

На правах рукописи



ПЕЧЁРИНА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**Индукцированные засолением дистанционные сигналы и их
роль в изменении активности фотосинтеза у картофеля**

1.5.2 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2025

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

**Научный
руководитель:**

Воденеев Владимир Анатольевич,

доктор биологических наук, доцент,
заведующий кафедрой биофизики Института биологии и
биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского

**Официальные
оппоненты:**

Медведев Сергей Семенович,

доктор биологических наук, профессор, заведующий
кафедрой физиологии и биохимии растений биологического
факультета Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Санкт-
Петербургский государственный университет»

Кулуев Булат Разяпович,

доктор биологических наук, заведующий лабораторией
геномики растений Института биохимии и генетики –
обособленного структурного подразделения Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 5 марта 2026 года в 15:00 часов на заседании
диссертационного совета Д 24.2.340.06 при Национальном исследовательском
Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу:
603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского
государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте:
https://diss.unn.ru/files/2025/1610/diss-Pecherina_-1610.pdf.

Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Черкасова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Засоление является одним из важнейших стрессовых абиотических воздействий для сельского хозяйства. Засоление вызывается как изменением климата, так и антропогенными причинами – главным образом, неправильным землепользованием и использованием солёных вод при недостатке пресной воды (Cheng et al., 2021; Gao et al., 2021; Mukhopadhyay et al., 2021). В результате, количество засоленных земель увеличивается с быстрой скоростью – до 1,5 млн га в год (Hossain, 2019). У культурных растений потеря урожайности при действии засоления может возрасти до 70% (Atta et al., 2023).

Засоление негативно влияет на морфологические параметры растения – уменьшается длина корней и нарушается их развитие (Saddiq et al., 2021; Bohle et al., 2024; Yun et al., 2024), снижается сырая (Abdel-Farid et al., 2020; Nefissi Ouertani et al., 2021; Khalilova et al., 2023) и сухая (Abdel-Farid et al., 2020; Saddiq et al., 2021) масса побега. Засоление приводит к ограничению водной проводимости (Lu, Fricke, 2023), подавлению активности фотосинтеза (Pan et al., 2021), падению синтеза углеводов и белков (Zörb et al., 2019), что приводит совместно с морфологическими нарушениями к снижению количества и качества урожая (Atta et al., 2023; Ahmed et al., 2024). Урожайность тесно связана с фотосинтетическими процессами (Zahra et al., 2022), поэтому изучению влияния засоления на фотосинтез уделяется много внимания (Chaves et al., 2009; Acosta-Motos et al., 2017; Wungrampha et al., 2018; Pan et al., 2021). Активность фотосинтеза подавляется во время засоления из-за ограничения устьичной проводимости (Hussain et al., 2021b) и токсичности накопленного Na^+ (Pan et al., 2021), приводящих к снижению активности ферментов цикла Кальвина-Бенсона (Aharon et al., 2003; Hussain et al., 2021b), подавлению системы защиты от избыточного освещения (Tsai et al., 2019; Zahra et al., 2022), падению содержания хлорофиллов (ElSayed et al., 2021) и ингибированию синтеза хлоропластных белков (Takahashi, Murata, 2005).

Засоление является комплексным стрессирующим воздействием, включающим ионный, осмотический и окислительный компоненты, причём последний является следствием первых двух (Liang et al., 2018; Wang et al., 2022; Hualpa-Ramirez et al., 2024). Ионный компонент определяется как поступление в клетку Na^+ и Cl^- , а осмотический – как снижение этими ионами осмотического потенциала среды вне клетки; оба

компонента активируют различные сигнальные системы в клетках и формируют исходящие из корня в побег сигналы, способные модулировать в побеге активность различных процессов (Pan et al., 2021).

У растений описаны дистанционные сигналы химической, электрической и гидравлической природы, которые могут активировать другие сигнальные системы внутри клетки и в системных тканях, как, например, Ca^{2+} -волны и АФК-волны (распространение повышения уровня активных форм кислорода) (Li et al., 2021). Экспериментально в ответ на засоление были зарегистрированы Ca^{2+} -волны (Choi et al., 2014; Graus et al., 2022; Allan et al., 2023), повышение уровня АФК (Monetti et al., 2014; Lim et al., 2019), изменение pH (Geilfus, Mühling, 2011; Geilfus, Mühling, 2014), увеличение концентрации сигнальных липидов (Darwish et al., 2009; Li et al., 2019), гидравлические сигналы (Kholodova et al., 2006; Katsuhara et al., 2011), изменение электрического потенциала (Bose et al., 2014; Graus et al., 2022). Однако подавляющее большинство работ выполнено на корнях или на культуре клеток, и недостаточно известно о сигналах, вызванных засолением, в побеге.

Влияние вызванных засолением дистанционных сигналов на активность фотосинтеза не исследовано, однако вызванные другими стимулами дистанционные сигналы могут изменять активность фотосинтеза (Sukhov, 2016; Szechyńska-Hebda et al., 2017; Sukhova et al., 2023). Кроме этого, исследования активности фотосинтеза проводят чаще всего спустя длительное время после начала засоления и связывают с ограничением устьичной проводимости, наступившим окислительным стрессом или изменением экспрессии генов (Kalaji et al., 2011; Mittal et al., 2012; Zhang et al., 2018). Ранние изменения активности фотосинтеза были исследованы в единичных работах, например, Martínez-Peñalver et al., 2012. Такие исследования раскрывают то, какие внутренние процессы могут влиять на ранние изменения активности фотосинтеза и может ли это влиять на чувствительность или формирование устойчивости к засолению у растения.

Изменение активности фотосинтеза и распространение сигналов при засолении практически не исследуется одновременно. Применение систем непрерывной регистрации флуоресценции хлорофилла для исследования активности фотосинтеза и использование растений с генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами для анализа сигнальных молекул с помощью систем флуоресцентного имиджинга могут

помочь наиболее полно исследовать влияние распространяющихся из корня сигналов на активность фотосинтеза.

Цель и задачи исследования

Целью работы является анализ роли распространяющихся из корня в побег дистанционных сигналов в ранних изменениях активности фотосинтеза, вызванных засолением.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Создание растений картофеля с генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами, чувствительными к концентрации H^+ , Ca^{2+} и H_2O_2 ;
2. Изучение влияния засоления на динамику активности фотосинтеза;
3. Изучение роли накопления Na^+ и ограничения устьичной проводимости в изменении активности фотосинтеза;
4. Выявление сигналов в побеге, вызванных действием NaCl на корни;
5. Определение роли вызванных NaCl дистанционных сигналов в изменении активности фотосинтеза;
6. Выявление роли ионного и осмотического компонентов засоления в индукции распространяющейся в побег Ca^{2+} -волны.

Научная новизна

Для изучения изменения уровня pH, Ca^{2+} и H_2O_2 и впервые были созданы растения картофеля с генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами (ГКС) Pt-GFP, Case12 и HyPer7 соответственно. Впервые показано, что изменение активности фотосинтеза при обработке корней NaCl развивается в несколько фаз, наиболее ранняя из которых возникает через 10-20 минут после обработки. Показано, что индуцированный ионами Na^+ распространяющийся Ca^{2+} -сигнал играет важную роль в раннем снижении активности фотосинтеза.

Научно-практическая значимость

Полученные знания дополняют теоретические представления о механизмах изменения активности фотосинтеза на ранних стадиях засоления. Также полученные знания и исследованные подходы могут быть применены в отборе и создании устойчивых к засолению растений. Основные выводы и результаты работы могут быть использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

Обработка корней NaCl вызывает снижение активности фотосинтеза, развивающееся в три последовательные фазы. Первая фаза снижения активности фотосинтеза предшествует накоплению Na^+ в листе и снижению устьичной проводимости и вызывается исходящим из корня в побег Ca^{2+} -сигналом, который индуцируется в корне, главным образом, ионным компонентом засоления.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в планировании и проведении экспериментальных исследований, обработке полученных данных, анализе и обсуждении результатов, публикации полученных результатов в виде статей в научных журналах и представлении результатов исследований на научных конференциях.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается их воспроизводимостью, обусловлена надёжностью применяемых экспериментальных методов исследования, а также согласованностью полученных данных с результатами исследований других авторов.

Апробация работы

Основные результаты работы представлялись на международных и всероссийских мероприятиях: Всероссийская конференция «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» (Нижний Новгород, 2024), International Conference on Plant Biology and Biotechnology (Казахстан, Алматы, 2024), Всероссийская школа-конференция молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2024, 2023, 2022, 2021, 2020, 2019, 2018), IV Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 45-летию кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики ИГУ (Иркутск, 2023), Всероссийская научная конференция «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» (Уфа, 2023), Всероссийская научная конференция «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий» (Нижний Новгород, 2022), PLAMIC2022 (Санкт-Петербург, 2022), Пущинская школа-конференция молодых учёных с международным участием "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2022, 2019), Всероссийская научная конференция "Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее" (Москва, 2021), V российский симпозиум «Клеточная сигнализация:

итоги и перспективы» (Казань, 2021), IV международная научная конференция "Наука будущего" (Москва, 2021), XXXI зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2019), Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2018» (Москва, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 19 работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК.

Структура и объём диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Объём составляет 156 страниц машинописного текста, иллюстрированного 34 рисунками и содержащего 3 таблицы. Список литературы включает 479 источника.

Благодарности

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-14-00388-П.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвящённый влиянию засоления на морфологические параметры и продуктивность растений, на активность фотосинтеза и локальные и распространяющихся на дальние расстояния сигналы.

В **главе 2** описаны использованные в работе объекты и методы исследования.

Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский (Северо-Западный НИИСХ, СССР) культивировали в условиях *in vitro* на питательной среде MS (Murashige, Scoog, 1962), содержащей 30 г/л сахарозы и 7 г/л агара, в стеклянных пробирках в культуральной комнате с температурой 24°C и освещением люминесцентными лампами (OSRAM, Германия) с фотопериодом 16/8 часов свет/темнота и интенсивностью освещённости 60 мкмоль/м²с. Растения возрастом 4 недели адаптировали в течение 1 недели в банках со стандартным раствором (СР: 1 мМ NaCl, 0,1 мМ KCl, 0,1 мМ CaCl₂). Такие растения, находящиеся в гидропонных условиях, составляли первую экспериментальную группу (далее – микрорастения). Вторая экспериментальная группа состояла из растений, выращиваемых в почве, с типично развитыми побегами: для этого растения после гидропонных условий

пересаживали в горшки с грунтом с содержанием Na^+ 20 ммоль/кг сухого веса почвы и выращивали до получения клубней, клубни сажали в почву того же состава и растения доращивали 7-8 недель до побегов с 4-5 взрослыми листьями.

