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

На правах рукописи

ЛАДЕЙНОВА МАРИЯ МИХАЙЛОВНА

Анализ роли индуцированного локальным раздражением вариабельного потенциала в системном изменении содержания фитогормонов

1.5.2 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

C	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
В	введение	7
Γ	ЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
	1.1. Сигнальные системы растений	12
	1.1.1. Электрические сигналы	13
	1.1.2. Химические сигналы	16
	1.2. Влияние электрических сигналов на системное изменение	
	содержания фитогормонов	23
	1.2.1. Динамика фитогормонов при действии локальных раздражителей	23
	1.2.2. Механизмы индукции изменений концентраций	
	фитогормонов электрическими сигналами	27
	1.3. Роль электрических сигналов и фитогормонов в развитии системного	
	ответа	34
Γ	ЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
	2.1. Объекты исследования	40
	2.2. Методы исследования	40
	2.2.1. Локальная стимуляция	40
	2.2.2. Регистрация электрической активности	40
	2.2.2.1. Внеклеточная регистрация электрической активности	40
	2.2.2.2. Внутриклеточная регистрация электрической активности	
	с помощью микроэлектродной техники	41
	2.2.3. Определение содержания фитогормонов методом жидкостной	
	хроматомасс-спектрометрии	42
	2.2.4. Ингибиторный анализ	
	2.2.5. Флуоресцентный имиджинг	44
	2.2.6. Измерение фотосинтетической активности	45
	2.2.7. Оценка интенсивности транспирации	46

2.2.8. Анатомическое исследование стебля гороха	46
2.2.9. Статистический анализ	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1. Индуцированные локальным стимулом электрические сигналы,	
изменение содержания фитогормонов и активности фотосинтеза	48
3.2. Пространственно-временная динамика электрической активности,	
содержания фитогормонов и активности фотосинтеза при действии	
локального стимула	60
3.3. Анализ механизмов изменения содержания фитогормонов при	
действии локального стимула	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК ПИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсиизовая кислота

АБК-ГЭ - глюкозиловый эфир абсцизовой кислоты

АФК – активные формы кислорода

АТФ – аденозинтрифосфат

ВП – вариабельный потенциал

ДМСО – диметилсульфоксид

ЖК – жасмоновая кислота

ЖК-иле – жасмонил-изолейцин

 Π_1 – первый нераздражаемый лист гороха

 Π_2 – второй нераздражаемый лист гороха

 Π_3 – третий нераздражаемый лист гороха

 Π_{c} – стимулируемый лист гороха

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

ОФДК – 12-оксо-фитодиеновая кислота

ПД – потенциал действия

РуБисКО – рибулозобисфосфаткарбоксилаза

СК – салициловая кислота

СП – системный потенциал

Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод / внутриклеточный микроэлектрод

 ${\bf 9}_1$ – измерительный макроэлектрод, размещённый на черешке первого листа гороха

Э2 – измерительный макроэлектрод, размещённый на черешке второго листа гороха

Э2 – измерительный макроэлектрод, размещённый на черешке третьего листа гороха

Эл. — измерительный внеклеточный макроэлектрод, контактирующий с листом растения

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

Эст. – измерительный внеклеточный макроэлектрод / внутриклеточный микроэлектрод, контактирующий со стеблем растения

ABC – ATФ-связывающая кассета (от англ. ATP-binding cassette)

АНА1 — H⁺-ATФаза арабидопсиса (от англ. *Arabidopsis* H⁺-ATPase)

ANN1 – аннексин 1 (от англ. annexin1)

 Ca^{2+} – ионы кальция

CaM – кальмодулин (от англ. calmoduline)

CBL – кальциневрин-В-подобные белки (от англ. calcineurine B-like proteins)

CBP – кальмодулин-связывающие белки (от англ. calmoduline-binding protein)

CDPK – кальций-зависимые протеинкиназы (от англ. calcium-dependent protein kinases)

CICR – кальций-индуцированное высвобождение кальция (от англ. calcium-induced calcium release)

CIPK – протеинкиназы, взаимодействующие с CBL (от англ. CBL-interacting protein kinases)

CML – кальмодулин-подобные белки (от англ. calmoduline-like proteins)

CNGC19 – канал, управляемый циклическими нуклеотидами 19 (от англ. cyclic nucleotide gated channel 19)

СО2 – углекислый газ

ESI – ионизация электроспреем (от англ. electrospray ionization)

 H^+ – протоны

 H_2O_2 – пероксид водорода

JAZ – жасмонатный ZIM(белок цинковых пальцев, экспрессируемый в меристеме соцветия)-домен (от англ. jasmonate ZIM (zinc-finger inflorescence meristem) domain)

 K^+ – ионы калия

 La^{3+} – ионы лантана

LaCl₃ – хлорид лантана

LOX – липоксигеназа (от англ. lipoxygenase)

MPK – митоген-активируемые протеинкиназы (от англ. mitogen-activated protein kinases)

MRM – мониторинг множественных реакций (от англ. multiple reaction monitoring)

Na₃VO₄ – ортованадат натрия

NPQ — нефотохимическое тушение флуоресценции (от англ. non-photochemical quenching)

PAM – амплитудно-импульсная модуляция (от англ. pulse-amplitude modulation)

PIN2 – ингибитор протеаз 2 (от англ. proteinase inhibitor 2)

PLD – фосфолипаза D (от англ. phospholipase D)

PSII – фотосистема II (от англ. photosystem II)

RBOH – гомологи оксидаз респираторного взрыва (от англ. respiratory burst oxidase homolog)

SHAM – салицилгидроксамовая кислота (от англ. salicylhydroxamic acid)

TPC – двухпоровый катионный канал (от англ. two-pore cation channel)

 Φ_{PSII} – квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II

 $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов кальция

ВВЕДЕНИЕ

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 (Ca²⁺) 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-Миñoz 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 вариабельного 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 способны локальными стимулами электрические сигналы 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 вариабельного 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 вариабельного потенциала, вызванного локальным стимулом.

- 2. Выявление связи между вариабельным потенциалом, изменением содержания фитогормонов и ответом фотосинтеза на основе анализа пространственно-временной динамики.
- 3. Анализ механизмов индукции изменений содержания фитогормонов при распространении вариабельного 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 вариабельным потенциалом, может выступать изменение внутриклеточного рН, которое сопровождает генерацию вариабельного потенциала.

Научно-практическая значимость

Получены новые знания о механизмах регуляции содержания фитогормонов вариабельным 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

Вариабельный потенциал индуцирует системные изменения содержания фитогормонов при локальном раздражении, что подтверждается согласованными изменениями параметров вариабельного потенциала и концентрации гормонов. Изменение внутриклеточного рН, сопровождающее генерацию вариабельного

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 источников, в том числе 143 работы иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сигнальные системы растений

Растения существуют в постоянно меняющихся условиях окружающей среды, но являются неподвижными организмами и поэтому не могут избежать действующих стрессоров. Растения вынуждены приспосабливаться к новым условиям, формируя адаптивный физиологический ответ. Для развития такого ответа необходимы внутриклеточные и межклеточные сигналы, которые координируют функциональные изменения в разных клетках, тканях органах. Межклеточные И распространяющиеся на значительные расстояния, достигающие масштабов отдельных органов или даже всего растительного организма, и вызванные действием абиотических или биотических стрессоров, называют дистанционными стрессовыми сигналами. При локальном действии раздражителей такие сигналы распространяются в нераздражённые части растений и вызывают там функциональные изменения, которые обозначают как системный ответ.

Дистанционные стрессовые сигналы растений традиционно разделяют на три основных типа: электрические, гидравлические и химические (Choi et al., 2016; Huber, Bauerle, 2016). Электрические сигналы представляют временное изменение мембранного потенциала, которое достаточно быстро распространяется по тканям растения. Тип электрической реакции зависит от типа стимула и ионных потоков, участвующих в её генерации. Выделяют потенциал действия (ПД), вариабельный потенциал (ВП) и системный потенциал (СП). Скорость распространения электрических сигналов по растению составляет от нескольких мм до нескольких см в секунду и зависит от типа сигнала (Huber, Bauerle, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017). Гидравлический сигнал — это волна повышенного давления, которая быстро распространяется по сосудам ксилемы. Изменение давления в сосудах ксилемы воспринимается соседними паренхимными клетками как механический сигнал, опосредованный изменением тургора этих клеток и изменением натяжения мембраны. Скорость распространения гидравлических сигналов очень высока и

может достигать скорости звука в воде для волны давления, и десятки см в секунду для гидравлического массового потока в ксилеме (Choi et al., 2016; Huber, Bauerle, 2016). Химические сигналы представляют собой временные изменения концентраций различных соединений, к которым относятся распространяющиеся волны активных форм кислорода (АФК), изменение концентраций ионов, например, кальциевые волны, а также фитогормоны и различные летучие соединения. Химические сигналы распространяются по растению с низкой скоростью, которая как правило составляет от нескольких мкм в секунду до нескольких сотен мкм в секунду (Xia et al., 2015; Choi et al., 2016; Huber, Bauerle, 2016).

Электрические, гидравлические и химические сигналы не действуют независимо друг от друга, наиболее вероятно их взаимодействие и интеграция при передаче информации о действии стрессора (Полевой и др., 2001; Takahashi, Shinozaki, 2019). Тесная взаимосвязь сигнальных путей и различные характерные скорости передачи сигналов предполагают возможность индукции одного типа сигнала другим, а также наличия петли положительной обратной связи (Xia et al., 2015; Choi et al., 2016; Gilroy et al., 2016; Huber, Bauerle, 2016; Farmer et al., 2020). Так, химические сигналы необходимы для инициации метаболических реакций и физиологических ответов в системных тканях растения, но для быстрой передачи на большие расстояния больше подходят электрические сигналы. В свою очередь различные химические сигналы способны приводить к изменению электрической активности. Далее наиболее подробно остановимся на двух типах дистанционных стрессовых сигналов – электрических и химических, активных участников передачи информации о действии локальных раздражителей.

1.1.1. Электрические сигналы

Все растения способны генерировать дистанционные электрические сигналы, которые служат для связи реакций в различных тканях и органах. Наиболее хорошо изучены электрические сигналы в низших растениях, в частности в *Characeae*, и в

локомоторных растениях, таких как *Mimosa pudica* и *Dionaea muscipula* (Опритов и др., 1991). В обычных высших растениях также широко показаны различные типы электрических сигналов.

Электрические сигналы, вызванные внешним раздражителем, отличаются пространственным и временным характером изменений электрического потенциала, имеют различные механизмы генерации и распространения.

ПД – кратковременная деполяризация спайковой формы, включающая две фазы – деполяризацию и реполяризацию. ПД возникает в ответ на неповреждающие воздействия, такие как электрический ток, прикосновение, охлаждение. Генерация ПД подчиняется закону «всё или ничего», имеет возможность суммации подпороговых стимулов, характерно наличие периода рефрактерности. ПД является самораспространяющимся сигналом с типичными скоростями 1 – 10 см/с в различных растениях (Fromm, Lautner, 2007; Huber, Bauerle, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017).

Генерация ПД в клетках высших растений инициируется активацией потенциалзависимых Са²⁺ каналов при пороговой деполяризации мембранного потенциала и
увеличением концентрации Са²⁺ в цитоплазме. Увеличение концентрации Са²⁺
активирует Са²⁺-зависимые анионные каналы и инактивирует Н⁺-АТФазу
плазматической мембраны. Развивается фаза деполяризации. Затем Са²⁺ каналы
инактивируются, концентрация Са²⁺ в цитоплазме снижается, активируются К⁺
каналы внешнего выпрямления и происходит последующий отток К⁺ из клетки,
развивается стадия реполяризации. Снижение концентрации Са²⁺ также инактивирует
анионные каналы и активирует Н⁺-АТФазу плазматической мембраны, что
способствует реполяризации. Распространение ПД происходит без затухания
амплитуды и скорости с расстоянием через симпласт паренхимных клеток,
окружающих проводящие пучки, или через ситовидные трубки флоэмы (Vodeneev et
al., 2006; Huber, Bauerle, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Sukhov et al., 2019).

ВП – длительная переходная деполяризация нерегулярной формы. Длительность ВП составляет от нескольких минут до нескольких десятков минут. ВП возникает в ответ на повреждающие воздействия, такие как механическое повреждение, ожог, нагрев. Амплитуда и скорость распространения ВП могут зависеть от расстояния до зоны повреждения и интенсивности стимула. ВП распространяется по растению со скоростью 0,2 — 20 мм/с. Также ВП может распространяться в рефрактерный период после ПД, и способен проходить через неактивные и мёртвые ткани. Данные специфические свойства ВП свидетельствуют о том, что ВП, по-видимому, является локальным электрическим ответом, вызванным распространением сигнала неэлектрической природы (Fromm, Lautner, 2007; Vodeneev et al., 2015; Huber, Bauerle, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Sukhov et al., 2019).

ВП может включать медленную волну деполяризации и сопровождающую её ПД-подобные спайки. Генерацию ВП в этом случае составляют две группы механизмов. Начальная быстрая деполяризация и ПД-подобные спайки, вероятно, являются локальными потенциалами действия, вызванными деполяризацией медленной волны, следовательно, их механизм генерации в целом соответствует механизму генерации ПД (Vodeneev et al., 2015; Sukhov et al., 2019). Генерация медленной волны деполяризации связана в основном с временной инактивацией Н⁺- АТФазы плазматической мембраны, зависимой от повышения внутриклеточной концентрации Ca²⁺, которая опосредована активацией АФК-зависимых (Demidchik, 2018; Marcec et al., 2019) или механочувствительных (Monshausen, Haswell, 2013) Ca²⁺ каналов (Stahlberg et al. 2006; Vodeneev et al., 2015; Szechyńska-Hebda et al., 2017).

Передача ВП связана с распространением из области локального повреждения гидравлической волны и/или химического сигнала, в качестве которого, вероятно, выступают АФК (Vodeneev et al., 2015; Gilroy et al., 2016; Choi et al., 2016). В соответствии с химической гипотезой длительная деполяризация — это локальная электрическая реакция, вызванная определённым химическим агентом (раневым веществом), которое распространяется из повреждённой зоны и активирует лигандзависимые Ca²⁺ каналы. Гидравлическая гипотеза предполагает активацию

механочувствительных Ca^{2+} каналов в результате распространения волны повышенного давления из зоны повреждения (Vodeneev et al., 2015; Sukhov et al., 2019).

Существуют модифицированные варианты химической и гидравлической гипотезы распространения ВП: «гидравлическая дисперсия» — перенос раневого вещества в потоке массы воды в ксилеме, вызванном гидравлической волной в зоне локального повреждения; «турбулентная диффузия» — распространение раневого вещества благодаря наличию турбулентных потоков в ксилеме, которые ускоряют диффузию в 3 — 4 раза (Vodeneev et al., 2015). Данные гипотезы являются комплексными и представляют собой комбинацию химических и гидравлических механизмов, взаимодействующих при распространении ВП.

СП — длительная переходная гиперполяризация, которая связана с временной активацией H^+ -АТФазы плазматической мембраны. В механизме генерации СП также могут принимать участие Ca^{2+} и K^+ каналы. СП является самораспространяющимся системным сигналом и не подчиняется закону «всё или ничего», зависит от интенсивности и характера первоначального стимула. Его распространение происходит в апопласте после локального повреждения со скоростью 0.8-1.7 мм/с (Zimmermann et al., 2009; Huber, Bauerle, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Sukhov et al., 2019).

1.1.2. Химические сигналы

Химические сигналы играют важную роль в ответных реакциях на стресс, имеют очень разнообразную природу и как следствие способны распространяться с разными скоростями как на короткие, так и на достаточно большие расстояния.

Распространяющиеся Ca²⁺ волны активно участвуют в передаче сигнала о действии стрессора на большие расстояния. В покое внутриклеточные концентрации Ca²⁺ очень низкие и составляют около 100 нМ. В ответ на широкий спектр абиотических и биотических факторов происходит временное увеличение

внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Choi et al., 2016). Концентрация Ca^{2+} в клетке изменяется благодаря наличию разнообразных лиганд-зависимых (Demidchik, 2018; Marcec et al., 2019) и механочувствительных (Monshausen, Haswell, 2013) Са²⁺ каналов, располагающихся на плазматической и внутренних мембранах клетки. Характерная скорость распространения системного Ca²⁺ сигнала составляет несколько сотен мкм/с (Choi et al., 2016; Huber, Bauerle, 2016; Shabala et al., 2016). Системный Са²⁺ сигнал представляет собой распространяющуюся волну Ca²⁺, которая может быть разной амплитуды и возникать один или несколько раз с разной частотой. Таким образом формируется Ca^{2+} сигнатура, которая вместе с пространственно-временным паттерном обеспечивает передачу информации о действующем стимуле. Восприятие Са²⁺ сигнатуры обеспечивается различными декодирующими сенсорными белками, Ca^{2+} , претерпевают которые связывают конформационные изменения модифицируют свою активность. В растениях известно несколько основных классов таких Ca^{2+} сенсоров, которые включают Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPK), (CaM), кальмодулин-подобные белки (CML), кальциневрин-Вподобные белки (CBL) и протеинкиназы, взаимодействующие с CBL (CIPK). После передачи декодированного сигнала различным мишеням, развивается специфичный физиологический ответ (Shabala et al., 2016; Marcec et al., 2019).

Достаточно высокую скорость распространения Ca²⁺ сигнала нельзя объяснить диффузией, что предполагает участие механизма усиления сигнала. В литературе предлагается механизм кальций-индуцированного высвобождения кальция (CICR), который опосредован работой двухпоровых катионных каналов (TPC) (Gilroy et al., 2016; Choi et al., 2017). Также усиление Ca²⁺ сигнала возможно при участии АФК (Gilroy et al., 2016; Choi et al., 2017; Marcec et al., 2019). Таким образом появляется возможность взаимодействия различных типов химических сигналов.

АФК — важные сигнальные молекулы, которые являются активными участниками в передаче дистанционного стрессового сигнала. Использование АФК в качестве сигнальных посредников имеет несколько преимуществ. Клетки растений

способны быстро продуцировать и утилизировать различные формы АФК, таким образом формируя их временные и пространственные сигнатуры (Marcec et al., 2019). Также АФК являются регуляторами активности различных катионных и анионных каналов, расположенных на плазматической и внутренних мембранах клетки (Demidchik, 2018; Marcec et al., 2019). Следовательно АФК могут влиять на Показана электрическую активность растительных клеток. возможность распространения волн АФК на большие расстояния быстрого как самоподдерживающегося сигнала. Зарегистрированная скорость распространения такого АФК-сигнала составляла 8,4 см/мин (Miller et al., 2009). Волны АФК зарегистрированы в ответ на такие раздражители как локальное повреждение, избыточное освещение, холод и тепловой стресс (Choi et al., 2016). В механизме распространения волн АФК главным участником является НАДФН-оксидаза – связанный с мембраной фермент, который продуцирует в апопласт супероксидный анион, используя в качестве донора электронов НАДФН. Супероксидный анион по своей природе является высокореактивной и нестабильной молекулой, и он либо реакцией спонтанной дисмутации переходит в более стабильный пероксид водорода (Н2О2), либо данное превращение катализирует супероксиддисмутаза. Более длительный период полураспада Н2О2 и его способность легко проникать в клетку через аквапорины представляют эту форму АФК как наиболее вероятного участника дистанционных стрессовых сигналов (Choi et al., 2016; Marcec et al., 2019). Известно, что НАДФН-оксидазы растений могут быть активированы непосредственно за счёт связывания Ca²⁺ или посредством фосфорилирования CDPK или CIPK. Ca²⁺ каналы плазматической мембраны, активируемые АФК, обеспечивают механизм, с помощью которого НАДФН-оксидаза запускает дальнейшую собственную активацию, таким образом обеспечивается распространение самоподдерживающейся волны АФК на значительные расстояния (Choi et al., 2016; Gilroy et al., 2016; Choi et al., 2017).

В поддержании передачи волны АФК могут играть роль фосфолипаза D (PLD) и фосфатидная кислота, участие которых однозначно ещё не доказано. Известно, что

активность НАДФН-оксидазы может регулироваться фосфатидной кислотой, которая является продуктом реакции катализируемой PLD. При этом сама PLD работает Ca^{2+} -зависимым образом. Взаимодействие фосфатидной кислоты с НАДФН-оксидазой модулирует её активность и тем самым может изменять передачу сигнала с участием АФК (Choi et al., 2016). Кроме того, PLD участвует и в продукции свободных жирных кислот (Ryu, Wang, 1996; Wang et al., 2000), которые являются субстратом для синтеза жасмоновой кислоты (ЖК), одного из важных стрессовых гормонов растений. Тем самым Ca^{2+} обеспечивает не только механизм поддержания волны АФК, но и участвует в регуляции продукции стрессовых фитогормонов. В свою очередь АФК обеспечивают поддержание волны Ca^{2+} , и, следовательно, также могут принимать участие в регуляции синтеза гормонов.

Передача сигналов с участием фитогормонов необходима как для процессов, обеспечивающих развитие растений, так и для адаптации к биотическим и абиотическим стрессам. Фитогормоны – это обширная группа эндогенных регуляторов физиологических процессов у растений, часть которых относят к ростовым веществам, а другие являются стрессовыми фитогормонами. Растительные гормоны включают следующие классы: ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовую кислоту (АБК), жасмонаты, салициловую кислоту (CK), брассиностероиды и стриголактоны. Перечисленные гормоны сильно различаются по своей химической структуре, что отражается на способах их транспортировки на ближние и дальние расстояния. Основными путями транспорта фитогормонов в растении является проводящая система: ксилема и флоэма (Xia et al., 2015; Shabala et al., 2016; Zhao et al., 2021). Большинство гормонов, вероятно, за исключением брассиностероидов, перемещаются по ксилеме в виде сигналов «корень-побег». Например, некоторые транс-зеатин-подобные цитокинины, синтезируемые в корне, были обнаружены в ксилемном соке. Их транспорт из корня в побеги контролировался сигналом самого побега, рост которого регулируют цитокинины. Напротив, цитокинины изопентенилового типа были обнаружены в соке флоэмы и, вероятно, действуют как сигналы от побега к корню (Shabala et al., 2016). АБК может транспортироваться как по ксилеме (Hartung et al., 2002), так и по флоэме (Kudoyarova et al., 2011). Для передачи сигнала о засухе АБК и конъюгаты АБК перемещаются по ксилеме от корня к побегу для регуляции работы устьиц (Kudoyarova et al., 2015; Shabala et al., 2016; Zhao et al., 2021). В ксилемном соке обнаружены и стриголактоны, которые регулируют ветвление побегов, развитие корней, симбиотические взаимодействия, реакцию на патогены, при этом они транспортируются от корня к побегу. Этилен, газообразный гормон, может распространяться как сигнал на большие расстояния. В ксилемном соке его предшественник может передаваться от корней к побегам как ответный сигнал на засуху. Гиббереллины, участвующие в удлинении побегов, также могут передаваться ксилемой как сигналы между корнями и побегами (Xia et al., 2015; Shabala et al., 2016; Zhao et al., 2021).

Гормоны из группы жасмонатов являются важными посредниками реакции на повреждение. Их транспорт в растении зависит от химической структуры. Так, производной ЖК и биоактивной формой гормона среди жасмонатов является жасмонил-изолейцин (ЖК-иле), который связывается с рецептором и запускает экспрессию жасмонат-зависимых генов (Fonseca et al., 2009; Acosta, Farmer, 2010; Wasternack, Hause, 2013). Передача сигналов с участием ЖК/ЖК-иле на короткие расстояния осуществляется через апопласт и флоэму. Также возможна передача жасмонатного сигнала на дальние расстояния. Прежде всего такая передача возможна благодаря существованию летучей формы жасмонатов – метилжасмоната. Он может распространяться путём воздушной диффузии на отдалённые листья и соседние растения, легко проникать через клеточную мембрану и индуцировать ответные реакции (Ruan et al., 2019). Передача жасмонатов по сосудистым пучкам, как по флоэме, так и по ксилеме, в качестве сигнала на большие расстояния также имеет место (Shabala et al., 2016; Ruan et al., 2019). Некоторые исследования также показали, что жасмонаты не просто транспортируются по проводящим пучкам, но их транспорт сопровождается ресинтезом ЖК. Локализация различных ферментов биосинтеза ЖК была обнаружена в комплексе клеток-спутниц и ситовидных элементов сосудистых пучков (Ruan et al., 2019).

СК является важным регулятором устойчивости ко многим патогенам. Было показано, что СК в своей метилированной форме, метилсалицилате, перемещается от корней к побегам, чтобы контролировать индукцию системной приобретенной устойчивости на большом расстоянии (Xia et al., 2015; Choi et al., 2016; Shabala et al., 2016; Zhao et al., 2021).

