

На правах рукописи

Сухов Владимир Сергеевич

**ВЫЗВАННАЯ ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ БЫСТРАЯ
ИНАКТИВАЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ:
МЕХАНИЗМЫ, СВЯЗЬ С ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬЮ, ПОДХОДЫ К
УПРАВЛЕНИЮ И МОНИТОРИНГУ**

1.5.2 – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук
в виде научного доклада

Нижний Новгород – 2025

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДОКЛАДА.....	13
2.1. Электрические сигналы у растений и их функциональная роль.....	13
2.2. Объекты и основные методы исследования.....	15
2.2.1. Растительные объекты и их культивирование.....	15
2.2.2. Индукция переменных потенциалов локальным действием повреждающих факторов.....	15
2.2.3. Измерения электрической активности.....	15
2.2.4. Исследование фотосинтетических процессов и транспирации.....	16
2.2.5. Действие стрессовых факторов на фотосинтетический аппарат и растение в целом.....	17
2.2.6. Оценка теплоустойчивости фотосинтетического аппарата и растений в целом.....	17
2.2.7. Измерение изменений внутри- и внеклеточного pH с использованием ратиометрических флуоресцентных зондов.....	18
2.2.8. Ингибиторный анализ механизмов влияния переменного потенциала на фотосинтез.....	18
2.2.9. Измерение содержания АТФ в листе.....	18
2.2.10. Выделение хлоропластов и протопластов.....	19
2.2.11. Обработка растений экзогенными фитогормонами.....	19
2.2.12. Измерение спектральных характеристик отражения листьев и анализ фотохимического индекса отражения.....	19
2.2.13. Комплексный анализ спектров отражения и поиск новых узко- и широкополосных индексов отражения, чувствительных к действию стрессоров и распространению ВП.....	20
2.2.14. Методы математического моделирования.....	21
2.2.15. Методы статистического анализа.....	21
2.3. Феноменологический анализ влияния переменного потенциала на фотосинтетические процессы.....	21
2.3.1. Анализ влияния локальных повреждений на фотосинтетические показатели высших растений.....	21
2.3.2. Анализ роли переменного потенциала в индукции быстрой инактивации фотосинтеза.....	24
2.4. Анализ механизмов формирования быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной переменным потенциалом.....	28
2.4.1. Анализ вклада изменений световой и темновой стадии фотосинтеза в формирование вызванного переменным потенциалом быстрого фотосинтетического ответа.....	28
2.4.2. Инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны как механизм индукции вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза.....	32
2.4.3. Роль закисления цитоплазмы, стромы и люмена хлоропластов в формировании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза.....	36
2.4.4. Роль защелачивания апопласта в формировании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза.....	38
2.4.5. Анализ потенциальной роли устьиц в формировании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации и активации фотосинтеза.....	41

2.4.6. Общая схема потенциальных механизмов развития быстрой инактивации фотосинтеза, индуцированной переменным потенциалом у высших растений.....	44
2.5. Анализ путей влияния переменного потенциала и вызванной им быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом.....	45
2.5.1. Влияние индукции переменного потенциала на теплоустойчивость растений.....	45
2.5.2. Анализ путей влияния переменного потенциала на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата растений.....	48
2.5.3. Общая схема путей влияния переменного потенциала на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата растений.....	52
2.6. Анализ факторов, модифицирующих формирование переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза.....	54
2.6.1. Анализ влияния переменности активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны на формирование электрических сигналов растения.....	54
2.6.2. Анализ влияния засухи на формирование переменного потенциала и быстрых фотосинтетических ответов.....	56
2.6.3. Анализ влияния обработки экзогенной абсцизовой кислотой и 24-эпибрассинолидом на формирование переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза.....	59
2.7. Анализ возможности выявления быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной переменным потенциалом, методами оптического мониторинга.....	63
2.7.1. Анализ возможности использования PRI для выявления вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза.....	63
2.7.2. Комплексный анализ влияния ВП на узкополосные индексы отражения, рассчитываемые на основании спектрального диапазона 400-700 нм.....	66
2.7.3. Анализ влияния ВП на параметры широкополосного отражения.....	68
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	74
4. СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ.....	81
4.1. Список научных статей за последние 10 лет (2016-2024 гг.), в которых изложены основные результаты диссертации.....	81
4.2. Список патентов за последние 10 лет (2016-2024 гг.), связанных с диссертацией.....	84
4.3. Список научных статей, опубликованных до 2016 г., в которых изложены основные результаты диссертации.....	84
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	87

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Наземные растения подвергаются воздействию многочисленных неблагоприятных факторов (включая сильный свет, неоптимальные температуры, механическое повреждение и многие другие), действие которых может быть пространственно-неоднородным. Вследствие этого, растениям необходимы стрессовые сигналы, распространяющиеся из зоны действия стрессора в интактные части растительного организма и вызывающие системные физиологические ответы (Dempsey, Klessig, 2012; Shah, Zeier, 2013; Devireddy et al., 2018; Hilleary, Gilroy, 2018). Такую роль могут выполнять электрические сигналы, представленные у растений потенциалами действия, системными потенциалами и переменными потенциалами (ВП) (Fromm, Lautner, 2007; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Pachú et al., 2023).

ВП является уникальным деполяризационным электрическим сигналом высших растений (Stahlberg et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Szechyńska-Hebda et al., 2017), который генерируется у растений в ответ на локальное действие повреждающих факторов (например, ожог, экстремальный нагрев или раздавливание), имеет сложную форму и большую длительность (десятки минут). По-видимому, ВП представляет собой электрический ответ на распространение сигнала неэлектрической природы (Pachú et al., 2023), в качестве которого рассматривают либо распространение гидравлической волны, либо перенос химического агента. Дальнейшее развитие ВП предположительно связано с активацией механочувствительных (в случае гидравлической гипотезы) или лиганд-зависимых (в случае химической гипотезы) Ca^{2+} каналов плазматической мембраны и входом ионов кальция, который приводит к длительной инактивации H^+ -АТФазы плазматической мембраны, формируя волну деполяризации (Szechyńska-Hebda et al., 2017; Pachú et al., 2023); вызванная Ca^{2+} активация анионных каналов, вероятно, также участвует в генерации ВП (Воденеев и др., 2011; Katicheva et al., 2014), формируя быструю деполяризацию (начальная деполяризация, спайки).

Индукция переменного потенциала повреждающими воздействиями показывает, что генерация и распространение ВП возникает в критичных для выживания растения ситуациях. С учетом этого, можно ожидать, что ВП должен вызывать масштабные физиологические изменения и, вероятно, играть роль в адаптации растения к экстремальным факторам среды. Действительно, из литературы известно, что ВП влияет на экспрессию защитных генов и продукцию стрессовых фитогормонов (Mousavi et al., 2013; Farmer et al., 2020), вызывает длительную окклюзию пластинок ситовидных элементов каллозой (van Bel et al., 2014), стимулирует дыхание (Lautner et al., 2014), индуцирует многофазные изменения транспирации (Vuralhan-Eckert et al., 2018), замедляет ростовые процессы (Stahlberg, Cosgrove, 1996) и вызывает другие физиологические ответы.

Фотосинтез, играющий ключевую роль в обеспечении растения энергией и органическими соединениями, также является важной «мишенью» ВП (Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015); при этом изменения могут развиваться как в фотосистеме I (ФСI), так и в фотосистеме II (ФСII). В частности, показано, что локальное действие повреждающих факторов, которое индуцирует распространение переменного потенциала, может вызывать быструю (обычно, до 5-10 мин) (Grams et al., 2009; Białasek et al., 2017) и/или длительную (до часа и более) (Hlavácková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012) инактивацию фотосинтетических процессов. Можно ожидать, что быстрая инактивация фотосинтеза играет важную роль в адаптации растения к действию неблагоприятных факторов, так как именно она представляет собой наиболее ранний этап системного фотосинтетического ответа растения при локальном повреждении.

Такое предположение требует подробных исследований; в частности, необходимо ответить на следующие фундаментальные вопросы: Какие фотосинтетические параметры меняются при развитии быстрой инактивации фотосинтеза? Являются ли ВП

необходимыми для ее индукции? Каковы механизмы формирования быстрой инактивации фотосинтеза? Влияет ли быстрая инактивация фотосинтеза на устойчивость растения (в частности, его фотосинтетического аппарата) к действию неблагоприятных факторов? Каковы пути такого влияния?

Учитывая потенциальную роль вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза в адаптации растений, исследование этой проблемы требует также решения вопросов прикладного характера: Существуют ли методы модификации ВП и вызванной им быстрой инактивации фотосинтеза? Существуют ли методы мониторинга развития ВП и быстрой инактивации фотосинтеза? Решение отмеченных прикладных вопросов создаст предпосылки для разработки новых методов оценки состояния растений и повышения их выживаемости в неблагоприятных условиях.

Диссертационная работа посвящена анализу заявленных вопросов, связанных с ВП и быстрой инактивацией фотосинтеза. При этом, в работе, прежде всего, исследуется влияние ВП и быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость растений, так как именно высокие температуры (вплоть до ожога) являются наиболее эффективным индуктором переменного потенциала [A65]; т.е., можно ожидать, что влияние на устойчивость к нагреву может быть одной из ключевых функций ВП.

Степень разработанности темы исследования

К моменту начала диссертационного исследования, значительное число работ было направлено на изучения механизмов генерации и распространения переменного потенциала (Воденеев и др., 2011; Stahlberg et al., 2006; Katicheva et al., 2014), а также велись активные феноменологические исследования быстрой инактивации фотосинтеза (см. обзоры Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015), которые показали уменьшение фотосинтетической ассимиляции CO_2 (A), снижение квантовых выходов фотосистем I (F_{PSI}) и II (F_{PSII}) и возрастание нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла а (NPQ) при развитии такой инактивации. Роль ВП в формировании быстрой инактивации фотосинтеза была показана на основании двух групп аргументов. (i) Более раннее формирование ответов фотосинтеза наблюдалось около проводящих пучков (Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009; Gallé et al., 2013), которые являются основным каналом передачи ВП. (ii) Ответы фотосинтеза подавлялись в условиях подавления генерации и распространения электрических сигналов (растения дефицитные по кальцию) (Lautner et al., 2005).

В то же время, в отдельных работах были показаны некоторые механизмы влияния электрических сигналов на фотосинтез. Прежде всего, было показано (Krupenina, Bulychov, 2007; Pavlovič et al., 2011), что подавление темновой стадии может быть ключевым этапом формирования быстрой инактивации фотосинтеза при распространении потенциала действия. В частности, выявлено, что вызванные потенциалом действия изменения световой стадии полностью подавляются в условиях низкой концентрации CO_2 (Pavlovič et al., 2011); т.е., в условиях, предварительной инактивации темновой стадии фотосинтеза и подавления ее ответов при распространении электрического сигнала. Однако, применимость предложенного механизма к влиянию ВП на фотосинтез оставалась слабо исследованной. Единственная работа в этой области (Gallé et al., 2013) показывала снижение проводимости мезофилла для CO_2 в ходе развития ВП; при этом количественный анализ связи изменений проводимости мезофилла и параметров световой стадии фотосинтеза отсутствовал. Во-вторых, было показано (Grams et al., 2009), что влияние ВП может опосредоваться изменениями pH внутри и вне клетки, что подтверждалось выявлением защелачивания апопласта и закисления цитоплазмы на фоне развития переменного потенциала, а также уменьшением F_{PSII} у хлоропластов при закислении среды выделения.

Таким образом, на момент начала диссертационного исследования имелась достаточно ограниченная аргументация в поддержку участия ВП в формировании быстрой инактивации фотосинтеза (снижения A, F_{PSI}, F_{PSII} и возрастания NPQ). В то же

время, отсутствовало целостное понимание путей формирования такой инактивации при распространении переменного потенциала. Остальные вопросы, отмеченные в предыдущем разделе, оставались практически не изученными.

Цель и задачи исследования

Цель диссертационной работы заключалась в комплексном исследовании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза у высших растений, включая анализ ее механизмов и влияния на теплоустойчивость, а также поиск подходов к регуляции и мониторингу такой инактивации.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Провести феноменологический анализ влияния переменного потенциала на фотосинтетические процессы, включая оценку необходимости участия ВП в формировании фотосинтетического ответа.
2. Провести анализ механизмов формирования быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной переменным потенциалом.
3. Провести анализ путей влияния переменного потенциала и вызванной им быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом
4. Исследовать факторы, модифицирующие формирование переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза.
5. Оценить возможность выявления распространения переменного потенциала и развития быстрой инактивации фотосинтеза методами оптического мониторинга.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования служили сельскохозяйственные и комнатные растения. Растения гороха выступали в качестве основного объекта исследования, так как представляли собой стандартный объект, с заранее определенными условиями выращивания и измерений. ВП и быстрая инактивация фотосинтеза у гороха были достаточно хорошо выражены. В качестве дополнительных объектов использовали пшеницу, тыкву, томаты, герань и другие, что позволяло оценить универсальность полученных результатов. Основными предметами исследования были переменный потенциал, быстрая инактивация фотосинтеза и теплоустойчивость у изучаемых растений.

Научная новизна работы

В ходе выполнения диссертационного исследования были использованы современные методы и подходы, включая разработанные автором, которые позволили получить ряд новых результатов.

Прежде всего, было впервые показано, что ВП вызывает обратимое возрастание циклического потока электронов вокруг фотосистемы I (CEF); для решения этой задачи был разработан улучшенный метод расчета CEF на базе измерения F_{PSI} и F_{PSII} в условиях исследуемого и слабого актиничного освещения.

Проведен масштабный анализ связи между параметрами ВП и быстрой инактивацией фотосинтеза, что позволило показать сильную связь между ними в условиях естественной переменности параметров ВП, в условиях различных расстояний от зоны повреждения, в условиях дополнительного воздействия фитогормонами. Такой анализ подтвердил ключевую роль ВП в индукции быстрой инактивации фотосинтеза.

Комплексно исследованы механизмы индукции быстрой инактивации фотосинтеза при распространении ВП и впервые показаны два разных пути формирования фотосинтетического ответа. Первый путь обусловлен вызванной ВП инактивацией темновой стадии фотосинтеза, которая индуцируется защелачиванием апопласта растения; далее, инактивация темновой стадии приводит к ответу световой стадии. Вторым путем обусловлен непосредственным влиянием ВП на световую стадию фотосинтеза; такое влияние связано с закислением цитоплазмы, которое приводит к снижению pH в строме и люмене хлоропластов. Дополнительно, впервые сформулирована и подтверждена гипотеза о необходимости низкой проводимости устьиц в качестве условия их участия в

вызванном ВП ответе фотосинтеза; т.е. сформулированы условия для функционирования третьего пути формирования вызванного ВП фотосинтетического ответа.

Впервые показано, что ВП вызывает сложное изменение теплоустойчивости фотосинтетического аппарата гороха и выявлены его механизмы. При сильном нагреве листьев (около 53°C), предварительная индукция переменного потенциала вызывает повышение теплоустойчивости ФСІ; однако, происходит рост температурного повреждения ФСІІ. Показано, что возрастание теплового повреждения ФСІІ обусловлено снижением транспирации после распространения ВП и избыточным нагревом листа растения. Возрастание теплоустойчивости ФСІ обусловлено быстрой инактивацией фотосинтеза, что, в частности, подтверждается корреляцией между этими величинами и повышением теплоустойчивости при имитации инактивации темновой стадии фотосинтеза. Возрастание NPQ, SEF и содержания АТФ в листе являются вероятными механизмами повышения теплоустойчивости ФСІ. Кроме того, снижение теплового повреждения ФСІ положительно связано с увеличением теплового повреждения ФСІІ, что показывает роль вызванного ВП усиления теплового повреждения ФСІІ в повышении теплоустойчивости ФСІ. Напротив, в условиях более слабого нагрева (50°C и ниже), генерация электрических сигналов положительно связана с теплоустойчивостью ФСІІ.

Впервые выявлен ряд факторов, стимулирующих или подавляющих формирование ВП и быстрой инактивации фотосинтеза. Так впервые показано, что стимуляция ответов может происходить за счет флуктуаций активности H^+ -АТФазы, неоднородности ее пространственного распределения, а также путем предварительной обработки растений 24-эпибрассинолидом (ЭБЛ). Подавление ответа может развиваться в условиях сильной засухи и при предварительной обработке растения абсцизовой кислотой (АБК).

Впервые предложен ряд подходов для дистанционного мониторинга распространения ВП и развития инактивации фотосинтеза, которые опираются на измерения отраженного света и последующий анализ показателей фотохимического индекса отражения (PRI) и новых узкополосных индексов отражения. Показано принципиальное сходство влияния ВП и непосредственного действия стрессоров (избыточный свет, нагрев, засуха) на показатели отражения. Кроме того, впервые выявлено, что распространение ВП влияет на отражение в широких спектральных диапазонах и, в частности, индуцирует изменения широкополосных индексов отражения.

При анализе спектров отражения предложен новый тип тепловых карт, которые показывают статистическую значимость и направление изменений. Такой подход позволяет быстро выявить чувствительные к действующему фактору или к распространению ВП индексы без дополнительных измерений физиологических характеристик.

Впервые разработан ряд математических моделей процессов фотосинтеза и электрогенеза, которые позволили дополнить экспериментальный анализ исследованиями, базирующимися на разработанных моделях.

Новизна результатов диссертационного исследования отражена в научных публикациях в передовых международных изданиях, а также патентом на систему пространственного имиджинга фотохимического индекса отражения (PRI) [A58], которая была разработана с использованием предложенного нового метода измерения PRI с помощью коротких импульсов желто-зеленого измерительного света.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты имеют как фундаментальную, так и прикладную значимость. С фундаментальной точки зрения, результаты исследования показывают новый механизм формирования системного адаптационного ответа растений на локальное действие повреждающих факторов (в частности, высокой температуры), включая генерацию и распространение ВП, формирование быстрой инактивации фотосинтеза, изменение теплоустойчивости фотосинтетического аппарата и возрастание теплоустойчивости растения в целом. Можно ожидать, что такой сценарий системного

адаптационного ответа растений может развиваться при действии экстремальных факторов среды (в частности, экстремальных повышений температуры или пожаров) и повышать шансы на выживание растений в этих условиях. Учитывая, что развитие глобальных климатических изменений повышает вероятность экстремальных температур и пожаров, выявление фундаментальных механизмов быстрого ответа растения в таких условиях имеет высокую значимость.

С практической точки зрения, полученные результаты создают основу для разработки новых методов управления теплоустойчивостью растений на основании стимуляции или подавления формирования ВП и быстрой инактивации фотосинтеза; в частности, для решения этой задачи может быть использована обработка растений экзогенными ЭБЛ или АБК, соответственно. Подобные методы управления теплоустойчивостью могут быть использованы для быстрой коррекции ответов растения на условия среды и стать одним из инструментов «точного земледелия».

Другая группа прикладных результатов связана с развитием методов мониторинга вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза у растений. К этому относится, в частности, разработка новых методов измерения и анализа фотохимического индекса отражения и выявление ряда новых индексов отражения, чувствительных к показателям фотосинтеза. Учитывая, что распространение ВП и формирование быстрой инактивации фотосинтеза является одним из наиболее ранних ответов растения на повреждение, результаты диссертационного исследования создают предпосылки для разработки методов раннего выявления действия экстремальных неблагоприятных факторов на растения. Важно также отметить, что разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методы и подходы (методы повышения эффективности использования PRI, система для измерения пространственного распределения PRI, метод построения тепловых карт на основании значимости и направления изменений и др.) могут быть использованы для детекции различных вариантов фотосинтетических ответов, включая вызванные непосредственным действием неблагоприятных факторов. Таким образом, полученные результаты расширяют инструментарий для дистанционного и проксимального имиджинга стрессовых изменений фотосинтеза у растений; т.е. могут быть использованы в точном земледелии и экологическом мониторинге.

Методология и методы исследования

Работа проводилась с использованием современных высокоточных инструментальных методов, включая как методы, широко используемые в мировой практике исследований, так и разработанные при участии автора. Исследования фотосинтеза проводились с использованием ряда систем РАМ-флуориметрии (включая системы РАМ имиджинга), системы для выполнения OJIP-теста и системы для анализа газообмена растений. Электрофизиологические ответы исследовались при помощи микро- и макроэлектродного отведения; последнее в большинстве экспериментов осуществляли параллельно с измерениями ответов фотосинтеза. Полные спектры отражения листьев были измерены спектрометром, а для измерения PRI использовали разработанную совместно с ИПФ РАН систему его пространственного имиджинга; обе системы позволяли измерять показатели отражения одновременно с фотосинтетическими измерениями. Широко применялись флуоресцентные и люминесцентные методы, включая использование флуоресцентных pH-чувствительных зондов и люциферин-люциферазный метод. Для комплексного анализа спектров отражения и визуализации полученных результатов была разработана серия программных инструментов с использованием языка программирования Python. Также был разработан ряд «точечных» и «пространственных» математических моделей различного уровня детализации для анализа влияния ВП на физиологические процессы (прежде всего, фотосинтез).

Личный вклад автора

Автор лично ставил цели и задачи исследований, проводил их детальное планирование, непосредственно выполнял или организовывал проведение экспериментов,

анализ данных и разработку математических моделей, интерпретировал полученные результаты, представлял результаты на научных конференциях. Автор участвовал в подготовке всех статей по теме диссертационного исследования, выполняя ключевую роль в подготовке большинства из них. Основные результаты были получены либо лично автором, либо под его непосредственным руководством.

Значительная часть исследований проводилась в рамках проектов, в которых автор выступал в качестве руководителя. Среди них можно отметить проекты Российского научного фонда: проект № 14-26-00098 («Роль электрогенеза в повышении устойчивости и увеличении продуктивности сельскохозяйственных растений при их обработке фитогормонами», 2014-2016 гг.), проект № 17-76-20032 («Ранняя дистанционная диагностика стрессового фотосинтетического ответа сельскохозяйственных растений при действии неблагоприятных факторов», 2017-2020 гг., 2020-2022 гг.), проект № 23-14-00127 («Комплексное математическое моделирование оптических свойств и фотосинтетических процессов СЗ растений как инструмент усовершенствования методов их дистанционного мониторинга на основе мультиспектрального и гиперспектрального имиджинга», 2023-2025 гг.). Также под руководством автора был выполнен ряд проектов Российского фонда фундаментальных исследований: проект № 14-04-01899 А («Влияние электрических сигналов на энергетический статус растений: феноменология и анализ механизмов», 2014-2016 гг.), проект 18-44-520009 («Математическое моделирование фотосинтеза СЗ растений в условиях быстрых колебаний интенсивности освещения», 2018-2021 гг.), проект № 19-04-00614 А («Роль пространственной неоднородности в регуляции электрического ответа листа высшего растения на действие стрессора: теоретический и экспериментальный анализ», 2019-2021 гг.).

Автор участвовал в разработке метода регистрации фотохимического индекса отражения и системы его мониторинга, которая была разработана совместно с ИПФ РАН. На систему мониторинга PRI был получен патент [А58]; она использовалась при выполнении ряда экспериментов в рамках диссертационного исследования.

Под руководством автора по теме исследования было защищено 3 кандидатские диссертации, а также более 20 дипломных работ специалистов, бакалавров и магистров. Результаты авторы были отмечены наградами различного уровня, включая почетную грамоту Министерства образования Нижегородской области (2015 г.) и золотую медаль Международной агропромышленной выставки-ярмарки "Агрорусь" (Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2016).

Положения, выносимые на защиту

1. Локальные повреждающие воздействия (прежде всего, локальный ожог) вызывают распространение переменного потенциала, который индуцирует быструю инактивацию фотосинтетических процессов (5-10 мин). Временное снижение активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны является индуктором такой инактивации. При этом, защелачивание апопласта нарушает поступление CO_2 в фотосинтезирующие клетки, вызывая инактивацию темновой стадии фотосинтеза, что является одним из механизмов инактивации световой стадии. С другой стороны, закисление цитоплазмы приводит к снижению pH в строме и люмене хлоропластов, непосредственно инактивируя процессы световой стадии (снижая нециклический поток электронов (LEF) и увеличивая CEF и NPQ, а также повышая потери на акцепторной стороне ФСII).

2. Переменный потенциал изменяет устойчивость фотосинтетического аппарата к нагреву и повышает общую теплоустойчивость растения. В случае действия высокой температуры (около $53^{\circ}C$), вызванное переменным потенциалом снижение транспирации и увеличение температуры листа при нагреве повышают тепловое повреждение ФСII, а вызванная ВП быстрая инактивация фотосинтеза повышает теплоустойчивость ФСI. При этом, вызванное переменным потенциалом усиление теплового повреждения ФСII само является дополнительным фактором снижения

теплового повреждения ФСІ. В случае меньших температур (50°C и ниже), ВП, по-видимому, может повышать теплоустойчивость ФСІІ.

3. Формирование переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза могут быть модифицированы рядом факторов, включая естественную переменность активности Н⁺-АТФазы плазматической мембраны, длительное действие засухи и предварительную обработку экзогенными АБК и ЭБЛ. Последнее является потенциальным инструментом для управления индукцией ВП и формированием быстрой инактивации фотосинтеза, путем их стимуляции (обработка ЭБЛ) или подавления (обработка АБК).

4. Формирование вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза сопровождается изменением величины фотохимического индекса отражения (PRI) и ряда выявленных узкополосных индексов, включая RI(571,542), RI(538,500), RI(646,554) и RI(692,662); такие индексы могут быть использованы для детектирования и количественной оценки изменений фотосинтетической активности после индукции ВП. Показатели отражения в широких спектральных диапазонах (100 нм) также медленно меняются после распространения переменного потенциала (десятки минут); однако, такие изменения не связаны с фотосинтетическими процессами и, по-видимому, обусловлены небольшим снижением содержания воды в листе, которое развивается после индукции ВП.

Достоверность и апробация результатов

Достоверность полученных научных результатов обеспечена применением современного высокоточного и апробированного оборудования, надежных экспериментальных методов, комплексных методов анализа и обработки данных, широко используемых статистических методов, воспроизводимостью результатов исследования. Достоверность результатов анализа разработанных математических моделей подтверждается их параметризацией и верификацией, а также использованием хорошо показавших себя ранее описаний и упрощений при разработке таких моделей. Полученные результаты расширяют и дополняют представления, сформулированные в ходе работы других исследовательских групп. Достоверность полученных результатов дополнительно подтверждается публикациями в международных рецензируемых журналах высокого уровня. По теме диссертации за последние 10 лет (с 2016 г) было опубликовано 57 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, включая индексируемые в базах данных Web of Science и Scopus и имеющие рейтинг Q1 или Q2 по SJR (45) и индексируемые RSCI (12). Из них 42 статьи в журналах Q1 (SJR). Имеется также ряд более ранних статей в ведущих научных журналах по теме диссертационного исследования.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных международных и всероссийских конференциях, в том числе: Plant signaling and behavior 2016. 4rd International symposium. Proceedings. St. Petersburg, RUSSIA, 19–24 June, 2016; 7th International conference on “Photosynthesis Research for Sustainability-2016”: In honor of Nathan Nelson and Turhan Nejat Veziroğlu, Pushchino, Russia, 2016; IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений», Казань, 2016; Годичное собрание общества физиологов растений России. «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», Санкт-Петербург, 2016; V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Дагомыс, 2016; VIII Съезд Российского фотобиологического общества Всероссийская конференция “Современные проблемы фотобиологии”, Шепси, 2017; 8th International Conference “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2017” in honor of Agepati S. Raghavendra, William A. Cramer, and Govindjee, India, Hyderabad, 2017; Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, научная конференция и школа для молодых ученых, 2017 г., Судак; Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 2017; Механизмы

устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды, Годичное собрание Общества физиологов растений России, Иркутск, 2018; V Международная научно-практическая конференция «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений», Москва, 2019; 10th International Conference “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019” in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum”, Saint Petersburg, Russia, 2019; IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» Казань, 2019; VI Съезд биофизиков России, Краснодар, 2019; Conference proceedings 3rd International Conference Volga Neuroscience Meeting, Nizhny Novgorod, 2021; IX Съезд Российского фотобиологического общества. Всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии», Шепси, 2021; Второй международный агроэкологический форум, Санкт-Петербург, 2021; Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий», Годичное собрание Общества физиологов растений России, Нижний Новгород, 2022; X съезд российского фотобиологического общества, конференция «современные проблемы фотобиологии», Шепси, 2023; I региональное собрание РФО и Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники», Нижний Новгород, 2024.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДОКЛАДА

2.1. Электрические сигналы у растений и их функциональная роль

В естественных условиях наземные растения подвержены влиянию многочисленных неблагоприятных факторов, действие которых может иметь пространственно-неоднородный характер [A16]; в частности, избыточный свет действует преимущественно на листья, неблагоприятные температуры сильнее влияют на побег, нежели на корень, механическое повреждение действует на конкретные зоны растительного организма. Вследствие этого, растению требуются стрессовые сигналы, распространяющиеся из зон действия стрессоров в неповрежденные участки растения и обеспечивающие координацию физиологических процессов на уровне целого организма (Dempsey, Klessig, 2012; Shah, Zeier, 2013; Devireddy et al., 2018; Hilleary, Gilroy, 2018). Электрические сигналы, представляющие собой обратимые изменения градиента электрического потенциала на плазматической мембране (E_m) и способные к распространению, играют, по-видимому, важную роль в качестве быстрых стрессовых сигналов у растений (Fromm, Lautner, 2007; Hedrich et al., 2016; Huber, Bauerle, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Pachú et al., 2023).

Из литературы известно, что электрические сигналы могут индуцировать экспрессию защитных генов, включая PIN1, PIN2 и VSP2 (Wildon et al., 1992; Mousavi et al., 2013), стимулировать синтез стрессовых фитогормонов, включая абсцизовую и жасмоновую кислоты (Hlavácková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Farmer et al., 2020), нарушать загрузку флоэмы (Fromm, 1991; Fromm, Bauer, 1994), вызывать временную остановку флоэмного потока и длительную окклюзию ситовидных элементов каллозой (Furch et al., 2007, 2009; van Bel et al., 2014), стимулировать дыхание (Filek, Kościelniak, 1997; Lautner et al., 2014), модифицировать транспирацию, вызывая ее многофазные изменения (Kaiser, Grams, 2006; Vuralhan-Eckert et al., 2018), замедлять ростовые процессы (Shiina, Tazawa, 1986; Stahlberg, Cosgrove, 1996) и влиять на многие другие физиологические процессы растений. Считается, что конечным результатом многообразных физиологических ответов является возрастание устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов (Ретивин и др., 1997, 1999; Szechyńska-Hebda et al., 2017). Согласно данным литературы, такое возрастание может проявляться как в снижении повреждения фотосинтетического аппарата и сохранении хлорофиллов при действии стрессоров (охлаждение, нагрев, избыточный свет), так и в меньшем нарушении целостности плазматической мембраны (Ретивин и др., 1999; Szechyńska-Hebda et al., 2010; Zandalinas et al., 2020a, 2020b). Отмеченные результаты показывают, что электрические сигналы участвуют в формировании системного адаптационного ответа.

При этом, фотосинтез является важной «мишенью» для электрических сигналов. В ряде работ показано (см. обзор [A1]), что такие сигналы могут вызывать быструю (5-10 мин) и длительную (до часа и более) инактивацию фотосинтетических процессов (снижение ассимиляции CO_2 и активности потока электронов в ФСІ и ФСІІ и возрастание NPQ), активацию фотосинтеза (возрастание A), а также комбинированные ответы. При этом, быстрая инактивация фотосинтеза (Kaiser, Grams, 2006; Gallé et al., 2013; Białasek et al., 2017; Szechyńska-Hebda et al., 2022) является широко распространенным и наиболее ранним фотосинтетическим ответом. Существует гипотеза о том, что вызванные электрическими сигналами физиологические ответы облегчают развитие специфических адаптационных изменений, которые индуцируются более медленным распространением сигналов другой природы (Choi et al., 2017; Szechyńska-Hebda et al., 2017). Исходя из нее, можно предполагать, что именно быстрая инактивация фотосинтеза в наибольшей степени связана с распространением электрических сигналов и требует особо тщательного изучения.

В настоящее время, выделяют три основных типа распространяющихся электрических сигналов у растений [A1,A16,A51,A57]: потенциал действия, системный потенциал и вариабельный потенциал (ВП) (Рис. 1). Потенциал действия представляет

собой короткую (десятки секунд – минуты) импульсную реакцию, которая возникает при действии неповреждающих стрессоров (охлаждение, надавливание, действие солей и другие), направлена в сторону деполяризации, подчиняется закону «все или ничего» и активно распространяется по симпласту проводящих пучков и/или ситовидным элементам (Trebacz et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007). Генерация потенциала действия является результатом активации потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов плазматической мембраны, входа ионов кальция в цитоплазму и последующей активации анионных и outwardly-rectifying калиевых каналов, а также кратковременной инактивации H^+ -АТФазы (Felle, Zimmermann, 2007; Sukhov, Vodeneev, 2009).

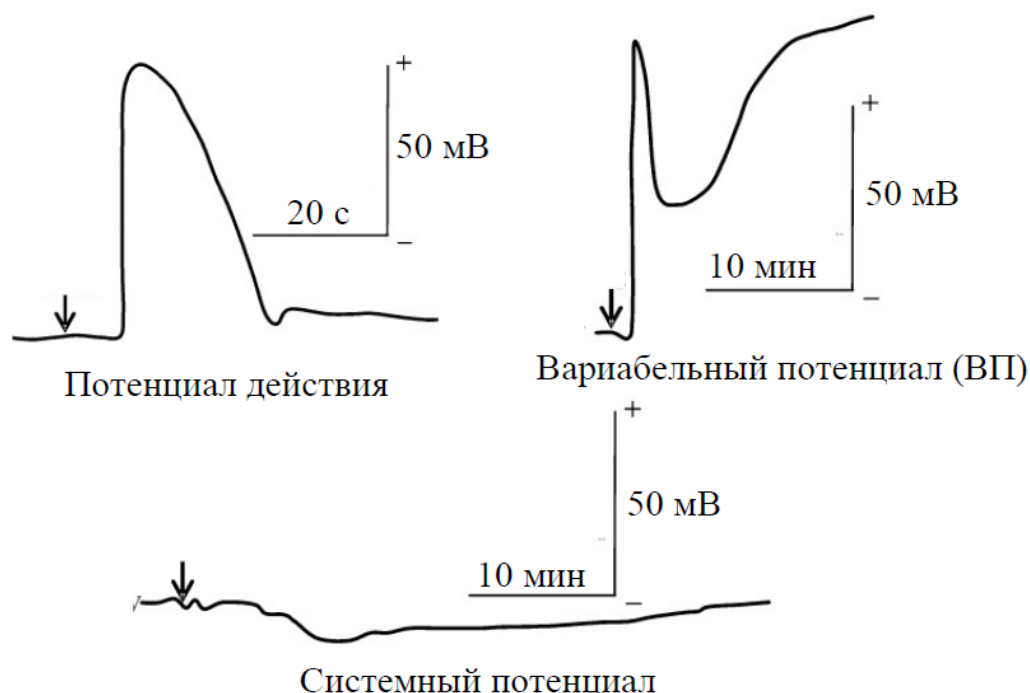


Рис. 1. Схемы основных типов распространяющихся электрических сигналов у высших растений (на основе [A1]). Стрелка обозначает момент локального действия стимула. Для потенциала действия это неповреждающие воздействия (охлаждение, надавливание, действие солей и др.). Для вариабельного потенциала (ВП) это повреждающие воздействия (ожог, экстремальный нагрев, раздавливание). Для системного потенциала, по-видимому, это могут быть как повреждающие, так и неповреждающие воздействия.

Системный потенциал представляет собой длительную (десятки минут) электрическую реакцию сложной формы, направленную в сторону гиперполяризации (Zimmermann et al., 2009, 2016), которая может возникать как при действии неповреждающих, так и повреждающих стрессоров. Механизмы системного потенциала остаются до конца неизвестными; однако, он может быть связан с распространением по ксилеме гидравлической волны с малой амплитудой, приводящей к умеренной активации механочувствительных Ca^{2+} каналов плазматической мембраны и небольшому входу Ca^{2+} в цитоплазму; в свою очередь, возрастание концентрации ионов кальция может приводить к закрытию inwardly-rectifying калиевых каналов и смещению результирующего мембранного потенциала в более отрицательную область [A51].

ВП является длительным (десятки минут) деполяризационным сигналом сложной формы (Stahlberg et al., 2006; Szechyńska-Hebda et al., 2017), который возникает у высших растений при локальном действии повреждающих факторов (ожог, экстремальный нагрев, механической раздавливание). По-видимому, распространение ВП является результатом передачи сигнала неэлектрической природы: химического агента (возможно H_2O_2) или гидравлической волны [A65], которые, в свою очередь, могут индуцировать существенный вход Ca^{2+} через лиганд-зависимые или механочувствительные кальциевые

каналы, приводя к длительной инактивации H^+ -АТФазы и сдвигу мембранного потенциала в более положительную сторону. Учитывая, что ВП индуцируется в крайне неблагоприятных для растений условиях, можно предположить, что этот сигнал играет важную роль в формировании системного адаптационного ответа растений в случае угрозы их выживанию [A16] и, вследствие этого, требует особо тщательного изучения.

Таким образом, диссертационное исследование было сосредоточено на изучении переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза, индуцированной распространением ВП.

2.2. Объекты и основные методы исследования

2.2.1. Растительные объекты и их культивирование

В качестве основного объекта исследования использовался 2-3-недельный горох (*Pisum sativum* L.). Дополнительные объекты, также использованные для исследования влияния ВП в некоторых экспериментах, включали 2-3-недельные пшеницу (*Triticum aestivum* L.) и тыкву (*Cucurbita pepo* L.), 5-недельный томат (*Solanum lycopersicum* L.) и 2-месячную герань (*Pelargonium zonale* L.). В различных вариантах экспериментов, растения выращивали в климатической камере Binder KBW-240 (Binder GmbH, Туттинген, Германия) [A2,A5,A61] или в специально оборудованной вегетационной комнате с контролируемыми условиями выращивания [A39,A44]; при температуре 24°C и 16-часовом фотопериоде. Выращивание осуществлялось гидропонным методом на среде Хогланда-Арнона [A2,A5,A61], песке [A39,A44] или почве [A49,A59].

2.2.2. Индукция переменных потенциалов локальным действием повреждающих факторов

Ожог использовали в качестве основного индуктора переменного потенциала, что соответствует данным литературы (Stanković and Davies, 1996; Hlaváčková et al., 2006; Grams et al., 2009). При этом, в случае гороха на кончик верхнего первого сформировавшегося листа площадью 1 см² воздействовали открытым пламенем в течение 3-4 с [A2,A3,A4]. В качестве дополнительных индукторов ВП использовали постепенный нагрев раствора, в который была погружена примерно половина стимулированного листа, от 22-24°C – до 60°C с использованием элемента Пельтье [A13,A34,A35] и механическое раздавливание половины листа пластмассовым цилиндром [A13]. Сходным образом локальный ожог и/или локальный нагрев наносили на семядоли тыквы [A60,A66], листья герани [A59], пшеницы [A34,A35] или томата [A49].

2.2.3. Измерения электрической активности

В большинстве экспериментов для измерения электрической активности использовали экстраклеточное отведение [A3,A12,A17,A44, A47,A49,A55]. Установка для измерения электрической активности включала в себя $Ag^+/AgCl$ электроды (ЭВЛ-1МЗ, Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь), высокоомный милливольтметр (10^{-12} Ом) (ИПЛ-113, Семико, Россия) и персональный компьютер. Электроды контактировали с растением с помощью электропроводящего геля Uniagel (Гельтек-Медика, Россия) или фитилей, смоченных стандартным раствором (1 mM KCl, 0.5 mM $CaCl_2$ и 0.1 mM NaCl). Электрод сравнения помещали в стандартный раствор, омывающий корень растения. Для одновременного измерения фотосинтетических показателей и электрической активности листа в отдельной серии экспериментов [A8] в качестве электродов использовались серебряные заостренные проволочки, которые подвели к листу, зажатому в системе для измерения фотосинтетических показателей.

В ряде экспериментов также использовали микроэлектродное отведение; такое отведение позволяло осуществить точную оценку показателей сигнала [A2,A34,A61] и определить активность H -АТФазы по величине метаболического потенциала [A23,A25]. Метаболический потенциал (E_p) оценивали по изменению мембранного потенциала (E_m) при действии высокой концентрации ортованадата натрия (ОВ, 5 mM). Измерительная система включала в себя микроскоп SliceScope Pro 2000 (Scientifica, Великобритания),

усилитель Multiclamp 700 В (Molecular Devices, США), систему сбора электрофизиологических данных DIGIDATA 1550 с низким уровнем шума (Molecular Devices, Sunnyvale, США) и персональный компьютер [A2,A47,A61]. Микропипетки были изготовлены с использованием микроузницы Sutter Micropipette Puller P-97 (SutterInstrument, США). Микроэлектроды, заполнялись 100 мМ раствором KCl. Электрод сравнения помещался в стандартный раствор, контактирующий с листом.

2.2.4. Исследование фотосинтетических процессов и транспирации

В исследованиях применялось несколько систем для оценки фотосинтетических процессов и/или транспирации. В большинстве экспериментов, использовали комбинацию газоанализатора GFS-3000, ПАМ-флуориметра Dual-PAM-100 и камеры 3010-Dual (Heinz Walz GmbH, Германия), что позволяло оценивать параметры как фотосинтеза, так и транспирации [A2,A5,A8,A13,A20,A23,A55]. На основании общепринятых уравнений (von Caemmerer, Farquhar, 1981; Maxwell, Johnson, 2000; Klughammer, Schreiber, 2008) программное обеспечение системы автоматически рассчитывало основные параметры световой и темновой стадии фотосинтеза и транспирации. В частности, рассчитывались величины ассимиляции (A) и транспирации (E), водная проводимость устьиц (g_{H_2O}), квантовые выходы ФCI (ϕ_{PSI}) и ФCII (ϕ_{PSII}), NPQ и ряд других показателей. Энергозависимую компоненту NPQ (NPQ_F) определяли по величине быстрой релаксации NPQ (минуты) после прекращения действия актиничного света (Maxwell, Johnson, 2000).

Расчет нециклического потока электронов (LEF) и циклического потока электронов вокруг ФCI (CEF) осуществлялся на базе уравнений (1), (2) и (3), которые опирались на литературу (Miyake et al., 2004, 2005; Huang et al., 2012; Zivcak et al., 2013) и предложенные в рамках диссертационного исследования подходы [A12,A25,A44,A48,A53,A55,A63]:

$$LEF = Abs \cdot dII \cdot \phi_{PSII} \cdot PAR \quad (1)$$

$$CEF = Abs \cdot ((1 - dII) \cdot \phi_{PSI} - dII \cdot \phi_{PSII}) \cdot PAR \quad (2)$$

$$dII = \frac{\phi_{PSI}^{LL}}{\phi_{PSI}^{LL} + \phi_{PSII}^{LL}} \quad (3)$$

где Abs=0,88 – доля поглощенного листьями фотосинтетически активного света (PAR) для гороха [A63]; dII – доля поглощенной PAR, направленная к фотосистеме II, ϕ_{PSI}^{LL} и ϕ_{PSII}^{LL} – квантовые выходы ФCI и ФCII в условиях низкой интенсивности освещения (в исследовании широко использовалось $24 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$).

В экспериментах с одновременной регистрацией спектров отражения и активности фотосинтеза совместно использовали Dual-PAM-100 и спектрометр S100 (SOLAR Лазерные Системы, Беларусь), которые имели фиксированное положение относительно друг друга и листа растения [A17,A18,A26,A27,A28,A37,A38]; такое положение обеспечивалось модифицированной камерой Dual-PAM-100 для исследования суспензий. Также Dual-PAM-100 с камерой для исследования суспензий использовался для исследования хлоропластов и протопластов [A21,A60,A61,A66],

Системы имиджинга IMAGING PAM M-Series MINI Version (Heinz Walz GmbH, Германия) [A13,A29,A34,A41,A42,A45] и Open FluorCam-O/1010 (Photon Systems Instruments, Чехия) [A35,A39] использовались для исследования пространственного распределения параметров световой стадии фотосинтеза, включая ϕ_{PSII} , NPQ и LEF. Усреднение показателей позволяло измерять их интегральные величины по участку листа.

Для реализации ОЛР-теста (анализа индукционной кривой флуоресценции хлорофилла а), использовался М-РЕА-2 (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) [A12]. При этом параметры ОЛР теста рассчитывались автоматически при помощи программного обеспечения прибора, которое применяло широко используемые уравнения из работ (Гольцев и др., 2016; Strasser et al., 2000).

Проводимость H^+ -АТФ-синтазы (g_s) и параметры электрохимического градиента на тилакоидной мембране, а также закисление люмена хлоропластов определяли с помощью

Dual-PAM-100, оснащенного P515/535 эмиттер-детекторным модулем [A3,A42]; использовалась конфигурация системы для исследования листьев. Компоненты релаксации электрохромного сдвига использовали для определения относительной величины электрохимического градиента (ECS_{pmf}), градиента протонов ($ECS_{\Delta pH}$) и электрического потенциала ($ECS_{\Delta \psi}$) на тилакоидной мембране в соответствии со стандартным протоколом (Schreiber, Klughammer, 2008). Проводимость H^+ -АТФ-синтазы оценивали как коэффициент при экспоненте после экспоненциальной аппроксимации релаксации электрохромного сдвига при выключении освещения (Wang et al., 2015). Закисление люмена оценивали на основе изменения рассеяния света на длине волны 535 нм после его выключения (минутный интервал) (LS) в соответствии со стандартным протоколом (Schreiber, Klughammer, 2008).

Скорость обмена O_2 в протопластах при имитации формирования ВП [A23] измеряли с помощью Oxygraph Plus System (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания). Система была использована для оценки реакций фотосинтеза (синий актиничный свет, 460 нм, $240 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) и дыхания (темнота). Температура суспензии во время измерения поддерживалась постоянной (25°C). Для повышения точности измерения, все пробы были разделены на два равных объема; опытный (с добавлением раствора ортованадата натрия, являющегося ингибитором H^+ -АТФазы плазматической мембраны) и контрольный (с добавлением стандартного раствора). Исследовали динамику разности опыта и контроля.

2.2.5. Действие стрессовых факторов на фотосинтетический аппарат и растение в целом

Нагрев исследуемого листа растения преимущественно осуществлялся с использованием комплекса для фотосинтетических измерений, состоящего из газоанализатора GFS-3000, Dual-PAM-100 и камеры 3010-Dual [A62,A64]. Первоначальная температура поверхности листа составляла 23°C . Нагрев продолжался 30 мин; основное возрастание температуры происходило в течение 10 мин, после чего температура оставалась относительно стабильной. Использовалось два варианта нагрева: нагрев до фиксированной температуры воздуха, окружающего лист (при этом температура листа регистрировалась и могла варьировать) и нагрев до фиксированной температуры листовой пластинки (при этом температура кюветы могла варьировать). Параметры фотосинтеза и газообмена измерялись одновременно с нагревом.

В отдельной серии экспериментов, для быстрого повреждения фотосинтетического аппарата использовали локальный нагрев листа растения в горячей воде (5 минут при 45 или 50°C) при освещении белым светом с интенсивностью около $100 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ [A4]; далее лист осушался (5 мин) и использовался для дальнейшего исследования.

Нагрев целого растения проводили внутри термостата TV-20-PZ-“К” (Касимовский инструментальный завод, Россия) или ТС-1/80 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) до заданных высоких температур в течение 30 или 45 минут [A26,A34,A38,A49,A64].

