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

МУДРИЛОВ МАКСИМ АНДРЕЕВИЧ

Роль вариабельного потенциала в развитии специфичного ответа фотосинтеза при действии локальных раздражителей различной природы

1.5.2 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

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

Нижний Новгород -2022

Оглавление

| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ4 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ВВЕДЕНИЕ6 |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11 |
| 1.1. Рецепция абиотических факторов растениями и индукция ими электрических сигналов11 |
| 1.1.1. Холод |
| 1.1.2. Высокие температуры |
| 1.1.3. Свет |
| 1.1.4. Механические стимулы |
| 1.1.5. Повреждение |
| 1.2. Дистанционные электрические сигналы растений |
| 1.3. Специфичность системных ответов, вызванных электрическими сигналами в растениях при действии разных стимулов |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ |
| 2.1. Объекты исследования |
| 2.2. Индукция электрических сигналов |
| 2.3. Электрофизиологические измерения |
| 2.4. Ингибиторный анализ 56 |
| 2.5. Измерение параметров фотосинтеза и транспирации |
| 2.6. Регистрация динамики pH с помощью флуоресцентного зонда 59 |
| 2.7. Определение содержания фитогормонов методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии |
| 2.8. Алгоритм обработки результатов на основе вейвлет-преобразования 62 |
| 2.9. Статистическая обработка |
| ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ |
| 3.1. Параметры вариабельного потенциала, индуцированного различными локальными раздражителями |
| 3.2. Ингибиторный анализ механизмов генерации и распространения вариабельного потенциала, индуцированного различными раздражителями 72 |

| 3.3. | Параметры | индуцированного | ВΠ | ответа | фотосинтеза | при | действии |
|------|--------------|--------------------|-------|---------|-------------|--------|------------|
| разл | ичных раздра | ажителей | ••••• | ••••• | | ••••• | |
| 3.4. | Анализ меха | низмов развития сп | ециф | ричного | функционалы | ного с | ответа при |
| дейс | твии раздраж | кителей различной | прир | оды | | ••••• | |
| 3AK | ЛЮЧЕНИЕ. | | ••••• | ••••• | | | |
| ВЫ | ВОДЫ | | ••••• | ••••• | | ••••• | 101 |
| ЦИТ | ГИРУЕМАЯ | ЛИТЕРАТУРА | | | | | |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМФ аденозинмонофосфат
- АБК абсцизовая кислота
- A-9-C anthracene-9-carboxylic acid
- 2-APB 2-aminoethyldiphenyl borate
- АТФ аденозинтрифосфорная кислота
- АФК активные формы кислорода
- Avp амплитуда вариабельного потенциала
- ВП вариабельный потенциал
- ГМФ гуанозинмонофосфат
- GLU глутамат
- DAMP молекулярные паттерны, связанные с повреждениями
- DPI дифенилениодоний
- EGTA ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
- FFA flufenamic acid
- ЖК жасмоновая кислота
- gS устьичная проводимость
- IP3 D-мио-инозитол-1,4,5-трифосфат
- $[Ca^{2+}]_c$ цитозольный Ca^{2+}
- НАДФ никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- NPPB 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid

- NPQ нефотохимическое тушение
- ПД потенциал действия
- PAM pulse-amplitude modulation
- PLD фосфолипаза D
- РІР2 фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
- РІРК фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы
- СК салициловая кислота
- СП системный потенциал
- ТЕА тетраэтиламмоний
- цАМ Φ циклический АМ Φ
- цГМ Φ циклический ГМ Φ
- ЭС электрический сигнал
- ЭТЦ электрон-транспортная цепь
- ${\it P}_{\rm PSI}$ квантовый выход фотосистемы I
- ${\it P}_{\rm PSII}-$ квантовый выход фотосистемы II

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

действию разнообразных неблагоприятных Растения подвержены факторов окружающей среды. Адаптация к этим факторам включает в себя физиологического комплексные изменения состояния растения, согласованность которых происходит при участии дистанционных сигналов. Среди дистанционных сигналов особый интерес представляют электрические сигналы (ЭС), которые, как известно, способны индуцировать системные себя ответы, включающие в 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 действия ЭC, потенциала (ПД), а именно: стандартного импульса деполяризации; вариабельного 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, 1997а), 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., 2020а). 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 Также специфичности стимулов. актуальным является изучение 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 вариабельного потенциала в индукции специфичного системного ответа фотосинтеза при действии различных локальных стимулов. В связи с поставленной целью, решались следующие задачи:

1. Анализ особенностей параметров вариабельного потенциала, индуцированного различными локальными стимулами.

2. Анализ механизмов, обуславливающих особенности параметров вариабельного потенциала при действии различных локальных стимулов.

3. Анализ специфичности ответа фотосинтеза, индуцированного вариабельным потенциалом, при действии различных локальных стимулов.

4. Анализ механизмов, лежащих в основе развития стимул-специфичного системного ответа.

Научная новизна

Выявлены характерные для быстро и медленно нарастающих стимулов особенности параметров вариабельного 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 вариабельного потенциала при действии различных раздражителей, особенностях механизма генерации и распространения и участия вариабельного потенциала в формировании специфичного 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 вариабельного 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 рН 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 (Wed of Science, Scopus), рекомендованных ВАК.

Апробация

Основные результаты работы представлялись на международных и всероссийских мероприятиях: Международной Пущинской школеконференции 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 работы

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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Рецепция абиотических факторов растениями и индукция ими электрических сигналов

Растения не могут избежать влияния неблагоприятных факторов внешней среды в силу своего прикрепленного образа жизни, что потребовало них выработки сложных механизмов реагирования на различные OT стрессоры. Поскольку в природных условиях существует значительная пространственная неоднородность действия различных природных факторов, важную роль в формировании адаптаций растений играют сигнальные системы. Эти системы в обязательном порядке включают в себя следующие компоненты: 1) рецептор, воспринимающий стрессор; 2) дистанционный сигнал, генерируемый рецепторам и распространяющий информацию о стрессоре по организму; 3) целевой орган или ткани, отвечающие на информацию, переданную дистанционным сигналом. Таким образом, после восприятия различных стимулов рецепторами локально генерируемые дистанционные сигналы распространяются по всему растению, играя решающую роль в формировании согласованной реакции, охватывающей все части организма растения, называемой системным ответом. Рассмотрение будет начато с механизмов рецепции стимулов.

1.1.1. Холод

Большинство исследований холодоиндуцированных электрических реакций выполнено либо путем импульсного охлаждения, либо постепенного охлаждение. В первом случае электрический ответ представляет переходную деполяризацию в форме единичного импульса (Carpaneto et al., 2007; Hafke et al., 2013; Minorsky and Spanswick, 1989; Nelles and Laske, 1982; Opritov et al., 2005). При охлаждении ледяной водой амплитуда составляет около 60-70 мВ, а длительность импульса не превышает минуты у обычных растений и несколько секунд у локомоторных (Fromm et al., 1995; Mousavi et al., 2013; Oda and Abe, 1972; Sibaoka, 1973). Импульсная деполяризация в зоне охлаждения не подчиняется характерному для ПД закону «все или ничего», а является градуальной в соответствии с амплитудой (и скоростью) падения температуры (Nelles and Laske, 1982; Minorsky and Spanswick, 1989; Opritov et al., 2005; Carpaneto et al., 2007; Hafke et al., 2013). Зависимость амплитуды электрического ответа от глубины охлаждения отображается типичной сигмоидной кривой с насыщением, полумаксимум амплитуды которого составляет всего несколько градусов. Быстрое импульсное охлаждение с большой вероятностью индуцирует ПД, распространяющийся за пределы зоны локального раздражения (Opritov et al., 2005; Sibaoka, 1973).

Медленное охлаждение со скоростью, не превышающей десятка градусов в минуту, также вызывает переходную деполяризацию клеток. К отличительным чертам электрической реакции при медленном охлаждении нужно отнести плавную деполяризацию, при достижении которой порогового уровня имеет место генерация ПД, как правило единичного. (Pyatygin et al., 1992; Опритов и др, 1991). В случае медленного градуального охлаждения хорошо проявляется такое характерное для рецепторных потенциалов свойство как аккомодация – зависимость порога возникновения ПД от Уменьшение скорости охлаждения. скорости охлаждения вызывает увеличение порога генерации ПД (Опритов и др, 1991), а уменьшение ниже критического уровня, составляющего около 0,5 °С/мин, ведет к лишь к плавной низкоамплитудной деполяризация без выраженного спайка (Minorsky and Spanswick, 1989; Nelles and Laske, 1982; Opritov et al., 2005).

Вход кальция в клетку, вероятно, играет центральную роль в холодиндуцированных изменениях электрического потенциала, о чем свидетельствуют экспериментальные данные ингибиторного анализа с использованием блокаторов кальциевых каналов и хелаторов Ca^{2+} . Такие блокаторы Ca^{2+} -каналов как LaCl₃ (Hafke et al., 2013; Krol et al., 2006; Minorsky and Spanswick, 1989), неомицин (Krol et al., 2003; Krol et al., 2004; Krol et al.,

2006), рутений красный (Krol et al., 2006) и верапамил (Krol et al., 2004; Vodeneev et al., 2006) вызывают значительное угнетение электрической реакции у целого ряда растений. К сходному эффекту приводит исключение Ca2+ из внеклеточной среды с помощью хелатора ethylene glycol-bis(2aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (Minorsky and Spanswick, 1989; Vodeneev et al., 2006). Угнетение холодоиндуцированной деполяризации вызывают также блокаторы анионных каналов клеток растений, такие как этакриновая кислота (Vodeneev et al., 2006), anthracene-9-carboxylic acid (A-9-C) (Krol et al., 2006), и 5-nitro-2-(3-phenylpropy1amino)-benzoic acid (NPPB) (Lewis et al., 1997). В формирование фазы реполяризации индуцированной холодом реакции, по-видимому, вносят вклад К⁺-каналы, что подтверждается увеличением амплитуды импульса при применении соответствующего блокатора тетраэтиламмония (TEA) (Krol et al., 2003; Krol et al., 2006). Другим участником формирования электрической холод-индуцированной реакции является протонный насос плазмалеммы, о что подтверждается выраженным эффектом применения его ингибиторов (Pyatygin et al., 1992; Vodeneev et al., 2006). При этом как активность H⁺-АТФазы (Vodeneev et al., 2006), так и вероятность открытия анионных каналов определяется концентрацией внутриклеточного кальция (Lewis et al., 1997).

Ключевую роль Ca²⁺ в генерации холод-индуцированных электрических реакций также подтверждает высокое сходство динамики концентрации свободного Ca²⁺ в цитозоле ([Ca²⁺]_c) и электрического мембранного потенциала, зарегистрированные одновременно (Carpaneto et al., 2007; Lewis et al., 1997). В случае резкого охлаждения «кальциевая сигнатура» имеет характерную импульсную форму, с длительностью, не превышающей несколько десятков секунд (Carpaneto et al., 2007; Knight and Knight, 2012; Krebs et al., 2012; Lewis et al., 1997). Как и для электрического ответа наблюдается зависимость амплитуды кальциевого пика глубины ОТ охлаждения (Carpaneto et al., 2007; Plieth et al., 1999). В случае постепенного охлаждения имеют место одиночные или повторяющиеся всплески

концентрации кальция по достижению температурой некоторого критического значения, а значительное снижение скорости охлаждения ведет к отсутствию характерного пика $[Ca^{2+}]_c$ (Plieth et al., 1999) как и электрической реакции. При этом источником входа кальция в цитозоль, по-видимому, могут выступать как вне-, так и внутриклеточные депо, о чем свидетельствует неполное подавление Ca^{2+} -сигнатуры при хелаторовании внеклеточного Ca^{2+} с помощью EGTA (Mori et al., 2018), а также эффект на кальциевую сигнатуру агентов, известных как блокаторы каналов, локализованных на внутренних мембранах клетки (Knight et al., 1996; Sangwan et al., 2001).

Интенсивные молекулярно-генетические исследования последних лет идентифицировать классифицировать позволили И ионные каналы, обуславливающие кальциевую проводимость (Demidchik et al., 2018). Они представлены следующими семействами: циклические нуклеотидноуправляемые каналы (CNGC), ионотропные рецепторы глутамата (GLR), двухпоровый канал (TPC), аннексины (ANN) и механочувствительные каналы (MCA, MSL, OSCA). Работы, выполненные на мутантах, дефицитных по определенному типу (или сочетанию) кальциевых каналов внесли серьезный вклад в расшифровку механизмов восприятия стимулов. Так показано снижение холод-индуцированного входа Ca²⁺ у растений арабидопсиса, дефицитных по механочувствительным кальциевым каналам MCA1/MCA2, наряду со снижением холодоустойчивости мутантных растений (Mori et al., 2018). Роль CNGC14 и CNGC16 из семейства CNGC, продемонстрирована в формировании кальциевого спайка при охлаждении на растениях риса (Cui et al., 2020). Роль последних подтверждается также данными о подавлении входа Ca²⁺ в присутствии блокатора рутений красный, рассматриваемого как селективный блокатор цАДФ-рибозо-зависимого высвобождениея Ca²⁺ (Krol et al., 2006), а также повышением их экспрессии при холодовом воздействии (Guo et al., 2018; Nawaz et al., 2014). Недавно было показано снижение холодиндуцированного входа Ca²⁺ у дефицитных по ANNEXIN 1 (ANN1) растений арабидопсиса (Liu et al., 2021). Другим потенциальным участником является

белок COLD1 (Ma et al., 2015), предполагаемый в качестве первичного датчика холода, рассматриваемых ниже. Дефицитные по COLD1 мутантные растения демонстрируют значительное подавление холод-индуцированной Ca²⁺ сигнатуры, при этом последние не изменялись под влиянием NaCl и воды комнатной температуры (Ma et al., 2015).

Приведенные данные могут указывать на комплексный характер холодиндуцированного кальциевого сигнала, вклад в формирование которого может вносить активация каналов нескольких типов. Последнее подтверждается дополнительным снижением входа Ca^{2+} у мутантных как по MCA1/MCA2 (Mori et al., 2018), так и по ANN1 (Liu et al., 2021) растений при добавлении блокаторов, таких как La³⁺ (Liu et al., 2021; Mori et al., 2018) и особенно Gd³⁺, известного блокатора механочувствительных каналов (Mori et al., 2018).

Тем не менее, остается вопрос о том, что вызывает активацию Ca²⁺каналов, т.е. является первичным датчиком холода. В принятой в настоящее время модели в качестве первичных реакций предполагают изменение текучести мембран и перестройку цитоскелета (Guo et al., 2018), за которой следует приток кальция, который запускает нижестоящие по течению реакции. Холод-индуцированные изменения вязкости липидного бислоя мембран или отдельных липидных рафтов рассматриваются как механизм активации механочувствительных MCA1/MCA2 (Guo et al., 2018; Knight and Knight, 2012; Murata and Los, 1997; Orvar et al., 2000). В пользу этого говорит подавление входа Ca²⁺ после псевдоразжижения мембран бензиловым спиртом в условиях холодового стресса (Orvar et al., 2000), наряду с подавлением холодиндуцированной экспрессии генов (Sangwan et al., 2001). Обратный эффект отмечен при повышении ригидности мембраны при применении диметилсульфоксида (Sangwan et al., 2001).



Рис. 1. Холод-индуцированная электрическая реакция (ЭР): А) Импульсное охлаждение: слева показано изменение электрического потенциала (Krol et al., 2004) и цитозольной концентрации свободного Ca²⁺ [Ca²⁺]_с на одиночный стимул, а справа показаны изменения для повторяющихся стимулов (Mori et 2018); В) постепенное al., охлаждение: слева показаны изменения электрического потенциала (Опритов и др., 1991) и $[Ca^{2+}]_c$ (Plieth et al., 1999), вызванные быстрым охлаждением, а справа — изменения, вызванные медленным охлаждением (V_m (Minorsky and Spanswick, 1989), $[Ca^{2+}]_c$ (Plieth et al., 1999)); С) зависимость амплитуды ЭР (в % от максимальной амплитуды) от глубины импульсного охлаждения у разных видов растений (Опритов и др., 1991; Carpaneto et al., 2011; Hafke et al., 2013; Minorsky and Spanswick, 1989); (D гипотетическая схема генерации холод-индуцированной ЭР. Пояснения даны в тексте. Черные линии — ЭР, красные — динамика [Ca²⁺]_с, синие динамика температуры. V_m – мембранный потенциал. Синие стрелки указывают на момент охлаждения.

Другим белком, чувствительным к изменению ригидности мембраны, или непосредственно воспринимающим охлаждение, в частности, в растениях риса, рассматривают COLD1 (Ma et al., 2015; Guo et al., 2018; Lamers et al., 2020). COLD1, представляющий собой трансмембранный белок, взаимодействует с а-субъединицей1 G-белка (RGA1), приводя к усилению активности ГТФазы и притоку Ca²⁺ в клетку (Ma et al., 2015; Guo et al., 2018).

Изменение активности Н⁺-АТФазы плазмалеммы, приводящее к деполяризации, может быть еще одним путем эффекта холодмембраны индуцированного повышения вязкости на электрический потенциал, что подтверждается сходными точками перегиба температурных зависимостей активности Н⁺-АТФазы, порога электрического ответа и конформационных перестроек липидного бислоя (Brauer et al., 1991; Pyatygin et al., 1992). При этом достижение порогового уровня деполяризации вызывает Ca^{2+} активацию потенциал-зависимых каналов И генерацию ПД. Са²⁺-каналов характеристики таких Биофизические хорошо изучены биофизически на основе изучения деполяризацией активируемой кальциевой проводимости (DACC) мембран (плазмалеммы) клеток растений, хотя, такая проводимость все еще не связана с каким-либо геном (Demidchik et al., 2018).

Как альтернативный прямой сенсор температуры обсуждается перестройка цитоскелета, что подтверждается, в частности, корреляцией перестройки микротрубочек критической температуры с холодочувствительностью растений (Nick, 2013) и хорошим соответствием интенсивность потока Ca²⁺ с уровнем организации микротрубочек при холоде (Mazars et al., 1997). Холодоиндуцированная деполимеризация микротрубочек предположительно, может вызывать активацию механочувствительных каналов (Mazars et al., 1997; Nick, 2013; Sangwan et al., 2001). В то же время, предполагается, что разрушение актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек инициирует вход Ca²⁺ (Mazars et al., 1997), что ставит деполимеризацию цитоскелета ниже по течению в восприятии холода. необходимость дальнейшего Несмотря изучения детальной на

последовательности событий при охлаждении, не вызывает сомнения факт необходимости наличия нативной структуры цитоскелета (Orvar et al., 2000; Hafke et al., 2013) для холод-индуцированных изменений концентраций Ca²⁺ и электрического ответа.

Таким образом, цепь событий развития холод-индуцированной реакции может быть представлена следующим образом (рис. 1). На начальном этапе понижение температуры вызывает изменения ригидности липидных мембран или рафтов в их составе и перестройку цитоскелета. Такие изменения могут приводить к активации механочувствительных Ca²⁺ каналов MCA1/MCA2, а также к снижению активности Н⁺-АТФазы. Дополнительно, по-видимому, имеет место активация кальциевых каналов CNGC14, CNGC16 и ANN1, пути которой не исследованы. Датчик холода COLD1 играет важную роль в обеспечении или регуляции холод-индуцированной кальциевой Активация соответствующих обуславливает проводимости. каналов формирование характерной холод-индуцированной сигнатуры [Ca²⁺]_c. В свою внутриклеточного кальция определяет активность очередь, динамика потенциал-определяющих систем ионного транспорта, таких как Н⁺-АТФаза, анионные и калиевые каналы. Активация анионных каналов и инактивация АТФазы ведут к формированию фазы деполяризации холод-индуцированного электрического импульса. Фаза реполяризации формируется при участии калиевых каналов и вследствие реактивации Н⁺-АТФазы вследствие снижения концентрации кальция в цитозоле. Вследствие превышения деполяризацией порогового уровня происходит генерация ПД, распространяющегося за пределы зоны локального охлаждения.

1.1.2. Высокие температуры

Локальные изменения электрического потенциала при высокотемпературном стрессе исследованы не столь детально по сравнению с охлаждением. Постепенный умеренный нагрев ведет к гиперполяризации мембраны, сменяющейся деполяризацией при превышении оптимума, который для теплолюбивых растений составляет более 30 °C (Filek and Koscielniak, 1997; Nelles and Laske, 1982; Опритов и др., 1991). Нагрев с высокой скоростью до высоких температур вызывает формирование глубокой с последующей медленной деполяризации реполяризацией. Распространяющаяся из зоны локального нагрева электрическая реакция представляет собой типичный ВП (Filek and Koscielniak, 1997; Stahlberg and Необходимо Cosgrove, 1997b). отметить, что перепад температур, необходимый для индукции ЭС в случае нагрева значительно больше в сравнении с охлаждением и достигает, судя по всему, несколько десятков градусов. Механизмы генерации электрической реакции непосредственно в зоне локального нагрева практически не исследованы, но предполагается ее связь с модуляцией активности Н⁺-АТФазы (Brauer et al., 1991; Nelles, 1985; Опритов и др., 1991).

Как и в случае холодового стресса, тепловой стресс вызывает вход Ca^{2+} в клетку (Gong et al., 1998; Liu al., 2003; Liu al., 2005; Saidi et al., 2011), который может служить индуктором электрической реакции. Кальциевая волна при нагреве отличается большой длительностью, значительно превышающей таковую для охлаждения, и крайне медленным возвращением на исходный уровень (Cui et al., 2020; Finka et al., 2012; Gong et al., 1998; Liao et al., 2017; Liu al., 2003; Wu et al., 2012) (рис. 2). Параметры кальциевого пика демонстрируют температурную зависимость – чем выше температура нагрева, тем более масштабный и с меньшим лаг-периодом вход кальция наблюдается (Gong et al., 1998; Wu et al., 2012). Фармакологический анализ показал роль в



Рис.2. Теплоиндуцированная электрическая реакция (ЭР): А) температурная зависимость мембранного потенциала клеток тыквы (Опритов и др., 1991); В) теплоиндуцированные ЭР растений пшеницы (неопубликованные данные) и динамика $[Ca^{2+}]_c$ при различных температурах стимула (Gong et al., 1998); C) зависимость вероятности генерации электрического сигнала (ЭС) от степени нагрева в Венериной мухоловке (Fabricant et al., 2021); D) гипотетическая схема генерации теплоиндуцированных ЭР. Пояснения даны в тексте. Черные линии – ЭР; красные линии — динамика [Ca²⁺]_c; синие линии — динамика мембранный _ потенциал. температуры. Vm V внеклеточный (поверхностный) электрический потенциал. Оранжевой стрелкой указан момент начала нагрева.

развитии сигнала внеклеточного Ca²⁺, вход которого подавляется как блокаторами кальциевых каналов плазмалеммы LaCl₃, 2-aminoethyldiphenyl

borate (2-APB) и flufenamic acid (FFA), так и хелаторами Ca²⁺ (Gong et al., 1998; Liao et al., 2017; Saidi et al., 2009; Wu et al., 2012).

В качестве основных участников формирования кальциевой волны при нагреве предполагаются Ca²⁺- каналы из семейства CNGC, в частности, CNGC2, CNGC6 (*Arabidopsis thaliana*) и CNGCb (их предполагаемый ортолог в *Physcomitrella patens*), для которых экспериментально продемонстрировано участие в росте цитозольного Ca²⁺ при повышении температуры (Gao et al., 2012; Finka et al., 2012; Katano et al., 2018), наряду с развитием теплоиндуцированной экспрессии генов и термотолерантности. Другими кандидатами из этого же семейства являются CNGC14 и CNGC16, для дефицитных мутантов которых на растениях риса было показано подавление тепло-индуцированного входа Ca²⁺ (Cui et al., 2020). Ряд исследований также демонстрируют возможность участии аннексинов в регуляции теплоиндуцированного ответа, а именно, ANN1, ANN2 и ANN4 (Liao et al., 2017; Qiao et al., 2015; Wang et al., 2015).