Транспорт ауксина от побегов к корням необходим для развития боковых корней. Основной способ транспорта ауксинов – активный полярный межклеточный транспорт со скоростью 1 – 5 мкм/с (Xia et al., 2015; Choi et al., 2016), возможно перемещение ауксина и по флоэме со скоростью 14 – 50 мкм/с (Shabala et al., 2016). В целом, транспорт фитогормонов более медленный, чем распространение волн Ca²⁺ и АФК и передача электрических сигналов (Huber, Bauerle, 2016; Shabala et al., 2016).

Химическими сигналами наряду с гормонами могут выступать различные летучие вещества, пептиды, ассимиляты и сахара, которые также участвуют в координации роста, развития и физиологических реакций на действие стрессов.

Летучие соединения обсуждаются в литературе как системный сигнал на большие расстояния как между растениями, так и между различными органами одного растения. Летучие соединения выделяются в ответ на патогены и нападение травоядных насекомых. Они могут вызывать системные защитные реакции в отдаленных частях растений в течение нескольких часов после нападения насекомых. Их химическое разнообразие очень велико, как и их способ действия, и они играют важную роль в защите растений (Huber et al., 2016; Erb, Reymond, 2019).

Первым идентифицированным сигнальным пептидом растений был системин, индуцируемый повреждающими воздействиями. Системин регулирует защитные реакции растений путём регуляции синтеза ингибитора протеазы. Позже были идентифицированы и другие малые сигнальные пептиды, которые контролируют различные процессы развития растений: пролиферация и деление клеток, лежащие в

основе роста растений, поддержание функционирования меристем, регуляция оплодотворения и образования пыльцы, гравитропизм, развитие боковых корней и корневых волосков, проводящей системы. Большинство малых пептидов действуют на коротких расстояниях для регуляции процессов развития, но также есть свидетельства того, что некоторые из них могут участвовать в передаче сигналов от корней к побегам на большие расстояния. Два класса сигнальных пептидов, которые регулируют усвоение азота растениями, могут перемещаться на большие расстояния. Первый класс включает определенные подтипы пептидов бобовых — CLAVATA (CLV) / EMBRYO SURROUNDING REGION (ESR)-RELATED PROTEIN, которые специфически контролируют количество корневых клубеньков, второй класс включает C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE, которые контролируют передачу сигналов о потребности в азоте у арабидопсиса (Shabala et al., 2016; Vega-Muñoz et al., 2020).

Роль сахаров и ассимилятов как дистанционных сигнальных молекул растений также описана в литературе. У высших растений сахароза является преобладающей формой ассимилятов, которая перемещается по флоэме от фотосинтетически активных листьев к акцепторным органам, включая развивающиеся корни. Сахароза, образовавшаяся в результате фотосинтеза в семядолях служит дистанционным сигналом, который инициирует первичное удлинение корня при прорастании семян, когда на начальной стадии происходит быстрое удлинение гипокотилей с подавлением роста корней. Также сахароза была идентифицирована как сигнал, регулирующий образование боковых корней у арабидопсиса. Существует и множество других примеров, когда ассимиляты играют роль дистанционного сигнала, действуя совместно с другими сигнальными молекулами для реализации программы развития или формирования адаптации (Kudoyarova et al., 2015; Choi et al., 2016; Shabala et al., 2016).

Системные изменения концентрации различных сигнальных молекул, которые происходят на большом расстоянии от зоны действия стрессового фактора, на данный

момент являются областью интенсивных исследований. Продолжается поиск ответа является ли транспорт сигнальной молекулы самостоятельным, действительно ли сигнальное соединение перемещается между различными органами и тканями растений, или увеличение его концентрации в системных тканях является следствием его синтеза в ответ на распространение другого дистанционного сигнала. Решение данного вопроса в особенности актуально для гормональной системы, так как существуют противоречия в достаточно медленных скоростях транспорта фитогормонов и быстрым изменением их концентрации на больших расстояниях (Glauser et al., 2008; Koo et al., 2009). Существует предположение (Choi et al., 2016), что системные изменения уровня фитогормонов не являются следствием непосредственного транспорта гормонов, а опосредован распространением другого быстрого сигнала, такого как электрический и/или волны Ca^{2+} и $A\Phi K$. Как только эти быстрые сигналы достигают системных тканей, они запускают там синтез гормонов, которые в свою очередь индуцируют системный ответ. Исследование влияния электрических сигналов на системное изменение содержания фитогормонов требует подробного изучения пространственно-временной динамики гормонов нераздражённых частях растения при действии локального раздражителя, а также изучение возможных механизмов индукции изменений концентраций гормонов электрическими сигналами. Рассмотрение данных литературы по этим вопросам приводится в следующих разделах.

1.2. Влияние электрических сигналов на системное изменение содержания фитогормонов

1.2.1. Динамика фитогормонов при действии локальных раздражителей

Локальные раздражители вызывают изменение содержания стрессовых фитогормонов в нераздражённых частях растения на значительном удалении от зоны локальной стимуляции. Основными локальными раздражителями, для которых зарегистрировано изменение содержания фитогормонов, являются тепловые стимулы

(ожог и нагрев), механическое повреждение и повреждение травоядными животными. Изменения концентрации фитогормонов в системных тканях регистрируют как через несколько минут (и даже десятков секунд) после действия стимула, так и на более длительных временных промежутках, от десятков минут до нескольких часов и суток. Среди стрессовых фитогормонов остановимся на рассмотрении динамики АБК, СК и жасмонатов. По данным литературы на основе средних значений концентрации фитогормонов в нераздражённых тканях растений при действии локальных стимулов были построены кривые динамики АБК, СК ЖК и ЖК-иле (рис. 1).

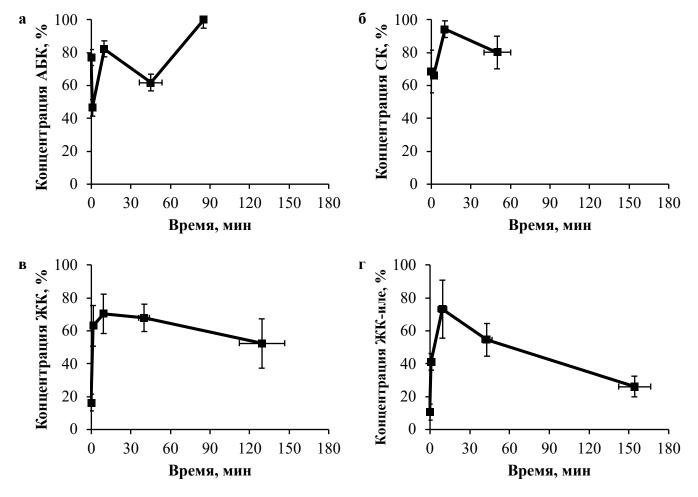


Рисунок 1. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г), индуцированная локальным раздражителем, в системных тканях растений; момент стимуляции соответствует точке 0 мин; концентрация приведена в процентах от максимального значения (100%) для каждого гормона; ссылки на публикации приведены в тексте

Наиболее при действии хорошо изученными гормонами локальных раздражителей являются жасмонаты. Их динамика исследована в широком временном диапазоне от десятков секунд до нескольких часов. Увеличение концентрации жасмонатов в системных тканях зарегистрировано уже через 0.7 - 5 мин в растениях арабидопсиса при локальном раздражении (Glauser et al., 2008; Koo et al., 2009; Chauvin et al., 2013; Devireddy et al., 2018; Zandalinas et al., 2020). При исследовании содержания жасмонатов в первые несколько десятков минут после стимуляции, максимум концентрации ЖК и ЖК-иле обычно находится во временном диапазоне от 10 до 30 мин (Suza, Staswick, 2008; Koo et al., 2009; Sato el al., 2009; Sato et al., 2011; Matsuura et al., 2012). После достижения максимума концентрации ЖК и ЖК-иле постепенно снижаются к исходному уровню до раздражения, в некоторых случаях их концентрация может оставаться относительно высокой длительное время свыше нескольких часов (Glauser et al., 2008; Sato el al., 2009). В целом, для ЖК-иле по ЖК характерно более ограниченное во времени повышение концентрации: быстрое достижение максимума и достаточно быстрое снижение к исходному уровню, при этом повышенная концентрация ЖК может сохраняться несколько дольше.

Концентрации жасмонатов в состоянии очень низкие и обычно составляют $\sim 0.01-10\,\mathrm{hr/r}$ сырой массы (Koo et al., 2009; Heyer et al., 2018; Zandalinas et al., 2020). Количественные изменения при стрессе могут зависеть от вида растения и природы локального раздражителя (Zandalinas et al., 2020), но в целом для жасмонатов характерны значительные изменения их содержания: локальная стимуляция вызывает от 10-кратного до 100-кратного увеличения концентрации жасмонатов в системных тканях (Hlaváčková et al., 2006; Wang et al., 2008; Koo et al., 2009; Sato et al., 2011; Hlavinka et al., 2012; Zandalinas et al., 2020).

Для динамики АБК в литературе представлены достаточно противоречивые сведения. Имеются данные, что максимальных значений концентрация АБК может достигать за достаточно короткие временные промежутки – через 10 – 15 мин после

стимуляции (Hlaváčková et al., 2006; Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018), в то же время содержание АБК может и не изменяться после действия локального ожога в растениях томата (Hlavinka et al., 2012) и ячменя (Paulman et al., 2018), и даже снижаться по сравнению с уровнем до раздражения спустя 1 ч после локального механического повреждения в растениях арабидопсиса (Heyer et al., 2018). Малый объём экспериментальных данных по исследованию системного содержания АБК после локального раздражения не позволяет сделать однозначного заключения о характерных временах изменений уровня АБК. Возможно, для полной картины динамики содержания АБК необходимо исследовать более длительные временные интервалы. Так, в растениях томата через 6 ч после локального раздражения концентрация АБК достоверно возрастала в нераздражённых тканях (Herde et al., 1999). Однако в данном исследовании это единственная временная точка, что также не позволяет достоверно судить о характере временных изменений.

Содержание АБК в состоянии покоя в различных видах растений находится в диапазоне от \sim 10 до \sim 80 нг/г сырой массы (Herde et al., 1999; Hlaváčková et al., 2006; Pan et al., 2008; Krausko et al., 2017; Heyer et al., 2018). Системно концентрация АБК увеличивается в \sim 1,2 - 3 раза при действии различных локальных раздражителей (Herde et al., 1999; Hlaváčková et al., 2006; Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018).

По динамике СК в системных тканях при локальном раздражении в литературе имеются очень ограниченные сведения. В целом динамика СК в различных объектах исследована на временном интервале до 60 мин. Максимум концентрации СК по некоторым данным соответствует временной точке 10 мин после раздражения (Devireddy et al., 2018; Zandalinas et al., 2020). По другим данным концентрация СК не изменяется на исследованном временном промежутке после нанесения стимула в удалённых листьях (Hlaváčková et al., 2006; Heyer et al., 2018). Таким образом, характер динамики СК при действии локальных раздражителей на данный момент остаётся открытым вопросом. Необходимы исследования системных изменений концентрации СК в различных временных точках на одном объекте, в особенности

регистрация долговременных изменений содержания СК при локальной стимуляции, которые на данный момент отсутствуют по имеющимся сведениям.

Концентрации СК в состоянии покоя в различных видах растений варьируют в достаточно широком диапазоне от \sim 10 до \sim 150 нг/г сырой массы (Hlaváčková et al., 2006; Pan et al., 2008; Krausko et al., 2017; Heyer et al., 2018; Zandalinas et al., 2020). Системно концентрация СК возрастает в \sim 2 – 3 раза при действии различных локальных раздражителей (Devireddy et al., 2018; Zandalinas et al., 2020).

1.2.2. Механизмы индукции изменений концентраций фитогормонов электрическими сигналами

В ряде работ (Коо et al., 2009; Mousavi et al., 2013; Farmer et al., 2020) высказывается предположение о том, что системное изменение содержания фитогормонов при действии локального раздражителя регулируется электрическими сигналами, которые распространяются от места раздражения в удалённые области растения. Такая регуляция может осуществляться через изменение концентраций ионов и АФК, которое сопровождает генерацию и распространение электрических сигналов, подробно описанное в разделе 1.1.1. Особое место принадлежит Ca²⁺ как активному посреднику в стрессовой сигнализации, известному своим участием в генерации электрических сигналов и распространении Ca²⁺ волн. Изменение концентрации Ca²⁺ при стрессе может оказывать влияние на изменение содержания фитогормонов путём регуляции их метаболических путей. Регуляция биосинтеза может происходить на нескольких уровнях, включая транскрипцию и трансляцию, а также каталитическую активность ферментов в биосинтетическом пути.

В литературе приводятся сведения, которые свидетельствуют о влиянии изменения концентрации Ca^{2+} на содержание стрессовых фитогормонов, а также возможные механизмы такого влияния. Прежде всего изменение концентрации Ca^{2+} внутри клетки зависит от работы Ca^{2+} каналов, активация которых является одним из ранних событий в генерации электрических сигналов и инициации Ca^{2+} волны. Ca^{2+}

канал CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL19 (CNGC19), локализованный в плазматической мембране клеток проводящих пучков, который быстро активируется и приводит к увеличению цитозольных уровней Ca²⁺ при локальном повреждении, играет роль в изменении концентрации жасмонатов. Потеря функции *CNGC19* приводит к снижению биосинтеза жасмонатов, как и к снижению роста концентрации Ca²⁺, индуцированных нападением травоядного насекомого. На концентрацию СК не повлияло ни локальное повреждение, ни потеря функции *CNGC19* (Meena et al., 2019). Сходные результаты о роли CNGC19 получены и при колонизации *Piriformospora indica*, корневого эндосимбионта, дополняя данные о том, что потеря функции *CNGC19* не повлияла не только уровни СК, но и на уровни АБК. Также отмечается, что в мутантных растениях *cngc19* были снижены как стимул-индуцированные уровни ЖК и ЖК-иле, так и их предшественника 12-оксо-фитодиеновой кислоты (ОФДК) (Jogawat et al., 2020).

Другие белки растений, которые предположительно способствуют транспорту Ca^{2+} , аннексины, в частности ANNEXIN1 (ANN1) в растениях арабидопсиса, также участвуют в увеличении концентрации цитозольного Ca^{2+} в системных листьях при локальном механическом повреждении. В мутантных растениях *ann1* наблюдается не только снижение роста уровня Ca^{2+} , но и подавление роста жасмонатов и их предшественника ОФДК (Malabarba et al., 2021).

Таким образом, увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} в результате работы разных Ca^{2+} -транспортирующих систем оказывает сходные эффекты на содержание гормонов при действии различных стимулов: не влияет на концентрацию СК, но индуцирует биосинтез жасмонатов. Учитывая тот факт, что вместе с увеличением концентраций ЖК и ЖК-иле происходило увеличение концентрации их предшественника ОФДК (Jogawat et al., 2020; Malabarba et al., 2021), можно сделать вывод, что Ca^{2+} влияет на начальные этапы биосинтеза жасмонатов. Это согласуется с предположением (Farmer et al., 2020) о том, что в быстром синтезе жасмонатов в системных листьях при локальном повреждении участвует Ca^{2+} -зависимый фермент,

который катализирует ранние этапы биосинтеза до ОФДК. Этим ферментом является 13-липоксигеназа (LOX), которая катализирует синтез предшественников ЖК. Одна из них, LOX6 способствует быстрому синтезу ЖК в нераздражённых листьях арабидопсиса при локальном механическом повреждении (Chauvin et al., 2013). Предполагается, что LOX6 имеет домен структуры β -бочонка, который может связывать Ca^{2+} (Farmer et al., 2020).

В начальных этапах биосинтеза жасмонатов также участвуют фосфолипазы, активность которых может зависеть от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Известно, что повышение продукции жасмонатов после механического повреждения может быть вызвано изменением активности PLD: приток Ca^{2+} индуцирует транслокацию PLD на мембрану, где она высвобождает полиненасыщенные жирные кислоты из мембранных фосфолипидов, необходимые для синтеза ЖК (Ryu, Wang, 1996; Wang et al., 2000).

Несмотря на то, что изменение концентраций АБК и СК не происходило при снижении стимул-индуцированного увеличения цитозольной концентрации Ca^{2+} в указанных работах (Meena et al., 2019; Jogawat et al., 2020), можно предположить механизмы, влияющие на регуляцию их метаболических путей, так как увеличение уровней АБК и СК имеет место при локальном раздражении, что подробно рассмотрено в разделе 1.2.1. В таких механизмах могут принимать участие различные Ca^{2+} -связывающие белки. Для СВL9 показано, что он способен модулировать биосинтез АБК при абиотическом стрессе. Нарушение функции гена CBL9 у растений $Arabidopsis\ thaliana$ приводит к увеличению накопления АБК в стрессовых условиях по сравнению с диким типом. Кроме того, экспрессия CBL9 индуцируется АБК, тем самым СВL9 представляет собой сигнальный узел, соединяющий передачу сигналов АБК и биосинтез АБК в условиях стресса (Pandey et al., 2004).

Описанные выше механизмы относились к быстрой регуляции за счёт изменения каталитической активности биосинтетических ферментов. Для фитогормонов также широко показана регуляция биосинтеза на уровне экспрессии

генов биосинтетических ферментов, что также может происходить при влиянии Ca²⁺. Известно, что увеличение концентраций СК и жасмонатов имеет место при локальном повреждении листьев табака листогрызущими насекомыми в результате активации биосинтеза гормонов с помощью СРРК при участии других протеинкиназ и факторов транскрипции, которые повышают уровни транскриптов генов, участвующих в биосинтезе СК и жасмонатов (Wu et al., 2007). Кроме транскрипционной регуляции биосинтеза СК, показана и посттранскрипционная регуляция при участии Ca²⁺ (Huang et al., 2020). Посредниками в Ca²⁺-зависимой регуляции биосинтеза СК являются различные CDPK, а также кальмодулин-связывающие белки (CBP), например, CBP60g (Romeis, Herde, 2014; Huang et al., 2020). У арабидопсиса избыточная экспрессия CDPK1 приводит к повышенной устойчивости к бактериальным и грибковым патогенам, что совпадает с конститутивно высокими уровнями СК и, соответственно, усиленной экспрессией генов ферментов биосинтеза СК (Romeis, Herde, 2014). У трансгенных линий арабидопсиса со сверхэкспрессией CDPK5 повышенная устойчивость к бактериальной инфекции зависит от высоких уровней СК, и растения демонстрируют конститутивную передачу сигналов СК (Romeis, Herde, 2014; Huang et al., 2020). Положительная регуляция биосинтеза СК с помощью Ca²⁺ может быть реализована через CBP60g, активность которого модулируется Ca^{2+}/CaM на посттранскрипционном уровне (Huang et al., 2020).

Для АБК предполагается регуляция экспрессии биосинтетических генов через Ca²⁺-зависимый каскад фосфорилирования, который активируется в ответ на абиотические стрессы, причём АБК сама может стимулировать экспрессию генов биосинтеза также через Ca²⁺-зависимый каскад фосфорилирования (Xiong, Zhu, 2003). В целом, петля положительной обратной связи и усиление биосинтеза предполагается для многих фитогормонов и связано с участием Ca²⁺ и АФК (Xia et al., 2015).

Влияние Ca^{2+} на изменение концентраций гормонов также может происходить через Ca^{2+} -индуцированные изменения pH в результате влияния Ca^{2+} на активность H^+ -ATФазы через CDPK (Ookura et al., 2005), в свою очередь изменение активности

Н⁺-АТФазы имеет место при генерации электрических сигналов (Sukhov et al., 2019), тем самым сдвиги рН могут являться потенциальным индуктором изменений содержания гормонов при распространении электрических сигналов.

В литературе приводятся данные о влиянии изменения активности Н⁺-АТФазы на содержание жасмонатов. Исследования проводились в нераздражённых листьях растений арабидопсиса при действии локального механического повреждения и показали, что у мутантных растений, дефицитных по гену Н⁺-АТФазы АНА1, происходит повышенное накопление жасмонатов после повреждения по сравнению с диким типом (Киmari et al., 2019). Кроме того, потеря функции гена *АНА1* в мутантных растениях арабидопсиса также влияла на рН в состоянии покоя, обуславливая меньшее закисление внеклеточной среды по сравнению с диким типом (Кumari et al., 2019), что подтверждает роль Н⁺-АТФазы АНА1 в регуляции рН. Следовательно, повышенная продукция жасмонатов у мутантных растений была, по-видимому, связана со сдвигами рН.

Потенциальной точкой влияния pH на биосинтез жасмонатов является изменение доступности предшественника ОФДК для пероксисомных ферментов, так как биосинтез жасмонатов в клетке разделён по компартментам: синтез ОФДК происходит в хлоропластах, а синтез ЖК из ОФДК продолжается в пероксисомах (Wasternack, Hause, 2013). ОФДК экспортируется через внутреннюю мембрану хлоропласта с помощью канального белка JASSY на внешнюю мембрану. Импорт в пероксисому происходит с помощью АТФ-зависимого транспортера СОМАТОЅЕ или, по крайней мере, частично с помощью пассивного механизма захвата ионов по принципу «анионной ловушки» из-за pH ~7,2 в цитозоле и ~8,2 в пероксисомах (Wasternack, Hause, 2019). Изменение pH цитозоля в результате изменения активности Н⁺-АТФазы при генерации электрического сигнала может влиять на транспорт ОФДК с помощью пассивного механизма, и как следствие приводить к изменению продукции ЖК и ЖК-иле.

Содержание АБК в растениях также потенциально может регулироваться с помощью рН. Известно, что стресс дегидратации приводил к увеличению рН апопласта и концентрации АБК, которые были полностью устранены после предварительной обработки фузикокцином, который активирует секрецию Н⁺ и тем самым способствует закислению апопласта (Hartung et al., 1988). Такое повышение концентрации АБК может быть реализовано путём гидролиза предшественников АБК в ответ на увеличение рН апопласта в стрессовых условиях (Netting, 2000; Duffield, Netting, 2001).

Потенциальной точкой влияния рН на изменение содержания АБК и СК может являться регуляция транспортных процессов конъюгатов АБК и СК, ферменты деконъюгации которых разделены по клеточным компартментам. Известно, что различные конъюгаты СК восстанавливаются в активную форму СК при стрессе, а внутриклеточный уровень СК и её неактивных форм находятся под контролем АТФсвязывающих кассетных (ABC) транспортеров и H⁺-антипортеров (Maruri-López et al., 2019). АБК может быть получена путём деконъюгации глюкозилового эфира абсцизовой кислоты (АБК-ГЭ), который представляет собой форму хранения или транспорта АБК, накапливается в вакуолях, апопласте, эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) (Finkelstein, 2013). Деконъюгация АБК-ГЭ ЭПР и вакуолярными βглюкозидазами позволяет быстро сформировать свободную АБК в ответ на абиотические стрессовые состояния, такие как дегидратация и солевой стресс. Деконьюгация АБК-ГЭ может иметь важное значение в быстрых стрессовых реакциях, поскольку свободная АБК генерируется в реакции одноэтапного гидролиза. Такая реакция происходит в вакуолях или ЭПР, следовательно, требуется импорт АБК-ГЭ в эти компартменты. В вакуоли такой импорт опосредован двумя различными системами мембранного транспорта: протонно-зависимый антипортовый механизм и ABC-транспортер (Burla et al., 2013). Действие ортованадата на импорт АБК-ГЭ с помощью AtABCC2 в вакуоль показало снижение поглощения АБК-ГЭ (Burla et al., 2013), что, предположительно, может повлиять и на снижение концентрации свободной АБК.

Регуляторная роль рН может быть реализована и на уровне экспрессии генов биосинтеза гормонов. Показано, что изменения внутриклеточного рН достаточно для модуляции экспрессии генов биосинтеза АБК и накопления самой АБК (Wang et al., 2014). Предварительная обработка растений химическими агентами, обеспечивающими изменение рН цитозоля, влияет на концентрацию АБК как в покое, так и при осмотическом стрессе. Также в работе отмечено, что биосинтез АБК скорее всего линейно не коррелирует с абсолютным значением рН в каких-либо компартментах, а в большей степени зависит от градиента рН между цитоплазмой и вакуолью (или другим компартментом) (Wang et al., 2014). Таким образом, на биосинтез АБК скорее влияет нарушенный внутриклеточный гомеостаз рН.