Засуху индуцировали прекращением полива растений, контроль продолжали поливать [A26,A38]. Вследствие использования песчаного субстрата для выращивания, такая схема обеспечивала быструю потерю воды растением ($4-5$ суток). Развитие засухи оценивали по относительному содержанию воды в побегах (или листьях) и в субстрате.

2.2.6. Оценка теплоустойчивости фотосинтетического аппарата и растений в целом

Различные варианты нагрева листа или растения вызывали быстрое повреждение фотосинтетического аппарата, что проявлялось в снижении фотосинтетических показателей [A4,A34,A38,A49,A62,A64]. Итоговые величины показателей после возвращения температуры к контрольному уровню использовали для оценки теплоустойчивости фотосинтетического аппарата.

Для оценки общей теплоустойчивости растений, сравнивали длину побегов и корней в различных экспериментальных вариантах (контроль без индукции ВП, контроль с индукцией ВП, нагрев без индукции ВП, нагрев с индукцией ВП) [A64].

2.2.7. Измерение изменений внутри- и внеклеточного pH с использованием ратиометрических флуоресцентных зондов

Величины внутри- и внеклеточного pH измерялись при помощи ратиометрического метода [A35,A61,A66,A67] с использованием pH-чувствительных флуоресцентных зондов BCECF-AM и FITC-dextran (Life Technologies, США). Лист растения выдерживали в растворах зондов в течение 12–14 часов при комнатной температуре (50 мкМ раствор FITC-dextran) или при температуре 4°C (20 мкМ раствор BCECF-AM). Далее зонды отмывали при температуре 21–22°C в течение 3 часов. Флуоресценцию измеряли с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu Corp., Япония) и специального модуля для измерения флуоресценции твердых образцов (“Гранат”, Россия). Спектры возбуждения снимали каждые 5 с. Флуоресценцию возбуждали светом в диапазоне 410–500 нм с интенсивностью около $185 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. В экспериментах с BCECF-AM измеряли отношение интенсивности флуоресценции на длине волны 525 нм при длине волны возбуждающего света 490 нм к интенсивности такой флуоресценции при длине волны возбуждающего света 450 нм. В экспериментах с FITC-dextran рассчитывали отношение интенсивности флуоресценции на длине волны 520 нм при длине волны возбуждающего света 490 нм к интенсивности такой флуоресценции при длине волны возбуждающего света 460 нм. Найденные соотношения использовали для расчёта внутри- и внеклеточного pH на основе калибровочной кривой.

Для одновременной регистрации электрических сигналов и качественной оценки изменения pH апопласта [A35] использовали системы флуоресцентной визуализации DVS-03 (ИЛИТ РАН, Россия). 10 мкМ BCECF загружали при комнатной температуре в темноте под временно пониженным давлением (0.2 атм, 10 минут) в лист растения, а затем выдерживали в течение 6 часов при нормальном давлении. Далее проводили отмывание зонда. Флуоресценцию зонда возбуждали при длине волны 488 нм и регистрировали с помощью интерференционного фильтра 530/50 (Zeiss, Германия).

2.2.8. Ингибиторный анализ механизмов влияния переменного потенциала на фотосинтез

Обработка протонофором КЦХФГ (Sigma-Aldrich, Inc., США) была использована для индукции входа протонов в клетки и анализа последующих фотосинтетических изменений [A61]. При этом прикрепленный к растению лист, у которого заранее срезали эпидермис, инкубировали в стандартном растворе с буфером (MES-КОН, 20 мМ, pH=6) в измерительной камере Dual-PAM-100 (сборка для суспензий). КЦХФГ добавляли после темновой и световой адаптации, которая сопровождалась измерением параметров световой стадии фотосинтеза. Контроль pH в среде осуществлялся с помощью pH-электрода ЭСК-10614 (ООО “НПП” Biomer, “Измерительные технологии”, Россия) и милливольтметра ИПЛ-113.

Для модификации активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны лист растения был предварительно обработан 0.5 мМ ортованодатом натрия (ОВ) или 1 мкМ фузикокином (ФК) (Sigma-Aldrich, США) [A23,A25]. ОВ использовался как ингибитор H^+ -АТФазы плазматической мембраны, ФК как ее активатор (Zimmermann, et al., 2009). При обработке, листья растений инкубировали в растворе ортованадата натрия или фузикокина в течение 2 часов; в контроле использовался раствор без ОВ и ФК.

2.2.9. Измерение содержания АТФ в листе

В экспериментах использовали набор для определения АТФ на основе люциферин-люциферазного метода (Biaffin GmbH & Co KG, Германия) [A2]. Срезанный лист взвешивали и гомогенизировали в 5% ледяной трихлоруксусной кислоте. Через 15 минут гомогенат нейтрализовался небольшим объемом 3 М КОН и разбавлялся в 12 раз перед измерением содержания АТФ. Каждая репликация включала калибровочные образцы, контрольный образец (лист растения без индукции ВП) и экспериментальный образец (лист растения с индукцией ВП). Световые суммы (15 минут) всех образцов измерялись одновременно с помощью Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., США).

2.2.10. Выделение хлоропластов и протопластов

Хлоропласты выделяли [A60,A61] при помощи стандартного метода, описанного в литературе (Egorov, Krasnovsky, 1992). В качестве среды выделения использовали 0.35 M NaCl и 0.06 M фосфатный буфер (pH=6.9). Параметры световой стадии в хлоропластах исследовали с помощью конфигурации Dual-PAM-100 для суспензий. Для индукции закисления среды инкубации добавляли различные объемы 0.5 M HCl; в контроле добавляли аналогичные объемы среды выделения. pH суспензии хлоропластов контролировали с помощью pH-электрода ЭСК-10614 и ИПЛ-113.

В качестве другого модельного объекта использовали протопласты [A23]. Для их получения у листьев растения удаляли эпидермис, затем их помещали в инкубационную среду (400 mM сорбитола, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM NaCl, 30 mM MES-KOH (pH 5.5)), содержащую ферменты (1% целлюлозы и 0.2% пектиназы) и 0.2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Инкубация продолжалась в течение 2 ч при слабом белом свете (около 42 мкмоль м⁻² с⁻¹) и контролируемой температуре (28 °C), после чего протопласты отделяли от листьев. Полученную суспензию пропускали через фильтр с 50 мкм порами и центрифугировали (5 минут, 30 g, 4°C); для последующего ресуспендирования была использована инкубационная среда. Фотосинтетические показатели измеряли с использованием конфигурации Dual-PAM-100 для анализа суспензий или с использованием Oxygraph Plus System. Для обеих систем была реализована одинаковые характеристики актиничного света (460 нм, 240 мкмоль м⁻² с⁻¹). Для имитации ВП в систему добавляли ортованадат натрия.

2.2.11. Обработка растений экзогенными фитогормонами

Растения опрыскивали водными растворами абсцизовой кислоты (АБК, 10⁻⁵ M) или 24-эпибрассинолида (ЭБЛ, 10⁻⁶ M) (Sigma-Aldrich, США) до полного увлажнения листьев [A25,A55]. Контрольные растения опрыскивали дистиллированной водой. Обработка проводилась за сутки перед экспериментальными процедурами.

2.2.12. Измерение спектральных характеристик отражения листьев и анализ фотохимического индекса отражения

Для исследований спектров отражения листьев растений использовали спектрометр S-100 (SOLAR Лазерные Системы, Беларусь), измеряющий спектры в диапазоне 190-1050 нм со спектральным разрешением около 1 нм [A17,A18,A19,A26,A27,A28,A37,A38]. В экспериментах использовали время интеграции 5 с. В качестве основного источника света использовалась галогеновая лампа (Osram Decostar; 3000K, 20 W, 12 V) с интенсивностью света 630 мкмоль м⁻² с⁻¹ [A17,A19,A21,A22,A26,A28,A37,A38]. При необходимости измерения индуцированных освещением изменений интенсивности отражения (или индексов отражения) использовали разности между величиной отражения после освещения в течение нескольких минут и в начальный момент освещения. Белое или серое поле калибровочного стандарта QPcard 101 Calibration Card v3 (Argraph Corp., США) использовали для минимизации влияния спектра источника освещения.

На основании спектров отражения, рассчитывали фотохимический индекс отражения (PRI), для чего использовали уравнение (4) (Garbulsky et al., 2011; Zhang et al., 2016):

$$PRI = \frac{R_{531} - R_{570}}{R_{531} + R_{570}} \quad (4)$$

где R₅₃₁ и R₅₇₀ – интенсивность отраженного света на длинах волн 531 и 570 нм, соответственно.

Для более строгого анализа светиндуцированных изменений PRI (при измерении PRI и параметров фотосинтеза при различных интенсивностях актиничного света), был разработан специальный метод измерения, базирующийся на использовании импульсов желто-зеленого измерительного света [A18,A39,A58], который позволял минимизировать влияние фонового освещения. В базовом варианте [A18] на фоне актиничного света (красный актиничный свет Dual-PAM-100), лист дополнительно освещался импульсами

желто-зеленого измерительного света; для расчета PRI использовали разности величины отражения при наличии и отсутствии импульса. Генерация импульсов желто-зеленого света осуществлялась изготовленным источником с максимум излучения на 550 нм (80% светового потока находилась между 500 и 600 нм), включающим в себя белые светодиоды TDS-P003L4U14 LED (TDS Lighting Co., Китай) и два абсорбционных светофильтра с пропусканием в желтой и желто-зеленой области.

Далее этот метод был реализован в специализированной системе PRI-имиджинга [A39,A58], разработанной совместно с ИПФ РАН. Система включала в себя несколько желто-зеленых светодиодов LXML-PX02-0000 (Lumileds, Нидерланды), которые имели близкую интенсивность на длинах волн 530 и 570 нм и освещали объект короткими импульсами (18 мс). Зелено-желтый отраженный свет попадал на светоделитель FF552-Di02 (Semrock, США), формирующий два световых потока: с длиной волны менее и более 550 нм. Далее световые потоки проходили через соответствующие интерференционные узкополосные фильтры FF01-530/11 и FF01-575/15 (Semrock), и формировали «зеленое» (530 нм) и «желтое» (570 нм) изображения на двух 12-разрядных монохроматических CCD-камерах CGN-B013-U (Mightex, Онтарио, Канада). На основании полученных изображений ПО системы формировало распределение PRI.

2.2.13. Комплексный анализ спектров отражения и поиск новых узко- и широкополосных индексов отражения, чувствительных к действию стрессоров и распространению ВП

Целью такого анализа было быстрое выявление узкополосных индексов отражения, чувствительных к воздействию стрессоров или к распространению ВП на основании спектров отражения листа (или его изменений). Также целью анализа было выявление индексов отражения, имеющих сильную линейную связь с фотосинтетическими показателями растения. Для комплексного анализа влияния ВП на узкополосные индексы отражения, рассчитываемые на основании спектрального диапазона 400-700 нм, были использованы тепловые карты.

Традиционно, тепловые карты представляют собой зависимость величины коэффициента корреляции для массива индексов отражения, рассчитываемых по заданной общей формуле, с исследуемыми физиологическими процессами у растений от длин волн, используемых для расчета индекса (Balzarolo et al., 2018; Kovar et al., 2019; El-Hendawy et al., 2019). При этом, величина корреляции задается псевдоцветовой шкалой, а длины волн откладываются по осям, что позволяет получить изображение, в котором каждая пиксель соответствует конкретному индексу отражения.

В настоящем исследовании корреляционные тепловые карты рассчитывались для связи индексов отражения с параметрами световой стадии фотосинтеза; были использованы коэффициенты корреляции Пирсона. Также, в рамках диссертационного исследования был предложен и экспериментально апробирован дополнительный подход к анализу индексов отражения: в качестве задаваемого псевдоцветовой шкалой параметра на тепловой карте были использованы статистическая значимость изменений индекса и их направление [A38]. Такой подход позволяет быстро выявить меняющиеся индексы отражения даже при отсутствии измерений других показателей растения.

В диссертационном исследовании была использована только нормализованная разностная форма индекса отражения ($RI(x,y)$); при этом, индексы $RI(x,y)$ рассчитывались в соответствии с уравнением (5).

$$RI(x,y) = \frac{R_x - R_y}{R_x + R_y} \quad (5)$$

где R_x и R_y – величины отраженного света на длинах волн x и y . x и y являются произвольными длинами волн в диапазоне 400-700 нм, выполняющими условие $y < x$.

Для реализации описанных подходов был разработан ряд программных инструментов на языке Python (с использованием библиотек numpy, scipy и matplotlib) [A37,A38]. Разработанные инструменты осуществляли расчет массива индексов

отражения, выполняли оценку статистической значимости и направления их изменений по отношению к контрольным величинам или определяли величины коэффициентов корреляции Пирсона с заданными фотосинтетическими показателями, а также строили тепловые карты. Важно отметить, что разработанные программы могли реализовывать описанные функции не только для абсолютных величин индексов, но и для их изменений, включая изменения, вызванные распространением ВП.

Тепловые карты использовались, прежде всего, для анализа узкополосных индексов отражения с шириной полосы, соответствующей разрешению измеряющего спектр прибора [A37,A38]. Однако разработанные программы позволяли также рассчитать широкополосные индексы отражения, которые использовали спектральные полосы с шириной полосы около 100 нм [A19]. Для решения этой задачи, спектры отражения усредняли в диапазонах 400-500, 500-600, 600-700 и 700-800 нм; т.е. в этом варианте экспериментов дополнительно анализировали диапазон дальнего красного света и ближнего инфракрасного.

2.2.14. Методы математического моделирования

В ходе реализации диссертационного исследования был разработан ряд математических моделей, включая модель распространения индуцирующей ВП гидравлической волны [A33], модель влияния временной [A30] и пространственной [A36] неоднородности активности H^+ -АТФазы на параметры генерации электрического сигнала, упрощенная модель, а также модели фотосинтетических процессов [A31,A42,A52,A53,A54], включая упрощенную модель влияния ВП на фотосинтез [A6] и модель влияния активности H^+ -АТФазы на транспорт CO_2 в клетки мезофилла [A10,A15,A45,A46]. В зависимости от конкретной модели, для их решения использовали аналитические [A33,A42] или численные [A6,A10,A15,A30,A31,A36,A45,A46,A52,A53,A54] методы, включая метод Эйлера и метод Монте-Карло. Для анализа моделей использовали Excel, C++ и Delphi 7.

2.2.15. Методы статистического анализа

При обработке данных использовали параметрическую статистику. Результаты представлены в виде типичных примеров, средних и стандартных отклонений среднего, а также диаграмм рассеяния. Достоверность различий определялась с использованием критерия Стьюдента. Сила связи между параметрами оценивалась с помощью линейной корреляций Пирсона и, при необходимости, коэффициента детерминации для линейных регрессионных моделей.

2.3. Феноменологический анализ влияния переменного потенциала на фотосинтетические процессы

2.3.1. Анализ влияния локальных повреждений на фотосинтетические показатели высших растений

На первом этапе исследования был проведен анализ влияния локального повреждения первого зрелого листа гороха, включая ожог открытым пламенем, постепенный нагрев до 60°C и механическое раздавливание 50% листа, на показатели световой стадии фотосинтеза во втором листе [A13] (Рис. 2). Было показано, что локальный ожог вызывал увеличение NPQ и снижение Φ_{PSII} . Пример динамики NPQ и Φ_{PSII} (Рис. 2а) показал наличие двух компонент инактивации фотосинтетических процессов (возрастание NPQ и снижение Φ_{PSII}): быстрой (5-10 мин) и длительной (более 20 мин). Сравнение средних амплитуд фотосинтетических ответов, индуцированных различными типами раздражителей (Рис. 2б), показало, что наиболее масштабные изменения во втором листе наблюдались при ожоге первого листа. Несколько меньшими были амплитуды изменений NPQ и Φ_{PSII} при постепенном локальном нагреве первого листа до повреждающих величин. Наконец, механическое раздавливание первого листа не вызывало статистически значимых изменений параметров световой стадии фотосинтеза во втором листе.

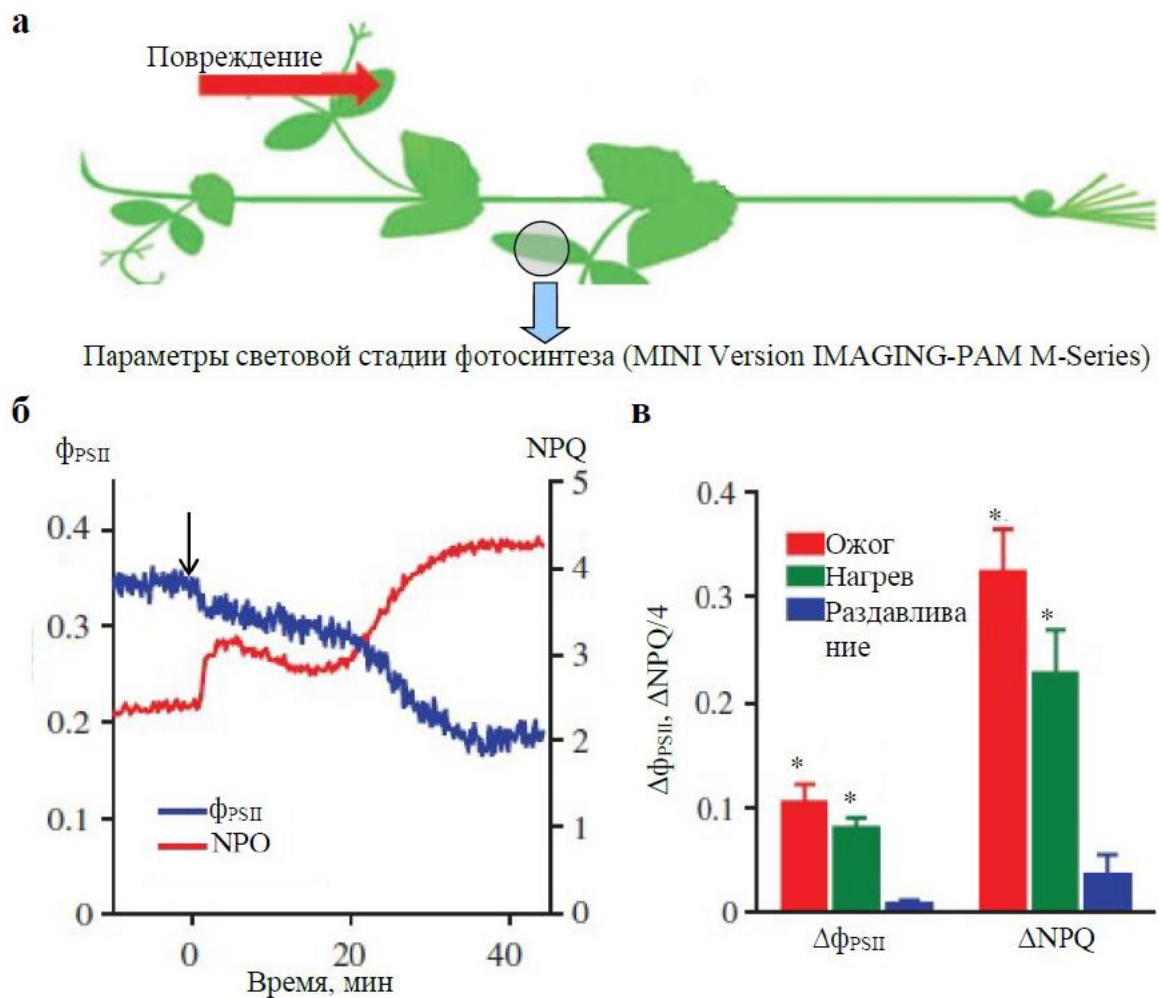


Рис. 2. а, Схема расположения зоны повреждения и области измерений фотосинтеза у растения гороха. б, Пример вызванных локальным ожогом первого зрелого листа гороха (стрелка, нулевая точка) изменений квантового выхода ФСII (F_v/F_m) и нефотохимического тушения (NPQ) во втором листе. в, Средние абсолютные величины вызванных локальным повреждением первого листа ответов F_v/F_m ($\Delta F_v/F_m$) и NPQ (ΔNPQ) во втором листе. В варианте 2в показаны ответы при действии трех типов повреждающих стимулов: ожог открытым пламенем, постепенный нагрев до 60°C (10°C мин⁻¹), раздавливание пластиковым цилиндром 50% листа. Измерения показателей световой стадии фотосинтеза осуществляли с использованием IMAGING PAM M-Series MINI Version. *, изменения статистически значимы. Результаты из работы [A13].

Аналогичные исследования влияния локального ожога и нагрева до 60°C на фотосинтез неповрежденных частей растений пшеницы [A35] показали сходные результаты: наличие двух компонент ответа (быстрой и длительной инактивации) и более выраженные быстрые изменения фотосинтетических показателей при локальном ожоге.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными ряда работ (см. обзоры [A1]; Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015) и показывают, что ожог вызывает наиболее выраженные быстрые изменения фотосинтетических процессов. Вследствие этого, именно ожог использовался в качестве основного индуктора быстрого фотосинтетического ответа (быстрой инактивации фотосинтеза) в неповрежденных зонах растения в ходе дальнейшего анализа. На следующем этапе анализа было проведено более детальное исследование вызванной локальным ожогом инактивации фотосинтеза у ряда высших растений, включая горох [A63,A64] (Рис. 3), пшеницу [A5], герань [A59] и тыкву [A60,A66].

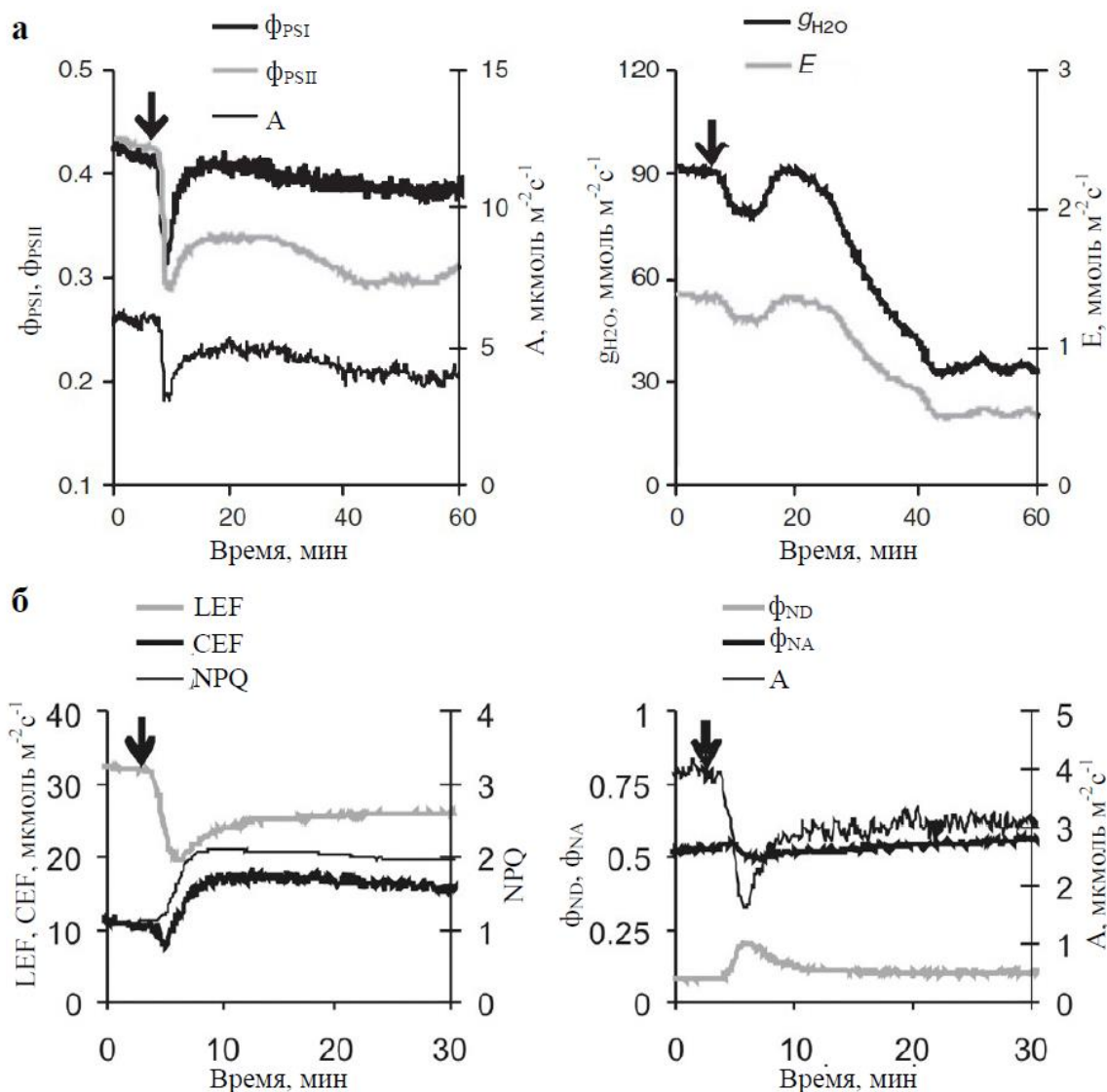


Рис. 3. Примеры изменений фотосинтетических показателей второго зрелого листа гороха, вызванные локальным ожогом первого зрелого листа (стрелка) в двух различных сериях экспериментов. а, Типичная длительная запись изменений Φ_{PSI} и Φ_{PSII} , A , g_{H_2O} и E ($n=10$) [A64]. б, Типичная кратковременная запись изменений LEF, CEF, NPQ, квантовых выходов потерь ФСІ, связанных с ограничениями донорной (Φ_{ND}) и акцепторной (Φ_{NA}) сторон фотосистемы, и A ($n=17$) [A63]. Фотосинтетические измерения осуществлялись во втором зрелом листе с использованием системы из GFS-3000 и Dual-PAM-100 при 360 ppm CO_2 , 20000 ppm H_2O , температуре 23°C и освещении 239 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (синий свет).

На примере гороха, было показано (Рис. 3), что локальный ожог первого листа вызывал широкий спектр фотосинтетических ответов во втором листе, включая снижение A , Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и LEF; кроме того, наблюдалось небольшое уменьшение квантового выхода потерь ФСІ, связанных с ограничением акцепторной стороны фотосистемы. Локальный ожог также вызывал снижение E и g_{H_2O} , которое включало в себя две выраженные компоненты (быстрое и длительное снижение этих показателей). Напротив, CEF, NPQ и квантовый выход потерь ФСІ, связанных с ограничением донорной стороны фотосистемы, возрастали после локального ожога. На рис. 3 представлены типичные примеры ответов из двух различных серий экспериментов [A63, A64]; однако, следует отметить, что длительная компонента инактивации фотосинтеза была слабее выражена во второй серии экспериментов (Рис. 3б). Напротив, быстрая фаза инактивации была выражена в обеих экспериментальных сериях.

В случае пшеницы [A5] и герани [A59] вызванные локальным ожогом изменения фотосинтетических показателей имели сходный характер: снижение A , Φ_{PSI} и Φ_{PSII} и возрастание NPQ, которые включали в себя быструю и длительную компоненту. Развитие быстрой инактивации фотосинтетических процессов в неповрежденных листьях высшего растения в ответ на локальное действие стрессоров хорошо соответствует данным литературы (Grams et al., 2009; Pavlovič et al., 2011; Białasek et al., 2017). Одновременное формирование двух компонент фотосинтетической инактивации было также показано в некоторых работах (Peña-Cortés et al., 1995).

В случае тыквы [A60,A66], ВП не вызывал выраженную быструю инактивацию фотосинтеза (Рис. 4). После локального ожога преимущественно наблюдалось постепенное и длительное снижение A и возрастание NPQ; изменения Φ_{PSI} и Φ_{PSII} практически отсутствовали. Такой результат хорошо согласуется с некоторыми представленными в литературе работами (Hlavácková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012), в которых у томатов и табака было показано только медленное развитие длительной инактивации темновой стадии фотосинтеза; изменения показателей световой стадии фотосинтеза при этом отсутствовали.

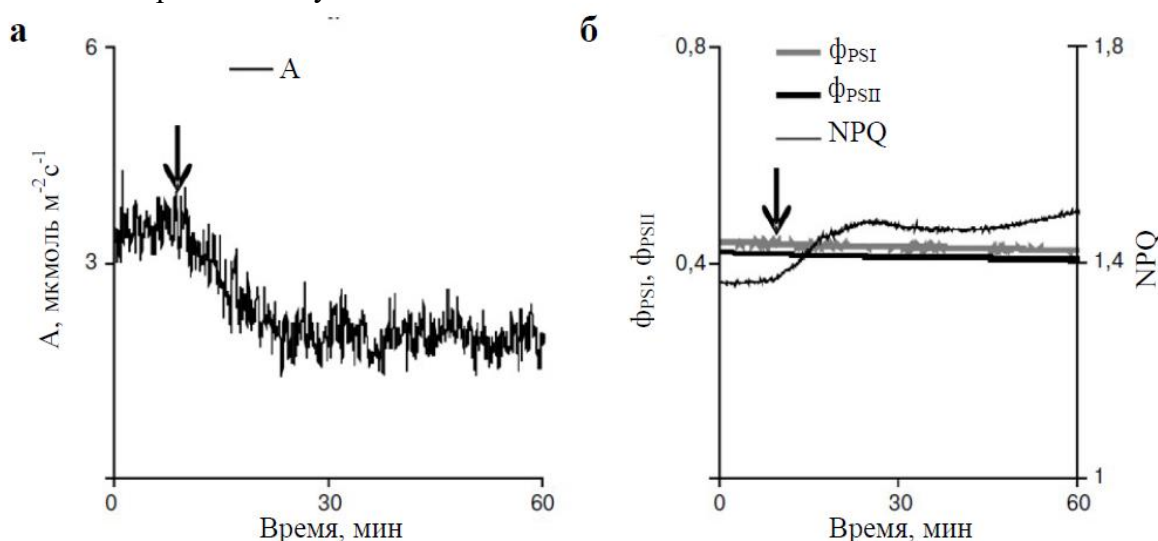


Рис. 4. Типичный пример изменений ассимиляции (A) (а) и показателей световой стадии фотосинтеза (б) у первого нижнего листа тыквы, вызванные локальным ожогом семядоли (стрелка) ($n=15$) [A66]. Фотосинтетические измерения осуществлялись во втором зрелом листе с использованием системы из GFS-3000 и Dual-PAM-100 при 360 ppm CO_2 , 20000 ppm H_2O , температуре 23°C и освещении $239 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (синий свет).

Таким образом, результаты этапа показывают, что локальный ожог вызывал инактивацию фотосинтеза у всех исследованных растений (горох, пшеница, тыква, герань). При этом у гороха, пшеницы и герани наблюдалась быстрая инактивация фотосинтеза (в пределах 10 мин), которая включала в себя ответы как световой, так и темновой стадии. Важно отметить, что такие ответы включали в себя не только снижение A , Φ_{PSI} и Φ_{PSII} и возрастание NPQ, которые были ранее показаны в ряде работ (см. обзоры [A1], Gallé et al., 2015), но и увеличение CEF; такие ответы не были ранее выявлены.

2.3.2. Анализ роли переменного потенциала в индукции быстрой инактивации фотосинтеза

Учитывая, что ожоги вызывают у высших растений распространение ВП [A65], который может влиять на фотосинтетические процессы [A1], участие переменного потенциала в формировании связи между поврежденными участками и неповрежденными зонами, в которых формируется быстрая инактивация фотосинтеза, представляется наиболее вероятным. Рис. 5 показывает примеры электрических сигналов, вызванных локальным ожогом первого листа гороха и измеренных во втором листе, как макро-, так и микроэлектродным методом [A3,A61]. Такие сигналы имели сложную форму, включая в

себя быструю деполяризацию (спайк) и более медленно развивающуюся длительную волну реполяризации. Индукция температурным воздействием и сложная форма сигналов соответствовали особенностям ВП [A1,A16,A65], что позволило идентифицировать их как переменные потенциалы. Распространение ВП после нанесения локального ожога было также показано у всех исследованных в рамках диссертационного исследования растений, включая пшеницу [A5], герань [A59], томат [A49] и тыкву [A60,A66].

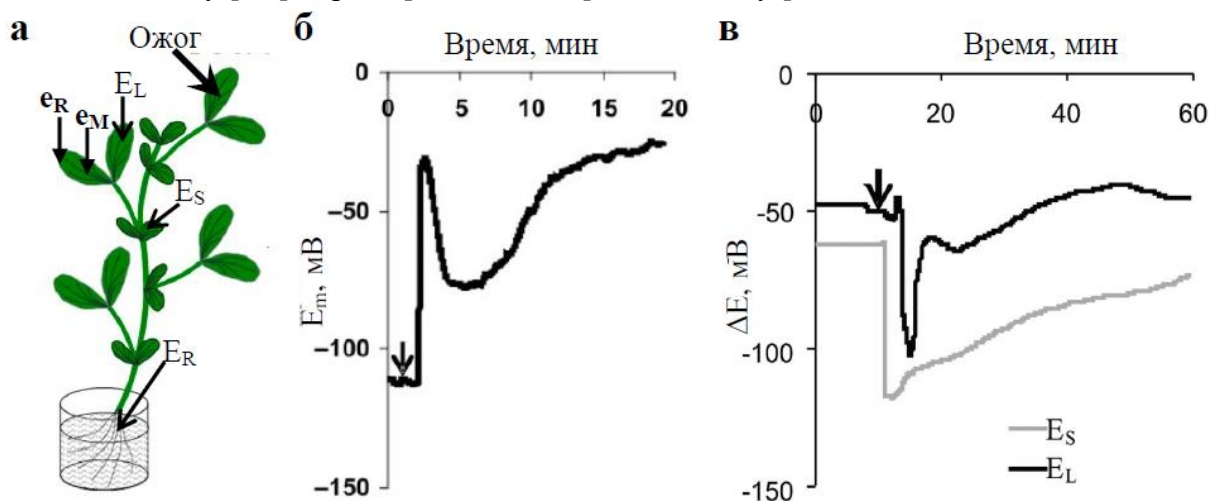


Рис. 5. а, Пример расположения на растении гороха микроэлектродов (e_M и e_R – измерительный электрод и электрод сравнения) и макроэлектродов (E_L , E_S и E_R – электрод на листе, электрод на стебле около листа и электрод сравнения). б, Пример переменного потенциала в листе гороха, измеренного микроэлектродами [A61]. в, Пример переменного потенциала в листе и стебле гороха, измеренного макроэлектродами [A3]. ВП были индуцированы локальным ожогом первого листа (стрелка).

В ходе диссертационного исследования был получен ряд аргументов, подтверждающих ключевое участие ВП в формировании вызванных локальными ожогами фотосинтетических ответов в неповрежденных листьях растения. Прежде всего, на примере гороха [A40,A62] и герани [A59], было показано, что даже при ожоге соседнего листа, у единичных экспериментальных растений ВП не проходил в листовую пластинку. В этом случае генерация фотосинтетических ответов в листе гороха отсутствовала [A62] (Рис. 6). У герани, при отсутствии прохождения ВП в листовую пластинку, на нее наносился дополнительный ожог. Рис. 7 показывает, что при таком ожоге происходила генерация ВП в исследуемом листе и развивалась быстрая фотосинтетическая инактивация. Полученные результаты показывают, что прохождение ВП в листовую пластинку являлось необходимым условием для индукции фотосинтетического ответа.

Так как при индукции ВП у различных индивидуальных растений наблюдалось значительная изменчивость амплитуды переменного потенциала, проходящего в листовую пластинку, была исследована связь между такими амплитудами и амплитудами фотосинтетических ответов. Было показано [A34,A66], что корреляция Пирсона между амплитудами ВП и изменений A была статистически значимой и равнялась 0.58-0.98 в разных вариантах экспериментов; в частности, она составляла 0.86 в случае быстрого снижения ассимиляции [A34].

В рамках диссертационного исследования было показано, что при увеличении расстояния от зоны повреждения у гороха [A2,A12,A17,A24] и пшеницы [A35] наблюдалось значительное снижение амплитуды вызванного локальным ожогом переменного потенциала и одновременное уменьшение амплитуды быстрой инактивации фотосинтеза. Проведенный анализ связи между средними амплитудами ВП (A_{VP}) и возрастания NPQ (ΔNPQ) во втором, третьем и четвертом листьях гороха [A12,A24] показал сильную линейную связь между исследуемыми величинами, которая наблюдалась как при наличии (Рис. 8а), так и при отсутствии актиничного света (Рис. 8б).

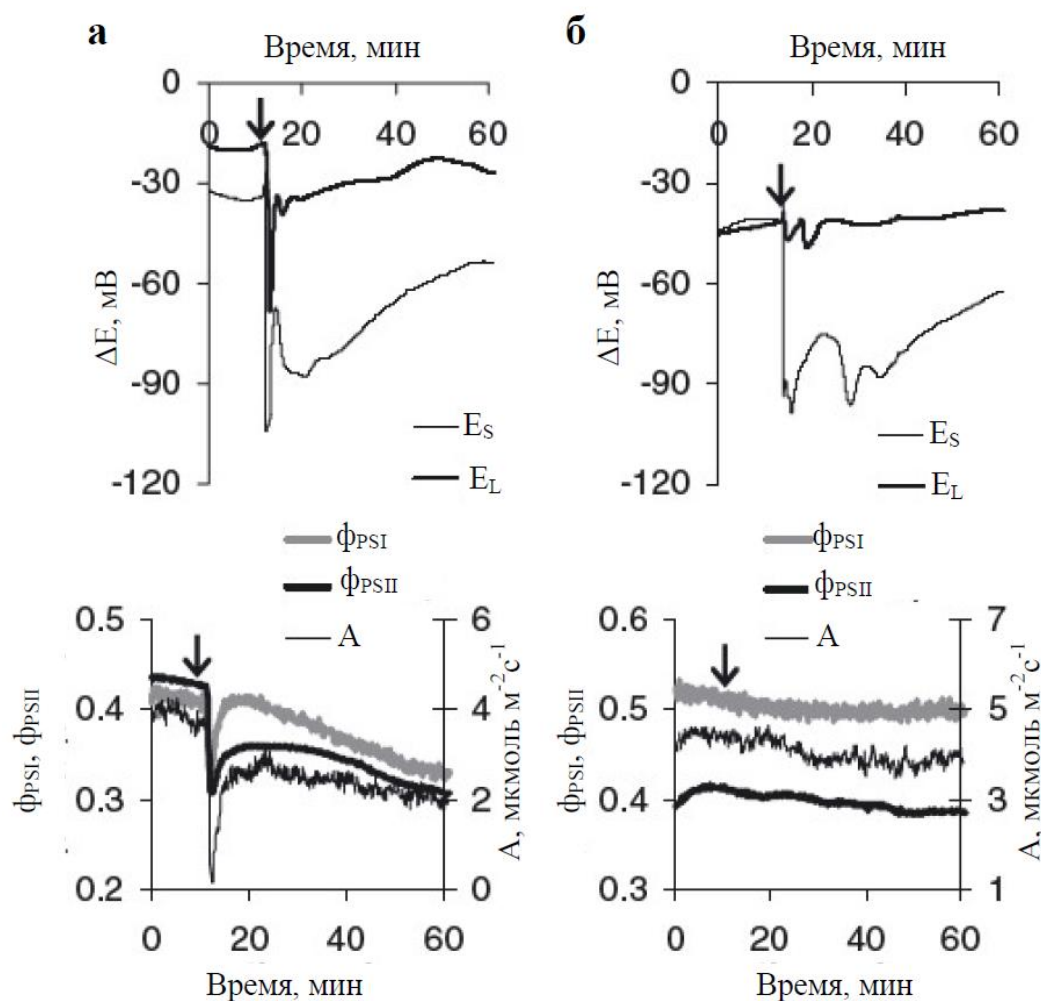


Рис. 6. Примеры переменных потенциалов и фотосинтетических ответов у листа гороха при прохождении ВП в листовую пластинку (а) и без такого прохождения (б) [A62]. Переменные потенциалы были индуцированы локальным ожогом первого листа (стрелка); фотосинтетические измерения осуществлялись во втором листе (GFS-3000 и Dual-PAM-100).

Наконец, в ряде работ диссертационного исследования было показано, что при модификации амплитуды вызванного локальным ожогом ВП или времени его прохождения в лист различными химическими агентами (ортованадат [A23], фузикоцин [A23], АБК [A25], эпибрассинолид [A55]) у гороха происходили сходные изменения амплитуды быстрой инактивации фотосинтеза и времени ее начала. Более того, снижение активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны, путем обработки ортованадатом натрия, которая имитировала основной механизм генерации ВП [A16, A65], приводила к формированию фотосинтетических изменений, сходных с вызванными переменным потенциалом [A23]. Так как эта группа экспериментов была связана с выявлением механизмов формирования фотосинтетических ответов или поиском путей их модификации, более подробное описание результатов представлено в следующих разделах.

Анализ литературы показывает дополнительные аргументы в пользу ключевой роли распространения ВП в инициации быстрой инактивации фотосинтеза при локальном действии повреждающих факторов. В частности, более ранняя индукция фотосинтетических ответов наблюдается вблизи проводящих пучков, которые являются основным путем распространения ВП (Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009), а подавление генерации и распространения электрических сигналов приводит к подавлению ответов фотосинтеза (Lautner et al., 2005).

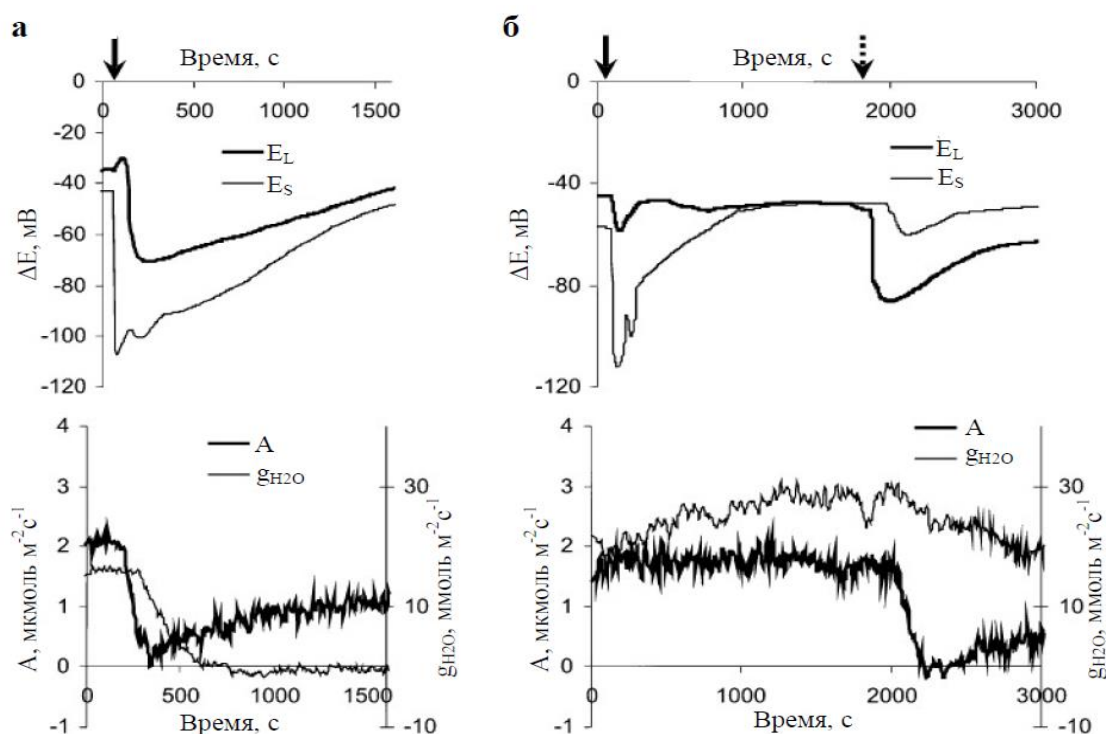


Рис. 7. Примеры переменных потенциалов, фотосинтетических и транспирационных ответов у листа герани при прохождении ВП в листовую пластинку (а) и без такого прохождения (б) [A59]. Переменные потенциалы были индуцированы локальным ожогом листа (жирная стрелка); измерения A и $g_{\text{H}_2\text{O}}$ осуществлялись в соседней сверху листовой пластинке (GFS-3000 и Dual-PAM-100). В случае отсутствия прохождения ВП в листовую пластинку, в которой измерялись A и $g_{\text{H}_2\text{O}}$, непосредственно на эту пластинку (верхний кончик) наносился еще один локальный ожог (пунктирная стрелка).

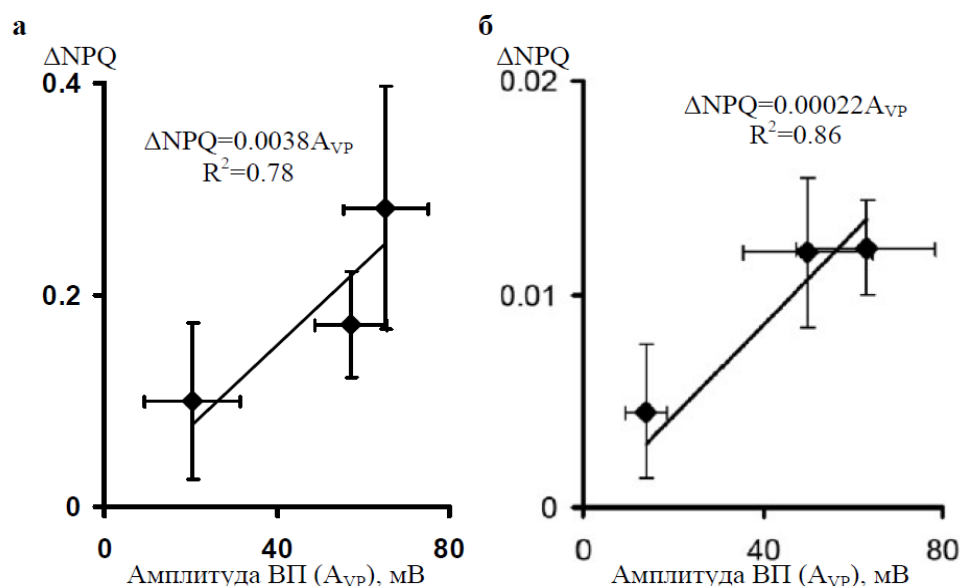


Рис. 8. Диаграммы рассеяния между средними значениями амплитуды переменного потенциала (A_{VP}) и средними значениями амплитуды изменения NPQ (ΔNPQ) во втором, третьем и четвертом листе гороха после ожога первого листа. а, измерения NPQ проводились с использованием Open FluorCam FC 800-O/1010 в условиях освещения (красный актиничный свет, 617 нм, 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($n=8$) (на основе [A24]). б, измерения NPQ проводились с использованием Dual-PAM-100 без актиничного света ($n=5$) [A12].

Таким образом, полученные результаты и данные литературы показывают, что именно ВП является вероятной причиной индукции фотосинтетических ответов в неповрежденных листьях растений, включая быструю инактивацию фотосинтеза, после локального действия повреждающих факторов.

2.4. Анализ механизмов формирования быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной переменным потенциалом

2.4.1. Анализ вклада изменений световой и темновой стадии фотосинтеза в формирование вызванного переменным потенциалом быстрого фотосинтетического ответа

Анализ механизмов вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза, показанной в предыдущем разделе, требует, прежде всего, выявления потенциальных «мишеней» для влияния электрических сигналов. Такое влияние может быть связано с изменениями активности световой или темновой стадии фотосинтеза.