Засоление создавали в нескольких вариантах: у растений, выращиваемых в почве, добавляли раствор 400 mM NaCl, что приводило к увеличению содержания Na^+ в почве до 150 ммоль/кг сухого веса почвы, а у микрорастений увеличивали концентрацию NaCl в омывающем корни растворе до 200 mM.

Активность фотосинтеза определяли путём регистрации динамики флуоресценции хлорофилла фотосистемы II в импульсно модулированном режиме на установках IMAGING-PAM M-Series (Heinz Walz GmbH, Германия) и PlantExplorerPro+ (PhenoVation, Нидерланды). Были измерены следующие параметры: максимальный квантовый выход фотосистемы II (F_v/F_m), квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II (Φ_{PSII}) и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ).

Изменение интенсивности транспирации листьев оценивали с помощью индекса водного стресса растений CWSI, который рассчитывался как (Jackson et al., 1981; Zhou et al., 2021):

$$\text{CWSI} = (T_{\text{сухой}} - T) / (T_{\text{сухой}} - T_{\text{влажный}}),$$

где T – температура поверхности листа, $T_{\text{сухой}}$ – температура сухого стандарта, $T_{\text{влажный}}$ – температура влажного стандарта. Для расчёта CWSI получали изображения температуры листа, сухого и влажного стандартов с помощью тепловизора Testo 885 (Testo, Германия).

Растения картофеля, экспрессирующие гены pH-чувствительного сенсора Pt-GFP, Ca^{2+} -чувствительного сенсора Case12 или H_2O_2 -чувствительного сенсора HyPer7, получали методом генетической трансформации с помощью агробактерий (*Agrobacterium tumefaciens*) штамма AGL0 с бинарными векторами pART27-ptGFP (NanoLight Technology, США), pH7WG2-Case12 (Invitrogen, США; Евроген, Россия) или pART27-HyPer7 (NanoLight Technology, США; Евроген, Россия) соответственно. Селекцию проводили на среде MS с добавлением 100 мг/л канамицина (трансформация генами Pt-GFP и HyPer7) или 20 мг/л гигромицина В (трансформация геном Case12). У регенерировавших побегов (регенерантов) проверяли наличие вставки целевых генов с помощью ПЦР с электрофорезом в агарозном геле полученных ПЦР-продуктов генов ГКС. Также флуоресценцию регенерантов анализировали на конфокальном лазерном

сканирующем микроскопе LSM710 (Carl Zeiss, Германия).

Изменение уровня сигнальных молекул и натрия регистрировали с помощью флуоресцентных сенсоров. В цитозоле определяли изменение уровня pH по изменению флуоресценции ГКС Pt-GFP, концентрации Ca^{2+} – ГКС Case12 и зонда Fluo4 AM (Molecular Probes, США), уровня H_2O_2 – ГКС HyPer7 и концентрации Na^+ – зонда CoroNa Green AM (Thermo Fisher Scientific, США). Растворы зондов загружали в растения методом вакуумной инфльтрации. Флуоресценцию сенсоров и зондов визуализировали с помощью LSM710 (Carl Zeiss, Германия), DVS-03 (Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт» Москва, Россия) или PlantExplorerPro+ (PhenoVation, Нидерланды).

Внеклеточные электрические потенциалы измеряли с помощью Ag^+/AgCl электродов ЭВЛ-1М3 (Гомельский завод измерительных приборов, Белоруссия), заполненных 3М KCl и высокоомного усилителя ИПЛ-113 (Семико, Россия), соединённого с компьютером.

Изменение толщины стебля определяли с помощью системы, включающей лазерный дистанционный сенсор (SICK, Германия), блок оценки данных AOD1 (SICK, Германия) и аналого-цифровых преобразователей.

Хлорид лантана (1 mM LaCl_3) применяли в качестве ингибитора Ca^{2+} -проницаемых каналов. Его раствор был приготовлен на СР, с ним растение инкубировали в течение двух часов.

Содержание Na^+ в листьях и почве определяли с помощью селективного макроэлектрода ЭЛИС-112 Na (НПО «Измерительные технологии», Россия). Для этого образцы высушивали и измельчали, стандартную навеску растворяли в стандартном объёме дистиллированной воды.

Каждая серия экспериментов состояла не менее чем из 5 повторностей. В результатах представлены типичные записи отдельных измерений, средние значения, ошибки среднего, которые отображены в форме планок погрешностей. Анализируемые данные соответствовали нормальному распределению. Значимость различий определялась с помощью t-теста Стьюдента с использованием программы GraphPad Prism 8. Уровень статистической значимости был установлен при $p < 0,05$.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Получение растений с генетически кодируемыми сенсорами

В результате агробактериальной трансформации и последующей селекции при регенерации из эксплантов были получены побеги картофеля. Вставку генов Pt-GFP, Case12 и HyPer7 устанавливали с помощью ПЦР (рис. 1А, 3А, 4А), в результате чего было определено, что 18, 5 и 19 растений соответственно имели такую вставку. Затем флуоресцентный сигнал целевых белков у всех трансформантов (регенерантов, у которых был доказан факт вставки гена) был проверен с помощью конфокальной микроскопии: получали флуоресцентные изображения клеток листьев картофеля (рис. 1Б, 3Б, 4Б) и спектры флуоресценции (рис. 1В, 3В, 4В).

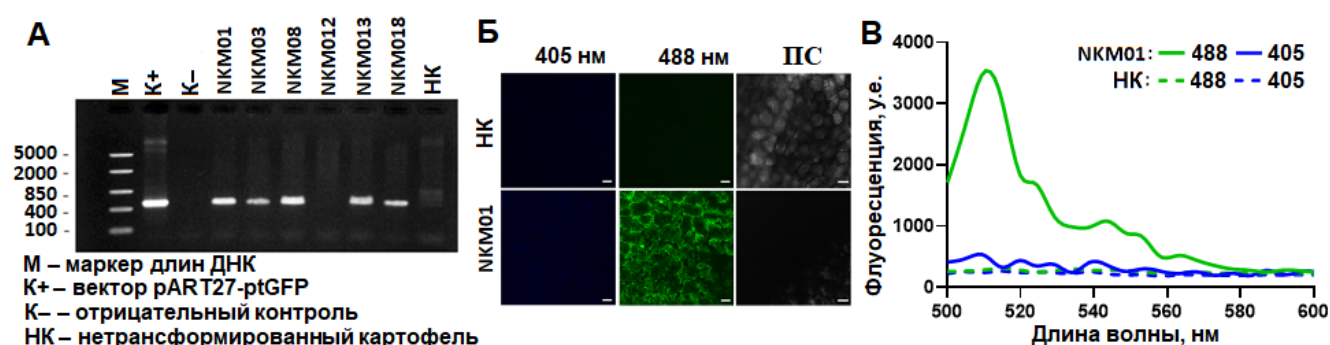


Рисунок 1. Характеристика созданных растений картофеля с сенсором Pt-GFP:

А – Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР гена PtGFP из различных трансформантов (NKM01-NKM18); Б – Флуоресцентные изображения адаксиальной стороны листа растения линии NKM01 и HK (при $\lambda_{ex}=405$ нм, $\lambda_{ex}=488$ нм); также представлены тканевые структуры ткани в проходящем свете (ПС); бар 20 мкм; В – Спектры флуоресценции клеток стебля растения линии NKM01 и HK

Флуоресцентный сигнал в клетках трансформированных растений был локализован в цитозоле и ядре (рис. 1Б, 3Б, 4Б), что типично для сенсоров без направляющей последовательности (Luther et al., 2022). Трансгенные линии для дальнейшей работы отбирали по уровню яркости сигнала: для Pt-GFP – линия NKM01, для Case12 – линия C1(2)3, для HyPer7 – линия HP11.

Для перевода флуоресцентного сигнала ратиометрического сенсора Pt-GFP в значения pH растения обрабатывали буферами с различным pH и протонофором карбонилцианид 3-хлорфенилгидразом (125 мкМ) и получали калибровочные зависимости отношения флуоресценции Pt-GFP при возбуждении разными длинами волн от pH, что позволило в дальнейшем определить значения pH. Далее определяли возможность регистрации изменения pH цитозоля с помощью созданных модельных растений. В ходе исследования определялось изменение pH цитозоля и электрических потенциалов в нераздражаемых областях при локальном нагреве кончика листа до 52°C

(рис. 2). Происходило снижение pH цитозоля на 0,2 в нераздражаемой области O1 и на 0,1 в области O2 (рис. 2) и прохождение волны кратковременной деполяризации с амплитудой до 50 мВ. Такие изменения pH цитозоля и электрических потенциалов являются типичными для данного воздействия и были ранее зарегистрированы у растений пшеницы (Surova et al., 2016; Mudrilov et al., 2021; Mudrilov et al., 2024) и табака (Grinberg et al., 2023).

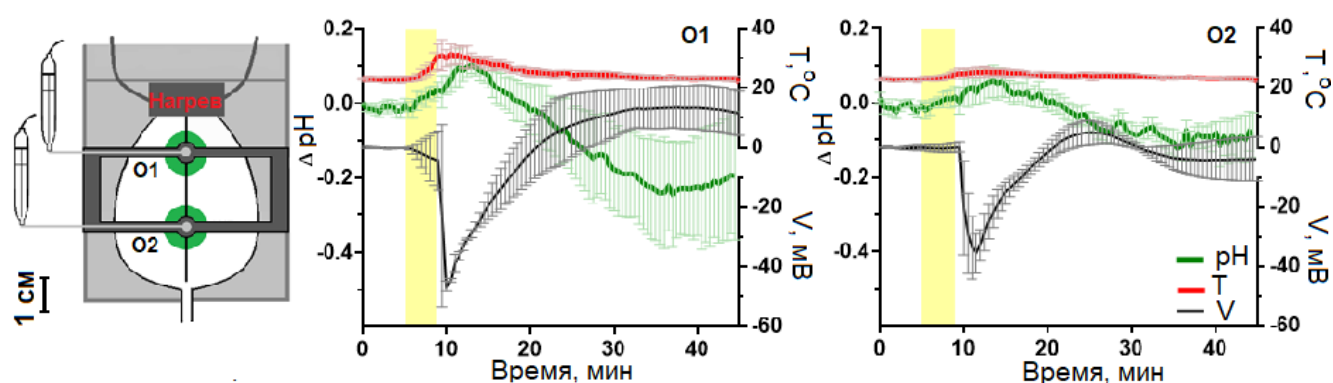


Рисунок 2. Вызванные локальным нагревом кончика листа изменения pH цитозоля и электрических потенциалов (V) в нераздражаемых областях O1 и O2. Представлены также изменения температуры поверхности листа (T). Жёлтым прямоугольником выделено время нагрева

Возможность регистрации изменения уровня Ca^{2+} с помощью Case12, экспрессируемого в растениях картофеля, была продемонстрирована с использованием локального стимула – ожога листа растения линии С1(2)3 открытым пламенем. Для такого воздействия ранее было описано распространяющееся временное повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} (Ca^{2+} -волна) (Furch et al., 2009; Jakšová et al., 2021). Ожог листа вызывал переходное увеличение интенсивности флуоресценции сенсора, свидетельствующее о распространении Ca^{2+} -волны по стеблю и в нераздражённые листья (рис. 3Г), схожее с ранее полученными результатами (Furch et al., 2009; Jakšová et al., 2021). После быстрого увеличения флуоресценции сенсора происходило резкое её падение, которое наблюдалось вследствие различных воздействий в других исследованиях (Bose et al., 2011; Jakšová et al., 2021; Alcon, Xiong, 2023), что могло быть связано как с фотовыгоранием флуоресцентного сенсора (Scheenen et al., 1996; Czymmek et al., 2025), так и с быстрым удалением Ca^{2+} из цитозоля до концентраций ниже константы диссоциации сенсора (van der Linden et al., 2025).