Как было сказано, в генерации электрических сигналов принимает участие H⁺- ATФаза, активность которой зависит от Ca²⁺. В свою очередь активность Ca²⁺ каналов может регулироваться АФК (Demidchik, 2018; Marcec et al., 2019). Следовательно можно предполагать и влияние АФК на изменение концентрации фитогормонов. Взаимодействие АФК и гормонов при различных стрессах показано в литературе (Xia et al., 2015), в том числе для АБК, СК и жасмонатов. Регуляция биосинтеза гормонов может быть опосредована CDPК и митоген-активируемыми протеинкиназами (MPK). Каскад фосфорилирования MPK активируется с помощью АФК, которые продуцирует НАДФН-оксидаза. Увеличение концентрации АФК также активирует Ca²⁺ каналы, а повышение концентрации Ca²⁺ приводит к активации CDPК. В свою очередь гормоны могут также инициировать продукцию АФК через НАДФН-оксидазу. Тем самым АФК, Ca²⁺ и гормоны образуют петлю положительной обратной связи, что приводит к усилению стрессового дистанционного сигнала, основанного на взаимной регуляции АФК, Са²⁺ и гормонов (Xia et al., 2015).

Свидетельством регуляции концентрации гормонов с помощью АФК могут являться экспериментальные данные по искусственной индукции повышения

жасмонатов при действии экзогенных АФК (Hu et al., 2003; Hu et al., 2009; Wang et al., 2019), а также изменённые уровни гормонов в мутантных растениях с потерей функции НАДФН-оксидазы. Так, повышение концентрации АБК, СК и ЖК в нераздражённом листе, которое имеет место при локальной стимуляции листьев арабидопсиса, было подавлено у растений мутантной линии с дефицитом НАДФН-оксидазы (Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018). Стимуляция продукции ЖК у растений Arabidopsis thaliana (Hu et al., 2009) и Panax ginseng (Hu et al., 2003) требовала повышения концентрации H2O2, зависимой от активности НАДФН-оксидазы и повышения концентрации Са²⁺, в растениях Aquilaria sinensis увеличение концентрации ЖК и СК в ответ на повреждение также требовало повышения концентрации H2O2 (Lv et al., 2019). Активность НАДФН-оксидазы была необходима для увеличения концентрации ЖК в растениях Solanum lycopersicum в ответ на атаку нематод, свою очередь продукция ЖК зависела от активности МРК1 и МРК2, которые активируются в ответ на распространение взаимозависимых электрических и АФКсигналов (Wang et al., 2019).

Таким образом, механизмы индукции изменений концентраций фитогормонов электрическими сигналами потенциально могут быть опосредованы изменением концентраций Ca^{2+} , H^+ и $A\Phi K$, которые имеют место при генерации электрических сигналов, однако, это предположение требует дальнейших экспериментальных подтверждений.

1.3. Роль электрических сигналов и фитогормонов в развитии системного ответа

Находящимся в условиях изменчивой окружающей среды растениям необходимы механизмы адаптации к действующим на них разнообразным стрессорам, как биотическим, так и абиотическим. Причем локальный стрессор, например локальное заражение патогеном или избыточное освещение отдельного листа, может перейти в системное, действующее на весь растительный организм.

Следовательно, растению необходимо сформировать адекватный системный ответ, затрагивающий различные процессы жизнедеятельности. Для формирования системного ответа необходимо распространение дистанционного стрессового сигнала, способного передать информацию о действии стимула, что в итоге приводит к системной приобретенной устойчивости растений к действующему стрессору (Gallé et al., 2015; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Sukhov et al., 2019).

Одним из ключевых аспектов адаптации является изменение профиля экспрессии генов. Широко известно, что жасмонаты участвуют в формировании защитного ответа, в особенности при нападении различных вредителей или патогенов (Nabity et al., 2013; Wasternack, Hause, 2013; Attaran et al., 2014), ЖК-индуцированная экспрессия генов также наблюдается и на абиотические стимулы, такие как сильный свет (Suzuki et al., 2013) или ожог (Herde et al., 1999). Тем не менее влияние жасмонатов на экспрессию генов не ограничивается генами, ассоциированными с защитными реакциями. Значительную часть составляют гены, отвечающие за фотосинтез и углеводный обмен (Chen et al., 2011), экспрессия которых подавляется в ответ на жасмонаты. Так, показано, что метилжасмонат подавляет экспрессию генов, отвечающих за синтез хлорофилла (Chen et al., 2011; Attaran et al., 2014; Sirhindi et al., 2020), функционирование РуБисКО (Chen et al., 2011; Attaran et al., 2014), формирование фотосистем с светособирающими комплексами (Attaran et al., 2014; Sirhindi et al., 2020) и электрон-транспортных систем (Nabity et al., 2013). В хищных растениях можно отметить участие жасмонатов в продукции пищеварительных ферментов при попадании добычи в ловчий лист (Krausko et al., 2017).

СК также участвует в регуляции экспрессии различных защитных генов, в частности, контролируя окислительно-восстановительный баланс (Blanco et al., 2009; Herrera-Vásquez et al., 2015), причём не только при атаках патогенов, но и, вероятно, при локальных тепловых и световых стимулах (Herrera-Vásquez et al., 2015; Zandalinas et al., 2020). При этом СК может действовать антагонистически по отношению к ЖК (Ndamukong et al., 2007).

Для АБК прежде всего характерна регуляция экспрессии генов, отвечающих за засухоустойчивость (Finkelstein, 2013). Тем не менее, было показано АБК-индуцированное повышение экспрессии генов НАДФН-оксидаз (Kwak et al., 2003), АБК-зависимая экспрессия гена аскорбатпероксидазы и других генов в ответ на сильный свет (Suzuki et al., 2013; Gorecka et al., 2014).

Что касается временных рамок развития ответа, то гормоны могут оперативно изменять системную экспрессию ряда генов, в частности, экспрессия ЖК-индуцированных JAZ-белков (jasmonate Zim-domain) может регистрироваться уже через 15 минут в нераздражённом листе (Koo et al., 2009). Однако, в большинстве случаев, влияние на экспрессию генов является долговременной реакцией, эффект от которой наблюдается в течение часов и нескольких суток (Attaran et al., 2014).

Данные, свидетельствующие о регуляции электрическими сигналами экспрессии генов, меньше представлены в литературе, и, вероятно, такая регуляция зависит от фитогормонов, которые свою очередь могут быть индуцированы электрическими реакциями. Так, системно распространяющиеся электрические сигналы вызывают продукцию гормонов, выступающие в качестве посредника экспрессии генов, как в случае с индуцированной ПД экспрессией гена ингибитора протеаз PIN2 (proteinase inhibitor 2), связанного с ЖК (Stankovic, Davies, 1996; Fisahn et al., 2004) или продукцией пищеварительных ферментов в насекомоядных растениях (Krausko et al., 2017). Тем не менее, для электрических сигналов показана как минимум быстрая системная экспрессия отдельных генов в ответ на индуцированный локальным ожогом ВП в течение 5 – 15 минут (Davies et al., 1997; Vian, Davies, 2006), так и влияние ПД на экспрессию рецепторов ЖК (Böhm et al., 2016), что может говорить о некоторых иных, независимых от гормонов механизмах регуляции электрическими сигналами экспрессии генов.

Другим важнейшим аспектом формирования приобретённой системной устойчивости является адаптация фотосинтеза к оптимальному режиму работы в изменившихся условиях, или временное его подавление. Данные по влиянию

гормонов на фотосинтез показывают подавление повышенным содержанием АБК и ЖК скорости ассимиляции СО₂ (Herde et al.,1997; Hlaváčková et al., 2006), причём кинетика роста концентрации ЖК была сходна с динамикой подавления ответа фотосинтеза (Hlaváčková et al., 2006). Последующие работы подтвердили влияние ЖК на скорость ассимиляции СО₂ (Nabity et al., 2013), однако в случае АБК влияние на фотосинтез хоть и было отмечено, но признано незначительным (Gorecka et al., 2014). Судя по всему, влияние гормонов на быстрый ответ фотосинтеза заключается в изменении доступности СО₂ из-за закрытия устьиц, что было показано путём повышения концентрации СО₂ в среде, нивелирующее влияние закрытия устьиц на световые параметры фотосинтеза, такие как квантовый выход фотосистемы ІІ и уровень нефотохимического тушения (Attaran et al., 2014).

Системный ответ фотосинтеза, индуцированный электрическими сигналами, возникающими в ответ на различные стимулы, изучен более подробно. Помимо снижения скорости ассимиляции CO₂ (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009; Fromm et al., 2013), индуцированные локальными стимулами электрические сигналы, прежде всего в форме ВП, также влияют на показатели светозависимой фотосинтеза, например, стадии снижая квантовый выхол фотосистемы II (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009; Fromm et al., 2013). Стоит отметить, что возникновение ответа фотосинтеза, во-первых, строго ассоциируется с распространением электрического сигнала (Lautner et al., 2005; Gallé et al., 2013), и во-вторых, является кратковременной реакцией, системно возникающей в течение десятков секунд после локального воздействия (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009). Механизм влияния электрических сигналов на изменение активности фотосинтеза может заключаться прежде всего в сдвигах концентраций pH в клетке (Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2014), вызывая инактивацию цикла Кальвина-Бенсона (Sukhov et al., 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017).

С фотосинтезом тесно связана регуляция работы устьиц, роль гормонов в которой хорошо изучена. АБК широко известен как индуктор закрытия устьиц (Реі et al., 2000; Kwak et al., 2003; Hlavinka et al., 2012; Gorecka et al., 2014; Savchenko et al., 2014; Devireddy et al., 2018; Prodhan et al., 2018), сходное действие проявляют и различные жасмонаты, такие как ЖК (Gehring et al., 1997; Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Geng et al., 2016; Förster et al., 2019), ЖК-иле (De Ollas et al., 2018), метилжасмонат (Gehring et al., 1997; Suhita et al., 2004; Yan et al., 2015) и в том числе их предшественник ОФДК (Savchenko et al., 2014; De Ollas et al., 2018). Причём, судя по имеющимся данным (Munemasa et al., 2007), механизмы действия ЖК и АБК частично пересекаются или требуют взаимодействия этих гормонов (Herde et al., 1997; Hossain et al., 2011; Munemasa et al., 2007). В ходе процесса закрытия устьиц и жасмонаты (Munemasa et al., 2007) и АБК (Kwak et al., 2003; Munemasa et al., 2007; Gorecka et al., 2014; Devireddy et al., 2018) активируют НАДФН-оксидазы (Kwak et al., 2003; Devireddy et al., 2018), продуцирующие АФК, причём их активации предшествует защелачивание цитозоля, вероятно, через активацию Н⁺-АТФазы (Gehring et al., 1997; Suhita et al., 2004; Yan et al., 2015; Zhou et al., 2015). АФК в свою очередь инициируют работу Ca²⁺ каналов замыкающих клеток (Pei et al., 2000; Munemasa et al., 2007), хотя для АБК предполагается и Ca²⁺-независимый механизм закрытия устьиц (Suhita et al., 2004). Приток Ca²⁺ приводит к активации анионных каналов S-типа (Munemasa et al., 2007), в случае АБК (Devireddy et al., 2018), и К⁺каналов в случае ЖК (Förster et al., 2019) и метилжасмоната (Suhita et al., 2004; Yan et al., 2015). В ряде работ предполагается NO, продуцируемый H₂O₂-активируемыми нитратредуктазами, в качестве ключевого активатора Ca²⁺-каналов, вызывающего АБК-зависимое закрытие устьиц (Bright et al., 2006; Munemasa et al., 2007). При этом стоит отметить, что, судя по всему, ОФДК имеет отдельный, независимый от АБК механизм регуляции закрытия устьиц (Savchenko et al., 2014).

СК также вызывает двухфазное закрытие устьиц (Khokon et al., 2011; Prodhan et al., 2018), отмеченное для ЖК и АБК (Peña-Cortés et al., 1995), однако в случае СК

механизм несколько отличается — основную роль играют SHAM-ингибируемые пероксидазы (Khokon et al., 2011), продуцирующие АФК в ответ на СК. Вероятно, в данном процессе также участвует АФК- (Khokon et al., 2011) или Ca^{2+} -зависимая продукция NO (Zottini et al., 2007). Однако, в отличие от жасмонатов и АБК, в СК-индуцированном закрытии устьиц Ca^{2+} -каналы напрямую не участвуют, а закрытие устьиц осуществляется через подавление связывания внеклеточного Ca^{2+} и подавление активности K^+ -каналов (Khokon et al., 2011).

Временные рамки гормон-индуцированного закрытия устьиц варьируют в различных работах, для достижения максимального уровня закрытия устьиц может пройти до двух часов (Förster et al., 2019), хотя реакция начинает формироваться уже в течении 1 минуты для АБК (Devireddy et al., 2018) и 10 мин для жасмонатов (Munemasa et al., 2007).

Электрические сигналы также вызывают закрытие устьиц, причём во многих случаях снижению транспирации предшествует небольшой её рост (Koziolek et al., 2004; Kaiser, Grams, 2006; Grams et al., 2009), что может быть связано с гидропассивным открыванием устьиц при распространении ВП (Kaiser, Grams, 2006).

Таким образом, системный ответ, действием вызванный локального раздражителя, включает изменение экспрессии генов, изменение активности фотосинтеза и интенсивности транспирации. Ключевая роль в индукции системного ответа принадлежит электрической и гормональной сигнальным системам. Повидимому, имеет место взаимодействие сигналов различной природы. Генерация и распространение электрических сигналов сопровождается изменением концентраций различных ионов и, возможно, распространением взаимосвязанных волн Ca^{2+} и $A\Phi K$, которые могут влиять на системное изменение концентраций фитогормонов. На данный момент, однако, неизвестно, каким образом реализуется взаимодействие сигналов различной природы при действии локальных стимулов. Необходимо изучать механизмы такого взаимодействия и роль различных сигнальных систем в развитии системного ответа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) культивировали гидропонным способом, растения пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) выращивали в горшках с песком в качестве грунта. Растения выращивали в климатической камере Binder KBW 720 (Binder GmbH, Германия) при температуре 24°C и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота). В экспериментах использовали растения гороха 17-19-дневного возраста с 5 полностью развитыми листьями, растения пшеницы 15-17-дневного возраста. Адаптацию растений к условиям измерения проводили в течение 1,5 ч.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Локальная стимуляция

Локальная стимуляция выполнялась с использованием локального ожога кончика листа открытым пламенем в течение 3 с, а также с использованием постепенного нагрева кончика листа в кювете с водой до 60°С в течение 7 минут (скорость нагрева около 5°С/мин). Площадь участка листа, подвергаемого локальной стимуляции составляла 1 см². Контроль температуры воды в кювете осуществлялся при помощи измерителя-регистратора температуры АТЕ-9380 (Актаком, Россия).

2.2.2. Регистрация электрической активности

2.2.2.1. Внеклеточная регистрация электрической активности

Регистрация поверхностных потенциалов выполнена с помощью многоканальной макроэлектродной установки, которая состояла из $Ag^+/AgCl$ электродов ЭВЛ-1М3 («Гомельский завод измерительных приборов», Белоруссия), заполненных 3М КСl, высокоомного усилителя ИПЛ-113 («Семико», Россия) и персонального компьютера. Контакт электродов с растением осуществлялся через хлопковые нити, смоченные стандартным раствором (КСl – 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.

2.2.2.2. Внутриклеточная регистрация электрической активности с помощью микроэлектродной техники

Электрические сигналы регистрировались внутриклеточно с использованием микроэлектродной техники измерения мембранного потенциала. Мембранный потенциал регистрировался с помощью электрофизиологической установки, состоящей из усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) и системы сбора данных с низким уровнем шума Axon Digidata 1550 (Molecular Devices, США), SliceScope 2000 моторизированного микроскопа Pro И моторизованных манипуляторов PatchStar (Scientifica, Великобритания) для введения микроэлектрода в клетку, который состоял из микропипетки с сопротивлением 12-15 МОм, заполненной 0,1 M раствором KCl и погружённой в него Ag⁺/AgCl-проволокой. Микропипетки с диаметром кончика около 1 мкм изготавливались из стеклянных заготовок-капилляров с помощью пуллера P-97 Micropipette Puller (Sutter Instrument, США). Внешний капилляров, диаметр используемых ДЛЯ изготовления микропипеток, -1.5 мм, внутренний диаметр -0.86 мм, материал - боросиликатное стекло (Sutter Instrument, США). Электрод сравнения помещался в стандартный раствор, омывающий исследуемый участок растения, и представлял собой хлорированную серебряную проволоку.

Электрофизиологическая установка размещалась на антивибрационном столе (ТМС, США), для защиты от внешних электромагнитных полей использовалась клетка Фарадея (ТМС, США).

Регистрация мембранного потенциала осуществлялась в клетках паренхимы проводящего пучка. Запись изменений мембранного потенциала проводилась с использованием программного обеспечения для системы сбора данных – Clampex 10.4 (Molecular Devices, США), для управления усилителем использовалась программа

MultiClamp 700B Commander (Molecular Devices, США), контроль позиционирования измерительного микроэлектрода осуществлялся с помощью программного обеспечения LinLab Software (Scientifica, Великобритания).

2.2.3. Определение содержания фитогормонов методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии

Анализ содержания фитогормонов осуществлялся в нераздражённых листьях гороха, расположенных ниже раздражаемого листа, и во фрагменте второго взрослого листа пшеницы размером 5 см, который располагался на удалении 5 см от нагреваемого кончика листа. Листья/фрагменты собирали через определённые временные интервалы после раздражения и немедленно замораживали в жидком азоте. Каждый образец взвешивали на аналитических весах, затем в замороженном виде растирали до порошкообразного состояния. Далее образцы гомогенизировали в экстрагирующем растворе (метанол:вода:муравьиная кислота 80:19:1) соотношении 1:20 для листьев гороха и в соотношении 1:15 для фрагментов листьев пшеницы. Экстрагирующий раствор содержал также внутренние стандарты исследуемых фитогормонов – дейтерированный аналог АБК 1 нг/мл [²H]₆ABA (Olchemim, Чехия) и 13 С-меченый аналог СК 20 нг/мл 13 С-SA (TRC, Канада). Экстракцию проводили в течение 18 ч для гороха и в течение 15 мин для пшеницы при температуре 4°C на ротаторе Multi Bio RS-24 (Biosan, Латвия). После центрифугирования при 20040 g и температуре 4°C в течение 25 мин на центрифуге Z 36 HK (Hermle Labortechnik, Германия) собирали надосадочную жидкость и остаток экстрагировали ещё раз в соотношении 1:5 в течение 1 ч для гороха и в течение 15 мин для пшеницы. Объединенные супернатанты концентрировали в два раза при 40° C на испарителе-концентраторе Smart Evaporator C1 (BioChromato, Япония). Пробы фильтровали через шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (фильтрнасадка Millex-LCR, Merck Millipore, США).

Полученные экстракты анализировали с использованием жидкостного хроматографа Prominence и масс-спектрометра LCMS-8040 (Shimadzu, Япония). Объем инъекции составлял 10 мкл. Разделение аналитов проводили с использованием колонки Shim-pack HR-ODS (2,21 × 150 мм, размер частиц 3 мкм) (Shimadzu, Япония) при скорости потока подвижной фазы 0,5 мл мин/мин и температуре термостата колонки 40°С. Элюенты А и В представляли собой 0,1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил, соответственно. Профиль градиента был следующим: 0 мин – 3% В; от 0 до 1,5 мин линейный градиент до 45% В; 2,5 мин – 45% В; от 2,5 до 4,5 мин линейный градиент до 60% В; от 4,5 до 7,5 линейный градиент до 80% В; 9 мин – 80% В; с 9,01 до 11 мин — уравновешивание до исходных условий 3% В.

Параметры масс-спектрометрического детектирования были следующими: отрицательная ионизация электроспреем (ESI), режим мониторинга множественных реакций (MRM), температура линии десольватации 280°C, температура блока нагревателя 400°C, поток газа-распылителя 3 л/мин, поток газа-осущителя 15 л/мин.

Количественный анализ содержания фитогормонов осуществлялся на основании калибровочных зависимостей по площадям пиков хроматограмм, полученных с использованием аналитических стандартов, с коррекцией по внутреннему стандарту. Аналитические стандарты фитогормонов: АБК, ЖК-иле и ОФДК (Olchemim, Чехия), СК и ЖК (Sigma-Aldrich, США).

2.2.4. Ингибиторный анализ

Для оценки влияния ингибиторов на параметры электрической реакции и на уровень фитогормонов использовались ингибитор H⁺-АТФазы плазматической мембраны (5 мМ Na₃VO₄) и блокатор Ca²⁺ каналов (5 мМ LaCl₃). Растворы ингибиторов были приготовлены на стандартном растворе. Для контрольной группы использовался стандартный раствор без ингибиторов. Растворы загружались в отсечённый лист пшеницы методом вакуумной инфильтрации. Для этого предварительно отрезали второй взрослый лист у растений пшеницы, адаптировали

его в стандартном растворе без ингибиторов в течение 14 ч, затем подвергали одному циклу вакуумной инфильтрации в течение 5 мин при давлении -70 кПа в вакуумном эксикаторе.

2.2.5. Флуоресцентный имиджинг

Флуоресцентный имиджинг для исследования динамики pH, концентраций Ca²⁺ и H_2O_2 в листе пшеницы проводился с помощью установки поверхностного **DVS-03** ТФИ) PAH, Россия) оптического имиджинга чувствительных флуоресцентных зондов BCECF, AM, fluo-4, AM (Molecular Probes, США), Ampliflu Red (Sigma-Aldrich, США), растворы которых загружались в отсечённый лист пшеницы с помощью вакуумной инфильтрации по схеме загрузки для метода ингибиторного анализа. Растворы зондов были приготовлены на стандартном растворе в концентрациях 10 мкМ BCECF, AM, 20 мкМ fluo-4, AM, 50 мкМ Ampliflu Red из исходных растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО) концентраций 1 мг/мл BCECF, AM, 1 MM fluo-4, AM, 10 MM Ampliflu Red.

Для возбуждения рН-чувствительного ратиометрического зонда ВСЕСF, АМ использовались светодиоды 465/10 нм и 490/20 нм, испускаемую флуоресценцию детектировали с помощью СМОS-камеры PRIME 95В (Photometrics, США) с фильтром 535/43 нм. Флуоресцентные изображения получали при экспозиции 2000 мс с частотой 1 кадр в 30 с. Для возбуждения Са²⁺-чувствительного зонда fluo-4, АМ использовался светодиод 490/20 нм, испускаемую флуоресценцию детектировали с фильтром 535/43 нм. Флуоресцентные изображения получали при экспозиции 2000 мс с частотой 1 кадр в 20 с. Для возбуждения Н₂О₂-чувствительного зонда Ampliflu Red использовался светодиод 530/20 нм, испускаемую флуоресценцию детектировали с фильтром 650/50 нм. Флуоресцентные изображения получали при экспозиции 2000 мс с частотой 1 кадр в 20 с. Записи производились при освещении актиничным светом 650/50 нм. Получаемые изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Для исследования динамики концентрации Ca^{2+} в стебле гороха был использован Ca^{2+} -чувствительный флуоресцентный ратиометрический зонд fura-2, АМ (Molecular Probes, США). Для загрузки fura-2, АМ в клетки растения 1 мМ раствор зонда в ДМСО разводили до концентрации 10 мкМ с использованием стандартного раствора. Участок стебля гороха между первым и вторым листом инкубировали в растворе зонда в течение 17 ч при температуре 4°C. Затем этот участок промывали стандартным раствором при комнатной температуре в течение 2 ч.

Регистрацию флуоресценции загруженного зонда fura-2, АМ осуществляли с Shimadzu RF-5301 спектрофлуориметра PC (Shimadzu, Япония), помощью оснащённого оптическим волокном ВОЛС-Рь и устройством для измерения слабых люминесцентных сигналов вне кюветного отделения «Лягушка» (ПКГ «Гранат», Россия). флуоресценции Зону регистрации затемняли помощью светонепропускающих стенок. Диаметр светового пятна возбуждающего света (380) нм и 340 нм) на участке стебля составлял приблизительно 1 мм. Флуоресценцию зонда регистрировали при 505 нм.

2.2.6. Измерение фотосинтетической активности

Активность фотосинтеза определяли путем 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). Регистрировали такие параметры как квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}) и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ), которые отражают интенсивность фотосинтетических процессов. Φ_{PSII} был рассчитан как

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F)/F_m',$$

где F и F_{m} — текущий и максимальный уровень флуоресценции хлорофилла фотосистемы II в условиях освещения.

NPQ рассчитывался по формуле

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

где F_m – максимальный уровень флуоресценции хлорофилла фотосистемы II (Maxwell, Johnson, 2000).

При регистрации на флуориметре Open FluorCam FC 800-O/1010 растение располагали в измерительной области установки, которая составляет 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 M^{-2} C^{-1} , 617 nm) для световой адаптации в течение 30 минут. Затем подавались насыщающие световые импульсы (4000 мкмоль M^{-2} C^{-1} , холодный белый свет 6500 K, 800 мс).

При регистрации на флуориметре IMAGING-PAM M-Series лист гороха закрепляли в измерительной головке прибора. Импульсы насыщающего света подавали раз в 10 с для получения изображения эффективного квантового выхода потока электронов фотосистемы II.