Для проверки участия инактивации темновой стадии фотосинтеза в качестве механизма развития индуцированной ВП инактивации световой стадии фотосинтеза в серии работ [A3, A59, A61, A62, A63] были исследованы особенности ответов световой стадии в условиях низкой концентрации CO_2 в камере газоанализатора GFS-3000, так как снижение концентрации CO_2 позволяло подавить развитие изменений темновой стадии фотосинтеза. В работе [A3] было показано (Рис. 9, Табл. 1), что в условиях пониженной концентрации углекислого газа действительно наблюдалось практически полное подавление вызванных ВП изменений ассимиляции CO_2 у гороха; при этом амплитуда изменений f_{PSII} и NPQ снижалась. Важно также отметить, что снижение концентрации углекислого газа, приводящее к подавлению ассимиляции, вызывало изменения параметров световой стадии фотосинтеза, качественно сходные с изменениями, вызванными ВП (Рис. 9, Табл. 1). Выявленное влияние CO_2 на фотосинтетические показатели и вызванные ВП ответы световой стадии фотосинтеза наблюдалось у гороха как при использовании красного [A3], так и синего [A61, A62, A63] актиничного света; однако, в условиях освещения синим светом наблюдалось меньшее снижение амплитуды вызванных ВП изменений показателей световой стадии фотосинтеза [A61, A63].

Качественно сходные результаты, но с большими амплитудами ответов, были показаны при исследовании влияния снижения концентрации CO_2 на фотосинтетические показатели и вызванные ВП ответы световой стадии фотосинтеза у другого растительного объекта – герани [A59].

Наконец, следует отметить, что абсолютные величины коэффициентов корреляции Пирсона между вызванными ВП изменениями A и LEF у гороха [A63] и между изменениями A и большинства параметров световой стадии у герани [A59] превышали по абсолютной величине 0.75 и были статистически значимы. Этот результат дополнительно подтверждает сильную связь изменений ассимиляции с изменениями световой стадии фотосинтеза, что хорошо согласуется с показанной выше ролью снижения A в формировании ответов световой стадии фотосинтеза.

В соответствии с гипотезой Pavlovič et al. (2011) влияние инактивации темновой стадии на световую может быть связано с возрастанием соотношений концентраций ATF/ADP и НАДФН/НАДФ^+ в строме хлоропластов; рост ATF/ADP в строме должен увеличивать содержание ATF в листе и снижать активность H^+ - ATF -синтазы. Анализ содержания ATF во втором листе гороха, показал [A2], что оно действительно возрастало после индукции ВП (ожога первого листа) и распространения сигнала в исследуемый лист; при этом динамика ответа была близкой к динамике инактивации фотосинтеза (Рис. 10). Напротив, изменения содержания ATF и инактивация фотосинтеза отсутствовали в четвертом листе, в который ВП практически не проходил.

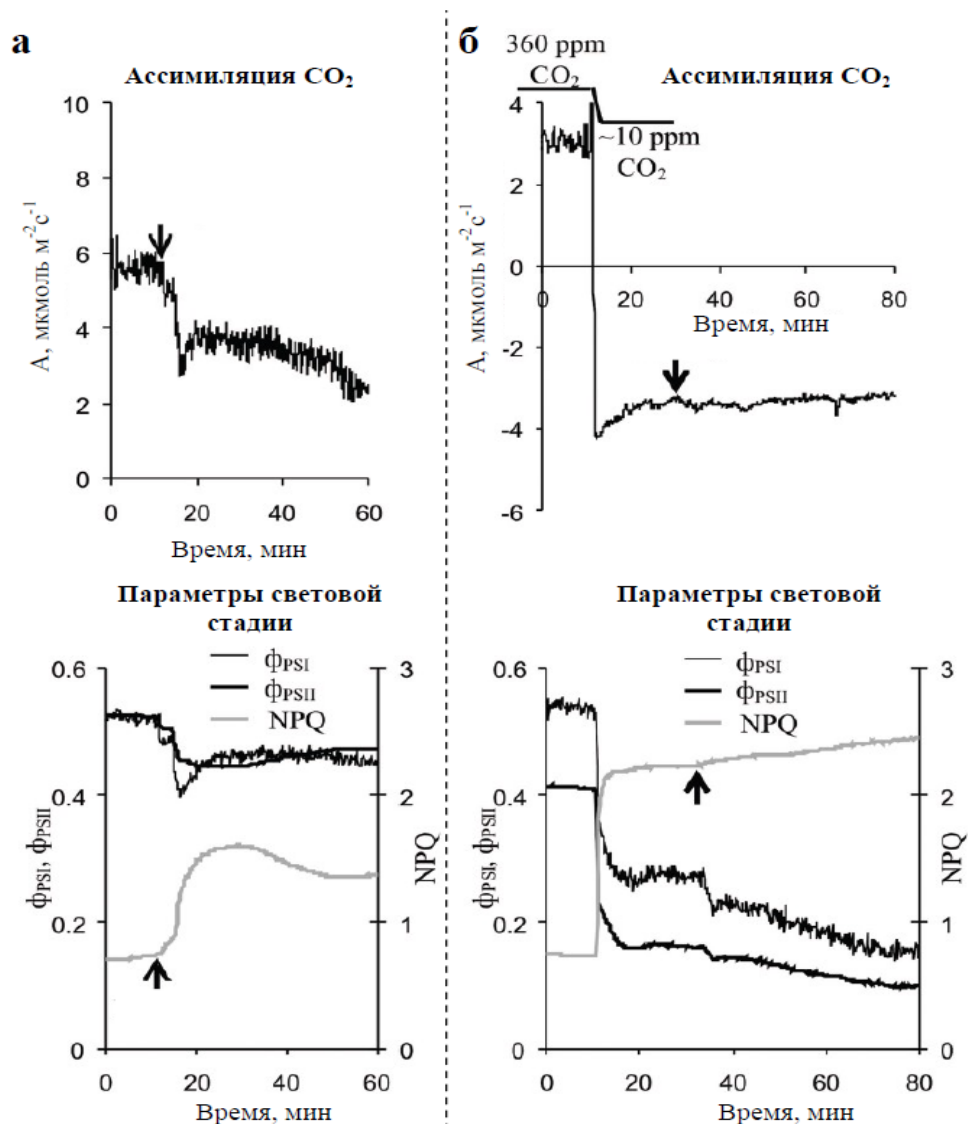


Рис. 9. Примеры вызванных ВП изменений A , F_{PSI} , F_{PSII} и NPQ в условиях контрольной концентрации CO_2 (а) и в условиях снижения такой концентрации (б) у растений гороха [АЗ]. ВП был индуцирован локальным ожогом первого листа (стрелка); фотосинтетические измерения осуществлялись во втором листе с использованием системы из GFS-3000 и Dual-PAM-100. Исходная концентрация CO_2 составляла 360 ppm; снижение концентрации осуществлялось приблизительно до 10 ppm с использованием GFS-3000. Измерения проводились в условиях красного актиничного света (630 нм, 278 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), при 23°C и 70% влажности.

Таблица 1.
Средние изменения фотосинтетических показателей при индукции ВП и снижении концентрации CO_2 ($n=5-10$) [АЗ]. Условия измерения показаны на рис. 9.

	ΔA_{CO_2} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ΔF_{PSI}	ΔF_{PSII}	ΔNPQ
ВП, 360 ppm CO_2	$-1.9 \pm 0.3^*$	$-0.112 \pm 0.009^*$	$-0.081 \pm 0.01^*$	$0.51 \pm 0.10^*$
Снижение концентрации CO_2 от 360 – до 10 ppm	$-7.2 \pm 0.6^*$	$-0.253 \pm 0.017^*$	$-0.301 \pm 0.023^*$	$1.63 \pm 0.11^*$
ВП, 10 ppm CO_2	$-0.3 \pm 0.1^{* \#}$	$-0.088 \pm 0.004^*$	$-0.051 \pm 0.006^{* \#}$	$0.17 \pm 0.08^{* \#}$

^{*}, изменения по сравнению с уровнем до воздействия статистически значимы ($p < 0.05$).

[#], амплитуда вызванных ВП изменений в условиях низкой концентрации CO_2 статистически значимо отличается от изменений при 360 ppm CO_2 ($p < 0.05$).

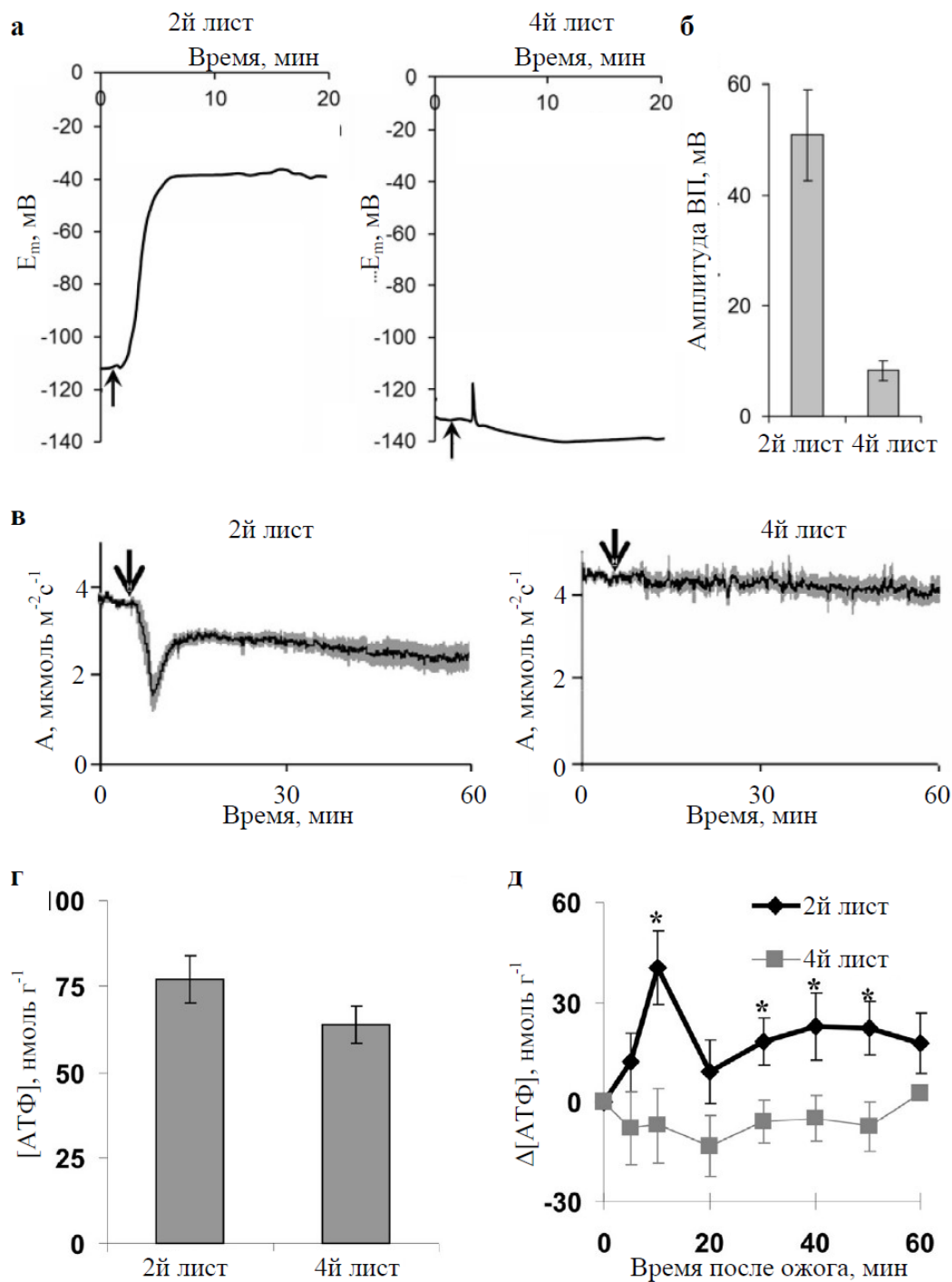


Рис. 10. Динамика мембранного потенциала во втором и четвертом листьях гороха при индукции ВП (а), средние амплитуды ВП ($n=6-24$) (б), усредненная динамика вызванных ВП изменений A во втором и четвертом листьях гороха ($n=6-13$) (в), начальное содержание АТФ ($[\text{АТФ}]$) в этих листьях ($n=14-26$) (г) и усредненная динамика изменений содержания АТФ ($\Delta[\text{АТФ}]$) во втором и четвертом листьях ($n=5-9$) (д) [А2]. ВП был индуцирован локальным ожогом первого листа (стрелка на 10а и 10в или нулевая точка на 10д); измерения осуществлялись микроэлектродным методом. Фотосинтетические измерения осуществлялись во втором и четвертом листе с использованием системы из GFS-3000 и Dual-PAM-100. Измерения содержания АТФ осуществлялись во втором и четвертом листе с использованием люциферин-люциферазного метода. *, изменения содержания АТФ статистически значимы ($p < 0.05$).

Вызванное ВП снижение активности H^+ -АТФ-синтазы (g_s), которое оценивали на основании релаксации электрохромного сдвига после прекращения освещения, было также показано в ходе анализа [A3]. Эффект был сильно выражен при контрольной концентрации CO_2 (360 ppm) и практически отсутствовал при низкой концентрации CO_2 (10 ppm) (Рис. 11); снижение концентрации углекислого газа также вызывало уменьшение такой активности. Следует, однако, отметить, что вызванные ВП изменения активности H^+ -АТФ-синтазы не сопровождались изменениями электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране (ECS_{pmf}), в то время как снижение концентрации CO_2 такие изменения вызывало.

Последний результат показывает, что индукция вызванных ВП изменений показателей световой стадии фотосинтеза может быть связана не только с инактивацией темновой стадии фотосинтеза, но и с другими ответами. Дополнительными аргументами в пользу существования альтернативных механизмов влияния ВП на световую стадию является развитие вызванных вариabельным потенциалом изменений ϕ_{PSI} и ϕ_{PSII} , NPQ, LEF и CEF даже в условиях низкой концентрации CO_2 или при затемнении [A3,A59,A61,A63].

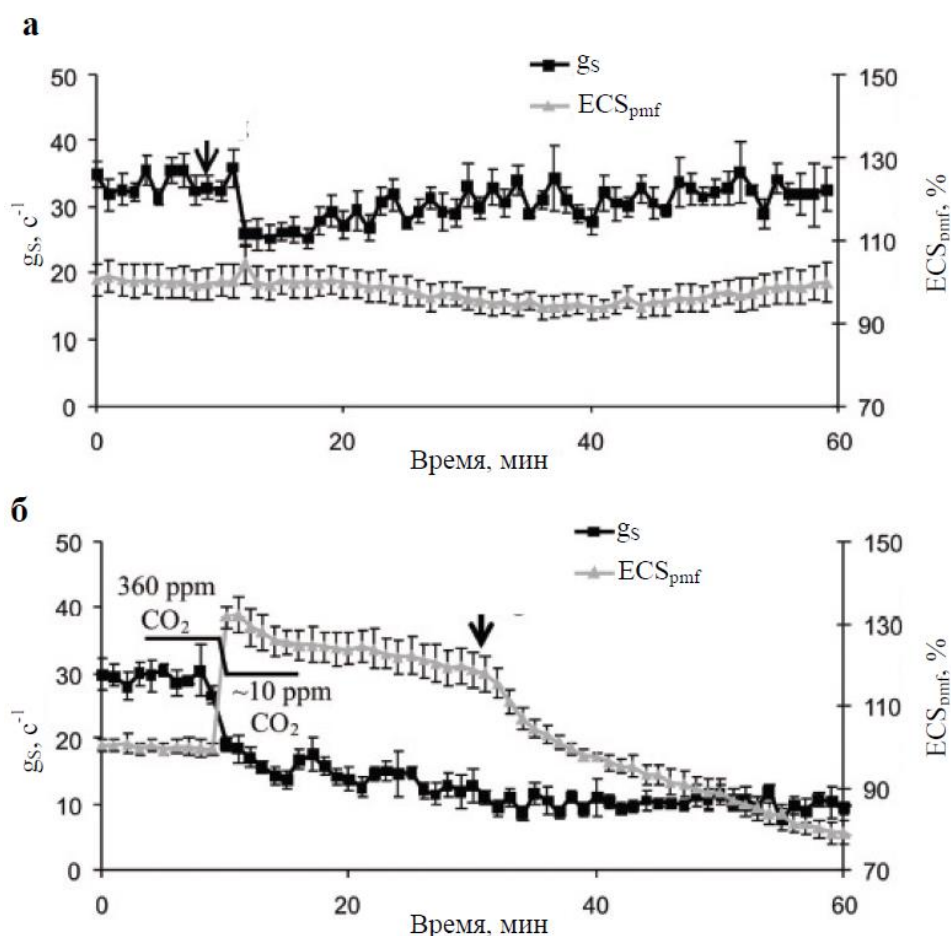


Рис. 11. Динамика изменения проводимости H^+ -АТФ-синтазы (g_s) и электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране (ECS_{pmf}) при индукции ВП при 360 ppm CO_2 (а) и при снижении концентрации CO_2 и индукции вариabельного потенциала в этих условиях (б) ($n=5-6$) [A3]. g_s определяли как коэффициент в экспоненте, описывающей релаксацию электрохромного сдвига в условиях затемнения. ECS_{pmf} — определяли как максимальную величину изменения разности поглощения света на 515 и 550 нм в условиях затемнения, нормированную на такую величину перед индукцией ВП. Измерения осуществляли во втором листе с использованием системы из GFS-3000 и Dual-РАМ-100 с P515/535 эмитер-детекторным модулем. ВП индуцировали ожогом первого листа (стрелка).

В частности, было показано [A12], что в условиях затемнения, исключаяющего влияние изменений темновой стадии фотосинтеза на световую стадию, ВП вызывал быстрое возрастание NPQ и более медленное увеличение доли поглощенной энергии, направленной к ФСII (dII), и потока поглощенной световой энергии на один активный реакционный центр ФСII (ABS/RC) (Рис. 12). Однако, вклад медленных изменений dII и ABS/RC в быструю инактивацию фотосинтеза может быть мал.

Таким образом, полученные в ходе диссертационного исследования результаты показывают, что раннее влияние ВП на фотосинтетические процессы высших растений, связано как минимум с двумя группами «мишеней»: со снижением активности темновой стадии фотосинтеза и с непосредственным влиянием ВП на процессы световой стадии фотосинтеза. Это означает, что влияние ВП на фотосинтетические процессы у высших растений имеет более сложный характер, чем влияние ПД, которое обусловлено только инактивацией темновой стадии фотосинтеза (Pavlović et al., 2011).

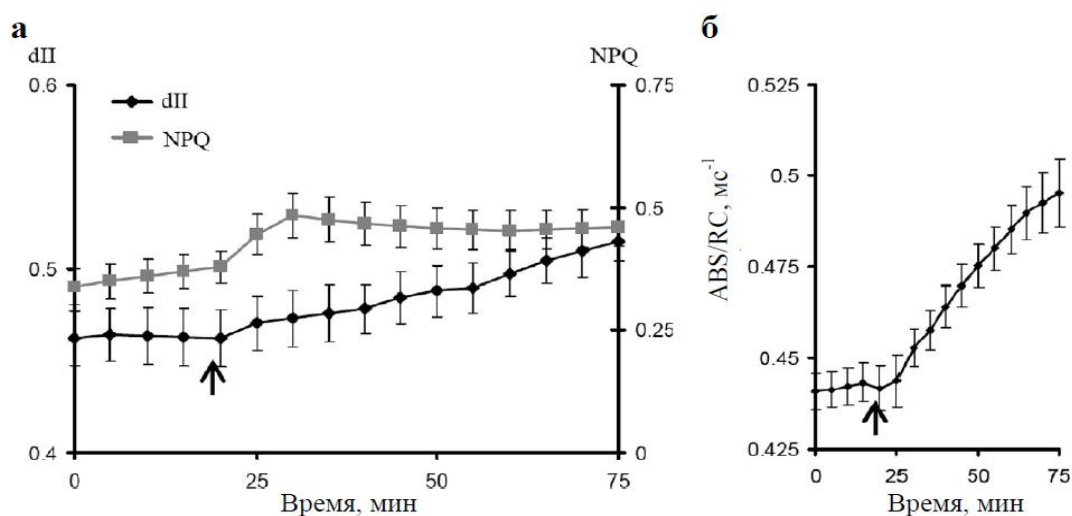


Рис. 12. Усредненные динамики вызванного ВП возрастания NPQ и доли поглощенной световой энергии, направленной к ФСII (dII) ($n=5$) (а), а также увеличения потока поглощенной световой энергии на активный реакционный центр ФСII (ABS/RC) ($n=9$) (б), измеренные во втором листе гороха в условиях затемнения [A12]. Измерения NPQ и dII осуществляли с использованием Dual-PAM-100; dII рассчитывали в соответствии с методом, предложенным в [A63]. Измерения ABS/RC осуществляли с использованием М-РЕА-2. ВП индуцировали ожогом первого листа (стрелка).

2.4.2. Инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны как механизм индукции вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза

В соответствии с ранними работами, результаты которых были обобщены в обзорах [A1,A7,A16,A32,A51,A65], основным механизмом генерации ВП является обратимая инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны высших растений. Такая инактивация обусловлена активацией Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны и последующим входом ионов кальция в цитоплазму [A16,A40,A51,A57]. Представленные в литературе работы (Stahlberg, Cosgrove, 1996, 1997; Mancuso, 1999; Stahlberg et al., 2006) и разработанная в рамках диссертационного исследования математическая модель распространения зоны повышенного давления по стеблю растения [A33], опирающаяся на уравнение Пуазейля, показывают, что наиболее вероятным механизмом распространения ВП является гидравлическая волна, индуцированная в зоне повреждения, передающаяся по ксилеме растения и вызывающая активацию механочувствительных Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране. В то же время, распространение ВП также связывают с переносом по ксилеме химического соединения (в частности, H_2O_2) и активацией лиганд-зависимых Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны [A7,A16].

Так как инактивация H^+ -АТФазы является вероятным механизмом формирования ВП в рамках как гидравлической, так и химической гипотез [A16,A65], было предположено, что именно она играет основную роль в индукции фотосинтетических ответов. В ходе диссертационного исследования был получен ряд аргументов в пользу участия инактивации H^+ -АТФазы в формировании быстрой инактивации фотосинтеза.

Прежде всего, был проведен ингибиторный анализ [A23,A25], в ходе которого активность H^+ -АТФазы в исследуемом листе гороха была предварительно снижена (ортованадат натрия, ОВ, 0,5 мМ) или увеличена (фузикокцин, ФК, 1 мкМ) (Рис. 13).

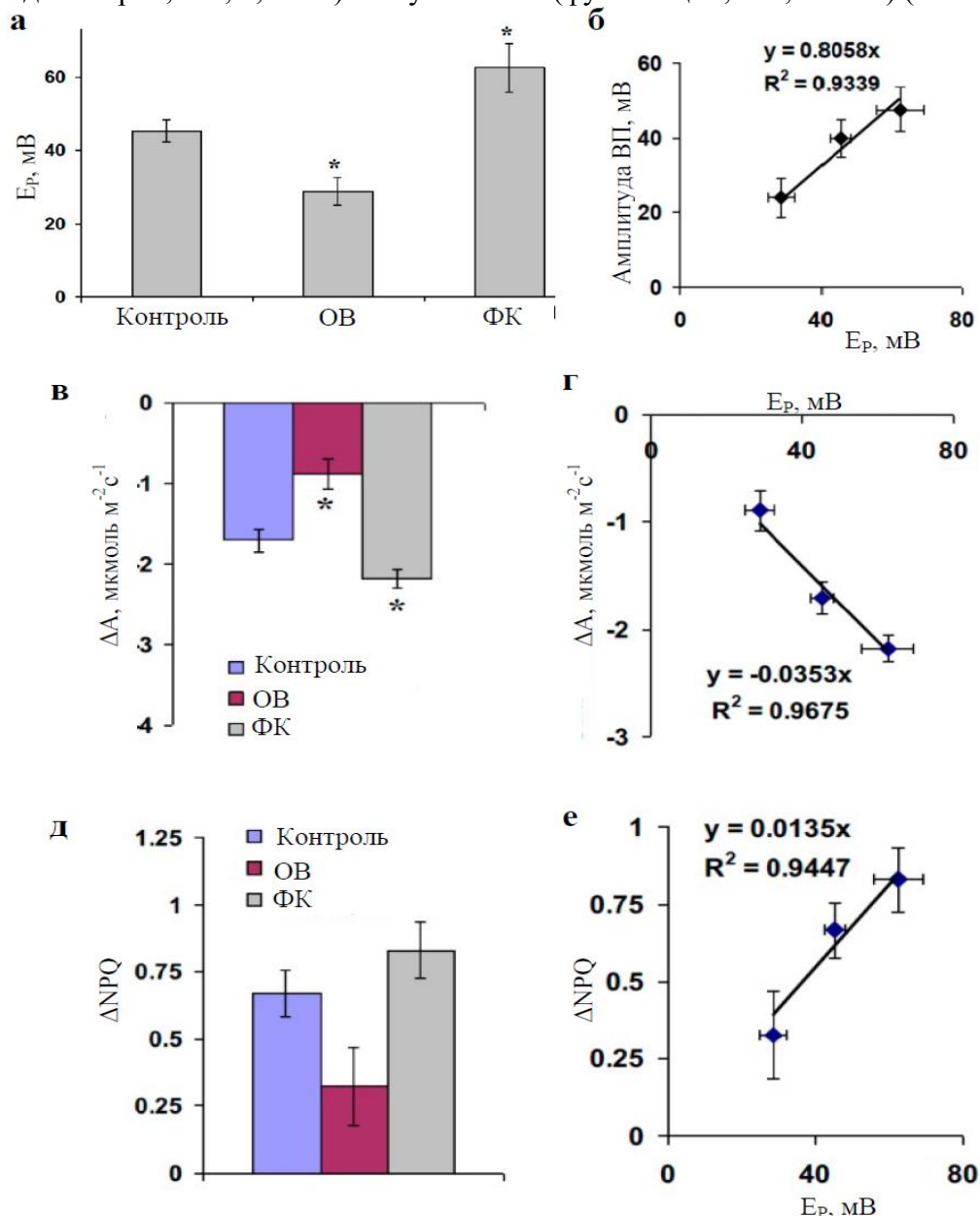


Рис. 13. Влияние предварительной обработки ортованадатом натрия (ОВ, 0,5 мМ) и фузикокцином (ФК, 1 мкМ) на метаболический потенциал (E_p) второго листа гороха ($n=6-10$) (а), диаграмма рассеяния между E_p и амплитудами ВП (б), влияние предварительной обработки ОВ и ФК на амплитуды вызванных ВП изменений А (ΔA) ($n=5-6$) (в), диаграмма рассеяния между E_p и ΔA (г), влияние предварительной обработки ОВ и ФК на амплитуды вызванных ВП изменений NPQ (ΔNPQ) ($n=5-6$) (д), диаграмма рассеяния между E_p и ΔNPQ (е) [A23]. E_p – определяли микроэлектродным методом, по изменению мембранного потенциала в условиях действия высокой концентрации ОВ (5 мМ). Амплитуды ВП измеряли экстраклеточно. А и NPQ измеряли с использованием системы из GFS-3000 и Dual-PAM-100. *, отличия от контроля статистически значимы ($p < 0.05$).

Было показано (Рис. 13а), что предварительная обработка ОВ снижала метаболический потенциал клеток гороха (E_p), а обработка ФК повышала такой потенциал. Изменения E_p сопровождались аналогичными изменениями амплитуды ВП, индуцированными локальным ожогом у обработанных растений (Рис. 13б), и амплитуды последующих изменений ассимиляции (Рис. 13в и 13г) и NPQ (Рис. 13д и 13е). Учитывая, что активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны вносит основной вклад в E_p (Sze et al., 1999; Palmgren et al., 2001), полученный результат показывает тесную связь H^+ -АТФазы как с генерацией ВП, так и с развитием инактивации фотосинтеза.

Далее, на модельной системе (протопласты гороха) было исследовано непосредственное влияние инактивации H^+ -АТФазы (ОВ, 0.25 мМ) на фотосинтетические процессы [A23]. Показано, что инактивация H^+ -АТФазы вызывала снижение ϕ_{PSII} и возрастание NPQ (Рис. 14а и 14б), что хорошо соответствовало инактивации фотосинтеза при распространении ВП (см. обзоры [A1,A16,A32,A51]; Gallé et al., 2015; Szechyńska-Hebda et al., 2017). Вызванное ОВ снижение выделения кислорода на свету протопластами гороха (Рис. 14в) также хорошо соответствовало индуцированной ВП инактивации фотосинтеза. Аналогичный эффект был показан и на листьях гороха [A25]: предварительная обработка ОВ (0.5 мМ) приводила к статистически значимому уменьшению ассимиляции CO_2 по сравнению с контролем (Рис. 14г).

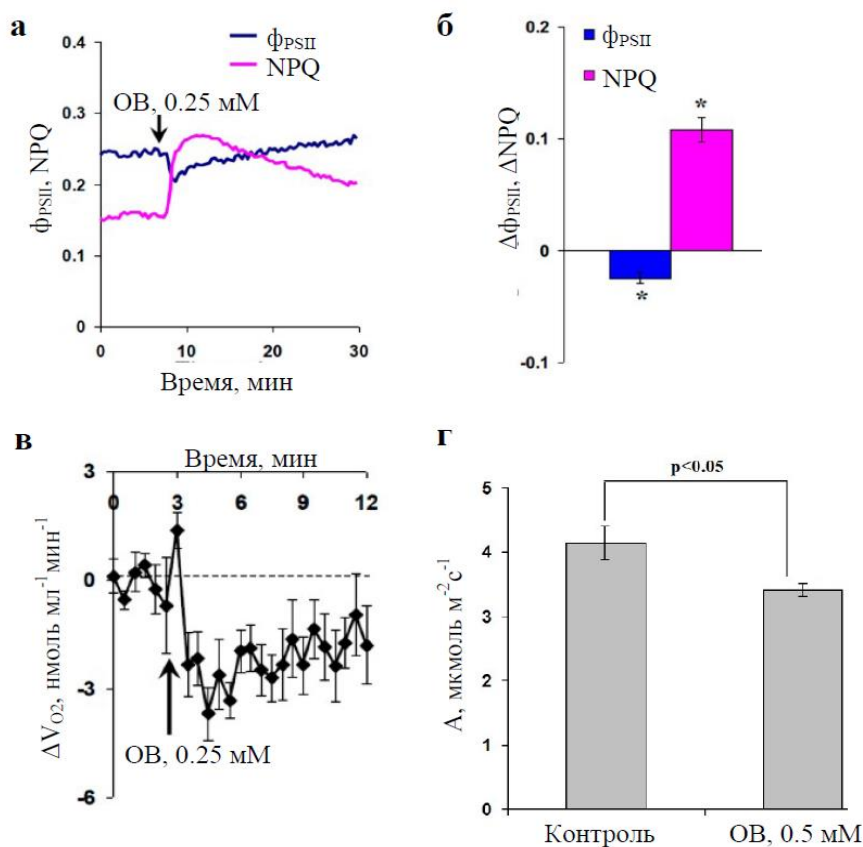


Рис. 14. Влияние обработки ортованадатом натрия (ОВ) на показатели световой стадии фотосинтеза у протопластов гороха и ассимиляцию листьев гороха. а, пример вызванных ОВ (0.25 мМ) изменений ϕ_{PSII} и NPQ протопласта, измеренных Dual-PAM-100 [A23]. б, средние амплитуды вызванных ОВ (0.25 мМ) изменений ϕ_{PSII} и NPQ протопласта, измеренных Dual-PAM-100 ($n=6$) [A23]. в, средняя динамика изменения выделения кислорода (ΔV_{O_2}) при добавлении ОВ (0.25 мМ), измеренная Oxygraph Plus System ($n=7-10$); за ноль принималась скорость выделения кислорода без добавления ОВ [A23]. г, фотосинтетическая ассимиляция (A) листьев гороха после предварительной обработки ОВ (0.5 мМ), измеренная системой GFS-3000 и Dual-PAM-100 [A25]. Стрелка показывает момент добавления ОВ, *, изменения являются статистически значимыми ($p < 0.05$).

Учитывая, что H^+ -АТФаза играет ключевую роль в поддержании внутри- и внеклеточного рН (Ding et al., 2021; Zhou et al., 2021), можно предположить, что влияние ВП на фотосинтез связано, прежде всего, с изменениями рН, которые развиваются после инактивации этого фермента. В серии экспериментальных работ с использованием рН-чувствительных флуоресцентных зондов [A35,A61,A66,A67] было показано, что генерация ВП сопровождается защелачиванием апопласта и закислением цитоплазмы клеток листа высшего растения, включая горох (Рис. 15), тыкву и пшеницу.

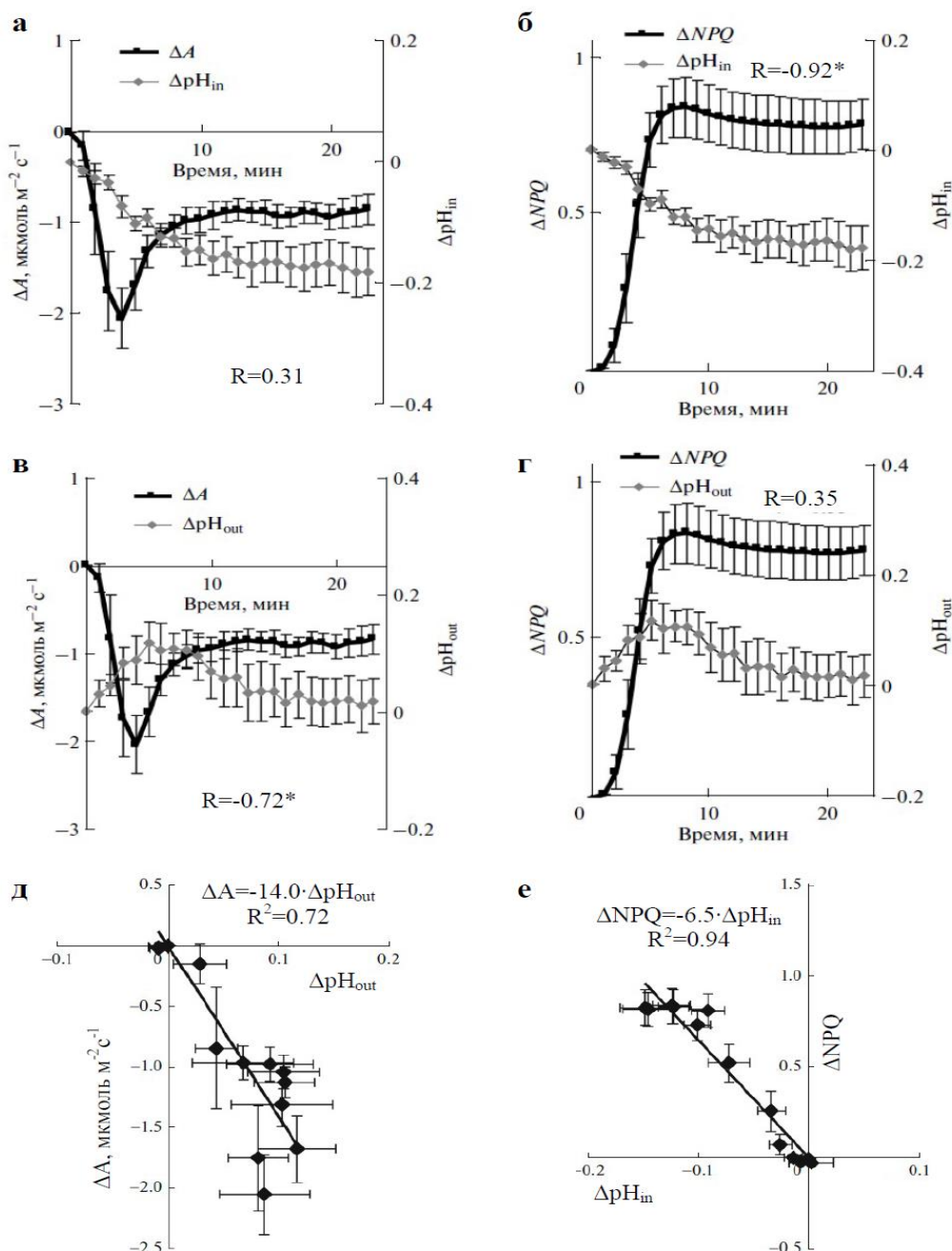


Рис. 15. Усредненные динамики вызванных ВП изменений А (ΔA) и изменений внутриклеточного рН ($\Delta \text{pH}_{\text{in}}$) (а), изменений NPQ (ΔNPQ) и $\Delta \text{pH}_{\text{in}}$ (б), ΔA и изменений внеклеточного рН ($\Delta \text{pH}_{\text{out}}$) (в) и ΔNPQ и $\Delta \text{pH}_{\text{out}}$ (г) у гороха ($n=5-6$) [A67], а также диаграммы рассеяния между ΔA и $\Delta \text{pH}_{\text{out}}$ (д) и ΔNPQ и $\Delta \text{pH}_{\text{in}}$ (е) [A6]. А и NPQ измерены системой из GFS-3000 и Dual-PAM-100. pH_{in} и pH_{out} измерены с использованием флуоресцентных ратиометрических зондов BCECF-AM и FITC-dextran, соответственно. ВП индуцировали ожогом первого листа (нулевая точка); измерения проводили во втором листе. R – коэффициент корреляции Пирсона между динамиками; *, R является статистически значимым ($p<0.05$). R^2 – коэффициент детерминации линейной регрессии.

Для гороха было показано [A6,A67], что изменения внутриклеточного pH (ΔpH_{in}) сильно связаны с изменениями NPQ (ΔNPQ), а изменения внеклеточного pH (ΔpH_{out}) сильно связаны с изменениями ассимиляции (ΔA) (Рис. 15); напротив, связи между ΔA и ΔpH_{in} и между ΔNPQ и ΔpH_{out} были слабыми. Объединение выявленных линейных связей (Рис. 15д и 15е) с ранее разработанной моделью генерации ВП (Sukhov et al., 2013), опирающейся на детализированное описание систем ионного транспорта растительной клетки (H^+ - и Ca^{2+} -АТФазы, Ca^{2+} , K^+ , Cl^- ионные каналы, $2H^+/Cl^-$ симпортер и H^+/K^+ -антипортер) и их регуляции, позволило имитировать вызванную ВП инактивацию фотосинтеза [A6], что соответствует отмеченным выше экспериментальным результатам.

Полученные результаты подтверждают возможность участия изменения внутри- и внеклеточного pH в формировании быстрой инактивации фотосинтеза. Однако, они также показывают различные механизмы влияния pH: внутриклеточный pH влияет прежде всего на NPQ, а внеклеточный pH – на ассимиляцию, что согласуется с показанными на предыдущем этапе различными путями формирования быстрой инактивации фотосинтеза.

2.4.3. Роль закисления цитоплазмы, стромы и люмена хлоропластов в формировании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза

Влияние закисления цитоплазмы может быть связано с транспортом протонов в строму и люмен хлоропластов [A1], так как снижение pH стромы может регулировать поток электронов на акцепторной стороне ФСII за счет изменения локализации ферредоксин-НАДФ-редуктазы и снижения переноса электронов на НАДФ⁺ (Alte et al., 2010; Benz et al., 2011). С другой стороны, снижение pH люмена может замедлять LEF (Tikhonov 2013, 2014) и стимулировать NPQ_F (Müller et al., 2001; Ruban, 2016).

Проведенный анализ показал [A3], что ВП сопровождается закислением люмена хлоропластов, которое оценивали по изменениям светорассеяния на 535 нм (LS) (Рис. 16а); однако, вызванные переменным потенциалом изменения градиента pH, который оценивали по соответствующей компоненте электрохромного сдвига ($ECS_{\Delta pH}$), практически отсутствовали (Рис. 16б).

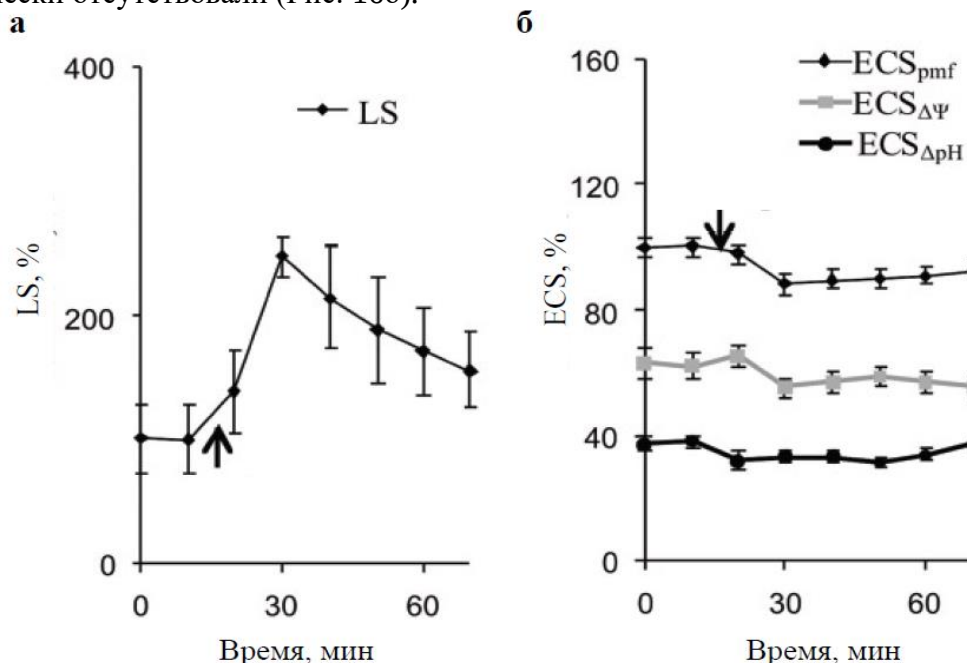


Рис. 16. Усредненные динамики вызванных ВП изменений содержания pH в люмене (светорассеяние на 535 нм, LS) (а) и электрохимического, электрического и химического градиента протонов на тилакоидной мембране (компоненты электрохромного сдвига (ECS), включая ECS_{pmf} , $ECS_{\Delta \Psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$, соответственно) (б) у листьев гороха ($n=6$) [A3]. ВП индуцировали ожогом первого листа (стрелка); измерения проводили на втором листе. LS и ECS нормировали на их величины перед индукцией ВП.

Полученное противоречие, может быть объяснено в том случае, если генерация ВП сопровождается закислением не только люмена, но и стромы хлоропластов. Так как связанные с генерацией ВП «избыточные» протоны могут поступать из цитоплазмы – в строму (через системы протонного транспорта у оболочек хлоропластов, Pottosin, Shabala, 2016; Szabó, Spetea, 2017) и из стромы – в люмен (через электрон-транспортную цепь), одновременное закисление стромы и люмена при ВП является вероятным [A1,A16].

Для дополнительной проверки влияния закисления цитоплазмы на фотосинтез были использованы модельные системы: погруженные в водный раствор части листа гороха, которые затем обрабатывали протонофором (КЦХФГ, 25 мкМ), и выделенные хлоропласты, у которых закисляли среду инкубации [A61] (Рис. 17).

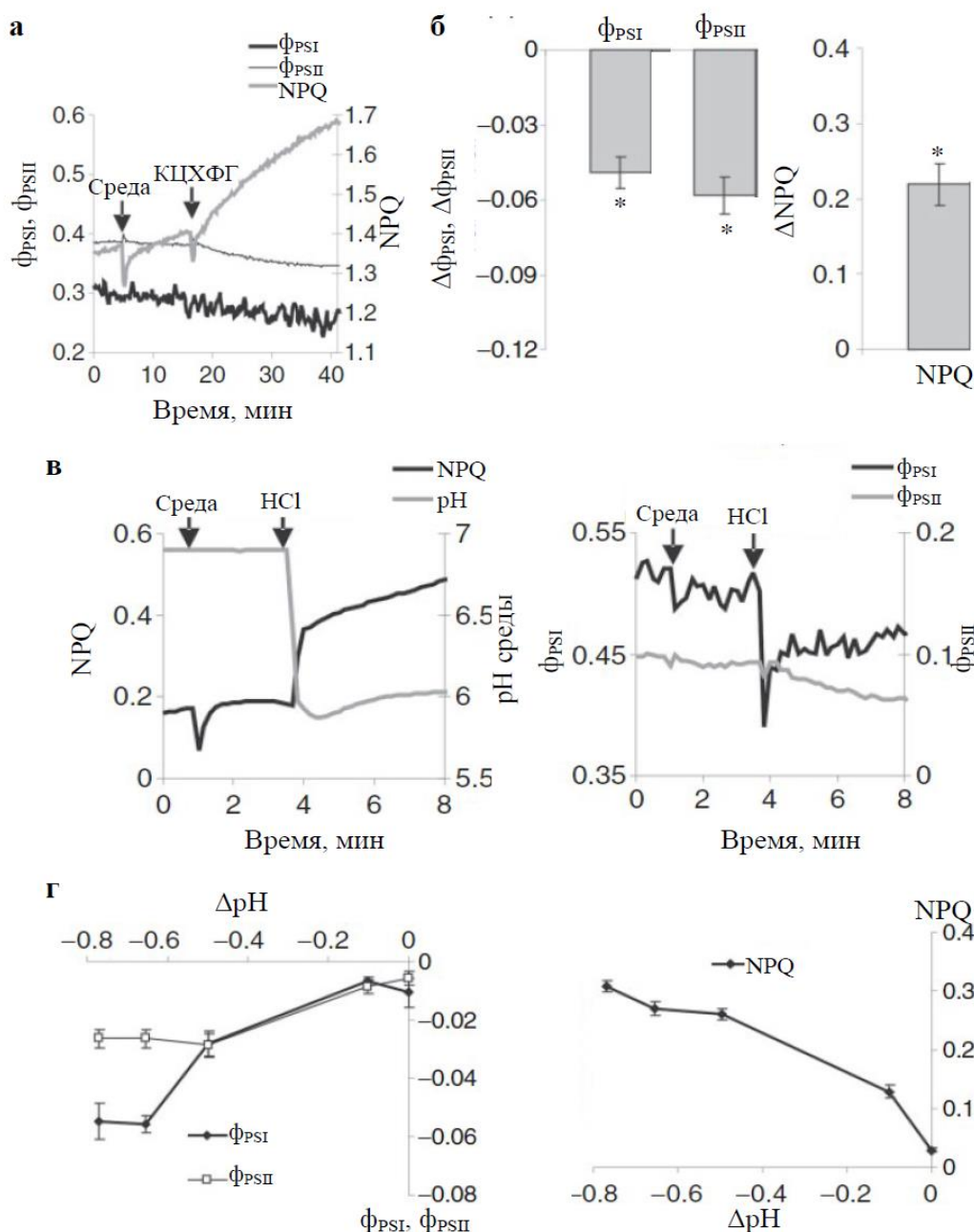


Рис. 17. Пример изменений Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и NPQ , вызванных добавлением КЦХФГ (25 мкМ) к участку листа гороха (а), средние величины таких изменений ($n=11$) (б), пример изменений Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и NPQ , вызванных закислением (добавление 0.5 М HCl) среды инкубации хлоропластов гороха (в), и средние величины таких изменений ($n=5-7$) (г) [A61]. Стрелки обозначают момент добавления действующего вещества или среды.