Первичная рецепция теплового стресса может быть связана с работой нескольких систем. Активация каналов семейства CNGC может быть опосредована цАМФ или цГМФ, продуцируемой при тепловом шоке неизвестной аденилатциклазой или гуанилатциклазой (Cui et al., 2020; Gao et al., 2012). Продемонстрировано, что при нагреве имеет место активация фосфолипазы D (PLD) и фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы (PIPK), с последующим накоплением различных сигнальных молекул, таких как фосфатидная кислота, фосфолипазы Сигнальных молекул, таких как фосфатидная кислота, фосфолипазы С9, сокращение активности которой в мутантных растениях ведет как к снижению продукции IP3, так и к снижению термотолерантности (Mittler et al., 2012; Zheng et al., 2012). Фосфолипаза С может регулировать активность Ca²⁺-каналов и зависимого от его входа ответа (Horvath et al., 2012; Liu et al., 2006; Gong et al., 1998). В качестве находящегося выше по течению участника сигнальных каскадов PLD и PIPK предполагается

G-белкок ARF6, однако экспериментальных подтверждений этого нет (Horvath et al., 2012).

Нельзя исключать, что, как и в случае понижения температуры, при ее повышении первичным рецептором выступает вязкость мембраны. На это указывает схожий с тепловым эффект бензилового спирта, который вызывет псевдоразжижение мембран, на концентрацию Ca²⁺ и экспрессию шаперонов, являющуюся типичным ответом на тепловой стресс (Saidi et al., 2009).

При рассмотрении индуцированной теплом ответной реакции нельзя не отметить возможную роль активных форм кислорода (АФК), уровень которых значительно повышается (Driedonks et al., 2015; Saidi et al., 2011; Suzuki et al., 2008; Volkov et al., 2006). Показано, что уровень повышения АФК зависит от степени нагрева, а ингибитор НАДФН-оксидаз DPI подавляет его накопление (Volkov et al., 2006). Под контролем АФК, редуцирующихся плазматическими НАДФН-оксидазами (возможно, через гомолог оксидазы респираторного взрыва С (RBOHC)), может, вероятно, находиться работа аннексинов, что делает аннексины вторичными сенсорами теплового стресса (Laohavisit et al., 2012; Richards et al., 2014). Наряду с ферментативным путем продукции $A\Phi K$ при тепловом стрессе важен вклад электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий и хлоропластов (Baxter et al., 2014; Choudhury et al., 2017). В сочетании с АФК в развитии ответа при тепловом стрессе может действовать NO, регулируя как ее уровни, так и активность нижестоящих путей (Xuan et al., 2010), причем последние исследования показали, что продукция NO может контролироваться Ca^{2+} , поступающим через канал CNGC6 (Peng et al., 2019).

В целом, имеющихся на сегодняшний день данных недостаточно для формирования целостной картины механизма восприятия теплового воздействия и генерации тепло-индуцированной электрической реакции, однако можно предположить следующее (рис. 2). Высокая температура повышает текучесть мембран, что воспринимается каналами CNGC и/или ANN. Другим важным событием является обусловленное как работой ферментативных систем (RBOH C), так нарушением работы ЭТЦ повышение

уровня АФК, что также может вызывать рост [Ca²⁺]_с. Результатом является формирование волны повышения внутриклеточного кальция, длительность которой значительно превышает таковую при холоде. Изменение активности, вероятно, находящихся под контролем внутриклеточного кальция, систем ионного транспорта обуславливает формирование глубокой и продолжительной деполяризации. В силу универсальности механизмов деполяризации в клетках растений, можно полагать, что наряду с H⁺⁻ATФазой в формирование деполяризации вносят вклад и анионные каналы.

1.1.3. Свет

Свет относится к числу важнейших факторов, контролирующих рост и развитие растений. Дистанционная электрическая сигнализация входит в число механизмов, отвечающих за реализацию регуляторной функции света. (Babla et al., 2019; Szechyńska-Hebda et al., 2017). Генерация ЭС в ответ на изменения освещенности продемонстрирована давно для многих видов растений (Szechyńska-Hebda et al., 2017). Тем не менее, механизмы индукции светом ЭС изучены недостаточно для формирования целостной картины. В текущем разделе суммируются известные сведения об индукции ЭС светом.

Достаточно типичной реакцией на освещение является переход электрического потенциала на новый гиперполяризованный уровень, которому предшествует кратковременная импульсная деполяризация (Ermolayeva et al., 1996; Krol et al., 2003; Roblin, 1982; Spalding et al., 1992a; Shabala and Newman, 1999; Trebacz and Zawadzki, 1985; Trebacz et al., 1997; Опритов и др., 1991; Elzenga et al., 1995; Szechynska-Hebda et al., 2010). Индуцированная деполяризация, вызванная освещением, обладает рядом свойств, характерных для рецепторных потенциалов. В первую очередь к числу таких свойств нужно отнести зависимость амплитуды электрической реакции от интенсивности света (Elzenga et al., 1995; Ermolayeva et al., 1996; Trebacz and Zawadzki, 1985; Trebacz and Sievers, 1998). При достижении

пороговых значений возникает ПД, подчиняющийся закону «все или ничего», способный к распространению, для которого характерно наличие рефрактерного периода (Ermolayeva et al., 1996; Roblin, 1982; Krol and Trebacz, 1999; Trebacz and Zawadzki, 1985; Trebacz and Sievers, 1998; Trebacz et al., 1989). Пороговые значения интенсивности света, индуцирующие генерацию ПД, составляют около 80 мкмоль м⁻² c⁻¹, что не выходит за границы ествественного освещения (Szechynska-Hebda et al., 2010; Trebacz and Zawadzki, 1985; Trebacz and Sievers, 1998).

Механизм формирования свето-индуцированной электрической реакции полностью не исследован, а имеющиеся сведения могут быть противоречивыми, что может быть связанно, в том числе, с выявленными различиями механизмов развития светоиндуцированных электрической реакции в клетках с определенной функциональной специализацией (Elzenga et al., 1995; Shabala and Newman, 1999). Ключевой стадией формирования свето-индуцированной электрической реакции, по-видимому, является активация Ca²⁺-каналов, обуславливающая его вход в клетку и последующую деполяризацию (Baum et al., 1999; Elzenga et al., 1995; Johannes et al., 1997; Krol and Trebacz, 1999; Li et al., 2019; Shabala and Newman, 1999; Trebacz et al., 1997). Это подтверждается, в частности, результатами по подавлению электрической реакции La^{3+} и нифедипином (Ermolayeva et al., 1996; Szechynska-Hebda et al., 2010). В дополнение к Ca^{2+} , или в качестве альтернативного формирования свето-индуцированной механизма деполяризации, предполагается вклад потоков анионов, в частности Cl-, возникающий вследствие активации анионных каналов (Elzenga et al., 1995; Li et al., 2019; Shabala and Newman, 1999). Так, А-9-С и NPPB, ингибиторы анионных каналов, снижают амплитуду светоиндуцированной электрической реакции у растений арабидопсиса и мха Conocephalum, хотя и не подавляли ее полностью (Cho and Spalding, 1996; Trebacz et al., 1997). Однако на другом объекте – мхе Physcomitrella, эффект продемонстрирован для NPPB и отсутствовал для А-9-С. Не совсем ясна роль К⁺-каналов, так в ряде работ

применение тетраэтиламмония (TEA), ингибитора K⁺-каналов, подавляло развитие спайка деполяризации при красном свете, однако при замене в среде K⁺ на Na⁺ реакция восстанавливалась (Ermolayeva et al., 1996; Trebacz et al., 1997). Тем не менее, другие работы предполагают участие K⁺-каналов в фазе реполяризации и продолжительной гиперполяризации (Baum et al., 1999; Krol et al., 2003; Li et al., 2019). К числу участников формирования светоиндуцированной ЭР относится также H⁺ -АТФаза. В частности, H⁺-АТФаза вносит вклад в формирование фазы реполяризации импульса, а также последующей гиперполяризации (Elzenga et al., 1995; Li et al., 2019; Shabala and Newman, 1999). Это подтверждается динамикой pH апопласта при действии синего и красного света (Staal et al., 1994). Также предположен вклад H⁺-АТФазы в формирование фазы деполяризации светоиндуцированного импульса, путем подавления ее активности (Krol and Trebacz, 1999; Spalding and Cosgrove, 1992b).

Изменение освещенности, как и действие других стимулов, вызывает переходное увеличение концентрации внутриклеточного Ca²⁺. Длительность пика составляет нескольких секунд до нескольких минут (Baum et al., 1999; Li et al., 2019). Продемонстрировано наличие спектральной зависимости амплитуды Ca²⁺ пика, в том числе наличие максимумов на длинах волн 440 и 470 нм (Baum et al., 1999). В то же время, нужно отметить высокую вариативность описанных в различных работах динамик [Ca²⁺]с, включая наличие нескольких волн Ca²⁺ (Baum et al., 1999; Li et al., 2019), а также отсутствие роста Ca²⁺ (Elzenga et al., 1995; Lewis et al., 1997). Отмеченная вариативность динамики Ca²⁺ может быть обусловлена функциональной специализацией клеток, в которых она регистрируется, а также видовыми особенностями растений.

На сегодняшний день достаточно хорошо изучено восприятие света различного спектрального состава и идентифицированы системы, ответственные за первичную рецепцию и активацию сигнальных каскадов. К таким системам относят криптохромы, фитохромы и фототропины.

Криптохромы отвечают за восприятие синего, отчасти ультрафиолетового и зеленого света (Lin, 2000; Whitelam, 1995; Quail, 2002), фототропины за восприятие синего света (Lin, 2000; Lin, 2002; Quail, 2002), а фитохромы – красного и дальнего красного (Franklin and Quail, 2010; Quail, 2002). Наряду с активацией специализированных рецепторных систем свето-индуцированные изменения электрического потенциала также могут быть обусловлены активацией фотосинтетических процессов. В этом ключе в первую очередь необходимо остановиться на спектральной зависимости электрической реакции, хотя данные довольно противоречивы. Есть работы, показавшие отсутствие электрической реакции при освещении любым светом, кроме синего (Spalding and Cosgrove, 1992а), в других работах показана индукция электрической реакции при совещении красным светом (Ermolayeva et al., 1996). При этом электрическая реакция на красный свет может быть не связана с работой фотосинтетического аппарата, поскольку переходная деполяризация наблюдалось на этиолированных растениях и при угнетении работы фотосистемы II с помощью DCMU (Elzenga et al., 1995; Ermolayeva et al., 1996). Результаты работ демонстрируют других значительное подавление светоиндуцированных электрических реакции DCMU (Krol and Trebacz, 1999; Trebacz and Zawadzki, 1985; Trebacz and Sievers, 1998;), а также близость спектральной зависимости амплитуды электрической реакции и спектра фотосинтетических пигментов (Trebacz et al., 1989).

В отношении непосредственного участия специализированных рецепторных имеются доказательства роли систем криптохромов, определяемых ранее как НҮ4, в развитии индуцированной синим светом ЭР, подавляемой в дефицитных мутантах. При этом развитие ЭР связывают с активацией анионных каналов, что подтверждается сходным с мутантными растениями эффектом блокатора анионных каналов NPPB (Parks et al., 1998). Можно полагать, что именно криптохромы ответственны за специфичность наблюдаемую активации анионных каналов, при синем свете, И отсутствующую при красном (Cho and Spalding, 1996). При этом показана

возможность активации анионных каналов синим светом без участия Ca²⁺ (Lewis et al., 1997). Имеется предположение, что вклад криптохромов в индукцию электрической реакции синим светом может контролироваться через фототропины (Folta and Spalding, 2001). В случае красного света предположена роль фитохромов в индукции электрической реакции, исходя из данных о ее развитии при облучении красным светом и его подавлении при одновременном облучении красным и дальним красным светом. Развитие деполяризации при этом связана, по-видимому, с индукцией входа кальция (Ermolayeva et al., 1996; Johannes et al., 1997). Причем вход Ca²⁺ связывают именно с фототропинами, а не криптохромами (Stoelzle et al., 2003). Важнейшим участником свето-индуцированных электрических реакций является H⁺-ATФаза плазмалеммы. Активность H⁺-ATФазы стимулируется фототропинами при освещении синим светом (Kinoshita et al., 2001). Предположительно, фототропины могут взаимодействовать с Н⁺-АТФазой, через протеинкиназу BLUE LIGHT SIGNALING 1 (BLUS1) и неизвестный компонент, протеинкиназу фосфотазу, возможно, ИЛИ которая взаимодействует с сайтами фосфорилирования H⁺-ATФазы и обеспечивает присоединение 14-3-3 белков, активирующих H⁺-АТФазы (Falhof et al., 2016).

Индукция светом сигналов возможна не только за счет активации специализированных рецепторных систем, но также и вследствие действия света очень высокой интенсивности, приводящему, по-видимому, к повреждению клеток. Так была продемонстрирована индукция световым стрессом распространяющейся волны АФК, продуцируемой при участии RBOHD, что было показано как на мутантных растениях, так и подавлением распространения волны ингибитором RBOH DPI (Devireddy et al., 2018; Szechynska-Hebda et al., 2010; Zandalinas et al., 2020b). Важно отметить, что распространяющаяся волна АФК, вероятно, лежит в основе передачи такого типичного для повреждения электрического сигнала как ВП. Продукцию H_2O_2 при световом стрессе связывают с клетками, расположенными вдоль сосудов, сама продукция АФК может проходить в две фазы и предполагается, что

источниками АФК являются три участка фотосинтетического аппарата: светособирающий комплекс ФСІІ, реакционный центр ФСІІ и акцепторный сайт ФСІ. Продукция АФК зависит от степени повреждения фотосинтетического аппарата (Galvez-Valdivieso et al., 2009; Pogson et al., 2008; Niyogi et al., 1999; Szechynska-Hebda et al., 2010), возможно, из-за нагревания на свету.

Таким образом, последовательность событий при индукции ЭС светом можно представить следующим образом. Действие света ведет к активации кальциевых и/или анионных каналов, генетическая принадлежность которых не идентифицирована. При синем свете активация анионных каналов, повидимому, связана с криптохромами, а кальциевых, можно предположить, с фототропинами. При красном свет возможна активация кальциевых каналов при участии фитохромов. Активация анионных и/или кальциевых каналов ведет к формированию деполяризации. Фаза реполяризации импульса, а также последующая продолжительная гиперполяризация, вероятно, обусловлены активацией протонной АТФазы и калиевых каналов.

1.1.4. Механические стимулы

Одним из самых часто действующих на растения в естественных условиях раздражителей является механический. Механические воздействия испытывает как побег, так и корень, вследствие гравитации, ветра, активности животных, твердости почв и т.п. Локальные механические стимулы требуют от растения быстрых ответных реакций, как в зоне раздражения, так и за ее пределами. Как и для стимулов другой природы для механорецепции характерно отсутствие специализированных органов чувств. Исключением являются, по-видимому, лишь специализированные рецепторные волоски ловушек насекомоядных (Iijima and Sibaoka, 1981; Procko et al., 2021; Sibaoka, 1991).

Неповреждающие механический стимул вызывает кратковременную переходную деполяризацию, имеющую импульсную форму (Iijima and Sibaoka, 1981; Oda and Abe, 1972; Opritov et al., 2005; Shimmen, 1996; Williams and Spanswick, 1976). Амплитуда электрической реакции зависит от силы механического стимула, а при достижении порогового уровня происходит индукция распространяющегося ПД (Sibaoka, 1991; Visnovitz et al., 2007). Такие особенности механо-индуцированный электрической реакции позволяют отнести ее к рецепторному потенциалу. Отмеченные особенности – зависимость амплитуды ответа от силы стимула и способность индуцировать ПД – характерны и для механо-индуцированных реакций нелокомоторных растений, как высших растений, так и классического модельного объекта электрофизиологии растений – харовых водорослей. Отметим, ЧТО зависимость амплитуды механоиндуцированной ЭР от силы прикосновения отличается от зависимости, вызванной холодиндуцированной ЭР. При этом для развития ПД достаточно небольшого прикосновения, эквивалентного капле дождя (Kaneko et al., 2005; Opritov et al., 2005).

Формирование механо-индуцированной электрической реакции связано. преимущественно с активацией ионных каналов, 0 чем свидетельствует значительное снижение электрического сопротивления мембраны (Shimmen, 1997). Ингибиторный анализ и эксперименты с варьированием ионного состава среды указывают на роль входящего потока кальция и выходящего потока анионов в формировании деполяризации (Hodick and Sievers, 1988; Kaneko et al., 2005; Shimmen, 1997; Shimmen, 1997b). При этом подавление входа кальция из внешней среды, как с помощью блокатора кальциевых каналов плазмаллемы La³⁺, так и хелатора ЭГТА не ведет к полному подавлению электрической реакции (Hodick and Sievers, 1988; Shimmen, 1997; Shimmen, 1997b; Kaneko et al., 2005; Vodeneev et al., 2007), что может указывать на значительный вклад анионов. Также имеются сведения о апопласта и закислении цитозоля заелачивании BO время механо-

индуцированной реакции, что, по-видимому, вызвано переходной инактивацией Н⁺-АТФазы (Vodeneev et al., 2007; Monshausen et al., 2009). При



Рис. 3. Электрическая реакция (ЭР), индуцированная механическим стимулом: A) ЭР (Опритов и др., 1991) и динамика $[Ca^{2+}]_c$ (Haley et al., 1995), индуцированная механическим стимулом; (Б) Зависимость амплитуды ЭР от энергии удара (Опритов и др., 1991); С) Гипотетическая схема генерации ЭР при действии механического раздражителя. Пояснения даны в тексте. Черные линии — ЭР, красные — динамика $[Ca^{2+}]_c$. V – внеклеточный (поверхностный) электрический потенциал. Зеленые стрелки указывают на момент механической стимуляции. Цифры над пиками $[Ca^{2+}]_c$ представляют силу ветра в H (r.u.).

этом, динамика изменений pH хорошо соответствует динамике внутриклеточного Ca^{2+} , а изменения pH подавлялись добавлением La^{3+} (Monshausen et al., 2009), что указывает на роль Ca^{2+} в модуляции активности H⁺-АТФазы. Стоит также отметить, что изменения pH при генерации механоиндуцированной реакции меньше таковых для холодо-индуцированных (Vodeneev et al., 2007), что, наряду с отмеченным выше значительным падением сопротивления мембраны, указывает на определяющий вклад пассивных потоков ионов в ее формирование.

Кальциевые сигнатуры В случае механической стимуляции представляют собой кратковременные спайки, длительность которых обычно не превышает нескольких секунд (Haley et al., 1995; Knight et al., 1991; Knight et al., 1992; Lewis et al., 1997; Monshausen et al., 2009). Амплитуда кальциевого пика (Haley et al., 1995; Knight et al., 1992), как и амплитуда изменений электрического потенциала проявляет зависимость от силы механического стимула. Блокатор LaCl₃ подавляет механо-индуцированный пик кальция, наряду с захлопыванием ловушки, при стимуляции сенсорных волосков мухоловки (Suda et al., 2020). Тем не менее, не исключено, что основным источником Ca²⁺ при механическом воздействии являются внутриклеточные компартменты, вследствие более значительного подавления механо- Ca^{2+} индуцированных спайков рутением красным, ингибитором внутриклеточных Ca²⁺ каналов (Haley et al., 1995; Hagihara and Toyota, 2020; Knight et al., 1992; Yao et al., 2008).

Наряду с пиком внутриклеточного Ca^{2+} при механической стимуляции зарегистрирован также и всплеск АФК. При этом степень продукции АФК меньше, чем при нагреве (Volkov et al., 2006). Показано, что в механоиндуцированный рост АФК, вклад в который вносит RBOHC, имеет схожую с Ca^{2+} динамику и ингибируется La^{3+} (Monshausen et al., 2009).

В качестве первичных рецепторов механического стимула рассматривают механочувствительные ионные каналы, в частности Ca²⁺- каналы. Так, можно предположить роль MCA1, из семейства белков с Mid1-

комплементарной активностью, обнаруженный в клетках корня арабидопсиса и отвечающий за восприятие твердости почвы (Furuichi et al., 2012; Hamilton et al., 2015a; Nakagawa et al., 2007). Также механочувствительным Ca^{2+} каналом, вероятно, является недавно открытый RMA (rapid mechanically activated channel), кодируемый геном DEK1 И предположительно располагающийся в плазматической мембране эпидермальных клеток. Этот Gd^{3+} , канал эффективно ингибируется известным ингибитором механочувствительных каналов в растениях, и слабо подавляется La³⁺ (Guerringue et al., 2018; Tran et al., 2017).

Для Droseraceae была предположено участие DmOSCA являющийся гомологом OSCA/TMEM63 у арабидопсиса, в развитии входа Ca²⁺ во время генерации электрической реакции, индуцированной прикосновением, однако, не исследовалось экспериментально. Отмечается, что ЭТО наряду с сенсорными волосками повышенная экспрессия DmOSCA имеет место в общую цветках и корнях, что может указывать на его роль В механочувствительности (Procko et al., 2021). В пользу этого предположения свидетельствуют также данные об механочувствительности при экспрессии в модельных клетках канала OSCA1.2, его гомолога в арабидопсисе. При этом, не исключено возможная работа и других каналов семейства OSCA/TMEM63 в механочувствительности, хотя, возможно, с более высоким порогом активации (Murthy et al., 2018).

В качестве первичных механо-сенсоров, вероятно, могут выступать не только Ca^{2+} -каналы. Рассматриваются также такие механочувствительные каналы как MSL9 и MSL10 из семейства MscS-Like (MSL), демонстрируют преимущественно анионную проводимость. Экспрессия указанных каналов имеет место в корне (Guerringue et al., 2018; Haswell et al., 2008; Hamilton et al., 2015а; Maksaev and Haswell, 2012). Предполагаемый анионный канал MSL8 может выполнять функцию механочувствительности в цветке при опылении (Hamilton et al., 2015а).

Активация механочувствительных каналов может быть обусловлена либо натяжением мембраны, либо натяжением связанных с ней компонентов цитоскелета (Nick, 2013; Toyota and Gilroy, 2013). В последнем случае именно цитоскелет отвечает за первичную рецепцию механического стимула, причем восприятие осуществляется путем изменения его структуры, что воспринимается механочувствительными каналами (Hagihara and Toyota, 2020; Yao et al., 2008; Nick, 2013). Экспериментальные данные свидетельствуют о необходимости нативного актинового цитоскелета для входа Ca^{2+} (Hagihara and Toyota, 2020; Shepherd et al., 2002; Yao et al., 2008). Его разрушение латрункулином А, приводит к увеличению концентрации Ca²⁺ в клетке, аналогичное индуцированному механическому воздействию. Основным депо Ca²⁺ при этом, вероятно, выступают внутриклеточные компартменты, о чем говорит подавление индуцированного деструкцией цитоскелета входа Ca^{2+} рутениевым красным (Hagihara and Toyota, 2020; Yao et al., 2008). Наряду с активновыми филаментами важную роль в механорецепции играют и микротрубочки путем изменения их ориентации при механическом воздействии (Nick, 2013; Toyota and Gilroy, 2013).

В целом, последовательность событий при генерации механоиндуцированной электрической реакции представляется следующей (рис. 3). Механический стимул приводит к активации механочувствительных каналов путем изменения структуры цитоскелета и/или изменения натяжения мембраны. Активируемые стимулом каналы, генетическая природа которых на сегодня неизвестна, но предполагается принадлежность к семействам (MCA, OSCA, MSL), обуславливают вход в клетку кальция и выход анионов. Вход Ca²⁺ ведет к повышению внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и совместно выходом анионов к формированию деполяризации.