2.2.7. Оценка интенсивности транспирации

Для оценки пространственного распределения изменений транспирации регистрировали изменения температуры поверхности листьев (Belko et al., 2013; Guo et al., 2020), 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. Обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Testo «IRSoft». Об изменении транспирации судили по разнице температур соответствующих листьев стимулированно и контрольного растений.

2.2.8. Анатомическое исследование стебля гороха

Поперечные срезы узлов и междоузлий стебля гороха были приготовлены из сегментов диаметром 8 мм, залитых в парафин. Поперечные сечения сегментов

толщиной 25 мкм получали на роторном микротоме НМ 325 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные поперечные срезы окрашивали акридиновым оранжевым, выделяя лигнифицированные ткани (клеточные стенки клеток проводящих пучков). Акридиновый оранжевый имеет максимум возбуждения 490 нм и максимум излучения 535 нм. Микроскопические изображения получали с помощью флуоресцентной микроскопии при 10-кратном увеличении с использованием инвертированного микроскопа Olympus X71 и объектива CPlanFN L 10×/0,3 (Olympus, Япония).

2.2.9. 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, 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) с использованием программы GraphPad Prism (v. 6.01, GraphPad Software, Inc, США). Уровень статистической значимости был установлен при р<0,05. Коэффициент корреляции Пирсона был использован для корреляционного анализа.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Индуцированные локальным стимулом электрические сигналы, изменение содержания фитогормонов и активности фотосинтеза

Локальный повреждающий стимул вызывает генерацию электрического сигнала в нераздражённых тканях растений пшеницы (рис. 2) и гороха (рис. 3). Электрический сигнал представляет ВП — переходное изменение мембранного потенциала с относительно быстрой фазой деполяризации и длительной фазой реполяризации вариабельной формы и общей продолжительностью формирования реакции несколько десятков минут, что соответствует характеристикам ВП по данным литературы (Vodeneev et al., 2015; Huber, Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021). Регистрация ВП в растениях пшеницы и гороха осуществлена как с помощью микроэлектродной техники измерения мембранного потенциала (рис. 26, 3в), так и методом внеклеточной регистрации потенциалов (рис. 2а, 3а, 3б). Внутриклеточные измерения с помощью микроэлектродов и внеклеточные измерения демонстрируют сходство зарегистрированных электрических реакций, что позволяет использовать метод внеклеточной регистрации потенциалов для исследований электрических сигналов растений, в частности ВП.

Амплитуда ВП в листе пшеницы на расстоянии 7,5 см от места локального раздражения составляла 62 ± 6 мВ. При раздражении первого зрелого листа гороха (Π_c) амплитуда ВП в соседнем листе (Π_1) на расстоянии 10 см составляла 57 ± 4 мВ, на участке стебля между раздражаемым (Π_c) и последующим листом (Π_1) на расстоянии 3 см -83 ± 2 мВ. Характерное время возникновения ВП (начало развития деполяризации) составляет $\sim 15 - 30$ с после стимуляции. Также имеет место развитие второй волны деполяризации спустя $\sim 60 - 100$ мин после раздражения, с меньшей амплитудой и большей длительностью по сравнению с первой волной деполяризации (рис. 26). В целом параметры ВП, зарегистрированные у растений пшеницы и гороха, сопоставимы с данными исследований ВП для различных видов высших растений (Stahlberg, Cosgrove, 1997; Stanković et al., 1998; Sukhov et al., 2014).

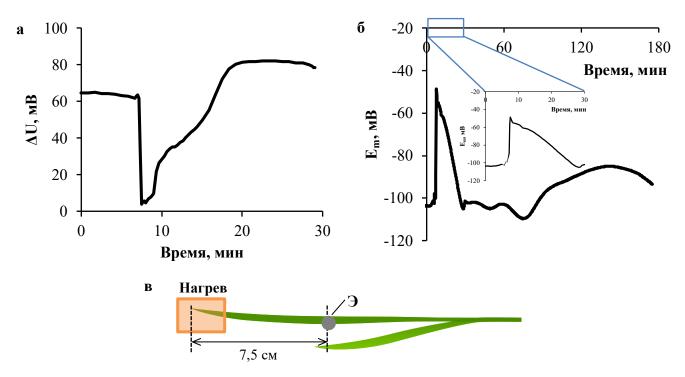


Рисунок 2. Вариабельный потенциал (ВП), индуцированный локальным нагревом кончика листа пшеницы: а — типичная запись поверхностного электрического потенциала, б — типичная запись изменения мембранного потенциала клетки околопучковой паренхимы листа; момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; в — схема регистрации ВП в растениях пшеницы (Э — измерительный внеклеточный макроэлектрод / внутриклеточный микроэлектрод)

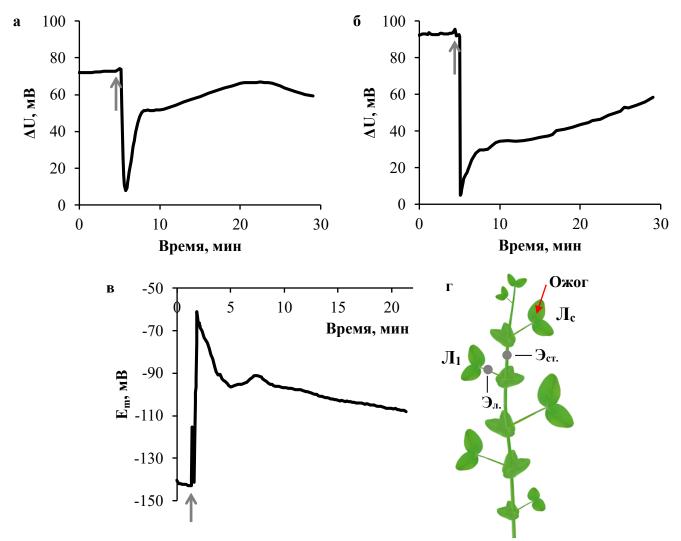


Рисунок 3. Вариабельный потенциал (ВП), индуцированный локальным ожогом кончика листа гороха: типичные записи поверхностного электрического потенциала в черешке листа (\mathcal{G}_{π} .) (а) и стебле ($\mathcal{G}_{\text{ст.}}$) (б), в – типичная запись изменения мембранного потенциала клетки околопучковой паренхимы стебля ($\mathcal{G}_{\text{ст.}}$); момент нанесения ожога обозначен стрелкой; г – схема регистрации ВП в растениях гороха (\mathcal{G}_{π} и $\mathcal{G}_{\text{ст.}}$ измерительные внеклеточные макроэлектроды / внутриклеточный микроэлектрод)

Локальные раздражители помимо распространения ВП вызывают изменение активности фотосинтеза, что хорошо известно по данным литературы (Peña-Cortés et al., 1995; Hlaváčková et al., 2006; Grams et al., 2009; Fromm et al., 2013; Sukhov et al., 2014; Białasek et al., 2017; Krausko et al., 2017). Изменение фотосинтетической активности в нераздражённых тканях происходит под действием таких локальных стимулов как ожог (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Sukhov et al., 2014); механическое повреждение (Fromm et al., 2013; Krausko et al., 2017), действие

(Peña-Cortés et al., 1995; Bulychev al., 2004). электрического тока et Фотосинтетический ответ может иметь различную динамику, включающую быструю (от нескольких минут до нескольких десятков минут после стимуляции) и длительную (от десятков минут до нескольких часов после стимуляции) фазы (Hlaváčková et al., 2006; Sukhov et al., 2019). Характеристики фотосинтетического ответа различаются у разных видов растений, проявляют зависимость от возраста и типа раздражителя (Fromm et al., 2013; Gallé et al., 2015; Vodeneev et al., 2016). У растений табака (Hlaváčková et al., 2006) и тыквы (Sherstneva et al., 2015) фотосинтетический ответ представлен только длительной инактивацией, тогда как у других растений (например, у пшеницы, гороха, томата, росянки) реакция включает как быструю, так и длительную инактивацию (Sukhov et al., 2019).

Проведённое нами исследование влияния локальных стимулов на фотосинтетические процессы в нераздражённых частях растений пшеницы и гороха показало развитие временной инактивации фотосинтеза после действия раздражителя (рис. 4). Снижение активности фотосинтеза проявляется в понижении уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}) и росте уровня нефотохимического тушения (NPQ). Динамика фотосинтетического ответа включала быструю и длительную фазы. Первая быстрая волна снижения активности фотосинтеза начинается через несколько минут после индукции ВП локальным стимулом и длится около 10 мин у пшеницы и 10 - 20 мин у гороха, вторая более продолжительная волна начинает развиваться по окончании первой и длится около 30 мин у пшеницы и около часа у гороха.

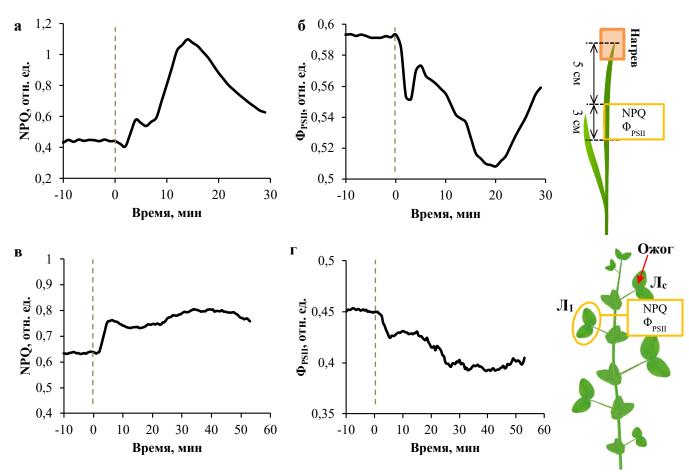


Рисунок 4. Изменения активности фотосинтеза, индуцированные локальным раздражением: типичные записи изменений нефотохимического тушения (NPQ) (а,в) и уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы Π (Φ_{PSII}) (б,г) в нераздражённой части листа пшеницы при локальном нагреве (а,б) и в нераздражённом листе гороха при локальном ожоге (в,г); момент генерации ВП обозначен пунктирной линией; в правой части рисунка 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, по-видимому, различны. На сегодняшний день хорошо изучен механизм развития первой быстрой фазы фотосинтетического ответа (Sukhov, 2016). Быстрая переходная инактивация фотосинтеза обусловлена сдвигами рН – временным закислением цитоплазмы и защелачиванием апопласта, происходящими из-за временного угнетения активности Н⁺-АТФазы при генерации ВП (Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2014). Такие изменения рН приводят к снижению транспорта CO₂ в клетки, уменьшению

активности ферментов цикла Кальвина и росту тепловых потерь энергии поглощенного света, что приводит к инактивации фотосинтеза (Sukhov et al., 2019).

Длительная фаза фотосинтетического ответа, по-видимому, имеет иной механизм индукции. В частности, предполагается участие стрессовых фитогормонов, таких как АБК и ЖК (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). Так, в растениях табака локальный ожог вызывает быстрый рост концентрации АБК и более поздний рост концентрации ЖК в нераздражённом листе, что указывает на возможную роль АБК в закрытии устьиц и снижении скорости ассимиляции СО2 на начальном этапе, тогда как ЖК индуцирует более позднюю фазу ответа (Hlaváčková et al., 2006). В растениях томата изменение содержания АБК в нераздражённых листьях не зарегистрировано, в то время как системное содержание ЖК значительно увеличено. При этом, однако, имел значение начальный уровень АБК, определяющий характер изменения газообмена (Hlavinka et al., 2012). В ловушке насекомоядного растения росянки Drosera capensis локальное повреждение вызывает повышение концентрации жасмонатов и АБК наряду со снижением активности фотосинтеза (Krausko et al., 2017). При этом предположена роль жасмонатов в индукции ответов фотосинтеза, поскольку наиболее значительное угнетение фотосинтеза наблюдалось во время достижения максимальных концентраций жасмонатов, и, напротив, фотосинтетическая активность восстанавливалась по мере снижения содержания жасмонатов. В целом малый объём имеющихся экспериментальных данных и их вариабельность позволяют однозначного не сделать заключения роли определённого гормона в индукции определённой фазы фотосинтетического ответа. Поэтому следующим этапом данной работы стало исследование концентрационной динамики фитогормонов после действия локального стимула.

Локальный стимул вызывает не только генерацию ВП, но и изменение содержания фитогормонов в нераздражённых тканях растений пшеницы и гороха. Были исследованы такие стрессовые фитогормоны как АБК, СК и жасмонаты (ЖК и ЖК-иле). Локальный нагрев кончика листа пшеницы вызывает изменение содержания фитогормонов в нераздражённой части листа на расстоянии от действия локального стимула (рис. 5). Динамика концентрации АБК может быть охарактеризована как однофазная кривая с максимумом при 60 мин после стимуляции (рис. 5а). Содержание АБК через 120 мин после воздействия стимула также достоверно превышает содержание АБК в покое (точка 0 мин). Через 180 мин после раздражения концентрация АБК снижается до контрольных значений. В листьях пшеницы при действии локального нагрева также было исследовано содержание СК в удалённом фрагменте (рис. 56). Динамика СК характеризуется двухфазной кривой с первым максимумом при 40 мин и вторым максимумом при 120 мин. Концентрация СК начинает расти с 20 мин после действия стимула и возвращается к контрольным значениям через 60 мин и 180 мин. Наиболее выраженные изменения среди фитогормонов при действии локального нагрева выявлены для жасмонатов. Увеличение концентрации ЖК начинается уже через 5 мин после стимуляции и достигает максимума при 10 мин, а затем постепенно снижается до контрольного уровня (рис. 5в). Заметный рост концентрации ЖК-иле также начинается через 5 мин, достигает максимума через 20 мин после действия стимула, постепенно возвращается к контрольным значениям (рис. 5г). В целом динамику жасмонатов можно описать как однофазную кривую с быстрым ростом.

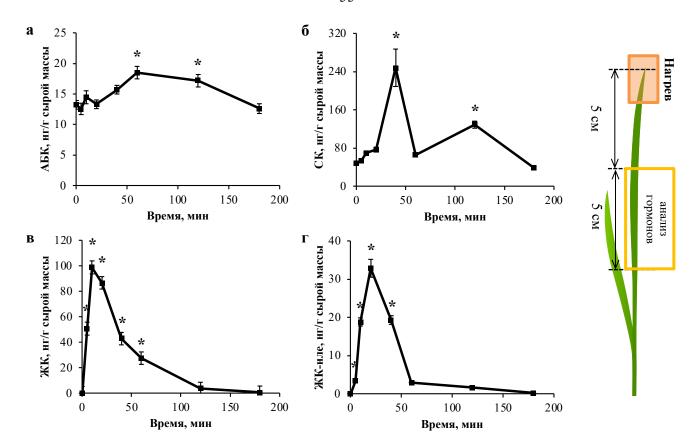


Рисунок 5. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части листа пшеницы; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; в правой части рисунка приведена схема определения содержания фитогормонов в растениях пшеницы

* – статистически значимые различия от контрольного значения (0 мин), p < 0.05

Действие локального раздражителя на изменение содержания фитогормонов также исследовали в растениях гороха. Концентрации АБК и ЖК определяли в нераздражённом листе через определённые промежутки времени после нанесения ожога на вышерасположенный соседний лист (рис. 6). На исследованном 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 (рис. 6а). Концентрация ЖК быстро возрастает после действия ожога, начиная с 5 мин после стимуляции (рис. 6б). Содержание ЖК достигает максимума через 15 мин после раздражения и затем постепенно снижается к исходному уровню на протяжении исследуемого временного интервала.

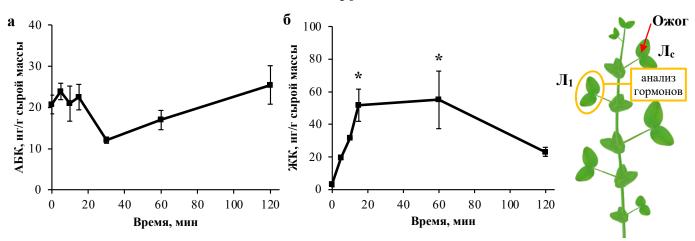


Рисунок 6. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а) и жасмоновой кислоты (ЖК) (б), индуцированная локальным ожогом, в нераздражённом листе (Π_1) гороха; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; в правой части рисунка приведена схема определения содержания фитогормонов в растениях гороха

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

Динамика содержания гормонов при действии локального стимула имеет общие черты в различных растениях. Динамику жасмонатов описывает однофазная кривая с быстрым ростом, выраженным максимумом и постепенным спадом. Характерные времена начала роста концентрации жасмонатов лежат в пределах первых 5 – 15 мин после раздражения. Достижение максимальной концентрации происходит через 10 – 20 мин, а затем начинается постепенный спад и возвращение к исходным значениям. Исходный уровень жасмонатов в исследуемых растениях в состоянии покоя достаточно низкий, но быстро и многократно увеличивается при локальном повреждающем воздействии. Для АБК характерно отсутствие изменений на коротких временных промежутках до 60 мин, значимое увеличение 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.

Влияние тепловых локальных стимулов на изменение содержания фитогормонов в нестимулированных тканях было описано в литературе ранее. При нагреве листьев арабидопсиса в воде 40°C было зарегистрировано кратковременное повышение концентрации АБК в удалённом листе через 10 мин после действия стимула (Suzuki et al., 2013), нагрев листа арабидопсиса до 33°C показал увеличение

концентрации СК в удалённом листе в течение 8 мин после действия нагрева, изменения по ЖК на данном временном промежутке отсутствовали (Zandalinas et al., 2020). Ожог листа табака показывает динамику фитогормонов отличную от зарегистрированной в нашей работе: в нераздражённом соседнем листе содержание АБК возрастает быстро с максимумом при 15 мин, а к 60 мин после действия ожога возвращается к исходным значениям, ЖК, напротив, начинает расти только на длительных временных промежутках с максимумом при 60 мин, СК при этом не изменяется (Hlaváčková et al., 2006). Исследования содержания фитогормонов в отдельных временных точках после действия ожога показывают отсутствие изменений по АБК в нераздражённом листе томата через 85 мин (Hlavinka et al., 2012) и в нераздражённой части листа ячменя через 30 мин (Paulman et al., 2018), однако при этом жасмонаты всегда значительно возрастают, СК изменяется незначительно (Paulman et al., 2018). Рассматривая временную динамику гормонов, можно отметить, что динамика АБК и ЖК на локальный тепловой стимул имеет однофазный характер (Hlaváčková et al., 2006; Suzuki et al., 2013), характерные времена пиковых значений концентрации фитогормонов для АБК могут находиться во временном диапазоне от 10 до 15 мин, для ЖК – от 30 до 85 мин. Различия в динамике фитогормонов при действии локального стимула могут быть обусловлены разной интенсивностью применяемого теплового стимула, различными режимами его нанесения, а также видовыми особенностями растений.

При рассмотрении других локальных повреждающих раздражителей, не ограничиваясь только тепловыми воздействиями, можно отметить, что динамика концентрации жасмонатов в нераздражаемых частях растений часто имеет характер компактного пика с быстром ростом уровня жасмонатов в первые несколько десятков минут после стимуляции (Suza, Staswick, 2008; Koo et al., 2009; Sato et al., 2009; Sato et al., 2011; Matsuura et al., 2012), как и приведённая в нашей работе. Данный факт, вероятно, свидетельствует об универсальности первичной стрессовой реакции растений с участием фитогормонов, главную роль из которых играют жасмонаты.

Биоактивной формой гормона среди жасмонатов является ЖК-иле, который связывается с рецептором и запускает экспрессию жасмонат-зависимых генов (Fonseca et al., 2009; Acosta, Farmer, 2010; Wasternack, Hause, 2013). Исследование динамики ЖК-иле в листе пшенице в ответ на локальную стимуляцию показывает более компактный, ограниченный во времени пик по сравнению с его предшественником ЖК, для динамики которой характерно более растянутое по времени концентрационное увеличение (рис. 5). Данные закономерности динамики ЖК и ЖК-иле также обнаружены в нераздражённых листьях растений арабидопсиса в ответ на локальную стимуляцию (Коо et al., 2009).

Как было сказано выше, среди исследуемых нами фитогормонов, наиболее выраженные изменения имели место для жасмонатов, их уровень увеличивался в ~100 раз, что вполне соответствует данным литературы, где локальная стимуляция вызывала от 10-кратного до 100-кратного увеличения концентрации жасмонатов (Hlaváčková et al., 2006; Wang et al., 2008; Koo et al., 2009; Sato et al., 2011; Zandalinas et al., 2020). При этом в покое для жасмонатов характерны очень низкие концентрации, обычно не превышающие нескольких нг/г сырой массы (Коо et al., 2009; Heyer et al., 2018; Zandalinas et al., 2020).

Для АБК и СК изменения содержания после действия локального раздражителя имеют менее интенсивный характер по сравнению с жасмонатами. Как в нашей работе, так и в других исследованиях (Herde et al., 1999; Hlaváčková et al., 2006; Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018), концентрация АБК увеличивается всего в ~1,2 – 3 раза. В покое концентрации АБК составляют от нескольких нг/г до нескольких десятков нг/г сырой массы (Hlaváčková et al., 2006; Vadassery et al., 2012; Heyer et al., 2018), и соответствуют определённым в нашей работе. Локальный нагрев приводит к увеличению содержания СК в ~4 раза в нераздражённых тканях пшеницы по нашим исследованиям и в ~3 раза в растениях арабидопсиса (Zandalinas et al., 2020). Другие локальные стимулы могут как не оказывать влияния на содержание СК (Hlaváčková et al., 2006; Heyer et al., 2018; Paulman et al., 2018), так и приводить к её увеличению в

несколько раз (Devireddy et al., 2018). Концентрации СК в покое могут варьироваться от нескольких нг/г до сотен нг/г сырой массы для различных растений (Hlaváčková et al., 2006; Vadassery et al., 2012; Heyer et al., 2018), контрольные значения концентраций СК в листьях пшеницы, определённые в нашей работе, соответствуют приведённым в литературе.

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 в нераздражённой зоне, 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. Именно пространственная динамика, то есть определение параметров сигналов и ответов на различном расстоянии от зоны действия локального стимула, даёт больше информации для анализа связи между исследуемыми процессами на основе пространственных закономерностей.

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

Изменение содержания фитогормонов в нераздражённой части растения при действии локального стимула, вероятно, индуцируется распространением дистанционного стрессового сигнала, в роли которого выступает ВП. Механизмы изменения активности фотосинтеза в интактных частях растения в ответ на локальный раздражитель на данный момент являются дискуссионным вопросом: только электрический сигнал или сигналы другой природы принимают участие в индукции фотосинтетического ответа (Sukhov et al., 2019).

Для изучения связи электрических сигналов, изменения содержания фитогормонов и активности фотосинтеза при действии локального стимула нами была исследована пространственно-временная динамика данных процессов в растениях гороха. Измерения проводились в нескольких листьях гороха, находящихся на различном расстоянии от раздражаемого.

Исследование электрической активности показало, что ожог кончика листа гороха вызывает распространение ВП в соседние листья (рис. 7а). Электрическая реакция регистрировалась в основании листа (на участке черешка, примыкающего к листу), в первом, втором и третьем листьях, расположенных ниже раздражаемого (рис. 7б). Имеют место различия в параметрах ВП, зарегистрированных в разных

листьях. 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. 7в). 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. 7г). Временной интервал между раздражением и возникновением ВП в первом, втором и третьем листьях составляет — 47, 13 и 64 секунд соответственно.