Оба варианта имитировали закисление цитоплазмы при ВП. Было показано, что и добавление КЦХФГ (Рис. 17а и 17б) к участкам листа, и закисление среды инкубации хлоропластов (Рис. 17в и 17г), вызывали снижение квантовых выходов ФСІ и ФСІІ и возрастание NPQ, что хорошо соответствовало вызванной ВП инактивации фотосинтеза в интактных растениях. Инактивирующее влияние закисления среды инкубации на фотосинтетические процессы было также показано для хлоропластов тыквы [A60,A66] и, согласно данным литературы, для хлоропластов кукурузы (Grams et al., 2009).

Таким образом, сопровождающее развитие ВП закисление цитоплазмы, стромы и люмена хлоропластов, может быть одним из путей формирования быстрой инактивации фотосинтеза. По-видимому, такое закисление является механизмом непосредственного влияния переменного потенциала на процессы световой стадии фотосинтеза.

2.4.4. Роль защелачивания апопласта в формировании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза

Как было показано в разделе 2.4.2 (Рис. 15в и 15д), вызванная ВП инактивация темновой стадии фотосинтеза связана, прежде всего, с изменениями pH в апопласте клеток растения. Такой результат противоречит влиянию ВП на цикл Кальвина, который должен быть скорее связан с закислением цитоплазмы и стромы, так как активность его ферментов зависит от pH (Wolosiuk et al., 1993). Альтернативной гипотезой является влияние сопровождающего ВП защелачивания апопласта на транспорт CO₂ в фотосинтезирующие клетки. Такая гипотеза хорошо согласуется с данными о снижении проводимости мезофилла для CO₂, которое сопровождает распространение электрических сигналов и индукцию быстрой инактивации фотосинтеза у сои (Gallé et al., 2013).

Потенциально можно предположить два наиболее вероятных механизма влияния pH апопласта на транспорт CO₂ в фотосинтезирующие клетки [A51]. Первый из них связан со снижением соотношения CO₂/HCO₃⁻, которое происходит при возрастании pH (Булычев и др. 2001), так как заряженная HCO₃⁻ слабо транспортируется через биологические мембраны (Tholen, Zhu, 2011). рК для реакции CO₂+H₂O↔HCO₃⁻+H⁺ составляет 6.35 [A66]; при этом показанные с использованием флуоресцентного зонда FITC-dextran начальные значения pH апопласта клеток гороха и тыквы равнялись приблизительно 5.5-5.8 ед. pH [A61,A66,A67]. На основании этого, можно ожидать, что даже умеренное возрастание pH апопласта при генерации ВП (приблизительно на 0.2-0.4 ед. pH [A66,A67]) способно значительно влиять на транспорт углекислого газа через плазматическую мембрану (снижать на величину до 25% [A66]), вследствие близости начального pH апопласта к рК. Учитывая, что данные литературы показывают возможность более масштабного возрастания pH при ВП (на 0.5-1.0 ед. pH, и более Grams et al., 2009; Zimmermann, Felle, 2009), величина снижения поступления CO₂ в фотосинтезирующие клетки может быть значительно более высокой. Важно также отметить, что величина pH апопласта существенно варьирует в различных исследованиях (в частности, у разных растений, тканей и клеток); в некоторых случаях, она может лежать ниже 5 или выше 7 ед. pH (см., например, обзор Yu et al., 2000). Такая переменность может быть дополнительным фактором модификации вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза, так как в зависимости от начального pH апопласта и амплитуды его возрастания при переменном потенциале, изменения соотношения CO₂/HCO₃⁻ могут существенно варьировать [A51].

Для более детального анализа влияния вызванных ВП изменений pH апопласта на вероятность прохождения CO₂ в цитоплазму фотосинтезирующей клетки (P_{CO₂}) в рамках диссертационного исследования была разработана математическая модель, подробно описанная в теоретических работах [A10,A15] и в обзоре [A9], которая опиралась на ранее предложенную серию моделей электрогенеза растительной клетки (Sukhov, Vodeneev, 2009; Sukhov et al., 2011, 2013). Разработанная модель учитывала основные системы активного и пассивного ионного транспорта через плазматическую мембрану и тонопласт (включая H⁺-АТФазу плазматической мембраны), изменения концентраций ионов,

буферные свойства для таких ионов, а также регуляцию систем ионного транспорта (Рис. 18а). Последнее позволяло описать возбудимость растительной клетки.

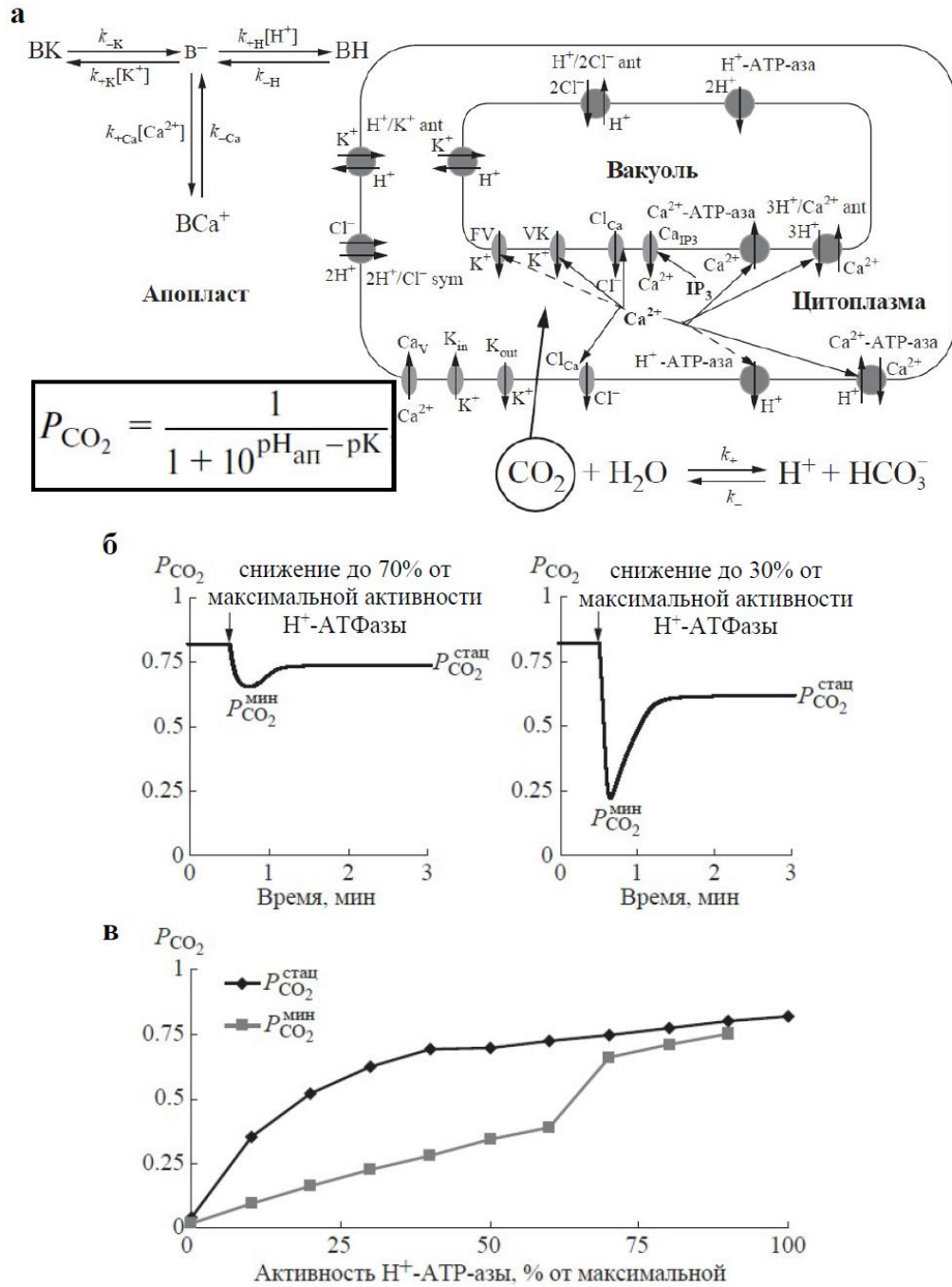


Рис. 18. Принципиальная схема модели возбудимой клетки, учитывающей влияние pH апопласта на вероятность прохождения CO_2 в цитоплазму (P_{CO_2}) (подробное описание модели и параметры см. в [A10,A15]) (а), примеры динамики P_{CO_2} при различной амплитуде инактивации H^+ -АТФазы (б) и зависимости минимальной ($P_{CO_2}^{мин}$) и стационарной ($P_{CO_2}^{стационар}$) величины P_{CO_2} от величины итоговой активности H^+ -АТФазы после снижения активности (в) [A15].

P_{CO_2} было описана на основании [A66], как $P_{CO_2} = \frac{1}{1 + 10^{pH_{ap} - pK}}$, где pH_{ap} – pH в апопласте, а $pK=6.35$ – отрицательный десятичный логарифм константы равновесия для реакции $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$. Для имитации генерации ВП использовали ступенчатое снижение активности H^+ -АТФазы. В ходе анализа было показано, что снижение

активности фермента вызывало быстрое уменьшение P_{CO_2} , после чего в минутном диапазоне происходило частичное восстановление показателя (Рис. 18б); величина эффекта зависела от величины инактивации H^+ -АТФазы (Рис. 18в). Полученные результаты подтверждают возможность участия сдвига соотношения CO_2/HCO_3^- в генерации вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза.

Важно отметить, что выявленные изменения P_{CO_2} отражают нестационарные изменения поглощения углекислого газа клетками листа растения; однако, при анализе стационарных изменений может наблюдаться другая картина: сдвиг уравнения $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ будет приводить к большему накоплению общего пула CO_2 и HCO_3^- , компенсируя тем самым уменьшение P_{CO_2} . Для проверки влияния изменения активности H^+ -АТФазы на стационарную фотосинтетическую ассимиляцию была разработана дополнительная модель фотосинтеза. Модель и ее параметры подробно описана в работах [A45,A46]; общая схема модели представлена на рисунке 19а.

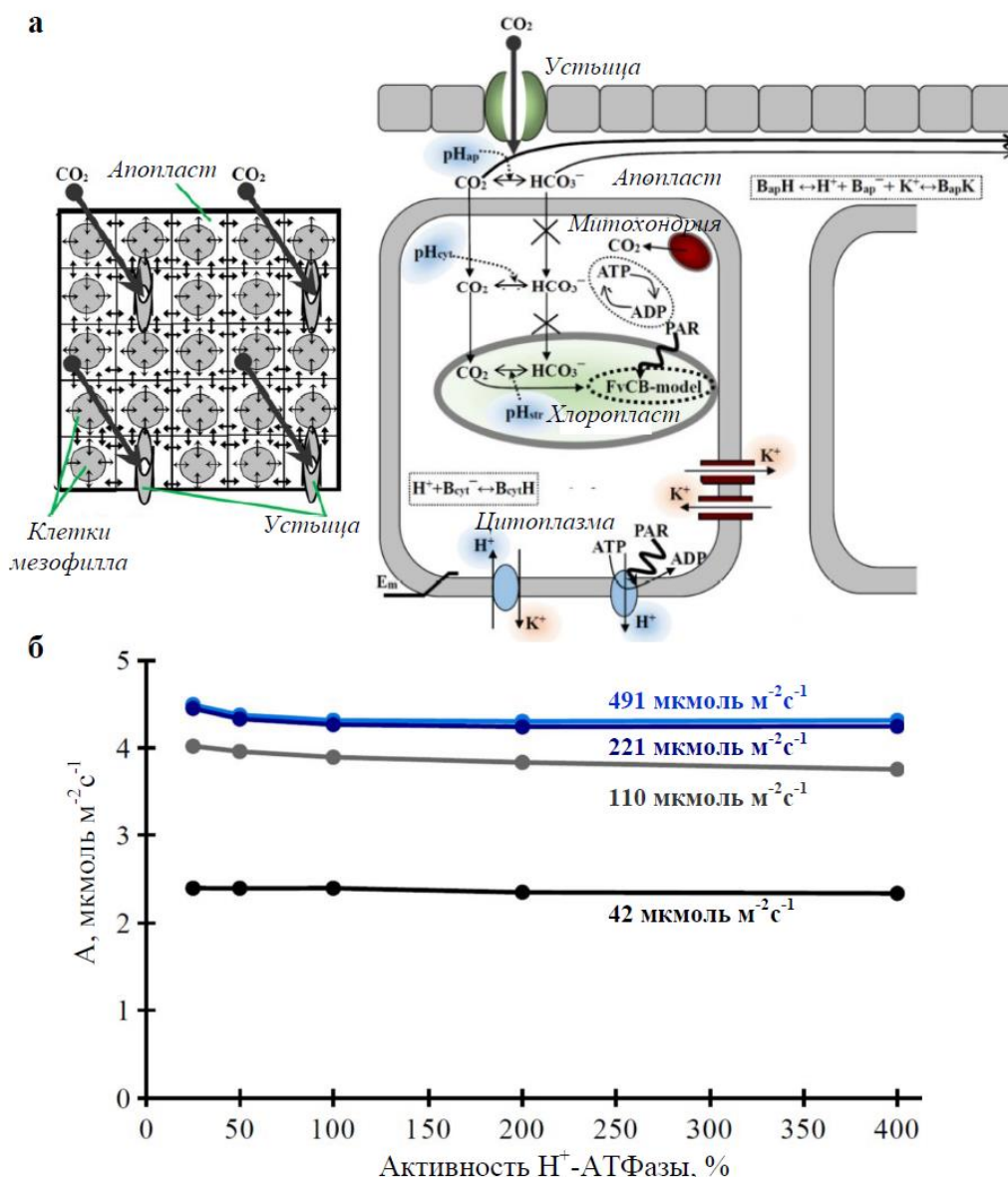


Рис. 19. Принципиальная схема двумерной модели фотосинтеза в листе (подробное описание модели и параметры см. в [A45,A46]) (а) и влияние активности H^+ -АТФазы на имитированную моделью фотосинтетическую ассимиляцию (б) в условиях разной интенсивности освещения (от 42 – до 491 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) [A46]. Для приведенного анализа использован вариант модели, в котором устьица располагались в центре квадратов 5×5 клеток.

Разработанная модель представляла собой двумерную систему фотосинтезирующих клеток мезофилла с участками апопласта, имитирующую лист (или участок листа). Поступление CO_2 осуществлялось через устьица, расположенные в центре блоков 3×3 или 5×5 клеток, дальнейший транспорт CO_2 и HCO_3^- в апопласт соседних клеток описывали на основании закона Фика. Взаимопревращение CO_2 и HCO_3^- описывали как мгновенное (т.е. описывалось их равновесное распределение). В работе использовалась минимальная электрофизиологическая модель клетки, опирающаяся на раннюю модель Sukhov, Vodeneev (2009). Модель учитывала H^+ -АТФазу плазматической мембраны, inwardly-rectifying и outwardly-rectifying K^+ каналы и H^+/K^+ антипортер; изменения концентраций протонов и калия, а также буферные свойства. Поступление CO_2 в клетку описывали на основании закона Фика; поступление HCO_3^- через мембрану принимали нулевым (Tholen, Zhu, 2011). Фотосинтетические процессы в строме описывали на основе стандартной модели Farquhar–von Caemmerer–Berry (von Caemmerer et al., 2009; von Caemmerer, 2013), у которой было сохранено только два варианта лимитирования фиксации CO_2 (в соответствии с Bernacchi et al., 2009): лимитирование активностью Рубиско и лимитирование функционированием электрон-транспортной цепи тилакоидных мембран (см. также [A43,A52]). Анализ стационарной фотосинтетической ассимиляции, имитированной моделью, показал (Рис. 19б), что изменения активности H^+ -АТФазы слабо влияли на такую ассимиляцию. Учитывая, что для достижения стационарных значений требовалось около 10-20 минут модельного времени, полученный результат показывает, что вызванные инактивацией H^+ -АТФазы и защелачиванием апопласта сдвиги соотношения $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ могут участвовать в быстрой фазе инактивации фотосинтеза [A1]; однако, их участие в длительных изменениях менее вероятно. Следует отметить, что разработанная модель не анализировала возможное влияние пространственной неоднородности в распределении карбоангидраз и аквапоринов [A51], которые могут иметь совместную локализацию (Wang et al., 2016). Учитывая, что аквапорины участвуют в транспорте CO_2 через мембраны растительных клеток (Uehlein et al., 2008; Gallé et al., 2013), нельзя исключать существование нестационарных распределений CO_2 и HCO_3^- около систем их транспорта. В этом случае, влияние pH апопласта на соотношение $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ может иметь длительный характер.

Альтернативная гипотеза, объясняющая влияние изменений pH на фотосинтез, предполагает, что такие изменения снижают способность аквапоринов пропускать CO_2 (Gallé et al., 2013). Такое предположение, хорошо согласуется с результатами моделирования [A46], которые показывают снижение стационарной фотосинтетической ассимиляции при уменьшении проводимости плазматической мембраны для CO_2 . Однако, данные литературы показывают, что инактивация аквапоринов наблюдается при закислении цитоплазмы (Liu, Maurel, 2005; Chaumont, Tyerman, 2014; Kapilan et al., 2018), а не при защелачивании апопласта. Такой вариант развития ответа противоречит экспериментальным результатам [A6,A67] (Рис. 15); т.е. является менее вероятным.

Таким образом, результаты этапа диссертационного исследования показывают, что сопровождающее ВП защелачивание апопласта, по-видимому, снижает поступление CO_2 в фотосинтезирующие клетки. pH зависимое смещение равновесия в реакции $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ в сторону образования HCO_3^- является возможным механизмом такого ответа (по крайней мере для быстрой инактивации фотосинтеза и нестационарных потоков CO_2 в строму).

2.4.5. Анализ потенциальной роли устьиц в формировании вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации и активации фотосинтеза

Из литературы известно, что распространение электрических сигналов часто сопровождается закрытием или открытием устьиц (Koziolek et al., 2004; Hlavácková et al., 2006; Grams et al., 2007, 2009; Hlavinka et al., 2012; Gallé et al., 2013; Lautner et al., 2014; Vuralhan-Eckert et al., 2018). Вызванные ВП изменения проводимости устьиц были также показаны в экспериментальном блоке диссертационного исследования

[A20,A34,A35,A59,A64]. Более того, вызванное ВП снижение проводимости устьиц у листьев гороха [A64] было связано с активностью H^+ -АТФазы, так как предварительная обработка ортованадатом натрия (0.5 мМ) приводила как к уменьшению начальной транспирации (Рис. 20а), так и к снижению ее изменения после индукции переменного потенциала (Рис. 20б). По-видимому, полученный результат обусловлен ключевой ролью H^+ -АТФазы в обеспечении открытости устьиц (Falhof et al., 2016; Inoue, Kinoshita, 2017), что приводит к закрытию устьиц при уменьшении активности фермента. Потенциально, изменение открытости устьиц может влиять на поступление CO_2 в фотосинтезирующие клетки, что подтверждается, например, анализом разработанной модели фотосинтеза в листе [A45,A46], т.е. может быть механизмом влияния ВП на фотосинтез.

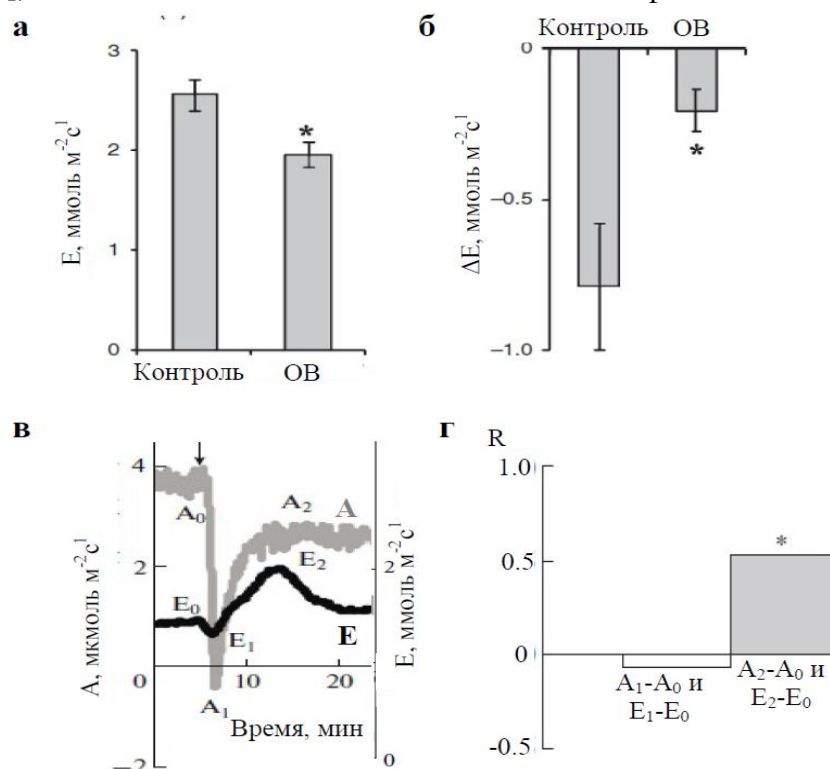


Рис. 20. Влияние ортованадата натрия (ОВ, 0.5 мМ) на стационарный уровень транспирации (Е) (а) и на вызванные ВП изменения Е (ΔE) (б) у гороха ($n=6$) [A64]. Пример вызванного ВП ответа А и Е, на котором показаны различные этапы ответа (в), и коэффициент корреляции (R) между изменениями Е и А на разных этапах ответа ($n=21$) (г) [A20]. Результаты, представленные на а и б, и результаты, представленные на в и г, получены в различных сериях экспериментов. ВП индуцирован ожогом первого листа гороха (стрелка); измерения проводились во втором листе с использованием GFS-3000 и Dual-РАМ-100. *, показывает статистически значимые различия с контролем или коэффициенты корреляции ($p<0.05$).

Проведенный в рамках работы [A20] анализ большого массива вызванных ВП ответов ассимиляции (А) и транспирации (Е) показал, что динамика изменения транспирации у гороха может иметь достаточно сложный характер (Рис. 20в) и корреляция между изменениями А и Е либо полностью отсутствовала, либо была достаточно слабой в течение первых 15 минут развития ответа (Рис. 20г). Такой результат хорошо согласуется с результатами других экспериментальных блоков исследования [A34,A35,A59], а также с данными ряда представленных в литературе работ (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009; Gallé et al., 2013). Однако, в литературе также имеются работы (Peña-Cortés et al., 1995; Hlavácková et al., 2006; Grams et al., 2007; Hlavinka et al., 2012; Vuralhan-Eckert et al., 2018), в которых показана очень близкая динамика вызванных электрическими сигналами изменений ассимиляции и транспирации (или проводимости устьиц листа). Более того, в некоторых из этих работ (Peña-Cortés et

al., 1995; Fromm, Fei, 1998; Vuralhan-Eckert et al., 2018), электрические сигналы вызывали активацию фотосинтетических процессов (возрастание ассимиляции CO_2), которая сопровождалась увеличением проводимости устьиц листа.

Отмеченные противоречивые результаты могут быть объяснены на основании гипотезы, предложенной в рамках диссертационного исследования [A56]. В соответствии с ней, опираясь на метод эквивалентных схем и предполагая последовательное соединение проводимостей мезофилла (g_m) и устьиц (g_{st}) для CO_2 , общая проводимость листа для CO_2 (g_{CO_2}) была описана как $\frac{g_m g_{st}}{g_m + g_{st}}$. В этом случае, при низкой величине g_m по сравнению с

g_{st} , что может наблюдаться у гороха в благоприятных условиях [A11], изменения проводимости устьиц не будут влиять на итоговый фотосинтетический ответ. Напротив, в условиях низкой g_{st} , вызванные ВП изменения проводимости устьиц будут полностью определять фотосинтетический ответ темновой стадии фотосинтеза. Такой вариант, хорошо согласуется с высокой степенью соответствия между изменениями ассимиляции и транспирации, показанной экспериментально в условиях сильной засухи [A44]. Следует также отметить, что быстрое открытие устьиц достаточно часто наблюдается при индукции ВП ([A20, A34, A35], Peña-Cortés et al., 1995; Fromm, Fei, 1998; Koziol et al., 2004; Grams et al., 2009; Gallé et al., 2013), что создает предпосылки для развития вызванной ВП активации фотосинтеза в том случае, если проводимость устьиц будет лимитировать общую проводимость листа для CO_2 .

В соответствии с работой [A20], можно предположить, что инактивация H^+ -АТФазы, которая приводит к снижению тургора клеток (посредством сопровождающего такую инактивацию выхода ионов калия и хлора из клеток), может одновременно способствовать как закрытию, так и открытию устьиц. В частности, при такой инактивации замыкающие клетки, теряя тургор, будут закрывать устьица; напротив, теряющие тургор клетки эпидермиса вокруг устьиц могут способствовать их открытию (Kaiser, Grams, 2006; Kollist et al., 2014). Было предположено, что в зависимости от конкретных экспериментальных условий и/или вида растения, при распространении ВП будет преобладать один из этих процессов, обеспечивая различный результирующий ответ на ВП (закрытие или открытие устьиц). В частности, проведенный в рамках диссертационного исследования анализ [A20], показал, что при более низкой влажности воздуха ВП вызывал снижение транспирации (Рис. 21а), а при более высокой влажности – ее возрастание (Рис. 21б).

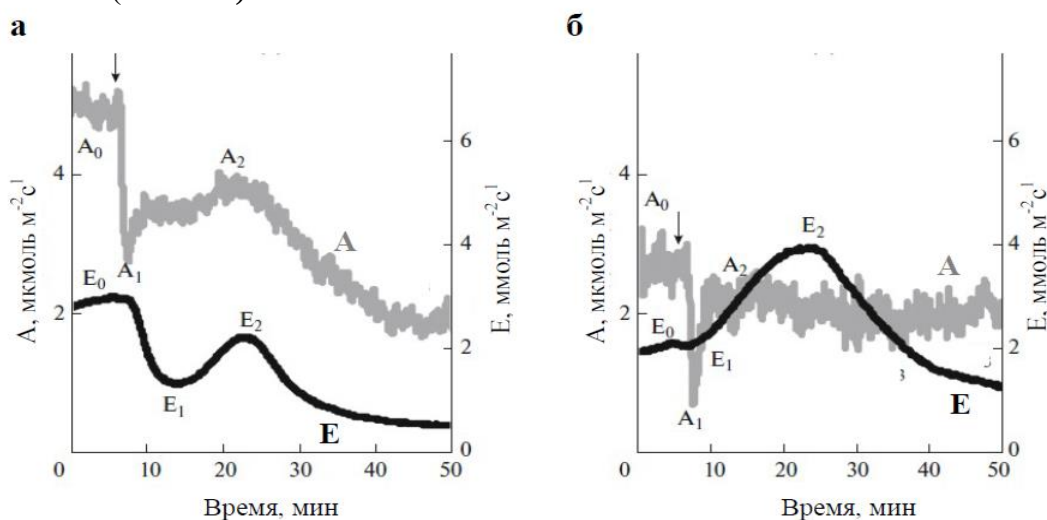


Рис. 21. Примеры вызванного ВП ответа А и Е в условиях влажности окружающего лист воздуха, равной 16000 ppm (а) и 20000 ppm (б) [A20]. ВП индуцирован ожогом первого листа гороха (стрелка); измерения проводились во втором листе с использованием GFS-3000 и Dual-PAM-100. GFS-3000 поддерживал заданную влажность воздуха.

Еще одним фактором, потенциально влияющим, на тип и величину вызванного ВП ответа устьиц, является их исходная проводимость. Так, данные литературы показывают (Gallé et al., 2013), что в условиях более низкой проводимости устьиц (концентрация CO_2 в среде 2000 ppm) ВП вызывает возрастание такой проводимости на 46%; напротив, в условиях более высокой проводимости устьиц (концентрация CO_2 в среде 700 ppm) ВП вызывает возрастание такой проводимости на 22%. Кроме того, в отдельной серии экспериментов в рамках диссертационного исследования [A44] было показано, что при влажности окружающего лист воздуха 20000 ppm и достаточном поливе, ВП с равной вероятностью вызывал быстрое выраженное возрастание или снижение проводимости устьиц; напротив, в условиях почвенной засухи (влажность воздуха не менялась) и резкого уменьшения исходной проводимости устьиц, в 66.7% случаев наблюдалось быстрое возрастание проводимости после ВП (в остальных случаях ответы отсутствовали).

Таким образом, результаты этапа исследования показывают, что при достаточно низкой проводимости устьиц, вызванные ВП изменения такой проводимости, по-видимому, могут быть основным механизмом развития быстрых фотосинтетических ответов, включая как инактивацию, так и активацию фотосинтеза. Выбор между открытием или закрытием устьиц при распространении ВП может определяться видом растения и условиями среды; в частности, более низкая исходная проводимость устьиц, по-видимому, способствует более выраженному повышению их проводимости при ВП и наоборот. Следует, однако, отметить, что в большинстве экспериментов диссертационного исследования (исключая [A44]), вариант регуляции фотосинтеза вызванными ВП ответами устьиц не реализовывался.

2.4.6. Общая схема потенциальных механизмов развития быстрой инактивации фотосинтеза, индуцированной переменным потенциалом у высших растений

Рис. 22 обобщает основные результаты блока диссертационного исследования, показывая потенциальные механизмы развития быстрых фотосинтетических ответов (прежде всего, инактивации фотосинтеза) при индукции и распространении ВП. При этом, ключевым этапом всех механизмов является инактивация H^+ -АТФазы [A51], которая сопровождает генерацию ВП и, по-видимому, играет основную роль в реализации всех рассматриваемых механизмов формирования быстрого фотосинтетического ответа (непосредственная инактивация световой стадии, уменьшение проводимости мезофилла листа для CO_2 , изменение проводимости устьиц для CO_2).

Следует отметить, что существуют альтернативные гипотезы о механизмах индукции быстрых фотосинтетических ответов электрическими сигналами. Одна из них (Krupenina, Bulychov, 2007), объясняет инактивацию фотосинтеза входом ионов кальция. Однако, учитывая тесную связь входа ионов кальция и инактивации H^+ -АТФазы при развитии ВП [A16,A51,A65], такой вход можно рассматривать как этап, предшествующий реализации показанных выше механизмов.

Еще одна гипотеза (Białasek et al., 2017) связывает инициацию фотосинтетических ответов с распространением по растению активных форм кислорода (вероятно, пероксида водорода), которые рассматриваются как механизм передачи электрических сигналов по проводящим пучкам (Suzuki, Mittler, 2012; Choi et al., 2017; Hilleary, Gilroy, 2018). Однако, в рамках этой гипотезы, активные формы кислорода (включая пероксид водорода) также являются лишь частью механизма формирования ВП, индуцирующими активацию Ca^{2+} -каналов, вход ионов кальция и последующую инактивацию H^+ -АТФазы плазматической мембраны [A65].

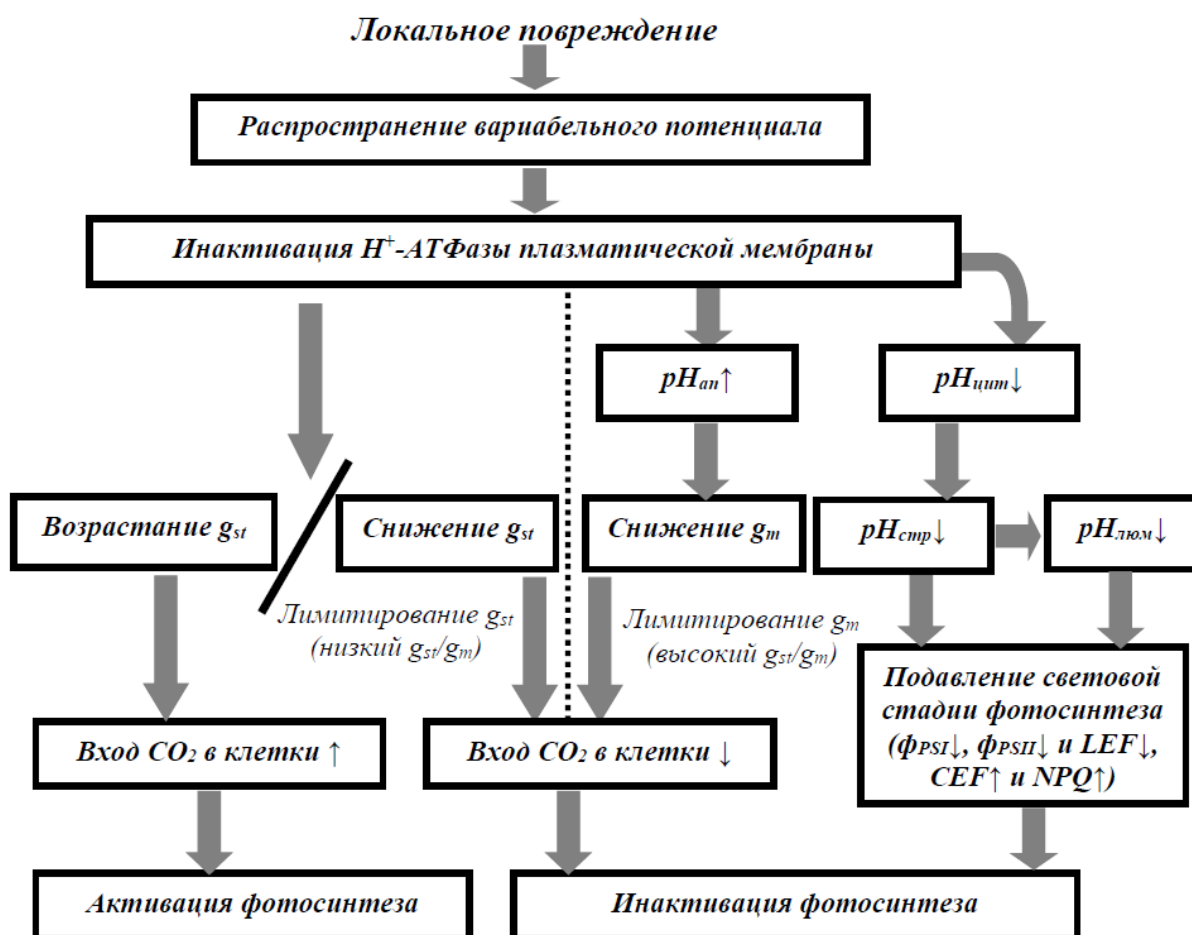


Рис. 22. Схема потенциальных путей индукции быстрых фотосинтетических ответов при распространении переменного потенциала. $pH_{ап}$, $pH_{цит}$, $pH_{стр}$ и $pH_{люм}$ – pH в апопласте, цитоплазме, строме и люмене хлоропластов, соответственно. g_{st} и g_m – проводимость устьиц и мезофилла для CO_2 . ϕ_{PSI} , ϕ_{PSII} , LEF , CEF и NPQ – квантовые выходы фотосистемы I и II, нециклический поток электронов, циклический поток электронов вокруг фотосистемы I и нефотохимическое тушение флуоресценции, соответственно.

2.5. Анализ путей влияния переменного потенциала и вызванной им быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом

2.5.1. Влияние индукции переменного потенциала на теплоустойчивость растений

Масштабное влияние электрических сигналов на физиологические процессы у растений [A1,A16,A51] позволяет предположить, что такие сигналы могут участвовать в адаптации растений к действию неблагоприятных факторов [A1,A32,A50], повышая, в частности, их устойчивость к этим факторам. В литературе представлен ряд работ (Ретивин и др., 1999; Szechyńska-Hebda et al., 2010; Zandalinas et al., 2020a, 2020b), показывающих положительное влияние электрических сигналов на такую устойчивость; однако, механизмы влияния и, в частности, роль быстрой инактивации фотосинтеза в его реализации в настоящее время остаются слабо исследованными. Влияние ВП на устойчивость растений к повышенной температуре, которая является одним из ключевых неблагоприятных факторов для растений (Bakery et al., 2024; Pandey et al., 2024; Yao et al., 2024), было проанализировано в текущем блоке диссертационного исследования.

Прежде всего, было изучено влияние локального ожога и индукции ВП на общую теплоустойчивость гороха [А64], которую оценивали по подавлению ростовой реакции после тестового воздействия высокой температуры. Было показано, что предварительная индукция ВП локальным ожогом первого листа за 15 мин до системного нагрева растения приводила к снижению подавления ростовых процессов после такого нагрева (Рис. 23). Следует отметить, что эффект наблюдался лишь при нагреве до 53°; в условиях более слабого или более сильного нагрева он отсутствовал.

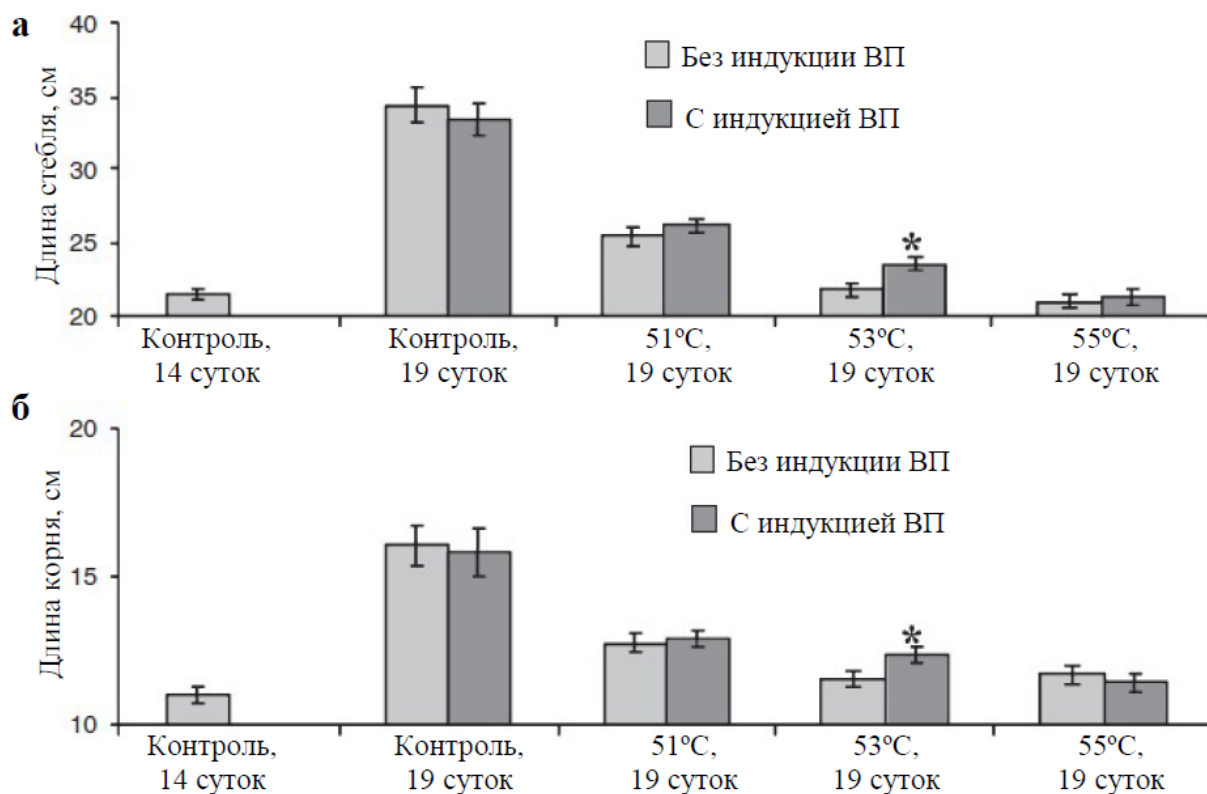


Рис. 23. Влияние предварительной индукции переменного потенциала на рост побега (а) и корня (б) гороха после кратковременного действия высокой температуры ($n=20-50$) [А64]. Индукция ВП осуществлялась локальным ожогом первого листа гороха. Высокая температура действовала на все растение (30 мин, нагрев до 51, 53 или 55°C, термостат TV-20-PZ-'К'); воздействие начиналось через 15 мин после индукции ВП. Морфометрические измерения осуществлялись через 5 суток после нагрева. *, между вариантами с индукцией ВП и без индукции наблюдались статистически значимые различия ($p<0.05$).

Для проверки возможности участия вызванных локальным ожогом и индукцией ВП изменений теплоустойчивости фотосинтетического аппарата в выявленном ответе было исследовано фотосинтетическое повреждение при нагреве воздуха в камере с листом до 53°C [А64]. Показано (Рис. 24), что предварительная индукция ВП снижала повреждение ФСІ при нагреве; напротив, температурное повреждение ФСІІ усиливалось. Важно отметить, что вызванные индукцией ВП изменения теплоустойчивости ФСІ и ФСІІ, по-видимому, отсутствовали при более слабом нагреве [А62]. Более того, на пшенице [А34] и томате [А49] было показано, что индукция ВП может снижать температурное повреждение ФСІІ при использовании более слабого нагрева (до 50°C), вызывающего слабое снижение F_{PSII} в контроле (на 20-40%). Таким образом, выявленное возрастание температурного повреждения ФСІІ [А64] не является обязательным результатом индукции ВП.

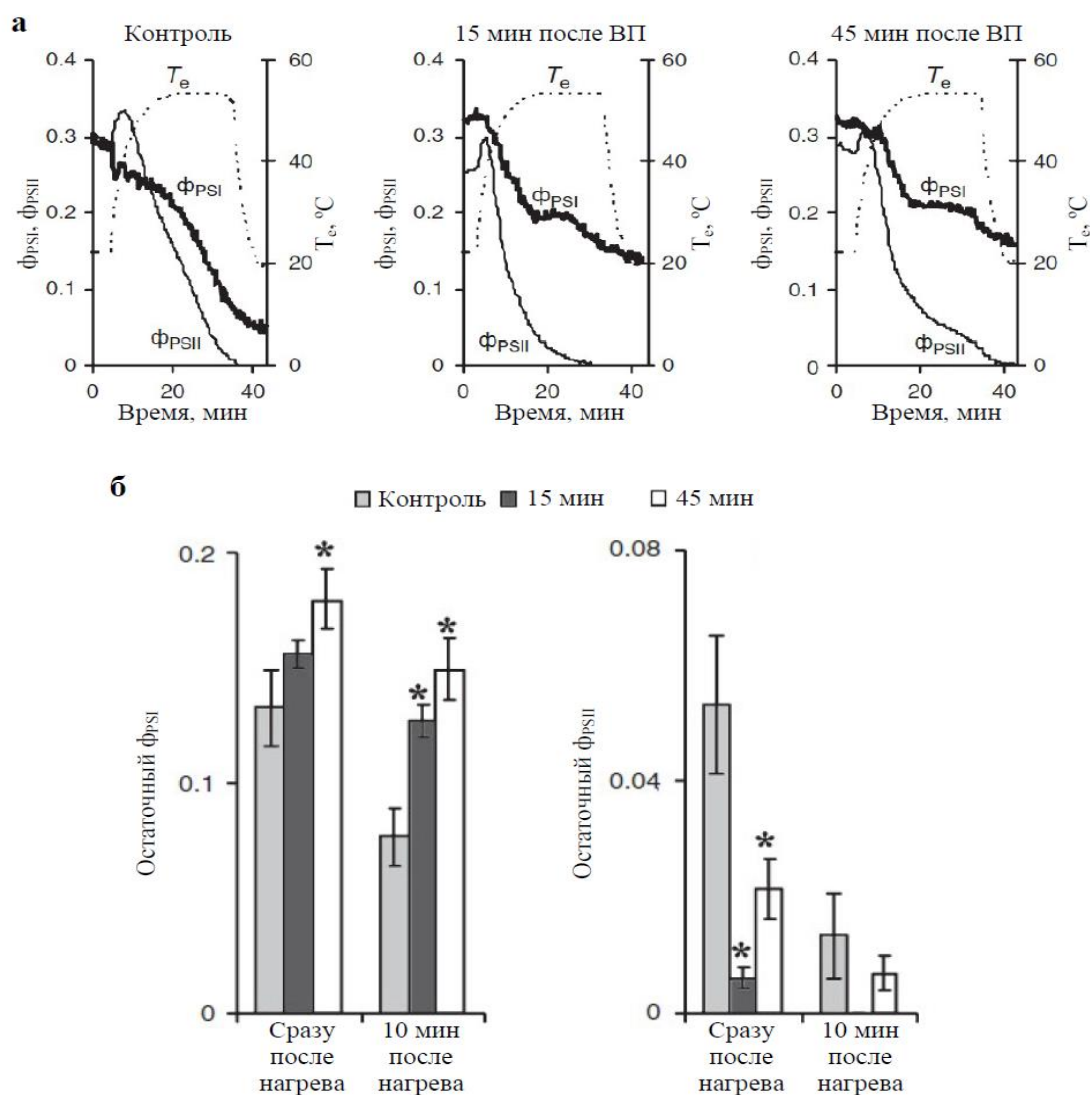


Рис. 24. Примеры изменения Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и температуры воздуха, окружающего лист (T_e), у растений гороха в контроле и через 15 и 45 мин после индукции ВП (а) и средние величины остаточных Φ_{PSI} и Φ_{PSII} сразу после нагрева и через 10 мин ($n=5-8$) (б) [A64]. ВП индуцировали ожогом первого листа; нагрев воздуха в камере 3010-Dual и фотосинтетические измерения осуществляли на втором листе. Нагрев продолжался в течение 30 мин и достигал 53°C. *, между вариантами с индукцией ВП и без индукции наблюдались статистически значимые различия ($p<0.05$).

В рамках диссертационного исследования был проведен дополнительный анализ связи индукции электрических сигналов и теплоустойчивости фотосинтеза у гороха [A8]. Такой анализ опирался на одновременный нагрев (до 30, 40 и 45°C) и измерение электрической активности листьев (Рис. 25а) и на последующий корреляционный анализ между параметрами электрических сигналов и остаточной активностью фотосинтетических процессов (Рис. 25б и 25в). При этом нагрев листа вызывал в зоне действия электрические сигналы, которые по своим характеристикам были близки к ВП (длительные деполяризационные сигналы сложной формы) и, вероятно, имели сходные механизмы. Было показано, что остаточная активность фотосинтетических процессов (ассимиляция, квантовый выход ФСII) была выше при большей амплитуде электрических реакций. Более высокая остаточная активность таких показателей наблюдалась также при более низком температурном пороге индукции электрических реакций [A8]. Эти результаты дополнительно подтверждают участие электрических сигналов в повышении теплоустойчивости фотосинтетического аппарата и возможность положительного влияния таких сигналов на устойчивость ФСII в случае умеренного нагрева.

