

На правах рукописи

Ладейнова Мария Михайловна

**Анализ роли индуцированного локальным раздражением переменного
потенциала в системном изменении содержания фитогормонов**

1.5.2 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на базе кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»

Научный руководитель: **Воденеев Владимир Анатольевич,**
доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Веселов Дмитрий Станиславович,**
доктор биологических наук, и.о. директора, главный научный сотрудник Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Медведев Сергей Семенович,
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н. И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2022/1288/diss-Ladeynova-1288.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Рост и развитие растений регулируются внутренними сигналами и внешними условиями окружающей среды. Растения подвергаются влиянию различных неблагоприятных факторов, действие которых может быть локальным или системным. Многие локальные стрессоры, такие как механическое повреждение, избыточное освещение, высокие и низкие температуры вызывают активацию защитных реакций не только в месте действия, но и на значительном удалении в нераздражённых частях растения. Для развития системной адаптации необходимы генерация и распространение стрессовых сигналов (Hilleary et al., 2018), среди которых у растений выделяют химические, гидравлические и электрические (Huber, Bauerle, 2016).

Механизмы распространения и индукции дистанционных стрессовых сигналов растений в ответ на действие локального раздражителя на данный момент изучены недостаточно. Предполагается взаимодействие электрических и гидравлических сигналов, волн кальция (Ca^{2+}) и активных форм кислорода (АФК) при передаче дистанционного стрессового сигнала (Choi et al., 2016; Gilroy et al., 2016). Распространение такого комплексного сигнала может регулировать содержание стрессовых фитогормонов в нераздражённых частях растений при действии локального стимула (Xia et al., 2015; Farmer et al., 2020; Vega-Muñoz et al., 2020). Механизмы регуляции гормонального статуса растений при действии локальных стимулов на данный момент неизвестны. В частности, необходимо выяснить, какие компоненты дистанционного стрессового сигнала играют ключевую роль в изменении концентрации фитогормонов, вызванных локальными стимулами.

Имеются работы, показывающие возможность регуляторного влияния варибельного потенциала (ВП), одного из типов электрических сигналов, на гормональный статус растений (Farmer et al., 2020), также в ряде работ отмечено изменение уровня фитогормонов и предшествующее им распространение ВП в ответ на локальный стимул (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Paulman et al., 2018), что даёт основание предполагать ВП в качестве индуктора изменений содержания фитогормонов.

Вызванные локальными стимулами электрические сигналы способны индуцировать системный ответ, включающий изменение активности фотосинтеза и транспирации, активацию дыхания, увеличение концентрации АТФ, активацию экспрессии защитных генов и т. д. (Huber, Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). При рассмотрении системных изменений активности фотосинтеза предполагается, что электрические сигналы не являются единственными индукторами ответа, фитогормоны также могут участвовать в индукции ответа фотосинтеза (Sukhov et al., 2019). Отдельные работы демонстрируют экспериментальные доказательства такого участия (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012), однако стоит отметить недостаточность исследований пространственно-временной динамики изменения содержания фитогормонов и активности фотосинтеза в ответ на локальный стимул, которые играют важную роль в установлении связей данных процессов.

Вопросы взаимодействия электрической и гормональной систем растений и индуцируемых ими системных ответов при локальном раздражении на данный момент остаются во многом неисследованными. В особенности большие пробелы находятся в области регуляции уровня стрессовых фитогормонов при распространении ВП.

Цель и задачи исследования

Целью работы является анализ роли вызванного локальным раздражением переменного потенциала в системном изменении содержания стрессовых фитогормонов и изучение механизмов индукции таких изменений.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи.

1. Изучение временной динамики концентрации фитогормонов и активности фотосинтеза в нераздраженных частях растения при распространении переменного потенциала, вызванного локальным стимулом.

2. Выявление связи между переменным потенциалом, изменением содержания фитогормонов и ответом фотосинтеза на основе анализа пространственно-временной динамики.

3. Анализ механизмов индукции изменений содержания фитогормонов при распространении переменного потенциала.

Научная новизна

Изучена временная динамика концентрации фитогормонов, индуцированная локальным раздражением, в растениях гороха и пшеницы. Впервые показано, что в качестве возможного индуктора повышения содержания жасмонатов, вызванного переменным потенциалом, может выступать изменение внутриклеточного pH, которое сопровождает генерацию переменного потенциала.

Научно-практическая значимость

Получены новые знания о механизмах регуляции содержания фитогормонов переменным потенциалом, механизме формирования системного ответа растения на действие стрессовых факторов, которые расширяют и дополняют теоретические представления в соответствующей области и могут быть использованы в перспективе в разработке рациональных стратегий ведения сельского хозяйства с использованием растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды. В целом полученные знания помогут улучшить понимание процессов адаптации растений к действию неблагоприятных факторов. Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

Переменный потенциал индуцирует системные изменения содержания фитогормонов при локальном раздражении, что подтверждается согласованными изменениями параметров переменного потенциала и концентрации гормонов. Изменение внутриклеточного pH, сопровождающее генерацию переменного потенциала, может выступать в качестве фактора, индуцирующего повышение концентрации жасмонатов в нераздраженных областях растения.

Личный вклад автора

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

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надёжностью

использованных экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью полученных данных с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные результаты работы представлялись на международных и всероссийских мероприятиях: 45th FEBS Congress «Molecules of Life: Towards New Horizons» (виртуальный формат, 2021), Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2021, 2020, 2019), VI съезд биофизиков России (Сочи, 2019), III Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 2017), Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Объем составляет 115 страниц машинописного текста, иллюстрированного 28 рисунками. Список литературы включает 145 источника, в том числе 143 работы иностранных авторов.

Благодарности

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, соглашение № 075-15-2020-808 (задача 1) и РФФИ, проект № 19-34-90179 (задачи 2-3).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный электрической и гормональной сигнальным системам растений, динамике содержания фитогормонов при действии локальных стимулов в нераздражённых частях растений, влиянию электрических сигналов на изменение содержания фитогормонов и возможным механизмам индукции этих изменений, также рассматривается роль электрических сигналов и фитогормонов в развитии системного ответа.

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

Объектами исследования служили растения пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) и гороха посевного (*Pisum sativum* L.), выращиваемые в климатической камере Binder KBW 720 (Binder GmbH, Германия) при 24°C и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота). Адаптацию растений к условиям измерения проводили в течение 1,5 ч.

Локальная стимуляция выполнялась с использованием постепенного нагрева до 60°C в кювете с водой в течение 7 минут, а также ожога открытым пламенем в течение 3 с.

Измерение электрической активности. Электрические сигналы регистрировались внеклеточно с помощью многоканальной макроэлектродной установки и внутриклеточно с использованием микроэлектродной техники измерения мембранного потенциала. Регистрация поверхностных потенциалов выполнена с помощью Ag⁺/AgCl электродов ЭВЛ-1МЗ («Гомельский завод измерительных приборов», Белоруссия), соединённых с усилителем ИПЛ-113 («Семико», Россия). Контакт электродов с растением осуществлялся

через хлопковые нити, смоченные стандартным раствором (KCl – 1 мМ, CaCl_2 – 0,5 мМ, NaCl – 0,1 мМ). Измерительные электроды размещались на растении в соответствии со схемами на рисунках главы 3. Электрод сравнения контактировал с корнями растения.

Мембранный потенциал регистрировался с помощью электрофизиологической установки, состоящей из усилителя MultiClamp 700B и системы сбора данных Axon Digidata 1550 (Molecular Devices, США), микроскопа SliceScope Pro 2000 и моторизованных манипуляторов PatchStar (Scientifica, Великобритания) для введения микроэлектрода в клетку, который состоял из микропипетки с сопротивлением 12-15 МОм, заполненной 0,1 М раствором KCl и погружённой в него Ag^+/AgCl -проволокой. Микропипетки с диаметром кончика около 1 мкм изготавливались из боросиликатного стекла с помощью пуллера Р-97 Micropipette Puller (Sutter Instrument, США). Электрод сравнения помещался в раствор ИПВ, омывающий исследуемый участок растения.

Ингибиторный анализ был выполнен с использованием ингибитора H^+ -АТФазы плазматической мембраны (5 мМ Na_3VO_4) и блокатора Ca^{2+} каналов (5 мМ LaCl_3). Растворы ингибиторов были приготовлены на стандартном растворе. Для контрольной группы использовался стандартный раствор без ингибиторов. Растворы загружались в отсечённый лист пшеницы методом вакуумной инфильтрации.

Флуоресцентный имиджинг для исследования динамики рН, концентраций Ca^{2+} и H_2O_2 в листе пшеницы проводился с помощью установки поверхностного оптического имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия) и чувствительных флуоресцентных зондов BCECF, AM, fluo-4, AM (Molecular Probes, США), Ampliflu Red (Sigma-Aldrich, США), которые загружались в отсечённый лист пшеницы с помощью вакуумной инфильтрации.

Определение содержания фитогормонов методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Определение уровня гормонов осуществлялось в нераздражённых участках растений в соответствии со схемами рисунков главы 3, через определённые временные интервалы после локальной стимуляции. Образец взвешивали, фиксировали жидким азотом, гомогенизировали в экстрагирующем растворе (метанол:вода:муравьиная кислота = 80:19:1), содержащем внутренние стандарты исследуемых гормонов. Экстракцию проводили в два этапа при 4°C на ротаторе, центрифугировали 25 мин при 20040 g, концентрировали супернатант при 40°C на испарителе-концентраторе, фильтрацию проводили через шприцевой фильтр. Полученные экстракты анализировали с использованием жидкостного хроматографа Prominence и масс-спектрометра LCMS-8040 (Shimadzu, Япония). Количественный анализ содержания фитогормонов осуществлялся на основании калибровочных зависимостей по площадям пиков хроматограмм, полученных с использованием аналитических стандартов, с коррекцией по внутреннему стандарту.