1.1.5. Повреждение

Имеются довольно обширные сведения о наличии электрических реакций. индуцированных локальным повреждением. В естественных условиях локальные повреждения могут быть вызваны атакой травоядных, гусениц и др. Не затрагивая в настоящем обзоре биотические стрессоры, рассмотрим механическое повреждение и ожог, которые являются типичными индукторами ВП в целом ряде работ (Grams et al., 2009; Lautner et al., 2014; Vian and Davies, 2006). Очевидно, что во всех работах регистрируется распространяющаяся из зоны повреждения ЭС, вследствие невозможности измерения потенциала непосредственно в разрушенных клетках. Зона повреждения при этом является источником сигналов, распространяющихся в неразрушенные ткани и органы растения. К таким сигналам относится, в первую очередь, гидравлическая волна и химические сигналы (Huber and Bauerle, 2016; Vega-Muñoz et al., 2020). Гидравлическая волна при повреждении возникает вследствие совокупности факторов, к которым относятся высвобождение васкулярного сока из поврежденных клеток, а также повышение ионных концентраций (Malone and Stankovlc, 1991; Malone, 1992) Stankovic et al., 1997). Такой раздражитель как ожог дополнительно вызывает увеличение объема газа и давления в межклеточных пространствах и в ксилеме (Boari and Malone, 1993; Stahlberg et al., 2006). В совокупности это ведет к передаче гидравлического сигнала, проявляющегося в быстром увеличении давления ксилемы (Stahlberg et al., 2006).

Химический сигнал представляет собой молекулярные паттерны, связанные с повреждениями (DAMP). Первичные DAMP включают АТФ, фрагменты клеточной стенки или ферменты, разрушающие клеточную стенку и иные соединения, которые в норме имеют свою физиологическую роль в внутриклеточном гомеостазе и обнаруживаются вне клетки исключительно при ее повреждении, вызывая индукцию защитного ответа. Вторичные или индуцибельные DAMP — это эндогенные молекулы, которые активно

продуцируются или модифицируются во время гибели клеток и действуют исключительно как сигналы (Heil and Land, 2014; Vega-Muñoz et al., 2020). Как при ожоге, так и при механическом повреждении, выделяются различные DAMP из поврежденных клеток, которые крайне многочисленны, потому поэтому остановимся только на тех, которые с высокой степенью вероятности могут индуцировать ЭР.

Одним из вероятных индукторов ЭР при повреждении является глутамат (GLU), в свете того факта, что для его рецепторов GLR3.3 и GLR3.6 показано участие в качестве Ca^{2+} -каналов, вносящих вклад в формирование дистанционных ЭС (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018; Salvador-Recatala, 2016).

Олигогалактурониды (OG) высвобождаются из клеточных стенок в результате фрагментации гомогалактуронана полигалактуроназами (PG). OG воспринимаются рецептором wall-associated kinase 1 (WAK1) и WAK2, трансмембранными белками, связывающими OG, наряду с полигалактуроновой кислотой и пектинами (Decreux and Messiaen, 2005; Heil and Land, 2014; Li et al., 2020; Vega-Muñoz et al., 2020), что вызывает быстрое (в течение нескольких минут) повышение $[Ca^{2+}]_c$ и Ca^{2+} -зависимую активацию НАДФН-оксидазы, приводя к всплеску H_2O_2 в сосудах растения (Hu et al., 2004).

Высвобожденный при повреждении клеток АТФ может распознаваться семейством расположенных на плазматической мембране P2-рецепторных киназ 1 (P2K1), вероятно, LecRK-I.9 (киназа, подобная рецептору лектина L-типа) (Chen et al., 2017; Li et al., 2020; Tripathi and Tanaka, 2018), приводя к опосредованному Ca²⁺ росту НАДФН-оксидазной активности (RBOHD) путем фосфорилирования и всплеску АФК (Chen et al., 2017; Song et al., 2006).

НАД⁺ и НАД Φ^+ также способны выступать в качестве первичных DAMP, их рецепторами потенциально могут выступать киназы лектинового рецептора LecRK-VI.2 и, возможно, LecRK-I.8 (только для НАД⁺) (Heil and Land, 2014; Li et al., 2020; Vega-Muñoz et al., 2020; Wang et al., 2017), которые

путем образования комплекса с корецептором BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATIVE1 KINASE1 (BAK1) способны запускать защитный ответ, многие аспекты развития которого пока не ясны (Li et al., 2020; Wang et al., 2019). Тем не менее, показано, что для его развития необходимо участие Ca²⁺ (Zhang and Mou, 2009).

Ряд белковых соединений, таких как системин и белковый элиситорный пептид 1 и 3 (Рер1 и Рер3) выступают как вторичные DAMP, продукция активируется в ответ на высвобождение внутриклеточных которых предшественников или активаторов синтеза. Для системина и PEP1 выявлено по два рецептора - SYSTEMIN RECEPTOR1 и 2 (SYR1и SYR2), и рецептороподобные киназы PEP рецептора 1 и 2 (PEPR1 и PEPR2), соответственно. Однако, их продукция вторичных DAMP в большинстве своем наблюдается через десятки минут после повреждения (Heil and Land, 2014; Li et al., 2020; Vega-Muñoz et al., 2020), что не предполагает их вклад в индукцию быстрых электрических реакций. Тем не менее, для PEP1 отмечена Ca²⁺-зависимая выработка менее чем за одну минуту после повреждения (Hander et al., 2019). Также сообщается, что его апликация вызывает активацию Ca²⁺-каналов (Krol et al., 2010). В частности, PEP1-зависимая активация была показана для каналов CNGC2 (Ma et al., 2012) и CNGC19 (Meena et al., 2019) Pep1.

Можно предположить, что последовательность событий при индукции дистанционного стрессового сигнала в ответ на повреждающее воздействие состоит в следующем. Повреждение клеток вызывает выход разнообразных первичных и вторичных DAMP, в том числе глутамата, OG, PEP1 и AФK, который способен приводить к активации лиганд-чувствительных Ca²⁺ каналов. Одновременно при повреждении индуцируется гидравлическая волна, способная активировать механочувствительные Ca²⁺-каналы. Вход Ca²⁺ приводит к развитию деполяризации в неповрежденных клетках. Таким образом, распространение DAMP и гидравлической волны может служить индуктором ЭС в неповрежденных клетках.
1.2. Дистанционные электрические сигналы растений

Рассматривая возможность участия дистанционных электрических сигналов в передаче информации в растениях, в первую очередь необходимо отметить наличие трех их типов, а именно, ПД, ВП и СП (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016). Рассмотрим их подробнее.

Потенциал действия (ПД) представляет собой системно распространяющуюся переходную деполяризацию характерной импульсной формы амплитудой от нескольких десятков мВ до ста мВ и длительностью от нескольких секунд (у локомоторных) до нескольких десятков секунд (у обычных) растений. ПД возникает по пороговому принципу и подчиняется закону «все или ничего», также имеется рефракторный период, длительность которого может быть от нескольких секунд (у локомоторных) до нескольких минут (у обычных) (Choi et al., 2016; Fromm and Lautner, 2007; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). Генерация ПД связана с активацией потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов, молекулярная природа которых остается неопределенной (Demidchik et al., 2018). Увеличение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме вызывает активацию анионных каналов. Одновременно, активация кальций-зависимых, протеинкиназ, идет фосфорилирующих Н⁺-АТФазы плазматических мембран, что приводит к снижению их активности. Вход Ca²⁺, инактивация протонной АТФазы и выходящий поток Cl⁻ ведут к формированию фазы деполяризации ПД. Деполяризация, в свою очередь, приводит к активации потенциалчувствительных К⁺ каналов, который формирует первый этап фазы реполяризации ПД. Наблюдаемая вследствие удаления ионов Ca²⁺ из цитозоля активация H⁺-АТФаз формирует второй этап реполяризации (Choi et al., 2016; Fromm and Lautner, 2007; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019).

ПД, являясь самораспространяющимся электрическим сигналом электротонически передается на большие расстояния со скоростью 1-10 см/с

по элементам флоэмы и на соседние клетки через мембранные связи в плазмодесмах (Опритов и др, 1991; Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). Прохождение электрического импульса вызывает сдвиги в концентрациях ПД-формирующих ионов в клетках, где произошла его генерация. Такими ионами, в частности, являются Ca^{2+} и H⁺, важнейшие регуляторы внутриклеточных процессов, отвечающие за индукцию связанных с ПД системных ответов (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016).

Вариабельный потенциал (ВП) представляет собой переходную деполяризацию нерегулярной формы, амплитудой несколько десятков мВ и длительностью до нескольких десятков минут (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016). B отличие от ПД, ВП не подчиняется закону «все или ничего» и различается по амплитуде и продолжительности деполяризации в зависимости от вызвавшего его стимула. Ведущая роль в формировании волны деполяриации принадлежит Ca²⁺-индуцированному снижению активности Н⁺-АТФазы, показанную сходной временной кинетикой изменения потенциала при генерации ВП и изменения pH в апопласте (Vodeneev et al., 2006; Sukhov et al., 2014), причем продолжительность сдвигов ионных концентраций в случае ВП намного превышают характерные для ПД времена (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019; Vodeneev et al., 2015). Роль ионов Ca^{2+} в активации ВП подтверждается тем, что удаление из среды вызывает значительное угнетение генерации ВП (Katicheva et al., 2014). Кроме того, данные ингибиторного анализа показали участие Ca²⁺-каналов в генерации ВП, причем, вероятно, нескольких типов, в том числе, механочувствительных (Furch et al., 2009). Непосредственно связь ионов Ca²⁺ может осуществляться через Ca²⁺зависимые протеинкиназы (Choi et al., 2016).

Также ВП не является самораспространяющимся электрическим сигналом, а является локальным электрическим ответом, индуцированным распространением гидравлической волны и химического агента (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019; Vodeneev et al., 2015). Химическим агентом может выступать $A\Phi K$, с самоподдерживающейся волной которой связывают распространение ВП (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). Инициация ВП связана с активацией лиганд-зависимых ИЛИ механочувствительных кальциевых каналов. В частности, предположена роль GLR3.1, 3.2, 3.3 и 3.6 в формировании ВП (Mousavi et al., 2013; Nguyen et al., 2018). Гидравлическая волна может восприниматься механочувствительными каналами не выявленной природы, однако, они скорее всего принадлежат к семейств: MSL (MscS-подобные подобные одному ИЗ трех или механочувствительным каналы малой проводимости), MCA (каналы MID-1 комплиментарной активности) и ТРК (двухпоровые калиевые) (Hamilton et al, 2015; Monshausen and Haswell, 2013). Наибольший интерес представляют первые семейства, поскольку, представители третьего семейства на данный момент обнаружены только на тонопласте (Hamilton et al, 2015). К тому же, именно среди семейств MSL и MCA имеются кальциевые каналы (Hamilton et al, 2015), которые вносят определяющий вклад в генерацию вариабельного потенциала (Fromm and Lautner, 2007; Katicheva et al., 2014).

Системный (CП) представляет собой потенциал системно распространяющееся изменения мембранного потенциала В сторону гиперполяризации различной амплитуды и длительности. Механизм развития СП предположительно заключается в активации работы H⁺-ATФазы. Данный тип сигнала является наименее изученным и, судя по всему, индукцируется лишь глутаматом и двухвалентными ионами, нанесенными на рану (Huber and Bauerle, 2016; Zimmermann et al., 2009; Zimmermann et al., 2016), потому далее рассматриваться не будет. Тем не менее, сам факт наличие различных типов

ЭС у растений увеличивает возможность передачи информации посредством передачи сигнала определенного типа в ответ на определенный тип стимула.

наблюдается Действительно, при общем рассмотрении определенная специфичность различных типов электрических сигналов в отношении индуцировавших их стимулов. Так, генерация ПД наблюдается в ответ на разнообразные, в основном, не повреждающие воздействия, такие как холод (Fromm et al., 2013; Lautner et al., 2005; Oda and Abe, 1972; Sibaoka, 1973), электрический ток (Fromm and Bauer, 1994; Sibaoka, 1973; Williams and Spanswick, 1976), изменение освещенности (Trebacz and Sievers, 1998) и механическое прикосновение (Böhm et al., 2016; Iijima and Sibaoka, 1981; Oda and Abe, 1972; Hodick and Sievers, 1988; Williams and Spanswick, 1976). Генерация ВП имеет место при действии повреждающих стимулов (Choi et al., 2016; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016), таких как механическое повреждение (Kurenda et al., 2019; Mousavi et al., 2013; Salvador-Recatala et al., 2014; Stahlberg and Cosgrove, 1994; Vodeneev et al., 2018), ожог (Grams et al., 2009; Kaiser and Grams, 2006; Roblin, 1985; Stankovic and Davies 1996; Vodeneev et al., 2018; Yudina et al., 2020) и нагрев до высокой температуры (Julien et al., 1991; Stahlberg and Cosgrove, 1997b). В то же время, детальный анализ дает более сложную картину. В частности, при механическом повреждении, относительно небольшом, таком как укол иглой и даже более серьезном, таком как отсечение части листа, возникает сигнал по типу ПД (Furch et al., 2008; Krausko et al., 2017; Sibaoka, 1973). Также как ПД классифицирован сигнал в ловчем листе Dionea (Fabricant et al., 2021), в бобах (Vicia) (Filek and Koscielniak, 1997) и картофеле (Solanum) (Fisahn et al., 2004), при использовании такого типичного индуктора ВП как повышение температуры. Наряду с «чистыми» реакциями, представляющими быстрый импульс ПД и медленную волну изменения потенциала ВП, нельзя не отметить также распространения сложных комплексных реакций. Первый тип таких комплексных реакций представляет собой типичную для ВП медленную волну потенциала, на фоне которой возникают быстрые электрические импульсы

(Roblin, 1985; Salvador-Recatalà, 2016; Stahlberg and Cosgrove, 1994), обозначаемые в отдельных работах как «сопутствующие» ПД. Другой тип комплексных реакций, по всей видимости, представляет собой независимо распространяющиеся как ПД, так и ВП, например, при ожоге листа (Dziubinska et al., 2003; Roblin, 1985; Zimmermann and Felle, 2009) или при механическом повреждении (Zimmermann et al., 2013). Четкое разделение комплексной реакции на две составляющих имеет место с увеличением расстояния от зоны раздражения вследствие различных скоростей распространения сигналов – ВП отстает от ПД (Dziubinska et al., 2003; Roblin, 1985).

В целом, можно констатировать наличие определенной специфичности типа генерируемого сигнала в зависимости от природы, и вероятно, интенсивности абиотического стимула.

Далее следует рассмотреть специфичность дистанционных ЭС от особенностей параметров ЭС определенного типа, индуцированных разными стимулами. В отношении ПД, несмотря на разнообразие индуцирующих его стимулов, можно констатировать относительное постоянство его параметров, в независимости от типа индуцирующего стимула (Davies et al, 1997; Stankovic and Davies 1996; Oda and Abe, 1972; Sibaoka, 1973). Отсутствие стимулспецифических черт объясняется природой ПД. ПД у растений, как и у животных, представляет собой самораспространяющийся электрический сигнал, подчиняющегося «закону все-или-ничего». Т.е. возбудимая клетка, в которой достигнут пороговый уровень деполяризации будет генерировать стандартный электрический импульс, а его амплитуда и длительность не будут зависеть от параметров стимула (Fromm and Lautner, 2007; Huber and Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021).

Можно отметить, по-видимому, лишь видо-специфичные особенности ПД, выраженные главным образом различиями в длительности и скорости распространения импульса для локомоторных и нелокомоторных растений (Farmer et al., 2020). Так, длительность ПД у локомоторных растений составляет всего несколько секунд при скорости распространения до 8-9 см/с,

в то время как у нелокомоторных длительность достигает десятков секунд при скорости распространения менее 3 см/с (Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021; Sukhov et al., 2019). Также есть отдельные работы, показывающие определенную вариативность параметров ПД в зависимости от направления распространения и органа, в которых они зафиксированы (Lautner et al., 2005; Sibaoka, 1973).

В целом, можно полагать, что распространяющийся в пределах одного органа в растении ПД за пределами зоны локального раздражения не имеет стимул-специфических черт. Т.е. этот электрический сигнал несет информацию о самом факте действия стимула, но не о его природе, за исключением принадлежности стимула к характерным ПД-, а не ВПиндуцирующим.

Анализ специфичности параметров ВП от типа стимула дает иную картину в сравнении с ПД. В первую очередь необходимо отметить значительную вариабельность параметров ВП, индуцированных различными стимулами, откуда собственно И получила название реакция. Так, механическое повреждение, такое как отсечение корня (Stahlberg and Cosgrove, 1992; Stahlberg and Cosgrove, 1994), раздавливание листа (Vodeneev et al., 2018) или его рассечение (Maffei et al., 2004; Mousavi et al., 2013), часто вызывает ВП, имеющий форму растянутого импульса длительностью несколько минут. Реакция на ожог характеризуется большой длительностью, до десятков минут, имеет нерегулярную форму, а крайне медленная реполяризация часто не обеспечивает полного восстановления потенциала за время регистрации, составляющее обычно более получаса (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2014; Sukhov et al., 2014; Surova et al., 2016; Vian and Davies, 2006; Vodeneev et al., 2012; Vodeneev et al., 2018; Yudina et al., 2020). В случае постепенного нагрева реакция также отличается большой длительностью, но более регулярной формой в сравнении с ожогом (Julien et al., 1991; Vodeneev et al., 2018). Также стоит отметить зависимость амплитуды ВП не только от

типа стимула, но и от площади повреждения (Roblin, 1985) и интенсивности стимула (Stahlberg and Cosgrove, 1997а).

В случае ВП наряду с собственно параметрами ВП, такими как И длительность, важно также ИХ амплитуда изменение ПО мере распространения реакции. Наличие декремента амплитуды и скорости распространения ВП традиционно отмечается как отличающее его от ПД свойство (Fromm and Lautner, 2007; Huber and Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021). При этом наличие декремента хорошо согласуется с представлениями о том, что ВП не является самораспространяющимся электрическим сигналом, а представляет собой локальную электрическую реакцию, индуцированную гидравлическим или химическим сигналом (Fromm and Lautner, 2007; Huber and Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021).

Чем обусловлена стимул-специфичность параметров ВП? Механизмы специфичности дистанционных стрессовых сигналов растений до сих пор не изучены, но может быть выдвинута гипотеза, опирающаяся на особенности распространения этого дистанционного стрессового сигнала растений. Распространение ВП носит сложный характер и связано с тем, что ВП представляет собой комплексный дистанционный сигнал, представляющий собой взаимодействие электрической, гидравлической и химической волн (Huber and Bauerle, 2016; Vodenev et al., 2015). Химический механизм трансдукции ВП предполагает распространение по сосудам из зоны повреждения «раневого вещества» (фактор Рикка). Можно полагать, что таким соединением является H_2O_2 , для которого показано системное распространение при механическом повреждении, тепловом шоке и световом шоке (Devireddy et al., 2018; Miller et al., 2009; Slesak et al., 2008; Volkov et al., 2006), вероятно, продуцируемой RBOHD (Miller et al., 2009). Сама генерация ЭР может быть связана с активацией каналов семейства GLR (Miller et al., 2009; Mousavi et al., 2013; Nguyen et al., 2018; Salvador-Recatalà, 2016; Toyota et al., 2018), хотя тип АФК-активируемых Ca²⁺ не был идентифицирован генетически (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2011) (возможно по другому стоит

написать). Не исключено участие вакуолярных Ca²⁺-каналов типа TPC1, хотя они, скорее всего, выполняют функцию усилителя Ca²⁺-сигнала (Choi et al., 2016; Kiep et al., 2015). Это дополнительно подтверждается распространением Ca^{2+} индуцированной повреждением волны по сосудам растения. коррелирующей по своим параметрам с параметрами электрического сигнала (Nguyen et al., 2018; Toyota et al., 2018). Волна Ca^{2+} , в свою очередь, будет интегрирована с волной ROS путем Ca²⁺-зависимой активации RBOH, что вызовет увеличение производства ROS (Choi et al., 2016; Choi et al., 2017; Chen et al., 2017; Farmer et al., 2020; Kawarazaki et al., 2013; Song et al., 2006), обеспечивая самоподдержание распространяющейся волны. Это доказывется косвенными данными ингибиторного анализа, по которым применение LaCl₃ Ca²⁺-каналов) (ингибитора DPI И (ингибитора RBOH) подавляло распространяющийся системный ответ при механическом повреждении, однако авторы предположили, что Ca²⁺ необходим лишь для инициации первоначальной продукции АФК (Miller et al., 2009).

Индуктором электрических изменений при ВП может являться также и гидравлическая волна, о чем убедительно свидетельствуют результаты о возможности индуцировать ВП путем искусственного повышения давления (Stahlberg and Cosgrove, 1997; Stahlberg and Cosgrove, 1997b; Stankovic et al., 1997). Распространение гидравлической волны индуцирует генерацию ВП за счет активации механочувствительных Ca^{2+} -каналов (Stahlberg and Cosgrove, 1997b; Stahlberg et al., 2006; Huber and Bauerle, 2016; Vodeneev et al., 2015), возможно, из семейств OSCA1, MSL или MCA, хотя точных данных о генетической принадлежности каналов сегодня нет (Demidchik et al., 2018; Gilroy et al., 2016).

Основной гипотезой, объясняющей различия в параметрах ВП, индуцированных разными стимулами, может быть различный вклад компонентов в комплексный сигнал. Так, например, в случае нагрева, вероятно, преобладает химический сигнал. Выделяющиеся в зоне нагрева большие количества ROS, по-видимому, индуцируют формирование

самоподдерживающейся волны, обеспечивая бездекрементное распространение ВП. В случае механического повреждения и ожога, вероятно преобладает гидравлическая волна. На это указывает и более высокая начальная скорость ВП при механическом повреждении и ожоге, в сравнении с нагревом (Vodeneev et al., 2018). Но при таких стимулах имеется относительно небольшая площадь контакта с поврежденной областью, что не дает высвобождения для дальнейшего распространения (в проводящие пучки) достаточного количества «раневого вещества». Вследствие недостаточности количества АФК для самораспространяющейся волны, имеет место затухание ВП.

При рассмотрении распространения ЭС нельзя не отметить связанные с генерацией ЭС сдвиги концентраций кальция и протонов в клетках и апопласте (Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021). Известно, что кальциевая сигнатура определяет параметры индуцируемого ответа, в частности в случае экспрессии генов или продукции гормонов (Farmer et al., 2020; Guo et al., 2018; Knight and Knight, 2012). В отношении сигнатуры pH, развиваемой следствии подавления активности H⁺-ATФаз в ходе генерации ЭС, такого рода исследования пока не выполнены, но отмечено также, в частности, хорошее соответствие между динамикой рН при генерации сигнала и динамикой индуцируемого им ответа фотосинтеза. В свою очередь, сигнатуры кальция и рН, вероятно, близки к динамике электрического потенциала. Поэтому, несмотря на то что особенности сигнатур Ca²⁺ и pH при распространении пока ЭС, не изучены, можно полагать что для них имеются особенности, сходные с таковыми для ЭС (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019; Vodeneev et al., 2015).

В целом, завершая рассмотрение специфичности дистанционных электрических сигналов у растений можно констатировать наличие возможности вызывать специфичные изменения за пределами зоны локального раздражения несмотря на то, что как ПД, так и ВП представляют

собой переходную деполяризацию. Одним из путей являются генерируемые в ходе развития электрических сигналов Ca²⁺ и pH сигнатуры, которые могут обеспечивать преобразование сигнала в функциональный ответ. Другим потенциальным путем кодирования информации является комплексная природа ВП, представляющего совокупность электрического, гидравлического и химического сигналов. Таким образом, электрические сигналы могут обеспечивать передачу информации о природе и силе действующих локальных стимулов.