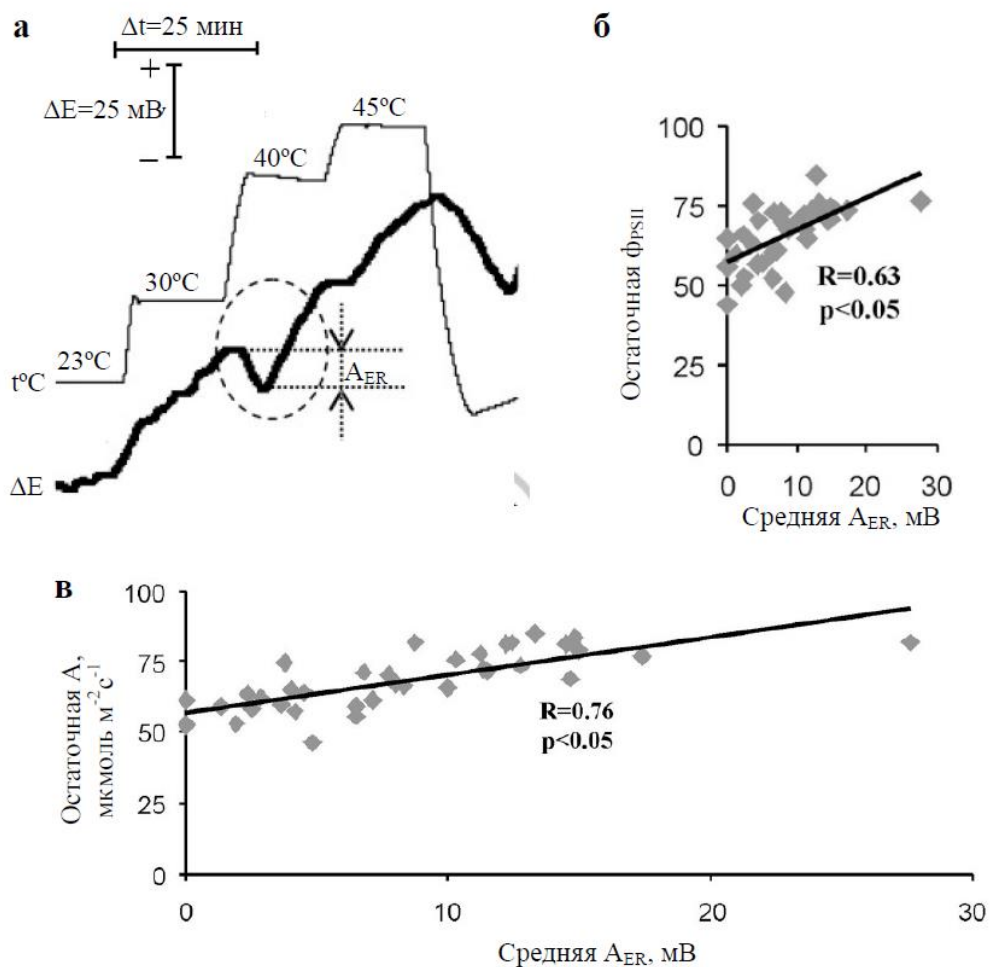


Рис. 25. Пример изменений электрического потенциала (ΔE), вызванных возрастанием температуры ($t^\circ\text{C}$) (а) и зависимости остаточного F_{PSII} (б) и A (в) от средней амплитуды электрических реакций (A_{ER}) при нагреве ($n=40$) [A8]. Нагрев воздуха вокруг листа осуществляли в камере 3010-Dual. ΔE измеряли с использованием макроэлектродов (электрод сравнения находился на корне); фотосинтетические показатели измеряли с использованием системы GFS-3000 и Dual-PAM-100, R – коэффициент корреляции Пирсона. *, коэффициент корреляции имеет статистически значимый характер ($p<0.05$).

Наконец, в работе [A25] было показано, что обработка умеренной концентрацией ортованадата натрия (0.5 мМ), которая снижала активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны и, тем самым, имитировала развитие ВП (в соответствии с [A16, A51, A65]), также повышала устойчивость фотосинтетических процессов в листе гороха к нагреву (48°C, 30 мин).

Таким образом, предварительная индукция ВП вызывает сложные изменения теплоустойчивости фотосинтетического аппарата (рост теплоустойчивости ФСІ и снижение теплоустойчивости ФСІІ) при сильном нагреве (около 53°C). При более низком нагреве (45-50°C и, возможно, ниже) может проявляться положительное влияние ВП на теплоустойчивость ФСІІ и фотосинтетических процессов в целом.

2.5.2. Анализ путей влияния варибельного потенциала на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата растений

Известно, что электрические сигналы, включая ВП, могут существенно влиять на устьичную проводимость высших растений (Koziolek et al., 2004; Gallé et al., 2013; Fromm et al., 2013). Несмотря на то, что такое влияние имеет сложный характер [A21, A51], можно ожидать, что при различной проводимости устьиц в условиях одинаковой температуры окружающего воздуха будет наблюдаться разный нагрев листовой пластинки. Предположение было подтверждено в рамках диссертационного исследования [A64]:

индукция ВП вызывала снижение транспирации и увеличение температуры листа в условиях нагрева до 53°C (Рис. 26а); между величинами изменений наблюдалась сильная связь (Рис. 26б). В свою очередь, максимальный нагрев листа был статистически значимо связан с остаточной величиной f_{PSII} после нагрева (Рис. 26в); напротив, остаточная активность f_{PSI} была практически не связана с величиной максимального нагрева. Полученный результат показывает, что усиление температурного повреждения ФСП после индукции ВП связано (по крайней мере, частично) с изменением транспирации листа в условиях нагрева. Такой механизм подтверждается отсутствием достоверного увеличения температурного повреждения ФСП после индукции ВП в условиях фиксированной величины температуры листа (43-47°C) [A62]; однако, тенденция к такому увеличению наблюдалась. С другой стороны, исследование влияния индукции ВП на повреждение ФСI и ФСП в листьях, после их погружения в нагретую до 50°C воду [A4] показало, что небольшое, но статистически значимое усиление повреждения ФСП наблюдалось и в таких условиях. Учитывая, что действие нагретой водой исключает влияние транспирации, такие результаты показывают существование дополнительного механизма усиления температурного повреждения ФСП после индукции ВП.

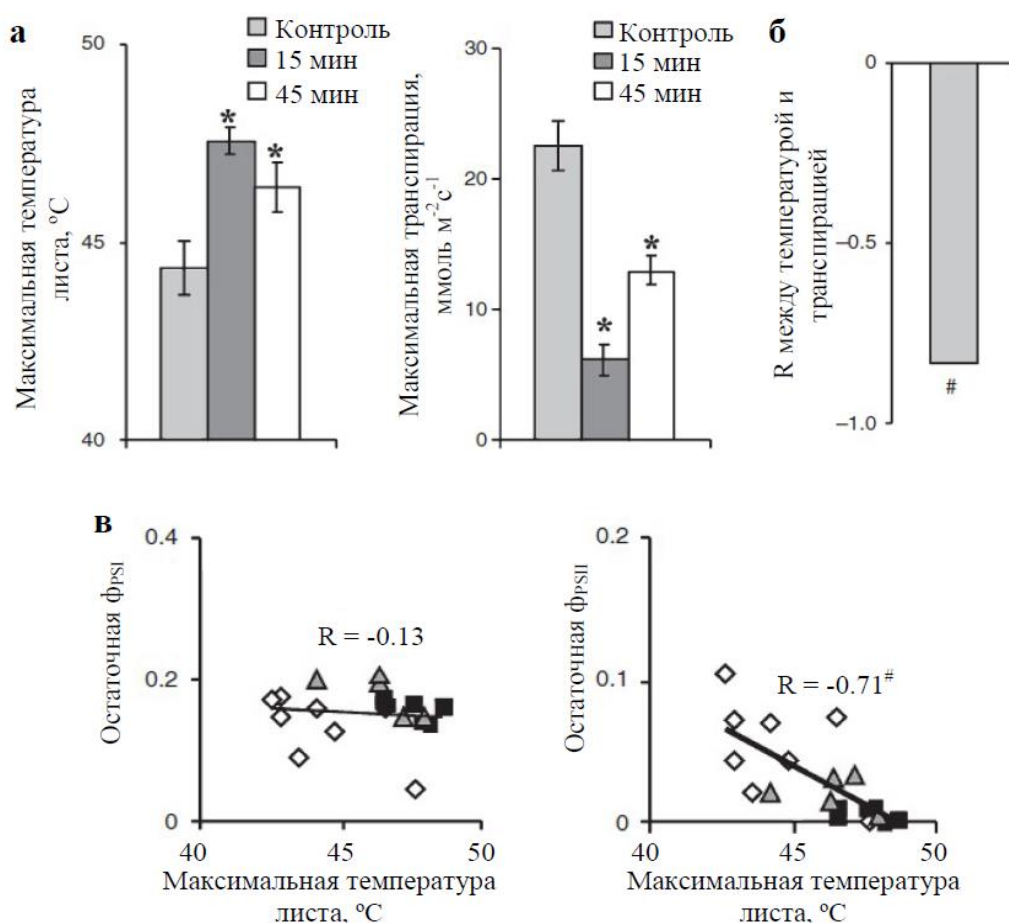


Рис. 26. Средние величины максимальной температуры и транспирации листа при нагреве окружающего листовую пластинку воздуха до 53°C в контроле, через 15 и 45 мин после индукции ВП у гороха ($n=5-8$) (а), корреляция Пирсона (R) между величинами максимальной температуры и транспирации (б), диаграммы рассеяния между максимальной температурой листа и остаточными f_{PSI} и f_{PSII} после нагрева ($n=19$) (в) [A64]. ВП индуцировали ожогом первого листа; измерения фотосинтетических показателей (GFS-3000 и Dual-PAM-100) и нагрев воздуха в измерительной камере 3010-Dual (30 мин) осуществляли на втором листе. *, различия с контролем (без индукции ВП) являются статистически значимыми ($p<0.05$). $^{\#}$, коэффициент корреляции Пирсона имеет статистически значимый характер ($p<0.05$).

Корреляционный анализ между амплитудой вызванного ВП быстрого снижения фотосинтетической ассимиляции и остаточной величиной Φ_{PSI} после нагрева листовой пластинки гороха до 46°C показал высокую и статистически значимую корреляцию Пирсона между этими показателями (Рис. 27а) [А62], что является аргументом в пользу участия быстрой инактивации фотосинтеза в формировании повышенной теплоустойчивости ФС.

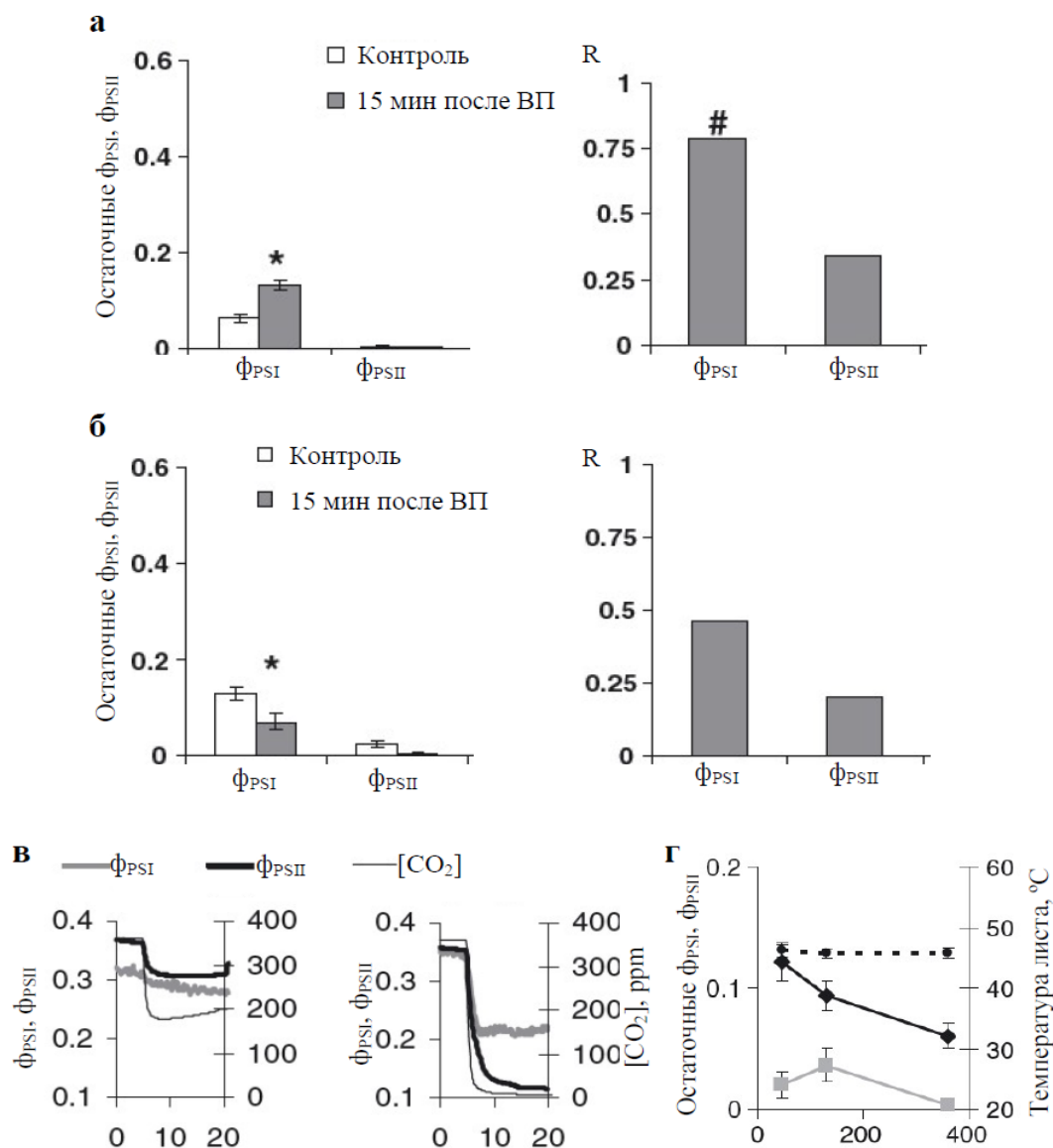


Рис. 27. Остаточные Φ_{PSI} и Φ_{PSII} после нагрева листовой пластинки гороха до 46°C ($n=6-11$) и коэффициенты корреляции Пирсона (R) между амплитудой вызванного ВП снижения А и остаточными квантовыми выходами при концентрации CO₂ в воздухе 360 ppm (а) и 10 ppm (б). Примеры изменений Φ_{PSI} и Φ_{PSII} при снижении концентрации CO₂ вокруг листа от 360 ppm до 200 и 10 ppm (в). Зависимость остаточных Φ_{PSI} и Φ_{PSII} после нагрева листовой пластинки до 46°C от величины снижения концентрации CO₂ перед таким нагревом ($n=5-8$) (г). Приведены результаты из работы [А62]. ВП индуцировали локальным ожогом первого листа у гороха за 15 мин до нагрева второго листа до 46°C. Нагрев (30 мин) осуществлялся в измерительной камере 3010-Dual; при этом, нагрев воздуха вокруг листа варьировал, чтобы обеспечить заданную температуру листовой пластинки. Снижение концентрации CO₂ вокруг второго листа (GFS-3000) осуществляли за 30 мин до индукции ВП (Рис. 27б) или за 15 мин до нагрева (Рис. 27в). Фотосинтетические показатели измеряли GFS-3000 и Dual-PAM-100. *, отличия от контроля без ВП статистически значимы ($p<0.05$). #, R статистически значим ($p<0.05$).

В условиях снижения активности темновой стадии фотосинтеза и подавления вызванного ВП быстрого снижения А (низкая концентрация CO_2 вокруг листа), индукция переменного потенциала снижала остаточный f_{PSI} и уменьшала корреляции (Рис. 27б). Снижение концентрации CO_2 вокруг листа вызывало уменьшение квантовых выходов ФСІ и ФСІІ, сходное с индуцированным ВП (Рис. 27в), и повышало остаточный f_{PSI} (Рис. 27). Полученные результаты показывают, что вызванная ВП инактивация темновой стадии фотосинтеза (и ее имитация уменьшением концентрации CO_2 вокруг листа) повышает теплоустойчивость ФСІ.

Положительное влияние ВП на теплоустойчивость ФСІІ в этом эксперименте отсутствовало (Рис. 27а); однако, умеренная инактивация темновой стадии фотосинтеза (снижение концентрации CO_2 вокруг листа до 100 ppm) увеличивало остаточный f_{PSII} по сравнению с его величиной в листе, прогревом при 360 ppm CO_2 (Рис. 27г). Результат показывает потенциальную возможность положительного влияния индуцированной ВП быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость ФСІІ, что хорошо согласуется с вызванным переменным потенциалом [A34] или ВП-образными электрическими сигналами в зоне нагрева [A8] повышением теплоустойчивости фотосистемы ІІ, которая была показана в диссертационном исследовании при использовании более слабого нагрева (50°C и ниже). Важно отметить отсутствие выраженных изменений теплоустойчивости ФСІ в этом случае [A8], что хорошо согласовывалось с уменьшением положительного влияния ВП на ФСІ при уменьшении нагрева [A62].

В рамках диссертационного исследования было показано, что ВП вызывают у растений возрастание NPQ [A3, A5, A12, A23, A24, A29, A34, A35], CEF [A44, A55, A63] и содержание АТФ в листьях [A2]. Возрастание NPQ (Müller et al., 2001; Roach, Krieger-Liszkay, 2014; Ruban, 2016) и CEF (Rumeau et al., 2007; Sharkey, Zhang, 2010; Johnson, 2011) являются хорошо известными стрессовыми ответами растений, способствующими защите фотосинтетического аппарата при действии неблагоприятных факторов. Напротив, повышенное содержание АТФ является фактором, облегчающим восстановление фотосинтетического аппарата после действия стрессовых факторов (включая повышенную температуру) (Allakhverdiev et al., 2005, 2008). Избыток АТФ также может быть непосредственно использован для ускорения формирования защитных изменений и восстановления других процессов растения. На основании этого, можно полагать, что увеличение NPQ, CEF и АТФ [A1] являются механизмами повышения теплоустойчивости фотосинтетического аппарата. Однако, в этом случае дополнительного анализа требует роль повышенного NPQ, так как этот механизм защищает прежде всего ФСІІ, а результаты диссертационного исследования преимущественно показывают возрастание теплоустойчивости ФСІ (по крайней мере, при сильном нагреве [A4, A62, A64]). В литературе представлена гипотеза (Sonoike, 2011; Tikkanen, Aro, 2014; Tikkanen et al., 2014) о том, что инактивация (например, вследствие роста NPQ) или повреждение ФСІІ может быть частью защитного механизма для ФСІ (путем уменьшения потока электронов на эту фотосистему), так как повреждение слабо репарирующей ФСІ является более опасным для растения.

Отмеченная гипотеза объясняет не только роль увеличения NPQ в повышении устойчивости ФСІ и растения в целом, но и вызванное ВП возрастание повреждения ФСІІ при сильном нагреве [A64]. Для проверки последнего, в рамках диссертационного исследования было проведено сопоставление остаточных активностей ФСІ и ФСІІ после нагрева в условиях предварительной индукции ВП (за 5, 10, 15 и 20 мин до нагрева) [A4]. Был использован нагрев до 50°C горячей водой, что уменьшало вариabельность результатов вследствие исключения вариabельности изменений транспирации при нагреве. Было показано, что индукция ВП за 5 мин до нагрева достоверно повышала остаточную активность ФСІ, а индукция ВП за 20 мин до нагрева – приводила к тенденции к повышению (Рис. 28а). Индукция ВП также снижала остаточную активность ФСІІ при нагреве через 5 и 20 мин после нее (Рис. 28б).

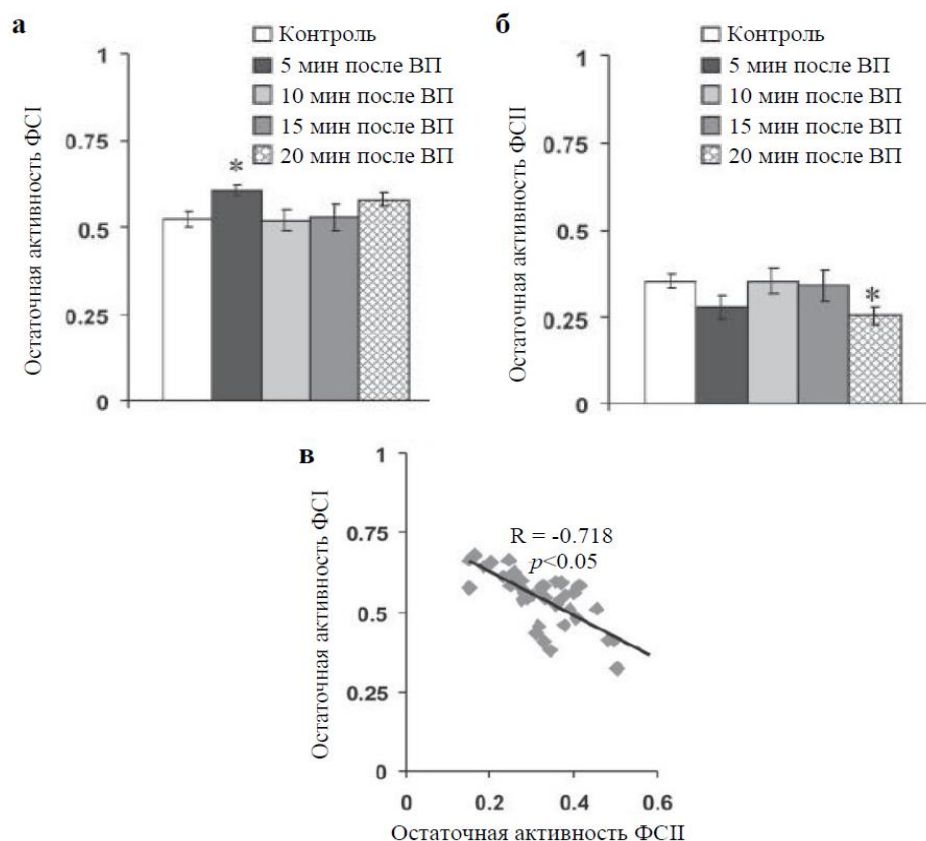


Рис. 28. Остаточная активность ФЦИ (а) и ФЦИ (б) после нагрева листа гороха до 50°C (5 мин, нагретая вода) ($n=6-11$) и диаграмма рассеяния между всеми индивидуальными остаточными активностями ($n=37$) [A4]. Нагрев второго листа осуществлялся через 5, 10, 15 и 20 мин после индукции ВП (локальный ожог первого листа); в контроле ожог не наносился. Остаточную активность ФЦИ ($1-f_{PSI}^0$) и ФЦИ (f_{PSII}^0) измеряли во втором листе через 15 мин после нагрева (Dual-PAM-100). f_{PSI}^0 и f_{PSII}^0 определяли после 10 мин затемнения по стандартной процедуре Dual-PAM-100; перед определением f_{PSI}^0 лист освещали дальним красным светом (10 с). R – коэффициент корреляции Пирсона. *, различия с контролем были статистически значимы ($p < 0.05$).

Анализ диаграммы рассеяния между индивидуальными величинами остаточной активности ФЦИ и ФЦИ, полученными во всех вариантах эксперимента, выявил сильную отрицательную связь между величинами (Рис. 28в). Полученные результаты показывают, что усиление повреждения ФЦИ (или ее инактивация при росте NPQ) действительно могут выступать в качестве механизма защиты ФЦИ от температурного повреждения и, в соответствии с приведенной гипотезой, участвовать в качестве механизма вызванного ВП повышения теплоустойчивости фотосинтетического аппарата и растения в целом [A1].

2.5.3. Общая схема путей влияния переменного потенциала на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата растений

Рис. 29 обобщает потенциальные пути влияния переменного потенциала и вызванной им быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом. Опираясь на результаты диссертационного исследования, такая схема предполагает несколько основных путей повышения теплоустойчивости растения.

Прежде всего, следует отметить, вызванное ВП повышение теплоустойчивости ФЦИ в условиях действия высокой температуры. Такое повышение базируется на активации CEF и на стимуляции инактивации (рост NPQ) и термического повреждения ФЦИ; последнее согласуется с гипотезой о более важной роли ФЦИ для выживания растения и необходимостью подавления функционирования ФЦИ при сильных стрессовых воздействиях (Sonoike, 2011; Tikkanen, Aro, 2014; Tikkanen et al., 2014).

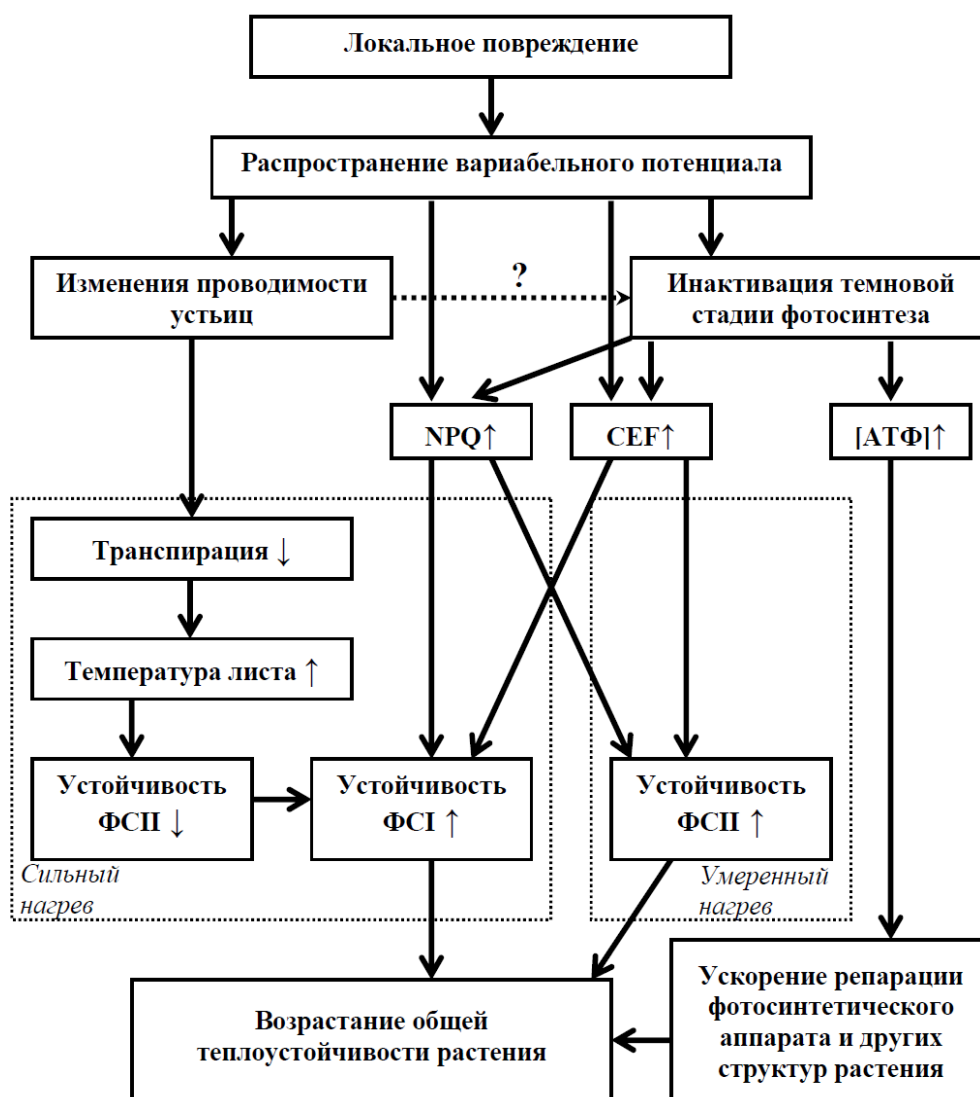


Рис. 29. Схема потенциальных путей влияния вызванного переменным потенциалом ответа на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом. Пунктирная стрелка показывает возможное влияние изменений проводимости устьиц, вызванных переменными потенциалами, на фотосинтетические процессы. Роль такого влияния в изменениях теплоустойчивости фотосинтетического аппарата и растения требует дальнейших исследований.

Второй путь предполагает непосредственное повышение теплоустойчивости ФСП в условиях действия умеренного нагрева, что может быть обусловлено, прежде всего, вызванным ВП возрастанием NPQ и, в частности, его энергозависимой компоненты, которая является одним из наиболее эффективных и быстрых путей защиты ФСП от фотоповреждения (Ruban, 2016). Как следствие, возрастание энергозависимой компоненты NPQ будет также способствовать защите от других стрессоров (включая повышенную температуру, Falcioni et al., 2024), которые облегчают развитие такого фотоповреждения путем снижения активности темновой стадии фотосинтеза.

Третий путь связан с вызванным ВП и инактивацией фотосинтеза возрастанием содержания АТФ в листьях растений, так как избыток АТФ может способствовать как репарационным, так и адаптационным процессам. Опираясь на [A3], можно полагать, что вызванные ВП фотосинтетические ответы не стимулируют, а снижают продукцию АТФ в ходе фотосинтетических процессов (g_s снижается); однако, вследствие уменьшения оттока энергии из листьев (в результате снижения образования сахаров, участвующих в дальнейшем транспорте) происходит накопление АТФ в хлоропластах и, вероятно, в цитоплазме клеток мезофилла [A2]. На основании этого было предположено [A50], что вызванное ВП

системное повышение теплоустойчивости растения может быть связано с временным снижением взаимодействия между клетками и органами растения. Помимо снижения образования транспортируемых сахаров, ВП могут уменьшать их загрузку во флоэму (Fromm, 1991; Fromm, Bauer, 1994) и способствовать окклюзии ситовидных элементов (Furch et al., 2007, 2010; van Bel et al., 2014); еще одним результатом распространения электрических сигналов является закрытие плазмодесм [A50]. При этом снижение взаимодействия между клетками и органами растения может способствовать как накоплению необходимых ресурсов (прежде всего, АТФ) в частях растения, подверженных наибольшему риску воздействия неблагоприятного фактора (листья), так и снижению вероятности повреждения соседних участков растения (например, через распространение активных форм кислорода).

Завершая блок диссертационного исследования, следует предварительно отметить еще один потенциальный путь влияния вызванных ВП фотосинтетических ответов на устойчивость растения. В соответствии с обзорной работой [A32], вызванная ВП инактивация фотосинтеза может снижать порог для индукции программируемой клеточной смерти, т.е. регулировать развитие этого процесса под действием факторов среды. Несмотря на то, что влияние электрических сигналов на программируемую клеточную смерть у растений остается практически неизученным, анализ подобного влияния является важной задачей будущих исследований, так как может показать еще один путь участия ВП в адаптации растений к действию неблагоприятных факторов.

2.6. Анализ факторов, модифицирующих формирование переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза

Учитывая положительное влияние электрических сигналов и вызванной ими инактивации фотосинтеза на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию стрессоров, становится актуальным анализ факторов, модифицирующих формирование ВП и фотосинтетических ответов. В рамках диссертационного исследования были рассмотрены три группы таких факторов: переменность электрофизиологических характеристик растительных клеток (на примере, активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны); длительное предварительное действие стрессора (на примере, засухи); предварительная обработка экзогенными фитогормонами (на примере, абсцизовой кислоты (АБК) и 24-эпибрассинолида (ЭБЛ)).

2.6.1. Анализ влияния переменности активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны на формирование электрических сигналов растения

Известно (Веселова и др., 1993; Schurr et al., 2006), что действие стрессовых факторов может повышать переменность характеристик растений; это согласуется с увеличением пространственной неоднородности фотосинтетических процессов в листе гороха при повышении интенсивности освещения или развитии засухи [A45]. Учитывая, что фотосинтетические процессы связаны с активностью H^+ -АТФазы (Kinoshita, Kinoshita, 2022), можно ожидать, что ее переменность также будет возрастать при действии стрессоров.

С другой стороны, анализ возбудимых элементов и их систем показывает, что флуктуации величины порога возбуждения во времени (Gammaitoni et al., 1998; Wellens et al., 2004) или ее стохастическая пространственная неоднородность (Tessone et al., 2006; Liang et al., 2020) могут облегчать индукцию электрического сигнала. В качестве механизмов этого рассматривают стохастический резонанс или индуцированный разнообразием резонанс, соответственно. Можно ожидать, что подобные факторы оказывают влияние на генерацию электрических сигналов у растений.

В рамках диссертационного исследования было показано, что метаболическая компонента мембранного потенциала, которая отражает активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны, значительно варьировала (около 40% в пределах одного листа [A36]). С другой стороны, такая активность может существенно влиять на порог

генерации электрических сигналов (см., например, теоретическую работу Sukhov et al., 2011). Вследствие этого, именно стохастическая вариабельность активности H^+ -АТФазы анализировалась в рамках диссертационного исследования [A30,A36]. Математическое моделирование является основным инструментом для анализа стохастического и индуцированного разнообразием резонанса, поэтому этот раздел диссертационного исследования опирался на ранее разработанную модель ансамбля возбудимых растительных клеток (Sukhov, Vodeneev, 2009; Sukhov et al., 2011). Следует отметить, что такая модель описывала инактивацию H^+ -АТФазы постепенным снижением температуры; однако, результаты анализа модели применимы для теоретического исследования начальной фазы различных электрических сигналов, обусловленных постепенным снижением активности этого фермента (в частности, ВП [A1,A7,A16,A51]).

Математическая модель, которая была разработана для изучения влияния индуцированного разнообразием резонанса на электрические сигналы, и использованные параметры были подробно описаны в работе [A36]. Электрофизиологическая модель клетки (Рис. 30а) включала в себя описание потенциалзависимых Ca^{2+} каналов, inwardly-rectifying и outwardly-rectifying K^+ каналов, Cl^- каналов, H^+ и Ca^{2+} -АТФаз, H^+/K^+ антипортера и $2H^+/Cl^-$ симпортера, изменений ионных концентраций кальция, калия и хлора, буферных свойств апопласта и цитоплазмы, а также кальциевой регуляции H^+ -АТФазы и Cl^- каналов.

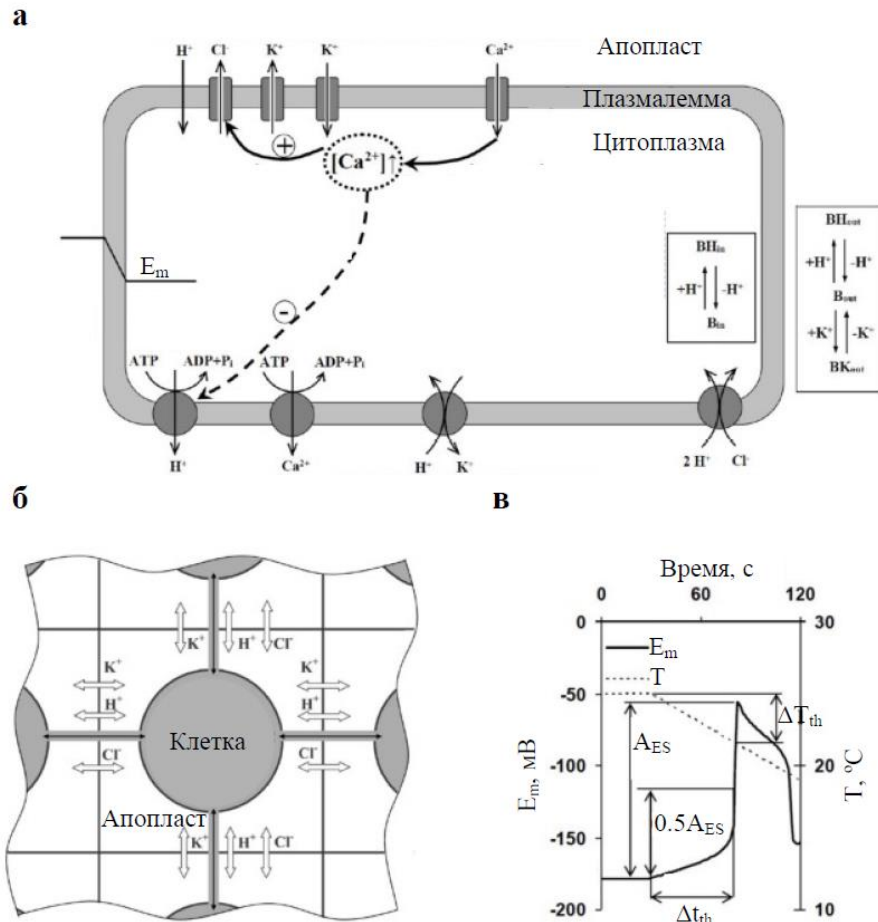


Рис. 30. Схема модели электрической активности клетки (а) и модели взаимодействия соседних клеток (б), а также пример электрического сигнала, имитированного моделью при снижении температуры и его параметры (в) [A36]. E_m – мембранный потенциал, T – температура, A_{ES} – амплитуда электрического сигнала, Δt_{th} – «пороговое» время для формирования спайка, ΔT_{th} – «пороговое» изменение температуры для формирования спайка.

Соседние клетки были связаны электрическими контактами через плазмодесмы (Рис. 30б); также, между участками апопласта соседних клеток происходил обмен ионов, описанные на основании закона Фика. Система в целом представляла собой двумерный ансамбль возбудимых клеток (20×20); анализируемый электрический сигнал рассчитывался путем усреднения ответов группы центральных клеток (10×10). Стохастическая пространственная неоднородность активности H^+ -АТФазы была реализована путем умножения активности фермента в каждой клетке на случайную величину с нормальным распределением и средним значением, равным единице. Такая величина оставалась неизменной для клетки в течении всего цикла расчета модели. Модель анализировали методом Монте-Карло, используя 25 повторов. Рис. 30в показывает анализируемые параметры электрических сигналов, включая пороговые характеристики.

Было показано (Рис. 31а), что увеличение стохастической пространственной неоднородности активности H^+ -АТФазы, которую задавали на основании относительного стандартного отклонения такой активности ($SD, \%$), приводило к ускорению формирования деполяризации и более раннему появлению спайков при развитии электрического сигнала. Анализ средних значений показателей (Рис. 31б), подтвердил такой результат, показывая снижение временного и температурного порога для появления спайков при увеличении SD . Амплитуда электрического сигнала имела двухфазную зависимость от SD : возрастание, затем снижение; однако, оба варианта изменений были относительно невелики (менее 10%).

Сходный анализ был использован для оценки влияния флуктуаций активности H^+ -АТФазы во времени на амплитуду и порог генерации электрических сигналов [A30]; однако, для него была использована более упрощенная модель, включающая в себя только электрически возбудимую клетку. Результаты анализа показали, что возрастание флуктуаций также ускоряло деполяризацию и снижало порог формирования спайков; кроме того, происходило небольшое уменьшение амплитуды электрических сигналов.

Таким образом, полученные результаты показывают, что пространственная неоднородность или флуктуации активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны могут ускорять развитие электрических сигналов (облегчать деполяризацию и формирование спайков с высокой амплитудой). Учитывая связь параметров электрических сигналов с параметрами ответов фотосинтеза [A1, A6], можно предполагать, что выявленный эффект должен также способствовать ускорению развития быстрой инактивации фотосинтеза и, вероятно, повышению устойчивости фотосинтетического аппарата к действию стрессоров. В целом, результаты показывают, что возрастание варибельности активности H^+ -АТФазы может быть механизмом стимуляции формирования ВП и быстрой фотосинтетической инактивации у растений.

2.6.2. Анализ влияния засухи на формирование варибельного потенциала и быстрых фотосинтетических ответов

Длительное влияние стрессоров является еще одной группой естественных факторов, которые, потенциально, могут оказывать влияние на индукцию ВП и быструю инактивацию фотосинтеза. При этом, значительный интерес вызывает влияние засухи, так как водный дефицит является одним из ключевых неблагоприятных факторов среды (Chaves et al., 2009; Fahad et al., 2017; Gupta et al., 2020), роль которого дополнительно усиливается вследствие глобальных изменений климата.

Засуха индуцировалась прекращением полива растений гороха, выращенных на песчаном субстрате [A44]; такая модельная система обеспечивала быструю потерю воды и развитие значительного водного дефицита в течение нескольких суток (относительное содержание воды в песке составляло менее 0.5% после 2 суток засухи). При этом, снижение относительного содержания воды в побегах гороха составляло около 1% после 2 суток засухи и около 10% после 4 суток засухи [A38].

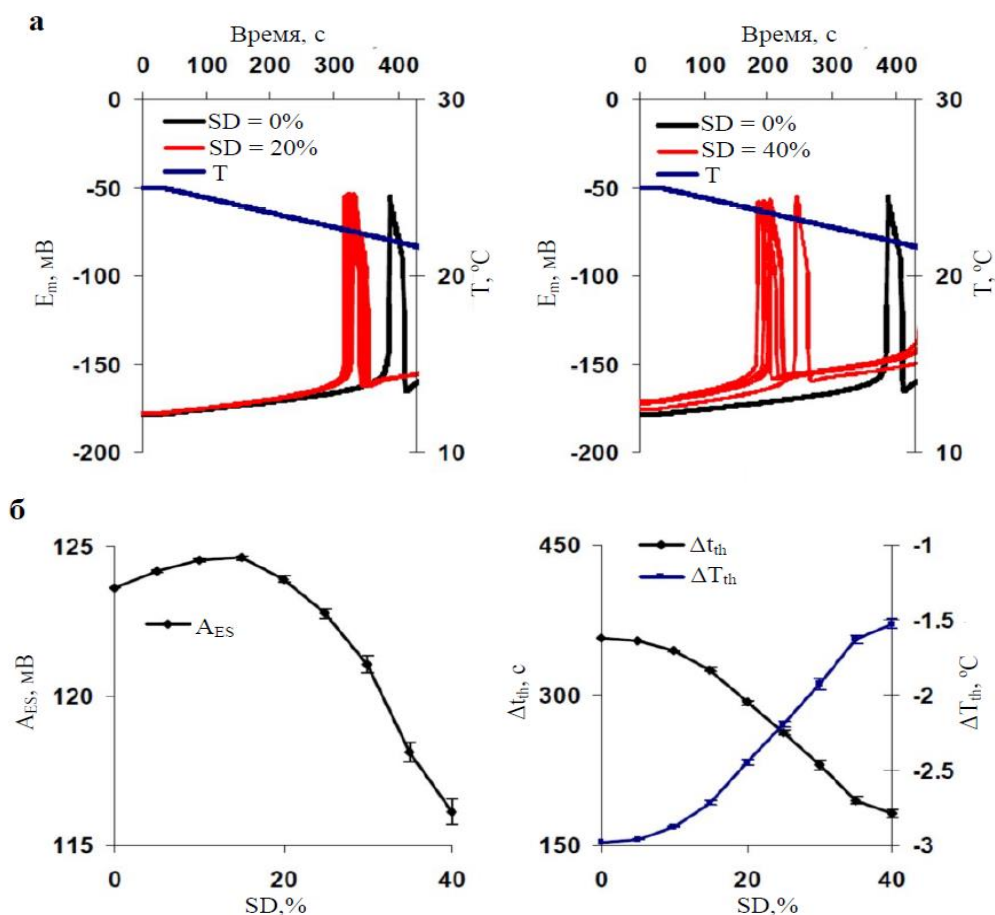


Рис. 31. Примеры электрических сигналов, имитированных моделью в условиях постепенного охлаждения и различной пространственной неоднородности активности H^+ -АТФазы (а), а также зависимости амплитуды электрических сигналов (A_{ES}) и временного (Δt_{th}) и температурного (ΔT_{th}) порогов для формирования спайков от величины пространственной неоднородности активности H^+ -АТФазы (б) [А36]. Различные величины относительного стандартного отклонения активности H^+ -АТФазы ($SD, \%$) использовалось для описания ее стохастической пространственной неоднородности. Для примеров приводилось по 5 записей; для расчетов зависимостей использовались 25 повторов. Отрицательные значения ΔT_{th} показывают необходимость имитации охлаждения для индукции электрического сигнала.

Было показано, что локальный ожог первого листа (Рис. 32а) вызывал распространение ВП во второй лист (Рис. 32б); при этом, засуха в течение 2 суток не оказывала существенного влияния на ВП. После 4 суток засухи (Рис. 32б) амплитуда ВП в стебле снижалась; в листе в равном соотношении наблюдались небольшие переменные потенциалы (менее 10-15 мВ) и гиперполяризационные сигналы, которые были идентифицированы как системные потенциалы (Zimmermann et al., 2009; 2016).

Исследование фотосинтетических изменений (Рис. 32в) показало, что засуха в течение 2 суток слабо влияла на вызванную ВП инактивацию ассимиляции; напротив, после 4 суток засухи, наблюдалась индуцированная электрическими сигналами активация фотосинтетического поглощения CO_2 . Такая активация сопровождалась тенденцией к возрастанию g_{H_2O} после ВП, что показывает открытие устьиц [А44]; при этом, после 4 суток засухи исходная водная проводимость листа была очень низкой. Выявленный эффект хорошо согласуется с выдвинутой в рамках диссертационного исследования гипотезой [А56] о том, что вызванная электрическими сигналами активация фотосинтеза наблюдается, если транспорт CO_2 через устьица является лимитирующей стадией фотосинтеза (низкая исходная g_{H_2O}) и если электрический сигнал вызывает открытие устьиц.

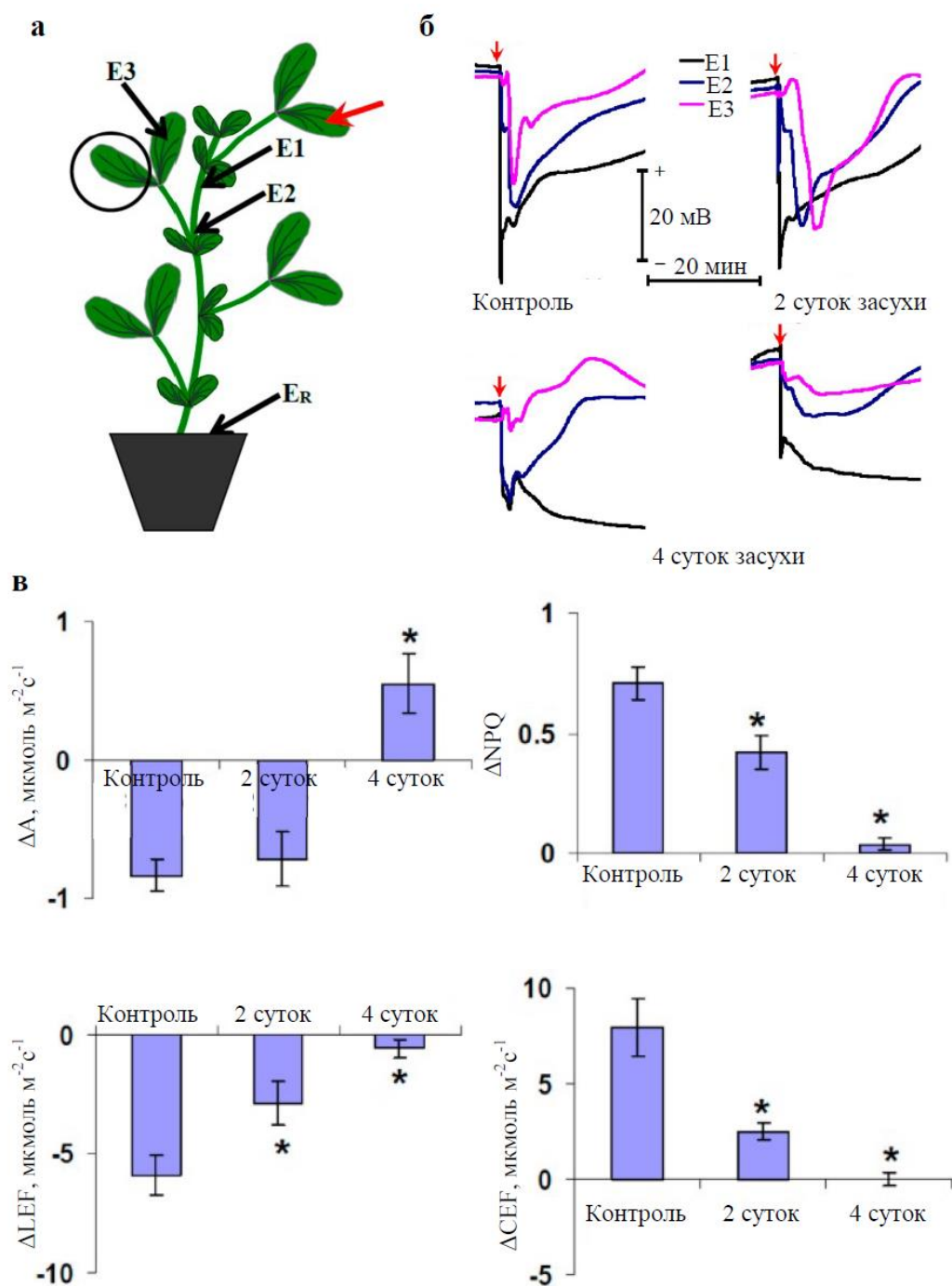


Рис. 32. а, Расположение измерительных электродов (E1, E2, E3) и электрода сравнения (E_R), зоны повреждения (локальный ожог, красная стрелка) и области измерения фотосинтетических показателей (отмечена окружностью). б, Примеры переменных потенциалов, вызванных ожогом (красная стрелка), в условиях контроля, 2 суток засухи и 4 суток засухи. в, Амплитуды вызванного ВП снижения А (ΔA) и LEF (ΔLEF) и возрастания NPQ (ΔNPQ) и CEF (ΔCEF) ($n=6$). Растения выращивали на песчаном субстрате; засуху индуцировали прекращением полива, которое приводило к быстрой потере воды. Результаты из работы [A44].