Измерение фотосинтетической активности выполнено путём регистрации динамики флуоресценции хлорофилла фотосистемы II (PSII) с использованием Imaging pulse-amplitude modulation (PAM) на флуориметрах Open FluorCam FC 800-O/1010 (Photon Systems Instruments, Чехия) и IMAGING-PAM M-Series (Heinz Walz GmbH, Германия). Регистрировались такие параметры как квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}) и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ).

Оценка интенсивности транспирации. Для оценки пространственного распределения изменений транспирации регистрировали изменения температуры поверхности листьев, которая определялась с помощью тепловизора Testo 885 (Testo,

Германия). Съёмка велась покадрово, осуществлялась одновременная регистрация в одном кадре контрольного и стимулированного растений, которые были установлены рядом.

Анатомическое исследование стебля гороха. Поперечные срезы узлов и междоузлий стебля гороха были получены на роторном микротоме HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США), затем окрашены акридиновым оранжевым, выделяя лигнифицированные ткани. Изображения получены с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием инвертированного микроскопа Olympus X71 и объектива CPlanFN L 10×/0,3 (Olympus, Япония).

Статистический анализ. Каждая серия экспериментов состояла не менее чем из 5 повторов, каждая повторность выполнялась на отдельном растении, для определения уровня фитогормонов каждая повторность включала 5 растений. В результатах представлены типичные записи отдельных измерений, средние значения и ошибки среднего, отображаемые в форме планок погрешностей. Анализируемые данные соответствовали нормальному распределению. Значимость различий определялась с помощью t-теста Стьюдента и методом однофакторного дисперсионного анализа (критерий Даннета). Уровень статистической значимости был установлен при $p < 0,05$. Коэффициент корреляции Пирсона был использован для корреляционного анализа.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Индукцированные локальным стимулом электрические сигналы, изменение содержания фитогормонов и активности фотосинтеза

Локальный повреждающий стимул вызывает генерацию распространяющегося электрического сигнала в виде переменного потенциала (ВП) в нераздражённых тканях растений пшеницы и гороха (рис. 1).

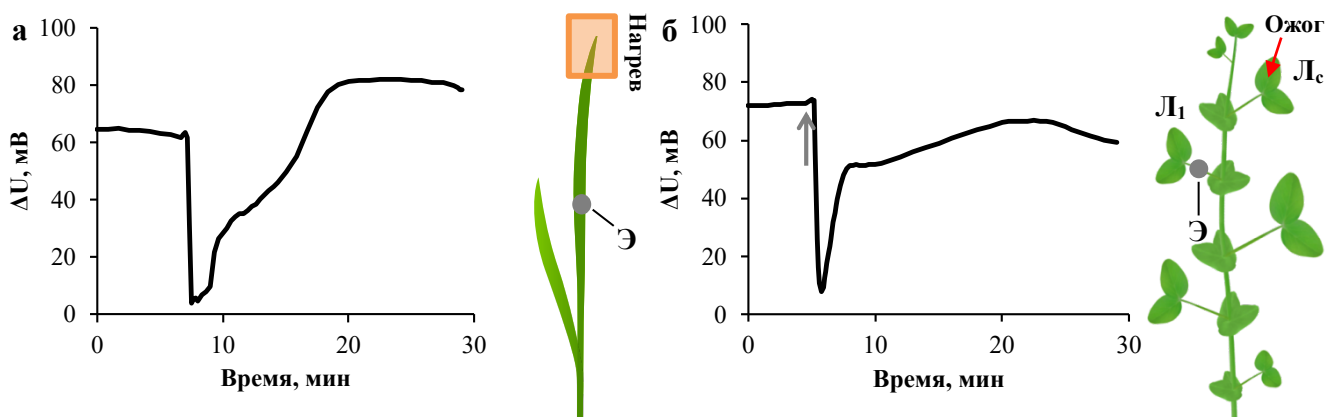


Рисунок 1. Типичные записи переменного потенциала (ВП) в растениях пшеницы (а) и гороха (б). ВП индуцирован локальным нагревом кончика листа пшеницы (момент начала нагрева соответствует точке 0 мин) и локальным ожогом кончика листа (Лс) гороха (момент нанесения ожога обозначен стрелкой). Приведены схемы регистрации ВП в растениях пшеницы и гороха, где Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод

Локальные раздражители помимо распространения ВП вызывают изменение активности фотосинтеза. Имеет место временная инактивация фотосинтеза в нераздражённых частях растений пшеницы и гороха после локального раздражения (рис. 2). Снижение активности фотосинтеза проявляется в понижении уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}) и росте уровня нефотохимического тушения

(NPQ). Фотосинтетический ответ включает быструю и длительную фазы. Первая быстрая волна снижения активности фотосинтеза начинается через несколько минут после возникновения ВП в зоне регистрации и длится около 10 мин у пшеницы и 10 – 20 мин у гороха, вторая более продолжительная волна, развивающаяся после первой, длится около 30 мин у пшеницы и около часа у гороха.

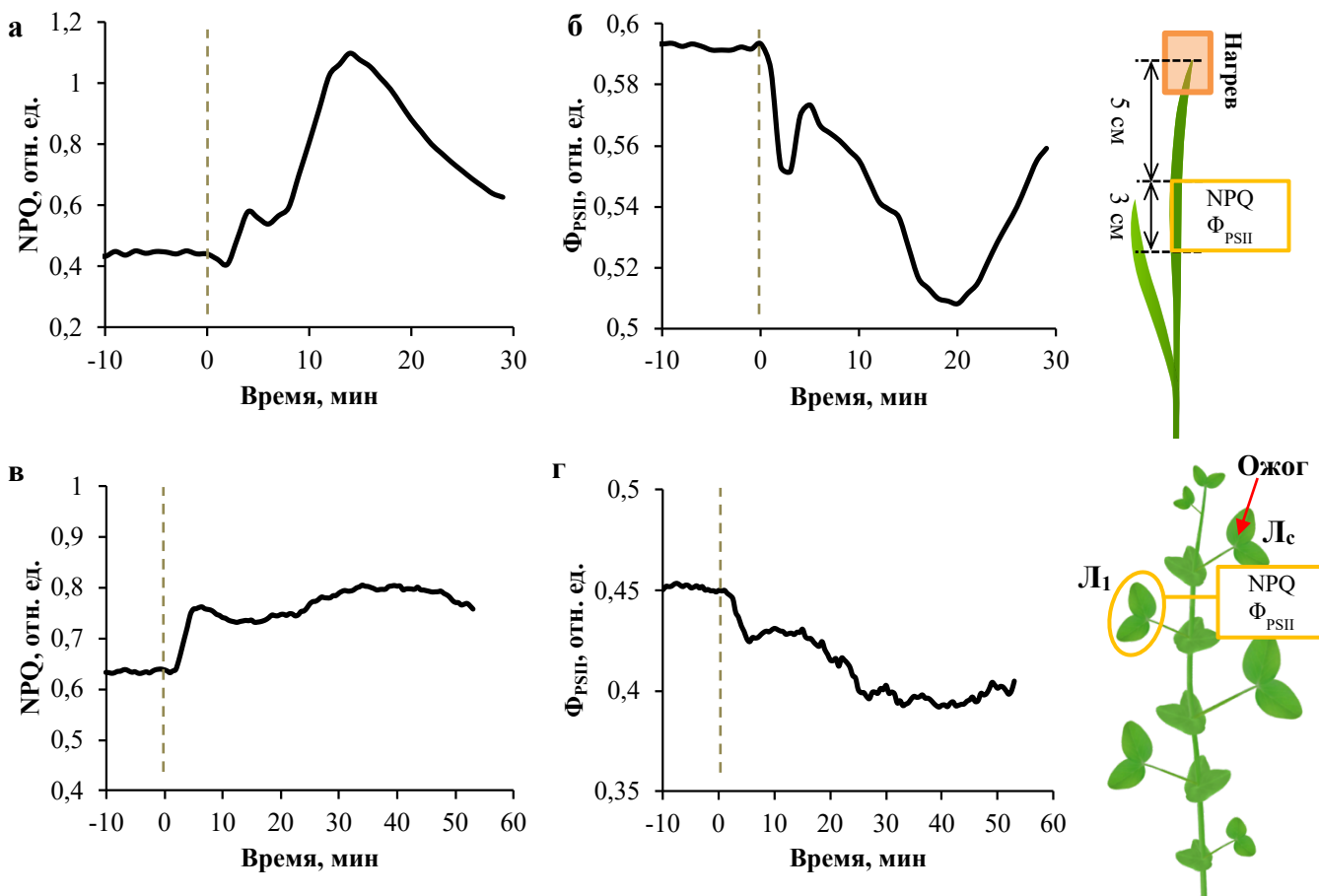


Рисунок 2. Изменения активности фотосинтеза, индуцированные локальным раздражением: типичные записи изменений нефотохимического тушения (NPQ) (а,в) и уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}) (б,г) в нераздражённой части листа пшеницы при локальном нагреве (а,б) и в нераздражённом листе гороха при локальном ожоге (в,г); момент генерации ВП обозначен пунктирной линией; представлены схемы измерения фотосинтетических параметров в растениях пшеницы и гороха

Развитие фотосинтетического ответа в нераздражённых частях растения, предположительно, является следствием распространения дистанционного стрессового сигнала (Koziolek et al., 2004). В то же время, механизмы индукции быстрой и длительной фаз ответа фотосинтеза могут быть различны. Быстрая переходная инактивация фотосинтеза обусловлена сдвигами рН – временным закислением цитоплазмы и защелачиванием апопласта, происходящими из-за временного снижения активности H^+ -АТФазы при генерации ВП (Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2014). Длительная фаза фотосинтетического ответа, по-видимому, имеет иной механизм индукции. В частности, предполагается участие стрессовых фитогормонов (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012). Однако в литературе представлены противоречивые данные о направленности изменений концентраций

гормонов и характерных временах процессов у различных растений при локальном действии стрессоров (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Krausko et al., 2017). Поэтому следующим этапом работы стало исследование динамики концентрации фитогормонов после действия локального стимула.