1.3. Специфичность системных ответов, вызванных электрическими сигналами в растениях при действии разных стимулов

Несмотря на продолжительную историю изучения ЭС у растений, на сегодняшний день не вполне ясно, способны ли растения дешифровать сигналы и специфично отвечать на стимулы, их вызвавшие, или же ответ имеет характер универсальной стрессовой реакции, обуславливающей формирование неспецифической системной приобретенной акклимации. Наиболее хорошо изучены индуцированные ЭС «очевидные» ответы в специализированных структурах и органах, где такие сигналы имеют чётко определённую функцию и конкретные клетки/ткани мишени. К таким специализированным структурам, в первую очередь, можно отнести двигательные органы насекомоядных И чувствительных растений: складывающиеся листья мимозы, ловушки венериной мухоловки, росянки и т.д., где ПД, возникающие в рецепторных зонах, вызывают быстрое складывание листьев или закрывание ловушки и синтез пищеварительных ферментов (Böhm et al., 2016; Iijima and Sibaoka, 1981; Hodick and Sievers, 1988; Krausko et al., 2017; Oda and Abe, 1972; Sibaoka, 1991 Williams and Spanswick, 1976).

Другим примером «узкой специализации» ПД можно считать его генерацию в органах размножения. Известно, что в пестике цветка ПД

возникают через несколько минут (Sinyukhin and Britikov, 1967; Fromm et al., 1995) или несколько часов (Spanjers, 1981) после попадания на рыльце пыльцы своего вида. Возникающие в результате опыления ПД запускают комплекс процессов, включая активацию дыхания, накопление АТФ, крахмала, что энергетическую обеспеченность повышает завязи вероятность И оплодотворения (Sinyukhin and Britikov, 1967; Fromm et al., 1995). Также описано влияние ПД на другие процессы оплодотворения. Так, у *Mimulus* и Incarvillea ПД способствуют формированию влажной камеры из лопастей рыльца, у липы ПД стимулируют нектарообразование и нектаровыделение, а у гаметофитов папоротников ПД вызывают гуттацию, необходимую для оплодотворения (Опритов и др., 1991).

ПД сам по себе, по-видимому, не несёт информацию о вызвавшем его стимуле. Это подтверждается сходством ответов, индуцированных ПД, которые вызваны стимулами различной природы. У венериной мухоловки захлопывание ловушки, происходит не только вследствие распространения ПД, индуцированного контактом чувствительных волосков с добычей, но также такими стимулами как механический, электрический, изменение освещённости и температуры (Hodick and Sievers, 1986; Trebacz et al., 1997; Trebacz and Sievers, 1998; Krol et al., 2006). У мимозы складывание листьев происходит не только при индукции ПД прикосновением, но и при повреждении, охлаждении, нагреве, изменении освещённости, электрической стимуляции, действии ионизирующего излучения (Hug et al., 1964; Volkov et al., 2010; Hagihara and Toyota, 2020). Отсутствие строгой связи между ПД, индуцированным ΠД стимулом, вызывающим И ответом В нераздраженных частях растения показано также на уровне экспрессии генов. Так ПД, вызванные электрической стимуляцией, механическим повреждением и нагревом вызывают усиление экспрессии гена PROTEINASE INHIBITOR 2 (pin2) со сходной динамикой (Stankovic and Davies, 1996; Fisahn et al., 2004).

Несмотря на одинаковые параметры подчиняющегося «закону все-илиничего» ПД, растения обрели способность развития стимул специфических функциональных ответов с использованием сигнала этого типа. Во-первых, можно отметить вероятность возникновения и распространения ПД при действии определенных стимулов. Так, при оплодотворении вероятность распространения ПД выше при перекрёстном, чем при самоопылении, что способствует генетическому разнообразию потомства. Пыльца растений других видов ПД не вызывает (Spanjers, 1981). При механической стимуляции рыльца без пыльцы ПД возникает, но не доходит до завязи и процесс подготовки к оплодотворению не запускается (Sinyukhin and Britikov, 1967).

Также, для передачи информации растения могут, как и животные, использовать частотное кодирование. У растений имеется способность декодирования информации на основе частотной модуляции и количества распространяющихся ПД. Когда насекомое посещает ловушку Dionaea muscipula и стимулирует механорецепторы, генерируются ПД. Ловушка закрывается в том случае, если добыча за счёт касания чувствительных волосков индуцировала не менее 2 ПД с промежутком не более 30 секунд. Дополнительные ПД вызывают более сильное и продолжительное сжатие ловушки и запускают синтез жасмоновой кислоты (ЖК). По достижении количества ПД пяти запускается экспрессия генов гидролаз, разрушающих добычу (Böhm et al., 2016; Pavlovic et al., 2017). Другое насекомоядное растение росянка способно генерировать ПД как при попадании добычи, так и при механической стимуляции, но кормление вызывает серию ПД, а механический стимул – одиночные ПД. В результате, в обоих случаях происходит скручивание ловушки, но обнаруживается разное количество и распределение по ловушке жасмонатов и пищеварительных ферментов (Krausko et al., 2017).

Наряду с частотным кодированием, по-видимому, может иметь место пространственное кодирование информации, передаваемой посредством ПД. Так, например, по-разному происходит скручивание ловушки и накопление жасмоната у росянки, в зависимости от того, какой из волосков – центральный или краевой затронуты. Если добыча попала в середину ловушки, краевые

волоски изгибаются к центру, при этом предполагается следующая последовательность событий: серии ПД у центральных волосков - градуальный потенциал и накопление жасмонатов - движение краевых волосков. Если добыча попала на край ловушки, краевые волоски быстро изгибаются поодиночке, движение индуцируется собственными сериями ПД с определёнными количеством и частотой (Krausko et al., 2017).

Способность частотного и пространственного декодирования сигналов, передаваемых посредством ПД, присуща, вероятно, только узкоспециализированным органам растений, главным образом локомоторным. В целом, более типична ситуация, когда стимул вызывает распространение одиночного ПД, который индуцирует универсальную стрессовую реакцию, связанную, главным образом, с временным снижением роста и развития растений, снижением метаболизма, а также синтезом защитных соединений. Даже в специализированных органах насекомоядных – в ловушках венериной мухоловки и росянки - распространение ПД индуцированные прикосновением к волоскам, наряду с движением вызывают снижение фотосинтетической активности (Pavlovic and Mancuso, 2011; Krausko et al., 2017; Pavlovic et al., 2017).

Для более тонкой подстройки стратегии адаптации к определенным стрессорам растения потенциально могут использовать ЭС разных типов – ПД и ВП, сопоставление ответов на которые изложено далее. В первую очередь, необходимо подчеркнуть, что оба типа сигналов независимо от природы вызвавшего их стимула способны индуцировать функциональные ответы, связанные с защитными и адаптивными реакциями, к которым относятся:

- временное угнетение фотосинтеза (ПД: Fromm et al., 1995; Bulychev et al., 2004; Pavlovic and Mancuso, 2011; Krausko et al., 2017; ВП: Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Fromm et al., 2013; Sukhov et al., 2019),

- усиление дыхания (ПД: Dziubinska et al., 2003; ВП: Filek et al., 1997; Khlopkov et al., 2021; Surova et al., 2016),

- накопление АТФ (ПД: Fromm et al., 1995; ВП: Surova et al., 2016),

- усиление экспрессии генов pin2 (ПД: Stankovic and Davies, 1996; Fisahn et al., 2004; ВП: Stankovic and Davies, 1996),

- запуск последующих сигнальных каскадов, в первую очередь изменение содержания гормонов (ПД: Krausko et al., 2017; Marhavý et al., 2019; ВП: Herde et al., 1999; Hlavinka et al., 2012; Mousavi et al., 2013).

функциональные ответы, вызванные ЭС Обычно разного типа, качественно сходны, но, в то же время, имеются количественные различия, связанные с амплитудой и динамикой индуцированных изменений. Так, значительное накопление каллозы В ситовидных трубках (при апопластической загрузке) наблюдалось распространения после индуцированного ожогом ВП, в то время как при распространении индуцированного отсечением ПД каллоза откладывалась в меньших количествах и на меньшем расстоянии от зоны стимула (Furch et al., 2008). Значительные различия наблюдались в продукции метаболитов, таких как крахмал, сахароза, малат и других, в случае индуцированного отсечением кончика листа кукурузы ВП и вызывным охлаждением ПД. В случае ВП концентрации метаболитов в поврежденных листьях снижалось по сравнению с не травмированными листьями, в то время как при холодовой стимуляции их концентрация возрастала, для некоторых соединений примерно в два раза по сравнению с ранением. В обоих случаях наблюдалось подавление флоэмоного транспорта, более выраженного в случае холод-индуцированного ПД (Fromm et al., 2013) На томатах индуцированный ожогом ВП вызывает примерно в 1,5 раза большее накопление chloroplast mRNA binding protein (CMBP) по сравнению с ПД, вызванным отсечением, кроме того динамика накопления несколько отличалась по своим временным характеристикам (Vian and Davies, 2006).

Наряду с количественными различиями, в отдельных работах отмечены качественные различия между ответами, индуцированными ПД и ВП. Так, индуцированное отсечением кончика листа кукурузы ВП вызывало снижение ассимиляции CO₂ и снижение транспирации, в то время как при холод-

индуцированном ПД реакции зафиксировано не было (Fromm et al., 2013). Исключительно при вызванном ожогом ВП наблюдалось подавление активности фотосистемы II и снижение ассимиляции СО₂ у тополя, тогда как холод-индуцированный электрический сигнал по типу ПД, не вызвала подобных изменений (Lautner et al., 2005).

Наряду со специфичностью ответов, вызванных дистанционными ЭС разного типа, подобная специфичность может наблюдаться и для одиночного сигнала в случае ВП, параметры которого, как было отмечено выше, зависят от типа и интенсивности стимула. Стимул-специфичные особенности ответа описаны, например, для сдвигов гормонов. Так на растениях арабидопсиса показано, что локальное действие сильного света ведет к системному увеличением концентрации ЖК и салициловой кислоты (СК), в то время как локальный тепловой шок вызывает изменение содержания только СК. Динамика содержания салициловой кислоты при этом сходна для обоих раздражителей (Zandalinas et al., 2020b). Разнонаправленные реакции замыкающих клеток устьиц также отмечены для сильного света и теплового шока: свет вызывает закрытие устьиц, а тепло приводит к открытию устьиц (Zandalinas et al., 2020а). Причиной различного ответа могут служить отмеченные различия в динамике ЖК, которая, как известно, индуцирует закрытие устьиц (Geng et al., 2016).

Также на растениях арабидопсиса показано, что механическое повреждение и сильный свет повышают транскрипты ответа абсцизовой кислоты (АБК) и транскрипты ответа ЖК, в то время как HS только траскрипты АБК (Suzuki et al., 2013). Авторы также продемонстрировали различия в изменении содержания метаболитов (сахароза, аминокислоты и др.), индуцированных изучаемыми стимулами (Suzuki et al., 2013).

Можно полагать, что отмеченная выше специфичность индуцированных ВП физиологических ответов обусловлена различиями в параметрах ВП, вызванных разными стимулами. В целом ряде работ, в частности, показана связь параметров ответа с параметрами вызвавшего его ВП. В частности,

амплитуды ответа фотосинтеза и транспирации коррелируют с амплитудой индуцирующего его ВП (Sukhov et al., 2012; Sukhov et al., 2019 Sherstneva et al., 2015). Также отмечена корреляция гормонального ответа с параметрами ВП (Hlavinka et al., 2012; Mousavi et al., 2013).

Итак, имеется достаточно сведений о том, что функциональный системный ответ способен проявлять зависимость от параметров вызывающих его ЭС. Как может осуществляться подобная связь? Известно, что индукция ЭС функционального ответа связана, в первую очередь, со сдвигами в концентрациях Ca²⁺ и H⁺ (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019), показанная, в том числе, путем ее иммитации при помощи ионофоров (Sukhov et al., 2014). Можно полагать, что специфичные сигнатуры Ca²⁺ и H⁺ обуславливают развитие специфичного ответа. Зависимость параметров ответа от параметров кальциевых сигнатур была показана ранее на растениях (Lenzoni et al., 2018). Насколько различаются сигнатуры Ca²⁺ и H⁺, связанные с распространением ВП, вызванных разными стимулами на сегодняшний день не изучено. В то же время, можно отметить достаточно хорошее сходство динамики изменений рН и динамики электрического потенциала при генерации ВП (Katicheva et al., 2014; Vodeneev et al., 2015). Вероятно, это можно отнести и к динамике внутриклеточного Ca²⁺ (Khlopkov et al., 2021). А поскольку изменения электрического потенциала, т.е. форма ВП, амплитуда и длительность ВП, проявляют зависимость от типа индуцирующего его стимула, можно ожидать и наличия стимул-специфичных сигнатур Ca²⁺ и H⁺ в клетках, в которых произошла генерация ВП. Специфичность ВП-индуцированного ответа может быть также обусловлена комплексной природой этого дистанционного сигнала, включающего из гидравлической и химической компонент (Huber and Bauerle, 2016; Vodeneev et al., 2015; Sukhov et al., 2019) В свою очередь, наряду с сигнатурами pH и Ca^{2+} дополнительные химические соединения в составе комплексного сигнала могут вносить свой вклад в специфичность формируемого ответа. Это может осуществляться путем их восприятия специфичными рецепторами, и

последующей активации сигнальных путей. Особенно хорошо это исследовано для биотических стимулов, в частности, при формировании патоген-специфичного или насекомое-специфичного защитного ответа, путем распознавания растением специфичных элиситоров (Krol et al., 2010; Maffei et al., 2004). Такие стимул-специфичные DAMP, предположительно могут быть вовлечены в индукцию ответа на абиотические стимулы.

Т.о. растения используют несколько вариантов индукции специфичного системного ответа. Первый из них базируется на частотном кодировании и дешифровке информации, передаваемой посредством ПД. Второй связан с передачей дистанционных ЭС нескольких типов, каждый из которых характерен для определенной категории стимула. Наконец передача информации посредством одиночного сигнала в случае ВП может базироваться на специфичности его параметров, зависящих от природы и силы вызвавшего его раздражителя.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Эксперименты проводились на 14-21-дневных растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Дарья и гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Альбумен. Растения гороха 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.

2.2. Индукция электрических сигналов

Локальное раздражение наносилось на кончик второго зрелого листа пшеницы и третьего зрелого листа гороха. В работе использовали три типа раздражителей:

1) ожог кончика листа (1 см) открытым пламенем в течение 3 сек;

2) постепенный нагрев, путем помещения кончика раздражаемого листа (1 см) в кювету с нагревательным элементом, заполненную водой. Нагревательный элемент повышал температуру воды до 60°С в течение 4-5 мин, вызывая генерацию ВП;

3) механическое повреждение кончика листа (1 см) путем сдавливания при помощи пластиковых цилиндров.

2.3. Электрофизиологические измерения

Электрическую активность регистрировали внеклеточно с помощью Ag/AgCl-макроэлектродов ЭВЛ-1МЗ (ОАО «Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь), усилителем служил иономер ИПЛ-113

(ООО НПП «Семико», Россия) с входным сопротивлением 10¹² Ом, соединенный с компьютером. Контакт электродов с растением осуществлялся через хлопковые нити, смоченные в стандартном растворе следующего состава: KCl – 1 мM, CaCl₂ – 0,5 мM, NaCl – 0,1 мM. Запись регистрируемой разницы потенциалов осуществляли с помощью программы «Param2», частота регистрация 1 Гц.

Растения пшеницы располагали на специально изготовленных подставках из пластика. В экспериментах использовались 3 измерительных электрода, расположенных на втором взрослом листе пшеницы. Расстояние от зоны повреждения до первого измерительного электрода (Э1) составляло 3 см, до второго электрода (Э2) – 6 см, до третьего электрода (Э3) – 9 см (Рис. 4). Электрод сравнения помещали в песок, рядом с корнями растения, предварительно смочив его водой. Адаптация растений перед началом измерений осуществлялась в течение 1,5 ч.



Рис. 4. Схема расположения электродов на проростках А) пшеницы и Б) гороха.

Измерение электрической активности гороха осуществлялось аналогичным образом, однако эксперименте использовались 5 В измерительных электродов. Они располагались на стебле гороха, на расстояниях 1,5, 3, 4,5, 6 и 9 см от зоны раздражения. Также в отдельной серии экспериментов растение помещалось на специальную стойку, а измерительные электроды располагались на стебле в междоузлии ниже раздражаемого листа, на расстоянии 3 см от зоны повреждения, и на парном

листе к исследуемому, закрепленному в кювете газоанализатора. Электрод сравнения погружался в раствор, омывающий корни растения.

2.4. Ингибиторный анализ

Для изучения особенностей механизмов генерации и распространения электрических сигналов, индуцированных различными стимулами, выполнялся ингибиторный анализ с применением специфичных блокаторов. Использовались растворы следующих ингибиторов: 1) Na₃VO₄ (2 мM) специфичного ингибитора H⁺-АТФазы плазматических мембран; 2) LaCl₃ (5 блокатора Ca²⁺ каналов; 3) GdCl₃ (10мМ) – блокатора мМ) – механочувствительных Ca²⁺ каналов; 4) N,N'-диметилтиомочевины (DMTU) (1 MM) – скавенджера пероксида водорода (H₂O₂); 5) дифенилениодония (DPI) (20 мкМ) – ингибитора НАДФН-оксидазы; 6) салицилгидроксамиковой кислоты (SHAM) (1 мМ) – ингибитора альтернативной оксидазы митохондрий растений.

Вследствие плохого проникновения ингибиторов через эпидермис листа пшеницы эксперименты были выполнены на отсеченном листе (рис. 5). 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. Измерения проводили через 1,5 часа после загрузки.

На растениях гороха ингибитор наносился локально, на участок стебля со снятым эпидермиса, погруженный в специальную кювету длиной 2 см с раствором ингибитора за 1,5 часа до раздражения.



Рис. 5. Схема загрузки ингибиторов в отсеченный лист пшеницы.

2.5. Измерение параметров фотосинтеза и транспирации

Анализ параметров фотосинтетической активности и газообмена осуществлялся с использованием стандартной системы для исследования фотосинтеза (Heinz Walz GmbH, Германия), которая включала в себя PAMфлуориметр Dual-PAM-100, инфракрасный газоанализатор GFS-3000 и измерительную головку 3010-Dual gas-exchange, позволяющую одновременно измерять параметры световой и темновой стадии фотосинтеза (Sukhov et al., 2012) в условиях заданной влажности, температуры и содержания CO_2 в зоне регистрации. Регистрировали такие показатели газообмена, как интенсивность транспирации (E), скорость ассимиляции CO_2 (A) и устьичную проводимость (gS).

$$E = \frac{u_e(w_0 - w_e)}{LA(1 - w_0)},$$

где u_e – молярный расход на входе в измерительную головку (µмоль/с), w_o – мольная доля H_2O на выходе из измерительной головки (ppm), w_e – мольная

доля H_2O на входе из измерительной головки (ppm), LA – площадь листа (M^2) (Caemmerer and Farquhar, 1981).

$$A = \frac{u_e(c_0 - c_e)}{LA} - E * c_0,$$

где c_o – мольная доля CO₂ на выходе из измерительной головки [ppm], c_e – мольная доля CO₂ на входе из измерительной головки (ppm) (Caemmerer and Farquhar, 1981).

$$gS = E/VPD$$
,

где VPD – дефицит давления паров (воздух-листья) (Па/кПа) (Caemmerer and Farquhar, 1981).

В качестве параметров флуоресценции хлорофилла рассматривали квантовый выход фотосистемы I и II – Φ_{PSI} , и Φ_{PSII} , и уровень нефотохимического тушения – NPQ.

Для расчета \varPhi_{PSII} использовали уравнение:

$$\Phi_{\rm PSII} = \frac{(F_m' - F)}{F_m'}$$

где F'_m и F – максимальный и текущий квантовый выход флуоресценции хлорофилла фотосистемы II при постоянном освещении (Maxwell and Johnson, 2000).

Для расчета NPQ применяли формулу:

NPQ =
$$(F_m - F'_m) / F'_m$$
,

где F_m — максимальный квантовый выход флуоресценции хлорофилла фотосистемы II (Maxwell and Johnson, 2000).

При измерениях относительная влажность воздуха в измерительной головке составляла около 60%, концентрация $CO_2 - 360$ ppm. Значения F_0 , F_m и P_m определяли после 10 мин темновой адаптации, после чего включали синий актиничный свет (239 мкмоль м⁻² с⁻¹, 460 нм) и насыщающие вспышки (10000 мкмоль м⁻² с⁻¹, 635 нм, 300мс), которые следовали каждые 20 с.

Второй лист пшеницы располагали таким образом, чтобы измерительная головка располагалась примерно на расстоянии 5 см от области стимула,

участок помещался в измерительной головке газоанализатора. Для гороха выбирался лист, нижележащий от раздражаемого, он полностью помещался в измерительной головке газоанализатора (~1,5×1,5 см).



Рис. 6. Схема измерения активности фотосинтеза на проростках А) пшеницы и Б) гороха. Красным обозначены области регистрации активности фотосинтеза.

Анализ пространственно-временного распределения параметров флуоресценции хлорофилла (Φ_{PSII} и NPQ) на растениях пшеницы осуществлялся методом РАМ-флуориметрии с использованием РАМ-флуориметра Open FluorCam FC 800-O/1010. Второй лист пшеницы располагали в измерительной области прибора, размер которой составлял ~20×20 см.

Значения F_0 , F_m и P_m определяли после 15 мин темновой адаптации, после чего включали красный актиничный свет (280 мкмоль м⁻² с⁻¹, 617 нм) и насыщающие вспышки (4000 мкмоль м⁻² с⁻¹, холодный белый свет, 6500 К 300мс), которые повторялись каждую минуту в течение 10 минут и каждые 2 минуты в течение 20 минут.

2.6. Регистрация динамики рН с помощью флуоресцентного зонда

Для регистрации изменений pH в апопласте листа при распространении электрических сигналов использовали pH чувствительный флуоресцентный

зонд ВСЕСF (Molecular Probes, США). Зонд ВСЕСF загружался в темноте при комнатной температуре в условиях временно пониженного давления (0,2 атмосфер, 10 минут) во 2-й лист проростков пшеницы. Концентрация зонда в растворе составляла 10 мкМ. После этого растение оставляли в растворе с зондом на 6 часов при нормальном давлении. Последующую отмывку зонда с поверхности растения производили в стандартном растворе. После загрузки зондом перед началом измерений растения стояли в вегетационной комнате в течение ночи в темноте.

Динамику рН в растениях пшеницы регистрировали с помощью установки для флуоресцентного имиджинга DVS-03 (ИПЛИТ РАН, Россия). Растения пшеницы располагали на специально изготовленных подставках из пластика, закрепляя второй зрелый 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. Динамика рН изменения в апопласте определялась на основании интенсивности флуоресценции зонда. Интенсивность флуоресценции ВСЕСГ возрастает при увеличении величины рН.

2.7. Определение содержания фитогормонов методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии

Анализ содержания фитогормонов осуществляли в фрагменте второго взрослого листа пшеницы длиной 5 см, расположенном на расстоянии 5 см от зоны раздражения. Через определённый интервал времени после раздражения фрагмент вырезали, взвешивали, фиксировали жидким азотом и растирали тефлоновым пестиком до порошкообразного состояния. Далее образцы гомогенизировали в экстрагирующем растворе (метанол:вода:муравьиная кислота = 80:19:1) в соотношении 1:15. Экстрагирующий раствор содержал

также внутренние стандарты: дейтерированный аналог абсцизовой кислоты $[^{2}H]_{6}AБК$ (1 нг/мл, Olchemim, Чехия). Экстракцию проводили 15 минут на ротаторе (Multi Bio RS-24, Biosan, Латвия) при температуре 4°C. Затем пробы центрифугировали в течение 25 мин при температуре 4°C и 20 000 rcf (Z 36 HK, Hermle Labortechnik, Германия). После отбора супернатанта к осадку добавляли экстрагирующий раствор в соотношении 1:5 от массы навески для повторной экстракци в тех же условиях. После чего супернатанты объединяли. Далее концентрировали полученный экстракт фитогормонов в 2 раза при 40°C на испарителе-концентраторе (Smart Evaporator C1, BioChromato, Япония) и фильтровали через шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (Millex-LCR, Merck Millipore, CIIIA).