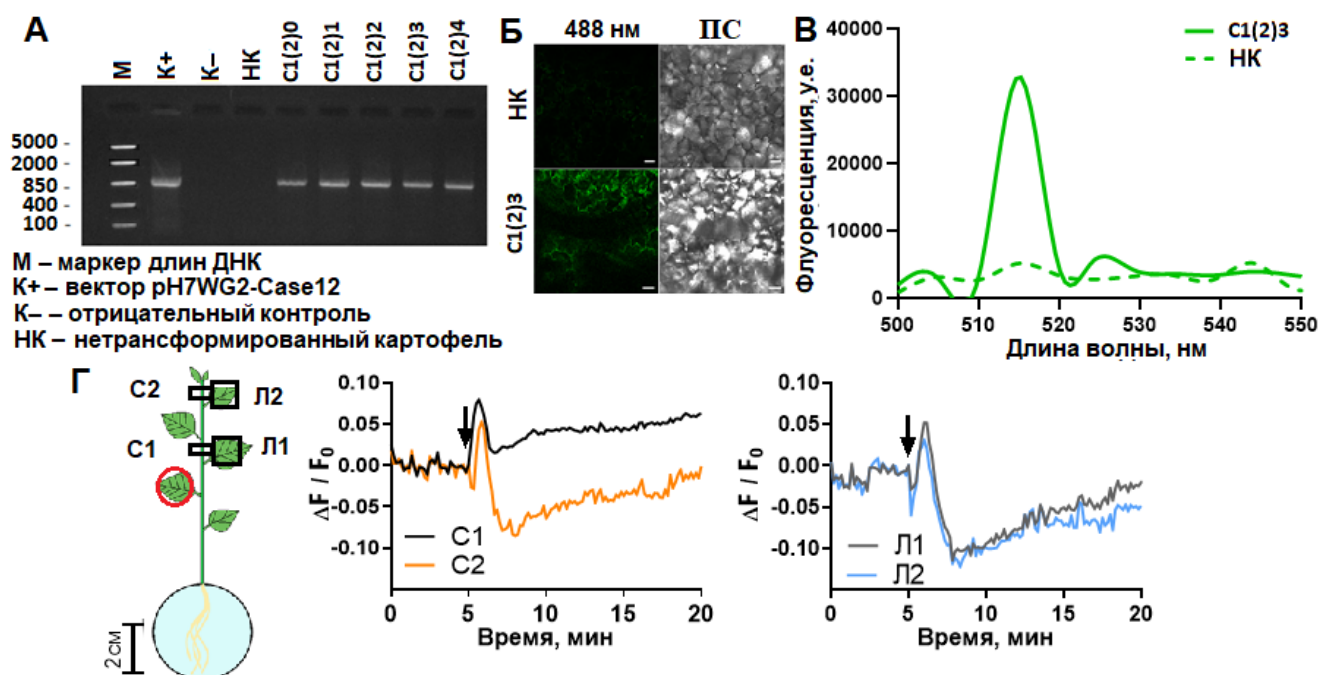


Рисунок 3. Характеристика созданных растений картофеля с сенсором Case12:

А – Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР гена Case12 из различных трансформантов (C1(2)0-C1(2)4); Б – Флуоресцентные изображения адаксиальной стороны листа растения линии C1(2)3 и НК при $\lambda_{ex}=488$ нм; также представлены структуры ткани в проходящем свете (ПС); бар 20 мкм; В – Спектры флуоресценции сенсора Case12 в клетках листа растения линии C1(2)3 и НК; Г – $\Delta F/F_0$ (F – принимаемый при 535 нм сигнал при $\lambda_{ex}=490$ нм) Case12 у C1(2)3 в стебле и листьях при ожоге листа (показан красной окружностью); стрелкой указан момент нанесения воздействия

Регистрацию повышения уровня активных форм кислорода (АФК-сигнал) проводили с помощью созданных растений с H_2O_2 -чувствительным сенсором HyPer7. Сенсор HyPer7 является ратиометрическим, как и Pt-GFP, поэтому получаемый сигнал об изменении концентрации H_2O_2 представлен в виде соотношения флуоресценции сенсора при возбуждении светом с двумя длинами волн (395 и 490 нм). Соотношение флуоресценции HyPer7 повышается при его связывании с H_2O_2 , поэтому для проверки его функционирования в растении использовали обработку раствором 10% H_2O_2 листа (рис. 4Г, Д) или корней (рис. 4Е). Ранее для растений арабидопсиса (Haber et al., 2021) и картофеля (Hirsch et al., 2021) уже применяли высокие концентрации H_2O_2 (0,5-1 М) для проверки функционирования редокс-чувствительного флуоресцентного сенсора. В ответ на эту обработку наблюдалось повышение отношения флуоресценции HyPer7 в месте воздействия.

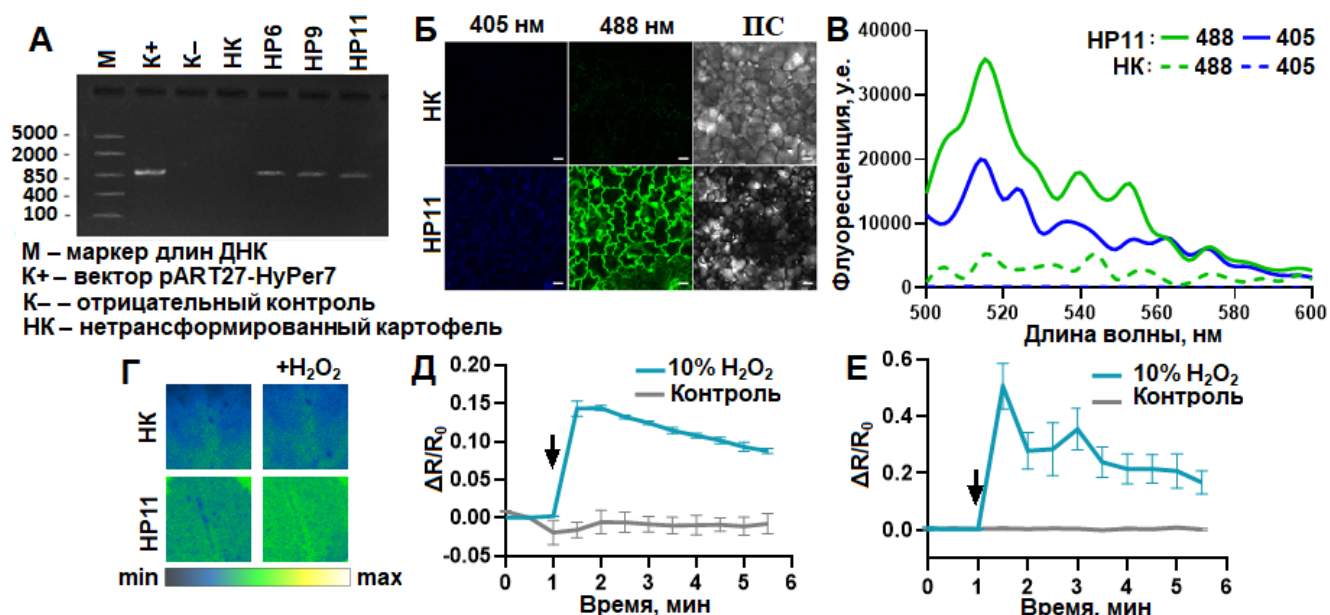


Рисунок 4. Характеристика созданных растений картофеля с сенсором HyPer7:

А – Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР гена HyPer7 из различных трансформантов (HP6, HP9, HP11); Б – Флуоресцентные изображения адаксиальной стороны листа растения линии HP11 и HK (при $\lambda_{ex}=405$ нм, $\lambda_{ex}=488$ нм); также представлены структуры ткани в проходящем свете (ПС); бар 20 мкм; В – Спектры флуоресценции сенсора HyPer7 в клетках листа растения линии HP11 и HK; Г – Псевдоцветные изображения отношения флуоресценции ($\Delta R/R_0$, где R – сигнал, представленный в виде соотношения флуоресценции сенсора при $\lambda_{ex}=395$ и $\lambda_{ex}=490$ нм, принимаемой при 535 нм) листьев при обработке H₂O₂ у HP11 и HK; Д – Реакция на обработку листа 10% H₂O₂ с 0,05% Сильвет 408; Е – Обработка корней 10% H₂O₂. Стрелкой указан момент обработки

Выполненный анализ продемонстрировал возможность регистрации изменения концентрации H⁺, Ca²⁺ и H₂O₂ в цитозоле с помощью созданных растений картофеля с соответствующими генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами.

Изменение активности фотосинтеза, вызванное засолением

Влияние обработки NaCl на параметры флуоресценции хлорофилла, отражающие активность фотосинтеза, (F_v/F_m , Φ_{PSII} и NPQ) определяли у растений, выращенных в почве (рис. 5), и микрорастений (рис. 6).