Локальный стимул вызывает изменение содержания фитогормонов в нераздражённых тканях растений пшеницы (рис. 3) и гороха (рис. 4). Были исследованы изменения содержания таких стрессовых фитогормонов как абсцизовая кислота (АБК), салициловая кислота (СК) и жасмонаты (жасмоновая кислота (ЖК) и жасмонил-изолейцин (ЖК-иле)). В пшенице динамика концентрации АБК может быть охарактеризована как однофазная кривая с максимумом при 60 мин после стимуляции. Динамика СК характеризуется двухфазной кривой с первым максимумом при 40 мин и вторым максимумом при 120 мин. Увеличение концентрации ЖК начинается уже через 5 мин после стимуляции и достигает максимума при 10 мин, а затем постепенно снижается до контрольного уровня. Заметный рост концентрации ЖК-иле также начинается через 5 мин, достигает максимума через 20 мин. В целом динамику жасмонатов можно описать как однофазную кривую с быстрым ростом. В растениях гороха на временном промежутке от 0 до 120 мин после действия стимула концентрация АБК достоверно не отличается от уровня в покое (0 мин), наблюдаются только незначительные колебания. Концентрация ЖК быстро возрастает после действия ожога через 5 мин после стимуляции, и достигает максимума через 15 мин, затем снижается к исходному уровню.

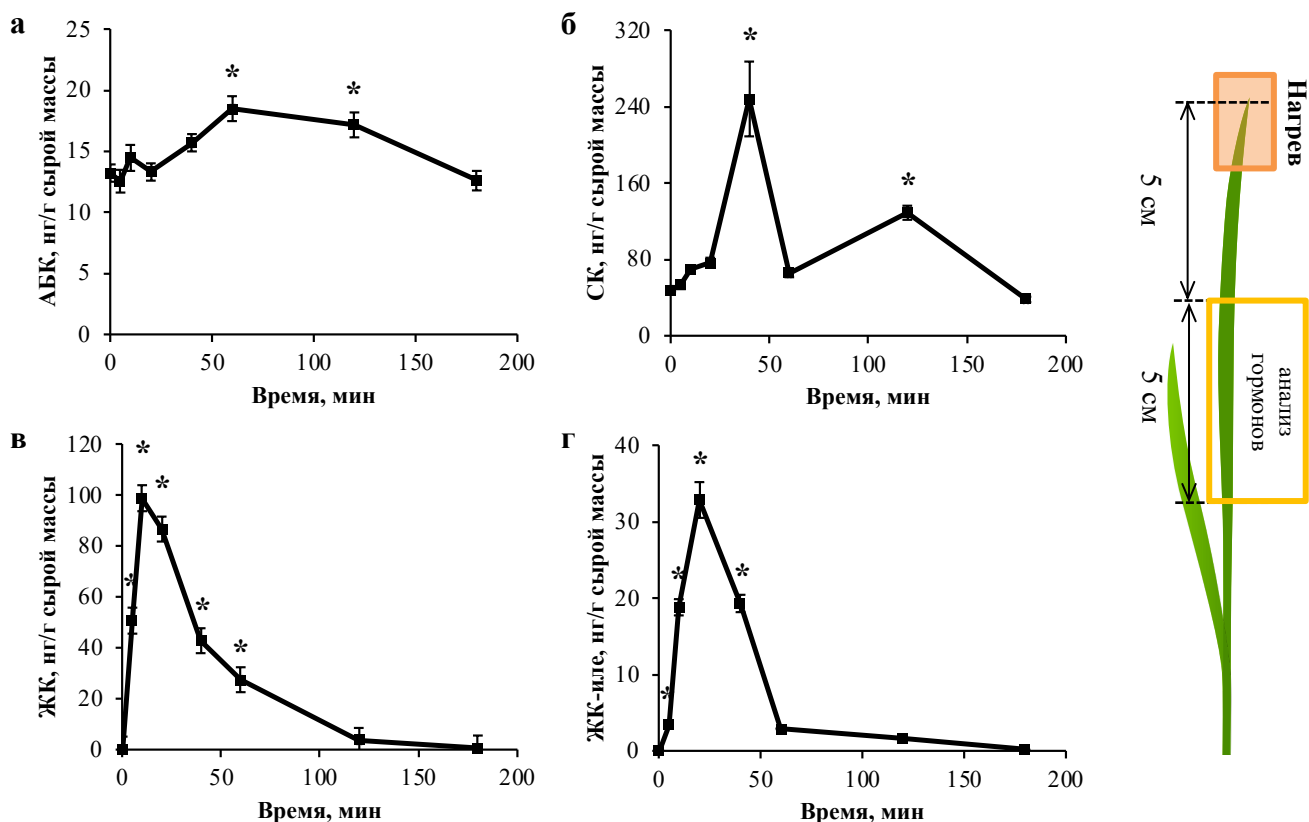


Рисунок 3. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части листа пшеницы; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; приведена схема определения содержания гормонов в растениях пшеницы

* – статистически значимые различия от контрольного значения (0 мин), $p < 0,05$

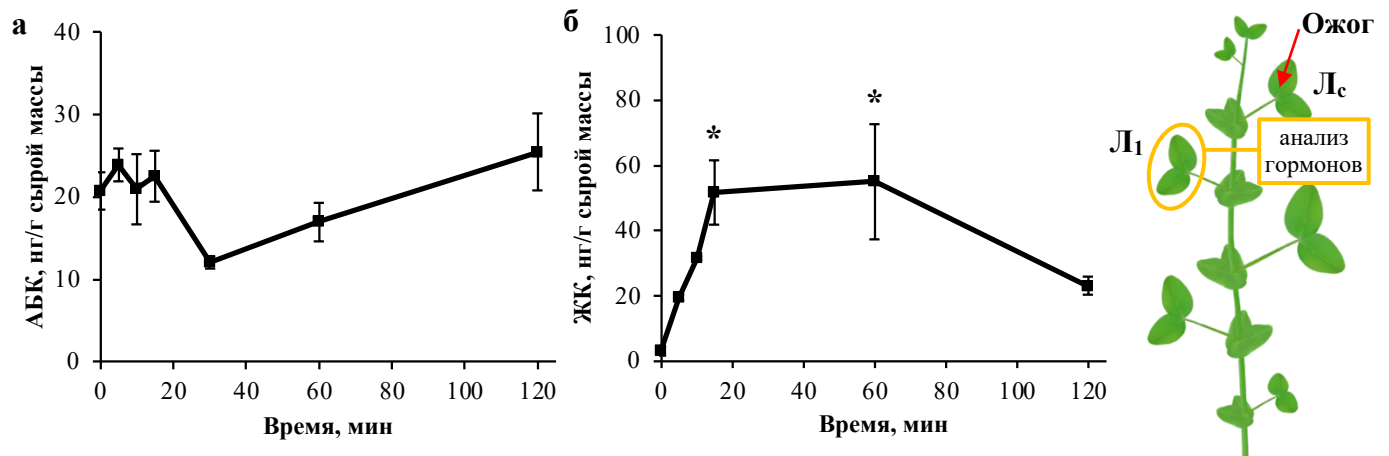


Рисунок 4. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а) и жасмоновой кислоты (ЖК) (б), индуцированная локальным ожогом, в нераздражённом листе (Л₁) гороха; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; приведена схема определения содержания гормонов в растениях гороха * – статистически значимые различия от контрольного значения (0 мин), $p < 0,05$

Динамика содержания гормонов при действии локального стимула имеет общие черты в различных растениях. Исходный уровень жасмонатов в исследуемых растениях в состоянии покоя достаточно низкий, но быстро и многократно увеличивается при локальном раздражении. Для АБК характерно отсутствие изменений на коротких временных промежутках до 60 мин, статистически значимое увеличение концентрации происходит у пшеницы при 60 мин и 120 мин, но не выражено у гороха. В листе пшеницы содержание АБК в максимуме превышает уровень до раздражения примерно в 1,5 раза. По данным литературы динамика концентрации жасмонатов в нераздражаемых частях растений часто имеет форму компактного пика с быстрым ростом в первые несколько десятков минут после стимуляции (Koo et al., 2009; Sato et al., 2011; Matsuura et al., 2012). Для АБК и СК изменения содержания после действия локального раздражителя имеют менее интенсивный характер по сравнению с жасмонатами (Hlaváčková et al., 2006; Devireddy et al., 2018).

Обобщая результаты первого блока исследований, можно выстроить временную последовательность событий в ответ на действие локального стимула. ВП возникает в зоне локальной стимуляции и распространяется в нераздражённую область, где происходит увеличение содержания жасмонатов через 5 – 15 мин, увеличение содержания СК – через 40 мин и 120 мин, АБК возрастает во временном диапазоне 60 – 120 мин. В нераздражённой зоне развивается двухфазное снижение активности фотосинтеза: первая фаза начинается практически сразу после возникновения ВП и длится 10 – 20 мин, вторая фаза начинается через 10 – 20 мин после ВП и длится 30 – 60 мин.

ВП предшествует увеличению содержания фитогормонов, что соответствует предположению о возможной роли электрических сигналов в качестве регулятора гормонального статуса растения при локальных повреждающих воздействиях (Farmer et al., 2020), а также согласуется с результатами работ, где изменение содержания гормонов развивается после генерации электрического сигнала в ответ на локальный стимул (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Mousavi et al., 2013). Увеличение концентрации жасмонатов предшествует развитию длительной фазы фотосинтетического ответа, следовательно жасмонаты могут являться её индуктором, что также предполагалось ранее в работах других авторов (Krausko et al., 2017). Концентрация таких гормонов как СК и АБК

изменяется уже после развития фотосинтетического ответа, следовательно указанные гормоны не могут претендовать на роль его индуктора, хотя для АБК ранее предложена такая роль (Hlaváčková et al., 2006).