Амплитуды вызванных ВП изменений параметров световой стадии фотосинтеза (ΔNPQ , ΔLEF , ΔCEF) были снижены после 2 суток засухи (Рис. 32в); после 4 суток засухи они практически отсутствовали. Этот результат хорошо согласуется с участием ВП в повышении устойчивости растения к действию стрессоров [A1,A32], так как в условиях сильного и системного действия неблагоприятного фактора, необходимость в распространении ВП и развитии фотосинтетических ответов отсутствует.

Таким образом, полученные результаты показывают сложный характер влияния засухи на ВП и вызванные им фотосинтетические ответы: сильная засуха полностью подавляет изменения световой стадии фотосинтеза, а направление 50% электрических сигналов и большинства ответов ассимиляции инвертируется.

2.6.3. Анализ влияния обработки экзогенной абсцизовой кислотой и 24-эпибрассинолидом на формирование переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза

АБК является одним из ключевых стрессовых фитогормонов у растений (Wilkinson et al., 2012; Kurepin et al., 2015). В частности, обработка экзогенной АБК вызывает закрытие устьиц и снижение фотосинтеза (Mott, 1995; Franks, Farquhar, 2001); последнее может наблюдаться и без значительного снижения g_{H_2O} [A11]. На основании этого можно ожидать, что обработка экзогенной АБК будет влиять на вызванную ВП инактивацию фотосинтеза и, возможно, на параметры переменного потенциала.

В рамках диссертационного исследования был проведен анализ влияния экзогенной АБК на ВП и ответы фотосинтеза [A25]. Было показано, что предварительная обработка растений гороха АБК (10^{-5} М, опрыскивание за сутки до измерений), вызывала снижение амплитуды ВП (Рис. 33а и 33б); величина снижения составляла около 30%.

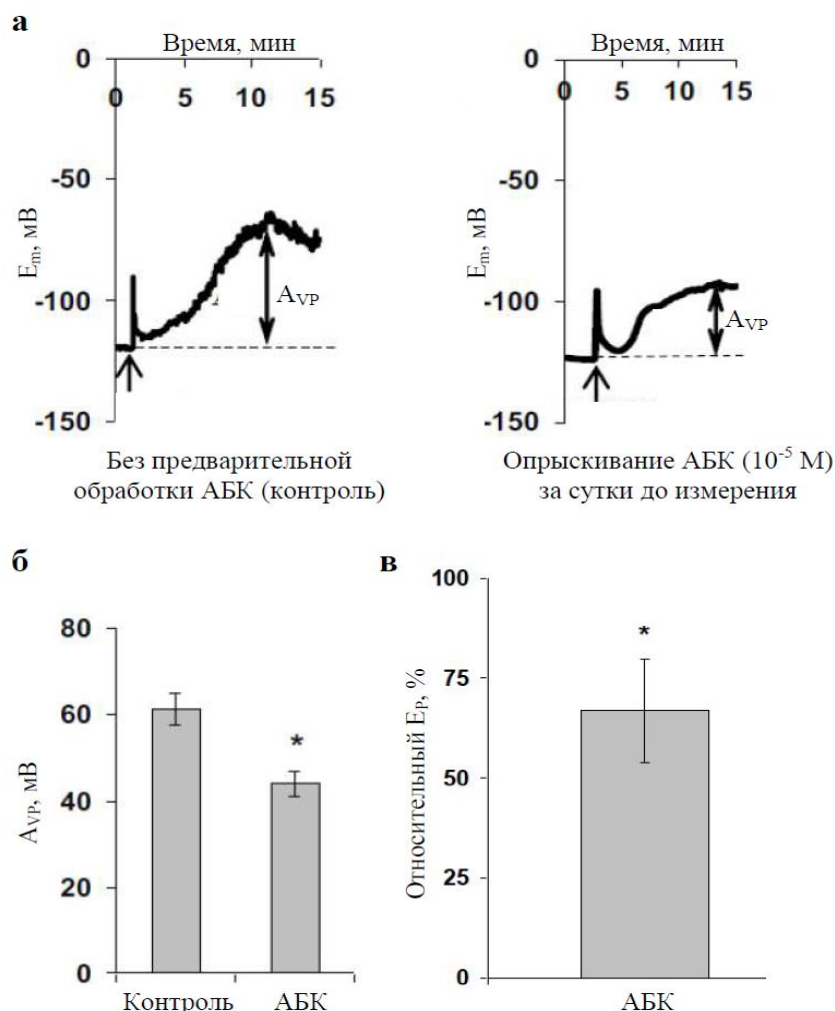


Рис. 33. Примеры микроэлектродных записей ВП (а) и их средние амплитуды (A_{VP}) (б) у растений гороха в контроле и после обработки экзогенной АБК, а также относительная величина E_P после такой обработки ($n=7$) (в) [A25]. ВП вызывался ожогом первого листа гороха (стрелка); измерения проводились во втором листе. Обработка АБК (10^{-5} М) осуществлялась опрыскиванием за сутки до измерений. E_P определялся по величине изменения E_m при действии высокой концентрации ортованадата натрия (5 мМ) на клетки. *, различия с контролем статистически значимы ($p<0.05$).

Известно, что обработка АБК снижает активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны [A11] (Hayashi et al., 2014); с другой стороны, величина исходной активности H^+ -АТФазы положительно влияет на амплитуду ВП (Рис. 13б) [A23]. Рис. 33в показывает, что обработка АБК снижала метаболический потенциал клеток гороха, что соответствовало снижению активности H^+ -АТФазы. По-видимому, влияние обработки АБК на амплитуду ВП реализовывалось именно через такое снижение.

Вызванное предварительной обработкой АБК снижение амплитуды ВП может приводить к уменьшению величины изменений фотосинтетических параметров. В рамках диссертационного исследования было показано [A25], что обработка абсцизовой кислотой (10^{-5} М) слабо влияла на динамику ответов (Рис. 34а и 34б); однако, вызывала статистически значимое уменьшение амплитуды вызванного ВП снижения ассимиляции (Рис. 34в). Амплитуды вызванных ВП изменений показателей световой стадии фотосинтеза (Φ_{PSI} , Φ_{PSII} , NPQ) не менялись после обработки АБК.

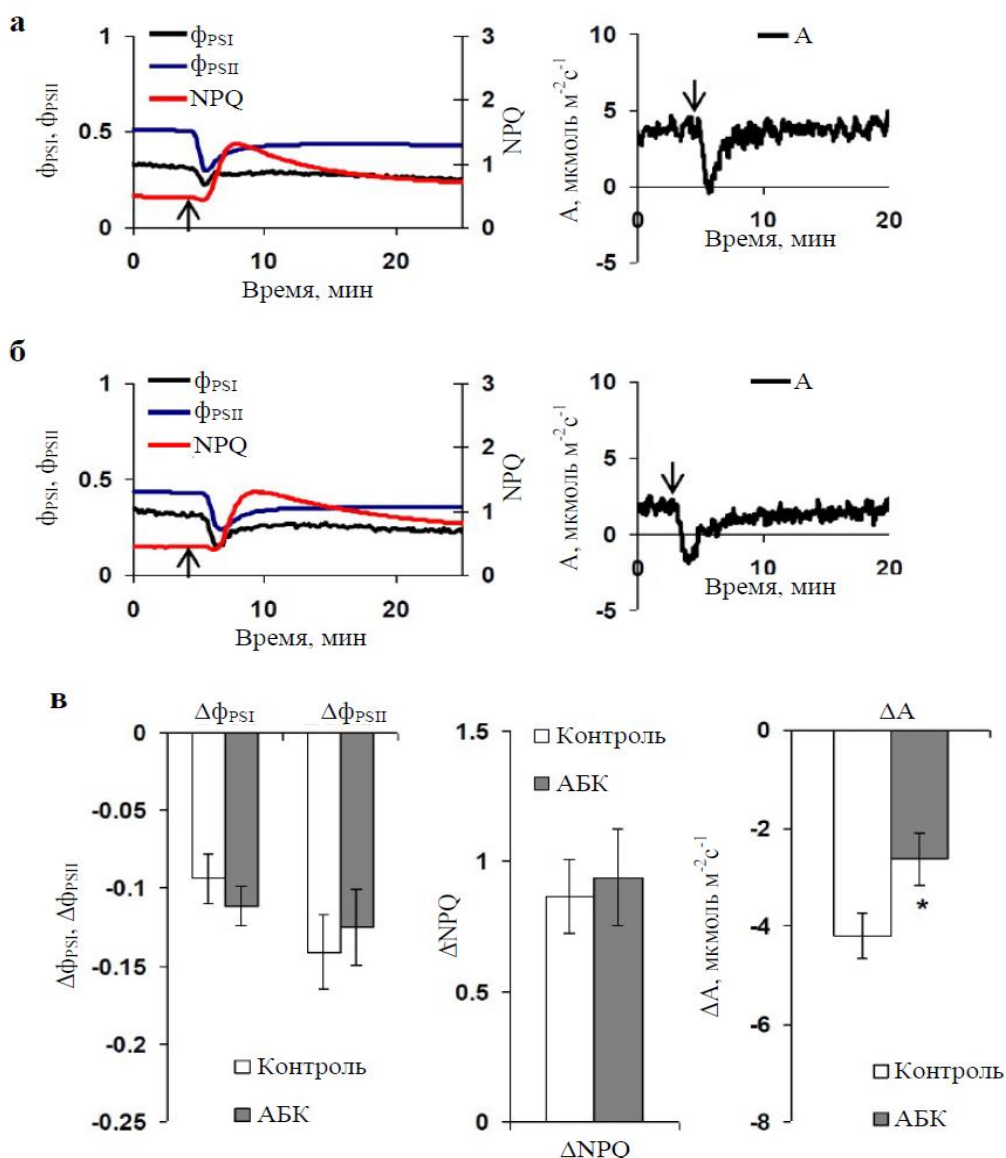


Рис. 34. Примеры индуцированных ВП изменений параметров световой и темновой стадии фотосинтеза во втором листе гороха в условиях контроля (а) и после предварительной обработки АБК (б) и средние амплитуды таких изменений ($n=5-7$) (в) [A25]. ВП вызывался ожогом первого листа гороха (стрелка); измерения проводились во втором листе. Для фотосинтетических измерений использовали систему из GFS-3000 и Dual-PAM-100. Обработка АБК (10^{-5} М) осуществлялась опрыскиванием за сутки до измерений. *, различия с контролем статистически значимы ($p < 0.05$).

Брассиностероиды, включая ЭБЛ, представляют собой стероидные фитогормоны, регулирующие широкий спектр физиологических ответов растения и, в частности, участвующие в ответе на действие неблагоприятных факторов (Zhabinskii et al., 2015; Peres et al., 2019; Nolan et al., 2020; Sadura, Janeczko, 2022). Известно, что обработка растений экзогенным ЭБЛ может влиять на фотосинтетические процессы у ряда растений (Yu et al., 2004; Rothová et al., 2014; Kolomeichuk et al., 2020), включая горох (Dobrikova et al., 2014). Учитывая влияние начальной фотосинтетической активности на амплитуду вызванной ВП инактивации фотосинтеза (см., например, [A25]), можно ожидать, что предварительная обработка экзогенным ЭБЛ может влиять на формирование фотосинтетических ответов; нельзя исключать также влияние такой обработки на параметры ВП.

В рамках диссертационного исследования был проведен анализ влияния обработки экзогенным ЭБЛ (10^{-6} М, опрыскивание за сутки до эксперимента) на ВП и ответы фотосинтеза у гороха [A55]. Было показано (Рис. 35), что обработка ЭБЛ увеличивала амплитуду ВП в листе и снижала время прохождения переменного потенциала из стебля в лист; напротив, обработка эпибрасинолидом не влияла на амплитуду ВП в стебле гороха.

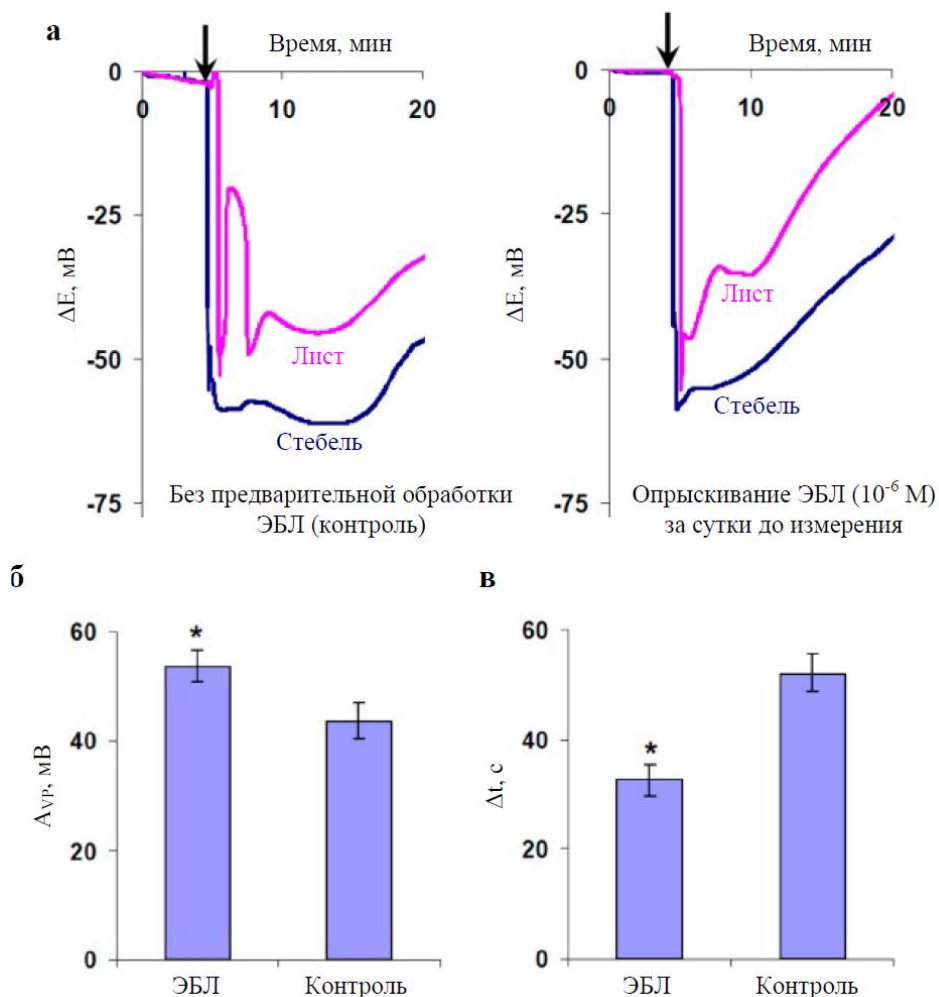


Рис. 35. Примеры макроэлектродных записей ВП, индуцированных у контрольных и предварительно обработанных ЭБЛ растений гороха (а), средние амплитуды ВП в листе (A_{VP}) (б) и времена прохождения электрического сигнала из стебля в лист (Δt) (в) в контроле и после обработки ЭБЛ [A55]. ВП индуцировали ожогом первого листа (стрелка); измерения проводили во втором листе и в стебле у основания черешка второго листа. Обработка ЭБЛ (10^{-6} М) осуществлялась опрыскиванием за сутки до измерений. *, различия с контролем статистически значимы ($p < 0.05$). Средние амплитуды ВП в стебле не приводятся, так как обработка ЭБЛ на их величину не влияла.

Далее была исследована вызванная ВП инактивация фотосинтеза. Было показано, что предварительная обработка ЭБЛ практически не влияла на амплитуды вызванного ВП снижения ассимиляции (Рис. 36а) и LEF (Рис. 36б). Напротив, время развития вызванного ВП ответа А (Рис. 36в) и LEF (Рис. 36г) снижалось после обработки ЭБЛ. Полученные результаты показывают, что обработка экзогенным ЭБЛ ускоряет прохождение ВП в лист и формирование быстрой инактивации фотосинтеза. Несмотря на то, что конкретный механизм влияния обработки ЭБЛ на ВП и фотосинтетические ответы до конца неясен, весьма вероятным путем реализации такого влияния представляется активация H^+ -АТФазы плазматической мембраны. Из литературы известно (Withöft et al., 2011; Minami et al., 2019), что обработка брассинолидами может вызывать такую активацию; с другой стороны, была показана стимуляция ВП и быстрая инактивация фотосинтеза при более высокой исходной активности H^+ -АТФазы [A23].

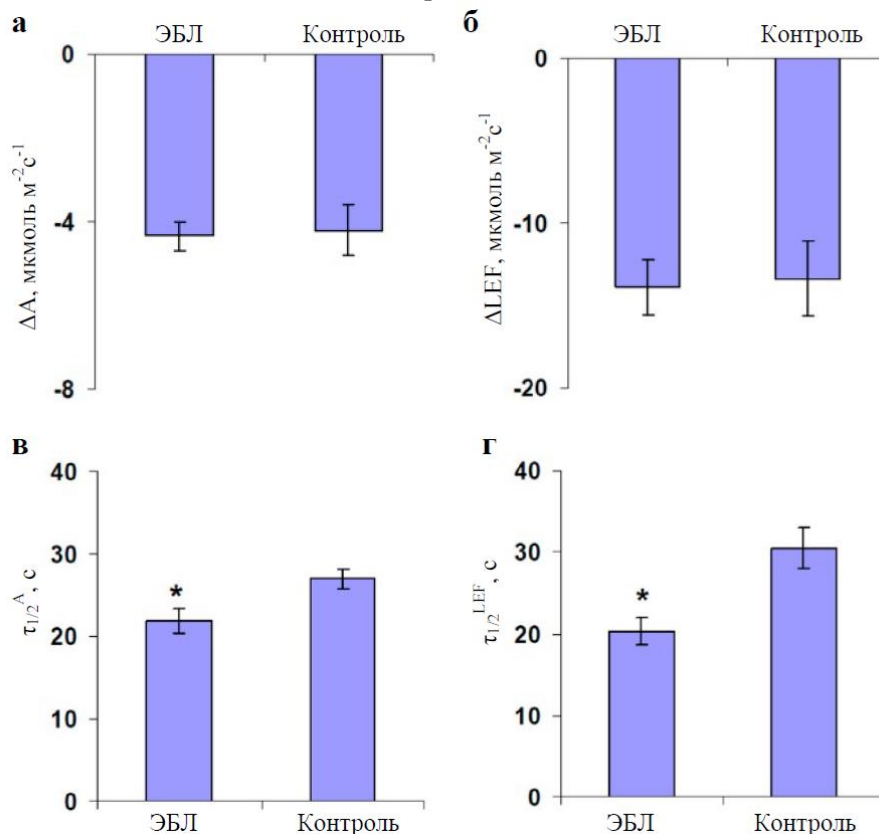


Рис. 36. Средние амплитуды вызванного ВП снижения А (а) и LEF (б) во втором листе гороха после предварительной обработки ЭБЛ и в контроле, а также времена развития 50% снижения А ($\tau_{1/2}^A$) (в) и LEF ($\tau_{1/2}^{LEF}$) (г) после индукции ВП ($n=5-7$) [A55]. ВП вызывался ожогом первого листа гороха; измерения проводились во втором листе. Для фотосинтетических измерений использовали систему из GFS-3000 и Dual-PAM-100. Обработка ЭБЛ (10^{-6} М) осуществлялась опрыскиванием за сутки до измерений. *, различия с контролем статистически значимы ($p < 0.05$).

Таким образом, полученные результаты показывают, что обработка экзогенными АБК и ЭБЛ может существенно влиять на переменный потенциал и вызванную ВП инактивацию фотосинтеза: обработка абсцизовой кислотой снижает амплитуду ВП и вызванную им инактивацию фотосинтеза; обработка 24-эпибрассинолидом ускоряет прохождение ВП в лист и развитие инактивации фотосинтеза в этом листе. Учитывая связь вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза с устойчивостью растения [A1,A16,A27], можно предполагать, что обработка АБК или ЭБЛ может быть в перспективе использована для ослабления или усиления влияния ВП на состояние растения.

2.7. Анализ возможности выявления быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной переменным потенциалом, методами оптического мониторинга

Оптические методы мониторинга и, в частности, мониторинг спектральных характеристик отраженного света, являются одним из наиболее эффективных инструментов для выявления стрессовых изменений у растений (Xue, Su, 2017), включая оценку фотосинтетических изменений (Gitelson, 2003; Danelichen et al., 2015; Tsujimoto, Nikosaka, 2021). Можно предположить, что такие методы могут быть также использованы для дистанционного и быстрого выявления ответов фотосинтеза, вызванных генерацией и распространением электрических сигналов. В рамках диссертационного исследования анализировали влияние ВП и вызванной им быстрой инактивации фотосинтеза на широко используемый фотохимический индекс отражения (PRI), на всю совокупность узкополосных индексов отражения, рассчитываемых на основании видимого диапазона (400-700 нм), и на параметры широкополосного отражения.

2.7.1. Анализ возможности использования PRI для выявления вызванной переменным потенциалом быстрой инактивации фотосинтеза

Типичный фотохимический индекс отражения (Garbulsky et al., 2011; Zhang et al., 2016) рассчитывается на основании величин отраженного света на измерительной длине волны 531 нм (R_{531}) и на «опорной» длине волны 570 нм (см. уравнение (4)). В литературе показано, что при действии неблагоприятных факторов R_{531} может снижаться в минутном и даже секундном диапазоне, что связывают с переходами в цикле ксантофиллов и сжатием хлоропластов (Gamon et al., 1992, 1997; Evain et al., 2004); отмеченные процессы индуцируются закислением люмена хлоропластов. Учитывая ключевую роль формирования градиента pH на тилакоидной мембране и, в частности, закисления люмена в фотосинтетических процессах (Тихонов, 2012; Tikhonov, 2013; Ruban, 2016), является вероятным, что PRI может быть использован для выявления быстрой инактивации фотосинтеза, индуцированной ВП.

Проведенный в рамках диссертационного исследования мета-анализ [A14] показал, что абсолютные величины PRI в среднем достаточно слабо связаны с показателями фотосинтеза. Дополнительные экспериментальные исследования [A18,A21,A22,A26,A27,A39] показали, что анализ амплитуд быстрых (минуты) изменений PRI (ΔPRI) является более эффективным для оценки показателей фотосинтеза. В частности, светоиндуцированные ΔPRI были направлены в отрицательную сторону при действии таких неблагоприятных факторов, как избыточный свет [A18,A21,A22,A27], нагрев и засуха [A26,A39]; амплитуда изменений возрастала при увеличении интенсивности действия стрессора. Амплитуды снижения PRI были линейно связаны с энергозависимой компонентой NPQ [A18,A26,A39] и с другими показателями световой стадии фотосинтеза [A21,A27]. Следует отдельно отметить [A39], что сильная линейная связь между ΔPRI и NPQ_F сохранялась при объединении результатов, полученных на горохе в условиях избыточного света, засухи и нагрева (Рис. 37); напротив, связь между PRI и NPQ_F была слабой.

При объединении результатов, полученных в условиях различной интенсивности освещения у гороха, пшеницы и тыквы [A18], также наблюдалась сильная линейная связь между ΔPRI и NPQ_F и слабая связь между PRI и NPQ_F. Полученные результаты показывают, что ΔPRI более чувствителен к изменениям фотосинтетических показателей (в частности, к изменениям энергозависимой компоненты NPQ), нежели PRI. Это хорошо согласуется с наличием процессов, вызывающих медленные изменения PRI (например, изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов, Wong, Gamon, 2015), которые могут увеличивать вариабельность PRI при анализе длительной временной динамики (сутки и более) или при усреднении показателей нескольких индивидуальных растений. Таким образом, именно ΔPRI были использованы при анализе влияния ВП на фотохимический индекс отражения.

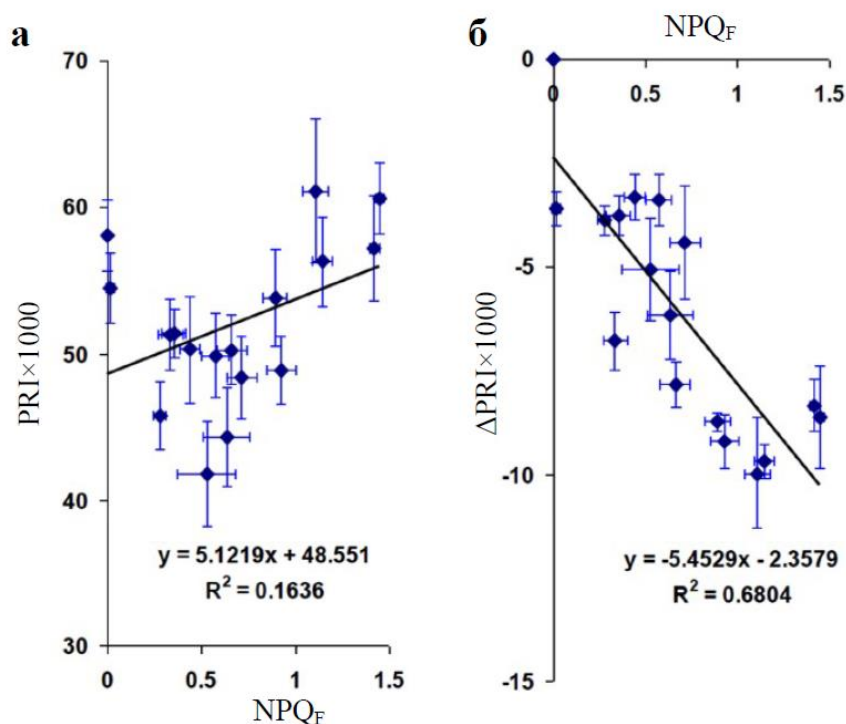


Рис. 37. Диаграммы рассеяния между фотохимическим индексом отражения (PRI) и энергозависимой компонентой NPQ (NPQ_F) (а) и между светоиндуцированным изменением PRI (ΔPRI) и NPQ_F (б), полученные на основании средних величин показателей ($n=12-16$) при действии на горох различных стрессовых факторов (различные интенсивности света, засуха, нагрев) [A39]. Подробное описание стрессовых воздействий приводится в работе [A39]; на диаграммах рассеяния представлены все измеренные средние значения и их погрешности. NPQ_F измерялась как быстро релаксирующая в темноте компонента NPQ (5 мин) с использованием OpenFluorCam FC 800-O/1010. PRI измерялась с использованием разработанной системы PRI-имиджинга [A39,A58]. ΔPRI рассчитывалась как разность PRI на свету и в условиях затемнения. R^2 – коэффициент детерминации.

Далее в ходе диссертационного исследования был проведен анализ влияния ВП на показатели световой стадии фотосинтеза и PRI [A17]; измерения осуществлялись параллельно. Рис. 38а показывает, что локальный ожог первого листа гороха вызывал распространение ВП во второй и четвертый лист; при этом, в четвертом листе амплитуда ВП значительно снижалась. После индукции ВП во втором и четвертом листьях наблюдалось возрастание NPQ и снижение ϕ_{PSI} и ϕ_{PSII} (Рис. 38б); одновременно, развивалось обратимое снижение PRI. Анализ средних значений изменений (Рис. 38в) показал выраженные сдвиги NPQ, ϕ_{PSI} , ϕ_{PSII} и PRI во втором листе гороха; их амплитуды были ниже в четвертом листе. В целом, полученные результаты показали близкую динамику изменения показателей световой стадии фотосинтеза и PRI, а также зависимость таких изменений от амплитуды ВП. Между амплитудами изменений PRI и исследованных фотосинтетических показателей (NPQ, ϕ_{PSI} , ϕ_{PSII}) наблюдались статистически значимые корреляции Пирсона [A17].

Для более детального анализа связи ΔPRI и ΔNPQ_F в рамках диссертационного исследования была проведена дополнительная серия экспериментов [A17]. Было показано (Рис. 39а), что индукция ВП вызывала возрастание энергозависимой компоненты NPQ, динамика которой были близка к динамике снижения PRI. Анализ диаграммы рассеяния между значениями ΔPRI и ΔNPQ_F в отдельных точках (Рис. 39б) показал сильную линейную связь между исследуемыми величинами. Полученные результаты хорошо согласуются с закислением люмена при развитии ВП [A3] и с влиянием закисления люмена как на NPQ (Ruban, 2016), так и на PRI (Garbulsky et al., 2011; Zhang et al., 2016).

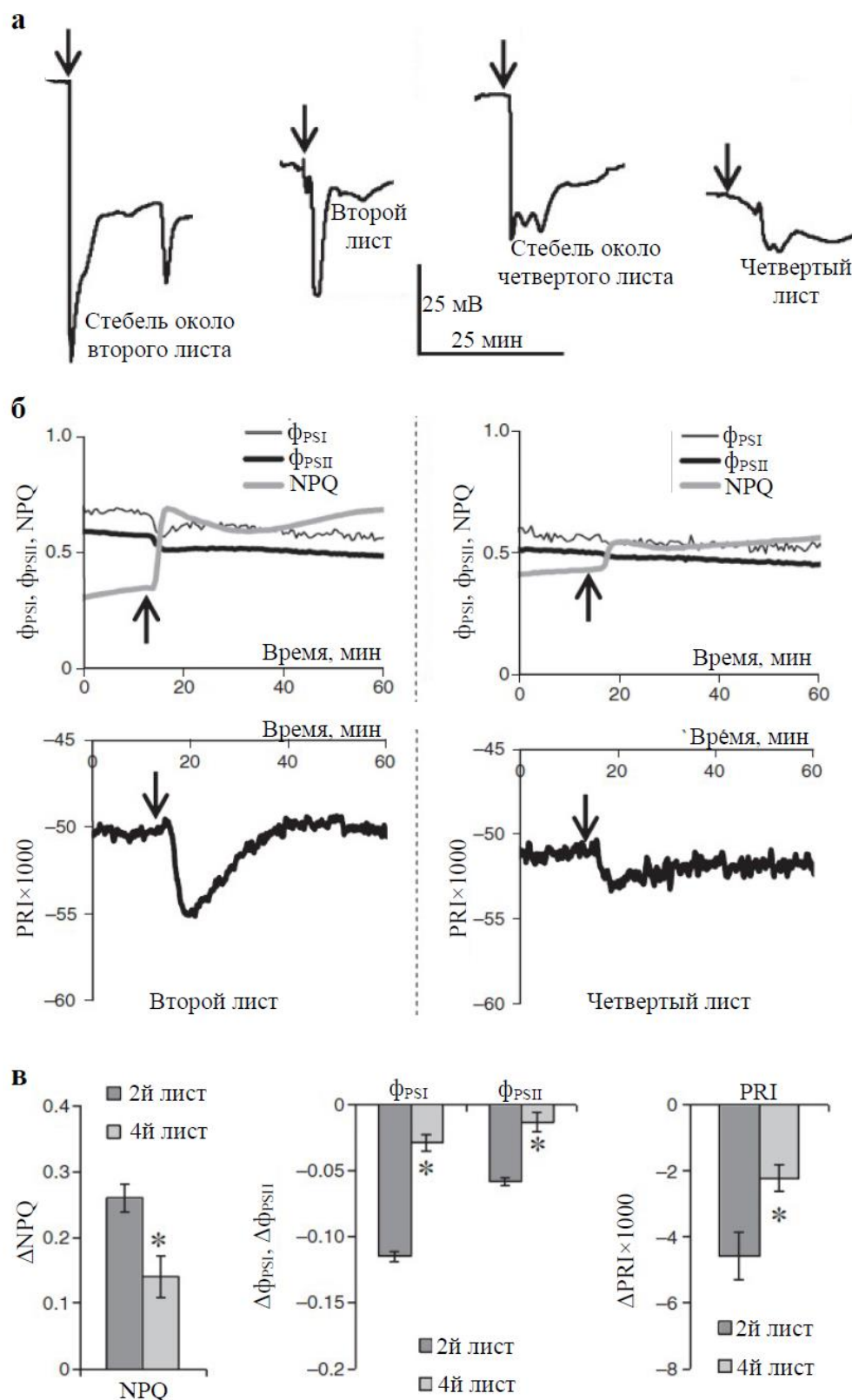


Рис. 38. а, Примеры ВП во втором и четвертом листьях гороха и в стебле рядом с листьями. ВП индуцировался ожогом первого листа (стрелка); использовалось макроэлектродное отведение. б, Примеры фотосинтетических ответов и изменений PRI, индуцированных ВП. Измерения фотосинтеза и отражения осуществлялись с использованием Dual-PAM-100 и S100, соответственно. в, Средние величины вызванных ВП изменений NPQ, ϕ_{PSI} , ϕ_{PSII} и PRI ($n=5$). Результаты из работы [A17]. *, амплитуда изменений в четвертом листе статистически значимо отличается от амплитуды изменений во втором листе ($p<0.05$).

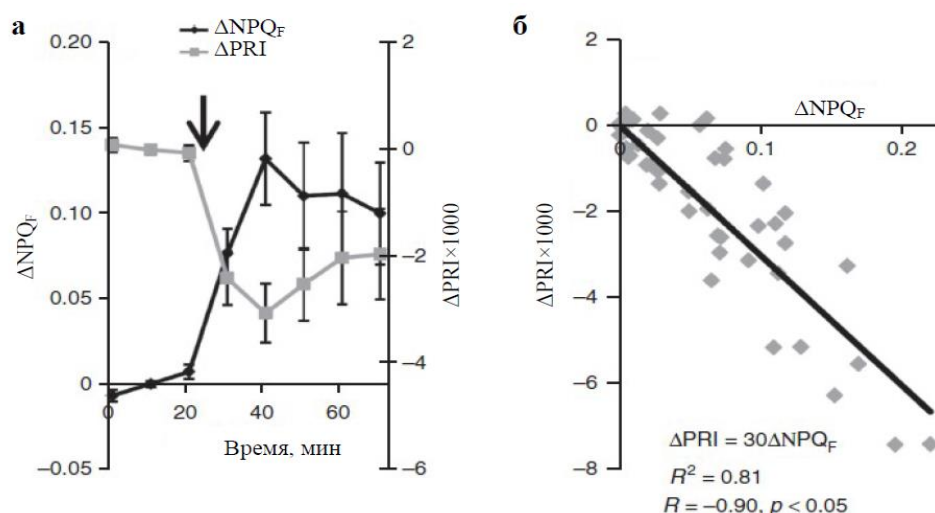


Рис. 39. Влияние индукции ВП на усредненные динамики ΔNPQ_F и ΔPRI во втором листе гороха ($n=7$) (а) и диаграмма рассеяния между величинами ΔNPQ_F и ΔPRI , определенными у индивидуальных растений в каждой временной точке ($n=56$) (б) [A17]. Измерения фотосинтеза и спектра отражения осуществлялись каждые 10 мин с использованием Dual-PAM-100 и S100, соответственно. ВП индуцировался ожогом первого листа (стрелка) через 5 мин после третьего измерения фотосинтетических показателей и спектра отражения. Вызванные ВП изменения NPQ_F и PRI рассчитывались как разности между текущей величиной показателя и усредненной величиной показателя по первым трем временным точкам, которые измерялись до индукции ВП. R^2 и R – коэффициент детерминации и коэффициент корреляции Пирсона.

Таким образом, вызванные ВП изменения фотосинтетических процессов сопровождаются обратимым снижением PRI , что потенциально позволяет использовать измерение изменений фотохимического индекса отражения для выявления быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной ВП. Следует отметить, что направленность вызванных ВП изменений PRI полностью соответствует направленности изменений светоиндуцированного ΔPRI при непосредственном действии стрессоров (избыточный свет, засуха, нагревание) [A18,A21,A22,A26,A27,A39]. Наконец, сильная линейная связь между ΔNPQ_F и ΔPRI создает предпосылки для количественной оценки изменений энергозависимой компоненты NPQ на основе измерения изменений фотохимического индекса отражения.

2.7.2. Комплексный анализ влияния ВП на узкополосные индексы отражения, рассчитываемые на основании спектрального диапазона 400-700 нм

Для комплексного анализа влияния ВП на узкополосные индексы отражения, рассчитываемые на основании спектрального диапазона 400-700 нм, были использованы тепловые карты, описывающие статистическую значимость и направление изменений (в соответствии с предложенным в диссертационном исследовании методом [A38]). Дополнительно были использованы тепловые карты, описывающие корреляцию Пирсона (Balzarolo et al., 2018; Kovar et al., 2019; El-Hendawy et al., 2019). При анализе была использована только нормализованная разностная форма индекса отражения ($\text{RI}(x,y)$), которую рассчитывали в соответствии с уравнением (5).

Комплексный анализ влияния ВП на узкополосные разностные индексы показал [A37], что индукция вариабельного потенциала слабо влияет на статистические значимые различия между абсолютными величинами индексов. Напротив, комплексный анализ вызванных ВП изменений величин $\text{RI}(x,y)$ ($\Delta\text{RI}(x,y)$) показал их большой масштаб и статистическую значимость (Рис. 40а). При этом у ряда индексов, включая $\text{RI}(571,542)$, $\text{RI}(538,500)$, $\text{RI}(646,554)$ и $\text{RI}(692,662)$, вызванные ВП изменения начинались не позднее,

чем через 5 мин после индукции сигнала (первая исследованная временная точка после нанесения локального ожога) и имели большую величину (Рис. 40б).

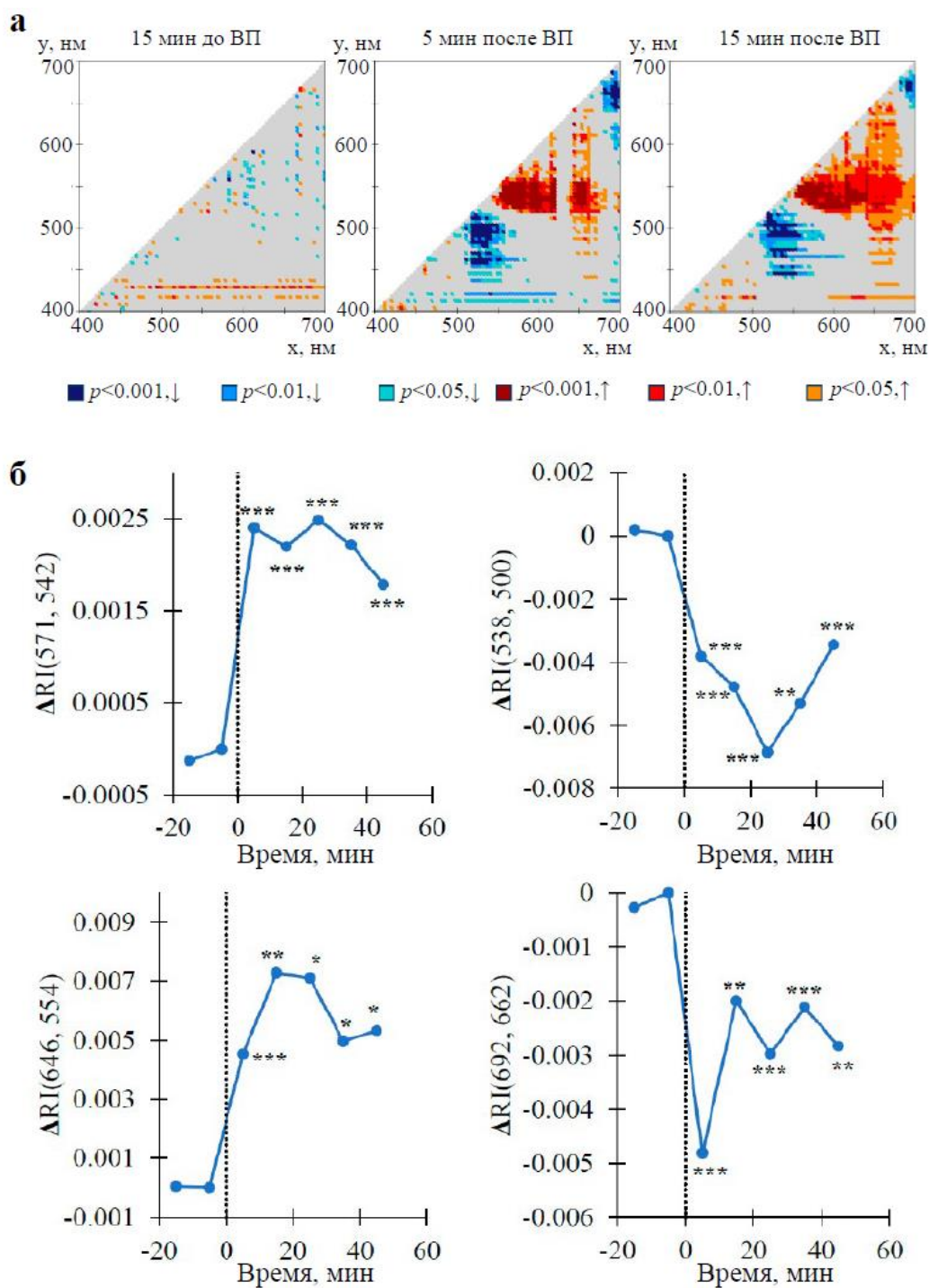


Рис. 40. Тепловые карты статистической значимости и направления вызванных ВП изменений величин индексов отражения ($\Delta RI(x,y)$) ($n=7$) (а) и примеры наиболее чувствительных $\Delta RI(x,y)$ ($n=13$) (б) [A37]. ВП был индуцирован ожогом первого листа (точка «0» и пунктирная линия); измерения осуществлялись во втором листе. Тепловые карты приведены только для трех временных точек; изменения $\Delta RI(x,y)$ также сохранялись на больших временных интервалах после индукции ВП. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$. ***, $p < 0.001$.

Важно отметить, что $RI(571,542)$ очень близок к модифицированным фотохимическим индексам отражения, высокая эффективность которых к непосредственному действию стрессовых факторов была показана в работе [A27]. Другие

приведенные индексы (RI(538,500), RI(646,554) и RI(692,662)) менее эффективны при непосредственном действии стрессоров (см. [A38]). Потенциально, такая особенность может быть использована для разработки методов дифференцированного определения непосредственного действия стрессоров и выявления развития системных стрессовых ответов при распространении ВП. При этом изменения индексов RI(571,542), RI(538,500) и RI(646,554), вероятно, связаны с быстрыми изменениями отражения листа на длинах волне 535-555 нм [A27], которые, в свою очередь, могут быть обусловлены закислением люмена хлоропластов и их сжатием (Evain et al., 2004). Такой механизм хорошо согласуется с механизмами формирования быстрой инактивации фотосинтеза при распространении ВП [A1,A51]. Индуцированные ВП изменения RI(692,662) могут быть обусловлены развитием ответа NPQ (Рис. 38б и 39а) и снижением флуоресценции хлорофилла а. Так, учитывая спектр флуоресценции ФСII (Pedrós et al., 2008), исходная интенсивность флуоресценции на длине волны 692 нм должны быть достаточно высока и, по-видимому, может вносить вклад в измеряемый спектр отраженного света (помимо, собственно отраженного света). Вследствие этого, снижение такой флуоресценции может приводить к уменьшению измеряемого RI(692,662).

Дополнительно была проведен корреляционный анализ связи изменений индексов отражения, рассчитанных на основании всех возможных комбинаций x и y , и показателей световой стадии фотосинтеза [A37]. Было показано, что имелось значительное число индексов RI(x,y), включая описанные выше, для которых вызванные ВП изменения сильно коррелировали с изменениями Φ_{PSII} (Рис. 41а) и NPQ (Рис. 41б).

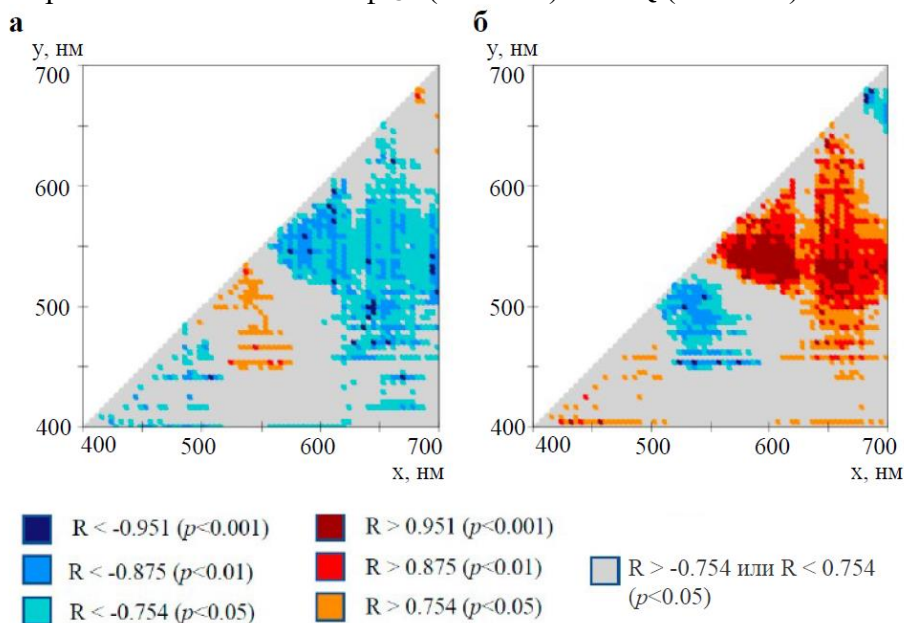


Рис. 41. Тепловые карты коэффициента корреляции Пирсона (R) между $\Delta RI(x,y)$ и $\Delta \Phi_{PSII}$ (а) и между $\Delta RI(x,y)$ и ΔNPQ (б) ($n=7$) [A37]. Величины $\Delta RI(x,y)$, $\Delta \Phi_{PSII}$ и ΔNPQ на разных временных точках до и после индукции ВП были использованы для расчета коэффициента корреляции.

Таким образом, полученные результаты показывают, что существует ряд дополнительных узкополосных индексов отражения (в частности, RI(571,542), RI(538,500), RI(646,554) и RI(692,662)), изменения которых чувствительны к распространению ВП и связаны с развитием фотосинтетических ответов, а значит – могут быть, потенциально, использованы для выявления таких ответов.

2.7.3. Анализ влияния ВП на параметры широкополосного отражения

В литературе показано (Gitelson et al., 2002; Widjaja Putra, Soni, 2018; Yin et al., 2022), что мониторинг характеристик растения может базироваться на измерении отражения в широких спектральных полосах (до десятков нм, в отмеченных работах). Так как такие измерения требуют технически более простых приборов, анализ возможности

использования параметров широкополосного отражения для выявления вызванных ВП системных ответов растения является актуальным.