У растений, выращиваемых в грунте, обработка раствором NaCl вызывала снижение F_v/F_m и Φ_{PSII} и повышение NPQ, что отражает снижение активности фотосинтеза. Статистически значимые различия наступали через 56 часов для F_v/F_m , 10 – для Φ_{PSII} и 8 – для NPQ (рис. 5). Максимальная амплитуда изменения составляла 0,1 для F_v/F_m , 0,38 для Φ_{PSII} и 1,4 для NPQ. Стоит отметить, что снижение активности фотосинтеза происходило немонотонно: можно выделить две последовательные фазы,

которые особенно хорошо заметны у динамики повышения NPQ.

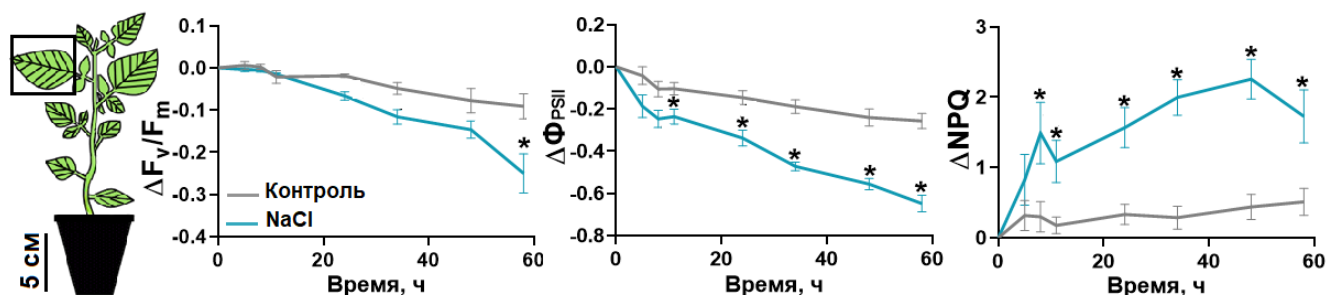


Рисунок 5. Влияние почвенной обработки NaCl на параметры флуоресценции хлорофилла в листьях растений картофеля. Прямоугольником выделен исследованный лист. Представлены изменения F_v/F_m , Φ_{PSII} и NPQ.

* – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$

Приведённые выше изменения параметров флуоресценции хлорофилла согласуются с описанными в литературе изменениями: при засолении Φ_{PSII} , в основном, снижается (Mittal et al., 2012; Liu et al., 2023), NPQ повышается (Yan et al., 2015; Zhang et al., 2018;) или не изменяется (Martínez-Peñalver et al., 2012), а F_v/F_m снижается (Sun et al., 2016; Nnilickova et al., 2021) или не изменяется (Zhang et al., 2018; Cerqueira et al., 2019).

У микрорастений также после обработки NaCl происходило изменение параметров флуоресценции хлорофилла, которое отражает снижение активности фотосинтеза. Регистрация этих параметров с частотой один раз в час показала, что происходило падение Φ_{PSII} и повышение NPQ через 1 час, а также снижение F_v/F_m через 5 часов (рис. 6). В этом случае активность фотосинтеза также падала в две последовательные фазы, которые хорошо заметны в изменениях Φ_{PSII} и NPQ.

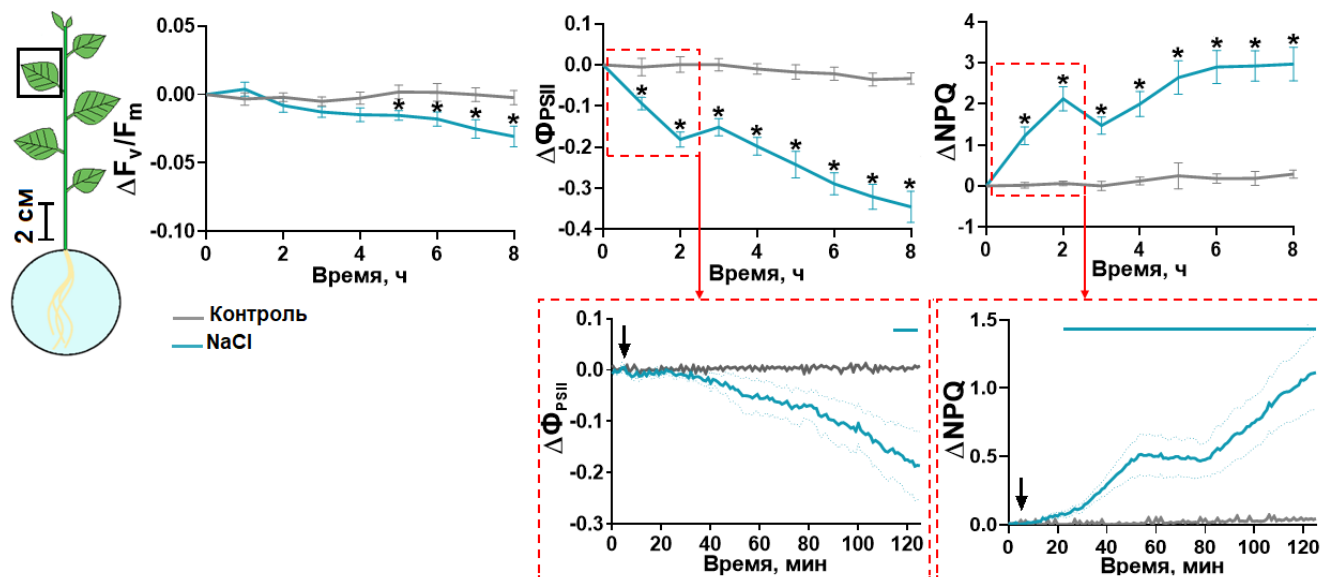


Рисунок 6. Влияние обработки NaCl на активность фотосинтеза в листе микрорастения. Представлены изменения F_v/F_m , Φ_{PSII} и NPQ. Прямоугольником выделен исследованный

лист. Стрелкой указан момент обработки.

* – статистически значимые различия с контролем; прямые линии указывают временной диапазон с наличием статистически значимых различий с контролем, $p < 0,05$

Затем у микрорастений начальная фаза изменения активности фотосинтеза была изучена с высоким временным разрешением (рис. 6). Такая регистрация позволила установить, что в течение первого часа после обработки NaCl также происходит переходное снижение Φ_{PSII} и увеличение NPQ. Обработка NaCl статистически значимо снижала Φ_{PSII} через 110 минут и повышала NPQ через 23 минуты. Таким образом, ответ фотосинтеза на обработку NaCl включает не только описанные выше две фазы, но и раннюю фазу, характеризующуюся статистически значимым повышением NPQ.

Изучение динамики вызванных NaCl изменений активности фотосинтеза позволила выявить, что снижение активности фотосинтеза развивается в три последовательные фазы. Первая фаза, характеризующаяся переходным увеличением NPQ и незначительным снижением Φ_{PSII} , у микрорастений начиналась через 20 минут после обработки NaCl, вторая, характеризующаяся повторным ростом NPQ и выраженным снижением Φ_{PSII} , – через 60-70 минут, третья фаза, в которой наряду с изменениями NPQ и Φ_{PSII} происходило снижение F_v/F_m , – через 4-5 часов. Несколько последовательных фаз снижения активности фотосинтеза могут указывать на наличие нескольких механизмов регуляции его активности при засолении, которые были проанализированы далее.

Роль ионного и осмотического компонентов засоления в изменении активности фотосинтеза

Засоление – это комплексный стрессовый фактор, включающий осмотический и ионный компоненты (Zhao et al., 2020). Оба компонента засоления оказывают негативное влияние на активность фотосинтеза за счёт устьичных ограничений (осмотический компонент) и токсического эффекта накопления Na^+ в листе (Pan et al., 2021). Далее был проведен анализ потенциального влияния каждого из компонентов на динамику активности фотосинтеза при действии NaCl на растения картофеля.

В ходе работы была исследована динамика накопления Na^+ в корне и листьях при обработке растений NaCl. При увеличении концентрации NaCl до 200 мМ в растворе, омывающем корни, Na^+ быстро поступает в клетки (рис. 7А) и быстро накапливается в

корне (рис. 7Б).

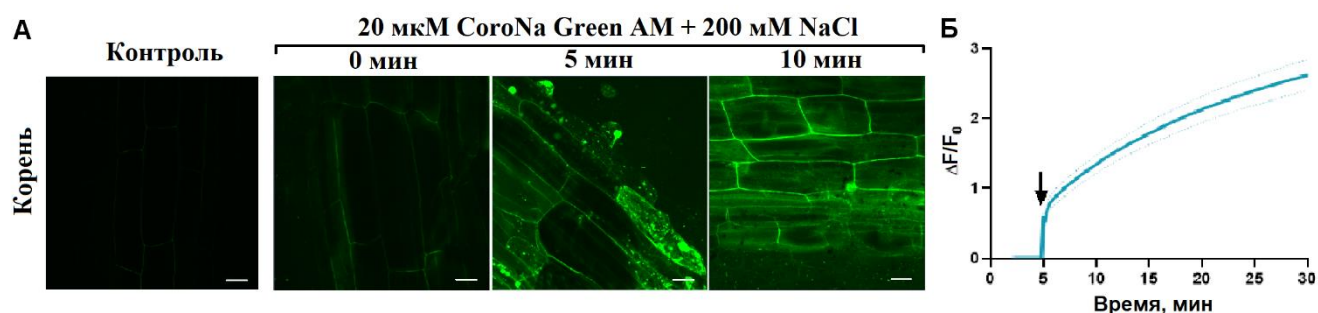


Рисунок 7. Поступление и накопление Na^+ в клетках корня при обработке NaCl. Изображения флуоресценции CoroNa Green AM в корне (зона дифференциации) при обработке NaCl (бар 20 мкм) (А), и изменение интенсивности флуоресценции $\Delta F/F_0$ CoroNa Green AM. Стрелкой указан момент обработки

Наряду с корнем была определена динамика накопления Na^+ в тех же листьях, в которых регистрировали параметры флуоресценции хлорофилла (рис. 8).

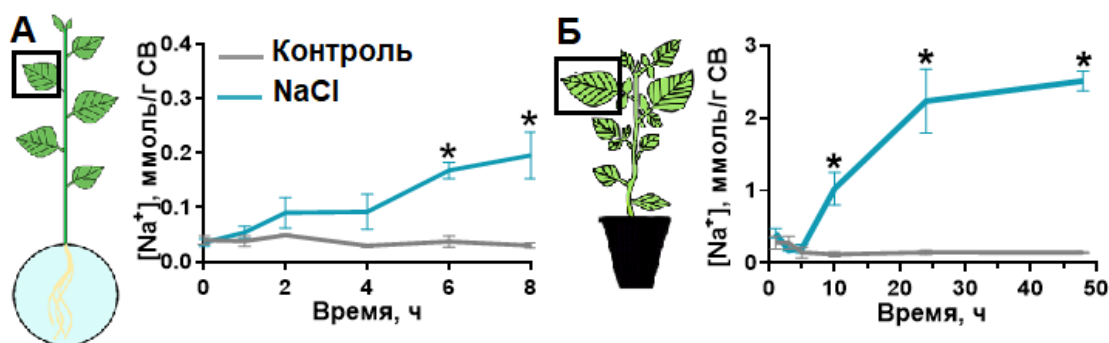


Рисунок 8. Накопление Na^+ в листе у микрорастений (А) и растений, выращенных в почве, (Б) при обработке NaCl. Прямоугольником выделен исследованный лист.

* – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$

Было обнаружено, что у микрорастений уровень Na^+ статистически значимо повышался только через 6 часов после добавления NaCl (рис. 8А), а у растений, выращенных в почве, – через 11 часов (рис. 8Б). Выявленная в нашей работе динамика накопления Na^+ в листьях растений картофеля соответствует таковой для других растений (Jaarsma et al., 2013; Peng et al., 2016; Ibrahimova et al., 2021). Сопоставление динамики накопления Na^+ и динамики активности фотосинтеза показало, что непосредственно токсическое действие Na^+ может объяснить формирование только наиболее поздней третьей фазы ответа фотосинтеза.

Далее анализировали роль снижения устьичной проводимости, вызванной засолением, в индукции изменений активности фотосинтеза. Изменение устьичной проводимости оценивали с помощью индекса CWSI, корреляция между которыми была определена в нескольких исследованиях (Ru et al., 2020; Liao et al., 2024; Ramos-

Fernández et al., 2024). У растений, выращенных в почве, CWSI снижался через 3 часа (рис. 9А); у микрорастений при регистрации с высоким временным разрешением изменения CWSI были статистически значимо обнаружены через 90 минут (рис. 9Б).

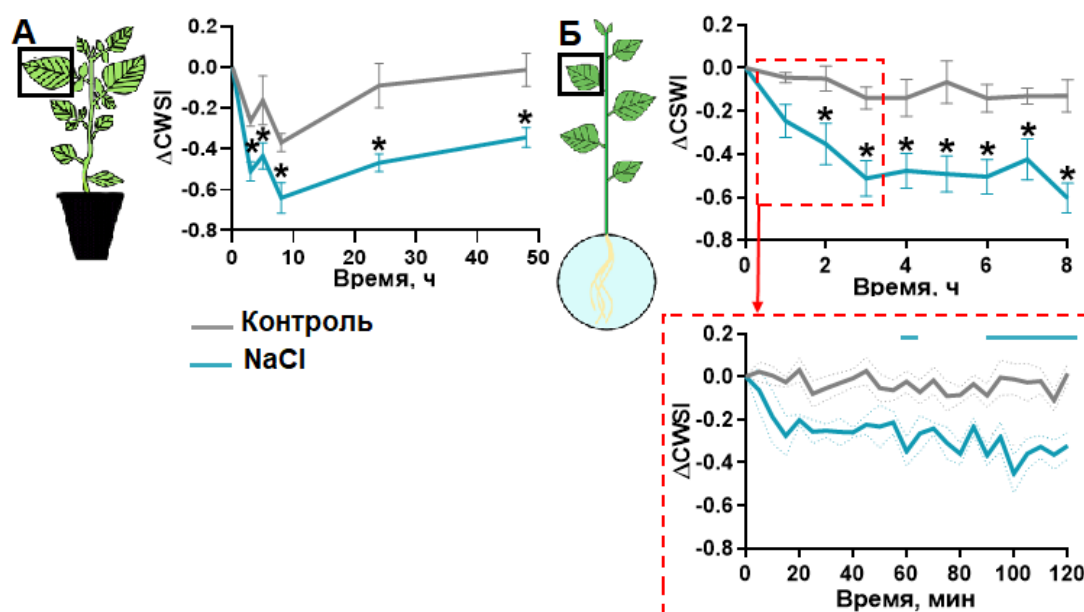


Рисунок 9. Влияние обработки NaCl на CWSI у растений, выращенных в почве, (А) и микрорастений (Б). Прямоугольником выделен исследованный лист.

* – статистически значимые различия с контролем; прямые линии указывают временной диапазон с наличием статистически значимых различий с контролем, $p < 0,05$

Для развитых растений картофеля была описана схожая динамика снижения транспирации при засолении (Backhausen et al., 2005), тогда как для микрорастений ранее были выполнены измерения транспирации, в которых было обнаружено ее снижение, только через 48 часов после добавления 200 мМ NaCl (Zhu et al., 2021). Сопоставление динамики изменения параметров флуоресценции хлорофилла и CWSI показывает, что снижение устьичной проводимости может объяснить вторую фазу снижения активности фотосинтеза.

Важную роль в регуляции активности многих физиологических процессов и фотосинтеза также играют изменения pH. Ранее отмечали влияние закисления цитозоля на активность фотосинтеза при охлаждении (Kadohama et al., 2013), локальном нагревании (Grams et al., 2009) и дефиците K^+ (Hu et al., 2023). Потенциально засоление за счёт своего осмотического компонента может влиять на pH цитозоля листьев (Ma et al., 2010). Ранняя фаза падения активности фотосинтеза могла быть обусловлена изменением pH цитозоля в листе. На созданных модельных растениях с сенсором Pt-GFP была проанализирована динамика pH цитозоля одновременно с регистрацией

изменения активности фотосинтеза. Цитозоль листьев закислялся через 5-10 часов после обработки NaCl (рис. 10А и Б). Это изменение рН цитозоля совпадало с началом третьей фазы снижения активности фотосинтеза у микрорастений и растений, выращенных в почве. Закисление цитозоля клеток листа могло быть связано с накоплением Na^+ в побеге, повышением активности Na^+/H^+ -антипортёра (Guo et al., 2009; Sze, Chanroj, 2018) и снижением активности H^+ -АТФазы плазмалеммы, причинами которого могут быть снижение активности дыхания и/или снижения экспрессии генов, кодирующих H^+ -АТФазы (Pitann et al., 2009; Ma et al., 2010). Устойчивое закисление цитозоля могло быть связано с ингибированием декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (Kumar et al., 2000; Saha et al., 2012), а также глутаматдекарбоксилазы (Al-Khayri et al., 2024), являющихся компонентами биохимического рН-стата (Wegner, Shabala, 2020).

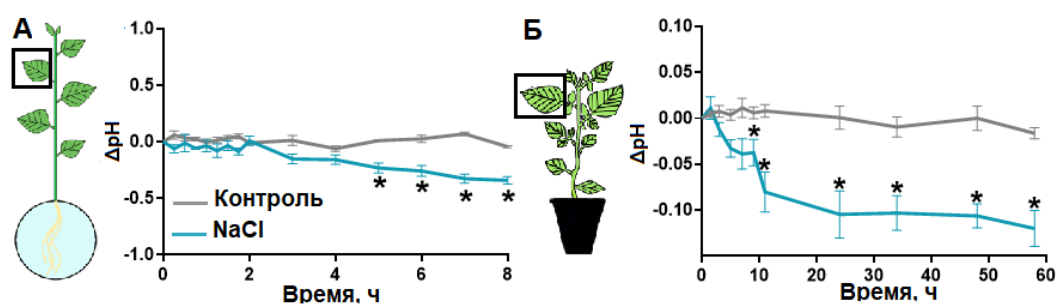


Рисунок 10. Изменения рН цитозоля при засолении в листе у микрорастений (А) и у растений, выращенных в почве (Б). Прямоугольником выделен исследованный лист.

* – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$

Таким образом, засоление вызывает ограничение устьичной проводимости и накопления Na^+ в листьях, которые могут быть ответственны за вторую и третью фазы снижения активности фотосинтеза (рис. 11). За индукцию самых ранних изменений активности фотосинтеза, вероятно, ответственен другой фактор.

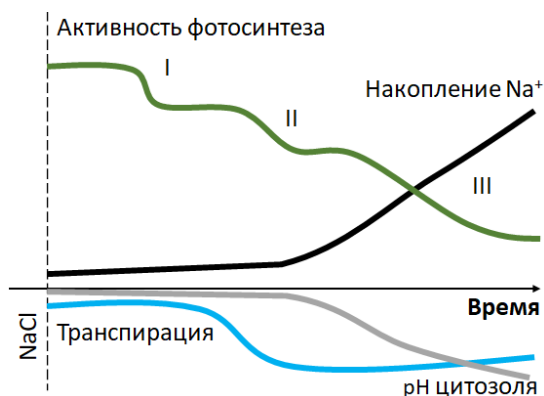


Рисунок 11. Схема изменения активности фотосинтеза, транспирации, накопления Na^+ и изменения рН цитозоля листа растения картофеля при обработке NaCl

Индукцированная засолением регуляция фотосинтеза. Влияние распространяющихся из корня в побег сигналов

Обнаруженный малый временной интервал (рис. 6) между обработкой NaCl и началом изменения активности фотосинтеза может говорить о наличии быстрых сигналов, распространяющихся из корня в побег. Возможность индукции засолением распространения быстрых сигналов в побег показана в работах, сделанных на растениях арабидопсиса (Choi et al., 2014; Liu et al., 2018), табака (Graus et al., 2022), ледяной травы (Kholodova et al., 2006). В нашем исследовании мы изучили возможность индукции обработкой NaCl электрических и гидравлических сигналов, Ca^{2+} - и АФК-волн в побеге картофеля.

Гидравлический сигнал – это быстро распространяющаяся волна изменения давления (Malone, 1993; Christmann et al., 2013). Как правило, распространяющийся гидравлический сигнал регистрируют в ответ на локальное повреждение (Malone, 1993). В этом случае возникает распространение волны повышенного давления. В то же время, увеличение осмолярности внешнего раствора вызывает отток воды из растения вследствие изменения разности водного потенциала (Graus et al., 2022), что вызывает волну пониженного давления (Malone, 1992). Гидравлический сигнал может быть зарегистрирован не только непосредственно датчиком давления (Katsuhara et al., 2011; Wegner et al., 2011), но и косвенно – по изменению толщины стебля и листьев (Neumann et al., 1988; Graus et al., 2022). Такой подход был применён в наших исследованиях, где измерялось изменение толщины стебля (рис. 12).