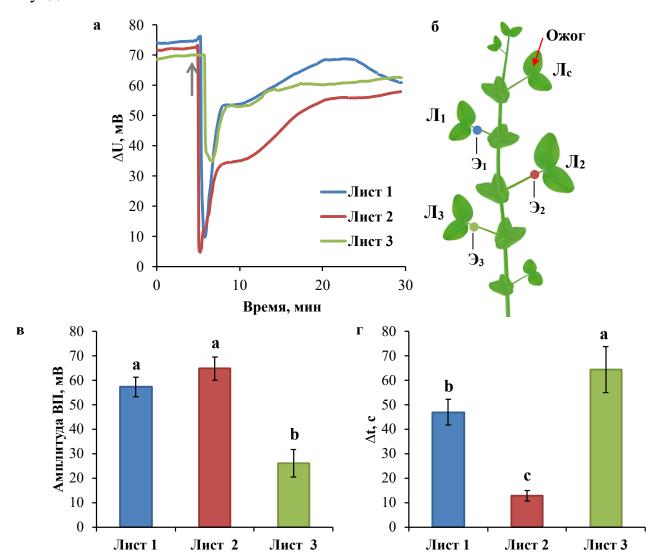


Рисунок 7. Вариабельный потенциал (ВП), индуцированный локальным ожогом кончика листа гороха: а – типичная запись электрической реакции; момент нанесения ожога обозначен стрелкой; б – схема регистрации ВП в растениях гороха (Э₁, Э₂, Э₃ – измерительные макроэлектроды, размещённые на черешках первого, второго и третьего листьев, соответственно); в – амплитуда ВП в первом, втором и третьем листьях, расположенных ниже раздражаемого листа; г – временной интервал между раздражением и возникновением ВП в первом, втором и третьем листьях Разные буквы обозначают статистически значимые различия между листьями, р<0,05

В ответ действие локального стимула была исследована пространственновременная динамика содержания АБК и ЖК в растениях гороха. Локальный ожог листа гороха вызывает временное повышение концентрации АБК и ЖК в нераздраженных листьях (рис. 8). Имеют место незначительные колебания концентрации АБК. Лишь через 120 минут после ожога происходит статистически значимое повышение уровня АБК во втором листе. В первом и третьем листьях концентрация АБК остаётся относительно постоянной с небольшими колебаниями. динамику содержания ЖК, можно наблюдать быстрый Рассматривая концентрации уже через 5 мин после ожога. Максимума концентрация ЖК достигает через 15 мин после ожога, после чего начинается постепенный спад на всём исследованном временном промежутке. Наибольшие изменения концентрации наблюдаются во втором листе, меньшая амплитуда изменений концентрации ЖК характерна для первого листа, в третьем листе не происходит значительных изменений концентрации ЖК. Начало роста концентрации ЖК у второго листа несколько опережает рост концентрации ЖК первого листа.

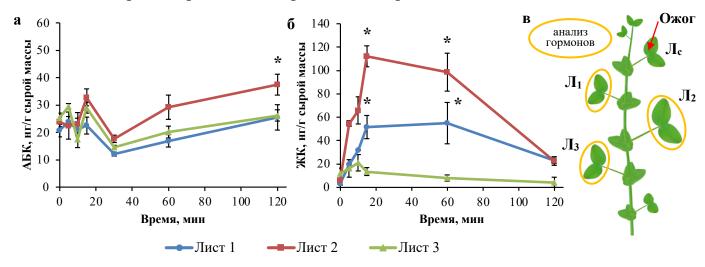


Рисунок 8. Пространственно-временная динамика содержания абсцизовой кислоты (АБК) (а) и жасмоновой кислоты (ЖК) (б), индуцированная локальным ожогом, в нераздражённых листьях гороха; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; в — схема определения содержания фитогормонов в растениях гороха

Исследование пространственной динамики АБК и ЖК при действии локального стимула в работах (Hlavinka et al., 2012; Heyer et al., 2018) также показало наличие

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

различий в сдвигах концентраций фитогормонов между разноудалёнными листьями, однако данные исследования выполнены только в одной временной точке, что не позволяет достоверно судить о скоростях изменений концентраций в различных листьях и наличии различий во временных динамиках гормонов на различном расстоянии от места действия локального стимула.

Локальный ожог листа гороха вызывает временное снижение активности фотосинтеза в нераздражённых листьях наряду с изменением концентрации гормонов, которое проявляется в понижении уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (ФРЗІІ) и росте уровня нефотохимического тушения (NPQ) (рис. 9). Снижение активности фотосинтеза развивается в две фазы. Амплитуды первой фазы NPQ и ФРЗІІ 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. 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.

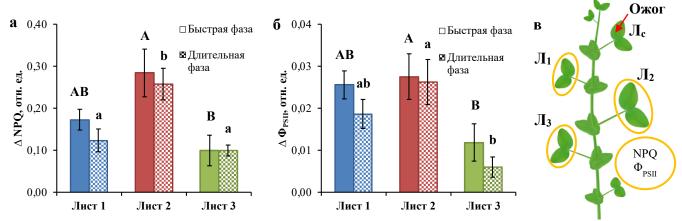


Рисунок 9. Индуцированные локальным ожогом изменения активности фотосинтеза в первом, втором и третьем ниже стимулированного листьях гороха: а — амплитуды изменений нефотохимического тушения (NPQ); б — амплитуды изменений уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}); в — схема измерения фотосинтетических параметров в растениях гороха. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между амплитудами изменений длительной фазы, р<0,05

В качестве механизма изменения активности фотосинтеза проводилось исследование изменений устьичной проводимости, которая определяет доступность углекислого газа. Устьичную проводимость можно оценить по интенсивности Вызванные транспирации. локальным могожо изменения транспирации нераздражённых листьев оценивали по изменению температуры листьев с помощью тепловизора, что позволило определить пространственно-временную динамику изучаемого показателя во всех исследуемых листьях одновременно. Локальный ожог вызывает временное повышение температуры нераздражённых листьев, свидетельствует о снижении интенсивности транспирации (рис. 10). температуры листьев начинается примерно через 20 минут после раздражения, достигая максимума на 50-70 минутах, возвращаясь до близких к исходным значениям спустя примерно два часа. Повышение температуры несколько больше для второго листа в сравнении с первым. Менее выражены изменения температуры в третьем листе. Учитывая тесную связь изменений температуры с процессом транспирации листьев растений (Belko et al., 2013; Guo et al., 2020), можно предполагать, что выявленные ответы отражают связанное с распространением электрических сигналов закрытие устьиц, которое было показано в ряде работ (Surova et al., 2016; Yudina et al., 2019).

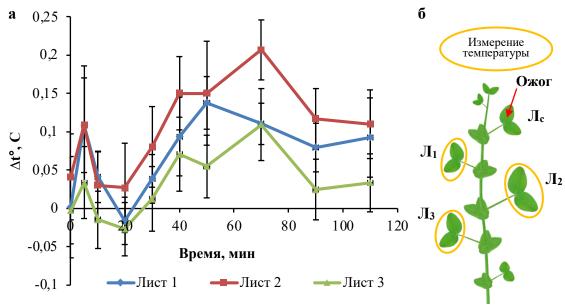


Рисунок 10. Динамика температуры листьев гороха, индуцированная локальным ожогом (a); момент стимуляции соответствует точке 0 мин; Δt — разница температуры между соответствующими листьями раздражённого и нераздражённого растений; б — схема измерения температуры листьев гороха при действии локального ожога

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 зарегистрированных ответов фотосинтеза, имеющих двухфазную динамику. Первая быстрая фаза снижения активности фотосинтеза, как это было показано в ряде работ, вызвана закислением цитоплазмы и защелачиванием апопласта, которые происходят вследствие генерации ВП (Grams et al. 2009; Sukhov et al., 2014). 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. 8, 9), а также тот факт, что рост уровня ЖК предшествует второй волне инактивации фотосинтеза. Это подтверждается высокими И значениями коэффициентов детерминации между амплитудой изменений ЖК и амплитудой изменений параметров фотосинтеза (для $\Phi_{PSII} - 0.98$, для NPQ - 0.83). В свою очередь ЖК изменения концентрации ΜΟΓΥΤ быть вызваны предшествующим $B\Pi$, распространением ДЛЯ которых также показана согласованность пространственной динамики и пропорциональности изменений (рис. 7, 8), значение коэффициента детерминации между амплитудой ВП и амплитудой изменений ЖК составляет 0,86.

В литературе также имеются сведения о согласованных пространственных изменениях электрической активности и активности передачи сигналов с участием жасмоната (Mousavi et al., 2013). Однако, в работе Mousavi et al. (2013) приводятся только исследования уровня транскриптов JASMONATE-ZIM DOMAIN 10 (JAZ10), маркера активности жасмонатного пути, в различных неповреждённых листьях при действии локального стимула, и нет данных об изменениях концентрации жасмонатов. Исследование пространственно-временной динамики содержания других гормонов в нескольких нераздражённых листьях, кроме жасмонатов, выполнено только в отдельных работах (Hlavinka et al., 2012; Heyer et al., 2018), и не всегда сопровождается регистрацией электрических реакций (Heyer et al., 2018).

Сопоставление собственных данных по согласованности пространственных изменений концентрации гормонов и фотосинтетической активности с данными литературы выполнить затруднительно, так как имеются сведения о регистрации динамики ответа фотосинтеза и содержания гормонов лишь в соседнем с раздражённым листе, сведения о реакциях в более удалённых листьях отсутствуют (Hlavinka et al., 2012).

Предполагаемая роль ЖК в индукции длительной инактивации фотосинтеза может быть реализована через ЖК-индуцированное угнетение транспирации, которое также имело место в нераздражённых листьях (рис. 10). Известно, что повышение концентрации ЖК в замыкающих клетках устьиц приводит к уменьшению размера устьичной щели через 5 – 15 мин (Gehring et al., 1997; Geng et al., 2016). ЖК может снижать интенсивность транспирации как независимо, так и при взаимодействии с АБК (de Ollas et al., 2015; Geng et al., 2016). Также необходимо подчеркнуть, что для проростков гороха ранее была показана высокая корреляция между активностью фотосинтеза и транспирации именно для длительной фазы ответа фотосинтеза (Yudina et al., 2019). Таким образом, полученные результаты и данные литературы позволяют предположить, что вторая длительная волна фотосинтетического ответа у гороха развивается вследствие ЖК-индуцированного понижения транспирации.

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 области узла и междоузлия. На основе полученных с флуоресцентного микроскопа изображений окрашенных срезов была построена трёхмерная схема проводящих пучков в стебле гороха (рис. 11, 12). Стебель гороха в поперечном разрезе имеет четырёхгранную форму. В области междоузлий в центре стебля расположен сосудистый цилиндр, состоящий из несомкнутых проводящих пучков (на схеме обозначены серым цветом). В двух противоположных друг другу углах находятся проводящие пучки, напрямую связанные с выше- или нижележащими листьями. При этом за счёт очерёдного расположения листьев у гороха угловые пучки с одной стороны стебля имеют непосредственный контакт только с листьями, имеющими чётный порядковый номер (на схеме обозначены синим цветом), а пучки с противоположной стороны связаны только с нечётными листьями (на схеме обозначены фиолетовым цветом). По мере приближения к узлу проводящие пучки сближаются, образуя плотный контакт друг с другом. На срезе смыкающиеся пучки образуют структуру, по форме напоминающую подкову, в которую входят пучки центрального цилиндра и угловые пучки той стороны, с которой закладывается лист в соответствующем узле (на схеме фиолетовые и серые). Важно подчеркнуть, что пучок, относящийся к листьям противоположной стороны (на схеме синий), в этом случае сохраняет независимое расположение. На выходе из узла проводящие пучки частично перекомбинируются и к междоузлию «подкова» вновь распадается. В узле следующего листа происходит контакт пучков центрального цилиндра с пучками листового следа противоположного листа (на схеме синие и серые).

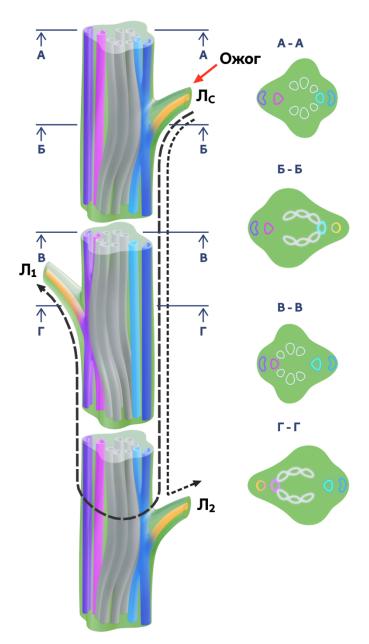


Рисунок 11. Предполагаемая схема распространения дистанционных сигналов в стебле гороха. Трёхмерная диаграмма проводящих пучков в стебле гороха и схематические срезы узлов и междоузлий. Все изменения в системе проводящих пучков происходят в области узла, что является причиной пропусков подробного изображения междоузлий на схеме. Пунктирная линия (короткие штрихи) обозначает путь дистанционного сигнала от стимулированного листа (Π_c) к второму нераздражённому листу (Π_2). Пунктирная линия (длинные штрихи) обозначает путь дистанционного сигнала от стимулированного листа (Π_c) к первому нераздражённому листу (Π_1)

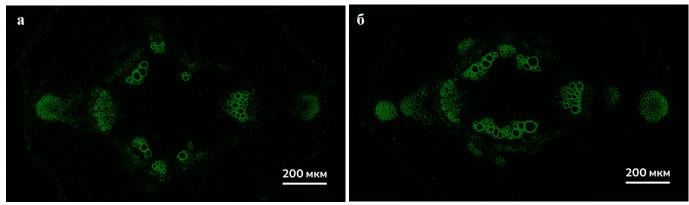


Рисунок 12. Поперечные срезы стебля гороха, соответствующие сечениям B-B (a) и $\Gamma-\Gamma$ (б) на схеме рисунка 11.

Исходя из описанных особенностей проводящих пучков, у гороха вероятное распространение дистанционного стрессового сигнала между листьями через сосудистую систему происходит следующим образом (распространение сигнала на схеме показано стрелками): сигнал из стимулированного листа (Π_c на схеме) по угловому пучку (на схеме синий) проходит в узел следующего листа параллельно оси стебля (узел листа 2 (Π_2) на схеме), минуя узел противоположного листа (лист 1 (Π_1) на схеме) и пучки центрального цилиндра. В области узла сигнал входит в лист и радиально распространяется в сосуды центрального цилиндра за счёт смыкания пучков в «подкову». После этого сигнал по сосудам центрального пучка распространяется к местам контакта (смыкания) с пучками противоположной стороны (узлы листьев 1 и 3), откуда попадает в соответствующие листья. Таким образом, измеряемое внешнее расстояние между листьями существенно отличается от реального расстояния, проходимого сигналом по проводящим пучкам.

Были измерены расстояния от раздражаемого листа до первого, второго и третьего листьев гороха, которые составляют соответственно 10,9±1,1 см, 15,2±1,2 см и 19,7±1,5 см. Поскольку распространение ВП связано с проводящими пучками, в частности с ксилемой (Vodeneev et al., 2015; Evans, Morris, 2017), расстояния, покрываемые ВП, отличаются от расстояний, измеренных снаружи. Реальное расстояние (рис. 11), которое, согласно схеме, сигнал проходит по проводящим пучкам, составляет ~ 20 см, 15 см и 28 см для первого, второго и третьего листьев,

соответственно. Сравнивая зависимости амплитуды ВП от внешнего расстояния и расстояния, который проходит сигнал по проводящим пучкам, можно заметить, что в случае расстояния по проводящим пучкам (рис. 13) присутствует стандартная зависимость декремента амплитуды ВП с увеличением расстояния (Vodeneev et al., 2015), также можно видеть и интенсивное затухание гормонального сигнала при удалении от зоны раздражения.

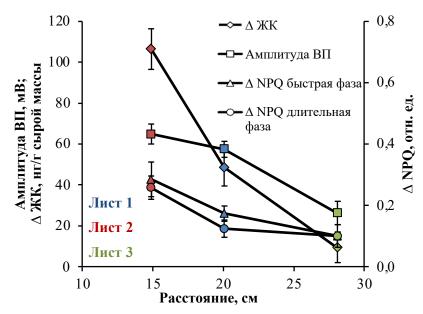


Рисунок 13. Зависимость амплитуды ВП, амплитуды изменения концентрации ЖК и амплитуд первой и второй волн NPQ от расстояния до зоны локального раздражения в соответствии с предполагаемой схемой распространения дистанционного сигнала

Анализ пространственно-временной динамики электрической активности, изменения содержания гормонов и фотосинтетической активности показал нетипичную зависимость от расстояния (в более удаленном от зоны раздражения листе гороха сигнал/ответ возникает раньше и с большей амплитудой), которая обусловлена особенностями архитектуры проводящих пучков гороха. Исследования проводящей системы стебля гороха проводились ранее (Sachs, 1972; Aloni, Gad, 1982) и также показали отсутствие непосредственного соединения между соседними листьями через проводящие ткани. Прямые связи проводящих пучков имеют листья, которые располагаются на одной стороне стебля и чередуются последовательно через один. Отмеченные нами особенности распространения ВП в горохе согласуются с

результатами других работ, в частности согласно результатам работы (Dziubińska et al., 2001) в подсолнечнике ВП не был зарегистрирован на стороне стебля, противоположной стимулируемому листу, вследствие его вероятного распространения преимущественно по проводящим пучкам листового следа.

В литературе также имеются сведения о согласованных пространственных изменениях электрической активности и гормонального ответа, которые связаны с системой проводящих пучков: наиболее выраженные электрические реакции и активация передачи сигналов с участием жасмоната имеют место в листьях арабидопсиса, соединённых прямыми сосудистыми связями с раздражаемым листом (Mousavi et al., 2013; Salvador-Recatalà, 2016). Деление листьев по сосудистым связям возможно благодаря подробно исследованной сложной архитектуре связей проводящих пучков растений арабидопсиса (Dengler, 2006), которому в литературе уделяется гораздо большее внимание по сравнению с другими видами растений, в частности с горохом. Таким образом, знание строения системы проводящих пучков объекта исследования является неотъемлемой частью изучения дистанционного сигналинга растений, объясняет наблюдаемые пространственные закономерности сигналов и ответов и является дополнительным подтверждением наличия связи между исследуемыми процессами.

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. 7, 8), а также предшествующего изменению содержания ЖК распространения ВП можно предположить наличие связи электрическими сигналами И изменениями концентрации ЖК нераздражённых 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.

3.3. Анализ механизмов изменения содержания фитогормонов при действии локального стимула

Наличие потенциальных путей влияния ВП на продукцию стрессовых гормонов (Farmer et al., 2020), а также обнаруженное в нашей работе достаточно малое время между действием стимула и ростом концентрации жасмонатов в нераздражённых частях растения, могут указывать на то, что повышение концентрации связано с синтезом жасмонатов в нераздражённых частях вследствие распространения ВП. В ряде работ, в которых была осуществлена регистрация электрических сигналов и уровня гормонов при действии локальных раздражителей, также предполагается возможность индукции системной продукции гормонов в результате распространения дистанционного сигнала (Hlavácková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Mousavi et al., 2013; Suzuki et al., 2013; Krausko et al., 2017; Kumari et al., 2019). В то же время, имеются работы, в которых показана возможность транспорта фитогормонов из зоны локального раздражения с высокой скоростью (Sato et al., 2009; Sato et al., 2011; Matsuura et al., 2012), что не позволяет полностью закрыть вопрос о том, распространяются ли гормоны из зоны локального раздражения или же синтезируются нераздраженных вследствие распространения частях дистанционного сигнала.

В нашей работе данный вопрос был исследован методом оценки изменения содержания фитогормонов в последовательных фрагментах листа пшеницы, располагающихся на удалении от зоны локального нагрева, через короткие временные промежутки после действия стимула. Разные скорости распространения ВП и транспорта гормонов с учётом малых временных интервалов и достаточно больших расстояний (несколько см) должны позволить разделить процессы транспорта и индукции фитогормонов. Лист пшеницы представляет собой подходящий объект для

такого исследования, так как имеет место линейное распространение дистанционных химического и электрического сигналов. Фрагмент листа, подвергаемый локальному нагреву, отбрасывался, определение концентрации гормонов проводилось в двух следующих фрагментах листа (рис. 14г). Анализ содержания фитогормонов во фрагментах пшеницы на временном интервале от 0 до 5 мин показал (рис. 14), что АБК практически не изменяется на данном временном промежутке, нет различий между фрагментом 1 и фрагментом 2. СК на исследуемом временном промежутке изменяется слабо, динамика между двумя фрагментами достоверно не отличается. ЖК значительно возрастает как в первом, так и во втором фрагменте. Как через 2,5 мин, так и через 5 мин после действия стимула, динамика концентрации ЖК для двух фрагментов является практически идентичной. Таким образом, сходная динамика фитогормонов двух последовательных фрагментов листа пшеницы позволяет сделать вывод, что гормоны не транспортируются самостоятельно из зоны локального раздражения, а синтезируются в нераздраженных частях вследствие распространения дистанционного сигнала, которым скорее всего является ВП.

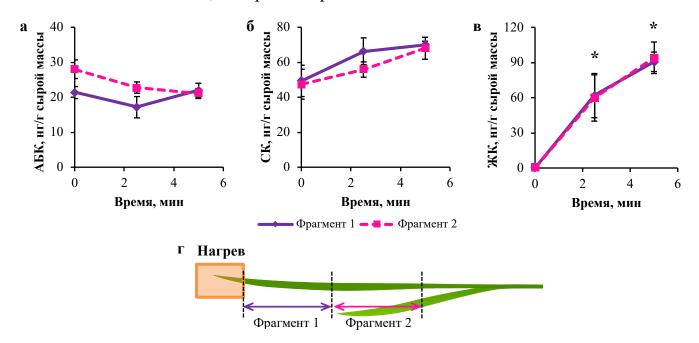


Рисунок 14. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённых последовательных фрагментах листа пшеницы; момент генерации ВП соответствует точке 0 мин; г – схема эксперимента по анализу возможности транспорта фитогормонов из зоны раздражения

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

Предполагая возможность индукции электрическими сигналами изменений содержания фитогормонов, необходимо изучить, каким образом ВП может влиять на синтез гормонов. 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 Ca²⁺. Также предполагается вклад Н⁺-АТФазы плазмалеммы в стресс-индуцированное повышение концентрации ЖК наряду с генерацией электрических сигналов, которые в свою очередь зависят от активности продуцирующей АФК НАДФН-оксидазы. Поэтому следующим этапом данной работы стало исследование динамики Ca²⁺, H⁺ и H₂O₂ при генерации ВП с помощью специфичных флуоресцентных зондов и оценка участия Ca²⁺, H⁺ и H₂O₂ в стимул-индуцированном изменении содержания гормонов с помощью ингибиторного анализа.

Для эффективной доставки флуоресцентных зондов и ингибиторов в клетки растения использовался метод вакуумной инфильтрации отсечённого листа, который ранее уже успешно применялся для исследования стрессовых реакций растений на локальные стимулы (Maffei, Bossi, 2006; Maffei et al., 2006). Использование в качестве объекта исследования отсечённого листа пшеницы допускает возможность различий в гормональном статусе по сравнению с целыми интактными растениями, что обуславливает необходимость определения уровня гормонов в отсечённом листе и в интактном растении в отсутствии раздражения. Анализ показал (рис. 15), что концентрации АБК и СК больше в отсечённом листе, ЖК и ЖК-иле не обнаружены как в листе интактного растения, так и в отсечённом листе в состоянии покоя (без раздражения), который был адаптирован до проведения измерений в течение 14 ч после отсечения.

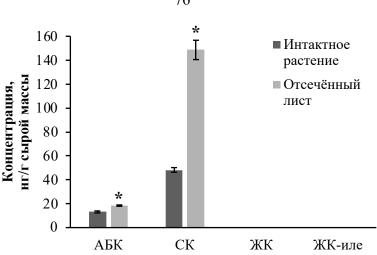


Рисунок 15. Концентрации абсцизовой кислоты (АБК), салициловой кислоты (СК), жасмоновой кислоты (ЖК) и жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) в состоянии покоя в листе интактного растения и в отсечённом листе пшеницы

Первым шагом ингибиторного анализа стало исследование динамики рН при действии локального раздражителя. Исследование изменений цитоплазматического рН проводилось на растениях пшеницы с помощью ратиометрического рНчувствительного флуоресцентного зонда BCECF,AM при одновременной регистрации электрической активности. Имеет место снижение $\Delta R/R_0$ при генерации ВП (рис. 16), что соответствует снижению внутриклеточного рН. Закисление внутриклеточной среды является временным: происходит рост $\Delta R/R_0$, соответствует повышению рН. Исследования рН на других растениях также показали временное закисление цитоплазмы и защелачивание апопласта при генерации ВП (Stahlberg, Cosgrove, 1996; Grams et al., 2009; Vodeneev et al., 2011; Sukhov et al., 2014; Sherstneva et al., 2015).

^{* –} статистически значимые различия от концентрации в интактных растениях, p<0,05

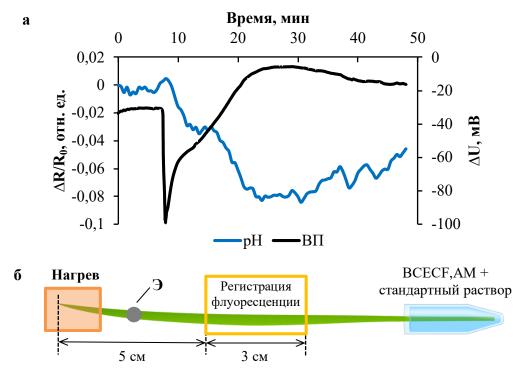


Рисунок 16. Динамика рН, индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, при одновременной регистрации ВП (а); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного рН-чувствительного зонда ВСЕСF,АМ в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

Предполагается, что временное закисление цитоплазмы при генерации ВП связано с переходной инактивацией Н⁺-АТФазы в плазматической мембране (Vodeneev et al., 2015). В нашей работе применение ингибитора Н⁺-АТФазы ортованадата натрия вызывает уменьшение амплитуды и скорости стимулиндуцированного снижения цитоплазматического рН (рис 17). Также наблюдается отсутствие восстановления значений рН на исследуемом временном промежутке. Действие ингибитора Н⁺-АТФазы отражается и на параметрах ВП: заметно меньше амплитуда и скорость деполяризации (рис. 17, 18). Сходный эффект ортованадата натрия на параметры ВП обнаружен в целых растениях пшеницы (Katicheva et al., 2014) и растениях гороха (Yudina et al., 2020). Кроме того, у мутантных растений арабидопсиса, дефицитных по гену Н⁺-АТФазы АНА1 уменьшена амплитуда деполяризации и увеличена длительность фаз деполяризации и реполяризации

электрической реакции, зарегистрированной в нераздражённом листе после действия локального повреждения, по сравнению с диким типом (Kumari et al., 2019).