Следующим шагом работы стала оценка пространственно-временной динамики электрической активности, концентрации фитогормонов и фотосинтетической активности при действии локального раздражителя для определения связи между данными процессами.

Пространственно-временная динамика электрической активности, содержания фитогормонов и активности фотосинтеза при действии локального стимула

Для анализа пространственно-временной динамики регистрацию изменений осуществляли в нескольких листьях, разноудалённых от раздражаемого.

Ожог кончика листа гороха вызывает распространение ВП в соседние листья. Амплитуда ВП в первом листе, расположенном ниже раздражаемого листа, составляет 57 ± 4 мВ, во втором листе – 65 ± 5 мВ, в третьем листе – 26 ± 6 мВ (рис. 5а). Необходимо отметить, что реакция во втором более удалённом от зоны локального раздражения листе возникает раньше, чем в первом листе, расположенном ближе к месту раздражения (рис. 5б). Временной интервал между раздражением и возникновением ВП в первом, втором и третьем листьях составляет – 47, 13 и 64 секунд соответственно.

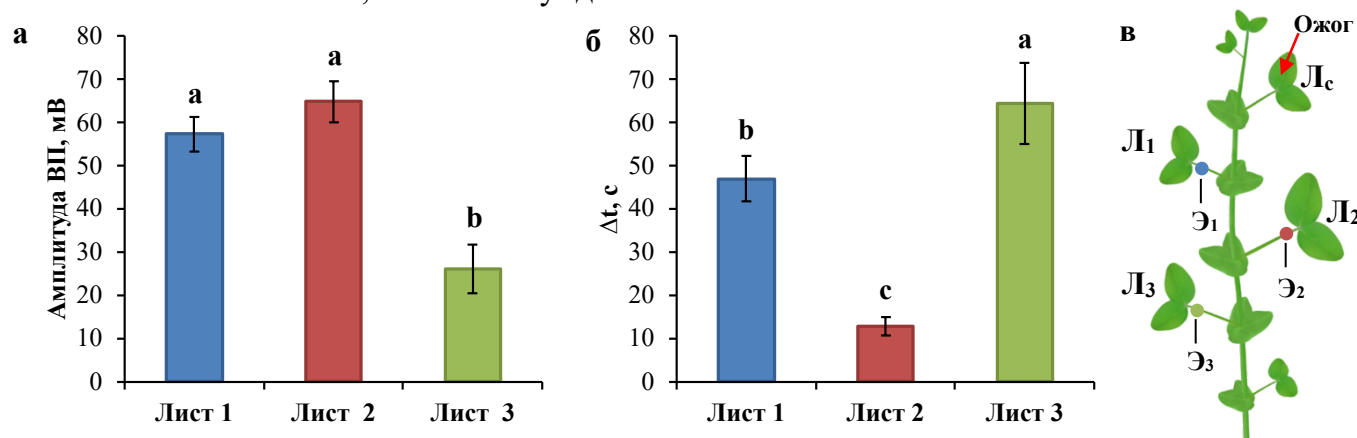


Рисунок 5. Амплитуда переменного потенциала (ВП) в первом, втором и третьем листьях, расположенных ниже раздражаемого листа (а) и временной интервал между раздражением и возникновением ВП в первом, втором и третьем листьях (б); в – схема регистрации ВП в растениях гороха (Э₁, Э₂, Э₃ – измерительные макроэлектроды, размещённые на черешках первого, второго и третьего листьев, соответственно). Разные буквы обозначают статистически значимые различия между листьями, $p < 0,05$

Также была исследована пространственно-временная динамика содержания АБК и ЖК в растениях гороха при действии локального стимула (рис. 6). Имеют место незначительные колебания концентрации АБК, лишь через 120 минут после ожога происходит статистически значимое повышение концентрации АБК во втором листе. В первом и третьем листьях концентрация АБК остаётся относительно постоянной. Изменения концентрации ЖК имеют место во втором листе, меньшая амплитуда изменений концентрации ЖК характерна для первого листа, в третьем листе не происходит статистически значимого увеличения концентрации ЖК. Начало роста концентрации ЖК во втором листе несколько опережает рост концентрации ЖК в первом.

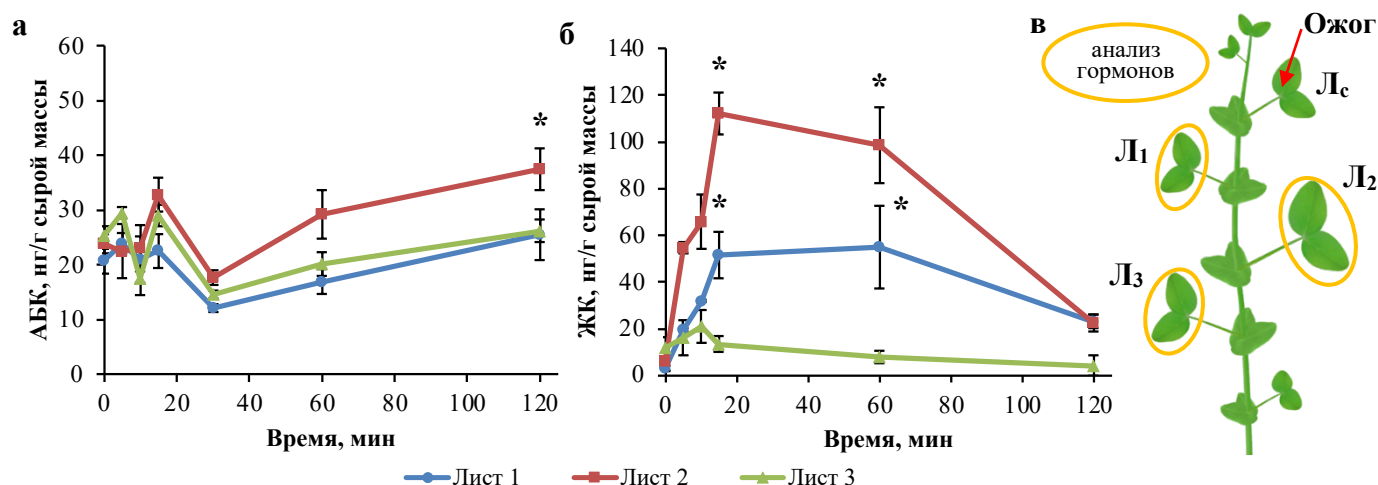


Рисунок 6. Пространственно-временная динамика содержания абсцизовой кислоты (АБК) (а) и жасмоновой кислоты (ЖК) (б), индуцированная локальным ожогом, в нераздражённых листьях гороха; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; в – схема определения содержания фитогормонов в растениях гороха

* – статистически значимые различия от контрольного значения (0 мин), $p < 0,05$

Локальный ожог листа гороха вызывает временное снижение активности фотосинтеза в нераздражённых листьях наряду с изменением концентрации гормонов. Снижение активности фотосинтеза развивается в две фазы. Амплитуды первой фазы NPQ и Φ_{PSII} не обнаруживают значимых различий между первым и вторым листом, лишь проявляется тенденция к большей амплитуде во втором листе, в третьем листе этот показатель статистически значимо ниже (рис. 7). Амплитуда NPQ второй волны ответа фотосинтеза во втором ниже стимулированного листе гороха превышает таковые в первом и третьем листьях. В целом, необходимо отметить большую амплитуду фотосинтетического ответа во втором листе, сильнее выраженную для длительной волны.

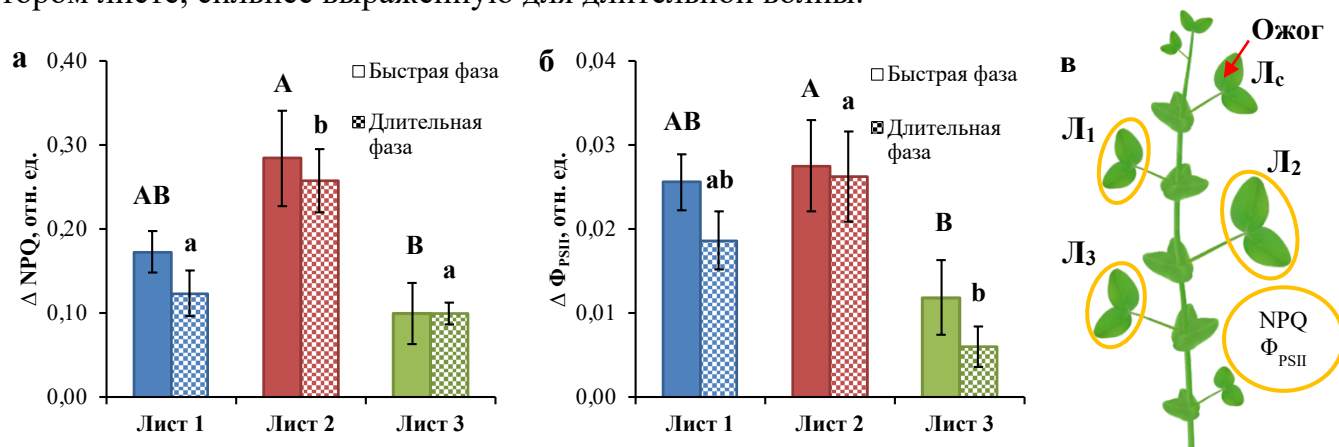


Рисунок 7. Индуцированные локальным ожогом изменения активности фотосинтеза в первом, втором и третьем ниже стимулированного листьях гороха: а – амплитуды изменений нефотохимического тушения (NPQ); б – амплитуды изменений уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}); в – схема измерения фотосинтетических параметров в растениях гороха. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между столбцами быстрой фазы, различные строчные буквы обозначают статистически значимые различия между столбцами длительной фазы, $p < 0,05$