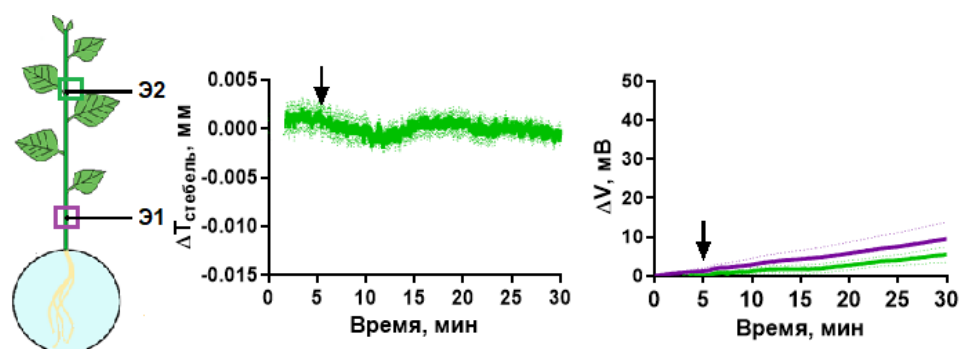


Рисунок 12. Изменение толщины стебля ($\Delta T_{\text{стебель}}$) и электрических потенциалов (ΔV) в побеге при обработке NaCl. Цвета линий соответствуют цвету областей на схеме. На схеме также указаны места установки измерительных электродов (Э1, Э2). Стрелкой указан момент обработки

После обработки NaCl происходило незначительное снижение толщины стебля, которое через 7 минут достигало минимума. Это уменьшение толщины стебля может

быть следствием снижения тургорного давления, обусловленное, в свою очередь, распространением гидравлического сигнала. Эти данные согласуются с результатами, полученными на растениях ледяной травы, где наблюдалось падение тургорного давления (Kholodova et al., 2006), и фасоли (Neumann et al., 1988), табака (Graus et al., 2022) и ячменя (Fricke et al., 2006), у которых наблюдалось снижение тургора клеток побега. Снижение тургорного давления клеток в побеге могло быть вызвано оттоком воды из-за увеличения осмолярности снаружи корня и оттоком воды из клеток корня и побега для её компенсации (Zhao et al., 2020).

Изменение электрических потенциалов в стебле в ответ на обработку NaCl было представлено медленной гиперполяризацией небольшой амплитуды. Распространяющихся электрических импульсов обнаружено не было (рис. 12).

Ca^{2+} -сигнал представляет собой временное повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле. Это повышение было определено с помощью Case12 и Fluo4 по увеличению уровня их флуоресценции. По всему побегу было зафиксировано распространение Ca^{2+} -сигнала (рис. 13А), который представлял собой два повышения уровня Ca^{2+} : первое повышение в участке побега, расположенном в 1 см от корня, регистрировалось практически моментально после начала обработки NaCl, второе повышение начиналось через 3-4 минуты.

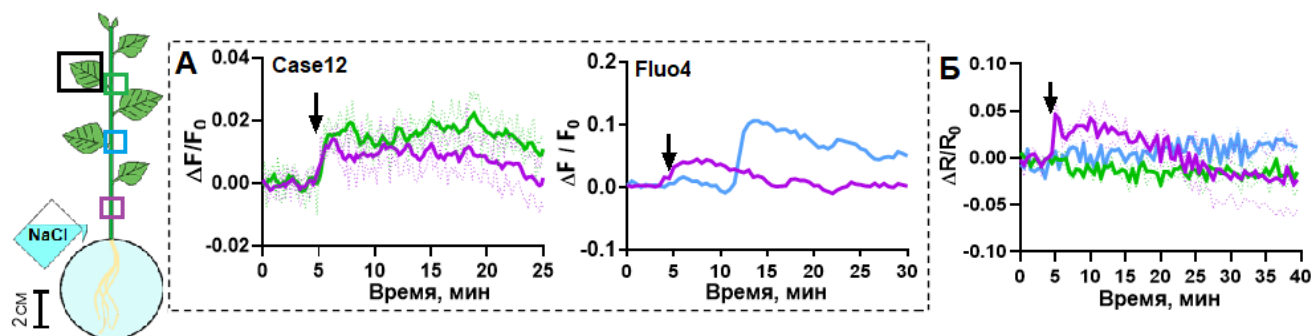


Рисунок 13. Изменение флуоресценции Ca^{2+} -чувствительных (А) и H_2O_2 -чувствительного (Б) сенсоров в побеге при обработке NaCl. Цвета линий соответствуют цвету областей на схеме. Стрелкой указан момент обработки

Первое повышение уровня Ca^{2+} могло быть связано с прохождением гидравлического сигнала, когда происходит активация механочувствительных Ca^{2+} -проницаемых каналов (Choi et al., 2016), а второе, вероятно, могло быть распространяющейся Ca^{2+} -волной, механизмы распространения которой слабо известны; на данный момент активно обсуждается гипотеза о совместном распространении Ca^{2+} -волн и АФК-волн (Li et al., 2021), а также известно о генерации

Ca^{2+} -волны при участии двухпорových каналов тонопласта (Choi et al., 2014) и аннексинов (Laohavisit et al., 2013) при засолении. Скорость распространения сигнала составляла около 900 мкм/с, что находится в диапазоне ранее зарегистрированных скоростей этого сигнала при засолении у растений арабидопсиса (Choi et al., 2014; Steinhorst et al., 2022).

Также в области стебля, близкой к корню, через 1 минуту засоления было обнаружено повышение уровня H_2O_2 в цитозоле; на больших расстояниях, превышающих несколько сантиметров, такое повышение отсутствовало (рис. 13Б).

В результате в стебле были зарегистрированы распространяющаяся на большое расстояние Ca^{2+} -волна и изменение толщины стебля, свидетельствующее о прохождении гидравлического сигнала, а также распространяющаяся на малое расстояние АФК-волна. Электрического сигнала зарегистрировано не было. Из всех проанализированных дистанционных сигналов распространяющиеся из корня Ca^{2+} -сигнал и гидравлическая волна могли вызвать быстрые изменения активности фотосинтеза. Указанные сигналы были обнаружены в участке стебля, близком к листу, в котором анализировали параметры флуоресценции хлорофилла, раньше, чем начиналась первая фаза снижения активности фотосинтеза.

Для подтверждения роли Ca^{2+} в индукции ранних изменений активности фотосинтеза применяли ингибитор Ca^{2+} -проницаемых каналов LaCl_3 . В результате происходило снижение амплитуды второго повышения уровня Ca^{2+} в участке стебля, который инкубировался с LaCl_3 , а также в более отдалённой зоне стебля (рис. 14).

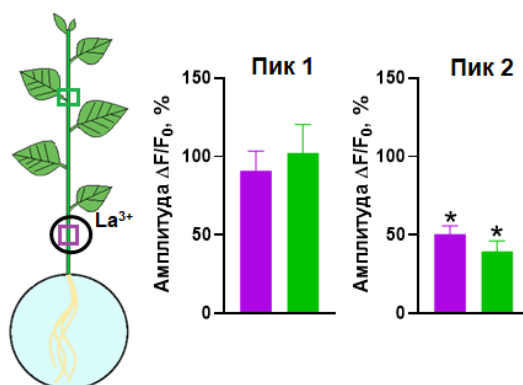


Рисунок 14. Влияние ингибитора LaCl_3 на флуоресценцию Case12 в разных областях стебля. Цвета столбцов соответствуют цвету областей на схеме. Окружностью выделено место загрузки LaCl_3 . * – статистически значимые различия оригинальных значений от обработки NaCl без предобработки LaCl_3 , $p < 0,05$

Первое повышение уровня Ca^{2+} оказалось не затронутым ингибитором. LaCl_3

подавляет большинство каналов, чувствительных к растяжению (de Vriese et al., 2018), однако для быстрого механоактивируемого канала не было обнаружено влияния LaCl_3 на его проводимость (Tran et al., 2017), следовательно, гидравлический сигнал мог активировать эти каналы и вызвать первое повышение уровня Ca^{2+} в стебле.

Обработка LaCl_3 вызывала угнетение ответа фотосинтеза при добавлении раствора NaCl (рис. 15). Амплитуда снижения Φ_{PSII} была подавлена во вторую фазу. Амплитуда повышения NPQ подавлялась в обе фазы. Угнетение ответа фотосинтеза при блокировании распространяющейся из корня в побег Ca^{2+} -волны указывает на ее определяющую роль в индукции вызванного засолением ответа, при этом важное значение имело второе повышение уровня Ca^{2+} , которое зависело от LaCl_3 .

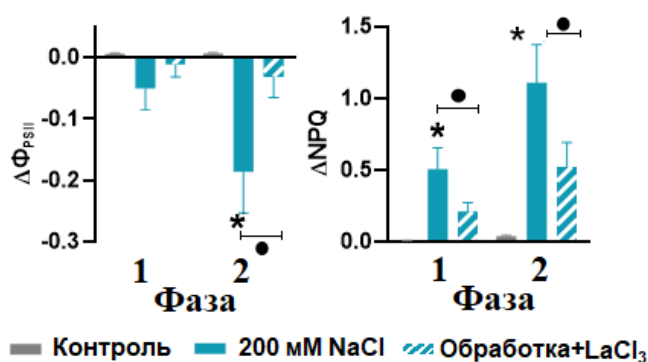


Рисунок 15. Влияние ингибитора LaCl_3 на амплитуды изменения Φ_{PSII} и NPQ через 50-60 (Фаза 1) и 120 минут (Фаза 2).

* – статистически значимые различия с контролем; • – статистически значимые различия между обработкой LaCl_3 и её отсутствием, $p < 0,05$

Далее определяли возможные механизмы возникновения Ca^{2+} -сигнала в корне в ответ на обработку NaCl . Существует несколько путей поступления Ca^{2+} в клетку, связанных с активацией Ca^{2+} -проницаемых каналов нескольких типов, активируемых как осмотическим компонентом засоления, так и Na^+ (Jiang et al., 2019; Smokvarska et al., 2021; Gigli-Bisceglia et al., 2022; Colin et al., 2023). Генерация Ca^{2+} -сигнала также может быть связана с активацией иных сигнальных систем. В частности, показано, что Ca^{2+} - и АФК-волны распространяются совместно, активируя друг друга (Huh et al., 2010; Li et al., 2021), и что повышение уровня Ca^{2+} способствует изменению активности H^+ -АТФаз и изменению pH цитозоля (Yang, Boss, 1994; Ali et al., 2023; Yang et al., 2023), при этом обратная связь также существует (Dindas et al., 2021).