Ингибитор Н⁺-АТФазы влияет и на потенциал покоя растительных клеток, вызывая уменьшение его метаболической компоненты (Katicheva et al., 2014; Yudina et al., 2020). В нашем исследовании эффект ингибитора Н⁺-АТФазы на величину рН в покое проявлялся в конститутивном закислении внутриклеточной среды: значение отношения (I₄₉₀/I₄₄₀) интенсивностей флуоресценции ВСЕСГ,АМ при его возбуждении на длинах волн 490 нм (I₄₉₀) и 440 нм (I₄₄₀), прямо пропорциональное величине рН, в присутствии ингибитора было ниже по сравнению с таковым в контроле. Потеря функции гена Н⁺-АТФазы АНА1 в мутантных растениях арабидопсиса также влияла на рН в состоянии покоя, обуславливая меньшее закисление внеклеточной среды по сравнению с диким типом (Kumari et al., 2019).

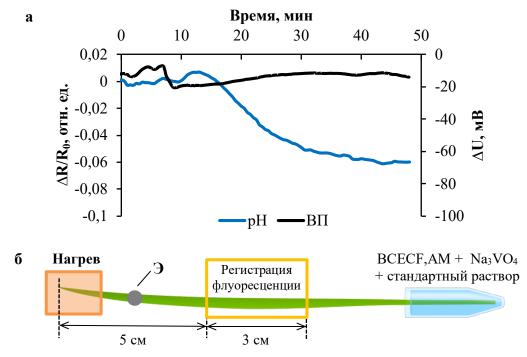


Рисунок 17. Динамика pH, индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы в условиях ингибирования H⁺-ATФазы, при одновременной регистрации ВП (а); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного pH-чувствительного зонда BCECF, AM в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

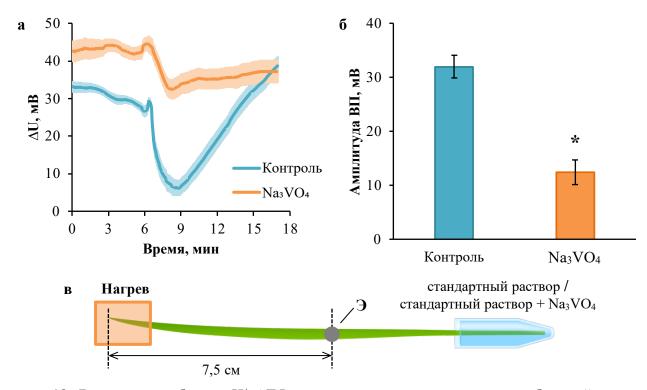


Рисунок 18. Влияние ингибитора H^+ -АТФазы ортованадата натрия на вариабельный потенциал (ВП), индуцированный локальным нагревом кончика листа пшеницы: а — усреднённые записи ВП в контрольных условиях и при ингибировании H^+ -АТФазы; момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б — амплитуда ВП в контрольных условиях и при ингибировании H^+ -АТФазы; в — схема регистрации ВП в отсечённом листе пшеницы (Э — измерительный внеклеточный макроэлектрод) * — статистически значимые различия с контрольной группой, р<0,05

Следующим шагом ингибиторного анализа стало изучение эффекта ингибитора H^+ -АТФазы на динамику фитогормонов при действии локального раздражителя. Динамика фитогормонов была исследована в отсечённом листе пшеницы в условиях действия ингибитора H^+ -АТФазы ортованадата натрия и в контрольных условиях без ингибитора. Локальный нагрев кончика листа пшеницы вызывает увеличение содержания АБК через 15 мин и через 60 мин в контроле и только через 60 мин при действии ингибитора по сравнению с уровнем до раздражения (0 мин) (рис. 19а). Ортованадат натрия повышает содержание АБК в покое, а при раздражении роста концентрации АБК не происходит. Действие локального нагрева вызывает увеличение концентрации СК через 15 мин и через 60 мин в контроле, а в условиях ингибирования H^+ -АТФазы роста не происходит (рис. 19б). Ортованадат натрия уменьшает величину стимул-индуцированного сдвига концентрации СК через 60 мин

после раздражения. Локальный нагрев вызывает повышение концентрации ЖК и ЖК-иле через 15 мин и через 60 мин в контрольных условиях, при действии ингибитора стимул-индуцированного роста не наблюдается (рис. 19в,г).

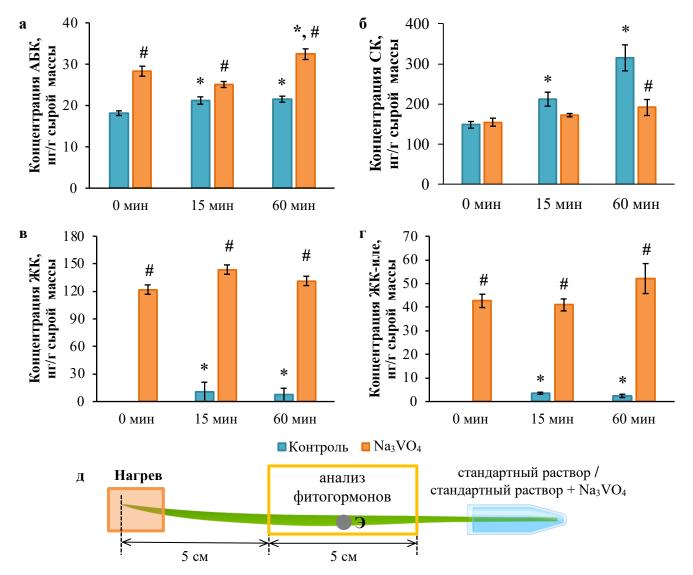


Рисунок 19. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, в контрольных условиях и при ингибировании Н⁺-АТФазы ортованадатом натрия; момент стимуляции соответствует точке 0 мин; д – 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

Изменение концентрации протонов может оказывать влияние на изменение содержания фитогормонов путём регуляции их метаболических путей. Регуляция

биосинтеза может происходить на нескольких уровнях, включая транскрипцию и трансляцию, и также возможно, каталитическую активность ферментов в биосинтетическом пути.

Внутриклеточные изменения рН могут играть сигнальную роль в регуляции биосинтеза АБК. Показано, что изменения внутриклеточного рН достаточно для модуляции экспрессии генов биосинтеза АБК и накопления самой АБК (Wang et al., 2014). Предварительная обработка растений химическими агентами. обеспечивающими изменение рН цитозоля, влияет на концентрацию АБК как в покое, так и при осмотическом стрессе, причём эти изменения концентрации АБК в ответ на смещение рН являются однонаправленными по отношению к контролю (нормальный рН), как и в наших экспериментах. Однако искусственное закисление цитозоля вызывало снижение концентрации АБК (Wang et al., 2014), что противоречит нашим данным. Сами авторы отмечают, что биосинтез АБК скорее всего линейно не коррелирует с абсолютным значением рН в каких-либо компартментах, а в большей степени зависит от градиента рН между цитоплазмой и вакуолью (или другим компартментом) (Wang et al., 2014). Таким образом, на биосинтез АБК скорее влияет нарушенный внутриклеточный гомеостаз рН.

Также известно, что увеличение pH апопласта в стрессовых условиях может способствовать гидролизу предшественников AБК, тем самым повышая её количество (Netting, 2000; Duffield, Netting, 2001). Дегидратация индуцировала увеличение pH апопласта и концентрации AБК, которые были полностью устранены после предварительной обработки фузикокцином, который активирует секрецию H⁺ и тем самым способствует закислению апопласта (Hartung et al., 1988).

Регуляция с помощью рН конкретных молекулярных мишеней, участвующих в биосинтезе АБК, на данный момент остаётся открытым вопросом. Известно, что АБК может быть получена путём синтеза *de novo* и путём деконьюгации глюкозилового эфира абсцизовой кислоты (АБК-ГЭ), который представляет собой форму хранения или транспорта АБК, накапливается в вакуолях, апопласте, эндоплазматическом

ретикулуме (ЭПР) (Finkelstein, 2013). Деконьюгация АБК-ГЭ ЭПР и вакуолярными β-глюкозидазами позволяет быстро сформировать свободную АБК в ответ на абиотические стрессовые состояния, такие как дегидратация и солевой стресс. Деконьюгация АБК-ГЭ может иметь важное значение в быстрых стрессовых реакциях, поскольку свободная АБК генерируется в реакции одноэтапного гидролиза. Такая реакция происходит в вакуолях или ЭПР, следовательно, требуется импорт АБК-ГЭ в эти компартменты. В вакуоли такой импорт опосредован двумя различными системами мембранного транспорта: протонно-зависимый антипортовый механизм и АТФ-связывающий кассетный (АВС) транспортер (Burla et al., 2013). Действие ортованадата на импорт АБК-ГЭ с помощью AtABCC2 в вакуоль показало снижение поглощения АБК-ГЭ (Burla et al., 2013), что, предположительно, может повлиять и на снижение концентрации свободной АБК. В нашем исследовании ортованадат повышает содержание АБК, следовательно, ортованадат в большей степени влияет на другой неизвестный процесс, который способствует увеличению концентрации АБК.

Регуляция концентрации СК с помощью рН также может быть реализована через влияние на транспортные процессы конъюгатов СК по сходному с АБК-ГЭ механизму, так как известно, что различные конъюгаты СК восстанавливаются в активную форму СК при стрессе, а внутриклеточный уровень СК и её неактивных форм находятся под контролем АВС-транспортеров и H⁺-антипортеров (Maruri-López et al., 2019).

Регуляция содержания АБК и СК также может быть обусловлена их взаимным влиянием друг на друга и влиянием жасмонатов, концентрация которых быстро увеличивается при локальном раздражении и достигает максимума, предшествующего по времени максимумам концентраций АБК и СК (рис. 5, 6). Взаимное влияние уровней фитогормонов друг на друга показано в литературе при различных биотических и абиотических стрессах (Santino et al., 2013; Kudoyarova et al., 2015; Zhao et al., 2021).

В литературе также имеются данные о влиянии изменения активности H⁺- АТФазы на содержание жасмонатов. Исследования проводились в нераздражённых листьях растений арабидопсиса при действии локального повреждения и показали, что у мутантных растений, дефицитных по гену H⁺-АТФазы АНА1, происходит повышенное накопление жасмонатов после повреждения по сравнению с диким типом (Кumari et al., 2019), что согласуется с нашими данными по влиянию ингибитора H⁺-АТФазы.

Потенциальной точкой влияния рН на биосинтез жасмонатов является изменение доступности субстрата. Известно, биосинтез жасмонатов происходит в различных клеточных компартментах: хлоропласт, пероксисома, ЦИТОЗОЛЬ (Wasternack, Hause, 2013), следовательно такое пространственное разделение предполагает наличие необходимого фермента и субстрата одновременно внутри одного компартмента. В состоянии покоя концентрации ЖК и ЖК-иле очень низкие, а концентрация их предшественника ОФДК поддерживается на определённом высоком уровне и быстро снижается при локальном повреждении в нераздражённых листьях (Koo et al., 2009; Kumari et al., 2019). ОФДК синтезируется в хлоропластах, затем экспортируется через внутреннюю мембрану с помощью канального белка JASSY на внешнюю мембрану. Импорт в пероксисому происходит с помощью ATФзависимого ABC-транспортера COMATOSE или, по крайней мере, частично с помощью пассивного механизма захвата ионов из-за pH \sim 7,2 в цитозоле и \sim 8,2 в пероксисомах. После перемещения ОФДК синтез ЖК продолжается в пероксисоме (Wasternack, Hause, 2019). Ингибитор H⁺-АТФазы вызывает закисление цитозоля, в результате большее количество молекул ОФДК переходят в протонированную форму и свободно перемещаются через мембрану пероксисомы, где щелочной рН обуславливает их диссоциацию и накопление по принципу «анионной ловушки». Таким образом большое количество субстрата в виде ОФДК становится доступным для пероксисомных ферментов, которые синтезируют ЖК. Данное предположение мы проверили, исследуя влияние ингибитора Н⁺-АТФазы ортованадата натрия на концентрацию ОФДК в состоянии покоя (в отсутствии раздражения). Показано, что ортованадат снижает уровень ОФДК (рис. 20). При этом концентрации ЖК и ЖК-иле возрастают (рис. 19).

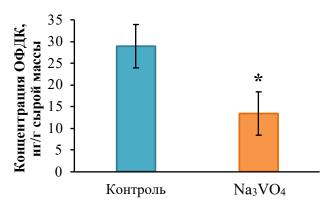


Рисунок 20. Влияние ингибитора H^+ -АТФазы ортованадата натрия на концентрацию 12-оксофитодиеновой кислоты (ОФДК) в состоянии покоя в отсечённом листе пшеницы * – статистически значимые различия с контрольной группой, p<0,05

Как уже было сказано, при генерации ВП происходит изменение концентрации не только H^+ , но и Ca^{2+} . Поэтому следующим этапом данной работы стало исследование динамики внутриклеточной концентрации $Ca^{2+}([Ca^{2+}]_i)$ при генерации $B\Pi$ с помощью Ca^{2+} -специфичного флуоресцентного зонда fluo-4, AM при одновременной регистрации ВП. Происходит увеличение $\Delta F/F_0$ (рис. 21), что соответствует увеличению $[Ca^{2+}]_i$ при генерации ВП. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ является временным, значения $\Delta F/F_0$ постепенно снижаются, что соответствует снижению $[Ca^{2+}]_i$. В растениях гороха экспериментальное исследование динамики $[Ca^{2+}]_i$ при увеличение $[Ca^{2+}]_i$ B локальном раздражении также показало временное нераздражённой области при генерации ВП. В литературе имеются сходные данные о повышении [Са²⁺]_і в нераздражённых листьях после действия локального стимула на других растениях (Fisahn et al., 2004; Maffei et al., 2004; Nguyen et al., 2018; Yan et al., 2018; Kumari et al., 2019), которое сопровождает генерацию электрического сигнала (Fisahn et al., 2004; Nguyen et al., 2018).

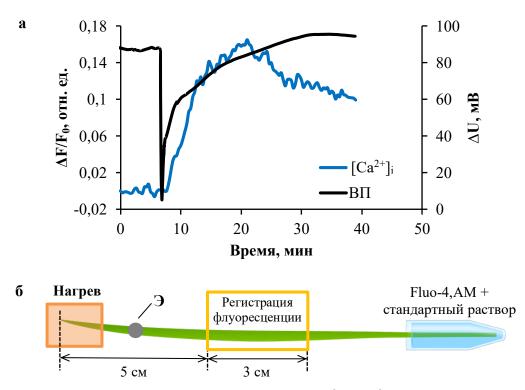


Рисунок 21. Динамика внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, при одновременной регистрации ВП (а); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного Ca^{2+} -чувствительного зонда Fluo-4,AM в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

Повышение $[Ca^{2+}]_i$, которое имеет место при распространении ВП, может принимать участие в механизме генерации ВП и стимул-индуцированном изменении содержания фитогормонов. Для анализа участия Ca^{2+} в данных процессах проводили исследование влияния блокатора Ca^{2+} каналов La^{3+} на параметры ВП и стимул-индуцированного сдвига фитогормонов. Действие блокатора Ca^{2+} каналов приводит к уменьшению амплитуды ВП в листе пшеницы (рис. 22). В других видах растений применение La^{3+} также снижает амплитуду ВП (Julien et al., 1991; Furch et al., 2009).

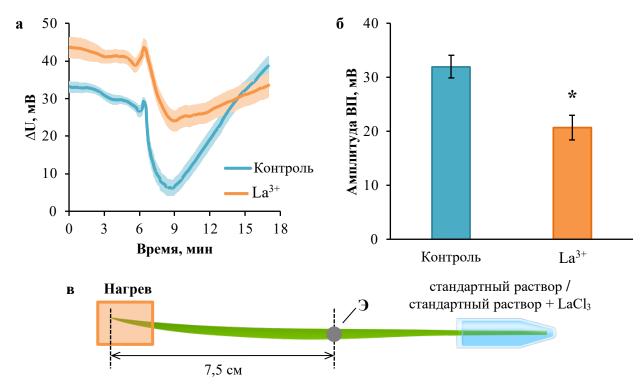


Рисунок 22. Влияние блокатора Ca^{2+} каналов La^{3+} на вариабельный потенциал (ВП), индуцированный локальным нагревом кончика листа пшеницы: а — усреднённые записи ВП в контрольных условиях и при блокировании Ca^{2+} каналов; момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; б — амплитуда ВП в контрольных условиях и при блокировании Ca^{2+} каналов; в — схема регистрации ВП в отсечённом листе пшеницы (Э — измерительный внеклеточный макроэлектрод) * — статистически значимые различия с контрольной группой, p<0,05

В условиях действия блокатора Ca²⁺ каналов La³⁺ было исследовано влияние локального раздражителя на изменение содержания фитогормонов. Показано, что при действии блокатора локальный нагрев кончика листа пшеницы вызывает увеличение содержания АБК, ЖК и ЖК-иле только через 60 мин, и не вызывает изменения концентрации СК (рис. 23). La³⁺ влияет на содержание АБК в покое и через 60 мин после раздражения, повышая её уровень по сравнению с контролем. Он также повышает концентрацию СК в покое, но подавляет её увеличение через 60 мин после действия локального стимула. Блокирование Ca²⁺ каналов влияет и на концентрацию жасмонатов, приводя к её увеличению в состоянии покоя по сравнению с контрольными условиями, однако оно подавляет рост концентрации ЖК и ЖК-иле через 15 мин после стимуляции, когда жасмонаты достигают максимальных значений концентрации (рис. 5).

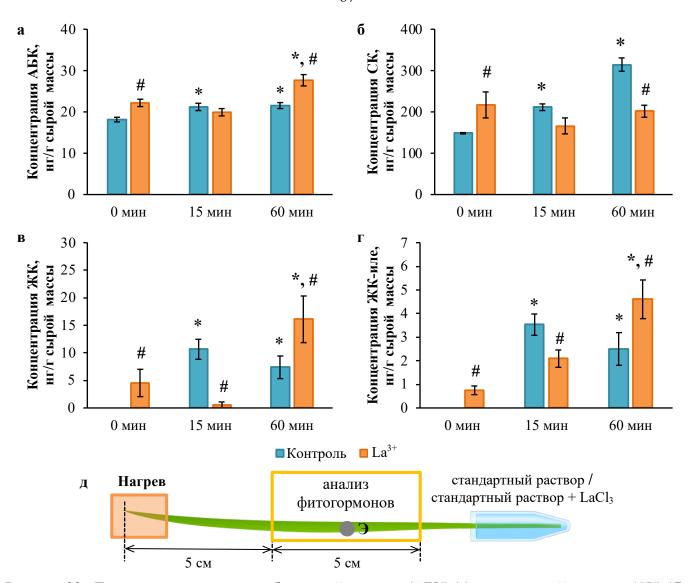


Рисунок 23. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г), индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, в контрольных условиях и при блокировании Ca^{2+} каналов La^{3+} ; момент стимуляции соответствует точке 0 мин; д — 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

Изменение содержания фитогормонов может происходить за счёт регуляторного влияния Ca^{2+} на процессы синтеза гормонов, как на уровне экспрессии генов биосинтетических ферментов, так и при изменении каталитической активности самих ферментов.

Известно, что увеличение концентраций СК и жасмонатов может происходить при локальном повреждении листьев табака листогрызущими насекомыми в результате активации биосинтеза гормонов с помощью кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK) при участии других протеинкиназ и факторов транскрипции, которые повышают уровни транскриптов генов, участвующих в биосинтезе СК и жасмонатов (Wu et al., 2007). Кроме транскрипционной регуляции биосинтеза СК, показана и посттранскрипционная регуляция при участии Ca²⁺ (Huang et al., 2020). Посредниками в Ca²⁺-зависимой регуляции биосинтеза СК являются различные CDPK, а также кальмодулин-связывающие белки (CBP), например, CBP60g (Romeis, Herde, 2014; Huang et al., 2020).

Кроме CDPК и CBP, белковыми сенсорами, связывающими кальций, в клетках растений выступают кальциневрин-В-подобные белки (CBL). Известно, что CBL9 модулирует биосинтез АБК при абиотическом стрессе. Нарушение функции гена *CBL9* у растений *Arabidopsis thaliana* приводит к увеличению накопления АБК в стрессовых условиях по сравнению с диким типом (Pandey et al., 2004).

Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ при ВП может способствовать повышению активности ферментов биосинтеза жасмонатов. Известно, что 13-липоксигеназы (LOX) катализируют синтез предшественников ЖК, одна из них, LOX6 способствует быстрому синтезу ЖК в нераздражённых листьях арабидопсиса при локальном повреждении (Chauvin et al., 2013). Предполагается, что LOX6 имеет домен структуры β -бочонка, который может связывать Ca^{2+} (Farmer et al., 2020). Кроме того, повышение продукции жасмонатов после механического повреждения может быть вызвано Ca^{2+} фосфолипазы D (PLD): приток индуцирует изменением активности транслокацию PLD на мембрану, где она высвобождает полиненасыщенные жирные кислоты из мембранных фосфолипидов, необходимые для синтеза ЖК (Ryu, Wang, 1996; Wang et al., 2000). Таким образом, уменьшение величины стимулиндуцированного сдвига жасмонатов при действии блокатора Са²⁺ каналов, повидимому, связано со снижением активности ферментов биосинтеза жасмонатов, в частности PLD и LOX6, в результате уменьшения $[Ca^{2+}]_i$. Увеличение концентрации жасмонатов в состоянии покоя и через 60 мин, вероятно, происходит вследствие негативного влияния длительной блокировки транспорта Ca^{2+} .

Влияние Ca^{2+} на изменение концентраций гормонов также может происходить через Ca^{2+} -индуцированные изменения рН 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; Marcec et al., 2019).

Исследование динамики H_2O_2 при генерации $B\Pi$ с помощью H_2O_2 -специфичного флуоресцентного зонда Ampliflu Red при одновременной регистрации $B\Pi$ показало, что происходит увеличение $\Delta F/F_0$, что соответствует увеличению концентрации H_2O_2 при генерации $B\Pi$ (рис. 24). Исследования концентрации H_2O_2 после действия локального стимула на других растениях также показывают повышение уровня H_2O_2 в нераздражённых листьях (Miller et al., 2009; Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018), которое сопровождает генерацию электрического сигнала (Suzuki et al., 2013).

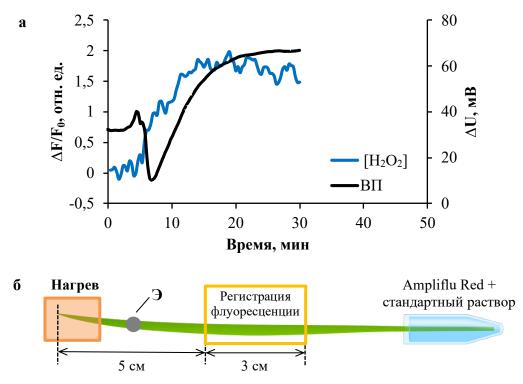


Рисунок 24. Динамика пероксида водорода (H_2O_2) , индуцированная локальным нагревом, в нераздражённой части отсечённого листа пшеницы, при одновременной регистрации ВП (а); момент начала нагрева соответствует точке 0 мин; δ – схема одновременной регистрации поверхностных потенциалов и флуоресценции загруженного H_2O_2 -чувствительного зонда Ampliflu Red в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

Повышение концентрации H_2O_2 , которое имеет место при распространении ВП, может принимать участие в стимул-индуцированном изменении содержания фитогормонов. Для анализа участия H_2O_2 в качестве индуктора изменений концентраций фитогормонов проводили исследование влияния искусственного повышения концентрации H_2O_2 на содержание фитогормонов. Для этого раствор H_2O_2 определённой концентрации загружали в отсечённый лист пшеницы с помощью вакуумной инфильтрации и через определённый временной интервал после окончания загрузки анализировали содержание фитогормонов.