Анализируя данные пространственно-временной динамики электрической активности, концентрации фитогормонов и активности фотосинтеза в совокупности, можно видеть, что наиболее выраженные сигналы и ответы характерны для второго листа растений гороха, наименьшие – в третьем листе, изменения в первом листе носят промежуточный характер. Распространение ВП и связанное с этим изменение содержания ЖК, по-видимому, лежат в основе ответов фотосинтеза, имеющих двухфазную динамику. Связь быстрой фазы фотосинтетического ответа непосредственно с процессом генерации ВП подтверждают значения коэффициентов корреляции между амплитудой ВП и амплитудой изменений Φ_{PSII} (I фаза 0,64, $P=0,01$; II фаза 0,40, $P=0,05$) и NPQ (I фаза 0,66, $P=0,01$; II фаза 0,44, $P=0,03$) – корреляция выше для первой фазы ответа. Более низкие значения корреляции для второй фазы ответа могут указывать на то, что ВП не является её непосредственным индуктором, она обусловлена, по-видимому, повышением уровня ЖК. В пользу этого предположения выступает выявленная нами согласованность пространственной динамики и пропорциональности изменений уровня ЖК и активности фотосинтеза (рис. 6,7), а также тот факт, что рост уровня ЖК предшествует второй волне инактивации фотосинтеза. Это подтверждается и высокими значениями коэффициентов детерминации между амплитудой изменений ЖК и амплитудой изменений параметров фотосинтеза (для Φ_{PSII} – 0,98, для NPQ – 0,83). В свою очередь изменения концентрации ЖК могут быть вызваны предшествующим распространением ВП, для которых также показана согласованность пространственной динамики и пропорциональности изменений (рис. 5,6), значение коэффициента детерминации между амплитудой ВП и амплитудой изменений ЖК составляет 0,86.

Выявленные закономерности распространения электрического и гормонального сигналов, а также изменения активности фотосинтеза дают основание полагать о наличии структурных особенностей в стебле гороха, которые определяют различие во временах начала ответов и амплитудах ответов между листьями. Поэтому следующей задачей явилось исследование путей распространения дистанционных сигналов в стебле гороха. Для исследования строения стебля гороха были приготовлены срезы различных его участков в областях узлов и междоузлий. На основе полученных изображений окрашенных срезов была построена трёхмерная схема проводящих пучков в стебле гороха (рис. 8а). Листья, расположенные на одной стороне стебля, имеют прямую сосудистую связь. Проводящие пучки листьев, расположенные на разных сторонах стебля связаны между собой через междоузлие нижележащего листа. Исходя из связей проводящих пучков между листьями, была построена предполагаемая схема путей распространения дистанционного сигнала (рис. 8а), и рассчитаны расстояния, который он проходит по проводящим пучкам (рис. 8г). Показано, что вероятное распространение дистанционного стрессового сигнала между стимулируемым листом (L_c на схеме) и ближайшим листом (L_1) происходит не напрямую по короткому пути, а через узел листа (L_2) на противоположной стороне по более длинному пути. Таким образом, измеряемое внешнее расстояние между листьями существенно отличается от реального расстояния, проходимого сигналом по проводящим пучкам. Сравнивая зависимости амплитуды ВП от внешнего расстояния (рис. 5) и расстояния, который проходит сигнал по проводящим пучкам, можно заметить, что во втором случае (рис. 8г) присутствует стандартная зависимость декремента амплитуды ВП с увеличением расстояния (Vodeneev et al., 2015).

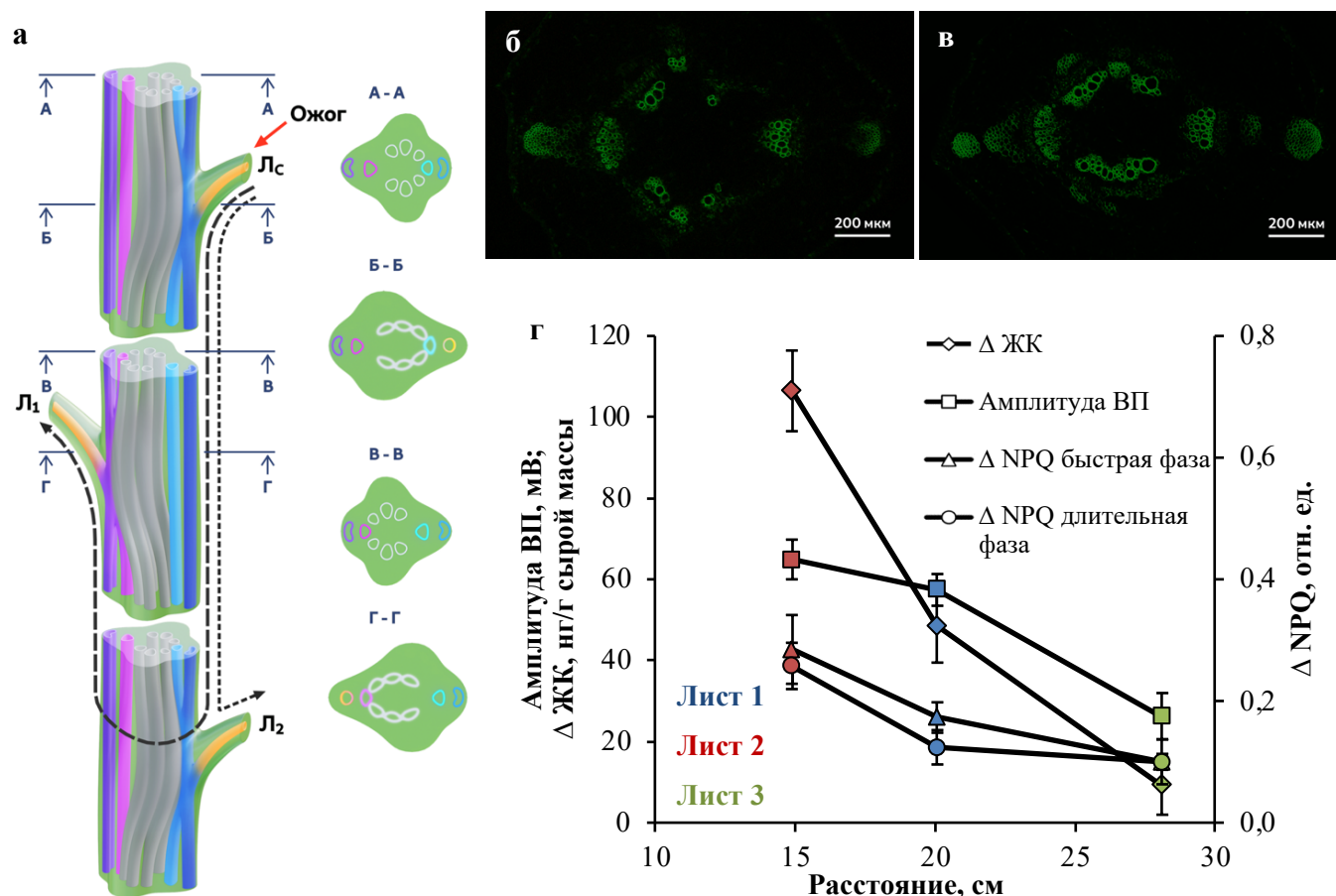


Рисунок 8. Предполагаемая схема распространения дистанционных сигналов в стебле гороха (а); поперечные срезы стебля гороха, соответствующие сечениям В – В (б) и Г – Г (в) на схеме; зависимость амплитуды ВП, амплитуды изменения концентрации ЖК и амплитуд первой и второй волн NPQ от расстояния до зоны локального раздражения в соответствии с предполагаемой схемой (г). Трёхмерная диаграмма проводящих пучков в стебле гороха и схематические срезы узлов и междоузлий: все изменения в системе проводящих пучков происходят в области узла, что является причиной пропусков подробного изображения междоузлий на схеме. Пунктирная линия (короткие штрихи) обозначает путь дистанционного сигнала от стимулированного листа (Лс) ко второму нераздражённому листу (Л2). Пунктирная линия (длинные штрихи) обозначает путь дистанционного сигнала от стимулированного листа (Лс) к первому нераздражённому листу (Л1)

Анализируя пространственные закономерности отдельных этапов временной последовательности событий, определённой в предыдущем разделе, можно видеть, что чем сильнее выражен ВП (больше амплитуда), тем большие изменения концентраций АБК и ЖК происходят в этих же листьях. На основе согласованности пространственной динамики и пропорциональности изменений электрической активности и динамики концентрации ЖК (рис. 5, 6), а также предшествующего изменению содержания ЖК распространения ВП можно предположить наличие связи между электрическими сигналами и изменениями концентрации ЖК в нераздражнённых листьях при действии локального стимула. Для оценки участия электрических сигналов в индукции изменений содержания фитогормонов необходимо провести анализ механизмов изменения содержания фитогормонов при действии локального стимула.

Анализ механизмов изменения содержания фитогормонов при действии локального стимула

Несмотря на высказанные ранее в ряде работ предположения о роли ВП в индукции гормонального ответа (Koo et al., 2009; Mousavi et al., 2013; Farmer et al., 2020), остаются невыясненными механизмы такого влияния. В работе Farmer et al. (2020) предполагается, что при локальном повреждении быстрый синтез ЖК происходит при участии 13-липоксигеназы, активность которой зависит от Ca^{2+} . Также предполагается вклад H^+ -АТФазы плазмалеммы в стресс-индуцированное повышение концентрации ЖК наряду с генерацией электрических сигналов, которые в свою очередь зависят от активности продуцирующей АФК НАДФН-оксидазы. В то же время остаётся открытым вопрос о путях повышения содержания гормонов: их транспорт из зоны локального раздражения (Sato et al., 2011; Matsuura et al., 2012) или синтез в нераздражённой области. С целью определения возможного вклада транспорта гормонов из зоны локального раздражения в системное повышение их содержания производили оценку изменений концентраций через короткие временные промежутки (2,5 и 5 минут) на различных расстояниях. Различий в динамике концентраций между удалёнными на различные расстояния от зоны раздражения участками выявлено не было, что указывает на синтез гормонов в нераздражённой зоне вследствие распространения ВП. Изучение потенциальных механизмов влияния ВП на содержание гормонов, в частности анализ возможной роли Ca^{2+} , H^+ и АФК, стало следующим шагом работы.