В ходе диссертационного исследования был проведен анализ влияния ВП на фотосинтетические показатели и отражение листа гороха в широких спектральных полосах (400-500 нм, 500-600 нм, 600-700 нм и 700-800 нм) [A19]. Прежде всего, было показано, что ВП, вызванный локальным ожогом первого листа гороха, хорошо проходил во второй лист, вызывая в нем типичные фотосинтетические ответы (снижение f_{PSII} и возрастание NPQ); напротив, только небольшой электрический сигнал и слабо выраженная инактивации фотосинтеза наблюдались в четвертом листе. Анализ влияния индукции ВП показал, что во втором листе отражение статистически значимо возрастало на всех исследованных широкополосных диапазонах (Рис. 42а). При этом, наибольшая амплитуда изменений наблюдалась на 600-700 нм, что приблизительно соответствовало красному свету. Наименьшая амплитуда изменений наблюдалась на 700-800 нм, что соответствовало дальнему красному свету и ближнему инфракрасному. В четвертом листе (Рис. 42б), амплитуда изменений была значительно ниже, и они не имели статистически значимого характера.

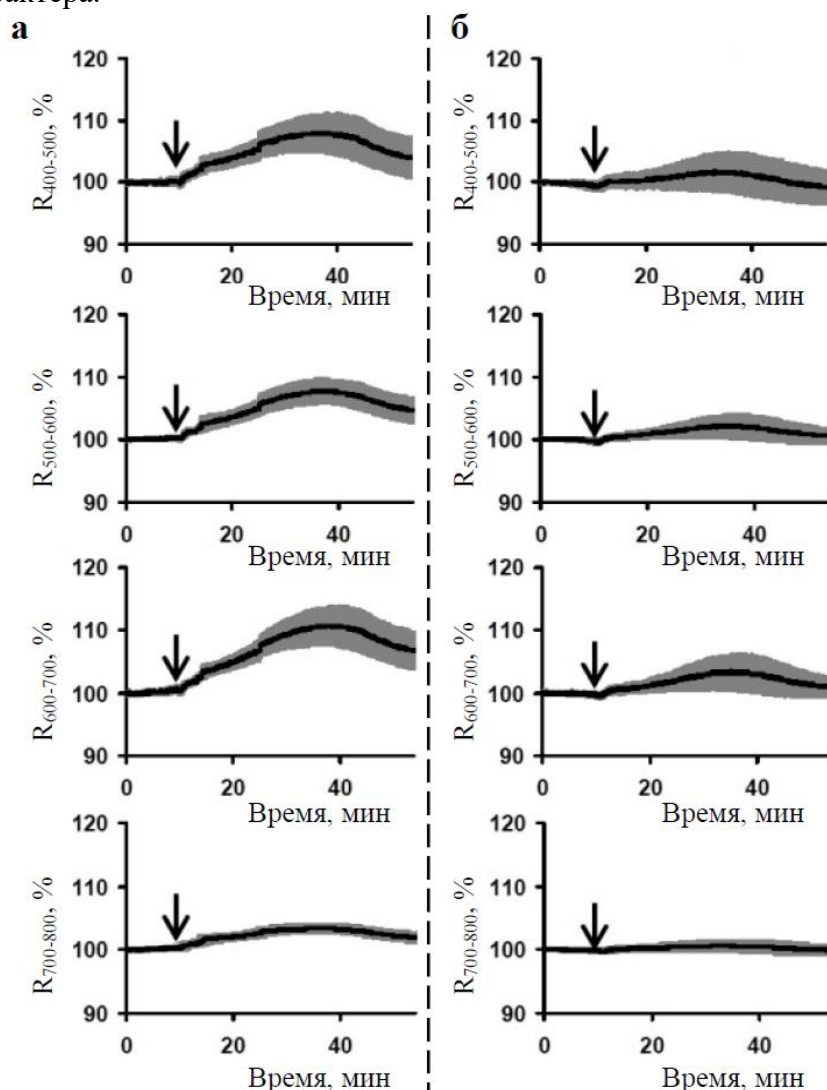


Рис. 42. Динамика среднего относительного отражения на длинах волн 400-500 нм ($R_{400-500}$), 500-600 нм ($R_{500-600}$), 600-700 нм ($R_{600-700}$) и 700-800 нм ($R_{700-800}$) после индукции ВП (стрелка) во втором (а) и в четвертом (б) листьях гороха ($n=5$) [A19]. ВП индуцировался ожогом первого листа. Измерения спектров отражения осуществлялись с использованием S100. Полученные интенсивности отраженного света усреднялись на отмеченных спектральных диапазонах; за 100% принималась величина отражения до ожога. Серой зоной показано стандартное отклонение значений.

Полученный результат показал, что распространение ВП может оказывать значительное влияние на широкополосное отражение в листе. Однако, выявленные динамики возрастания отражения значительно отличались от типичных динамик фотосинтетических ответов у гороха [A2,A17,A19]. Проведенный дополнительно корреляционный анализ [A19] показал, что абсолютные величины корреляции Пирсона между амплитудами изменения отражения и изменений фотосинтетических показателей (Φ_{PSII} и NPQ) не превышали 0.35 и не имели статистически значимого характера. Это означает, что вызванные ВП изменения отражения в широкополосном диапазоне должны иметь другие механизмы.

Было предположено, что развитие изменения отражений может быть связано с изменением содержания воды в листе, так как ВП может существенно влиять на транспирацию [A56]. Для проверки этого предположения был измерен индекс отражения WI [A28], показывающий содержание воды в растении (Penuelas et al., 1997). WI рассчитывался как $WI = R_{900}/R_{970}$, где R_{900} и R_{970} интенсивности отраженного света на длинах волн 900 и 970 нм (Рис. 43а). Калибровка на белый стандарт не приводилась, так как абсолютные величины WI не анализировались в данном блоке работ; исследовались только изменения WI (ΔWI).

С использованием модельной системы (горох, выращенный на песчаном субстрате, в условиях отсутствия и наличия полива), было показано (Рис. 43б), что между изменениями WI (ΔWI) и изменениями относительного содержания воды в листьях (ΔRWC) имела сильная линейная связь. Полученный результат подтвердил возможность использования ΔWI в качестве показателя изменения содержания воды у растений. Дальнейший анализ показал (Рис. 43в), что индукция ВП вызывала длительное уменьшение WI во втором листе гороха, динамика которого была близка к динамикам вызванных ВП изменений отражения листа в широких спектральных полосах. В четвертом листе, вызванные индукцией ВП изменения WI были выражены значительно слабее (Рис. 43г), что также соответствовало изменениям отражения в широких спектральных полосах. Полученные результаты показывают, что вызванные ВП небольшие изменения содержания воды у гороха потенциально могут быть механизмом изменения широкополосного отражения листа.

Дополнительный анализ [A28], проведенный в рамках диссертационного исследования, был направлен на исследование влияния индукции ВП на широкополосные разностные нормализованные индексы отражения. Такие индексы рассчитывались в соответствии с уравнением (5); однако, при этом были использованы спектральные полосы 400-500 нм, 500-600 нм, 600-700 нм и 700-800 нм. Было показано, что $RI(400-500,600-700)$ (Рис. 44а), $RI(500-600,700-800)$ (Рис. 44б) и $RI(600-700,700-800)$ (Рис. 44в) статистически значимо менялись во втором листе гороха после индукции ВП. Изменения других индексов отражения во втором листе были незначительны. В четвертом листе изменения всех широкополосных индексов отражения имели слабовыраженный характер, что согласуется с низкой амплитудой ВП в этом листе. Корреляционный анализ (Рис. 44) показал, что между изменениями WI и изменениями отмеченных широкополосных индексов отражения ($RI(400-500,600-700)$, $RI(500-600,700-800)$ и $RI(600-700,700-800)$) наблюдались сильные и статистически значимые корреляции Пирсона. Такой результат дополнительно подтверждает роль вызванных ВП изменений содержания воды в листе для формирования изменений широкополосных индексов отражения. При этом вызванные ВП изменения WI достаточно малы (Рис. 43в); учитывая рис. 43б, можно предполагать, что вызванные ВП изменения содержания воды также должны быть малы. Работа [A28] дополнительно подтверждает небольшую величину таких изменений, так как при снижении RWC на 15% (засуха), изменения $RI(400-500,600-700)$, $RI(500-600,700-800)$ и $RI(600-700,700-800)$ в 6-8 раз превышали изменения этих индексов, наблюдавшиеся при индукции ВП.

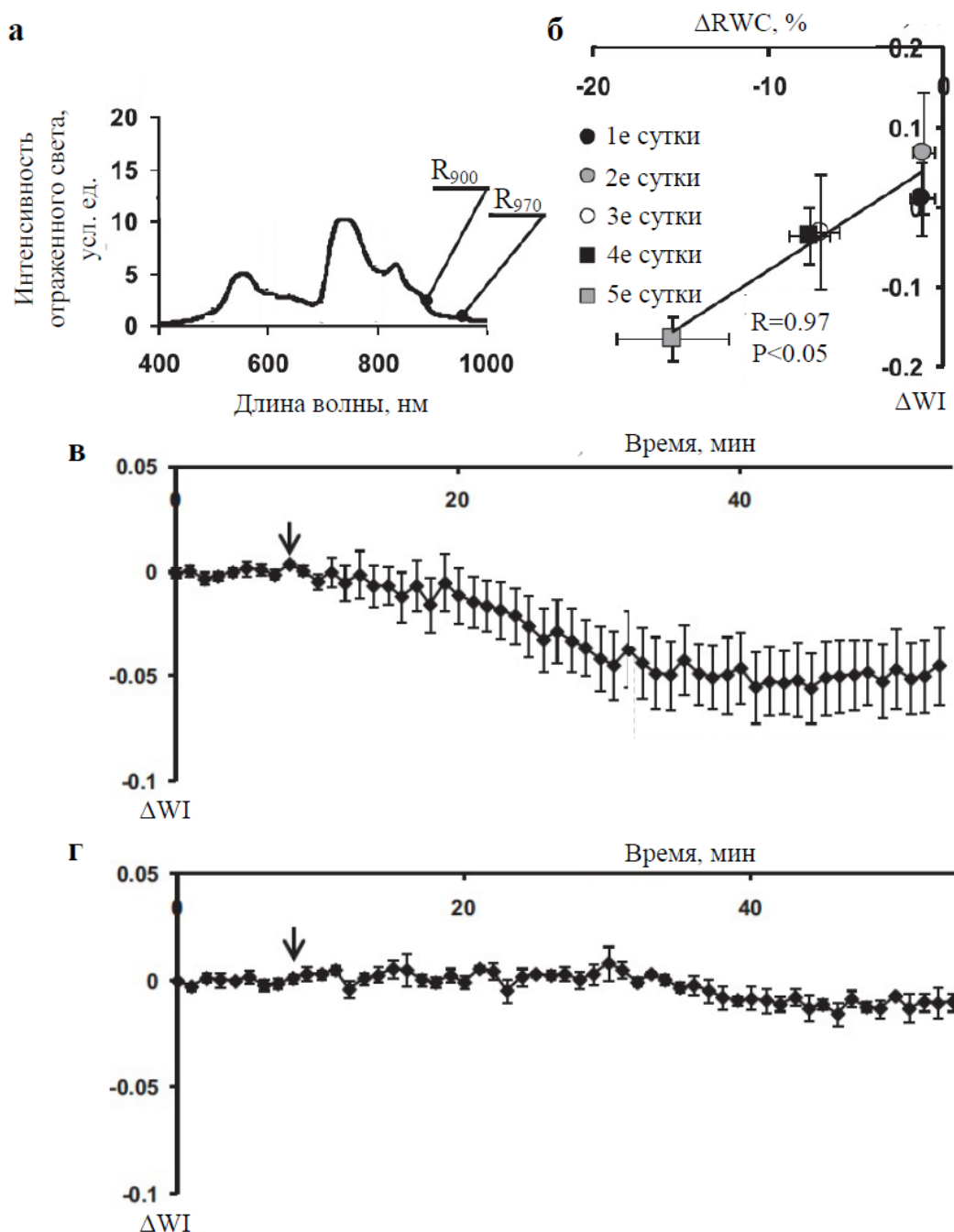


Рис. 43. а, Спектр интенсивности отраженного света у листа гороха (без калибровки на белый стандарт, галогенная лампа). R_{900} и R_{970} – интенсивности отраженного света на длинах волн 900 и 970 нм. Спектр отражения измерялся с использованием спектрометра S100. б, Связь между величиной изменения относительного содержания воды (ΔRWC) и водного индекса (ΔWI) у листьев гороха на фоне развития засухи. Засуха индуцирована прекращением полива гороха, в условиях его выращивания на песчаном субстрате. RWC определялся на основании сырого и сухого веса. ΔWI рассчитывался как разность WI в опыте (засуха) и контроле (полив). R – коэффициент корреляции Пирсона. в, Усредненная динамика вызванных индукцией ВП изменений WI во втором листе гороха ($n=6$). ВП индуцировался ожогом первого листа (стрелка). За нулевой уровень принималась величина WI перед ожогом. г, Усредненная динамика вызванных индукцией ВП изменений WI в четвертом листе гороха ($n=5$). Результаты из работы [A28].

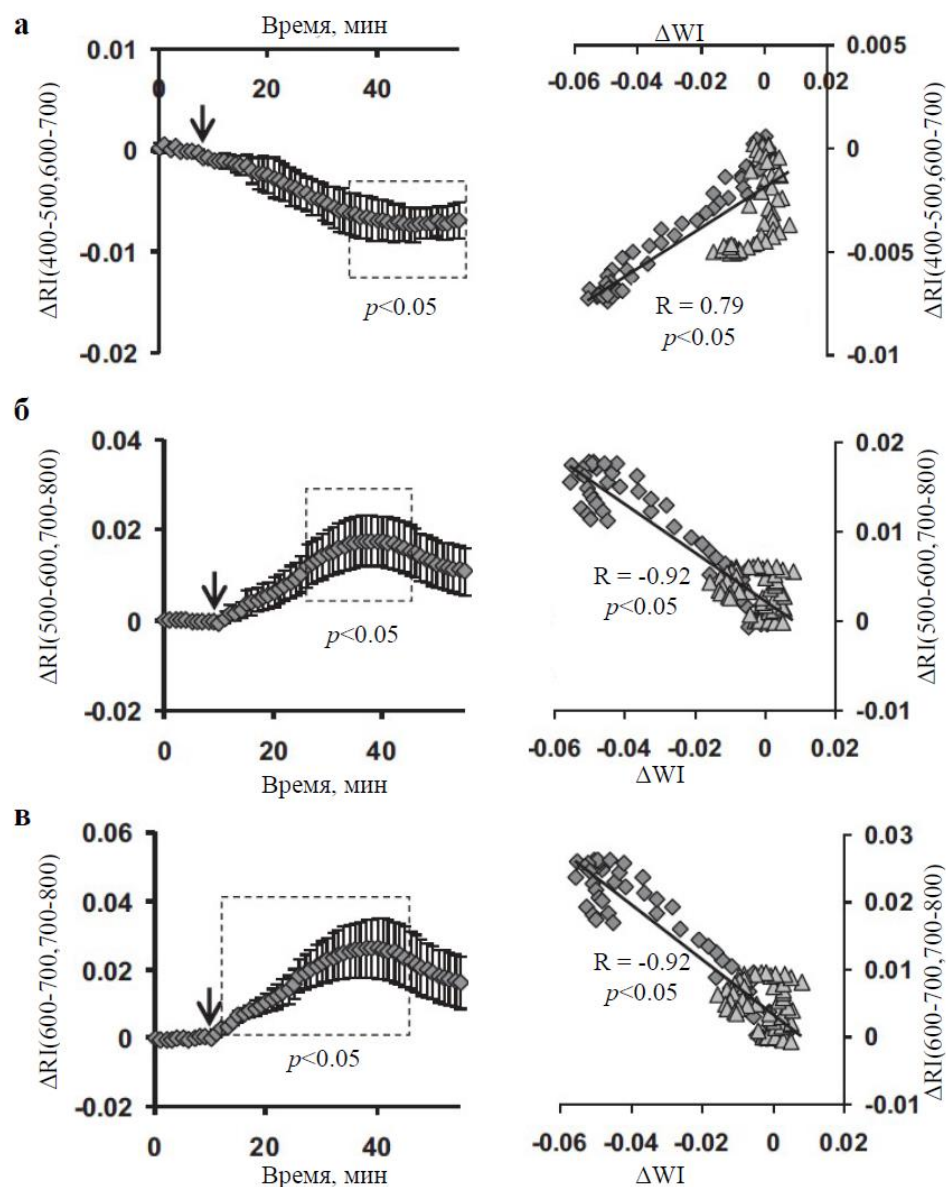


Рис. 44. Динамика вызванных индукцией ВП изменений широкополосных индексов отражения во втором листе гороха ($n=6$) и связь $\Delta RI(x,y)$ и ΔWI в ходе развития вызванных ВП изменений ($n=110$) [A28]. ВП индуцировался ожогом первого листа; спектры отражения измерялись с использованием спектрометра S100. Показаны $\Delta RI(400-500, 600-700)$ (а), $\Delta RI(500-600, 700-800)$ (б) и $\Delta RI(600-700, 700-800)$ (в); изменения других широкополосных индексов во втором листе не имели статистически значимого характера. Динамики изменения индексов в четвертом листе не приводятся, так как такие изменения были менее выраженными и в большинстве точек не имели статистически значимого характера. Для построения диаграмм рассеяния использовали все временные точки для второго (ромб) и четвертого (треугольник) листьев. Пунктирным прямоугольником обозначена область статистически значимых изменений индекса. R – коэффициент корреляции Пирсона.

Для непосредственной проверки влияния ВП на относительное содержание воды (RWC) в листьях была проведена отдельная серия экспериментов. Было показано, что через 15 мин после индукции ВП различия между величинами RWC в опыте и контроле практически отсутствовали (Рис. 45а); однако, через 45 мин RWC в опыте был ниже приблизительно на 1.5% (Рис. 45б). Такой результат подтверждает возможность небольшого и медленно развивающегося снижения содержания воды в листе после индукции ВП.

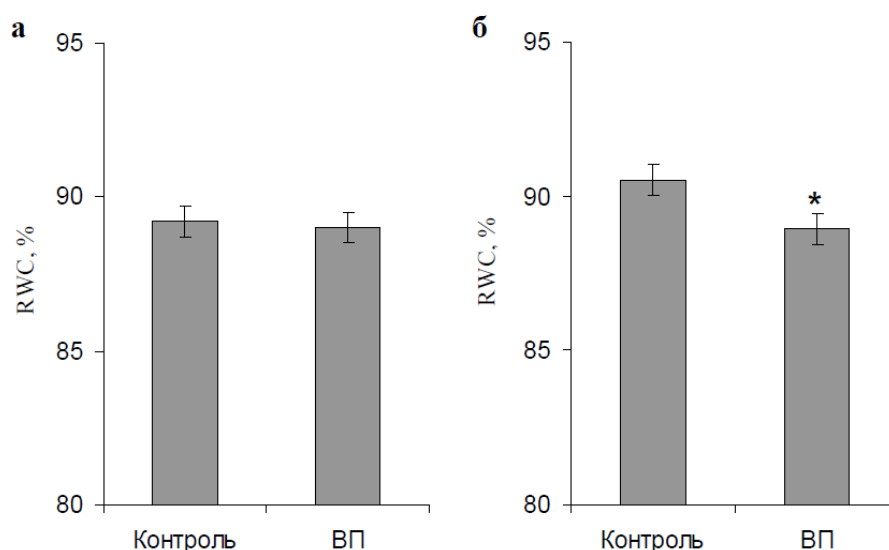


Рис. 45. Среднее относительное содержание воды (RWC) во втором листе гороха через 15 мин (а) и 45 мин (б) после индукции ВП ($n=11$). ВП индуцировался ожогом первого листа; в контроле ожог не наносили. RWC рассчитывалось на основании сырого и сухого веса. *, отличия от контроля статистически значимы ($p<0.05$).

Учитывая сложный характер ответов транспирации на ВП [A20], вопрос о конкретных механизмах вызванного вариabельным потенциалом снижения содержания воды остается открытым. Потенциально, такой ответ может быть связан с вызванным ВП открытием устьиц, которое может сохраняться у гороха в течение 20 мин и более [A20]; однако, открытие устьиц преимущественно наблюдалось в условиях повышенной влажности воздуха, что способствует низкому уровню транспирации. Более того, на длительных временных интервалах (более 20 мин) распространение ВП вызывало снижение проводимости устьиц и транспирации при различной влажности воздуха [A20,A44,A64], а изменения WI достигали максимального уровня приблизительно за 30 мин (Рис. 43в). Альтернативным вариантом является снижение поступления воды от корня, но возможность реализации подобного механизма при индукции ВП требует дальнейших исследований.

Таким образом, полученные результаты показывают, что изменения отражения света в широких спектральных полосах (100 нм) и изменения величины ряда широкополосных индексов отражения (RI(400-500,600-700), RI(500-600,700-800) и RI(600-700,700-800)) могут быть использованы для выявления распространения ВП по растению. При этом, такие изменения являются относительно медленными (развиваются за 30 мин и более) и слабо связанными с ответами фотосинтеза; возможно, такие изменения обусловлены небольшим снижением содержания воды в листе, которое развивается после индукции ВП,

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Электрические сигналы, включая вызванные локальными повреждающими воздействиями переменные потенциалы, являются одним из ключевых механизмов формирования быстрых и системных физиологических ответов растения (Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015; Choi et al., 2016; Hedrich et al., 2016). Известно, что электрические сигналы могут влиять на экспрессию генов (Wildon et al., 1992; Mousavi et al., 2013), синтез фитогормонов (Farmer et al., 2020), флоэмный поток (van Bel et al., 2014), дыхание (Filek, Kościelniak, 1997; Lautner et al., 2014), транспирацию (Kaiser, Grams, 2006; Vuralhan-Eckert et al., 2018), рост (Shiina, Tazawa, 1986; Stahlberg, Cosgrove, 1996) и многие другие процессы. Фотосинтез является одной из ключевых «мишеней» для электрических сигналов у высших растений (Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015; Szechyńska-Hebda et al., 2017). В частности, показано, что локальная стимуляция и индуцированные ею электрические сигналы могут вызывать быструю (Kaiser, Grams, 2006; Gallé et al., 2013; Białasek et al., 2017; Szechyńska-Hebda et al., 2022) и/или длительную (Hlavácková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Szechyńska-Hebda et al., 2022) инактивацию фотосинтеза; такая инактивация проявляется, в частности, в снижении фотосинтетической ассимиляции, уменьшении активности световой стадии фотосинтеза и возрастании NPQ.

В то же время, в литературе отсутствует целостное понимание механизмов влияния электрических сигналов на фотосинтез и анализ роли такого влияния для адаптации растения к неблагоприятным условиям. Кроме того, остаются практически не исследованными пути модификации и мониторинга фотосинтетических ответов. Настоящее диссертационное исследование представляет собой попытку решения этих вопросов для конкретного типа электрического сигнала (переменный потенциал) и конкретного типа фотосинтетического ответа (быстрая инактивация фотосинтеза). Переменный потенциал был выбран в качестве цели анализа в силу того, что это уникальный электрический сигнал высших растений, который индуцируется локальным действием экстремальных факторов (например, ожог, высокотемпературный нагрев или раздавливание). Таким образом, это сигнал, который, вероятно, играет ключевую роль в опасных для жизни растения условиях [A16,A65]. Быстрая инактивация фотосинтеза была выбрана в качестве предмета исследования как наиболее ранний фотосинтетический ответ, который, вероятно, не должен быть связан с более медленным распространением сигналов других типов (например, гормонального сигнала) [A16,A32]. По-видимому, быстрая инактивация фотосинтеза в меньшей степени зависит от типа стимула, индуцирующего ВП, нежели длительная инактивация [A35]; т.е., является наиболее универсальной.

Прежде всего, результаты диссертационного исследования значительно расширяют феноменологические знания о быстрых фотосинтетических ответах растения после индукции ВП; в частности, впервые показано, что такая индукция может вызывать обратимое возрастание циклического потока электронов вокруг ФСII [A44,A55,A63]. Другим ключевым результатом первого этапа диссертационного исследования является выявление ряда дополнительных аргументов в пользу участия ВП в качестве посредника между зоной повреждения и интактными листьями растения, в которых происходит индукция быстрой инактивации фотосинтеза. В литературе представлены два основных аргумента в пользу такого участия: более раннее развитие изменений фотосинтеза около проводящих пучков, которые являются основным каналом распространения электрических сигналов (Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009), и исчезновение фотосинтетических ответов при блокировании распространения электрических сигналов (например, охлаждением листа) (Grams et al., 2007). Диссертационное исследование дополнительно показывает, что (i) быстрая инактивация фотосинтеза отсутствует, если ВП не проходит в лист, и появляется при его дополнительной индукции [A59,A62], (ii) амплитуды ВП, варьирующие в силу индивидуальной изменчивости или разного расстояния до зоны повреждения, линейно связаны с амплитудой быстрой инактивации

фотосинтеза [A2,A12,A17,A24,A34,A35,A66], (iii) модификация амплитуды и параметров распространения ВП (ортованадат натрия, АБК, эпибрасинолид) приводит к соответствующим изменениям параметров быстрой инактивации фотосинтеза [A23,A25,A55], (iv) имитация индукции ВП (подавление активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны ортованадатом натрия) вызывает ответы фотосинтеза, сходные с индуцированной переменной потенциалом быстрой инактивацией фотосинтеза [A23]. Таким образом, именно распространение ВП является наиболее вероятным механизмом формирования быстрой инактивации фотосинтеза в интактных частях растения после локального действия повреждающих факторов.

Далее, результаты диссертационного исследования показывают комплексные механизмы формирования вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза [A1,A51,A56]. Ранее, в литературе (Krupenina, Bulychiev, 2007; Pavlovič et al., 2011) была предложена гипотеза о том, что инактивация темновой стадии фотосинтеза является основным механизмом влияния потенциалов действия на процессы световой стадии. Нами получен ряд аргументов, которые показывают, что при распространении ВП, инактивация темновой стадии фотосинтеза также является одним из механизмов его влияния на световую стадию: снижение амплитуды ответов световой стадии при подавлении индуцированных ВП ответов темновой стадии в условиях низкой концентрации CO_2 [A3,A59,A61,A62,A63], имитация ответов световой стадии фотосинтеза при снижении концентрации углекислого газа и подавлении темновой стадии [A3,A62,A63], а также вызванное ВП уменьшение активности H^+ -АТФ-синтазы тилакоидной мембраны [A3] и возрастание содержания АТФ в листе [A2]. Однако, сохранение вызванных ВП ответов световой стадии фотосинтеза (с уменьшенной амплитудой) в условиях низкой концентрации CO_2 и в темноте [A3,A12,A59,A61,A63] показывает существование дополнительных путей влияния переменной потенциала на процессы световой стадии, которые не связаны с инактивацией темновой стадии фотосинтеза. Диссертационное исследование показывает, что обе группы путей влияния связаны с обратимой инактивацией H^+ -АТФазы плазматической мембраны [A23,A25] и последующим возрастанием рН апопласта [A35,A61,A66,A67] и снижением рН цитоплазмы [A61,A66,A67], стромы и люмена хлоропластов [A3].

Анализ связи между изменениями рН и фотосинтетическими ответами, показывает, что сопровождающее ВП защелачивание апопласта обеспечивает снижение фотосинтетической ассимиляции CO_2 , а снижение внутриклеточного рН, включая, прежде всего, закисление стромы и люмена [A3], непосредственно влияет на процессы световой стадии фотосинтеза [A6,A67]. Влияние рН апопласта на фотосинтетические процессы, вероятно, реализуется через сдвиги равновесия в реакции $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$, которые существенно влияют на транспорт CO_2 в клетку [A15,A46], обеспечивая, по-видимому, вызванное ВП снижение проводимости мезофилла для CO_2 (Gallé et al., 2013). При этом, сопровождающие ВП и инактивацию H^+ -АТФазы изменения рН апопласта индуцируют нестационарные изменения поступления CO_2 в клетку [A15,A51]; базирующееся на анализе разработанной модели фотосинтеза исследование потоков при стационарных концентрациях CO_2 в листе и хлоропласте не выявило существенного влияния активности H^+ -АТФазы на фотосинтез [A46].

Роль снижения внутриклеточного рН в качестве альтернативного механизма формирования вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза подтверждается ответами хлоропластов на закисление среды инкубации и ответами участков листа на действие протонофора [A60,A61,A66]. Связанное с ВП закисление люмена хлоропластов, по-видимому, является основным механизмом возрастания NPQ и CEF и снижения LEF [A1,A3,A51]; все отмеченные процессы способствуют подавлению световой стадии фотосинтеза. Закисление стромы хлоропластов может вносить дополнительный вклад в такое подавление [A1,A51,A59], способствуя перемещению ферредоксин-НАДФ-редуктазы и снижению ее активности (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010). Полученные

результаты согласуются с отдельными работами, исследующими влияние закисления среды инкубации хлоропластов (Grams et al., 2009) или среды перфузии харовой клетки (Булычёв и др., 2013), которые показывают сходное влияние снижения pH на фотосинтез.

Таким образом, результаты этапа диссертационного исследования показывают, что инактивация H^+ -АТФазы и изменения pH являются наиболее вероятным механизмом формирования быстрой инактивации фотосинтеза [A1,A51]. Такой механизм не противоречит альтернативным объяснениям формирования быстрой инактивации фотосинтеза (вход Ca^{2+} и инактивация цикла Кальвина, Krupenina, Bulychев, 2007, или вход пероксида водорода и снижение активности фотосинтеза, Białasek et al., 2017), так как влияние таких механизмов также может реализовываться через изменения pH [A16,A51]. Более того, связанная с ВП инактивация H^+ -АТФазы приводит к снижению проводимости устьиц [A64]. Согласно результатам [A56], изменения проводимости устьиц также могут быть механизмом влияния ВП на фотосинтез, если такая проводимость является лимитирующей стадией для поступления CO_2 в клетку. Несмотря на то, что в большинстве экспериментов диссертационного исследования такой эффект отсутствовал, сильная связь изменений ассимиляции и проводимости устьиц наблюдалась в условиях сильной засухи и низкой проводимости устьиц [A44].

В литературе обсуждается влияние электрических сигналов на устойчивость растений к действию стрессоров (Ретивин и др., 1999; Szechyńska-Hebda et al., 2010; Zandalinas et al., 2020a, 2020b), что позволяет предположить возможное участие вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза в повышении устойчивости. Диссертационное исследование показывает, что ВП действительно повышает теплоустойчивость растения в целом [A64] и влияет на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата [A4,A34,A49,A62,A64]; последний эффект связан с развитием вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза (между изменениями теплоустойчивости и амплитудами ответов наблюдается сильная корреляция, имитация быстрой инактивации фотосинтеза снижением концентрации CO_2 влияет на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата аналогично ВП).

Следует, однако, отметить, что влияние ВП на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата имеет сложный характер. При действии высоких температур (нагрев воздуха приблизительно до $53^{\circ}C$, нагрев листовой пластинки до $46^{\circ}C$ или выше) индукция ВП снижает тепловое повреждение ФСII и увеличивает тепловое повреждение ФСII [A4,A62,A64]. Последний эффект отчасти связан с вызванным ВП снижением транспирации при нагреве и большим повышением температуры листовой пластинки [A64], но в случае сильного нагрева возрастание повреждения ФСII может быть не связано с изменениями транспирации [A4]. При этом увеличение теплового повреждения ФСII положительно связано со снижением повреждения ФСII [A4]. Полученный результат означает, что такое увеличение может быть механизмом повышения теплоустойчивости ФСII [A1]; в частности, снижение потока электронов на ФСII (при инактивации или повреждении ФСII) уменьшает ее повреждение при действии стрессоров. Учитывая, что ФСII легко репарирует, в то время как повреждение ФСII практически необратимо (Sonoike, 2011; Tikkanen, Aro, 2014; Tikkanen et al., 2014), отмеченный механизм должен способствовать повышению теплоустойчивости фотосинтетического аппарата в целом. Аналогичную роль может выполнять вызванное ВП возрастание NPQ (рост потерь световой энергии в ФСII) [A3,A13,A23,A24,A29,A34,A35,A44,A59,A61,A63]; с другой стороны, индуцированное переменным потенциалом возрастание циклического потока электронов вокруг ФСII [A44,A55,A63] может непосредственно снижать избыточное восстановление этой фотосистемы при действии стрессоров. Наконец, вызванное ВП и инактивацией фотосинтеза возрастание содержания АТФ в листе [A2] создает предпосылки для облегчения репарации фотосинтетического аппарата (Allakhverdiev et al., 2005, 2008) и, вероятно, других структур растения после повреждающего действия стрессора.

Можно ожидать, что некоторые из отмеченных механизмов (возрастание NPQ и содержания АТФ) должны также положительно влиять на теплоустойчивость ФСII и, возможно, других фотосинтетических процессов в условиях меньшего нагрева. Действительно, при нагреве до 50°C или ниже, ВП [A34,A49] и ВП-образные электрические сигналы в зоне нагрева [A8] повышают теплоустойчивость ФСII, а имитация переменного потенциала подавлением активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны увеличивает теплоустойчивость фотосинтетической ассимиляции CO_2 [A25]. Более того, полученные в рамках диссертационного исследования результаты [A62] показывают, что умеренное снижение активности темновой стадии фотосинтеза (при уменьшении CO_2 в среде до 150 ppm) может повышать теплоустойчивость ФСII даже в условиях сильного нагрева. На основании последнего результата, нельзя исключать, что положительное влияние ВП на устойчивость ФСII может дополнительно нелинейно зависеть от амплитуды быстрой фотосинтетической инактивации.

Таким образом, этап диссертационного исследования показывает, что индукция ВП и развитие быстрой инактивации фотосинтеза может повышать общую теплоустойчивость фотосинтетического аппарата. Механизмы такого повышения, по-видимому, варьируют в зависимости от величины нагрева листа.

Учитывая показанное влияние ВП и быстрой инактивации фотосинтеза на теплоустойчивость растений, в рамках диссертационного исследования были выявлены некоторые эндогенные и экзогенные факторы, способные модифицировать электрический сигналинг растений. Прежде всего, на основании анализа математических моделей электрогенеза растений показано, что формирование электрических сигналов может быть ускорено при флуктуациях активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны [A30] или при стохастической неоднородности ее пространственного распределения в ансамбле возбудимых клеток с локальной электрической связью (симпласт) [A36]. Вероятными механизмами выявленного ответа являются стохастический (Gammaitoni et al., 1998; Wellens et al., 2004) и индуцированный разнообразием (Tessone et al., 2006; Liang et al., 2020) резонансы. С другой стороны, экспериментальные результаты [A36] показывают высокую вариабельность активности H^+ -АТФазы (по крайней мере, между различными клетками в пределах одного листа растения), которая составляет около 40%. Наличие такой вариабельности подтверждает возможность ускорения формирования ВП за счет пространственной неоднородности активности H^+ -АТФазы в реальных условиях.

Помимо эндогенных факторов, параметры ВП и фотосинтетических ответов модифицируются экзогенными факторами. Так, диссертационное исследование показывает [A44], что развитие засухи, которое является одним из ключевых неблагоприятных факторов среды (Chaves et al., 2009; Fahad et al., 2017; Gupta et al., 2020), может постепенно снижать амплитуду вызванных ВП изменений параметров световой стадии фотосинтеза. Напротив, параметры ВП и ответа ассимиляции CO_2 качественно меняются в условиях сильной засухи [A44]: в значительной части случаев наблюдается гиперполяризационный сигнал (системный потенциал); вместо снижения ассимиляции CO_2 , наблюдается ее возрастание. По-видимому, трансформация ВП в системный потенциал обусловлена снижением амплитуды гидравлической волны при ожоге (вследствие уменьшения общего количества воды в растении) [A51], а возрастание ассимиляции CO_2 обусловлено низкой начальной проводимостью устьиц в условиях засухи, вследствие чего такая проводимость становится лимитирующим фактором для транспорта CO_2 в фотосинтезирующие клетки [A56].

Другими модифицирующими факторами является обработка стрессовыми фитогормонами. Так показано, что обработка экзогенной АБК, которая является основным стрессовым гормоном при засухе (Wilkinson et al., 2012; Kurepin et al., 2015), вызывает снижение амплитуды ВП и быстрой инактивации фотосинтеза [A25]. Выявленный эффект обусловлен вызванным АБК снижением начальной активности H^+ -

АТФазы плазматической мембраны [A25], что хорошо согласуется с нашими исследованиями, не вошедшими в диссертацию [A11], и данными литературы (Hayashi et al., 2014).

Обработка экзогенным 24-эпибрассинолидом, который является еще одним ключевым фитогормоном растений и может влиять на фотосинтетические процессы (Yu et al., 2004; Dobrikova et al., 2014; Rothová et al., 2014; Kolomeichuk et al., 2020), оказывает противоположенный эффект, увеличивая амплитуду ВП, ускоряя его распространение в листья и снижая время, необходимое для развития быстрой фотосинтетической инактивации [A55]. Потенциально, влияние ЭБЛ может быть также связано с функционированием H^+ -АТФазы, так как известно, что обработка брассиностероидами может повышать начальную активность H^+ -АТФазы (Witthöft et al., 2011; Minami et al., 2019), стимулируя тем самым формирование ВП и быстрой инактивации фотосинтеза [A21].

Таким образом, диссертационное исследование показывает, что существуют эндогенные (в частности, вариабельность активности H^+ -АТФазы) и экзогенные (засуха, обработка АБК и ЭБЛ) факторы, которые могут либо облегчать, либо затруднять формирование ВП и быстрой инактивации фотосинтеза. Помимо фундаментальной значимости, полученные результаты создают основу для разработки методов управления устойчивостью растений к действию неблагоприятных факторов путем модификации формирования ВП и фотосинтетических ответов.

Учитывая, что индукция ВП и развитие быстрой инактивации фотосинтеза влияет на устойчивость растений к повышенной температуре и, вероятно, другим стрессорам [A1,A16,A32,A50,A51,A57], раннее и дистанционное выявление обоих процессов имеет важное значения для мониторинга растений. В диссертационном исследовании показано, что анализ спектральных характеристик отраженного света может быть эффективным инструментом для выявления распространения ВП и формирования быстрой инактивации фотосинтеза. Так изменения PRI, чувствительные к избыточному свету, засухе, нагреву и другим факторам [A18,A21,A22,A26,A27,A39], могут быть также вызваны ВП [A17]. Как и при непосредственном действии стрессоров на исследуемые листья [A18,A21,A22,A26,A27,A39], вызванные ВП изменения линейно связаны с изменениями NPQ и могут быть использованы для оценки величины его энергозависимой компоненты [A17].

Использование тепловых карт коэффициента корреляции Пирсона (в соответствии с Balzarolo et al., 2018; Kovar et al., 2019; El-Hendawy et al., 2019) и статистической значимости различий (в соответствии с [A38]), позволило выявить новые узкополосные индексы отражения, чувствительные к индукции ВП и развитию фотосинтетических ответов [A37]. Среди них можно отметить такие индексы, как RI(571,542), RI(538,500), RI(646,554) и RI(692,662). При этом, изменения первых трех индексов, по-видимому, связаны с высокой чувствительностью отражения в области 535-555 нм к быстрым изменениям фотосинтетической активности [A27]; механизмом такой чувствительности является рН зависимое сжатие хлоропластов (Evain et al., 2004). Учитывая спектр флуоресценции ФСII (Pedrós et al., 2008), вызванные ВП изменения индекса RI(692,662) могут быть связаны с изменениями флуоресценции хлорофилла а; в частности, за счет снижения такой флуоресценции при росте NPQ после распространения вариабельного потенциала [A3,A13,A23,A24,A29,A34,A35,A44,A59,A61,A63].

В рамках диссертационного исследования также показано, что ВП может влиять на широкополосное отражение и некоторые индексы отражения (RI(400-500,600-700), RI(500-600,700-800) и RI(600-700,700-800)), рассчитанные на основании широких спектральных полос (100 нм) [A19,A28]. Однако, выявленные изменения широкополосного отражения слабо связаны с фотосинтетическими процессами и показывают небольшое снижение содержания воды в листе, которое медленно (десятки минут) развивается после индукции ВП. В то же время, следует отметить, что измерение и

анализ отраженного света в широких спектральных полосах является важным направлением исследований (Gitelson et al., 2002; Widjaja Putra, Soni, 2018; Yin et al., 2022) в силу большей простоты и дешевизны систем для регистрации отражения в таких полосах. С этой точки зрения, сам факт выявления относительно быстрых изменений широкополосных индексов (20-30 мин) показывает, что широкополосные индексы можно использовать для мониторинга системного ответа растения после индукции ВП.

Таким образом, изменения PRI, ряд новых узкополосных индексов отражения, и широкополосные индексы, выявленные в ходе блока анализа, в перспективе, могут быть использованы для мониторинга системных физиологических ответов растений, индуцированных генерацией и распространением ВП. Решение такой задачи обеспечит исследователей еще одним инструментом для анализа измерений, полученных на базе гиперспектральных или мультиспектральных камер.

В целом, основным фундаментальным результатом диссертационной работы является выявление основных механизмов формирования вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза и путей последующего повышения теплоустойчивости фотосинтетического аппарата у растений. Такой результат не только углубляет современные знания в области адаптации растений к неблагоприятным условиям среды, но и показывает новый путь регуляции фотосинтетических процессов, опирающийся на генерацию и распространение переменного потенциала.

При этом, полученные результаты также имеют высокую прикладную значимость, создавая основу для регуляции (на базе обработки фитогормонами) и мониторинга (на базе измерения и анализа PRI, а также найденных узкополосных и широкополосных индексов отражения) переменного потенциала и быстрой инактивации фотосинтеза. Их раннее и точное выявление в сочетании с использованием методов усиления или ослабления формирования ВП и ответов фотосинтеза может стать важным шагом в повышении эффективности земледелия, способствуя переходу к высокопроизводительному сельскому хозяйству.

По результатам диссертационного исследования были сделаны следующие **выводы:**

1. Подтверждена роль переменного потенциала в формировании быстрой инактивации фотосинтеза (5-10 мин) в интактных частях растения, включающей снижение ассимиляции CO_2 , квантовых выходов фотосистемы I и II и нециклического потока электронов, возрастание нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла а и впервые показанное усиление циклического потока электронов вокруг ФСІ.

2. Показано, что снижение активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны, вызывающее защелачивание апопласта и закисление цитоплазмы, стромы и люмена хлоропластов, является наиболее вероятным механизмом индукции быстрой фотосинтетической инактивации у высших растений при распространении ВП. При этом, одной из «мишеней» изменений рН апопласта является транспорт CO_2 внутрь фотосинтезирующих клеток, подавление которого приводит к инактивации темновой стадии фотосинтеза и последующему снижению активности световой стадии (уменьшение квантовых выходов ФСІ, ФСІІ и нециклического потока электронов, возрастание нефотохимического тушения флуоресценции и циклического потока электронов вокруг ФСІ). В то же время, закисление цитоплазмы, приводящее к снижению рН в строме и люмене хлоропластов, формирует другой путь влияния ВП на световую стадию фотосинтеза, который также способствует ее инактивации.

3. Выявлена роль индуцированной ВП быстрой инактивации фотосинтеза в повышении устойчивости ФСІ в условиях сильного нагрева (около 53°C), что, вероятно, способствует повышению теплоустойчивости растения в целом. Показан ряд потенциальных механизмов такого повышения, включая увеличение циклического потока электронов, рост нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла а, повышение содержания АТФ в листьях, а также усиление теплового повреждения ФСІІ, вызванное, в

том числе, снижением транспирации и более сильным нагревом листовой пластинки. Напротив, в условиях более слабого температурного воздействия (50°C и ниже) ВП может вызывать увеличение теплоустойчивости ФСII.

4. Выявлен ряд эндогенных и экзогенных факторов, способных усиливать или ослаблять формирование ВП и быстрой инактивации фотосинтеза, что может быть использовано для прогнозирования их влияния на состояние растения в различных условиях и для управления таким влиянием. В частности, показано, что стимуляция формирования электрических и/или фотосинтетических ответов происходит при возрастании амплитуды флуктуаций и при увеличении стохастической пространственной неоднородности активности H^+ -АТФазы, а также при предварительной обработке растений 24-эпибрассинолидом (10^{-6} М). Формирование таких ответов затрудняется при предварительной обработке растений абсцизовой кислотой (10^{-5} М), а также при развитии засухи.

5. Предложен ряд методов оптического мониторинга для выявления распространения переменного потенциала и/или формирования быстрой инактивации фотосинтеза, которые в перспективе могут быть использованы для оценки системных ответов растения при действии неблагоприятных факторов среды. Предложенные методы базируются на измерении и анализе изменений фотохимического индекса отражения и новых узкополосных индексов отражения (включая, RI(571,542), RI(538,500), RI(646,554) и RI(692,662)), которые тесно связаны с быстрой инактивацией фотосинтеза. Кроме того, распространение ВП может быть выявлено по медленному (десять минут) изменению широкополосного (100 нм) отражения растения, включая изменения ряда широкополосных индексов отражения (RI(400-500,600-700), RI(500-600,700-800) и RI(600-700,700-800)).

4. СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

4.1. Список научных статей за последние 10 лет (2016-2024 гг.), в которых изложены основные результаты диссертации

A1. **V. Sukhov**. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants // *Photosynthesis Research*. – 2016. – V. 130. – № 1-3. – P. 373-387. doi:10.1007/s11120-016-0270-x (**WoS, Scopus, IF= 3.7, Q1 (SJR)**)

A2. L. Surova, O. Sherstneva, V. Vodeneev, L. Katicheva, M. Semina, **V. Sukhov**. Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves // *Journal of Plant Physiology*. – 2016. – V. 202. – P. 57-64. doi: 10.1016/j.jplph.2016.05.024 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A3. **V. Sukhov**, L. Surova, E. Morozova, O. Sherstneva, V. Vodeneev. Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – V. 7. – P. 1092. doi: 10.3389/fpls.2016.01092 (**WoS, Scopus, IF= 4.8, Q1 (SJR)**)

A4. L. Surova, O. Sherstneva, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Variation potential propagation decreases heat-related damage of pea photosystem I by two different pathways // *Plant Signaling and Behavior*. – 2016. – V. 11. – P. E1145334. doi: 10.1080/15592324.2016.1145334 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A5. В.А. Воденеев, О.Н. Шерстнева, Л.М. Сурова, М.М. Семина, Л.А. Катичева, **В.С. Сухов**. Изменение параметров индуцированных электрическими сигналами ответов фотосинтеза при увеличении возраста проростков пшеницы // *Физиология растений*. – 2016. – Т. 63. – № 6. – С. 873-880. doi:10.7868/S001533031605016X (**WoS, Scopus, RSCI**)

A6. О.Н. Шерстнева, В.А. Воденеев, Л.М. Сурова, Е.М. Новикова, **В.С. Сухов**. Использование математической модели переменного потенциала для анализа его влияния на фотосинтез высших растений // *Биологические мембраны*. – 2016. – Т. 33. – № 4. – С. 293-302. doi: 10.7868/S0233475516030087 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A7. В.А. Воденеев, Л.А. Катичева, **В.С. Сухов**. Электрические сигналы у высших растений: механизмы генерации и распространения // *Биофизика*. – 2016. – Т. 61. – № 3. – С. 598-606. doi: 10.1134/S0006350916030209 (**Scopus, RSCI**)

A8. **V. Sukhov**, V. Gaspirovich, S. Mysyagin, V. Vodeneev. High-temperature tolerance of photosynthesis can be linked to local electrical responses in leaves of pea // *Frontiers in Physiology*. – 2017. – V. 8. – P. 763. doi: 10.3389/fphys.2017.00763 (**WoS, Scopus, IF=3.4, Q2 (SJR)**)

A9. E. Sukhova, E. Akinchits, **V. Sukhov**. Mathematical models of electrical activity in plants // *Journal of Membrane Biology*. – 2017. – V. 250. – № 5. – P. 407-423. doi: 10.1007/s00232-017-9969-7 (**WoS, Scopus, IF=2.9, Q2 (SJR)**)

A10. Е.М. Новикова, В.А. Воденеев, **В.С. Сухов**. Разработка математической модели потенциала действия высших растений, учитывающей роль вакуоли в генерации электрического сигнала // *Биологические мембраны*. – 2017. – Т. 34. – № 2. – С. 109-125. doi: 10.7868/S0233475517010066 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A11. **В.С. Сухов**, В.В. Гаспирович, Е.Н. Громова, М.М. Ладейнова, Ю.В. Сеницына, Е.В. Березина, Е.К. Акинчиц, В.А. Воденеев. Снижение проводимости мезофилла для CO₂ как механизм влияния абсцизовой кислоты на фотосинтез проростков гороха и пшеницы // *Биологические мембраны*. – 2017. – Т. 34. – № 3. – С. 174-185. doi: 10.7868/S0233475517030082 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A12. E. Sukhova, M. Mudrilov, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea // *Photosynthesis Research*. – 2018. – V. 136. – № 2. – P. 215-228. doi: 10.1007/s11120-017-0460-1 (**WoS, Scopus, IF= 3.7, Q1 (SJR)**)

A13. V. Vodeneev, M. Mudrilov, E. Akinchits, I. Balalaeva, **V. Sukhov**. Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the

nature of stimulus // *Functional Plant Biology*. – 2018. – V. 45. – № 2. – P. 160-170. doi: 10.1071/FP16342 (**WoS, Scopus, IF= 2.7, Q1 (SJR)**)

A14. E. Sukhova, **V. Sukhov**. Connection of the photochemical reflectance index (PRI) with the photosystem II quantum yield and the nonphotochemical quenching can be dependent on variation of photosynthetic parameters among investigated plants: A meta-analysis // *Remote Sensing*. – 2018. – V. 10. – № 5. – P. 771. doi:10.3390/rs10050771 (**WoS, Scopus, IF=4.1, Q1 (SJR)**)

A15. Е.М. Сухова, **В.С. Сухов**. Зависимость поступления CO₂ в растительную клетку от активности H⁺-АТФ-азы плазматической мембраны. Теоретический анализ // *Биологические мембраны*. – 2018. – Т. 35. – № 1. – С. 52-65. doi: 10.7868/S0233475518010061 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A16. **V. Sukhov**, E. Sukhova, V. Vodeneev. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2019. – V. 146. – P. 63-84. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009 (**WoS, Scopus, IF= 4.5, Q1 (SJR)**)

A17. **V. Sukhov**, E. Sukhova, E. Gromova, L. Surova, V. Nerush, V. Vodeneev. The electrical signals-induced systemic photosynthetic response is accompanied with changes in photochemical reflectance index in pea // *Functional Plant Biology*. – 2019. – V. 46. – № 4. – P. 328-338. doi:10.1071/FP18224 (**WoS, Scopus, IF= 2.7, Q1 (SJR)**)

A18. E. Sukhova, **V. Sukhov**. Analysis of light-induced changes in the photochemical reflectance index (PRI) in leaves of pea, wheat, and pumpkin using pulses of green-yellow measuring light // *Remote Sensing*. – 2019. – V. 11. – № 7. – P. 810. doi:10.3390/rs11070810 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A19. E. Sukhova, L. Yudina, E. Akinchits, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Influence of electrical signals on pea leaf reflectance in the 400 - 800 nm range // *Plant Signaling and Behavior*. – 2019. – V. 14. – № 7. – P. E1610301. doi:10.1080/15592324.2019.1610301 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A20. Л.М. Сурова, О.Н. Шерстнева, С.А. Мысягин, В.А. Воденеев, **В.С. Сухов**. Влияние локального повреждения на транспирацию листьев гороха при различной влажности воздуха // *Физиология растений*. – 2019. – Т. 66. – № 1. – С. 58-65. doi:10.1134/S0015330319010160 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A21. **В.С. Сухов**, Е.Н. Громова, Е.М. Сухова, Л.М. Сурова, В.Н. Неруш, В.А. Воденеев. Анализ связи показателей световой стадии фотосинтеза с фотохимическим индексом отражения (PRI) в условиях кратковременного освещения листа гороха // *Биологические мембраны*. – 2019. – Т. 36. – № 1. – С. 32-43. doi: 10.1134/S0233475518050122 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A22. Е.М. Сухова, Л.М. Юдина, В.А. Воденеев, **В.С. Сухов**. Анализ связи изменений фотохимического индекса отражения (PRI) и закисления люмена хлоропластов листьев гороха и герани в условиях кратковременного освещения // *Биологические мембраны*. – 2019. – Т. 36. – № 3. – С. 218-228. doi: 10.1134/S0233475519030083 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A23. L. Yudina, O. Sherstneva, E. Sukhova, M. Grinberg, S. Mysyagin, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Inactivation of H⁺-ATPase participates in the influence of variation potential on photosynthesis and respiration in peas // *Plants*. – 2020. – V. 11. – № 9. – P. 1585. doi:10.3390/plants9111585 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A24. M. Ladeinova, M. Mudrilov, E. Berezina, D. Kior, M. Grinberg, A. Brilkina, **V. Sukhov**, V. Vodeneev. Spatial and temporal dynamics of electrical and photosynthetic activity and the content of phytohormones induced by local stimulation of pea plants // *Plants*. – 2020. – V. 9. – № 10. – P. 1364. doi:10.3390/plants9101364 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A25. L. Yudina, E. Sukhova, O. Sherstneva, M. Grinberg, M. Ladeinova, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Exogenous abscisic acid can influence photosynthetic processes in peas through a

decrease in activity of H⁺-ATP-ase in the plasma membrane // *Biology*. – 2020. – V. 9. – № 10. – P. 324. doi:10.3390/biology9100324 (**WoS, Scopus, IF= 3.5, Q1 (SJR)**)

A26. L. Yudina, E. Sukhova, E. Gromova, V. Nerush, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. A light-induced decrease in the photochemical reflectance index (PRI) can be used to estimate the energy-dependent component of non-photochemical quenching under heat stress and soil drought in pea, wheat, and pumpkin. // *Photosynthesis Research*. – 2020. – V. 146. – № 1-3. – P. 175-187. doi:10.1007/s11120-020-00718-x (**WoS, Scopus, IF= 3.7, Q1 (SJR)**)

A27. E. Sukhova, **V. Sukhov**. Relation of photochemical reflectance indices based on different wavelengths to the parameters of light reactions in photosystems I and II in pea plants // *Remote Sensing*. – 2020. – V. 12. – № 8. – P. 1312. doi:10.3390/rs12081312 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A28. E. Sukhova, L. Yudina, E. Gromova, V. Nerush, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Burning-induced electrical signals influence broadband reflectance indices and water index in pea leaves // *Plant Signaling and Behavior*. – 2020. – V. 15. – № 4. – P. 1737786. doi:10.1080/15592324.2020.1737786 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A29. M. Mudrilov, L. Katicheva, M. Ladeynova, I. Balalaeva, **V. Sukhov**, V. Vodeneev. Automatic determination of the parameters of electrical signals and functional responses of plants using the wavelet transformation method // *Agriculture*. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 7. doi:10.3390/agriculture10010007 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A30. **В.С. Сухов**, Е.М. Сухова, Д.А. Ратницына, М.А. Гринберг, Л.М. Юдина, В.А. Воденеев. Теоретический анализ влияния флуктуаций активности Н⁺-АТФ-азы плазматической мембраны на холодоиндуцированные электрические реакции растительной клетки // *Биологические мембраны*. – 2020. – Т. 37. – № 4. – С. 299-312. doi:10.31857/S0233475520040076 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A31. E. Sukhova, A. Khlopkov, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Simulation of a nonphotochemical quenching in plant leaf under different light intensities // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. – 2020. – V. 1861. – № 2. – P. 148138. doi:10.1016/j.bbabi.2019.148138 (**WoS, Scopus, IF= 2.7, Q1 (SJR)**)

A32. E. Sukhova, **V. Sukhov**. Electrical signals, plant tolerance to actions of stressors, and programmed cell death: Is interaction possible? // *Plants*. – 2021. – V. 10. – № 8. – P. 1704. doi:10.3390/plants10081704 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A33. E. Sukhova, E. Akinchits, S.V. Gudkov, R.Y. Pishchalnikov, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. A theoretical analysis of relations between pressure changes along xylem vessels and propagation of variation potential in higher plants // *Plants*. – 2021. – V. 10. – № 2. – P. 372. doi:10.3390/plants10020372 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A34. M.A. Grinberg, S.V. Gudkov, I.V. Balalaeva, E. Gromova, Yu. Sinitsyna, **V. Sukhov**, V. Vodeneev. Effect of chronic β -radiation on long-distance electrical signals in wheat and their role in adaptation to heat stress // *Environmental and Experimental Botany*. – 2021. – V. 184. – P. 104378. doi:10.1016/j.envexpbot.2021.104378 (**WoS, Scopus, IF= 4.5, Q1 (SJR)**)

A35. M. Mudrilov, M. Ladeinova, E. Berezina, M. Grinberg, A. Brilkina, **V. Sukhov**, V. Vodeneev. Mechanisms of specific systemic response in wheat plants under different locally acting heat stimuli // *Journal of Plant Physiology*. – 2021. – V. 258–259. – P. 153377. doi:10.1016/j.jplph.2021.153377 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A36. E. Sukhova, D. Ratnitsyna, **V. Sukhov**. Stochastic spatial heterogeneity in activities of H⁺-ATP-ases in electrically connected plant cells decreases threshold for cooling-induced electrical responses // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – № 15. – P. 8254. doi:10.3390/ijms22158254 (**WoS, Scopus, IF= 4.9, Q1 (SJR)**)

A37. E. Sukhova, L. Yudina, E. Gromova, A. Ryabkova, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Influence of local burning on difference reflectance indices based on 400–700 nm wavelengths in leaves of pea seedlings // *Plants*. – 2021. – V. 10. – № 5. – P. 876. doi:10.3390/plants10050878 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A38. E. Sukhova, L. Yudina, E. Gromova, A. Ryabkova, D. Kior, **V. Sukhov**. Complex analysis of the efficiency of difference reflectance indices on the basis of 400–700 nm wavelengths for revealing the influences of water shortage and heating on plant seedlings // Remote Sensing. – 2021. – V. 13. – № 5. – P. 962. doi:10.3390/rs13050962 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A39. **V. Sukhov**, E. Sukhova, A. Khlopkov, L. Yudina, A. Ryabkova, A. Telnykh, E. Sergeeva, V. Vodeneev, I. Turchin. Proximal imaging of changes in photochemical reflectance index in leaves based on using pulses of green-yellow light // Remote Sensing. – 2021. – V. 13. – № 9. — P. 1762. doi:10.3390/rs13091762 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A40. A. Khlopkov, O. Sherstneva, M. Ladeinova, M. Grinberg, L. Yudina, **V. Sukhov**, V. Vodeneev. Participation of calcium ions in induction of respiratory response caused by variation potential in pea seedlings // Plant Signaling and Behavior. – 2021. – V. 16. – № 4. – P. 1869415. doi: 10.1080/15592324.2020.1869415 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A41. **V. Sukhov**, E. Sukhova, Yu. Sinitsyna, E. Gromova, N. Mshenskaya, A. Ryabkova, N. Ilin, V. Vodeneev, E. Mareev, P. Colin. Influence of magnetic field with schumann resonance frequencies on photosynthetic light reactions in wheat and pea // Cells. – 2021. – V. 10. – № 1. – P. 149. doi: 10.3390/cells10010149 (**WoS, Scopus, IF= 5.2, Q1 (SJR)**)

A42. E. Sukhova, E. Gromova, L. Yudina, A. Kior, Y. Vetrova, N. Ilin, E. Mareev, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Change in H^+ transport across thylakoid membrane as potential mechanism of 14.3 Hz magnetic field impact on photosynthetic light reactions in seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plants. – 2021. – V. 10. – № 10. — P. 2207. doi: 10.3390/plants10102207 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A43. E.M. Сухова, B.A. Воденеев, **В.С. Сухов**. Математическое моделирование фотосинтеза и анализ продуктивности растений // Биологические мембраны. – 2021. – Т. 38. – № 1. – С. 20-43. doi: 10.31857/S0233475521010060 (**WoS, Scopus, RSCI**)

A44. L. Yudina, E. Gromova, M. Grinberg, A. Popova, E. Sukhova, **V. Sukhov**. Influence of burning-induced electrical signals on photosynthesis in pea can be modified by soil water shortage // Plants. – 2022. – V. 11. – № 4. – P. 534. doi:10.3390/plants11040534 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A45. E. Sukhova, D. Ratnitsyna, E. Gromova, **V. Sukhov**. Development of two-dimensional model of photosynthesis in plant leaves and analysis of induction of spatial heterogeneity of CO_2 assimilation rate under action of excess light and drought // Plants. – 2022. – V. 11. – № 23. – P. 3285. doi:10.3390/plants11233285 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A46. E. Sukhova, D. Ratnitsyna, **V. Sukhov**. Simulated analysis of influence of changes in H^+ -ATPase activity and membrane CO_2 conductance on parameters of photosynthetic assimilation in leaves // Plants. – 2022. – V. 11. – № 24. – P. 3435. doi:10.3390/plants11243435 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A47. M. Grinberg, M. Mudrilov, E. Kozlova, **V. Sukhov**, F. Sarafanov, A. Evtushenko, N. Ilyin, V. Vodeneev, C. Price, E. Mareev. Effect of extremely low-frequency magnetic fields on light-induced electric reactions in wheat // Plant Signaling and Behavior. – 2022. – V. 17. – № 1. – P. 2021664. doi: 10.1080/15592324.2021.2021664 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A48. L. Yudina, E. Sukhova, M. Mudrilov, V. Nerush, A. Pecherina, A.A. Smirnov, A.S. Dorokhov, N.O. Chilingaryan, V. Vodeneev, **V. Sukhov**. Ratio of intensities of blue and red light at cultivation influences photosynthetic light reactions, respiration, growth, and reflectance indices in lettuce // Biology. – 2022. – V. 11. – № 1. – P. 60. doi:10.3390/biology11010060 (**WoS, Scopus, IF= 3.5, Q1 (SJR)**)

A49. M. Grinberg, E. Gromova, A. Grishina, E. Berezina, M. Ladeinova, A.V. Simakin, **V. Sukhov**, S.V. Gudkov, V. Vodeneev. Effect of photoconversion coatings for greenhouses on electrical signal-induced resistance to heat stress of tomato plants // Plants. – 2022. – V. 11. – № 2. – P. 229. doi:10.3390/plants11020229 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A50. E. Sukhova, **V. Sukhov**. Electrical signals in systemic adaptive response of higher plants: Integration through separation // Bioelectricity. – 2023. – V. 5. – № 2. – P. 126-131. doi:10.1089/bioe.2022.0042 (**WoS, Scopus**)

A51. Е.М. Сухова, Л.М. Юдина, **В.С. Сухов**. Изменения активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны как связующее звено между формированием электрических сигналов и развитием фотосинтетических ответов у высших растений // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 10. – С. 1800–1817. doi:10.31857/S0320972523100068 (**WoS, Scopus, IF= 2.2, Q2 (SJR), RSCI**)

A52. D. Ratnitsyna, L. Yudina, E. Sukhova, **V. Sukhov**. Development of modified Farquhar–von Caemmerer–Berry model describing photodamage of photosynthetic electron transport in C3 plants under different temperatures // Plants. – 2023. – V. 12. – № 18. – P. 3211. doi:10.3390/plants12183211 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A53. L. Yudina, E. Sukhova, E. Gromova, M. Mudrilov, Y. Zolin, A. Popova, V. Nerush, A. Pecherina, A.A. Grishin, A.A. Dorokhov, **V. Sukhov**. Effect of duration of LED lighting on growth, photosynthesis and respiration in lettuce // Plants. – 2023. – V. 12. – № 3. – P. 442. doi:10.3390/plants12030442 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A54. E. Sukhova, L. Yudina, Y. Zolin, A. Popova, **V. Sukhov**. Development, verification, and analysis of simple mathematical model of lettuce productivity under different light conditions // Horticulturae. – 2023. – V. 9. – № 12. – P. 1259. doi:10.3390/horticulturae9121259 (**WoS, Scopus, IF= 3.0, Q1 (SJR)**)

A55. E. Sukhova, L. Yudina, E. Kozlova, **V. Sukhov**. Preliminary treatment by exogenous 24-epibrassinolide influences burning-induced electrical signals and following photosynthetic responses in pea (*Pisum sativum* L.) // Plants. – 2024. – V. 13. – № 23. – P. 3292. doi:10.3390/plants13233292 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

A56. **V. Sukhov**. Increasing stomatal CO_2 conductance as a potential mechanism of photosynthetic activation by electrical signals in terrestrial plants // Frontiers in Plant Science. – 2024. – V. 15. – P. 1476175. doi:10.3389/fpls.2024.1476175 (**WoS, Scopus, IF= 4.8, Q1 (SJR)**)

A57. E. Kozlova, L. Yudina, E. Sukhova, **V. Sukhov**. Analysis of electrome as a tool for plant monitoring: Progress and perspectives // Plants. – 2025. – V. 14. – № 10. – P. 1500. doi:10.3390/plants14101500 (**WoS, Scopus, IF= 4.1, Q1 (SJR)**)

4.2. Список патентов за последние 10 лет (2016-2024 гг.), связанных с диссертацией

A58. **В.С. Сухов**, Е.М. Сухова, В.А. Воденеев, Л.М. Юдина, И.В. Турчин, А.А. Тельных, Е.А. Сергеева, В.А. Воробьев Система для измерения фотохимического индекса отражения PRI у растений (Патент на изобретение 2746690, государственная регистрация 19 апреля 2021 г.).

4.3. Список научных статей, опубликованных до 2016 г., в которых изложены основные результаты диссертации

A59. **V. Sukhov**, O. Orlova, S. Mysyagin, J. Sinitsyna, V. Vodeneev Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium // Planta. – 2012. – V. 235. – № 4. – P. 703-712. doi:10.1007/s00425-011-1529-2 (**WoS, Scopus, IF= 3.8, Q1 (SJR)**)

A60. **В.С. Сухов**, О.Н. Шерстнева, Л.М. Сурова, Е.А. Румянцев, В.А. Воденеев. Влияние переменного потенциала на фотосинтез проростков тыквы (*Cucurbita pepo* L.) // Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 3. – С. 468-473. doi:10.1134/S0006350913030184 (**Scopus, RSCI**)

A61. **V. Sukhov**, O. Sherstneva, L. Surova, L. Katicheva, V. Vodeneev. Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea // Plant, Cell and Environment. – 2014. – V. 37. – № 11. – P. 2532-2541. doi:10.1111/pce.12321 (**WoS, Scopus, IF= 6.3, Q1 (SJR)**)

A62. **V. Sukhov**, L. Surova, O. Sherstneva, V. Vodeneev. Influence of variation potential on resistance of the photosynthetic machinery to heating in pea // *Physiologia Plantarum*. – 2014. – V. 152. – № 4. – P. 773-783. doi:10.1111/ppl.12208 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A63. **V. Sukhov**, L. Surova, O. Sherstneva, L. Katichева, V. Vodeneev. Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – V. 5. – P. 766. doi: 10.3389/fpls.2014.00766 (**WoS, Scopus, IF= 4.8, Q1 (SJR)**)

A64. **V. Sukhov**, L. Surova, O. Sherstneva, A. Bushueva, V. Vodeneev. Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperature in pea // *Functional Plant Biology*. – 2015. – V. 42. – № 8. – P. 727-736. doi:10.1071/FP15052 (**WoS, Scopus, IF= 2.7, Q1 (SJR)**)

A65. V. Vodeneev, E. Akinchits, **V. Sukhov**. Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation // *Plant Signaling and Behavior*. – 2015. – V. 10. – P. E1057365. doi:10.1080/15592324.2015.1057365 (**WoS, Scopus, IF= 3.6, Q1 (SJR)**)

A66. О.Н. Шерстнева, В.А. Воденеев, Л.А. Катичева, Л.М. Сурова, **В.С. Сухов**. Участие изменений внутри и внеклеточного pH в развитии вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа у проростков тыквы // *Биохимия*. – 2015. – Т. 80. – № 6. – С. 920-930. doi:10.1134/S0006297915060139 (**WoS, Scopus, IF= 2.2, Q2 (SJR), RSCI**)

A67. О.Н. Шерстнева, Л.М. Сурова, В.А. Воденеев, Ю.И. Плотникова, А.В. Бушуева, **В.С. Сухов**. Изменения внутри- и внеклеточного pH участвуют в формировании разных компонент фотосинтетического ответа, вызванного переменным потенциалом у проростков гороха // *Биологические мембраны*. – 2015. – Т. 32. – № 5-6. – С. 446-454. DOI: doi:10.1134/S1990747815050116 (**WoS, Scopus, RSCI**)

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булычев А.А., Черкашин А.А., Вреденберг В., Рубин А.Б., Зыков В.С., Мюллер С.Х. Флуоресценция и фотосинтетическая активность хлоропластов в кислых и щелочных зонах клеток *Chara corallina* // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 384–391.
2. Булычёв А.А., Алова А.В., Рубин А.Б. Изменения флуоресценции хлоропластов в клетках *Chara corallina*, связанные с передачей фотоиндуцированного сигнала с потоком цитоплазмы // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 38–46.
3. Воденеев В.А., Акинчиц Е.К., Катичева Л.А., Сухов В.С. Анализ роли ионов Ca^{2+} , H^+ , Cl^- в генерации переменного потенциала у высшего растения *Cucurbita pepo* L. // Физиология растений. 2011. Т. 6. С. 826–833.
4. Гольцев В.Н., Каладжи Х.М., Паунов М., Баба В., Хорачек Т., Мойски Я., Коцел Х., Аллахвердиев С.И. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 881–908.
5. Ретивин В.Г., Опритов В.А., Лобов С.А., Тараканов С.А., Худяков В.А. Модификация устойчивости фотосинтезирующих клеток к охлаждению и прогреву после раздражения корней раствором KCl // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 790–798.
6. Ретивин В.Г., Опритов В.А., Федулина С.Б. Преадаптация тканей стебля CUCURBITA PEPO к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалами действия // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 499–510.
7. Тихонов А.Н. Энергетическая и регуляторная роль протонного потенциала в хлоропластах // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 1155–1176.
8. Веселова Т., Веселовский В., Чернавский Д. Стресс у растений (биофизический подход). М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993. 144 с.
9. Allakhverdiev S.I., Nishiyama Y., Takahashi S., Miyairi S., Suzuki I., Murata N. Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis* // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 263–273.
10. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis // Photosynth. Res. 2008. V. 98. P. 541–550.
11. Alte F., Stengel A., Benz J.P., Petersen E., Soll J., Groll M., Bölder, B. Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 19260–19265.
12. Bakery A., Vraggalas S., Shalha B., Chauhan H., Benhamed M., Fragkostefanakis S. Heat stress transcription factors as the central molecular rheostat to optimize plant survival and recovery from heat stress // New Phytol. 2024. V. 244. P. 51–64.
13. Balzarolo M., Peñuelas J., Filella I., Portillo-Estrada M., Ceulemans R. Assessing ecosystem isoprene emissions by hyper-spectral remote sensing // Remote Sens. 2018. V. 10. Article 1086.
14. Benz J.P., Stengel A., Lintala M., Lee Y.H., Weber A., Philippar K., Gügel I.L., Kaieda S., Ikegami T., Mulo P., Soll J., Bölder, B. Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise // Plant Cell. 2010. V. 21. P. 3965–3983.
15. Bernacchi C.J., Rosenthal D.M., Pimentel C., Long S.P., Farquhar G.D. Modeling the temperature dependence of C_3 // Photosynthesis *in silico*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Laisk A., Nedbal L., Govindjee, Eds. Springer: Dordrecht, Germany, 2009. V. 29. P. 231–246.
16. Białasek M., Górecka M., Mittler R., Karpiński S. Evidence for the involvement of electrical, calcium and ROS signaling in the systemic regulation of non-photochemical quenching and photosynthesis // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. P. 207–215.
17. Chaumont F., Tyerman S.D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations // Plant Physiol. 2014. V. 164. P. 1600–1618.

18. Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 551–560.
19. Choi W.G., Hilleary R., Swanson S.J., Kim S.H., Gilroy S. Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2016. V. 67. P. 287–307.
20. Choi W.G., Miller G., Wallace I., Harper J., Mittler R., Gilroy S. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca^{2+} , ROS and electrical signals // *Plant J.* 2017. V. 90. P. 698–707.
21. Danelichen V.H., Biudes M.S., Velasque M.C., Machado N.G., Gomes R.S., Vourlitis G.L., Nogueira J.S. Estimating of gross primary production in an Amazon-Cerrado transitional forest using MODIS and Landsat imagery // *An Acad Bras Cienc.* 2015. V. 87. P. 1545-1564.
22. Dempsey D.A., Klessig D.F. SOS - too many signals for systemic acquired resistance? // *Trends Plant. Sci.* 2012. V. 17. P. 538-545.
23. Devireddy A.R., Zandalinas S.I., Gómez-Cadenas A., Blumwald E., Mittler R. Coordinating the overall stomatal response of plants: Rapid leaf-to-leaf communication during light stress // *Sci. Signal.* 2018. V. 11. Article eaam9514.
24. Ding M., Zhang M., Zeng H., Hayashi Y., Zhu Y., Kinoshita T. Molecular basis of plasma membrane H^+ -ATPase function and potential application in the agricultural production // *Plant Physiol. Biochem.* 2021. V. 168. P. 10-16.
25. Dobrikova A.G., Vladkova R.S., Rashkov G.D., Todinova S.J., Krumova S.B., Apostolova E.L. Effects of exogenous 24-epibrassinolide on the photosynthetic membranes under non-stress conditions // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 80. P. 75–82.
26. Egorov S.Y., Krasnovsky A.A. Participation of chlorophyll triplet state and singlet molecular oxygen in chlorophyll photodestruction // *Research in Photosynthesis. Proceedings of the IXth ICP.* Murata N., Ed. Kluwer Academic Press: Amsterdam. 1992. V. 3. P. 111–114.
27. El-Hendawy S., Al-Suhaibani N., Dewir Y.H., Elsayed S., Alotaibi M., Hassan W., Refay Y., Tahir M.U. Ability of modified spectral reflectance indices for estimating growth and photosynthetic efficiency of wheat under saline field conditions // *Agronomy.* 2019. V. 9. Article 35.
28. Evain S., Flexas J., Moya I. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence // *Remote Sens. Environ.* 2004. V. 91. P. 175–185.
29. Fahad, S.; Bajwa, A.A.; Nazir, U.; Anjum, S.A.; Farooq, A.; Zohaib, A.; Sadia, S.; Nasim, W.; Adkins, S.; Saud, S.; et al. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options // *Front. Plant Sci.* 2017, 8, 1147.
30. Falcioni R., Chicati M.L., de Oliveira R.B., Antunes W.C., Hasanuzzaman M., Demattê J.A.M., Nanni M.R. Decreased photosynthetic efficiency in *Nicotiana tabacum* L. under transient heat stress // *Plants.* 2024. V. 13. Article 395.
31. Falhof J., Pedersen J.T., Fuglsang A.T., Palmgren M. Plasma membrane H^+ -ATPase regulation in the center of plant physiology // *Mol. Plant.* 2016. V. 9. P. 323-337.
32. Farmer E.E., Gao Y.Q., Lenzoni G., Wolfender J.L., Wu Q. Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses // *New Phytol.* 2020. V. 227. P. 1037-1050.
33. Felle H.H., Zimmermann M.R. Systemic signalling in barley through action potentials // *Planta.* 2007. V. 226. P. 203-214.
34. Filek M., Kościelniak J. The effect of wounding the roots by high temperature on the respiration rate of the shoot and propagation of electric signal in horse bean seedlings (*Vicia faba* L. minor) // *Plant Sci.* 1997. V. 123. P. 39–46.
35. Franks P.J., Farquhar G.D. The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana* // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 935–942.
36. Fromm J. Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa* // *Physiol. Plant.* 1991. V. 83. P. 529–533.

37. Fromm J. Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa* // *Physiol Plant*. 1991. V. 83. P. 529–533.
38. Fromm J., Bauer T. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation // *J. Exp. Bot.* 1994. V. 45. P. 463–469.
39. Fromm J., Fei H. Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil // *Plant Sci.* 1998. V. 132. P. 203–213.
40. Fromm J., Hajirezaei M.R., Becker V.K., Lautner S. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. Article 239.
41. Fromm J., Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 249–257.
42. Furch A.C., Hafke J.B., Schulz A., van Bel A.J. Ca^{2+} -mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba* // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 2827–2838.
43. Furch A.C., Zimmermann M.R., Will T., Hafke J.B., van Bel A.J. Remote-controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima* // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 3697–3708.
44. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J. Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signaling // *Environ. Exp. Bot.* 2015. V. 114. P. 15–21.
45. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Ribas-Carbo M., Hanson D., Roesgen J., Fromm J. Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO_2 // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 542–552.
46. Gammaitoni L., Hanggi P., Jung P., Marchesoni F. Stochastic resonance // *Rev. Mod. Phys.* 1998. V. 70. P. 223–287.
47. Gamon J.A., Penuelas J., Field C.B. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency // *Remote Sens. Environ.* 1992. V. 41. P. 35–44.
48. Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels // *Oecologia*. 1997. V. 112. P. 492–501.
49. Garbalsky M.F., Peñuelas J., Gamon J., Inoue Y., Filella I. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies. A review and meta-analysis // *Remote Sens. Environ.* 2011. V. 115. P. 281–297.
50. Gitelson A.A. Novel technique for remote estimation of CO_2 flux in maize // *Geophys. Res. Lett.* 2003. V. 30. Article 1486.
51. Gitelson A.A., Kaufman Y.J., Stark R., Rundquist D. Novel algorithms for remote estimation of vegetation fraction // *Remote Sens. Environ.* 2002. V. 80. P. 76–87.
52. Grams T.E., Koziol C., Lautner S., Matyssek R., Fromm J. Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 79–84.
53. Grams T.E., Lautner S., Felle H.H., Matyssek R., Fromm J. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf // *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32. P. 319–326.
54. Gupta A., Rico-Medina A., Caño-Delgado A.I. The physiology of plant responses to drought // *Science*. 2020. V. 368. P. 266–269.
55. Hayashi Y., Takahashi K., Inoue S., Kinoshita T. Abscissic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H^+ -ATPase in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. P. 845–853.
56. Hedrich R., Salvador-Recatalà V., Dreyer I. Electrical wiring and long-distance plant communication // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. P. 376–387.
57. Hilleary R., Gilroy S. Systemic signaling in response to wounding and pathogens // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. V. 43. P. 57–62.

58. Hilleary R., Gilroy S. Systemic signaling in response to wounding and pathogens // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. V. 43. P. 57–62.
59. Hlavácková V., Krchnák P., Naus J., Novák O., Spundová M., Strnad M. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning // *Planta*. 2006. V. 225. P. 235–244.
60. Hlavinka J., Nožková-Hlaváčková V., Floková K., Novák O., Nauš J. Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient sitiens mutants and sitiens pre-treated by ABA // *Plant Physiol. Biochem.* 2012. V. 54. P. 89–96.
61. Huang W., Yang S.J., Zhang S.B., Zhang J.L., Cao K.F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection for the resurrection plant *Paraboea rufescens* under drought stress // *Planta*. 2012. V. 235. P. 819–828.
62. Huber A.E., Bauerle T.L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 2063–2079.
63. Inoue S.I., Kinoshita T. Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase // *Plant Physiol.* 2017. V. 174. P. 531–538.
64. Johnson G.N. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1807. P. 384–389.
65. Kaiser H., Grams T.E. Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica* // *J Exp Bot.* 2006. V. 57. P. 2087–2092.
66. Kapilan R., Vaziri M., Zwiazek J. J. Regulation of aquaporins in plants under stress // *Biol. Res.* 2018. V. 51. Article 4.
67. Katicheva L., Sukhov V., Akinchits E., Vodeneev V. Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. P. 1511–1519.
68. Kinoshita S.N., Kinoshita T. A win-win scenario for photosynthesis and the plasma membrane H⁺ pump // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. Article 982485.
69. Klughammer C., Schreiber U. Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PSI // *PAM Appl. Notes*. 2008. V. 1. P. 11–14.
70. Kollist H., Nuhkat M., Rob M., Roelfsema G. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement // *New Phytol.* 2014. V. 203. P. 44–62.
71. Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., Zlobin I.E., Kreslavski V.D., Murgan O.K., Kovtun I.S., Khripach V.A., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants // *Photosynth. Res.* 2020. V. 146. P. 151–163.
72. Kovar M., Brestic M., Sytar O., Barek V., Hauptvogel P., Zivcak M. Evaluation of hyperspectral reflectance parameters to assess the leaf water content in soybean // *Water*. 2019. V. 11. P. 443.
73. Koziol C., Grams T.E.E., Schreiber U., Matyssek R., Fromm J. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals // *New Phytol.* 2004. V. 161. P. 715–722.
74. Krupenina N.A., Bulychiev A.A. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1767. P. 781–788.
75. Kurepin, L.V., Ivanov A.G., Zaman M., Pharos R.P., Allakhverdiev S.I., Hurry V., Hüner N.P. Stress-related hormones and glycinebetaine interplay in protection of photosynthesis under abiotic stress conditions // *Photosynth. Res.* 2015. V. 126. P. 221–235.
76. Lautner S., Grams T.E.E., Matyssek R., Fromm J. Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 2200–2209.
77. Lautner S., Stummer M., Matyssek R., Fromm J., Grams T.E.E. Involvement of respiratory processes in the transient knockout of net CO₂ uptake in *Mimosa pudica* upon heat stimulation // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 254–260.

78. Liang X., Zhang X., Zhao L. Diversity-induced resonance for optimally suprathreshold signals // *Chaos*. 2020. V. 30. P. 103101.
79. Luu D.-Y., Maurel C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status // *Plant Cell Environ.* 2005. V. 28. P. 85-96.
80. Mancuso S. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera* // *Aust. J. Plant Physiol.* 1999. V. 26. P. 55–61.
81. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // *J.Exp. Bot.* 2000. V. 51. P. 659–668.
82. Minami A., Takahashi K., Inoue S.I., Tada Y., Kinoshita T. Brassinosteroid induces phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase during hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 935–944.
83. Miyake C., Miyata M., Shinzaki Y., Tomizawa K. CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves--relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 629-637.
84. Miyake C., Shinzaki Y., Miyata M., Tomizawa K. Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of Chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1426-1433.
85. Mott K.A. Effects of patchy stomatal closure on gas exchange measurements following abscisic acid treatment // *Plant Cell Environ.* 1995. V. 18. P. 1291–1300.
86. Mousavi S.A., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling // *Nature*. 2013. V. 500. P. 422–426.
87. Müller P., Li X. P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 1558-1566.
88. Nolan T.M., Vukašinović N., Liu D., Russinova E., Yin Y. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses // *Plant Cell*. 2020. V. 32. P. 295–318.
89. Pachú J.K.S., Macedo F.C.O., Malaquias J.B., Ramalho F.S., Oliveira R.F., Godoy W.A.C., Salustino A.S. Electrical signalling and plant response to herbivory: A short review // *Plant Signal Behav.* 2023.V.18. Article 2277578.
90. Palmgren M.G. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 817–845.
91. Pandey S., Divakar S., Singh A. Genome editing prospects for heat stress tolerance in cereal crops // *Plant Physiol. Biochem.* 2024. V. 215. Article 108989.
92. Pavlovič A., Slováková L., Pandolfi C., Mancuso S. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula Ellis*) // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 1991–2000.
93. Pedrós R., Moya I., Goulas Y., Jacquemoud S. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. P. 498-502.
94. Peña-Cortés H., Fisahn J., Willmitzer L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995. V. 92. P. 4106–4113.
95. Penuelas J., Pinol J., Ogaya R., Filella I. Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970) // *Int. J. Remote Sens.* 1997. V. 18. P. 2869–2875.
96. Peres A.L.G.L., Soares J.S., Tavares R.G., Righetto G., Zullo M.A.T., Mandava N.B., Menossi M. Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: A molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. Article 331.
97. Pottosin I., Shabala S. Transport across chloroplast membranes: Optimizing photosynthesis for adverse environmental conditions // *Mol. Plant*. 2016. V. 9. P. 356–370.

98. Roach T., Krieger-Liszkay A. Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2014. V. 15. P. 351–362.
99. Rothová O., Holá D., Kočová M., Tůmová L., Hnilička F., Hniličková H., Kamlar M., Macek T. 24-epibrassinolide and 20-hydroxyecdysone affect photosynthesis differently in maize and spinach // *Steroids*. 2014. V. 85. P. 44–57.
100. Ruban A.V. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage // *Plant Physiol.* 2016. V. 170. P. 1903–1916.
101. Rumeau D., Peltier G., Cournac L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 1041–1051.
102. Sadura I., Janeczko A. Brassinosteroids and the tolerance of cereals to low and high temperature stress: Photosynthesis and the physicochemical properties of cell membranes // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. Article 342.
103. Schreiber U., Klughammer C. New accessory for the DUAL-PAM-100: The P515/535 module and examples of its application // *PAM Appl. Notes*. 2008. V. 1. P. 1–10.
104. Schurr U., Walter A., Rascher U. Functional dynamics of plant growth and photosynthesis—from steady-state to dynamics—from homogeneity to heterogeneity // *Plant Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 340–352.
105. Shah J., Zeier J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. Article 30.
106. Sharkey T.D., Zhang R. High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. P. 712–722.
107. Shiina T., Tazawa M. Action potential in *Luffa cylindrica* and its effects on elongation growth // *Plant Cell Physiol.* 1986. V. 27. P. 1081–1089.
108. Sonoike K. Photoinhibition of photosystem I // *Physiol. Plant.* 2011. V. 142. P. 56–64.
109. Stahlberg R., Cleland R.E., van Volkenburgh E. Slow wave potentials - A propagating electrical signal unique to higher plants // *Communication in plants. neuronal aspects of plant life*. Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Eds. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; New York, NY, USA. 2006. P. 291–308.
110. Stahlberg R., Cosgrove D.J. Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum L* // *Planta*. 1996. V. 200. P. 416–425.
111. Stahlberg R., Cosgrove D.J. The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls // *Plant Physiol.* 1997. V. 113. P. 209–217.
112. Stanković B., Davies E. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato // *FEBS Lett.* 1996. V. 390. P. 275–279.
113. Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples // *Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation*. Yunus M., Pathre U., Mohanty P., Eds. Taylor and Francis: London, 2000. P. 445–483.
114. Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. Simulation of action potential propagation in plants // *J. Theor. Biol.* 2011. V. 291. P. 47–55.
115. Sukhov V., Vodeneev V. A mathematical model of action potential in cells of vascular plants // *J. Membrane Biol.* 2009. V. 232. P. 59–67.
116. Sukhov V., Akinchits E., Katicheva L., Vodeneev V. Simulation of variation potential in higher plant cells // *J. Membr. Biol.* 2013. V. 246. P. 287–296.
117. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. P. 2269–2276.
118. Szabó I., Spetea C. Impact of the ion transportome of chloroplasts on the optimization of photosynthesis // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 3115–3128.
119. Sze H., Li X., Palmgren M.G. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 677–690.

120. Szechyńska-Hebda M., Lewandowska M., Witoń D., Fichman Y., Mittler R., Karpiński S.M. Aboveground plant-to-plant electrical signaling mediates network acquired acclimation // *Plant Cell*. 2022. V. 34. P. 3047-3065.
121. Szechyńska-Hebda M., Lewandowska M., Karpiński S. Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. Article 684.
122. Szechyńska-Hebda M., Kruk J., Górecka M., Karpińska B., Karpiński S. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 2201–2218.
123. Tessone C.J., Mirasso C.R., Toral R., Gunton J.D. Diversity-induced resonance // *Phys. Rev. Lett.* 2006. V. 97. Article 194101.
124. Tholen D., Zhu X.-G. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 90-105.
125. Tikhonov A.N. pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts // *Photosynth. Res.* 2013. V. 116. P. 511-534.
126. Tikhonov A.N. The cytochrome b₆ complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 81. P. 163-183.
127. Tikkanen M., Aro E.M. Integrative regulatory network of plant thylakoid energy transduction // *Trends Plant Sci.* 2014. V. 19. P. 10–17.
128. Tikkanen M., Mekala N.R., Aro E.M. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1837. P. 210–215.
129. Trebacz K., Dziubinska H., Krol E. Electrical signals in long-distance communication in plants // *Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life*. Baluška, F., Mancuso, S., Volkmann, D., Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2006. P. 277-290.
130. Tsujimoto K., Hikosaka K. Estimating leaf photosynthesis of C₃ plants grown under different environments from pigment index, photochemical reflectance index, and chlorophyll fluorescence // *Photosynth Res.* 2021. V. 148. P. 33-46.
131. Uehlein N., Otto B., Hanson D.T., Fischer M., McDowell N., Kaldenhoff R. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability // *Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 648-657.
132. van Bel A.J., Furch A.C., Will T., Buxa S.V., Musetti R., Hafke J.B. Spread the news: Systemic dissemination and local impact of Ca²⁺ signals along the phloem pathway // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 1761–1787.
133. von Caemmerer S. Steady-state models of photosynthesis // *Plant Cell Environ.* 2013, 36, 1617–1630.
134. von Caemmerer S., Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves // *Planta*. 1981. V. 153. P. 376–387.
135. von Caemmerer S., Farquhar G., Berry J. Biochemical model of C₃ photosynthesis // *Photosynthesis in silico: Advances in photosynthesis and respiration*. Laisk A., Nedbal L., Govindjee, Eds. Springer: Dordrecht, The Netherlands. 2009. V. 29. P. 209–230.
136. Vuralhan-Eckert J., Lautner S., Fromm J. Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants // *J. Plant Physiol.* 2018. V. 223. P. 32–36.
137. Wang C., Hu H., Qin X., Zeise B., Xu D., Rappel W.J., Boron W.F, Schroeder J.I. Reconstitution of CO₂ regulation of SLAC1 anion channel and function of CO₂-permeable PIP_{2,1} aquaporin as CARBONIC ANHYDRASE₄ interactor // *Plant Cell*. 2016. V. 28. P. 568-582.
138. Wang C., Yamamoto H., Shikanai T. Role of cyclic electron transport around photosystem I in regulating proton motive force // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1847. P. 931–938.
139. Wellens T., Shatokhin V., Buchleitner A. Stochastic resonance // *Rep. Prog. Phys.* 2004. V. 67. P. 45–105.

140. Widjaja Putra T.B., Soni P. Enhanced broadband greenness in assessing chlorophyll a and b, carotenoid, and nitrogen in Robusta coffee plantations using a digital camera // *Precis. Agric.* 2018. V. 19. P. 238–256.
141. Wildon D.C., Thain J.F., Minchin P.E.H., Gubb I.R., Reilly A.J., Skipper Y.D., Doherty H.M., O'Donnell P.J., Bowles D. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor Induction in the wounded plant // *Nature*. 1992. V. 360. P. 62–65.
142. Wilkinson S., Kudoyarova G.R., Veselov D.S., Arkhipova T.N., Davies W.J. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 3499–3509.
143. Witthöft J., Caesar K., Elgass K., Huppenberger P., Kilian J., Schleifenbaum F., Oecking C., Harter K. The activation of the *Arabidopsis* P-ATPase 1 by the brassinosteroid receptor BRI1 is independent of threonine 948 phosphorylation // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6. P. 1063–1066.
144. Wolosiuk R.A., Ballicora M.A., Hagelin K. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation // *FASEB J.* 1993. V. 7. P. 622–637.
145. Wong C.Y., Gamon J.A. Three causes of variation in the photochemical reflectance index (PRI) in evergreen conifers // *New Phytol.* 2015. V. 206. P. 187–195.
146. Xue J., Su B. Significant remote sensing vegetation indices: A review of developments and applications // *J. Sens.* 2017. V. 2017. P. 2–17.
147. Yao Q., Li P., Wang X., Liao S., Wang P., Huang S. Molecular mechanisms underlying the negative effects of transient heatwaves on crop fertility // *Plant Commun.* 2024. V. 5. Article 101009.
148. Yin G., Verger A., Descals A., Filella I., Peñuelas J. A broadband green-red vegetation index for monitoring gross primary production phenology // *J. Remote Sens.* 2022. V. 2022. Article 9764982.
149. Yu Q., Tang C., Kuo J. A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants // *Plant Soil.* 2000. V. 219. P. 29–40.
150. Yu J.Q., Huang L.F., Hu W.H., Zhou Y.H., Mao W.H., Ye S.F., Nogués S. A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus* // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 1135–1143.
151. Zandalinas S.I., Fichman Y., Devireddy A.R., Sengupta S., Azad R.K., Mittler R. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020a. V. 117. P. 13810–13820.
152. Zandalinas S.I., Fichman Y., Mittler R. Vascular bundles mediate systemic reactive oxygen signaling during light stress // *Plant Cell.* 2020b. V. 32. P. 3425–3435.
153. Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom // *Steroids.* 2015. V. 97. P. 87–97.
154. Zhang C., Filella I., Garbulsky M.F., Peñuelas J. Affecting factors and recent improvements of the photochemical reflectance index (PRI) for remotely sensing foliar, canopy and ecosystemic radiation-use efficiencies // *Remote Sens.* 2016. V. 8. Article 677.
155. Zhou J.Y., Hao D.L., Yang G.Z. Regulation of Cytosolic pH: The contributions of plant plasma membrane H⁺-ATPases and multiple transporters // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Article 12998.
156. Zimmermann M.R., Felle H.H. Dissection of heat-induced systemic signals: Superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities // *Planta.* 2009. V. 229. P. 539–547.
157. Zimmermann M.R., Mithöfer A., Will T., Felle H.H., Furch A.C. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: Candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification // *Plant Physiol.* 2016. V. 170. P. 2407–2419.
158. Zivcak M., Brestic M., Balatova Z., Drevenakova P., Olsovska K., Kalaji H.M., Yang X., Allakhverdiev S.I. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress // *Photosynth. Res.* 2013. V. 117. P. 529–546.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю огромную благодарность моим коллегам с кафедры биофизики Нижегородского университета, без которых эта работа бы не состоялась.

Особо хотелось бы поблагодарить Владимира Анатольевича Воденеева – за ценные обсуждения, помощь и многолетнее настойчивое убеждение написать эту работу, Любовь Михайловну Юдину – за умение организовать и проконтролировать проведение сложнейших экспериментов, Елену Константиновну Акинчиц – за незаменимую помощь в работе с документами.

Я благодарю О.Н. Шерстневу, Е.Н. Громову, Ю.А. Золина, А.Ю. Попову, К.В. Гребневу, К.Р. Абашеву, Е.А. Козлову и др. за активное участие в исследованиях.

Отдельно, хочу поблагодарить Екатерину Михайловну Сухову за сотрудничество и поддержку во всех направлениях исследований и жизни...