Была определена концентрационная зависимость содержания фитогормонов в ответ на действие H_2O_2 . Диапазон концентраций H_2O_2 для экзогенного применения составлял 5-20 мМ, что находится в пределах диапазона концентраций H_2O_2 , которые используются при экзогенном добавлении для индукции различных сигналов, в том числе гормональных и электрических (Hu et al., 2003; Maffei et al., 2006; Hu et al., 2009;

Lv et al., 2019; Wang et al., 2019). Показано, что АБК не изменяется через 15 мин в ответ на действие H_2O_2 , СК увеличивается при концентрации 20 мМ H_2O_2 по сравнению с контрольной группой без H_2O_2 , ЖК возрастает в ответ на 5 мМ и 10 мМ H_2O_2 , ЖК-иле увеличивается только при 10 мМ (рис. 25). Искусственная индукция продукции фитогормонов с помощью экзогенного добавления H_2O_2 ранее проводилась в некоторых работах, показано увеличение концентрации ЖК в ответ на действие H_2O_2 (Hu et al., 2003; Hu et al., 2009; Wang et al., 2019).

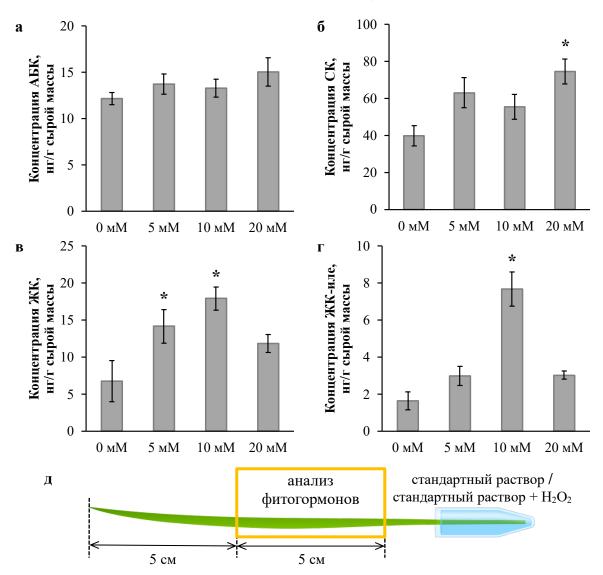


Рисунок 25. Зависимость концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г) от концентрации экзогенно применяемого пероксида водорода (H_2O_2) через 15 мин после окончания загрузки H_2O_2 в отсечённый лист пшеницы; д – схема определения содержания фитогормонов в отсечённом листе пшеницы (Э – измерительный внеклеточный макроэлектрод)

^{* –} статистически значимые различия от контрольного значения (0 мM), p < 0.05

Для определения временной зависимости содержания фитогормонов в ответ на действие H_2O_2 была выбрана концентрация 10 мМ H_2O_2 , вызывающая продукцию жасмонатов, которые представляют наибольший интерес среди исследуемых фитогормонов как потенциальные индукторы изменений второй фазы активности фотосинтеза. Действие H_2O_2 на изменение содержания фитогормонов было исследовано на временном интервале от 5 до 45 мин. Концентрации АБК и СК возрастают через 45 мин после применения H_2O_2 , ЖК и ЖК-иле показывают максимальную концентрацию через 15 мин действия H_2O_2 (рис. 26). Динамика фитогормонов при действии H_2O_2 имеет сходные черты с таковой при локальном раздражении (рис. 5): жасмонаты показывают быстрый рост с максимумом во временном интервале 10-20 мин, АБК и СК увеличиваются через более длительные временные промежутки с максимумами в интервале 40-60 мин. Таким образом, изменение концентрации H_2O_2 может являться потенциальным индуктором изменений содержания фитогормонов при действии локального стимула.

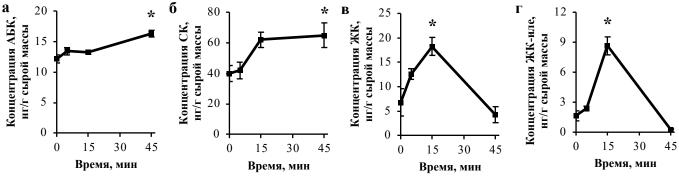


Рисунок 26. Динамика концентрации абсцизовой кислоты (АБК) (а), салициловой кислоты (СК) (б), жасмоновой кислоты (ЖК) (в), жасмонил-изолейцина (ЖК-иле) (г), индуцированная экзогенным 10 мМ H_2O_2 , в отсечённом листе пшеницы; момент загрузки H_2O_2 соответствует точке 0 мин * – статистически значимые различия от контрольного значения (0 мин), р<0,05

Изменение концентрации H_2O_2 может оказывать влияние на изменение содержания фитогормонов путём регуляции их метаболических путей через активацию $A\Phi K$ -зависимых Ca^{2+} каналов и повышение концентрации Ca^{2+} . Взаимосвязь Ca^{2+} волн и волн $A\Phi K$ предложена в литературе как комплексный механизм распространения дистанционного стрессового сигнала (Choi et al., 2016; Gilroy et al., 2016; Marcec et al., 2019), участвующий в гормональной регуляции (Xia et

al., 2015; Vega-Muñoz et al., 2020). Особая роль в этом механизме отведена НАДФНоксидазе, принадлежащей семейству гомологов оксидаз респираторного взрыва (RBOH), как активному продуценту АФК. Роль RBOH показана и в изменении фитогормонов, индуцированном локальным повреждением. Так, содержания повышение концентрации АБК, СК и ЖК в нераздражённом листе, которое имеет место при локальной стимуляции листьев арабидопсиса, было подавлено у растений мутантной линии *rbohD* (Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018). Стимуляция продукции ЖК у растений Arabidopsis thaliana (Hu et al., 2009) и Panax ginseng (Hu et al., 2003) требовала повышения концентрации H₂O₂, зависимой от активности ${\rm HAД}\Phi{\rm H}$ -оксидазы и повышения концентрации ${\rm Ca}^{2+}$, в растениях Aquilaria sinensis увеличение концентраций ЖК и СК в ответ на повреждение также требовало повышения концентрации H_2O_2 (Lv et al., 2019). Посредниками в активации $A\Phi K$ индуцированной продукции жасмонатов могут являться митоген-активируемые протеинкиназы (MPK): в растениях Solanum lycopersicum в ответ на атаку нематод увеличение концентрации ЖК зависело от активности МРК1 и МРК2, которые в свою очередь активируются в ответ на распространение взаимозависимых электрических и АФК-сигналов, опосредованных активностью RBOH1 (Wang et al., 2019).

Следующим шагом стало изучение эффекта экзогенного H_2O_2 на концентрацию предшественника жасмонатов ОФДК. Показано, что H_2O_2 вызывает снижение уровня ОФДК (рис. 27). Такое снижение концентрации ОФДК происходит и при закислении внутриклеточной среды (рис. 20), которое имеет место при генерации ВП (рис. 16). Кроме того, по данным литературы в ответ на экзогенное добавление H_2O_2 возникает быстрая переходная деполяризация (Maffei et al., 2006). Это позволяет предположить, что H_2O_2 может выступать как индуктор ВП, а изменение ионных концентраций, сопровождающее ВП, ведёт к повышению содержания жасмонатов.

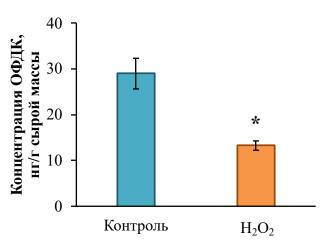


Рисунок 27. Влияние экзогенного пероксида водорода (H_2O_2) на концентрацию 12-оксофитодиеновой кислоты $(O\Phi \mathcal{J}K)$ в состоянии покоя в отсечённом листе пшеницы (концентрация H_2O_2-10 мМ, время экспозиции -15 мин)

В некоторых работах в ответ на локальное повреждение также наблюдалось быстрое снижение уровня ОФДК через 5 мин и незначительный рост в следующие 60 мин (Коо et al., 2009). По другим данным применение локального стресса вызывало быстрое переходное увеличение концентрации ОФДК в нераздражённых листьях в первые минуты после действия стимула, но было подавлено у растений мутантной линии *rbohD* (Devireddy et al., 2018), что предполагает участие НАДФН-оксидазы в изменении содержания ОФДК.

Таким образом, изменение концентраций H^+ , Ca^{2+} , H_2O_2 , сопровождающее генерацию ВП, индуцирует изменение содержания фитогормонов. Внутриклеточное увеличение концентрации H^+ вызывает значительное увеличение содержания жасмонатов в состоянии покоя, а также повышает содержание АБК и снижает стимулиндуцированное увеличение концентрации СК. В свою очередь изменения рН могут быть связаны с Ca^{2+} -зависимой инактивацией H^+ -АТФазы в результате увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , которое может быть вызвано активацией АФК-зависимых Ca^{2+} каналов. Также нельзя исключать прямое влияние изменений концентраций Ca^{2+} и АФК на изменение уровня фитогормонов.

^{* –} статистически значимые различия с контрольной группой, р<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, концентраций $B\Pi$. являются изменения ионных при генерации вторая фотосинтетической активности, продолжительная фаза снижения 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. 28) 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 Ca^{2+} в клетку, что приводит к снижению внутриклеточного рН. Изменение концентраций Ca^{2+} , Ca^{2

липоксигеназы LOX6 и фосфолипазы D (PLD), что приведёт к повышенной продукции жасмонатов. Са²⁺ 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.

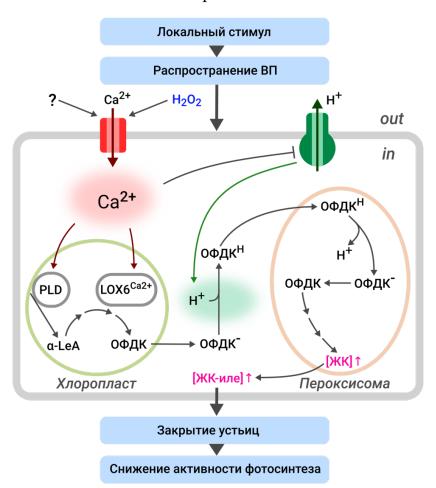


Рисунок 28. Предполагаемая схема ВП-индуцированного увеличения содержания жасмонатов и последующего снижения активности фотосинтеза при локальном раздражении

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Опритов, В. А. Биоэлектрогенез у высших растений / В. А. Опритов, С. С. Пятыгин, В. Г. Ретивин. М.: Наука, 1991. 216 с.
- 2. Полевой, В. В. Физиология целостности растительного организма / В. В. Полевой,
- Т. Е. Билова, Ю. И. Шевцов // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 631-643.
- 3. Acosta, I. F. Jasmonates / I. F. Acosta, E. E. Farmer // The Arabidopsis Book. 2010. V. 8. P. e0129.
- 4. Aloni, R. Anatomy of the primary phloem fiber system in *Pisum sativum* / R. Aloni, A. E. Gad // American Journal of Botany. − 1982. − V. 69, № 6. − P. 979-984.
- 5. Attaran, E. Temporal Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling / E. Attaran, I. T. Major, J. A. Cruz, B. A. Rosa, A. J. K. Koo, J. Chen, D. M. Kramer, S. Y. He, G. A. Howe // Plant Physiology. − 2014. − V. 165, № 3. − P. 1302-1314.
- 6. Belko, N. Restriction of transpiration rate under high vapour pressure deficit and non-limiting water conditions is important for terminal drought tolerance in cowpea: Drought tolerance of cowpea / N. Belko, M. Zaman-Allah, N. N. Diop, N. Cisse, G. Zombre, J. D. Ehlers, V. Vadez // Plant Biology. − 2013. − V. 15, № 2. − P. 304-316.
- 7. Białasek, M. Evidence for the Involvement of Electrical, Calcium and ROS Signaling in the Systemic Regulation of Non-Photochemical Quenching and Photosynthesis / M. Białasek, M. Górecka, R. Mittler, S. Karpiński // Plant and Cell Physiology. − 2017. − V. 58, № 2. − P. 207-215.
- 8. Blanco, F. Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis* / F. Blanco, P. Salinas, N. M. Cecchini, X. Jordana, P. Van Hummelen, M. E. Alvarez, L. Holuigue // Plant Molecular Biology. − 2009. − V. 70, № 1-2. − P. 79-102.
- 9. Böhm, J. The Venus Flytrap *Dionaea muscipula* Counts Prey-Induced Action Potentials to Induce Sodium Uptake / J. Böhm, S. Scherzer, E. Krol, I. Kreuzer, K. von Meyer, C. Lorey, T. D. Mueller, L. Shabala, I. Monte, R. Solano, K. A. S. Al-Rasheid, H. Rennenberg, S. Shabala, E. Neher, R. Hedrich // Current Biology. − 2016. − V. 26, № 3. − P. 286-295.

- 10. Bright, J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis: ABA, NO and H₂O₂ interactions in guard cells / J. Bright, R. Desikan, J. T. Hancock, I. S. Weir, S. J. Neill // The Plant Journal. 2006. V. 45, № 1. P. 113-122.
- 11. Bulychev, A. A. Effect of a Single Excitation Stimulus on Photosynthetic Activity and Light-dependent pH Banding in *Chara Cells* / A. A. Bulychev, N. A. Kamzolkina, J. Luengviriya, A. B. Rubin, S. C. Müller // Journal of Membrane Biology. -2004. -V. 202, N0 1. -P. 11-19.
- 12. Burla, B. Vacuolar Transport of Abscisic Acid Glucosyl Ester Is Mediated by ATP-Binding Cassette and Proton-Antiport Mechanisms in *Arabidopsis* / B. Burla, S. Pfrunder, R. Nagy, R. M. Francisco, Y. Lee, E. Martinoia // Plant Physiology. 2013. V. 163, № 3. P. 1446-1458.
- 13. Chauvin, A. Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals / A. Chauvin, D. Caldelari, J.-L. Wolfender, E. E. Farmer // New Phytologist. 2013. V. 197, № 2. P. 566-575.
- 14. Chen, Y. Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate / Y. Chen, Q. Pang, S. Dai, Y. Wang, S. Chen, X. Yan // Journal of Plant Physiology. − 2011. − V. 168, № 10. − P. 995-1008.
- 15. Choi, W. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca^{2+} , ROS and electrical signals / W. Choi, G. Miller, I. Wallace, J. Harper, R. Mittler, S. Gilroy // The Plant Journal. -2017. V. 90, No. 4. P. 698-707.
- 16. Choi, W.-G. Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants / W.-G. Choi, R. Hilleary, S. J. Swanson, S.-H. Kim, S. Gilroy // Annual Review of Plant Biology. 2016. V. 67, № 1. P. 287-307.
- 17. Davies, E. Rapid systemic up-regulation of genes after heat-wounding and electrical stimulation / E. Davies, A. Vian, C. Vian, B. Stankovic // Acta Physiologiae Plantarum. 1997. V. 19, № 4. P. 571-576.

- 18. De Ollas, C. Attenuated accumulation of jasmonates modifies stomatal responses to water deficit / C. De Ollas, V. Arbona, A. Gómez-Cadenas, I. C. Dodd // Journal of Experimental Botany. − 2018. − V. 69, № 8. − P. 2103-2116.
- 19. Demidchik, V. ROS-Activated Ion Channels in Plants: Biophysical Characteristics, Physiological Functions and Molecular Nature / V. Demidchik // International Journal of Molecular Sciences. 2018. V. 19, № 4. P. 1263.
- 20. Dengler, N. G. The shoot apical meristem and development of vascular architecture / N. G. Dengler // Canadian Journal of Botany. − 2006. − V. 84, № 11. − P. 1660-1671.
- 21. Devireddy, A. R. Coordinating the overall stomatal response of plants: Rapid leaf-to-leaf communication during light stress / A. R. Devireddy, S. I. Zandalinas, A. Gómez-Cadenas, E. Blumwald, R. Mittler // Science Signaling. − 2018. − V. 11, № 518. − P. eaam9514.
- 22. Duffield, P. H. Methods for the Quantitation of Abscisic Acid and Its Precursors from Plant Tissues / P. H. Duffield, A. G. Netting // Analytical Biochemistry. 2001. V. 289, № 2. P. 251-259.
- 23. Dziubińska, H. Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. / H. Dziubińska, K. Trębacz, T. Zawadzki // Journal of Plant Physiology. 2001. V. 158, № 9. P. 1167-1172.
- 24. Erb, M. Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores / M. Erb, P. Reymond // Annual Review of Plant Biology. 2019. V. 70, № 1. P. 527-557.
- 25. Evans, M. J. Chemical agents transported by xylem mass flow propagate variation potentials / M. J. Evans, R. J. Morris // The Plant Journal. 2017. V. 91, № 6. P. 1029-1037.
- 26. Farmer, E. E. Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses / E. E. Farmer, Y. Gao, G. Lenzoni, J. Wolfender, Q. Wu // New Phytologist. 2020. V. 227, № 4. P. 1037-1050.
- 27. Finkelstein, R. Abscisic Acid Synthesis and Response / R. Finkelstein // The Arabidopsis Book. 2013. V. 11. P. e0166.

- 28. Fisahn, J. 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 / J. Fisahn, O. Herde, L. Willmitzer, H. Peña-Cortés // Plant and Cell Physiology. − 2004. − V. 45, № 4. − P. 456-459.
- 29. Fonseca, S. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate / S. Fonseca, A. Chini, M. Hamberg, B. Adie, A. Porzel, R. Kramell, O. Miersch, C.
- Wasternack, R. Solano // Nature Chemical Biology. 2009. V. 5, № 5. P. 344-350.
- 30. Förster, S. Wounding-Induced Stomatal Closure Requires Jasmonate-Mediated Activation of GORK K⁺ Channels by a Ca²⁺ Sensor-Kinase CBL1-CIPK5 Complex / S. Förster, L. K. Schmidt, E. Kopic, U. Anschütz, S. Huang, K. Schlücking, P. Köster, R. Waadt, A. Larrieu, O. Batistič, P. L. Rodriguez, E. Grill, J. Kudla, D. Becker // Developmental Cell. 2019. V. 48, № 1. P. 87-99.e6.
- 31. Fromm, J. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf / J. Fromm, M.-R. Hajirezaei, V. K. Becker, S. Lautner // Frontiers in Plant Science. 2013. V. 4.
- 32. Fromm, J. Electrical signals and their physiological significance in plants: Electrical signals in plants / J. Fromm, S. Lautner // Plant, Cell & Environment. -2007. V. 30, No 3. -P. 249-257.
- 33. Furch, A. C. U. Sieve Element Ca²⁺ Channels as Relay Stations between Remote Stimuli and Sieve Tube Occlusion in *Vicia faba* / A. C. U. Furch, A. J. E. van Bel, M. D. Fricker, H. H. Felle, M. Fuchs, J. B. Hafke // The Plant Cell. − 2009. − V. 21, № 7. − P. 2118-2132.
- 34. Gallé, A. Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signalling / A. Gallé, S. Lautner, J. Flexas, J. Fromm // Environmental and Experimental Botany. 2015. V. 114. P. 15-21.
- 35. Gallé, A. 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 / A. Gallé, S. Lautner,

- J. Flexas, M. Ribas-Carbo, D. Hanson, J. Roesgen, J. Fromm // Plant, Cell & Environment. 2013. V. 36, № 3. P. 542-552.
- 36. Gehring, C. Jasmonates Induce Intracellular Alkalinization and Closure of *Paphiopedilum* Guard Cells / C. Gehring // Annals of Botany. 1997. V. 80, № 4. P. 485-489.
- 37. Geng, S. Jasmonate-mediated stomatal closure under elevated CO₂ revealed by time-resolved metabolomics / S. Geng, B. B. Misra, E. de Armas, D. V. Huhman, H. T. Alborn, L. W. Sumner, S. Chen // The Plant Journal. 2016. V. 88, № 6. P. 947-962.
- 38. Gilroy, S. ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants / S. Gilroy, M. Białasek, N. Suzuki, M. Górecka, A. R. Devireddy, S. Karpiński, R. Mittler // Plant Physiology. − 2016. − V. 171, № 3. − P. 1606-1615.
- 39. Glauser, G. Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in *Arabidopsis* in Response to Wounding / G. Glauser, E. Grata, L. Dubugnon, S. Rudaz, E. E. Farmer, J.-L. Wolfender // Journal of Biological Chemistry. − 2008. − V. 283, № 24. − P. 16400-16407.
- 40. Gorecka, M. Abscisic acid signalling determines susceptibility of bundle sheath cells to photoinhibition in high light-exposed *Arabidopsis* leaves / M. Gorecka, R. Alvarez-Fernandez, K. Slattery, L. McAusland, P. A. Davey, S. Karpinski, T. Lawson, P. M. Mullineaux // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. − 2014. − V. 369, № 1640. − P. 20130234.
- 41. Grams, T. E. E. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf / T. E. E. Grams, S. Lautner, H. H. Felle, R. Matyssek, J. Fromm // Plant, Cell & Environment. -2009. V. 32, No. 4. P. 319-326.
- 42. Guo, K. Identification of Novel Regulators of Plant Transpiration by Large-Scale Thermal Imaging Screening in *Helianthus Annuus* / K. Guo, P. Mellinger, V. Doan, J. Allen, R. N. Pringle, F. Jammes // Journal of Visualized Experiments. − 2020. − № 155. − P. 60535.

- 43. Hartung, W. Abscisic Acid Movement into the Apoplastic solution of Water-Stressed Cotton Leaves: Role of Apoplastic pH / W. Hartung, J. W. Radin, D. L. Hendrix // Plant Physiology. 1988. V. 86, № 3. P. 908-913.
- 44. Hartung, W. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? / W. Hartung, A. Sauter, E. Hose // Journal of Experimental Botany. − 2002. − V. 53, № 366. − P. 27-32.
- 45. Herde, O. 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 / O. Herde, H. Peña Cortés, C. Wasternack, L. Willmitzer, J. Fisahn // Plant Physiology. − 1999. − V. 119, № 1. − P. 213-218.
- 46. Herde, O. Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants / O. Herde, H. Pena-Cortes, L. Willmitzer, J. Fisahn // Plant, Cell and Environment. − 1997. − V. 20, № 1. − P. 136-141.
- 47. Herrera-Vásquez, A. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression / A. Herrera-Vásquez, P. Salinas, L. Holuigue // Frontiers in Plant Science. 2015. V. 6.
- 48. Heyer, M. A Holistic Approach to Analyze Systemic Jasmonate Accumulation in Individual Leaves of *Arabidopsis* Rosettes Upon Wounding / M. Heyer, M. Reichelt, A. Mithöfer // Frontiers in Plant Science. 2018. V. 9. P. 1569.
- 49. Hilleary, R. Systemic signaling in response to wounding and pathogens / R. Hilleary, S. Gilroy // Current Opinion in Plant Biology. 2018. V. 43. P. 57-62.
- 50. Hlaváčková, V. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning / V. Hlaváčková, P. Krchňák, J. Nauš, O. Novák, M. Špundová, M. Strnad // Planta. 2006. V. 225, № 1. P. 235-244.
- 51. Hlavinka, J. Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient sitiens mutants and sitiens pretreated by ABA / J. Hlavinka, V. Nožková-Hlaváčková, K. Floková, O. Novák, J. Nauš // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V. 54. P. 89-96.