Генерация ВП сопровождается переходным снижением внутриклеточного рН, регистрация которого в листьях пшеницы была осуществлена с использованием рН-чувствительного флуоресцентного зонда BCECF,AM (рис. 9а). Снижение внутриклеточного рН при генерации ВП связывают с угнетением активности H^+ -АТФазы плазмалеммы (Katicheva et al., 2014; Kumari et al., 2019). В наших экспериментах применение ингибитора H^+ -АТФазы ортованадата натрия вызывало как уменьшение амплитуды ВП, так и снижение рН (рис. 9б). Важно отметить, что эффект ингибитора H^+ -АТФазы на величину рН в покое проявлялся в конститутивном закислении внутриклеточной среды: значение отношения I_{490}/I_{440} BCECF,AM, прямо пропорциональное величине рН, в присутствии ингибитора было ниже по сравнению с таковым в контроле.

Также был изучен эффект ингибитора H^+ -АТФазы на индуцированные ВП изменения содержания жасмонатов (рис. 10). Локальное раздражение вызывает распространение ВП и увеличение содержания жасмонатов в отсутствие ингибитора. Ингибитор H^+ -АТФазы ортованадат натрия значительно увеличивает концентрацию жасмонатов в покое. Раздражение на фоне действия ингибитора не приводит к изменениям концентраций ЖК и ЖК-иле.

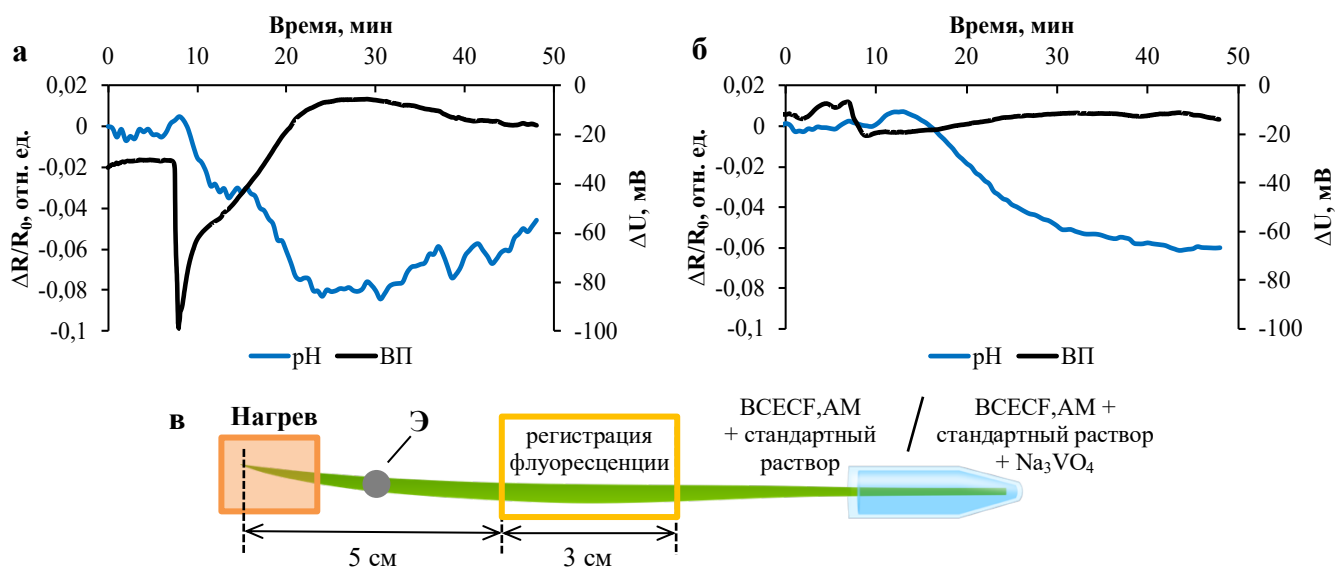


Рисунок 9. Динамика pH, индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, при одновременной регистрации ВП, в контрольных условиях (а) и при ингибировании H^+ -АТФазы ортованадатом натрия (б); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; в – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного pH-чувствительного зонда BCECF,AM в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

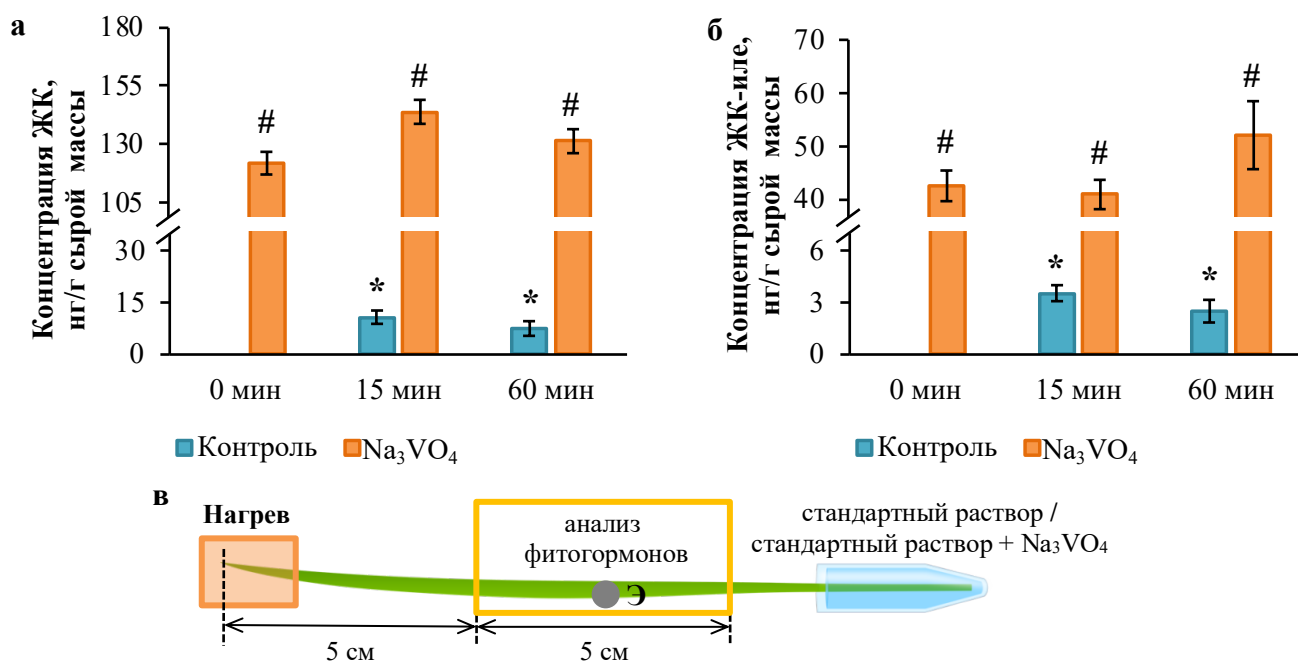


Рисунок 10. Динамика концентрации жасмоновой кислоты (ЖК) (а) и жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (б), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, в контрольных условиях и при ингибировании H^+ -АТФазы ортованадатом натрия; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; в – схема определения содержания фитогормонов в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

* – статистически значимые различия от концентрации до раздражения (0 мин), $p < 0,05$

– статистически значимые различия от контрольного значения (без ингибитора), $p < 0,05$

Данные литературы свидетельствуют о том, что внутриклеточный pH может влиять на продукцию жасмонатов (Kumari et al., 2019). Потенциальной точкой влияния pH на биосинтез жасмонатов является изменение доступности субстрата – предшественника 12-оксо-фитодиеновой кислоты (ОФДК), которая транспортируется из хлоропластов в пероксисомы для продолжения синтеза ЖК. Закисление цитозоля при генерации ВП должно вызывать увеличение степени протонирования ОФДК, что должно способствовать свободному перемещению через мембрану пероксисомы, т. е. усилению транспорта и повышению доступности ОФДК для пероксисомных ферментов биосинтеза ЖК. Экспериментальная проверка данной гипотезы показала, что ортованадат снижает уровень ОФДК в состоянии покоя с 29 ± 3 до 13 ± 3 нг/г сырой массы, т. е. предположенный механизм может объяснять индуцированное закислением увеличение жасмонатов.

Другим потенциальным регулятором стимул-индуцированных изменений концентрации гормонов является Ca^{2+} , увеличение концентрации которого имеет место при генерации ВП в растениях пшеницы (рис. 11). Увеличение концентрации Ca^{2+} при генерации ВП также было зарегистрировано в наших экспериментах на растениях гороха, и в отдельных работах показано на других видах растений (Nguyen et al., 2018; Kumari et al., 2019).