В наших исследованиях в корне в ответ на обработку NaCl были зарегистрированы изменения уровней Ca^{2+} , H_2O_2 и pH цитозоля. Уровень Ca^{2+} повышался очень быстро после добавления NaCl : острый пик формировался в первые

секунды после повышения концентрации NaCl в растворе, затем происходило более продолжительное незначительное увеличение, которое сменялось понижением уровня Ca^{2+} ниже исходного (рис. 16). Также в исследуемой зоне в первые секунды после обработки повышался уровень H_2O_2 . Через 1-2 минуты начинал временно повышаться pH цитозоля, достигая максимума к 7 минуте, а через 12 минут значения снижались ниже исходных.

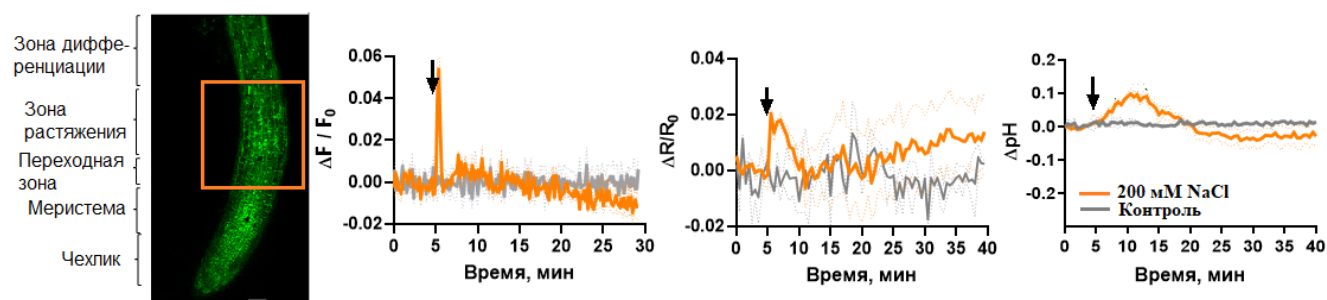


Рисунок 16. Увеличение уровня флуоресценции Case12 ($\Delta F/F_0$) и HyPer7 ($\Delta R/R_0$) и pH в корне (бар 100 мкм) при обработке NaCl. Стрелкой указан момент обработки

Для определения вклада ионного и осмотического компонента стрессора в индукцию Ca^{2+} -сигнала использовали различные агенты – NaCl, KCl и сорбитол. Использование сорбитола моделирует действие только осмотической составляющей стрессора, а использование KCl позволяет оценить какой из ионов – Na^+ или Cl^- – является определяющим в эффекте ионной составляющей. Все использованные агенты вызывали повышение уровня Ca^{2+} в клетках корня (рис. 17), что говорит о вкладе как осмотического, так и ионного компонента засоления в индукцию Ca^{2+} -сигнала. Амплитуда повышения Ca^{2+} была много больше при обработке NaCl по сравнению с обработкой KCl или сорбитолом.

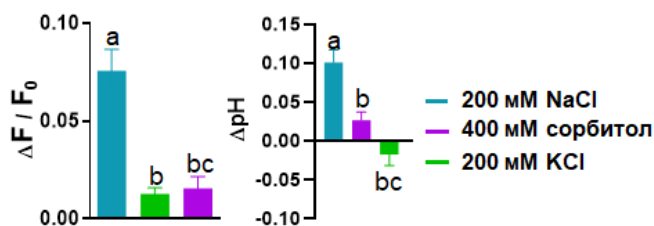


Рисунок 17. Влияние ионного и осмотического компонента солевого стресса на амплитуду изменения флуоресценции Case12 ($\Delta F/F_0$) и pH цитозоля в корне. Разные буквы обозначают статистически значимые различия между обработкой NaCl, сорбитолом и KCl, $p < 0,05$

Амплитуда защелачивания была также выше в ответ на NaCl в сравнении с другими агентами (рис. 17). Полученные результаты указывают на определяющий вклад именно Na^+ в индукцию вызванного засолением Ca^{2+} -сигнала.

Наряду с оценкой вклада ионного и осмотического компонентов в генерацию Ca^{2+} -сигнала непосредственно в клетках корня, для которого использовали различные агенты, также выполнили анализ различий в параметрах ответа в побеге при обработке блокатором LaCl_3 . Были зарегистрированы изменения активности фотосинтеза и транспирации, а также изменение толщины стебля при действии NaCl , KCl и сорбитола. Между агентами не было выявлено различий в эффектах на изменения толщины стебля, связанных, как предположено выше, с гидравлическим сигналом, и изменения CSWI , отражающего устьичную проводимость (рис. 18). Также не было выявлено влияния LaCl_3 на изменения толщины стебля и CWSI (рис. 18). Это указывает на определяющую роль осмотической составляющей действия NaCl в индукции этих изменений.

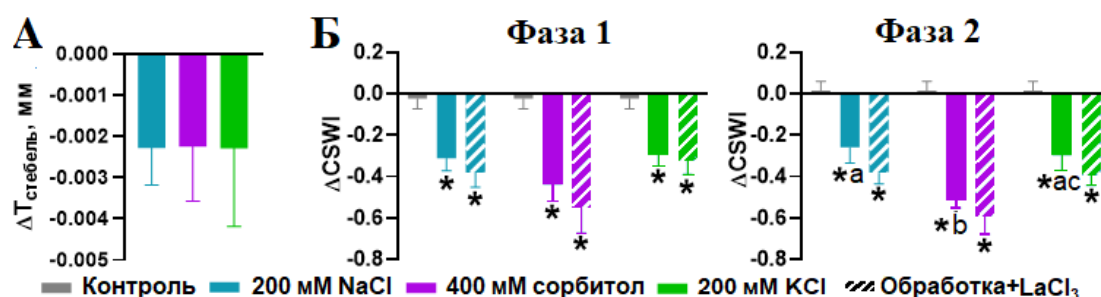


Рисунок 18. Влияние ионного и осмотического компонента обработки NaCl и Ca^{2+} -сигнала на амплитуду изменения толщины стебля ($\Delta T_{\text{стебель}}$) (А) и устьичную проводимость (Б) через 50-60 (Фаза 1) и 120 минут (Фаза 2).

* – статистически значимые различия с контролем; разные буквы обозначают статистически значимые различия между обработкой NaCl , сорбитолом и KCl , $p < 0,05$

В отличие от изменений устьичной проводимости наличествовали различия в ответах фотосинтеза при действии различных агентов. Наибольшая амплитуда изменений, как первой, так и второй фазы ответа фотосинтеза, имела место в случае обработки NaCl (рис. 19).

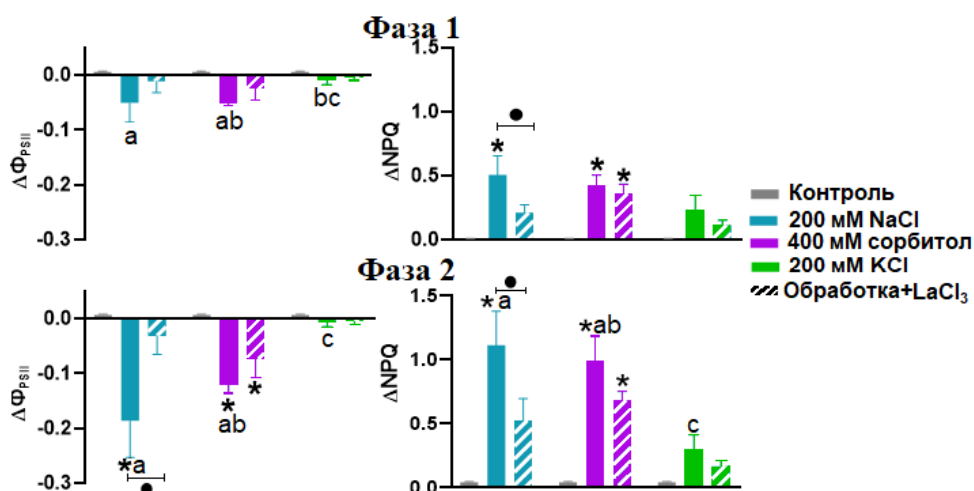


Рисунок 19. Влияние ингибитора LaCl_3 на амплитуды изменения Φ_{PSII} и NPQ , вызванные

ионным и осмотическим компонентами обработки NaCl, через 50-60 (Фаза 1) и 120 минут (Фаза 2).

* – статистически значимые различия с контролем; • – статистически значимые различия между обработкой LaCl_3 и её отсутствием; разные буквы обозначают статистически значимые различия между обработкой NaCl, сорбитолом и KCl, $p < 0,05$

Несколько ниже были изменения в случае сорбитола, и минимальными в случае KCl (рис. 19). В последнем случае не было выявлено статистически значимых отличий от контроля (рис. 19). Подавление Ca^{2+} -сигнала в побеге с помощью LaCl_3 вызывало снижение ответа фотосинтеза при действии NaCl, но не сорбитола и KCl (рис. 19).

В целом, полученные результаты указывают, что Na^+ -индуцированный распространяющийся из корня в побег Ca^{2+} -сигнал вносит определяющий вклад в индукцию первой фазы снижения активности фотосинтеза, вызванного засолением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы демонстрируют подавляющее действие засоления на активность фотосинтеза в листьях картофеля. Проведённое исследование выявило ранние изменения активности фотосинтеза, вызванные засолением, которые проходили в три фазы. Проведённый комплексный анализ позволил предположить, чем было индуцировано формирование каждой из этих фаз.

Начало накопления Na^+ в листьях совпадало с началом последней фазы снижения активности фотосинтеза, и оно может выступать индуктором этой фазы (рис. 4.1). Избыток Na^+ может угнетать активность фотосинтеза путём ингибирования кислород-выделяющего комплекса и ферментов цикла Кальвина-Бенсона (Yang et al., 2008; Kang et al., 2012; Pan et al., 2021).

Наряду с ионной составляющей, осмотический компонент засоления также оказывает негативное влияние на активность фотосинтеза. Падение устьичной проводимости, которое по времени наступления соответствует второй фазе снижения активности фотосинтеза, может частично её опосредовать. Сокращение поступления CO_2 вызывает снижение активности ферментов цикла Кальвина-Бенсона и подавление светозависимых реакций вследствие этого (Aharon et al., 2003; Li et al., 2008; Pan et al., 2021).