- 52. Hu, X. Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension-cultured cells of *Panax ginseng* / X. Hu, S. Neill, W. Cai, Z. Tang // Physiologia Plantarum. − 2003. − V. 118, № 3. − P. 414-421.
- 53. Hu, X. Early signals transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plant / X. Hu, L. Wansha, Q. Chen, Y. Yang // Plant Signaling & Behavior. 2009. V. 4, № 8. P. 696-697.
- 54. Huang, W. Biosynthesis and Regulation of Salicylic Acid and N-Hydroxypipecolic Acid in Plant Immunity / W. Huang, Y. Wang, X. Li, Y. Zhang // Molecular Plant. 2020. V. 13, № 1. P. 31-41.
- 55. Huber, A. E. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge / A. E. Huber, T. L. Bauerle // Journal of Experimental Botany. -2016. -V. 67, N = 7. -P. 2063-2079.
- 56. Jogawat, A. Calcium channel CNGC19 mediates basal defense signaling to regulate colonization by *Piriformospora indica in Arabidopsis* roots / A. Jogawat, M. K. Meena, A. Kundu, M. Varma, J. Vadassery // Journal of Experimental Botany. − 2020. − V. 71, № 9. − P. 2752-2768.
- 57. Julien, J. L. Characteristics of the Wave of Depolarization Induced by Wounding in *Bidens pilosa* L. / J. L. Julien, M. O. Desbiez, G. De Jaegher, J. M. Frachisse // Journal of Experimental Botany. − 1991. − V. 42, № 1. − P. 131-137.
- 58. Kaiser, H. Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica* / H. Kaiser, T. E. E. Grams // Journal of Experimental Botany. − 2006. − V. 57, № 9. − P. 2087-2092.
- 59. Katicheva, L. Ionic Nature of Burn-Induced Variation Potential in Wheat Leaves / L. Katicheva, V. Sukhov, E. Akinchits, V. Vodeneev // Plant and Cell Physiology. 2014. V. 55, № 8. P. 1511-1519.
- 60. Khokon, Md. A. R. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*: Extracellular ROS mediate SA-induced stomatal closure /

- Md. A. R. Khokon, E. Okuma, M. A. Hossain, S. Munemasa, M. Uraji, Y. Nakamura, I. C. Mori, Y. Murata // Plant, Cell & Environment. 2011. V. 34, № 3. P. 434-443.
- 61. Klejchova, M. Membrane voltage as a dynamic platform for spatiotemporal signaling, physiological, and developmental regulation / M. Klejchova, F. A. L. Silva-Alvim, M. R. Blatt, J. C. Alvim // Plant Physiology. − 2021. − V. 185, № 4. − P. 1523-1541.
- 62. Koo, A. J. K. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis* / A. J. K. Koo, X. Gao, A. Daniel Jones, G. A. Howe // The Plant Journal. -2009. V. 59, No 6. P. 974-986.
- 63. Koziolek, C. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals / C. Koziolek, T. E. E. Grams, U. Schreiber, R. Matyssek, J. Fromm // New Phytologist. 2004. V. 161, № 3. P. 715-722.
- 64. Krausko, M. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis* / M. Krausko, Z. Perutka, M. Šebela, O. Šamajová, J. Šamaj, O. Novák, A. Pavlovič // New Phytologist. − 2017. − V. 213, № 4. − P. 1818-1835.
- 65. Kudoyarova, G. R. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water / G. R. Kudoyarova, I. C. Dodd, D. S. Veselov, S. A. Rothwell, S. Yu. Veselov // Journal of Experimental Botany. − 2015. − V. 66, № 8. − P. 2133-2144.
- 66. Kudoyarova, G. Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand / G. Kudoyarova, S. Veselova, W. Hartung, R. Farhutdinov, D. Veselov, G. Sharipova // Planta. − 2011. − V. 233, № 1. − P. 87-94.
- 67. Kumari, A. Arabidopsis H⁺-ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation / A. Kumari, A. Chételat, C. T. Nguyen, E. E. Farmer // Proceedings of the National Academy of Sciences. − 2019. − V. 116, № 40. − P. 20226-20231.
- 68. Kwak, J. M. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis* / J. M. Kwak, C. M. Izumi, P. Zhen-Ming, L. Nathalie, A. T.

- Miguel, L. D. Jeffery, E. B. Rachel, B. Sara, D. G. J. Jonathan, I. S. Julian // The EMBO Journal. 2003. V. 22, № 11. P. 2623-2633.
- 69. Lautner, S. Characteristics of Electrical Signals in Poplar and Responses in Photosynthesis / S. Lautner, T. E. E. Grams, R. Matyssek, J. Fromm // Plant Physiology. 2005. V. 138, № 4. P. 2200-2209.
- 70. Lv, F. Hydrogen peroxide burst triggers accumulation of jasmonates and salicylic acid inducing sesquiterpene biosynthesis in wounded *Aquilaria sinesis* / F. Lv, S. Li, J. Feng, P. Liu, Z. Gao, Y. Yang, Y. Xu, J. Wei // Journal of Plant Physiology. 2019. V. 234-235. P. 167-175.
- 71. Maffei, M. Electrophysiology and Plant Responses to Biotic Stress / M. Maffei, S. Bossi // Plant Electrophysiology / A. G. Volkov ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. P. 461-481.
- 72. Maffei, M. Effects of Feeding *Spodoptera littoralis* on Lima Bean Leaves. I. Membrane Potentials, Intracellular Calcium Variations, Oral Secretions, and Regurgitate Components / M. Maffei, S. Bossi, D. Spiteller, A. Mithöfer, W. Boland // Plant Physiology. − 2004. − V. 134, № 4. − P. 1752-1762.
- 73. Maffei, M. E. Effects of Feeding *Spodoptera littoralis* on Lima Bean Leaves. III. Membrane Depolarization and Involvement of Hydrogen Peroxide / M. E. Maffei, A. Mithöfer, G.-I. Arimura, H. Uchtenhagen, S. Bossi, C. M. Bertea, L. S. Cucuzza, M. Novero, V. Volpe, S. Quadro, W. Boland // Plant Physiology. − 2006. − V. 140, № 3. − P. 1022-1035. 74. Malabarba, J. ANNEXIN1 mediates calcium-dependent systemic defense in *Arabidopsis* plants upon herbivory and wounding / J. Malabarba, A. K. Meents, M. Reichelt, S. S. Scholz, E. Peiter, J. Rachowka, D. Konopka-Postupolska, K. A. Wilkins, J. M. Davies, R. Oelmüller,
- 75. Marcec, M. J. Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling in plant immune response / M. J. Marcec, S. Gilroy, B. W. Poovaiah, K. Tanaka // Plant Science. 2019. V. 283. P. 343-354.

A. Mithöfer // New Phytologist. – 2021. – V. 231, № 1. – P. 243-254.

- 76. Maruri-López, I. Intra and Extracellular Journey of the Phytohormone Salicylic Acid / I. Maruri-López, N. Y. Aviles-Baltazar, A. Buchala, M. Serrano // Frontiers in Plant Science. 2019. V. 10. P. 423.
- 77. Matsuura, H. Transportation of de novo synthesized jasmonoyl isoleucine in tomato / H. Matsuura, S. Takeishi, N. Kiatoka, C. Sato, K. Sueda, C. Masuta, K. Nabeta // Phytochemistry. 2012. V. 83. P. 25-33.
- 78. Maxwell, K. Chlorophyll fluorescence a practical guide / K. Maxwell, G. N. Johnson // Journal of Experimental Botany. 2000. V. 51, № 345. P. 659-668.
- 79. Meena, M. K. The Ca²⁺ Channel CNGC19 Regulates Arabidopsis Defense Against *Spodoptera* Herbivory / M. K. Meena, R. Prajapati, D. Krishna, K. Divakaran, Y. Pandey, M. Reichelt, M. K. Mathew, W. Boland, A. Mithöfer, J. Vadassery // The Plant Cell. 2019. V. 31, № 7. P. 1539-1562.
- 80. Miller, G. The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli / G. Miller, K. Schlauch, R. Tam, D. Cortes, M. A. Torres, V. Shulaev, J. L. Dangl, R. Mittler // Science Signaling. $-2009.-V.\ 2,\ N\!\!\!\ 2009.-V.\ 2$
- 81. Monshausen, G. B. A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants / G. B. Monshausen, E. S. Haswell // Journal of Experimental Botany. 2013. V. 64, № 15. P. 4663-4680.
- 82. Mousavi, S. A. R. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling / S. A. R. Mousavi, A. Chauvin, F. Pascaud, S. Kellenberger, E. E. Farmer // Nature. 2013. V. 500, № 7463. P. 422-426.
- 83. Munemasa, S. The *coronatine-insensitive 1* Mutation Reveals the Hormonal Signaling Interaction between Abscisic Acid and Methyl Jasmonate in Arabidopsis Guard Cells. Specific Impairment of Ion Channel Activation and Second Messenger Production / S. Munemasa, K. Oda, M. Watanabe-Sugimoto, Y. Nakamura, Y. Shimoishi, Y. Murata // Plant Physiology. −2007. − V. 143, № 3. − P. 1398-1407.

- 84. Nabity, P. D. Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuata* / P. D. Nabity, J. A. Zavala, E. H. DeLucia // Journal of Experimental Botany. − 2013. − V. 64, № 2. − P. 685-694.
- 85. Ndamukong, I. SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription: Interaction of glutaredoxin with TGA factors / I. Ndamukong, A. A. Abdallat, C. Thurow, B. Fode, M. Zander, R. Weigel, C. Gatz // The Plant Journal. − 2007. − V. 50, № 1. − P. 128-139.
- 86. Netting, A. G. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations / A. G. Netting // Journal of Experimental Botany. -2000. V. 51, No. 343. P. 147-158.
- 87. Nguyen, C. T. Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant / C. T. Nguyen, A. Kurenda, S. Stolz, A. Chételat, E. E. Farmer // Proceedings of the National Academy of Sciences. − 2018. − V. 115, № 40. − P. 10178-10183.
- 88. Ookura, T. A 55-kDa Calcium Dependent Protein Kinase Phosphorylated Thr Residues from the Auto-Regulatory Domain of Plasma Membrane H⁺-ATPase in Rice / T. Ookura, S. Komatsu, Y. Kawamura, K. Kasamo // Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. − 2005. − V. 39, № 2. − P. 99-104.
- 89. Pan, X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry / X. Pan, R. Welti, X. Wang // Phytochemistry. 2008. V. 69, № 8. P. 1773-1781.
- 90. Pandey, G. K. The Calcium Sensor Calcineurin B-Like 9 Modulates Abscisic Acid Sensitivity and Biosynthesis in *Arabidopsis* / G. K. Pandey, Y. H. Cheong, K.-N. Kim, J. J. Grant, L. Li, W. Hung, C. D'Angelo, S. Weinl, J. Kudla, S. Luan // The Plant Cell. 2004. V. 16, № 7. P. 1912-1924.
- 91. Paulmann, M. K. Barley yellow dwarf virus Infection Leads to Higher Chemical Defense Signals and Lower Electrophysiological Reactions in Susceptible Compared to Tolerant

- Barley Genotypes / M. K. Paulmann, G. Kunert, M. R. Zimmermann, N. Theis, A. Ludwig, D. Meichsner, R. Oelmüller, J. Gershenzon, A. Habekuss, F. Ordon, A. C. U. Furch, T. Will // Frontiers in Plant Science. 2018. V. 9. P. 145.
- 92. Pei, Z.-M. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acidsignalling in guard cells / Z.-M. Pei, Y. Murata, G. Benning, S. Thomine, B. Klüsener, G. J. Allen, E. Grill, J. I. Schroeder // Nature. − 2000. − V. 406, № 6797. − P. 731-734.
- 93. Peña-Cortés, H. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. / H. Peña-Cortés, J. Fisahn, L. Willmitzer // Proceedings of the National Academy of Sciences. − 1995. − V. 92, № 10. − P. 4106-4113.
- 94. Prodhan, Md. Y. Guard Cell Salicylic Acid Signaling Is Integrated into Abscisic Acid Signaling via the Ca²⁺ /CPK-Dependent Pathway / Md. Y. Prodhan, S. Munemasa, Mst. N.-E.-N. Nahar, Y. Nakamura, Y. Murata // Plant Physiology. − 2018. − V. 178, № 1. − P. 441-450.
- 95. Romeis, T. From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack / T. Romeis, M. Herde // Current Opinion in Plant Biology. 2014. V. 20. P. 1-10.
- 96. Ruan, J. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants / J. Ruan, Y. Zhou, M. Zhou, J. Yan, M. Khurshid, W. Weng, J. Cheng, K. Zhang // International Journal of Molecular Sciences. 2019. V. 20, № 10. P. 2479.
- 97. Ryu, S. B. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves / S. B. Ryu, X. Wang // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Lipids and Lipid Metabolism. − 1996. − V. 1303, № 3. − P. 243-250.
- 98. Sachs, T. The Induction of Fibre Differentiation in Peas / T. Sachs // Annals of Botany. 1972. V. 36, № 1. P. 189-197.
- 99. 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 / V. Salvador-Recatalà // Plant Signaling & Behavior. − 2016. − V. 11, № 4. − P. e1161879.

- 100. Santino, A. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses / A. Santino, M. Taurino, S. De Domenico, S. Bonsegna, P. Poltronieri, V. Pastor, V. Flors // Plant Cell Reports. 2013. V. 32, № 7. P. 1085-1098.
- 101. Sato, C. Distal Transport of Exogenously Applied Jasmonoyl–Isoleucine with Wounding Stress / C. Sato, K. Aikawa, S. Sugiyama, K. Nabeta, C. Masuta, H. Matsuura // Plant and Cell Physiology. − 2011. − V. 52, № 3. − P. 509-517.
- 102. Sato, C. Kinetics of the Accumulation of Jasmonic Acid and Its Derivatives in Systemic Leaves of Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) and Translocation of Deuterium-Labeled Jasmonic Acid from the Wounding Site to the Systemic Site / C. Sato, Y. Seto, K. Nabeta, H. Matsuura // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. − 2009. − V. 73, № 9. − P. 1962-1970.
- 103. Savchenko, T. Functional Convergence of Oxylipin and Abscisic Acid Pathways Controls Stomatal Closure in Response to Drought / T. Savchenko, V. A. Kolla, C.-Q. Wang, Z. Nasafi, D. R. Hicks, B. Phadungchob, W. E. Chehab, F. Brandizzi, J. Froehlich, K. Dehesh // Plant Physiology. − 2014. − V. 164, № 3. − P. 1151-1160.
- 104. Shabala, S. Root-to-shoot signalling: integration of diverse molecules, pathways and functions / S. Shabala, R. G. White, M. A. Djordjevic, Y.-L. Ruan, U. Mathesius // Functional Plant Biology. − 2016. − V. 43, № 2. − P. 87.
- 105. Sherstneva, O. N. Participation of intracellular and extracellular pH changes in photosynthetic response development induced by variation potential in pumpkin seedlings / O. N. Sherstneva, V. A. Vodeneev, L. A. Katicheva, L. M. Surova, V. S. Sukhov // Biochemistry (Moscow). − 2015. − V. 80, № 6. − P. 776-784.
- 106. Sirhindi, G. Jasmonic acid and methyl jasmonate modulate growth, photosynthetic activity and expression of photosystem II subunit genes in *Brassica oleracea* L / G. Sirhindi, R. Mushtaq, S. S. Gill, P. Sharma, E. F. Abd_Allah, P. Ahmad // Scientific Reports. − 2020. − V. 10, № 1. − P. 9322.
- 107. Stahlberg, R. Slow Wave Potentials a Propagating Electrical Signal Unique to Higher Plants / R. Stahlberg, R. E. Cleland, E. Van Volkenburgh // Communication in Plants

- / F. Baluška, S. Mancuso, D. Volkmann eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. P. 291-308.
- 108. Stahlberg, R. Slow wave potentials in cucumber differ in form and growth effect from those in pea seedlings / R. Stahlberg, D. J. Cosgrove // Physiologia Plantarum. 1997. V. 101, $N \ge 2$. P. 379-388.
- 109. Stahlberg, R. Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L. / R. Stahlberg, DanielJ. Cosgrove // Planta. 1996. V. 200, № 4.
- 110. Stanković, B. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato / B. Stanković, E. Davies // FEBS Letters. 1996. V. 390, № 3. P. 275-279.
- 111. Stanković, B. Action potentials and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationships and distinguishing characteristics / B. Stanković, D. L. Witters, T. Zawadzki, E. Davies // Physiologia Plantarum. 1998. V. 103, № 1. P. 51-58.
- 112. Suhita, D. Cytoplasmic Alkalization Precedes Reactive Oxygen Species Production during Methyl Jasmonate- and Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure / D. Suhita, A. S. Raghavendra, J. M. Kwak, A. Vavasseur // Plant Physiology. − 2004. − V. 134, № 4. − P. 1536-1545.
- 113. Sukhov, V. Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea: VP influences on photosynthesis due to H^+ influx / V. Sukhov, O. Sherstneva, L. Surova, L. Katicheva, V. Vodeneev // Plant, Cell & Environment. -2014.-V.37, No.11.-P.2532-2541.
- 114. Sukhov, V. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants / V. Sukhov, E. Sukhova, V. Vodeneev // Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2019. V. 146. P. 63-84.
- 115. Sukhov, V. Changes in H⁺-ATP Synthase Activity, Proton Electrochemical Gradient, and pH in Pea Chloroplast Can Be Connected with Variation Potential / V. Sukhov, L.

- Surova, E. Morozova, O. Sherstneva, V. Vodeneev // Frontiers in Plant Science. 2016. V. 07.
- 116. Surova, L. Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves / L. Surova, O. Sherstneva, V. Vodeneev, L. Katicheva, M. Semina, V. Sukhov // Journal of Plant Physiology. 2016. V. 202. P. 57-64.
- 117. Suza, W. P. The role of JAR1 in Jasmonoyl-l-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response / W. P. Suza, P. E. Staswick // Planta. 2008. V. 227, № 6. P. 1221-1232.
- 118. Suzuki, N. Temporal-Spatial Interaction between Reactive Oxygen Species and Abscisic Acid Regulates Rapid Systemic Acclimation in Plants / N. Suzuki, G. Miller, C. Salazar, H. A. Mondal, E. Shulaev, D. F. Cortes, J. L. Shuman, X. Luo, J. Shah, K. Schlauch, V. Shulaev, R. Mittler // The Plant Cell. 2013. V. 25, № 9. P. 3553-3569.
- 119. Szechyńska-Hebda, M. Electrical Signaling, Photosynthesis and Systemic Acquired Acclimation / M. Szechyńska-Hebda, M. Lewandowska, S. Karpiński // Frontiers in Physiology. 2017. V. 8. P. 684.
- 120. Takahashi, F. Long-distance signaling in plant stress response / F. Takahashi, K. Shinozaki // Current Opinion in Plant Biology. 2019. V. 47. P. 106-111.
- 121. Vadassery, J. CML42-Mediated Calcium Signaling Coordinates Responses to *Spodoptera* Herbivory and Abiotic Stresses in Arabidopsis / J. Vadassery, M. Reichelt, B. Hause, J. Gershenzon, W. Boland, A. Mithöfer // Plant Physiology. 2012. V. 159, № 3. P. 1159-1175.
- 122. Vega-Muñoz, I. Breaking Bad News: Dynamic Molecular Mechanisms of Wound Response in Plants / I. Vega-Muñoz, D. Duran-Flores, Á. D. Fernández-Fernández, J. Heyman, A. Ritter, S. Stael // Frontiers in Plant Science. 2020. V. 11. P. 610445.
- 123. Vian, A. Two Different Wound Signals Evoke Very Rapid, Systemic CMBP Transcript Accumulation in Tomato / A. Vian, E. Davies // Plant Signaling & Behavior. 2006. V. 1, № 5. P. 261-264.

- 124. Vodeneev, V. A. The role of Ca^{2+} , H^+ , and Cl^- ions in generation of variation potential in pumpkin plants / V. A. Vodeneev, E. K. Akinchits, L. A. Orlova, V. S. Sukhov // Russian Journal of Plant Physiology. − 2011. − V. 58, № 6. − P. 974-981.
- 125. Vodeneev, V. A. Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo* / V. A. Vodeneev, V. A. Opritov, S. S. Pyatygin // Russian Journal of Plant Physiology. − 2006. − V. 53, № 4. − P. 481-487.
- 126. Vodeneev, V. A. Age-dependent changes of photosynthetic responses induced by electrical signals in wheat seedlings / V. A. Vodeneev, O. N. Sherstneva, L. M. Surova, M. M. Semina, L. A. Katicheva, V. S. Sukhov // Russian Journal of Plant Physiology. − 2016. − V. 63, № 6. − P. 861-868.
- 127. Vodeneev, V. Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation / V. Vodeneev, E. Akinchits, V. Sukhov // Plant Signaling & Behavior. 2015. V. 10, \mathbb{N} 9. P. e1057365.
- 128. Wang, C. Involvement of Phospholipase D in Wound-Induced Accumulation of Jasmonic Acid in *Arabidopsis* / C. Wang, C. A. Zien, M. Afitlhile, R. Welti, D. F. Hildebrand, X. Wang // The Plant Cell. 2000. V. 12, № 11. P. 2237-2246.
- 129. Wang, G. Systemic Root-Shoot Signaling Drives Jasmonate-Based Root Defense against Nematodes / G. Wang, C. Hu, J. Zhou, Y. Liu, J. Cai, C. Pan, Y. Wang, X. Wu, K. Shi, X. Xia, Y. Zhou, C. H. Foyer, J. Yu // Current Biology. −2019. − V. 29, № 20. − P. 3430-3438.e4.
- 130. Wang, L. Comparisons of LIPOXYGENASE3- and JASMONATE-RESISTANT4/6-Silenced Plants Reveal That Jasmonic Acid and Jasmonic Acid-Amino Acid Conjugates Play Different Roles in Herbivore Resistance of *Nicotiana attenuata* / L. Wang, S. Allmann, J. Wu, I. T. Baldwin // Plant Physiology. − 2008. − V. 146, № 3. − P. 904-915.
- 131. Wang, Z.-Y. The Arabidopsis Vacuolar Sorting Receptor1 Is Required for Osmotic Stress-Induced Abscisic Acid Biosynthesis / Z.-Y. Wang, C. Gehring, J. Zhu, F.-M. Li, J.-K. Zhu, L. Xiong // Plant Physiology. − 2014. − V. 167, № 1. − P. 137-152.

- 132. Wasternack, C. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany / C. Wasternack, B. Hause // Annals of Botany. − 2013. − V. 111, № 6. − P. 1021-1058.
- 133. Wasternack, C. The missing link in jasmonic acid biosynthesis / C. Wasternack, B. Hause // Nature Plants. 2019. V. 5, № 8. P. 776-777.
- 134. Wu, J. Herbivory Rapidly Activates MAPK Signaling in Attacked and Unattacked Leaf Regions but Not between Leaves of *Nicotiana attenuata* / J. Wu, C. Hettenhausen, S. Meldau, I. T. Baldwin // The Plant Cell. 2007. V. 19, № 3. P. 1096-1122.
- 135. Xia, X.-J. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance / X.-J. Xia, Y.-H. Zhou, K. Shi, J. Zhou, C. H. Foyer, J.-Q. Yu // Journal of Experimental Botany. − 2015. − V. 66, № 10. − P. 2839-2856.
- 136. Yan, C. Injury Activates Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 Complex for Jasmonate Biosynthesis / C. Yan, M. Fan, M. Yang, J. Zhao, W. Zhang, Y. Su, L. Xiao, H. Deng, D. Xie // Molecular Cell. 2018. V. 70, № 1. P. 136-149.e7.
- 137. Yan, S. The role of plasma membrane H⁺-ATPase in jasmonate-induced ion fluxes and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* / S. Yan, E. S. McLamore, S. Dong, H. Gao, M. Taguchi, N. Wang, T. Zhang, X. Su, Y. Shen // The Plant Journal. 2015. V. 83, № 4. P. 638-649.
- 138. Yudina, L. M. Impact of Local Damage on Transpiration of Pea Leaves at Various Air Humidity / L. M. Yudina, O. N. Sherstneva, S. A. Mysyagin, V. A. Vodeneev, V. S. Sukhov // Russian Journal of Plant Physiology. − 2019. − V. 66, № 1. − P. 87-94.
- 139. Yudina, L. Inactivation of H⁺-ATPase Participates in the Influence of Variation Potential on Photosynthesis and Respiration in Peas / L. Yudina, O. Sherstneva, E. Sukhova, M. Grinberg, S. Mysyagin, V. Vodeneev, V. Sukhov // Plants. − 2020. − V. 9, № 11. − P. 1585.

- 140. Zandalinas, S. I. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants / S. I. Zandalinas, Y. Fichman, A. R. Devireddy, S. Sengupta, R. K. Azad, R. Mittler // Proceedings of the National Academy of Sciences. − 2020. − V. 117, № 24. − P. 13810-13820.
- 141. Zhao, B. Roles of Phytohormones and Their Signaling Pathways in Leaf Development and Stress Responses / B. Zhao, Q. Liu, B. Wang, F. Yuan // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2021. V. 69, № 12. P. 3566-3584.
- 142. Zhou, Z. An Arabidopsis Plasma Membrane Proton ATPase Modulates JA Signaling and Is Exploited by the *Pseudomonas syringae* Effector Protein AvrB for Stomatal Invasion / Z. Zhou, Y. Wu, Y. Yang, M. Du, X. Zhang, Y. Guo, C. Li, J.-M. Zhou // The Plant Cell. −2015. − V. 27, № 7. − P. 2032-2041.
- 143. Zimmermann, M. R. System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding / M. R. Zimmermann, H. Maischak, A. Mithöfer, W. Boland, H. H. Felle // Plant Physiology. − 2009. − V. 149, № 3. − P. 1593-1600.
- 144. Zottini, M. Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis* / M. Zottini, A. Costa, R. De Michele, M. Ruzzene, F. Carimi, F. Lo Schiavo // Journal of Experimental Botany. − 2007. − V. 58, № 6. − P. 1397-1405.
- 145. Xiong, L. Regulation of abscisic acid biosynthesis / L. Xiong, J.-K. Zhu // Plant Physiology. 2003. V. 133, № 1. P. 29-36.