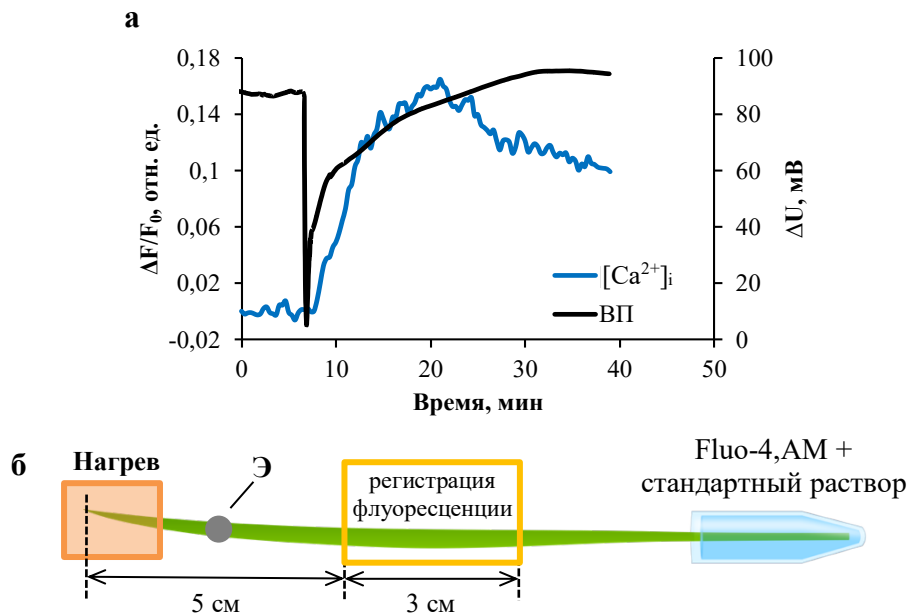


Рисунок 11. Динамика внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, при одновременной регистрации ВП (а); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного Ca^{2+} -чувствительного зонда Fluo-4,AM в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

Блокирование Ca^{2+} каналов приводит к увеличению концентрации жасмонатов в покое, но подавляет рост концентрации ЖК и ЖК-иле через 15 мин после стимуляции (рис. 12). Изменение содержания жасмонатов может происходить за счёт регуляторного влияния Ca^{2+} на процесс синтеза. Подавление стимул-индуцированного повышения жасмонатов при действии блокатора Ca^{2+} каналов, по-видимому, связано с отсутствием повышения активности Ca^{2+} -зависимых ферментов биосинтеза жасмонатов, в частности фосфолипазы D

(Ryu, Wang, 1996; Wang et al., 2000) и 13-липоксигеназы LOX6 (Chauvin et al., 2013), в результате уменьшения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

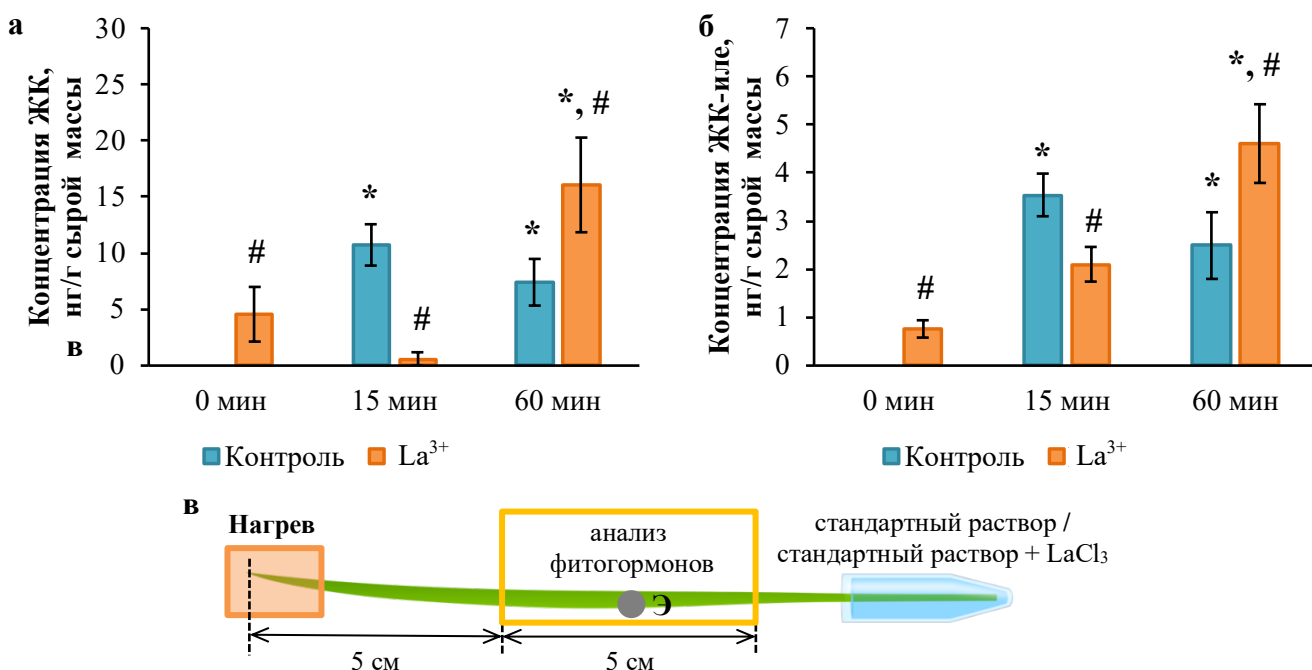


Рисунок 12. Динамика концентрации жасмоновой кислоты (ЖК) (а) и жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (б), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, в контрольных условиях и при блокировании Ca^{2+} каналов La^{3+} ; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; в – схема определения содержания фитогормонов в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

* – статистически значимые различия от концентрации до раздражения (0 мин), $p < 0,05$

– статистически значимые различия от контрольного значения (без ингибитора), $p < 0,05$

Влияние Ca^{2+} на изменение концентраций гормонов также может происходить через Ca^{2+} -индуцированные изменения pH в результате модуляции активности H^+ -АТФазы с помощью кальций-зависимых протеинкиназ (Ookura et al., 2005). В свою очередь активность Ca^{2+} каналов может регулироваться АФК (Demidchik, 2018; Marcsec et al., 2019).

Исследование динамики пероксида водорода (H_2O_2) при генерации ВП показало увеличение концентрации H_2O_2 (рис. 13), что согласуется с результатами других работ (Miller et al., 2009; Devireddy et al., 2018).

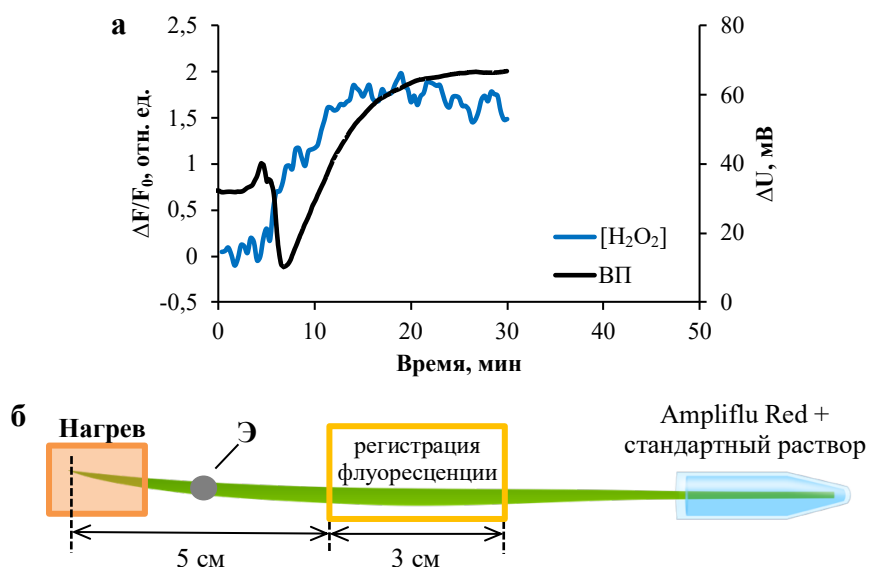


Рисунок 13. Динамика пероксида водорода (H_2O_2), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, при одновременной регистрации ВП (а); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного H_2O_2 -чувствительного зонда Ampliflu Red в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

Для анализа возможной роли H_2O_2 как индуктора изменений концентраций жасмонатов проводили исследование влияния искусственного повышения концентрации H_2O_2 на их содержание. Динамика жасмонатов при действии H_2O_2 имеет сходные черты с таковой при локальном раздражении (рис. 14): жасмонаты показывают быстрый рост с максимумом через 15 мин. Таким образом, повышение концентрации H_2O_2 может выступать потенциальным индуктором изменений содержания ЖК и ЖК-иле при действии локального стимула. Возможным механизмом повышения содержания жасмонатов при увеличении концентрации H_2O_2 может являться снижение рН цитозоля в результате Ca^{2+} -зависимой инактивации H^+ -АТФазы, которое, в свою очередь, может быть вызвано повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , опосредованным активацией H_2O_2 -зависимых Ca^{2+} каналов.

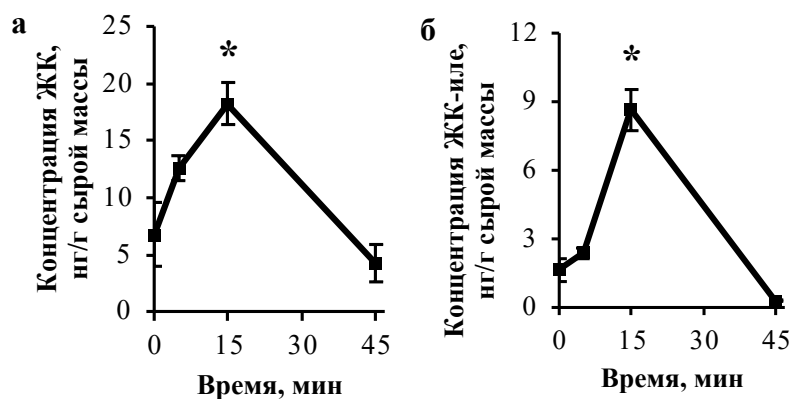


Рисунок 14. Динамика концентрации жасмоновой кислоты (ЖК) (а) и жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (б), индуцированная экзогенным 10 мМ H_2O_2 , в отсечённом листе пшеницы; момент загрузки H_2O_2 соответствует точке 0 мин

* – статистически значимые различия от контрольного значения (0 мин), $p < 0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Электрическая и гормональная системы растений играют важную роль в развитии системного ответа при локальном раздражении, скоординированный вклад которых регулирует физиологические процессы, обуславливающие формирование устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Распространение ВП в нераздражённые части растений индуцирует системные изменения содержания фитогормонов и активности фотосинтеза. Особенностью фотосинтетического ответа в растениях гороха и пшеницы является его двухфазность. Индуктором первой быстрой фазы снижения активности фотосинтеза, по-видимому, являются изменения ионных концентраций при генерации ВП, вторая продолжительная фаза снижения фотосинтетической активности, вероятно, индуцируется изменением содержания фитогормонов. Среди проанализированных в настоящей работе гормонов (АБК, СК, ЖК и ЖК-иле) наиболее выраженные изменения характерны для жасмонатов, рост концентрации которых предшествует формированию продолжительной фазы ответа фотосинтеза. Имеющиеся данные литературы и полученные в работе результаты позволяют предположить схему (рис. 15) ВП-индуцированного увеличения содержания жасмонатов и последующего снижения активности фотосинтеза при локальном раздражении.