фитогормонов осуществляли методом LC/MS/MS Анализ на жидкостном хроматомасс-спектрометре LCMS-8040 (Shimadzu, Япония). Для анализа фитогормонов были выбраны следующие параметры: температура линии десольватации 280°C, температура блока нагревателя - 400°C, поток газа-распылителя - 3 л/мин, поток газа-осушителя - 15 л/мин. Условия хроматографирования: объём пробы - 10 мкл; скорость потока фазы - 0,5 мл/мин; состав подвижной фазы: компонент А - 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, компонент В - 100% ацетонитрил; программа градиента: 0 мин -3%, 1 мин -45%, 4 мин -45%, 6 мин -60%, 7 мин -80%, 7,01 мин -3%, 9 мин – 3%; хроматографическая колонка Shim-pack HR-ODS (Shimadzu, Япония), 2,1x150 мм, размер частиц – 3 мкм; температура термостата колонки 40°С. Расчет содержания АБК и ЖК в контрольных (нераздражённых) и опытных растениях, проводили на основании калибровочных зависимостей, полученных с использованием аналитических стандартов: АБК (Olchemim, Чехия) и ЖК (Sigma-Aldrich, CША).

2.8. Алгоритм обработки результатов на основе вейвлет-преобразования

Автоматическое определение параметров исследуемых электрических сигналов и функционального ответа было выполнено с использованием методов, основанных на вейвлет-преобразовании сигнала. Детальное описание процедуры приведено в работе Mudrilov et al., 2020. Общее уравнение для непрерывного вейвлет-преобразования:

$$W = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)\psi(t)dt$$

где W – выходной сигнал, x(t) – анализируемая запись, $\psi(t)$ – базовая функция, материнский вейвлет, которую можно сдвигать и масштабировать (растягивать или сжимать) для создания серии непрерывных вейвлетов (Bruce et al., 2001; Hramov et al., 2015):

$$\psi(t) = \frac{1}{\sqrt{\alpha}} \psi \frac{t - \tau}{\alpha}$$

где α и τ – положительные числа, представляющие коэффициенты масштабирования и сдвига соответственно.

Выходной сигнал будет иметь локальные максимумы, в которых входной сигнал наиболее близок к анализируемому шаблону, то есть материнскому вейвлету. Алгоритм непрерывного вейвлет-преобразования входной записи представлен на схеме ниже (рис. 7). В качестве материнского вейвлета были использованы производные функции Гаусса первого, второго и третьего порядков, которые широко применяются при анализе переходных процессов.

В ходя проверки были подобраны оптимальные значения коэффициентов масштабирования, для анализа электрических записей на горохе наибольшее соответствие было найдено при значении масштаба, равном 5, для пшеницы – при 10, для всех типов функционального ответа – при 10. Для оценки корректности автоматической обработки использовался метод Блэнда-Алтмана, показавший применимость данного алгоритма (Bland and Altman, 1999; Giavarina, 2015).



Рис. 7. Алгоритм непрерывного вейвлет-преобразования входной записи.

Сравнение значений амплитуд изменений параметров ВП и системного ответа, полученных после ручной и автоматической обработки, приведены в таблицах 1 и 2. Результаты демонстрируют высокую степень согласованности, свидетельствуя о корректности предложеннного подхода. В работе использовали ручной вариант определения параметров реакций наряду с предложенным автоматическим.

Таблица 1

| рассчитанные с помощью ручной (го) и автоматической обработки (по). | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|--|
| | E1 | | E2 | | E3 | | E4 | | E5 | | |
| N⁰ | AO | РО | AO | РО | AO | РО | AO | РО | AO | РО | |
| 1 | 36.0 | 43.5 | 56.0 | 56.0 | 64.5 | 64.5 | 42.0 | 42.0 | 38.0 | 38.0 | |
| 2 | 41.0 | 41.0 | 43.0 | 43.0 | 56.5 | 56.5 | 42.5 | 42.5 | 52.0 | 52.0 | |
| 3 | 85.0 | 85.0 | 85.5 | 85.5 | 84.0 | 84.0 | 76.0 | 76.0 | 84.0 | 84.0 | |
| 4 | 94.0 | 94.0 | 93.0 | 93.0 | 96.0 | 96.0 | 88.5 | 88.5 | n/d | n/d | |
| 5 | 69.0 | 69.0 | 66.0 | 66.0 | 54.0 | 55.0 | 53.5 | 55.0 | 60.5 | 61.5 | |
| Среднее | 65.0± | $66.5\pm$ | 68.7± | 68.7± | 71.0± | 71.2± | $60.5\pm$ | 60.8± | 58.6± | 58.9± | |
| ±SEM | 11.6 | 10.7 | 9.2 | 9.2 | 8.2 | 8.1 | 9.3 | 9.3 | 9.6 | 9.7 | |

Амплитуды ВП (мВ), индуцированного нагревом, в проростках гороха,

рассчитанные с помощью ручной (РО) и автоматической обработки (АО)

Таблица 2

Амплитуды скорости ассимиляции CO₂ (A), уровеня транспирации (E), квантового выхода фотосистем I и II (Φ_{PSI} и Φ_{PSII}) и нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) в листьях проростков гороха, рассчитанные с использованием ручной (PO) или автоматической обработки (AO).

| | А | | E | | $arPhi_{ m PSI}$ | | $arPhi_{ m PSII}$ | | NPQ | |
|---------|--------|--------|--------|--------|------------------|--------|-------------------|--------|--------|--------|
| N⁰ | AO | РО | AO | РО | AO | РО | AO | РО | AO | РО |
| 1 | 2.900 | 2.500 | 0.860 | 0.850 | 0.052 | 0.039 | 0.065 | 0.065 | 0.707 | 0.707 |
| 2 | 0.450 | 0.480 | 0.170 | 0.170 | 0.147 | 0.152 | 0.166 | 0.164 | 0.816 | 0.824 |
| 3 | 0.280 | 0.330 | 0.120 | 0.130 | | 0.056 | 0.068 | 0.068 | 0.708 | 0.710 |
| 4 | 0.280 | 0.290 | 0.060 | 0.080 | 0.066 | 0.067 | 0.060 | 0.058 | 0.675 | 0.670 |
| 5 | 0.300 | 0.280 | 0.050 | 0.040 | 0.115 | 0.102 | 0.104 | 0.105 | 0.603 | 0.600 |
| 6 | 0.380 | 0.380 | 0.130 | 0.160 | 0.045 | 0.044 | 0.071 | 0.072 | 0.540 | 0.832 |
| Среднее | 0.765± | 0.710± | 0.232± | 0.238± | 0.085± | 0.077± | 0.089± | 0.089± | 0.675± | 0.724± |
| ±SEM | 0.428 | 0.359 | 0.127 | 0.124 | 0.020 | 0.018 | 0.017 | 0.016 | 0.039 | 0.037 |

2.9. Статистическая обработка

Все измерения производили на отдельных растениях. В каждой серии экспериментов для каждого воздействия использовалось не менее 10 растений. Статистическую обработку осуществляли в программе Microsoft Excel и GraphPad Prism 6. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 3.1. Параметры вариабельного потенциала, индуцированного различными локальными раздражителями

Первый этап работы был направлен на изучение параметров ВП, индуцированного раздражителями различной природы. В качестве локальных раздражителей выступал ожог, постепенный нагрев и механическое повреждение. Нанесение раздражителей вызывало генерацию распространяющегося электрического сигнала в виде ВП в растениях как пшеницы, так и гороха, при этом параметры сигналов различались в зависимости от типа раздражителя.

При действии всех типов стимулов амплитуды ВП (Аур) в листе пшеницы, в ближайшей к месту стимула точке регистрации, были примерно равны и составляли около 55-60 мВ (рис. 8Б). Также стоит отметить меньшую длительность ВП (оцениваемую по времени возвращения потенциала на половине индуцированного значения, равные A_{VP}), механическим повреждением, порядка 5 минут, в то время как для остальных стимулов она составляла 10 минут и более (рис. 8В). В случае ожога Аур имела значительный декремент, снижаясь с 57 мВ на расстоянии 3 см до 18 мВ на расстоянии 9 см. В случае механического раздражения декремент был еще более выражен, на расстоянии 9 см от зоны раздражения электрический сигнал практически отсутсвовал. В случае нагрева, в отличие от ожога и механического повреждения, декремент Аур был незначительным.

При рассмотрении скорости распространения ВП было выявлено, что в случае ожога скорость ВП была значительно выше, чем при нагреве, достигая около 4,5 мм/с вблизи места повреждения против 2 мм/с при нагреве (рис. 8Г). Стоит также отметить тенденцию к снижению скорости распространения ВП по мере удаления от места стимула как для нагрева, так и для ожога. В случае



Рис. 8. A) Типичные записи индуцированного нагревом, ожогом И механическим повреждением ВП в растениях пшеницы. Стрелка показывает момент нанесения ожога или механического повреждения или начало нагрева (скорость нагрева ~6 °С/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.



Рис. 9. А) Типичные записи индуцированного нагревом, ожогом и механическим повреждением ВП в проростках гороха. Стрелка показывает момент нанесения ожога или механического повреждения или начало нагрева (скорость нагрева ~6 °С/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.

механического повреждения из-за худшей способности к распространению корректная оценка скорости не представлялась возможной.

Для гороха выявленные особенности ВП при действии аналогичных раздражителей во многом сохранялись, однако имели свои особенности (рис. 9). ВП, индуцированный нагревом, имел наибольшую амплитуду, около 80 мВ, распространяясь с незначительным декрементом. А_{VP} при ожоге и механическом повреждении на стебле в непосредственности близости от зоны стимуляции были примерно равны и составляли около 60 мВ. В случае механического повреждения имел место наибольший декремент при распространении, А_{VP} опускалась от исходных 58 мВ на расстоянии 1,5 см до 35 мВ на расстоянии 9 см от места стимуляции. А_{VP} при ожоге также снижалась при распространении, хотя и в меньшей степени (рис. 9Б).

Начальная скорость распространения ВП, индуцированного ожогом, вблизи места стимуляции составляла в среднем 9-12 мм/с, быстро снижаясь до 3,5-5 мм/с на расстоянии 6 см от места раздражения. В случае нагрева и механического повреждения скорости оставались практически неизменными, составляя около 2 и 0,75 мм/с соответственно (рис. 9Г).

В растениях гороха наряду с изучением параметров BΠ, распространяющегося по стеблю, также выполнялась оценка ИХ В нераздраженном нижележащем листе, расположенном примерно в 10 см от раздражаемого. Распространение сигнала в нераздраженный лист при раздавливании имело значительный декремент, Avp, опускалась до 9 мВ. В ряде случаев распространение электрического сигнала в нераздраженный лист не происходило. В случае ожога декремент A_{VP} был менее выражен в сравнении с механическим повреждением, А_{VP} в листе составляла 17 мВ. В случае нагрева А_{VP} в листе составляла 20 мВ.

Полученные результаты в целом соответсвуют приведенным в литературе данным о параметрах индуцированных различными стимулами электрических сигналов (рис. 10), таких как велична амплитуды, ее декремент и скорость растпространения (Grams et al., 2009; Huber and Bauerle, 2016; Vian

and Davies, 2006). Так, зарегистрированные скорости распространения ВП в целом укладываются в диапазон 0,8-20 мм/с, выявленный для различных видов растений (Huber and Bauerle, 2016), хотя систематической оценки при типах раздражителей не было. Наиболее различных исследованным ВΠ индуцирующим типом стимула является ожог. Амплитуда индуцированного ожогом ВП в растениях различных видов вблизи от зоны диапазоне 55-100 мВ. Регистрация стимуляции лежит В сигнала осуществлялась в таких растениях как томат (Davies et al, 1997; Stankovic and Davies, 1996; Vian and Davies, 2006), мимоза (Roblin, 1985), бобы (Furch et al., 2008; Roblin, 1985), подсолнух (Stankovic et al., 1997; Stankovic et al., 1998) и другие. Для растений гороха и пшеницы, выступающих в качестве объектов исследования в настоящей работе, амплитуды индуцированного ожогом ВП составляли в среднем 65 (Surova et al., 2016; Yudina et al., 2020) и 75 мВ (Vodeneev et al., 2012).



Рис. 10. Диапазон амплитуд ВП при ожоге и механическом повреждении. Точками отмечены средние значения амплитуд ВП, полученные в данной работе. Приведены зарегистрированные в настоящей работе значения A_{vp} на расстояниях 3, 6 и 9 см для растений гороха и пшеницы. Значения A_{vp} на основании данных литературы примерно соответствуют указанным расстояниям.

Для индуцированного механическим раздражением ВП необходимо отметить очень высокую вариабельность значений аплитуды сигнала, приводимой в литературе – от 30 мВ у фасоли (Maffei et al., 2004) до 77 мВ у томата (Vian and Davies, 2006) вблизи места поверждения. Столь большой разброс быть обусловлен несистематизированностью ланных может исследований, из-за чего различные по силе и типу механические воздействия оказываются в одной группе (Huber and Bauerle, 2016). Использованное в исследовании механическое воздействие в виде сдавливания, судя по-всему, воздействию средней относится к силы, которое не вызывает распространяющегося на большие расстояния электрического сигнала. Вероятно, распространение без значительного затухания В случае механического воздействия имеет место при ЛИШЬ таких сильных воздействиях, как обламывание ветвей или стеблей (Oyarce and Gurovich, 2011). Что касается нагрева и других медленнонарастающих стимулов, то данные литературы по индуцированному ими ВП по-сути отсутсвуют.

Настоящиее исследование показало, что электрические сигналы, индуцированные такими стимулами, как ожог, нагрев и механическое повреждение, представляют собой переходную деполяризацию в виде ВП. Амплитуда реакции в непосредственной близости от зоны повреждения слабо зависит от типа стимула и составляет в среднем 50-65 мВ для пшеницы и 55-65 мВ для гороха (за исключением нагрева, для которого A_{VP} в проростках гороха была около 75-85 мВ), при дальнейшем распространении в той или иной степени наблюдается ее снижение. Наряду с универсальными чертами проведенное исследование позволило выделить 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.

Зарегистрированные различия в параметрах ВП указывают на их специфичность по отншению к различным стимулам. Это может объясняться

различиями в механизмах индукции, генерации и распространении ВП при действии различных раздражителей.

3.2. Ингибиторный анализ механизмов генерации и распространения вариабельного потенциала, индуцированного различными раздражителями

С целью выяснения механизмов, обуславливающих выявленные на первом этапе исследования различия в параметрах ВП, применяли ингибиторный специфичных анализ с использованием блокаторов. Вследствие плохого проникновения ингибиторов через покровы листа, данная серия экспериментов была выполнена на модельной системе – отсеченном втором листе проростков пшеницы, на котором на целых растениях проводились измерения параметров ВП на предыдущем этапе. Учитывая значительное снижение амплитуды индуцированного механическим повреждением ВП при распространении, этот тип раздражителя для сравнительного анализа не использовали.

Параметры ВП на отсеченных листьях пшеницы несколько отличались от таковых для целых растений – имело место худшее распространение как для ожога, так и для нагрева (рис. 11). Тем не менее, для отсеченных листьев в целом сохраняются закономерности, отмеченные для ВП в целых растениях. Что касается скорости распространения, то в случае нагрева она была немного ниже, чем при ожоге, но незначительно. Это указывает на возможность использования данной модельной системы для изучения механизмов, обуславливающих различия в параметрах электрических сигналов, индуцированных различными стимулами.


Рис. 11. А) Зависимость амплитуды ВП, индуцированного ожогом и нагревом, от расстояния на отсеченных листьях пшеницы. Б) Зависимость скорости распространения ВП, индуцированного ожогом и нагревом, от расстояния на отсеченных листьях пшеницы. Зависимости для интактных растений показаны пунктиром. В) Усредненные записи ВП, индуцированные нагревом и ожогом. 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, р<0,05.

Ведущая роль H⁺-ATФазы плазматических мембран в формировании ВП считается общепринятой (Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Huber and Bauerle, 2016). Однако, необходимо отметить, что роль H⁺-ATФазы в

формировании ВП была продемонстрирована только для одного типа стимула - ожога (Grams et al., 2009; Katicheva et al., 2014; Sukhov et al., 2014), в то время как ее участие в генерации ВП, индуцированного нагревом, оценивалось лишь в одной работе (Julien et al., 1991). Проверка универсальности роли H⁺-АТФазы BΠ, В генерации индуцированно различными стимулами, проводилась с использованием Na₃VO₄, который является специфичным ингибитором H⁺-АТФазы плазмолеммы (Lew, 1991; Katicheva et al., 2014). Na_3VO_4 вызывал практически полное подавление ВП как в случае ожога, так и нагрева. Имело место снижение амплитуды ВП у пшеницы более чем на 90% (рис. 12Б). Также оценивалась скорость деполяризации, которая составляла в контрольных растениях 0,789 и 0,355 мВ/с для нагрева и ожога соответсвенно. Действие ингибитора привело к практическому отсутсвтию фазы быстрой



Рис. 12. Влияние Na₃VO₄ (2 мМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. А) Усредненные записи ВП, индуцированного нагревом и ожогом Б) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. * - p<0,05, при сравнении с контролем.

деполяризации, ее скорость составляла 0,016 и 0,007 мВ/с для нагрева и ожога соответственно. Полученные результаты указывают на в целом сопоставимый вклад Н⁺-АТФазы плазмалеммы в генерацию ВП, индуцированного ожогом и постепенным нагревом.



Рис. 13. Влияние La³⁺ (5 мМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. А) Усредненные записи ВП, индуцированного нагревом и ожогом Б) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. * - p<0,05, при сравнении с контролем.

Переходное снижение активности H⁺-АТФазы при генерации ВП связывают с входом Ca²⁺ в клетку, вследствие активации Ca²⁺-каналов (Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Huber and Bauerle, 2016; Vodeneev et al., 2006). Для оценки роли Ca²⁺-каналов в генерации ВП в качестве ингибитора был использован La³⁺ (Hafke et al., 2013; Krol et al., 2006; Suda et al., 2020). Добавление ингибитора приводило к снижению A_{VP} как при ожоге, так и при нагреве, составляя 20-40% от контрольных значений (рис. 13Б). Также нарушалось формирование быстрой фазы деполяризации, однако в меньшей степени, чем в случае Na₃VO₄, около 0,044 мB/с и для ожога, и для нагрева. Таким образом, полученные экспериментальные данные соответствуют

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). Его роль может заключаться в регуляции активности H⁺-ATФазы, что хорошо соотноситься с данными по схожему действию Na₃VO₄ при обоих типах раздражения.

Блокируемые La³⁺ Ca²⁺-каналы, обеспечивающие вход Ca²⁺ при генерации ВП, могут относиться к различным типам. Среди них особый интерес представляют механо- и лиганд-зависимые каналы, способные участвовать в индукции ВП исходя из гидравлической и химической гипотез распространения ВП. Механочувствительные каналы способны воспринимать связанное с гидравлической волной изменение натяжения плазматической мембраны (Hamilton et al, 2015; Monshausen and Haswell, 2013), возникающее Лиганд-чувствительные В ответ на стимул. каналы воспринимают распространяющийся из зоны локальной стимуляции химический сигнал, в качестве которого, согласно высказываемым сегодня предположениям, выступают АФК (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2011). В настоящее время выделено четыре семейства потенциально механочувствительных Ca²⁺каналов, MCA, MSL, OSCA и TPK (Demidchik et al., 2018). Что касается лиганд-чувствительных каналов, качестве возможных В участников восприятия электрических сигналов стоит рассматривать прежде всего семейства CNGC и GLR (Demidchik et al., 2018). Более того, для последних в одной из работ была продемонстрирована потенциальная роль в генерации ВП в растениях арабидопсиса (Nguyen et al., 2018).

Роль механочувствительных Ca^{2+} -каналов в генерации индуцированных ожогом и потепенным нагревом ВП оценивалось с применением Gd^{3+} , который традиционно используется в качестве блокатора механочувствитльных кальциевых каналов (Ding and Pickard, 1993; Hamilton et al, 2015; Lansman, 1990; Nakagawa et al, 2007). Подавление ВП зарегистрировано для обоих типов раздражителей, однако, наибольший эффект Gd^{3+} оказывал в случае ожога, вызывая снижение A_{VP} более чем на 70%

по сравнению с контролем. При этом в случае нагрева снижение было значительно меньше (рис. 14А). Скорость деполяризации в случае нагрева также была чуть выше, 0,114 мВ/с против 0,105 мВ/с при ожоге. В целом, полученные результаты указывают на большую роль механочувствительных Ca²⁺-каналов в генерации ВП при ожоге, в сравнении с нагревом.



Рис 14. Влияние Gd³⁺ (10 мМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. А) Усредненные записи ВП, индуцированного нагревом и ожогом Б) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. * - p<0,05, при сравнении с контролем, # - p<0,05, при сравнении с нагревом.

В пользу гипотезы о большем вкладе механочувствительных кальциевых каналов в формирование индуцированного ожогом ВП также свидетельствует значительное затухание амплитуды ВП с расстоянием, как в контроле, так и при подавлении механочувствительных каналов Gd^{3+} . Это соотносится с затуханием при распространении гидравлической волны (Huber and Bauer, 2016). В восприятии гидравлической волны могут участвововать механочувствительные ионные каналы, предположительно, семейств MCA и MSL, через рецепцию натяжения плазматической мембраны или связанных с ней структур (Hamilton et al, 2015; Monshausen and Haswell, 2013).



Рис 15. Влияние DMTU (1 мМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. А) Усредненные записи ВП, индуцированного нагревом и ожогом Б) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. * - p<0,05, при сравнении с контролем.

Наряду с участием механочувствительных кальциевых каналов в генерации ВП также предполагается участие лиганд-зависимых кальциевых каналов (Mousavi et al., 2013; Nguyen et al., 2018). В качестве сигнальных молекул, активирующих лиганд-чувствительные Ca^{2+} -каналы, предполагают АФК, в частности, H_2O_2 (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2011). При использовании скавенджера H_2O_2 диметилтиомочевины (DMTU) имеет место 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 (Рис. 15). Тем не менее, данные, полученные с применением DMTU, свидетельствуют о немного большем подавлении (но без достижения статистически значимых различий) распространения ВП, индуцированного нагревом. Также об этом может косвенно свидетельствовать более медленная фаза деполяризации при нагреве, всего 0,043 мВ/с, тогда как в случае ожога она составляет 0,086 мВ/с.

На настоящий момент в качестве одного из источников АФК при распространении стрессого сигнала предполагаются НАДФН-оксидазы, продуцирующие АФК при стрессовых реакция и локализованные на плазматической мембране и некоторых иных органеллах (Miller et al., 2009). Их предполагаемая роль заключается в продукции дополнительного АФК, после их активации входящим потоком Ca²⁺, поступающим через АФКактивируемые Ca^{2+} -каналы (Kai et al., 2016; Mittler et al., 2004;), что в свою очередь вызывает генерацию ВП. Таким образом, идет самоподдержание распространяющегося сигнала через Ca²⁺-AФК взаимодействие (Choi et al., 2017; Chen et al., 2017; Demidchik et al., 2018; Farmer et al., 2020; Gilroy et al., 2016). Однако стоит отметить, что несмотря на довольно частое описание распространения ВΠ данной схемы В обзорных статья, прямые экспериментального подтверждения практически отсутсвуют, кроме работы с дефицитными по НАДФН-оксидазе мутантными растениями, продемонстрировавшими снижение амплитуды электрического сигнала, индуцированного сильным освещением и нагревом (Suzuki et al., 2013).