Наиболее раннее снижение активности фотосинтеза не может быть вызвано накоплением Na^+ или ограничением устьичной проводимости, поскольку они

происходят позже, но это снижение может быть индуцировано сигналами, исходящими из корня. В корне были зарегистрированы изменения уровня Ca^{2+} , H_2O_2 и цитозольного pH с помощью созданных растений с флуоресцентными сенсорами. В побег распространялись гидравлическая волна и Ca^{2+} -волна. Индукция распространяющейся в побег Ca^{2+} -волны вызывалась осмотическим компонентом засоления и, в большей мере, Na^+ . Механизм индукции Ca^{2+} -волны с помощью Na^+ также включал изменение активности H^+ -АТФазы в корне и НАДФН-оксидаз. Распространяющаяся Ca^{2+} -волна в побеге вносит основной вклад в первую фазу снижения активности фотосинтеза, наиболее вероятно, за счёт прямого влияния на светозависимые реакции или путём снижения активности ферментов цикла Кальвина-Бенсона (Kreimer et al., 1988; Pottosin, Shabala, 2016).

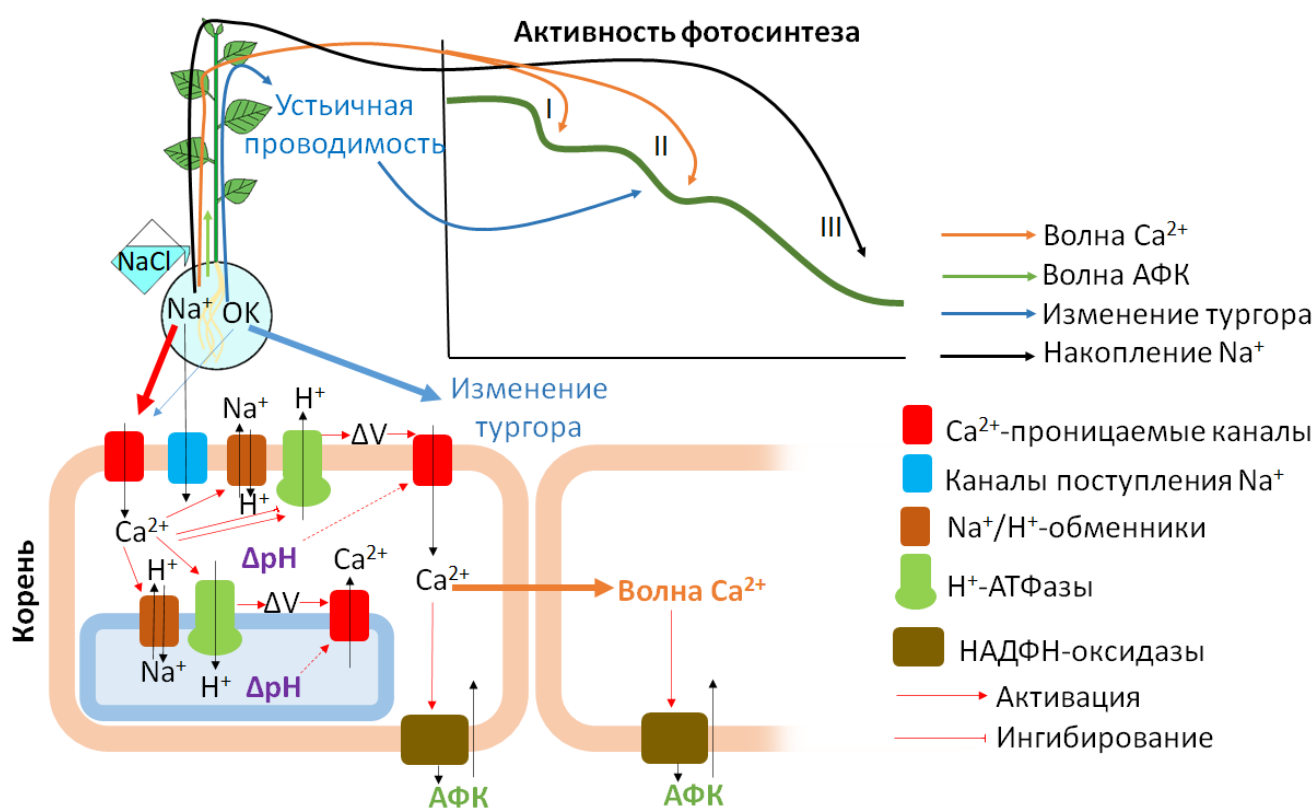


Рисунок 20. Предполагаемая схема ранних изменений активности фотосинтеза, вызванных ионным (Na^+) и осмотическим (OK) компонентами засоления

Можно полагать, что вызванное распространяющимися из корня в побег сигналами снижение активности фотосинтеза имеет значение для формирования устойчивости растения. Осмотический и ионный компоненты засоления могут приводить к возникновению окислительного стресса, который вызывает серьезные повреждения, в том числе хлоропластных ферментов и структур. Продукция АФК в хлоропластах зависит от активности фотосинтеза, и предварительное снижение

активности фотосинтеза, вызванное Ca^{2+} -сигналом, может предотвратить избыточную продукцию АФК и дальнейшее повреждение фотосинтетического аппарата (Foyer, Hanke, 2022). Таким образом, механизмы индукции, генерации и распространения сигналов при засолении, а также пути их влияния на активность физиологических процессов требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Созданы растения картофеля с генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами, чувствительными к концентрации H^+ (Pt-GFP), Ca^{2+} (Case12) и H_2O_2 (HyPer7) в цитозоле.

2. Действие NaCl на корни картофеля вызывает снижение активности фотосинтеза, которое происходит в три фазы. Первая фаза, характеризующаяся переходным увеличением NPQ и снижением Φ_{PSII} , начинается у микрорастений через 20 минут после обработки. Вторая фаза характеризуется повторным ростом NPQ и выраженным снижением Φ_{PSII} , у микрорастений она начинается через 60-70 минут. В третью фазу наряду с изменениями NPQ и Φ_{PSII} происходит снижение F_v/F_m , что происходило через 4-5 часов после обработки.

3. Засоление вызывало накопление Na^+ в листьях и снижение устьичной проводимости. Сопоставление динамики параметров флуоресценции хлорофилла с динамикой снижения устьичной проводимости и накопления Na^+ свидетельствует об их роли в индукции второй и третьей фазы снижения активности фотосинтеза соответственно.

4. Обработка NaCl корней вызывает распространение в побеге Ca^{2+} -волны, а также переходное уменьшение толщины стебля, которое может быть связано с распространением гидравлической волны. Электрический сигнал в побеге отсутствовал. АФК-волна, представленная повышением уровня H_2O_2 , распространялась в побег на расстояние не более нескольких сантиметров от корня.

5. Распространяющаяся Ca^{2+} -волна вызывает формирование первой фазы снижения активности фотосинтеза, что подтверждается значительным угнетением этой фазы ответа фотосинтеза при блокировании Ca^{2+} -волны.

6. Как ионный, так и осмотический компоненты засоления индуцируют Ca^{2+} -волну, при этом именно Na^+ вносит основной вклад в индукцию сигнала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. Pecherina A., Grinberg, M., Ageyeva, M., Zdobnova, T., Ladeynova, M., Yudintsev, A., Vodeneev, V., Brilkina, A. Whole-plant measure of temperature-induced changes in the cytosolic pH of potato plants using genetically encoded fluorescent sensor Pt-GFP // Agriculture (Switzerland). 2021. №11 (1131). (Q1, WoS, Scopus).
2. Pecherina A., Grinberg M., Ageyeva M., Zanegina D., Akinchits E., Brilkina A., Vodeneev V. Salt-Induced Changes in Cytosolic pH and Photosynthesis in Tobacco and Potato Leaves // International Journal of Molecular Sciences. 2023, V. 24, I. 1. (Q1, WoS, Scopus).
3. Pecherina A., Dimitrieva A., Mudrilov M., Ladeynova M., Zanegina D., Brilkina A., Vodeneev V. Salt-Induced Early Changes in Photosynthesis Activity Caused by Root-to-Shoot Signaling in Potato // International Journal of Molecular Sciences. 2024. V. 25, I. 2. (Q1, WoS, Scopus).

Тезисы докладов:

1. Печёрина А.А., Агеева М.Н., Гринберг М.А., Здобнова Т.А., Брилкина А.А., Воденеев В.А. Изменение цитозольного pH и электрических сигналов у растений картофеля, вызванное различными стрессирующими воздействиями // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы. V российский симпозиум с международным участием. Казань, Россия. 2021. С. 89-90.
2. Печёрина А.А., Агеева М.Н., Гринберг М.А., Здобнова Т.А., Брилкина А.А., Воденеев В.А. Выявление изменения pH цитоплазмы растений картофеля, трансформированных pH-сенсором Pt-GFP, при различных стрессовых воздействиях // Всероссийская научная конференция с международным участием, школа для молодых ученых "Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее". Москва, Россия. 2021. С. 99.
3. Печёрина А.А. Анализ вызванных температурой изменений цитозольного pH в растениях картофеля с генетически кодируемым флуоресцентным сенсором Pt-GFP // IV международная научная конференция "Наука будущего". Москва, Россия. 2021. С. 13.
4. Печёрина А.А., Агеева М.Н., Гринберг М.А., Здобнова Т.А., Брилкина А.А., Воденеев В.А. Картофель с сенсором Pt-GFP для исследования изменения pH_{cyt} //

Третья Международная научная конференция PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». Санкт-Петербург, Россия. 2022. С. 179.

5. Печёрина А.А., Агеева М.Н., Занегина Д.А., Гринберг М.А. Воденеев В.А., Брилкина А.А. «Whole-body» имиджинг изменения цитозольного pH и параметров РАМ-флуориметрии вследствие засоления у растений *Solanum tuberosum* и *Nicotiana tabacum* // Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий». Н. Новгород, Россия. 2022. С.106.

6. Печёрина А.А., Агеева М.Н., Занегина Д.А., Димитриева А.А., Гринберг М.А., Ладейнова М.М., Брилкина А.А., Воденеев В.А. Использование модельных растений с флуоресцентными генетически-кодируемыми сенсорами в исследованиях действия стрессоров различной природы // X Съезд общества физиологов растений России, Всероссийская научная конференция с международным участием «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата». Уфа, Россия. 2023. С. 291.

7. Pecherina A.A., Mudrilov M.A., Brilkina A.A., Vodeneev V.A. Early changes in photosynthesis activity are modulated by distant signals during salinity in potato plants // International Conference on Plant Biology and Biotechnology (ICPBB 2024). Almaty, Kazakhstan. 2024. P. 161.

8. Печёрина А.А., Димитриева А.А., Занегина Д.А., Зырянова С.С., Гринберг М.А., Агеева М.Н., Здобнова Т.А., Брилкина А.А., Воденеев В.А. Использование растений картофеля с генетически кодируемыми сенсорами в качестве модельных растений в изучении влияния абиотических стрессовых воздействий // Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники». Н. Новгород, Россия. 2024, С. 250-251.