Локальное раздражение индуцирует распространение ВП, которое сопровождается изменениями концентраций H^+ , Ca^{2+} , H_2O_2 . Происходит снижение внутриклеточного рН и рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , а также имеет место увеличение концентрации H_2O_2 . Вероятно, что процессы изменения концентраций ионов и H_2O_2 являются связанными: увеличение концентрации H_2O_2 активирует Ca^{2+} каналы, происходит приток Ca^{2+} в клетку, увеличение концентрации Ca^{2+} вызывает инактивацию H^+ -АТФазы, что приводит к снижению внутриклеточного рН. Изменение концентраций H^+ , Ca^{2+} , H_2O_2 может индуцировать изменение содержания жасмонатов. В ответ на увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может повышаться каталитическая активность ферментов биосинтеза жасмонатов, 13-липоксигеназы LOX6 и фосфолипазы D (PLD), что приведёт к повышенной продукции жасмонатов. Ca^{2+} также инактивирует H^+ -АТФазу, что вызывает закисление цитозоля. В ответ на снижение рН происходит усиление транслокации предшественника жасмонатов ОФДК из цитозоля в пероксисомы в результате перехода ОФДК в протонированную форму и как следствие свободного перемещения через мембрану пероксисомы, где щелочной рН обуславливает диссоциацию ОФДК и её накопление по принципу «анионной ловушки». Таким образом большее количество субстрата в виде ОФДК становится доступным для пероксисомных ферментов, которые синтезируют ЖК. Увеличение концентрации жасмонатов в результате усиления биосинтеза приводит к ЖК-индуцированному закрытию устьиц, в результате чего происходит снижение доступности углекислого газа и развивается продолжительное снижение активности фотосинтеза.

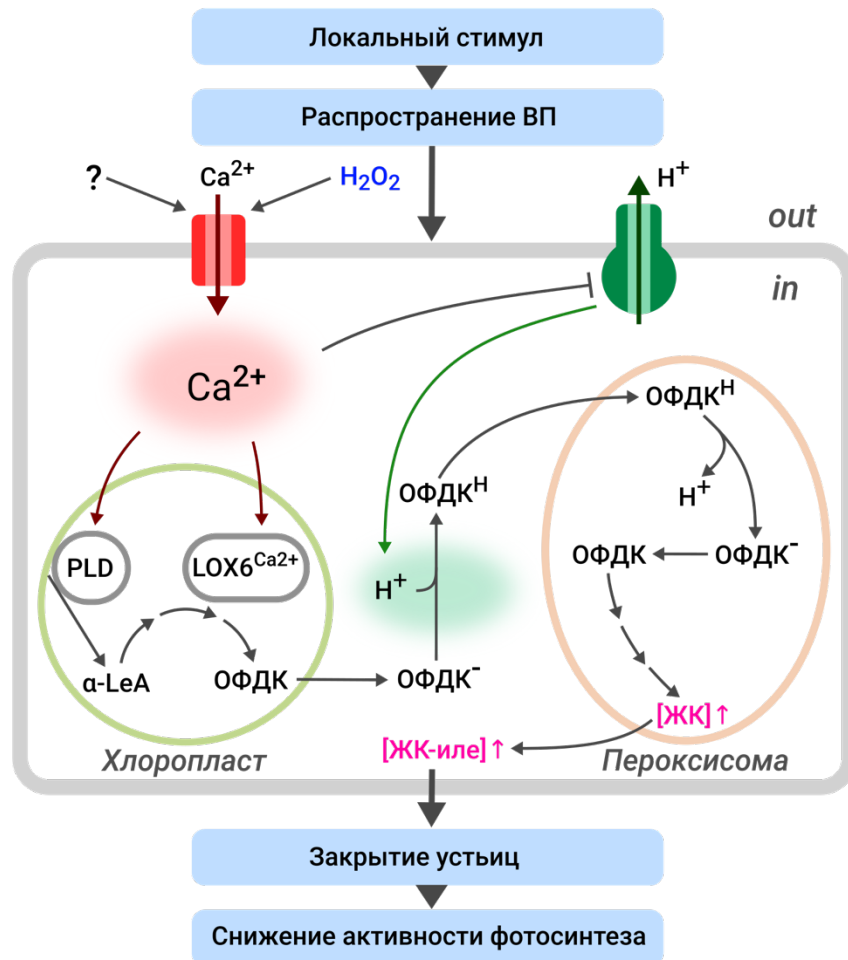


Рисунок 15. Предполагаемая схема ВП-индуцированного увеличения содержания жасмонатов и последующего снижения активности фотосинтеза при локальном раздражении

ВЫВОДЫ

1. Локальный стимул вызывает увеличение содержания абсцизовой кислоты, салициловой кислоты и жасмонатов в нераздраженных частях растений гороха и пшеницы наряду со снижением активности фотосинтеза. Распространение варибельного потенциала предшествует увеличению содержания фитогормонов. Рост уровня жасмонатов предшествует длительной фазе ответа фотосинтеза, что предполагает роль жасмонатов в индукции этой фазы фотосинтетического ответа.

2. Изменение концентрации жасмоновой кислоты и изменение активности фотосинтеза в нераздраженных частях растения имеют прямую зависимость от амплитуды варибельного потенциала.

3. Повышение содержания жасмонатов, индуцированное распространением варибельного потенциала, может быть связано с изменением концентраций H^+ , Ca^{2+} , H_2O_2 .

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. Yudina L., Sukhova E., Sherstneva O., Grinberg M., **Ladeynova M.**, Vodeneev V., Sukhov V. Exogenous Abscissic Acid Can Influence Photosynthetic Processes in Peas through a Decrease in Activity of H^+ -ATP-ase in the Plasma Membrane // Biology, 2020, Vol. 9, No. 10, P. 324.
2. **Ladeynova M.**, Mudrilov M., Berezina E., Kior D., Grinberg M., Brilkina A., Sukhov V., Vodeneev V. Spatial and Temporal Dynamics of Electrical and Photosynthetic Activity and the Content of Phytohormones Induced by Local Stimulation of Pea Plants // Plants, 2020, Vol. 9, No. 10, P. 1364.
3. Mudrilov M., **Ladeynova M.**, Berezina E., Grinberg M., Brilkina A., Sukhov V., Vodeneev V. Mechanisms of specific systemic response in wheat plants under different locally acting heat stimuli // Journal of Plant Physiology, 2021, Vol. 258-259, P. 153377.
4. 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 Signaling & Behavior, 2021, Vol. 16, No. 4, P. 1869415.

Тезисы докладов:

1. **Ладейнова М. М.**, Воденеев В. А. Пероксид водорода как возможный индуктор переменного потенциала в проростках гороха // Тезисы докладов 21-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». Пушкино. 2017. С. 66.
2. **Ладейнова М. М.** Возможная роль пероксида водорода как индуктора переменного потенциала в проростках гороха // Сборник тезисов участников форума «Наука будущего – наука молодых». 2017. Нижний Новгород. С. 27.
3. **Ладейнова М. М.**, Березина Е. В., Воденеев В. А., Брилкина А. А. Концентрационная динамика абсцизовой и жасмоновой кислот в условиях локального теплового стресса // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. – Т. 1 – Краснодар: Полиграфическое объединение «Плехановец». 2019. Сочи. С. 166.
4. **Ладейнова М. М.**, Березина Е. В., Воденеев В. А., Брилкина А. А. Действие локального теплового стрессора на динамику содержания абсцизовой и жасмоновой кислот в листьях проростков гороха // Тезисы докладов 72-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2019. Нижний Новгород. С. 133.
5. **Ладейнова М. М.**, Мудрилов М. А., Березина Е. В., Брилкина А. А., Воденеев В. А. Действие локальных раздражителей различной природы на динамику содержания абсцизовой и жасмоновой кислот // Тезисы докладов 73-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2020. Нижний Новгород. С. 120.
6. **Ладейнова М. М.**, Кузнецова Д. В., Брилкина А. А., Воденеев В. А. Электрические сигналы и динамика содержания фитогормонов при действии локального нагрева в растениях *Arabidopsis thaliana* // Тезисы докладов 74-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», посвященной памяти проф. А. П. Веселова. 2021. Нижний Новгород. С. 128.

7. Кузнецова Д. В., **Ладейнова М. М.**, Гринберг М. А., Брилкина А. А., Воденеев В. А. Влияние низкоинтенсивного β -излучения на переменный потенциал и содержание фитогормонов при действии локального раздражителя в проростках пшеницы // Тезисы докладов 74-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», посвященной памяти проф. А.П. Веселова. 2021. Нижний Новгород. С. 126.

8. **Ladeynova M.**, Mudrilov M., Berezina E., Brilkina A., Vodeneev V. Phytohormone dynamics induced by a local stimulation in wheat plants // Abstract title. FEBS Open Bio. 2021. 11: P-07.4-20.