Для определения участия НАДФН-оксидазы В генерации И распространении ВП использовали дифенилениодоний (DPI), являющийся ее ингибитором (Cross and Jones, 1986; Li and Trush, 1998; Lee et al., 2017; Kai et al., 2016). Как видно из рисунка 16, действие DPI приводит к снижению Avp для обоих типов раздражителей в растениях пшеницы, однако, достоверные различия с контролем наблюдались лишь в случае нагрева. Также можно отметить большее замедление скорости деполяризации в случае нагрева, по сравнению с ожогом, 0,152 мВ/с против 0,238 мВ/с. Таким образом, несмотря на то, что DPI является ингибитором всех ферментов с флавиновыми группами (O'Donnell et al., 1994) полученный результат можно рассматривать как свидетельство участия НАДФН-оксидазы в распространении ВП при нагреве.



Рис 16. Влияние DPI (20 мкМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. А) Усредненные записи ВП, индуцированного нагревом и ожогом Б) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. * - p<0,05, при сравнении с контролем.

Применение салицилгидроксамиковой кислоты (SHAM), селектривного ингибитора альтернативной оксидазы митохондрий растений, участвующей в внутриклеточной продукции АФК, также приводило к снижению A_{VP}, причем достоверное подавление было выражено только в случае нагрева (рис. 17). Однако, в одной из работ отмечалось, что SHAM не оказывал влияние на ВП, в отличие от DPI (Khlopkov et al., 2021).

Полученные результаты можно интерпретировать как наличие нескольких источников продукции АФК, участвующих в генерации и распространении ВП, в том числе и внутриклеточных. В случае нагрева можно предположить несколько большую продукцию АФК, в особенности, при участии НАДФН-оксидазы плазматических мембран.



Рис. 17. Влияние SHAM (1 мМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. А) Усредненные записи ВП, индуцированного нагревом и ожогом Б) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. * - p<0,05, при сравнении с контролем.

Универсальность заключений об особенностях механизмов генерации и распространения ВП, индуцированных различными раздражителями, базирующихся на полученных на растениях пшеницы результатах, была проверена на растениях гороха. В ходе проведения исследований на растениях гороха, ингибитор действовал локально на участок стебля, закрепленный в кювете. Измерительный электрод располагались в зоне действия ингибитора.

Na₃VO₄ приводит к достоверному подавлению A_{VP} в зоне действия ингибитора, как в случае ожога, так и постепенного нагрева (рис. 18А). Это говорит об участии H⁺-ATФазы в формировании ВП в проростках гороха при действии обоих стимулов.

Ингибитор механочувствительных кальциевых каналов Gd³⁺ вызывал статистически значимое снижение A_{VP} в зоне действия ингибитора только в случае ожога. Снижение амплитуды индуцированного нагревом ВП было незначительным (рис. 18Б). Полученные результаты подтверждают предположение о большем вкладе механочувствительных Ca²⁺-каналов в формирование ВП в случае ожога в сравнении с нагревом.



Рис. 18. Влияние А) Na₃VO₄ (2 мМ), Б) Gd³⁺ (10 мМ) и В) DPI (20 мкМ) на амплитуду ВП в проростках гороха, индуцированного нагревом и ожогом. Ингибитор действовал локально в кювете – обозначено пунктиром на схеме, на расстоянии 4-6 см от зоны раздражения. Измерительный электрод контактировал с раствором в кювете. * - p<0,05, при сравнении с контролем.

Ингибитор НАДФН-оксидазы DPI вызвал локальное подавление амплитуды индуцированного нагревом ВП. В случае ВП, индуцированного ожогом, не происходило снижения амплитуды в присутствии DPI (рис. 18В). Полученные на проростках гороха результаты также свидетельствуют о большем вкладе продуцируемого НАДФН-оксидазами АФК в индукцию ВП при нагреве. Таким образом, полученные результаты показали универсальность определяемых типом стимула особенностей механизмов ВП для растений различных видов.



Рис. 19. Схема генерации и распространения ВП при действии ожога и нагрева.

выделить следующие основные особенности В целом, можно механизмов генерации и распространения ВП, индуцированных ожогом и постепенным нагревом. Как упоминалось ранее, ВП представляет собой электрический ответ, индуцированный распространением гидравлического и химического сигналов (Farmer et al., 2020; Galle et al., 2015; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019; Vodeneev et al., 2015). Различия между индуцированными нагревом и ожогом ВП, по-видимому, обусловлены соотношением гидравлического и химических сигналов, которое может быть различным при действии различных стимулов. Исходя из полученных результатов, в случае ожога основную роль в распространении ВП играет гидравлическая волна, воспринимаемая через натяжение плазматической мембраны механочувствительными Ca²⁺-каналами, тогда как при нагреве основную роль играет волна АФК, возникающая при повреждении, и которую воспринимают АФК-чувствительные Ca²⁺-каналы. Таким образом, с учетом рассмотренных ранее данных литературы, можно предположить, что за восприятие ожога как быстронарастащего стимула отвечают преимущественно каналы MCA и MSL, тогда как за нагрев, как медленно нарастающий стимул – представители семейства GLR. Наблюдаемое в случае нагрева меньшее затухание ВП, вероятно, может быть связано с продукцией АФК, скорее всего регулирующиеся входом Ca²⁺ в клетку, путем активации НАДФН-оксидаз. Также, вероятно, играет роль продолжительность действия стимула, который обуславливает длительный выход АФК в случае постепенного нагрева, поскольку действие высокой температуры приводит к продукции АФК в зоне раздражения (Baxter et al., 2014; Choudhury et al., 2017). В случае ожога такой выход АФК, по-видимому, является более кратковременным. В самой генерации ВП основную роль играют Н⁺-АТФазы, инактивируемые входом Ca^{2+} в клетку (рис. 19) (Vodeneev et al., 2006; Stahlberg and Cosgrove, 1992; Sukhov et al., 2014).

3.3. Параметры индуцированного ВП ответа фотосинтеза при действии различных раздражителей

Следующим шагом стала оценка возможности развития стимулспецифичного системного ответа при действии различных локальных раздражителей. Выявление потенциальной специфичности системного ответа проводили на проростках гороха и пшеницы, с использованием таких стимулов как ожог, нагрев и механическое повреждение. В качестве системного ответа оценивали изменение активности транспирации и фотосинтеза, по таким параметрам как скорость ассимиляции CO₂, квантовый выход фотосистемы I и II (Φ_{PSI} и Φ_{PSII}), а также нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ).

Распространение ВП в нераздраженный лист проростков гороха вызывало снижение скорости ассимиляции (рис. 20А). Такие изменения

наблюдались в случае таких локальных стимулов как нагрев и ожог, при механическом повреждении изменения ассимиляции в нераздраженном листе отсутствовали, как и отсутствовало вышеупомянутое распространение ВП в нераздраженный лист (рис. 20Б). Если сравнить параметры системного ответа при действии различных стимулов, то необходимо отметить тенденцию к



Рис. 20. А) Типичные записи индуцированных нагревом и 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 гороха. Красным обозначена область регистрации активности фотосинтеза. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, p<0,05.

большей амплитуде ответа ассимиляции в случае нагрева в сравнении с ожогом (рис. 20Б).

Изменение интенсивности транспирации представляет собой сложную реакцию, в виде непродолжительного начального роста с последующим длительным снижением. В отличие от других регистрируемых показателей, изменения транспирации наблюдалось при всех типах исследуемых раздражителей. При этом, важно отметить, что во многих случаях ответ транспирации в случае ожога опережал начало ВП (рис. 21).



Рис. 21. Запись ВП (Э) и изменений интенсивности транспирации (Е) при ожоге в листе гороха.

Наряду с изменением газообмена также было изучено изменение показателей световой стадии фотосинтеза. Локальный стимул вызывает в нераздраженном листе снижение квантового выхода фотосистемы I и фотосистемы II, повышение нефотохимического а также тушения флуоресценции. Такие изменения имели место в случае нагрева и ожога, но отсутствовали Индуцированный при механическом стимуле. распространением ВП ответ фотосинтеза имеет характерную двухфазную динамику – первая быстрая фаза ответа продолжалась 10-20 минут, вторая более продолжительная – более часа (рис. 22А).



Рис. 22. А) Типичные записи индуцированных нагревом и ожогом изменений Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и NPQ. Б) Амплитуды первой и второй фазы изменений Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и изменений NPQ в листе гороха, вызванных ожогом и нагревом. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в листе гороха. Красным обозначена область регистрации активности фотосинтеза. * - p<0,05, различия между стимулами.

Сопоставление эффекта различных стимулов показало, что амплитуда изменений всех исследуемых показателей – Φ_{PSI} , Φ_{PSII} , NPQ – была выше в случае нагрева в сравнении с ожогом. При этом большие значения амплитуды ответа наблюдались как для первой быстрой, так и для второй длительной фазы ответа (рис. 22Б).

Изучение специфичности индуцированных различными локальными стимулами ответов фотосинтеза было выполнено также на растениях пшеницы. На данном объекте была изучена пространственно-временная динамика ответов фотосинтеза, индуцированных локальным нагревом, ожогом и механическим повреждением. С этой целью активность фотосинтеза регистрировали одновременно на различном расстоянии от зоны локального раздражения в трех различных областях, обозначенных на рисунке 23 как area1, area2, area3, методом PAM-имиджинга. Расположение area1, area2, area3 соответствовало расположению электродов Э1, Э2 и Э3, т.е. примерно 3, 6 и 9 см от места нанесения стимула. В качестве исследуемых параметров выступили амплитуды первой и второй фаз изменений Φ_{PSII} и NPQ (рис. 24). аналогичны ответу при горохе, однако были небольшие различия в его динамике. Так, у пшеницы первая фаза начиналась практически сразу после прохождения ВП, достигая пика через 1-2 минуты, а через 5-10 минут после начала изменений развивалась вторая фаза, достигая второго пика через 10-25 минут, причем фазы ответа были более выражены. Также стоит отметить наличие вблизи от зоны раздражения кратковременного (не более 1-2 минуты) понижения NPQ, которое предшествовало первой фазе подъема NPQ (рис. 23Б).

Амплитуды первой фазы изменений Φ_{PSII} и NPQ (рис. 24) на небольшом расстоянии от зоны раздражения были выше для ожога в сравнении с постепенным нагревом. Однако имел место более сильный декремент амплитуды ответа с расстоянием в случае ожога, следствием чего явилось

превышение амплитуды для нагрева на больших расстояниях. Амплитуда второй фазы ответа на небольших расстояниях была примерно одинакова для



Рис. 23. А) Типичные записи изменений Φ_{PSII} , индуцированные нагревом и ожогом. Б) Типичные записи изменений NPQ в проростках пшеницы, индуцированные нагревом и ожогом. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в area1. Разными цветами обозначены области регистрации активности фотосинтеза.



Рис. 24. 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. Разными цветами обозначены области регистрации активности фотосинтеза. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, различные строчные буквы обозначают статистически значимые различия, различных расстояниях в рамках одного стимула, р<0,05.

ожога и нагрева, но в случае ожога также имел место сильный декремент с расстоянием, тогда как при нагреве происходило некоторое возрастание с

последующим слабым снижением (рис 24). Что касается механического повреждения, то выраженный ответ фиксировался лишь на участке в 3 см от зоны раздражения, причем его амплитуда была меньше, чем при нагреве и ожоге, за исключением амплитуды первой фазы роста NPQ, где она была сопоставима с нагревом.

Таким образом, выполненные исследования позволили выявить, что при действии различных локальных раздражителей имеет место специфичность системного ответа, которая проявляется как в амплитуде изменений, так и в расстояниях, которые такие изменения охватывают. Рассмотрение причин, обуславливающих различия в параметрах системного ответа фотосинтеза при действии различных раздражителей, требуют анализа возможных механизмов индукции системного ответа. На сегодняшний день в литературе хорошо описана индукция ответа фотосинтеза электрическими сигналами (Fromm et al., 1995; Fromm et al., 2013; Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Pavlovic Sukhov 2011: et al., 2019). Согласно современным and Mancuso, представлениям, индуцированное ВП снижение активности фотосинтеза может быть обусловлена изменениями концентраций Ca²⁺ и pH, имеющими место при генерации ВП. Кроме того, индукция долговременных изменений активности фотосинтеза в ответ на локальные стимулы, может происходить вследствие изменения содержания фитогормонов (Choi et al., 2016; Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). Первая, быстрая фаза ответа фотосинтеза, по-видимому, связана с имеющими место сдвигами Ca²⁺ и рН в клетке, в частности, изменяя рН в хлоропластах и изменяя рНзависимое соотношение СО2: НСО3 и некоторых других компонентов фотосинтетических реакций, тем самым нарушая работу АТФ-синтаз и т.д. (Sukhov et al., 2019). В то время как вторая, продолжительная может быть связана с изменениями содержания гормонов, таких как жасмоновая (ЖК) или абсцизовая кислота (АБК), которые также способны приводить к нарушениям работы фотосинтеза, по-видимому, через закрытие устьиц и снижение доступа CO₂ (Hlavabkova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012). Что касается выявленного в

ряде случаев опережения ВП начальной фазой роста транспирации при ожоге, то это может объясняться участием гидравлической волны, составляющей одну из компонент ВП в виде комплексного сигнала (Vodeneev et al., 2012; Vodeneev et al., 2015).

Изучение особенностей вышеупомянутых путей индукции, как механизма специфичности системного ответа, стало задачей следующего этапа работы.

3.4. Анализ механизмов развития специфичного функционального ответа при действии раздражителей различной природы

С учетом выявленных ранее особенностей и механизмов электрических сигналов и функционального ответа был проведен анализ возможных механизмов развития особенностей ответа.

Таблица 3

Корреляция между амплитудой индуцированного ожогом или нагревом ВП и амплитудой кратковременной (первой) и долговременной (второй)

фазы фотосинтетического ответа у проростков пшеницы.

| | NPQ (первая | NPQ (вторая | $ \Phi_{\rm PSII} $ (первая | |
|--------|-------------|-------------|-----------------------------------|-------|
| | фаза) | фаза) | фаза) | фаза) |
| нагрев | 0.62* | 0.56* | 0.67* | 0.65* |
| ожог | 0.78* | 0.63* | 0.78* | 0.68* |

p<0,05, при оценки значимости коэффициента корреляции.

Первым этапом выступал корреляционный анализ, для проверки возможности связи между параметрами ВП и ответа фотосинтеза. Анализ осуществлялся на растениях пшеницы, ВП и ответ фотосинтеза индуцировали постепенным нагревом и ожогом. Проведенный анализ показал, что коэффициенты корреляции между амплитудами ВП и фотосинтетического



Рис. 25. А) Типичные записи изменений интенсивности флуоресценции рНчувствительного зонда BCECF ($\Delta F/F0$) в листьях пшеницы, индуцированных постепенным нагревом ожогом. Рост значений И соответствует защелачиванию апопласта. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в area1. Б) Зависимость амплитуд первой и второй фаз изменений $\Delta F/F0$ от расстояния в листьях пшеницы, индуцированных ожогом и постепенным нагревом. Разными цветами обозначены области регистрации изменений интенсивности флоресценции зонда. 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.

ответа выше для первой, быстрой фазы ответа по сравнению со второй, длительной фазой ответа (табл. 3). Это позволяет предположить о большем участии ВП в регуляции первой, кратковременной фазы фотосинтетического ответа.

Далее была проведена оценка изменений рН, поскольку, как было показано ранее (Grams et al., 2009; Joliot and Johnson 2011; Sukhov et al., 2014), такие изменения играют ключевую роль в развитии быстрого ответа фотосинтеза. Изменения pH регистрировали на различном расстоянии от зоны раздражения с использованием флуоресцентного рН-чувствительного зонда ВСЕСГ, 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. 25).

Вместе с данными корреляционного анализа, ЭТИ результаты показывают, что индукция быстрой фазы ответа фотосинтеза, вероятнее всего, связана с инактивацией H⁺-АТФазы плазматических мембран, которая имеет место при генерации ВП (Grams et al., 2009; Vodeneev et al., 2015) и хорошо соотносится с показанными раннее результатами ингибиторного анализа. 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). Это вызывает снижение активности фотосинтеза как путем редукции потока CO₂, так и путем повышения NPQ и изменением конформации светособирающих комплексов (Sukhov et al., 2019;

Szechynska-Hebda et al., 2017). Определенная пространственная динамика изменений pH в листе пшеницы проявляет высокое сходство с таковой для ответов фотосинтеза. Более того, сдвиги pH проявляют сильное затухание с расстоянием при ожоге и менее выраженное при нагреве, что соотносится с наблюдаемыми особенностями динамики ВП и кратковременной фазы фотосинтетического ответа.



Рис. 26. Временная динамика концентрации ЖК и АБК во втором листе пшеницы, индуцированных ожогом и постепенным нагревом. Черным обозначена исследуемая область. * - p<0,05 при сравнению между стимулами, # - p<0,05, при сравнении с концентрацией до стимуляции.

Также была исследована динамика содержания абсцизовой (АБК) и жасмоновой кислоты (ЖК) в листе пшеницы (рис. 26). В случае постепенного нагрева в нераздраженной части листа, на расстоянии 5 см от места нанесения стимула, имеет место повышение концентрации исследуемых гормонов, в то время как в случае ожога статистически значимые сдвиги концентраций наблюдаются лишь для ЖК, причем только в одной временной точке – пик

концентрации наблюдался через 10 минут после нанесения стимула. Подъем концентрации ЖК имеет место уже через 5 минут после прохождения ВП, индуцированного нагревом, достигая выраженного максимума через 10 минут, что соответсвует выявленному максимуму при ожоге. Затем происходит понижение концентрации ЖК с возращением к контрольным значениям через 2 часа после раздражения (рис. 26). Важно отметить, что в случае нагрева повышение концентрации ЖК в точке максимума было выше, чем для ожога, более чем в 5 раз.

Особенности динамики изменений концентраций гормонов позволяет предположить их роль в развитии долговременной фазы ответа фотосинтеза. Ранее для растений табака была показана связь роста концентраций ЖК и долгосрочного (15-60 минут) подавления фотосинтеза в ответ на локальный ожог листа (Hlavácková et al., 2006), схожие данные были получены для томатов (Hlavinka et al.. 2012). Полученные результаты также свидетельствуют, что ВП вызывает сдвиги концентраций гормонов в нераздраженных участках листа пшеницы. Среди двух исследованных в работе гормонов – АБК и ЖК – на роль индуктора долговременной фазы инактивации фотосинтеза у пшеницы претендует, прежде всего, ЖК. В пользу этого свидетельствуют выраженный сдвиг в концентрации, хорошее соответствие временной динамики концентрации ЖК и временной динамике второй фазы ответа фотосинтеза, способности ЖК вызывать инактивацию фотосинтеза (Maslenkova et al., 1995; Nabity et al., 2013; Popova et al., 1988) и данных о роли ЖК в индукции долговременных ответов фотосинтеза, полученные для других растений (Hlavabkova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012).

Для проверки предположения о гормональной регуляции второй фазы фотосинтеза на пшенице оценивали динамику устьичной проводимости (gS), поскольку для ЖК показана способность к закрытию устьиц (Hlavackova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Krausko et al., 2017). Измерения проводились на расстоянии 5 см от области раздражения. Изменения в устьичной проводимости имеют фазы роста и снижения (рис. 27), подъем gS начинается

сразу после распространения ВП и достигает максимума примерно через 5 мин. Последующее снижение gS имеет намного большую длительность, при этом стоит отметить, что оно фиксируется после времени достижения максимума концентрации ЖК. Динамика gS, вызванная электрическими сигналами, у растений пшеницы была аналогична динамике предварительно показанная динамика у других растений (Galle et al., 2013; Grams et al., 2009; Kaiser and Grams, 2006). Причем быстрый рост gS связали с гидропассивным открытием устьиц, вызванным потерей эпидермального тургора, а последующее снижение, вероятно, связано с закрытием устьиц из-за потери тургора замыкающих клеток (Kaiser and Grams, 2006), что в свою очередь, может объясняться действием ЖК.



Рис. 27. Динамика устьичной проводимости (gS) в проростках пшеницы, индуцированная ожогом и нагревом. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в исследуемой области.

Основные различия в динамике gS, вызванной ожогом и нагревом, заключаются в степени его подавления и продолжительности. В случае ожога амплитуда снижения gS была несколько меньше по сравнению с нагревом, при этом восстановление gS при ожоге началось примерно через 35 мин после BП, тогда как при постепенном нагреве восстановление началось только через 70 мин. Полученные различия дополнительно поддерживают предположение об участии ЖК в регуляции закрытия устьиц.

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.

На основании анализа результатов, полученных в настоящей работе, а также данных литературы была предложена гипотетическая схема развития стимул-специфичного системного ответа (рис. 28). Локальный стимул индуцирует ВП, который быстро распространяется за пределы зоны нарастающий раздражения. Быстро стимул (ожог, механическое повреждение), индуцирует 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 Ca²⁺каналов, соответственно. Распространение ВП в нераздраженных частях растения вызывает изменения в pH 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.



Рис. 28. Предполагаемая схема развития системного ответа фотосинтеза у проростков пшеницы, вызванного локальным 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.

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

- Выявлены стимул-специфичные особенности индуцированного локальным ожогом, нагревом и механическим повреждением вариабельного 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 механочувствительных Ca²⁺-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.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1. Опритов В.А., Пятыгин С.С., Ретвин В.Г. Биоэлектрогенез в высших растениях // Наука: Москва. Россия 1991
- Babla M., Cai S., Chen G., Tissue D.T., Cazzonelli C.I., Chen Z.-H. Molecular Evolution and Interaction of Membrane Transport and Photoreception in Plants // Front. Genet. 2019. V. 10. P. 956
- Baum G., Long J.C., Jenkins G.I., Trewavas A.J. Stimulation of the Blue Light Phototropic Receptor NPH1 Causes a Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺ // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. V. 96. P. 13554–13559
- 4. Baxter A., Mittler R., Suzuki N. ROS as Key Players in Plant Stress Signalling
 // Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65. P. 1229–1240
- Bland J.M., Altman D.G. Measuring agreement in method comparison studies // Stat. Methods Med. Res. 1999. V. 8(2). P. 135-160
- Boari F., Malone M. Wound-Induced Hydraulic Signals: Survey of Occurrence in a Range of Species // J. Exp. Bot. 1993. V. 44. P. 741–746
- Böhm J., Scherzer S., Krol E., Kreuzer I., von Meyer K., Lorey C., Mueller T.D., Shabala L., Monte I., Solano R., et al. The Venus Flytrap *Dionaea Muscipula* Counts Prey-Induced Action Potentials to Induce Sodium Uptake // Curr. Biol. 2016. V. 26. P. 286–295
- Brauer D., Loper M., Schubert C., Tu, S.-I. Effects of Temperature on the Coupled Activities of the Vanadate-Sensitive Proton Pump from Maize Root Microsomes // Plant Physiol. 1991. V. 96. P. 1114–1117
- Bruce, L. M., Morgan, C., Larsen, S. Automated detection of subpixel hyperspectral targets with continuous and discrete wavelet transforms // IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing. 2001. V. 39(10). P. 2217– 2226

- 10.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
- 11.Bulychev A. A., Komarova A. V. Long-Distance Signal Transmission and Regulation of Photosynthesis in Characean Cells // Biochemistry (Moscow).
 2014. V. 79. No. 3. P. 273-281
- 12.Caemmerer von S., Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves // Planta. 1981.
 V. 153(4). P. 376-387
- 13.Carpaneto A., Ivashikina N., Levchenko V., Krol E., Jeworutzki E., Zhu J.K., Hedrich R. Cold Transiently Activates Calcium-Permeable Channels in *Arabidopsis* Mesophyll Cells // Plant Physiol. 2007. V. 143. P. 487–494
- 14.Chen D., Cao Y., Li H., Kim D., Ahsan N., Thelen J., Stacey G. Extracellular ATP Elicits DORN1-Mediated RBOHD Phosphorylation to Regulate Stomatal Aperture // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 2265
- 15.Cho M.H., Spalding E.P. An Anion Channel in Arabidopsis Hypocotyls Activated by Blue Light // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. V. 93. P. 8134–8138
- 16.Choi W.-G., Hilleary R., Swanson S.J., Kim, S.-H., Gilroy, S. Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2016. V. 67. P. 287–307
- 17.Choi W., Miller G., Wallace I., Harper J., Mittler R., Gilroy S. Orchestrating Rapid Long-distance Signaling in Plants with Ca²⁺, ROS and Electrical Signals // Plant J. 2017. V. 90. P. 698–707
- 18.Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. Reactive Oxygen Species, Abiotic Stress and Stress Combination // Plant J. 2017. V. 90. P. 856– 867

- 19.Cross A.R., Jones O.T.G. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide generating system of neutrophils: Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. // Biochem J. 1986. V. 237. P. 111– 116
- 20.Cui Y., Lu S., Li Z., Cheng J., Hu P., Zhu T., Wang X., Jin M., Wang X., Li L., et al. CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELs 14 and 16 Promote Tolerance to Heat and Chilling in Rice // Plant Physiol. 2020. V. 183. P. 1794–1808
- 21.Davies E., Vian A., Vian C., Stankovic B. Rapid Systemic Up-Regulation of Genes after Heat-Wounding and Electrical Stimulation // Acta Physiol. Plant.
 1997. V. 19. P. 571–576
- 22.Decreux A., Messiaen J. Wall-Associated Kinase WAK1 Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-Induced Conformation // Plant Cell Physiol. 2005.
 V. 46. P. 268–278
- 23.Demidchik V., Shabala S., Isayenkov S., Cuin T.A., Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions // New Phytol. 2018. V. 220. P. 49–69
- 24.Devireddy A.R., Zandalinas S.I., Gómez-Cadenas A., Blumwald E., Mittler R. Coordinating the Overall Stomatal Response of Plants: Rapid Leaf-to-Leaf Communication during Light Stress // Sci. Signal. 2018. V. 11. eaam9514
- 25.Ding J.P. and Pickard B.G. Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells // Plant J. 1993. V. 3(1). P. 83-110
- 26.Driedonks N., Xu J., Peters J.L., Park S., Rieu I. Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 999
- 27.Dziubinska H., Filek M., Koscielniak J., Trebacz K. Variation and Action Potentials Evoked by Thermal Stimuli Accompany Enhancement of Ethylene

Emission in Distant Non-Stimulated Leaves Of *Vicia Faba Minor* seedlings // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 1203–1210

- 28.Elzenga J.T.M., Prins H.B.A., Van Volkenburgh E. Light-Induced Membrane Potential Changes of Epidermal and Mesophyll Cells in Growing Leaves of *Pisum Sativum* // Planta. 1995. V. 197. P. 127–134
- 29.Ermolayeva E., Hohmeyer H., Johannes E., Sanders D. Calcium-Dependent Membrane Depolarisation Activated by Phytochrome in the Moss *Physcomitrella Patens* // Planta. 1996. V. 199. P. 352–358
- 30.Fabricant A., Iwata G.Z., Scherzer S., Bougas L., Rolfs K., Jodko-Władzińska A., Voigt J., Hedrich R., Budker D. Action Potentials Induce Biomagnetic Fields in Carnivorous Venus Flytrap Plants // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 1438
- 31.Falhof J., Pedersen J.T., Fuglsang A.T., Palmgren M. Plasma Membrane H⁺ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology // Mol. Plant. 2016. V.
 9. P. 323–337
- 32.Farmer E.E., Gao Y., Lenzoni G., Wolfender, J., Wu Q. Wound- and Mechanostimulated Electrical Signals Control Hormone Responses // New Phytol. 2020. V. 227. P. 1037–1050
- 33.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
- 34.Finka A., Cuendet A.F.H., Maathuis F.J.M., Saidi Y., Goloubinoff, P. Plasma Membrane Cyclic Nucleotide Gated Calcium Channels Control Land Plant Thermal Sensing and Acquired Thermotolerance // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 3333–3348
- 35.Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Peña-Cortés H. Analysis of the Transient Increase in Cytosolic Ca²⁺ during the Action Potential of Higher Plants with

High Temporal Resolution: Requirement of Ca²⁺ Transients for Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis and PINII Gene Expression // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 456–459

- 36.Folta K.M., Spalding E.P. Unexpected Roles for Cryptochrome 2 and Phototropin Revealed by High-Resolution Analysis of Blue Light-Mediated Hypocotyl Growth Inhibition: Blue-Light Photoreceptors and Early Growth Kinetics // Plant J. 2001. V. 26. P. 471–478
- 37.Franklin K.A., Quail P.H. Phytochrome Functions in *Arabidopsis* Development // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 11–24
- 38.Fromm J., Bauer T. Action Potentials in Maize Sieve Tubes Change Phloem Translocation // J. Exp. Bot. 1994. V. 45. P. 463–469
- 39.Fromm J., Hajirezaei M., Wilke I. The Biochemical Response of Electrical Signaling in the Reproductive System of Hibiscus Plants // Plant Physiol. 1995 V. 109. P. 375–384
- 40.Fromm J., Lautner S. Electrical Signals and Their Physiological Significance in Plants: Electrical Signals in Plants // Plant Cell Environ. 2007. V. 30, P. 249–257
- 41.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. P. 239
- 42.Furch A.C.U., Hafke J.B., van Bel A.J.E. Plant- and Stimulus-Specific Variations in Remote-Controlled Sieve-Tube Occlusion // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3. P. 858–861
- 43.Furuichi T., Iida H., Sokabe M., Tatsumi H. Expression of *Arabidopsis* MCA1 Enhanced Mechanosensitive Channel Activity in the Xenopus Laevis Oocyte Plasma Membrane // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 1022–1026

- 44.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: Electrical Signalling and Mesophyll Conductance in Soybean // Plant Cell Environ. 2013. V. 36. P. 542–552
- 45.Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J. Environmental Stimuli and Physiological Responses: The Current View on Electrical Signalling // Environmental and Experimental Botany. 2015. V. 114. P. 15–21
- 46.Galvez-Valdivieso G., Fryer M.J., Lawson T., Slattery K., Truman W., Smirnoff N., Asami T., Davies W.J., Jones A.M., Baker N.R., et al. The High Light Response in *Arabidopsis* Involves ABA Signaling between Vascular and Bundle Sheath Cells // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2143–2162
- 47.Gao F., Han X., Wu J., Zheng S., Shang Z., Sun D., Zhou R., Li B. A Heat-Activated Calcium-Permeable Channel *Arabidopsis* Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel 6 Is Involved in Heat Shock Responses: CNGC6 Is a Heat-Activated Calcium Channel // Plant J. 2012. V. 70. P. 1056–1069
- 48.Geng S., Misra B.B., de Armas E., Huhman D.V., Alborn H.T., Sumne, L.W., Chen S. Jasmonate-Mediated Stomatal Closure under Elevated CO₂ Revealed by Time-Resolved Metabolomics // Plant J. 2016. V. 88. P. 947–962
- 49.Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis // Biochem Med. (Zagreb). 2015. V. 25(2). P. 141-151
- 50.Gilroy S., Białasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R., Karpiński S., Mittler R. ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants // Plant Physiol. 2016. V. 171(3). P. 1606–1615
- 51.Gong M., van der Luit A.H., Knight M.R., Trewavas A.J. Heat-Shock-Induced Changes in Intracellular Ca²⁺ Level in Tobacco Seedlings in Relation to Thermotolerance1 // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 429–437

- 52.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 Environ. 2009. V. 32. P. 319–326
- 53.Guerringue Y., Thomine S., Frachisse J.-M. Sensing and Transducing Forces in Plants with MSL10 and DEK1 Mechanosensors // FEBS Lett. 2018. V. 592. P. 1968–1979
- 54.Guo X., Liu D., Chong K. Cold Signaling in Plants: Insights into Mechanisms and Regulation: Cold Stress Signaling // J. Integr. Plant Biol. 2018. V. 60. P. 745–756
- 55.Hafke J.B., Ehlers K., Föller J., Höll S.-R., Becker S., van Bel A.J.E. Involvement of the Sieve Element Cytoskeleton in Electrical Responses to Cold Shocks // Plant Physiology. 2013. V. 162. P. 707–719
- 56.Hagihara T., Toyota M. Mechanical Signaling in the Sensitive Plant Mimosa Pudica L // Plants. 2020. V. 9. P. 587
- 57.Haley A., Russell A.J., Wood N., Allan A.C., Knight M., Campbell A.K., Trewavas A.J. Effects of Mechanical Signaling on Plant Cell Cytosolic Calcium // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. V. 92. P. 4124–4128
- 58.Hamilton E.S., Jensen G.S., Maksaev G., Katims A., Sherp A.M., Haswell E.S. Mechanosensitive Channel MSL8 Regulates Osmotic Forces during Pollen Hydration and Germination // Science. 2015. V. 350. P. 438–441
- 59.Hamilton E.S., Schlegel A.M., Haswell E.S. United in Diversity: Mechanosensitive Ion Channels in Plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2015. V. 66. P. 113–137
- 60.Hander T., Fernández-Fernández Á.D., Kumpf R.P., Willems P., Schatowitz H., Rombaut D., Staes A., Nolf J., Pottie R., Yao P., et al. Damage on Plants
Activates Ca²⁺ -Dependent Metacaspases for Release of Immunomodulatory Peptides. Science. 2019, V. 363. eaar7486

- 61.Haswell E.S., Peyronnet R., Barbier-Brygoo H., Meyerowitz E.M., Frachisse J.-M. Two MscS Homologs Provide Mechanosensitive Channel Activities in the *Arabidopsis* Root // Curr. Biol. 2008. V. 18. P. 730–734
- 62.Heil. M., Land. W.G. Danger Signals Damaged-Self Recognition across the Tree of Life // Front. Plant Sci. 2014. V. 5
- 63.Herde O., Peña-Cortés H., Wasternack C., Willmitzer L., Fisahn J. Electric Signaling and Pin2 Gene Expression on Different Abiotic Stimuli Depend on a Distinct Threshold Level of Endogenous Abscisic Acid in Several Abscisic Acid-Deficient Tomato Mutants1 // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 213–218
- 64.Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J., Novák O., Špundová 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
- 65.Hlavinka J., Nožková-Hlaváčková V., Floková K., Novák O., Nauš 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
- 66.Hodick D., Sievers A. The Influence of Ca²⁺ on the Action Potential in Mesophyll Cells Of *Dionaea Muscipula* Ellis // Protoplasma. 1986. V. 133.
 P. 83–84
- 67.Hodick D., Sievers A. The Action Potential of *Dionaea Muscipula* Ellis // Planta. 1988. V. 174. P. 8–18
- 68.Horváth I., Glatz A., Nakamoto H., Mishkind M.L., Munnik T., Saidi Y., Goloubinoff P., Harwood J.L., Vigh L. Heat Shock Response in

Photosynthetic Organisms: Membrane and Lipid Connections // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 208–220

- 69.Hramov, A.E., Koronovskii, A.A., Makarov, V.A., Pavlov, A.N., Sitnikova,
 E. Wavelets in Neuroscience // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2015.
 XVI. P.318
- 70.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. P. 2063–2079
- 71.Hu X.Y., Neill S.J., Cai W.M., Tang Z.C. Induction of Defence Gene Expression by Oligogalacturonic Acid Requires Increases in Both Cytosolic Calcium and Hydrogen Peroxide in *Arabidopsis Thaliana* // Cell Res. 2004.
 V. 14. P. 234–240
- 72.Hug O., Miltenburger H., Esch H. Elektrophysiologische Begleiterscheinungen Strahleninduzierter Bewegungen Bei Mimosen // Biophysik. 1964. V. 1. P. 374–379
- 73.Iijima T., Sibaoka T. Action Potential in the Trap-Lobes of Aldrovanda Vesiculosa // Plant Cell Physiol. 1981. V. 22. P. 1595–1601
- 74.Johannes E., Ermolayeva E., Sanders D. Red Light-Induced Membrane Potential Transients in the Moss *Physcomitrella Patens*: Ion Channel Interaction in Phytochrome Signalling // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. P. 599–608
- 75.Joliot P., Johnson G. N. Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108 (32). P. 13317–13322
- 76.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 // J. Exp. Bot. 1991. V. 42. P. 131–137
- 77.Kai K., Kasa S., Sakamoto M., Aoki N., Watabe G., Yuasa T., Iwaya-Inoue M., Ishibashia Y. Role of reactive oxygen species produced by NADPH

oxidase in gibberellin biosynthesis during barley seed germination // Plant Signal Behav. 2016. V. 11(5). e1180492

- 78.Kaiser H., Grams T.E.E. Rapid Hydropassive Opening and Subsequent Active Stomatal Closure Follow Heat-Induced Electrical Signals in *Mimosa Pudica* // Journal of Experimental Botany. 2006. V. 57. P. 2087–2092
- 79.Kaneko T., Saito C., Shimmen T., Kikuyama M. Possible Involvement of Mechanosensitive Ca²⁺ Channels of Plasma Membrane in Mechanoperception in *Chara* // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 130–135
- 80.Katano K., Kataoka R., Fujii M., Suzuki N. Differences between Seedlings and Flowers in Anti-ROS Based Heat Responses of *Arabidopsis* Plants Deficient in Cyclic Nucleotide Gated Channel 2 // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 123. P. 288-296
- 81.Katicheva L., Sukhov V., Akinchits E., Vodeneev V. Ionic Nature of Burn-Induced Variation Potential in Wheat Leaves // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 1511–1519
- 82.Kawarazaki T., Kimura S., Iizuka A., Hanamata S., Nibori H., Michikawa M., Imai A., Abe M., Kaya H., Kuchitsu K. A Low Temperature-Inducible Protein AtSRC2 Enhances the ROS-Producing Activity of NADPH Oxidase AtRbohF // Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 2013. 1833, 2775– 2780
- 83.Kiep V., Vadassery J., Lattke J., Maaß J.-P., Boland W., Peiter E., Mithöfer A. Systemic cytosolic Ca²⁺ elevation is activated upon wounding and herbivory in Arabidopsis // New Phytol. 2015. V. 207(4). P. 996-1004
- 84.Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M., Shimazaki K. Phot1 and Phot2 Mediate Blue Light Regulation of Stomatal Opening // Nature. 2001. V. 414. P. 656–660

- 85.Khlopkov A., Sherstneva O., Ladeynova M., Grinberg M., Yudina L., Sukhov V., Vodeneev V. Participation of Calcium Ions in Induction of Respiratory Response Caused by Variation Potential in Pea Seedlings // Plant Signal. Behav. 2021. V. 16, P. 1869415
- 86.Klejchova M., Silva-Alvim F.A.L., Blatt M.R., Alvim J.C. Membrane Voltage as a Dynamic Platform for Spatiotemporal Signaling, Physiological, and Developmental Regulation // Plant Physiology. 2021. V. 185. P. 1523– 1541
- 87.Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. Transgenic Plant Aequorin Reports the Effects of Touch and Cold-Shock and Elicitors on Cytoplasmic Calcium // Nature. 1991. V. 352. P. 524–526
- 88.Knight M.R., Smith S.M., Trewavas A.J. Wind-Induced Plant Motion Immediately Increases Cytosolic Calcium // Proc. Natl. Acad. Sci. 1992. V. 89. P. 4967–4971
- 89.Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. Cold Calcium Signaling in Arabidopsis Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation // Plant Cell. 1996. V. 8, P. 489–503
- 90.Knight M.R., Knight H. Low-temperature Perception Leading to Gene Expression and Cold Tolerance in Higher Plants // New Phytol. 2012. V. 195. P. 737–751
- 91.Koziolek Ch., Gram Th., Schreiber U. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals // New Phytologist. 2004. V. 161 (3). P. 715– 722
- 92.Krausko M., Perutka Z., Šebela M., Šamajová O., Šamaj J., Novák O., Pavlovič A. The Role of Electrical and Jasmonate Signalling in the Recognition of Captured Prey in the Carnivorous Sundew Plant Drosera Capensis // New Phytologist. 2017. V. 213. P. 1818–1835

- 93.Krebs M., Held K., Binder A., Hashimoto K., Den Herder G., Parniske M., Kudla J., Schumacher K. FRET-Based Genetically Encoded Sensors Allow High-Resolution Live Cell Imaging of Ca²⁺ Dynamics: Improved Vectors for Ca²⁺ Imaging in Plants // Plant J. 2012. V. 69. P. 181–192
- 94.Krol E., Trebacz K. Calcium-Dependent Voltage Transients Evoked by Illumination in the Liverwort *Conocephalum Conicum* // Plant Cell Physiol. 1999 V. 40 (1). P. 17–24
- 95.Krol E., Dziubinska H., Trebacz K. Low-Temperature Induced Transmembrane Potential Changes in the Liverwort *Conocephalum Conicum* // Plant Cell Physiol. 2003. V. 44, P. 527–533
- 96.Krol E., Dziubinska H., Trebacz K. Low-Temperature-Induced Transmembrane Potential Changes in Mesophyll Cells of *Arabidopsis Thaliana*, *Helianthus Annuus* and *Vicia Faba* // Physiol. Plant. 2004. V. 120. P. 265–270
- 97.Krol E., Dziubinska H., Stolarz M., Trebacz K. Effects of Ion Channel Inhibitors on Cold- and Electrically-Induced Action Potentials in *Dionaea Muscipula* // Biologia plant. 2006. V. 50. P. 411–416
- 98.Krol E., Mentzel T., Chinchilla D., Boller T., Felix G., Kemmerling B., Postel S., Arents M., Jeworutzki E., Al-Rasheid K.A.S., et al. Perception of the *Arabidopsis* Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2 // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 13471–13479
- 99.Kurenda A., Nguyen C.T., Chételat A., Stolz S., Farmer E.E. Insect-Damaged Arabidopsis Moves like Wounded *Mimosa Pudica* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2019. V. 116. P. 26066–26071

- Lamers J., van der Meer T., Testerink C. How Plants Sense and Respond to Stressful Environments // Plant Physiol. 2020. V. 182. P. 1624– 1635
- 101. Lansman J.B. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit // J Gen Physiol. 1990. V. 95(4). P. 679-696
- 102. Laohavisit A., Shang Z., Rubio L., Cuin T.A., Véry A.-A., Wang A., Mortimer J.C., Macpherson N., Coxon K.M., Battey N.H., et al. *Arabidopsis* Annexin1 Mediates the Radical-Activated Plasma Membrane Ca²⁺- and K⁺-Permeable Conductance in Root Cells // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 1522– 1533
- 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
- 104. 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: Electrical Signalling and Respiration // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. P. 254–260
- 105. Lee D.J., Choi H.J., Moon M.-.E., Chi Y.-T., Ji K.-Y., Choi D. Superoxide serves as a putative signal molecule for plant cell division: Overexpression of CaRLK1 promotes the plant cell cycle via accumulation of O₂ – and decrease in H₂O₂ // Physiol. Plant. 2017. V. 159(2). P. 228-243
- 106. Lenzoni G., Liu J., Knight M.R. Predicting Plant Immunity Gene Expression by Identifying the Decoding Mechanism of Calcium Signatures // New Phytol. 2018. V. 217. P. 1598–1609
- 107. Lew R.R. Electrogenic transport properties of growing *Arabidopsis* root hairs // Plant Physiol. 1991. V. 97. P. 1527-1534

- 108. Lewis B.D., Karlin-Neumann G., Davis R.W., Spalding E.P. Ca²⁺-Activated Anion Channels and Membrane Depolarizations Induced by Blue Light and Cold in *Arabidopsis* Seedlings // Plant Physiol. 1997. V. 114. P. 1327–1334
- 109. Li Y., Trush M. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, also Potently Inhibits Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production // Biochemical and biophysical research communications. 1998. V. 253. P. 295–299
- Li J., Yue Y., Wang Z., Zhou Q., Fan L., Chai Z., Song C., Dong H., Yan S., Gao X., et al. Illumination/Darkness-Induced Changes in Leaf Surface Potential Linked With Kinetics of Ion Fluxes // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1407
- Li Q., Wang C., Mou Z. Perception of Damaged Self in Plants // Plant Physiol. 2020. V. 182. P. 1545–1565
- 112. Liao C., Zheng Y., Gu. Y. MYB30 Transcription Factor Regulates Oxidative and Heat Stress Responses through ANNEXIN-mediated Cytosolic Calcium Signaling in *Arabidopsis* // New Phytol. 2017. V. 216. P. 163–177
- 113. Lin C. Plant Blue-Light Receptors // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P.337–342
- 114. Lin C. Blue Light Receptors and Signal Transduction // Plant Cell.2002. V. 14 P. 207-225
- Liu H.-T., Li B., Shang Z.-L., Li X.-Z., M, R.-L., Sun D.-Y., Zhou R.-G. Calmodulin Is Involved in Heat Shock Signal Transduction in Wheat // Plant Physiol. 2003. V. 132(3). P. 1186-95
- 116. Liu, H.-T., Sun, D.-Y., Zhou. R.-G. Ca²⁺ and AtCaM3 Are Involved in the Expression of Heat Shock Protein Gene in *Arabidopsis* // Plant Cell Environ. 2005. V. 28, P. 1276–1284

- 117. Liu H.T., Gao F., Cui S.J., Han J.L., Sun D.Y., Zhou R.G. Primary Evidence for Involvement of IP3 in Heat-Shock Signal Transduction in *Arabidopsis* // Cell Res. 2006. V. 16. P. 394–400
- 118. Liu Q., Ding Y., Shi Y., Ma L., Wang Y., Song C., Wilkins K.A., Davies J.M., Knight H., Knight M.R., et al. The Calcium Transporter ANNEXIN1 Mediates Cold-induced Calcium Signaling and Freezing Tolerance in Plants // EMBO J. 2021. V. 40(2). e104559
- 119. Ma Y., Walker R.K., Zha Y., Berkowitz G.A. Linking Ligand Perception by PEPR Pattern Recognition Receptors to Cytosolic Ca²⁺ Elevation and Downstream Immune Signaling in Plants // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. V. 109. P. 19852–19857
- Ma Y., Dai X., Xu Y., Luo W., Zheng X., Zeng D., Pan Y., Lin X., Liu H., Zhang D., et al. // COLD1 Confers Chilling Tolerance in Rice Cell. 2015.
 V. 160. P. 1209–1221
- 121. Maffei M., Bossi S., Spiteller D., Mithöfer A., Boland W. Effects of Feeding Spodoptera Littoralis on Lima Bean Leaves. I. Membrane Potentials, Intracellular Calcium Variations, Oral Secretions, and Regurgitate Components // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1752–1762
- 122. Maksaev G., Haswell E.S. MscS-Like10 Is a Stretch-Activated Ion Channel from *Arabidopsis Thaliana* with a Preference for Anions // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. V. 109, P. 19015–19020
- 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
- 124. Malone M. Kinetics of Wound-Induced Hydraulic Signals and Variation Potentials in Wheat Seedlings // Planta. 1992. V. 187

- 125. Marhavý P., Kurenda A., Siddique S., Dénervaud Tendon V., Zhou F., Holbein J., Hasan M.S., Grundler F.M., Farmer E.E., Geldner N. Single-cell Damage Elicits Regional, Nematode-restricting Ethylene Responses in Roots // EMBO J. 2019. V. 38(10). e100972
- 126. Maslenkova L., Toncheva S., Zeinalov Y. Effect of abscisic acid and jasmonic acid (or JA-Me) on the photosynthetic electron transport and oxygen evolving reactions in pea plants // Bulg J Plant Physiol. 1995. V. 21(4). P. 48– 55
- Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence a practical guide
 // Journal of Experimental Botany. 2000. V. 51. P. 659–668
- 128. Mazars C., Thion L., Thuleau P., Graziana A., Knight M.R., Moreau M., Ranjeva R. Organization of Cytoskeleton Controls the Changes in Cytosolic Calcium of Cold-Shocked *Nicotiana Plumbaginifolia* Protoplasts // Cell Calcium. 1997. V. 22. P. 413–420
- 129. Meena M.K., Prajapati R., Krishna D., Divakaran K., Pandey Y., Reichelt M., Mathew M.K., Boland W., Mithöfer A., Vadassery J. The Ca²⁺ Channel CNGC19 Regulates *Arabidopsis* Defense Against Spodoptera Herbivory // Plant Cell. 2019. V. 31. P. 1539–1562
- 130. 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 // Sci Signal. 2009. V. 2(84). ra45
- Minorsky P.V., Spanswick R.M. Electrophysiological Evidence for a Role for Calcium in Temperature Sensing by Roots of Cucumber Seedlings // Plant Cell Environ. 1989. V. 12. P. 137–143
- 132. Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. How Do Plants Feel the Heat? Trends Biochem // Sci. 2012. V. 37. P. 118–125

- 133. Mousavi S.A.R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer EE. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signaling // Nature. 2013. V. 500. P. 422–426
- Monshausen G.B., Bibikova T.N., Weisenseel M.H., Gilroy S. Ca²⁺
 Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during
 Mechanosensing in *Arabidopsis* Roots // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2341–2356
- Monshausen G.B., Haswell E.S. A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. // J Exp Bot. 2013. V. 64(15), P. 4663-80
- 136. Mori K., Renhu N., Naito M., Nakamura A., Shiba H., Yamamoto T., Suzaki T., Iida H., Miura K. Ca²⁺-Permeable Mechanosensitive Channels MCA1 and MCA2 Mediate Cold-Induced Cytosolic Ca²⁺ Increase and Cold Tolerance in *Arabidopsis* // Sci. Rep. 2018. V. 8, P. 550
- 137. Mousavi S.A.R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE Genes Mediate Leaf-to-Leaf Wound Signalling // Nature. 2013. V. 500. P. 422–426
- 138. 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
- Murata N., Los D.A. Membrane Fluidity and Temperature Perception // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 875–879
- 140. Murthy S.E., Dubin A.E., Whitwam T., Jojoa-Cruz S., Cahalan S.M., Mousavi S.A.R., Ward A.B., Patapoutian A. OSCA/TMEM63 Are an Evolutionarily Conserved Family of Mechanically Activated Ion Channels // eLife. 2018. V. 7, e41844

- 141. Nabity P.D., Zavala J.A., DeLucia E.H. Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuate* // J Exp Bot. 2013. V. 64(2). P. 685–94
- 142. Nakagawa Y., Katagiri T., Shinozaki K., Qi Z., Tatsumi H., Furuichi T., Kishigami A., Sokabe M., Kojima I., Sato S., Kato T., Tabata S., Iida K., Terashima A., Nakano M., Ikeda M., Yamanaka T., Iida H. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots // Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. V. 104(9). P. 3639–3644
- 143. Nawaz Z., Kakar K., Saand M.A., Shu Q.-Y. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel Gene Family in Rice, Identification, Characterization and Experimental Analysis of Expression Response to Plant Hormones, Biotic and Abiotic Stresses // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 853
- 144. Nelles A., Laske E. Temperature Dependency of the Membrane Potential of Corn Coleoptile Cells // Biochem. Physiol. Pflanz. 1982. V. 177.
 P. 107–113
- 145. Nelles A. Temperaturabhängigkeit des Protonen-Effluxes in Blattzellen von Begonia. Biochem // Physiol. Pflanz. 1985. V. 180. P. 473–475
- 146. Nguyen C.T., Kurenda A., Stolz S., Chételat A., Farmer E.E. Identification of Cell Populations Necessary for Leaf-to-Leaf Electrical Signaling in a Wounded Plant // Proc Natl Acad Sci USA. 2018. V. 115. P. 10178–10183
- 147. Nick P. Microtubules, Signalling and Abiotic Stress // Plant J. 2013. V.
 75. P. 309–323
- 148. Niyogi K.K. PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 333–359

- 149. Oda K., Abe T. Action Potential and Rapid Movement in the Main Pulvinus Of *Mimosa Pudica* // Bot. Mag. Tokyo. 1972. V. 85. P. 135–145
- O'Donnell V.B., Smith G.C., Jones O.T. Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes // Mol. Pharmacol. 1994. V. 46(4). P. 778-85
- Opritov V.A., Lobov S.A., Pyatygin S.S., Mysyagin S.A. Analysis of Possible Involvement of Local Bioelectric Responses in Chilling Perception by Higher Plants Exemplified by *Cucurbita Pepo //* Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52, P. 801–808
- 152. Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. Early Steps in Cold Sensing by Plant Cells: The Role of Actin Cytoskeleton and Membrane Fluidity // Plant J. 2000. V. 23. P. 785–794
- 153. Parks B.M., Cho M.H., Spalding E.P. Two Genetically Separable Phases of Growth Inhibition Induced by Blue Light in *Arabidopsis* Seedlings // Plant Physiol. 1998
- 154. Pavlovič A. The effect of electrical signals on photosynthesis and respiration // Plant Electrophysiology. 2012. ed by Volkov A., P. 378
- 155. Pavlovič A., Jakšová J., Novák O. Triggering a False Alarm: Wounding Mimics Prey Capture in the Carnivorous Venus Flytrap (*Dionaea Muscipula*) // New Phytol. 2017. V. 216. P. 927–938
- Pavlovič A., Mancuso S. Electrical Signaling and Photosynthesis: Can They Co-Exist Together? // Plant Signal Behav. 2011. V. 6. P. 840–842
- 157. Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener 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(6797). P. 731-734

- 158. Peng X., Zhang X., Li B., Zhao L. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel 6 Mediates Thermotolerance in *Arabidopsis* Seedlings by Regulating Nitric Oxide Production via Cytosolic Calcium Ions // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. P. 368
- 159. Plieth C., Hansen U.-P., Knight H., Knight M.R. Temperature Sensing by Plants: The Primary Characteristics of Signal Perception and Calcium Response // Plant J. 1999. V. 18. P. 491–497
- 160. Pogson B.J., Woo N.S., Förste, B., Small I.D. Plastid Signalling to the Nucleus and Beyond // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 602–609
- 161. Popova L.P., Tsonev T.D., Vaklinova S.G. Changes in some photosynthetic and photorespiratory properties in barley leaves after treatment with jasmonic acid // J Plant Physiol. 1988. V. 132. P. 257–61
- 162. Procko C., Murthy S., Keenan W.T., Mousavi S.A.R., Dabi T., Coombs A., Procko E., Baird L., Patapoutian A., Chory J. Stretch-Activated Ion Channels Identified in the Touch-Sensitive Structures of Carnivorous *Droseraceae* Plants // eLife. 2021. V. 10. e64250
- 163. Pyatygin S.S., Opritov V.A., Khudyakov V.A. Subthreshold Changes in Excitable Membranes of *Cucurbits Pepo* L. Stem Cells during Cooling-Induced Action-Potential Generation // Planta. 1992. P. 186
- 164. Qiao B., Zhang Q., Liu D., Wang H., Yin J., Wang R., He M., Cui M., Shang Z., Wang D., et al. A Calcium-Binding Protein, Rice Annexin OsANN1, Enhances Heat Stress Tolerance by Modulating the Production of H₂O₂ // J Exp. Bot. 2015
- 165. Quail P.H. Photosensory Perception and Signalling in Plant Cells: New Paradigms? // Curr. Opin Cell Biol. 2002. V. 14. P. 180–188

- 166. Oyarce P., Gurovich L. Electrical Signals in Avocado Trees: Responses to Light and Water Availability Conditions // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5, P. 34–41
- 167. Richards S.L., Laohavisit A., Mortimer J.C., Shabala L., Swarbreck S.M., Shabala S., Davies J.M. Annexin 1 Regulates the H₂O₂-Induced Calcium Signature in *Arabidopsis Thaliana* Roots // Plant J. 2014. V. 77. P. 136–145
- 168. Roblin G. Movements and Bioelectrical Events Induced by Photostimulation in the Primary Pulvinus of *Mimosa Pudica* // Z. Für Pflanzenphysiol. 1982. V. 106. P. 299–303
- 169. Roblin G. Analysis of the Variation Potential Induced by Wounding in Plants // Plant Cell Physiol. 1985. V. 26. P. 455–461
- 170. Saidi Y., Finka A., Muriset M., Bromberg Z., Weiss Y.G., Maathuis F.J.M., Goloubinoff P. The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane // Plant Cell. 2009. V. 21(9). P. 2829–2843
- Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. Heat Perception and Signalling in Plants: A Tortuous Path to Thermotolerance // New Phytol. 2011. V. 190. P. 556–565
- 172. Salvador-Recatalà V., Tjallingii W.F., Farmer E.E. Real-time, in Vivo Intracellular Recordings of Caterpillar-induced Depolarization Waves in Sieve Elements Using Aphid Electrodes // New Phytol. 2014. V. 203. P. 674– 684
- 173. Salvador-Recatalà V. New Roles for the GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE 3.3, 3.5, and 3.6 Genes as on/off Switches of Wound-Induced Systemic Electrical Signals // Plant Signal. Behav. 2016. V. 11. e1161879

- 174. Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R.S. Cold-Activation of Brassica Napus BN115 Promoter Is Mediated by Structural Changes in Membranes and Cytoskeleton, and Requires Ca²⁺ Influx: Low Temperature Sensing in Plants // Plant J. 2001. V. 27. P. 1–12
- 175. Shabala S., Newman I. Light-Induced Changes in Hydrogen, Calcium, Potassium, and Chloride Ion Fluxes and Concentrations from the Mesophyll and Epidermal Tissues of Bean Leaves. Understanding the Ionic Basis of Light-Induced Bioelectrogenesis1 // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 1115– 1124
- Shepherd V., Beilby M., Shimmen T. Mechanosensory Ion Channels in Charophyte Cells: The Response to Touch and Salinity Stress // Eur. Biophys. J. 2002. V. 31. P. 341–355
- 177. Sherstneva O., Vodeneev V, Katicheva L, Surova L, Sukhov V. Participation of intracellular and extracellular pH changes in photosynthetic response development induced by variation potential in pumpkin seedlings. Biochemistry (Mosc). 2015. V. 80(6). P. 776-784
- Shimmen T. Studies on Mechano-Perception in *Characean* Cells: Development of a Monitoring Apparatus // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 591–597
- Shimmen T. Studies on Mechano-Perception in Characeae: Effects of External Ca²⁺ and Cl⁻ // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. P. 691–697
- Shimmen T. Studies on Mechanoperception in Characean Cells: Pharmacological Analysis // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. P. 139–148
- Sibaoka T. Transmission of Action Potentials In *Biophytum* // Bot. Mag.
 Tokyo. 1973. V. 86. P. 51–61
- 182. Sibaoka T. Rapid Plant Movements Triggered by Action Potentials // Bot. Mag. Tokyo. 1991. V. 104. P. 73–95

- Sinyukhin A.M., Britikov E.A. Action Potentials in the Reproductive System of Plants // Nature. 1967. V. 215. P. 1278–1280
- 184. Ślesak I., Ślesak H., Libik M., Miszalski Z. Antioxidant Response System in the Short-Term Post-Wounding Effect in *Mesembryanthemum Crystallinum* Leaves // Journal of Plant Physiology. 2008. V. 165. P. 127–137
- 185. Song C.J., Steinebrunner I., Wang X., Stout S.C., Roux S.J. Extracellular ATP Induces the Accumulation of Superoxide via NADPH Oxidases in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 1222–1232
- 186. Spalding, E.P., Cosgrove D.J. Mechanism of Blue-Light-Induced Plasma-Membrane Depolarization in Etiolated *Cucumber* Hypocotyls // Planta. 1992. V. 188. P. 199–205
- Spalding E.P., Slayman C.L., Goldsmith M.H.M., Gradmann D., Bertl A. Ion Channels in Arabidopsis Plasma Membrane: Transport Characteristics and Involvement in Light-Induced Voltage Changes // PLANT Physiol. 1992.
 V. 99. P. 96–102
- Spanjers. A.W. Bioelectric Potential Changes in the Style of *Lilium Longiflorum* Thunb. after Self- and Cross-Pollination of the Stigma. Planta. 1981. V. 153. P. 1–5
- 189. Staal M., Elzenga J.T.M., van Elk A.G., Prins H.B.A., Van Volkenburgh E. Red and Blue Light-Stimulated Proton Efflux by Epidermal Leaf Cells of the Argenteum Mutant of Pisum Sativum // J. Exp. Bot. 1994. V. 45. P. 1213–1218
- Stahlberg R., Cosgrove D.J. Rapid Alterations in Growth Rate and Electrical Potentials upon Stem Excision in Pea Seedlings // Planta. 1992. V.
 187. P. 523–531
- 191. 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 Environ. 1994. V. 17. P. 1143– 1151

- 192. Stahlberg R., Cosgrove, D.J. Slow Wave Potentials in Cucumber Differ in Form and Growth Effect from Those in Pea Seedlings // Physiol Plant. 1997. V. 101. P. 379–388
- 193. Stahlberg R., Cosgrove D.J. The Propagation of Slow Wave Potentials in Pea Epicotyls // Plant Physiology. 1997. V. 113. P. 209–217
- 194. Stahlberg R., Robert E., Cleland, Elizabeth van Volkenburgh. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants // In: Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life. 2006., Baluska F., Mancuso S., Volkmann D. (eds). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. P. 291– 309
- Stankovic B., Davies E. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato // FEBS Letters. 1996.
 V. 390. P. 275–279
- Stankovic B., Zawadzki T., Davies E. Characterization of the Variation Potential in Sunflower // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 1083–1088
- 197. Stanković B., Witters D.L., Zawadzki T., Davies E. Action Potentials and Variation Potentials in Sunflower: An Analysis of Their Relationships and Distinguishing Characteristics // Physiol. Plant. 1998. V. 103. P. 51–58
- 198. Stoelzle S., Kagawa T., Wada M., Hedrich R., Dietrich P. Blue Light Activates Calcium-Permeable Channels in *Arabidopsis* Mesophyll Cells via the Phototropin Signaling Pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. V. 100. P. 1456–1461
- 199. Suda H., Mano H., Toyota M., Fukushima K., Mimura T., Tsutsui I., Hedrich R., Tamada Y., Hasebe M. Calcium Dynamics during Trap Closure

Visualized in Transgenic Venus Flytrap // Nat. Plants. 2020. V. 6. P. 1219– 1224

- 200. 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
- 201. 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: VP Influences on Photosynthesis Due to H⁺ Influx // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. P. 2532–2541
- 202. Sukhov V., Sukhova E., Vodeneev V. Long-Distance Electrical Signals as a Link between the Local Action of Stressors and the Systemic Physiological Responses in Higher Plants // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2019. V. 146, P. 63–84
- 203. Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Katicheva L., Semina M., Sukhov V. Variation Potential-Induced Photosynthetic and Respiratory Changes Increase ATP Content in Pea Leaves // J. Plant Physiol. 2016. V. 202. P. 57–64
- 204. Suzuki N., Bajad S., Shuman J., Shulaev V., Mittler R. The Transcriptional Co-Activator MBF1c Is a Key Regulator of Thermotolerance in *Arabidopsis Thaliana* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 9269–9275
- 205. Suzuki N., Miller G., Salazar C., Mondal H.A., Shulaev E., Cortes D.F., Shuman J.L., Luo X., Shah J., Schlauch K., et al. Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 3553–3569
- 206. Szechyńska-Hebda M., Kruk J., Górecka M., Karpińska B., KarpińskiS. Evidence for Light Wavelength-Specific Photoelectrophysiological

Signaling and Memory of Excess Light Episodes in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 2201–2218

- 207. Szechyńska-Hebda M., Lewandowska M., Karpiński S. Electrical Signaling, Photosynthesis and Systemic Acquired Acclimation. Front Physiol. 2017. V. 14(8). P. 684
- 208. Toyota M., Gilroy S. Gravitropism and Mechanical Signaling in Plants// Am. J. Bot. 2013. V. 100. P. 111–125
- 209. Toyota M., Spencer D., Sawai-Toyota S., Jiaqi W., Zhang T., Koo A.J., Howe G.A., Gilroy S. Glutamate Triggers Long-Distance, Calcium-Based Plant Defense Signaling // Science. 2018. V. 361. P. 1112–1115
- Tran D., Galletti R., Neumann E.D., Dubois A., Sharif-Naeini R., Geitmann A., Frachisse J.-M., Hamant O., Ingram G.C. A Mechanosensitive Ca²⁺ Channel Activity Is Dependent on the Developmental Regulator DEK1 // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 1009
- 211. Trebacz K., Zawadzki T. Light-Triggered Action Potentials in the Liverwort *Conocephalum Conicum* // Physiol. Plant. 1985. V. 64. P. 482–486
- 212. Trebacz K., Tarnecki R., Zawadzki T. Characteristics of the Light-Induced Generator Potentials in the Liverwort *Conocephalum Conicum* // Physiol Plant. 1989. V. 75. P. 20–23
- 213. Trebacz K., Simonis W., Schonknecht G. Effects of Anion Channel Inhibitors on Light-Induced Potential Changes in the Liverwort *Conocephalum Conicum* // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. P. 550–557
- Trebacz. K., Sievers. A. Action Potentials Evoked by Light in Traps of Dionaea Muscipula Ellis // Plant Cell Physiol. 1998. V. 39. P. 369–372
- 215. Tripathi D., Tanaka K. A Crosstalk between Extracellular ATP and Jasmonate Signaling Pathways for Plant Defense // Plant Signal. Behav. 2018.
 V. 13, e1432229

- 216. Vega-Muñoz I., Duran-Flores D., Fernández-Fernández Á.D., Heyman J., Ritter A., Stael S. Breaking Bad News: Dynamic Molecular Mechanisms of Wound Response in Plants // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 610445
- 217. Visnovitz T., Világi I., Varró P., Kristóf Z. Mechanoreceptor Cells on the Tertiary Pulvini of *Mimosa Pudica* L // Plant Signal. Behav. 2007. V. 2. P. 462–466
- Vian A., Davies E. Two Different Wound Signals Evoke Very Rapid, Systemic CMBP Transcript Accumulation in Tomato // Plant Signal Behav.
 2006. V. 1(5). P. 261–264
- 219. Vodeneev V.A., Opritov V.A., Pyatygin S.S. Reversible Changes of Extracellular PH during Action Potential Generation in a Higher Plant *Cucurbita Pepo //* Russ. J. Plant Physiol. 2006. V. 53. P. 481–487
- 220. Vodeneev V.A., Pyatygin S.S., Opritov V.A. Reversible Change of Extracellular pH at the Generation of Mechano-Induced Electrical Reaction in a Stem of *Cucurbita Pepo //* Plant Signal. Behav. 2007. V. 2. P. 267–268
- Vodeneev V., Orlova A., Morozova E., Orlova L., Akinchits E., Orlova O., Sukhov V. The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves // Journal of Plant Physiology. 2012. V. 169. P. 949–954
- Vodeneev V., Akinchits E., Sukhov V. Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation // Plant Signaling & Behavior. 2015. V. 10. e1057365
- 223. 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. P. 160-170

- 224. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schöffl F. Heat Stress-Induced H₂O₂ Is Required for Effective Expression of Heat Shock Genes in Arabidopsis // Plant Mol Biol. 2006. V. 61. P. 733–746
- 225. Volkov A.G., Foster J.C., Baker K.D., Markin V.S. Mechanical and Electrical Anisotropy in *Mimosa Pudica* Pulvini // Plant Signal. Behav. 2010.
 V. 5. P. 1211–1221
- 226. Wang X., Ma X., Wang H., Li B., Clark G., Guo Y., Roux S., Sun D., Tang W. Proteomic Study of Microsomal Proteins Reveals a Key Role for *Arabidopsis* Annexin 1 in Mediating Heat Stress-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels // Mol. Cell. Proteomics 2015. V. 14. P. 686– 694
- 227. Wang C., Zhou M., Zhang X., Yao J., Zhang Y., Mou Z. A Lectin Receptor Kinase as a Potential Sensor for Extracellular Nicotinamide Adenine Dinucleotide in *Arabidopsis Thaliana* // eLife. 2017. V. 6, e25474
- 228. Wang C., Huang X., Li Q., Zhang Y., Li J.-L., Mou Z. Extracellular Pyridine Nucleotides Trigger Plant Systemic Immunity through a Lectin Receptor Kinase/BAK1 Complex // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 4810
- 229. Whitelam G. Plant Photomorphogenesis: A Green Light for Cryptochrome Research // Curr. Biol. 1995. V. 5. P. 1351–1353
- Williams S.E., Spanswick R.M. Propagation of the Neuroid Action Potential of the Carnivorous Plant *Drosera* // J. Comp. Physiol. 1976. V. 108.
 P. 211–223
- Wu H.-C., Lu. D.-L., Vignols F., Jinn T.-L. Heat Shock-Induced Biphasic Ca²⁺ Signature and OsCaM1-1 Nuclear Localization Mediate Downstream Signalling in Acquisition of Thermotolerance in Rice (*Oryza Sativa* L.): Ca²⁺/CaM-Dependent Thermotolerance in Rice // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1543–1557

- 232. Xuan Y., Zhou S., Wang L., Cheng Y., Zhao L. Nitric Oxide Functions as a Signal and Acts Upstream of AtCaM3 in Thermotolerance in *Arabidopsis* Seedlings // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 1895–1906
- 233. Yao H., X, Q., Yua, M. Actin Dynamics Mediates the Changes of Calcium Level during the Pulvinus Movement of *Mimosa Pudica* // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3, P. 954–960
- 234. Yudina L., Sherstneva O., Sukhova E., Grinberg M., Mysyagin S., Vodeneev V., Sukhov V. Inactivation of H⁺-ATPase Participates in the Influence of Variation Potential on Photosynthesis and Respiration in Peas // Plants. 2020. V. 9. P. 1585
- 235. Zandalinas S.I., Fichman Y., Devireddy A.R., Sengupta S., Azad R.K., Mittler R. Systemic Signaling during Abiotic Stress Combination in Plants // Proc. Natl. Acad. Sci. 2020. V. 117. P. 13810–13820
- Zandalinas S.I., Fichman Y., Mittler R. Vascular Bundles Mediate Systemic Reactive Oxygen Signaling during Light Stress // Plant Cell. 2020.
 V. 32, P. 3425–3435
- Zimmermann M.R., Felle H.H. Dissection of Heat-Induced Systemic Signals: Superiority of Ion Fluxes to Voltage Changes in Substomatal Cavities // Planta. 2009. V. 229. P. 539–547
- 238. Zimmermann, M.R., Hafke, J.B., Van Bel, A.J.E., Furch, A.C.U. Interaction of Xylem and Phloem during Exudation and Wound Occlusion in *Cucurbita Maxima*: Exudation Mechanism in *Cucurbita Maxima* // Plant Cell Environ. 2013. V. 36. P. 237–247
- 239. Zimmermann M.R., Mithöfer A., Will T., Felle H.H., Furch A.C.U. Herbivore-Triggered Electrophysiological Reactions: Candidates for Systemic Signals in Higher Plants and the Challenge of Their Identification // Plant Physiol. 2016. V. 170. P. 2407–2419

- 240. Zhang X., Mou Z. Extracellular Pyridine Nucleotides Induce PR Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis* // Plant J. 2009. V. 57. P. 302–312
- Zhang W., Jeon B.W., Assmann S.M. Heterotrimeric G-protein regulation of ROS signalling and calcium currents in *Arabidopsis* guard cells
 // Journal of Experimental Botany. 2011. V. 62(7). P. 2371–2379
- Zheng S.-Z., Liu Y.-L., Li B., Shang Z.- lin, Zhou R.-G., Sun D.-Y. Phosphoinositide-Specific Phospholipase C9 Is Involved in the Thermotolerance of *Arabidopsis*: AtPLC9 Plays a Role in Thermotolerance // Plant J. 2012. V. 69. P. 689–700