

УЧАСТИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH В РАЗВИТИИ ВЫЗВАННОГО ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА У ПРОРОСТКОВ ТЫКВЫ

© 2015 О.Н. Шерстнева, В.А. Воденев, Л.А. Катичева,
Л.М. Сурова, В.С. Сухов*

*Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород;
электронная почта: vssuh@mail.ru*

Поступила в редакцию 12.01.15
После доработки 09.03.15

Электрические сигналы, представленные у растений потенциалом действия и вариабельным потенциалом (ВП), вызывают обратимую инактивацию фотосинтеза. Связанное с генерацией ВП изменение внутри- и внеклеточного pH является потенциальным механизмом индукции фотосинтетического ответа, что, однако, требует дальнейшего экспериментального исследования. В настоящей работе анализировали влияние изменений pH на индукцию фотосинтетического ответа у тыквы. Показано, что ожог семядольного листа вызывал распространение ВП, который проходил в настоящие листья проростков тыквы, индуцируя снижение уровня фотосинтетической ассимиляции CO₂ и рост нефотохимического тушения флуоресценции; дыхание при этом незначительно активировалось. Величина фотосинтетического ответа линейно зависела от амплитуды ВП. Проведенный с использованием pH-чувствительных флуоресцентных зондов анализ внутри- и внеклеточной концентрации протонов показал, что развитие ВП сопровождалось защелачиванием апопласта (0,4 ед pH) и закислением цитоплазмы (0,3 ед pH). Исследование влияния изменения pH среды инкубации на нефотохимическое тушение флуоресценции выделенных хлоропластов показало, что закисление среды повышало нефотохимическое тушение, при этом амплитуда такого возрастания зависела от величины снижения pH. Полученные результаты свидетельствуют в пользу участия изменений внутри- и внеклеточного pH в индукции вызванного ВП фотосинтетического ответа. Возможные механизмы влияния изменений pH на фотосинтез обсуждаются.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Cucurbita pepo*, pH, ассимиляция CO₂, вариабельный потенциал, нефотохимическое тушение флуоресценции, хлоропласты.

В настоящее время достаточно хорошо известно [1–3], что локальные раздражения могут вызывать генерацию и распространение электрических сигналов у растений. При этом неповреждающие стимулы индуцируют потенциал действия (ПД), а повреждающие воздействия приводят к распространению вариабельного потенциала (ВП) [1, 2]. ПД и ВП, по-видимому, отличаются в ионной природе и механизмах распространения. Активно распространяющийся ПД [4] связан преимущественно с потоками Ca²⁺, Cl⁻ и K⁺ [1, 3, 5, 6], хотя обратимая инактивация H⁺-АТФазы принимает определенное участие в его генерации [6]. В случае ВП основным механизмом является снижение активности H⁺-АТФазы [3, 4, 7], которое, возможно, индуцировано входом ионов кальция [8, 9]. При

этом ионы хлора и калия, по-видимому, принимают участие преимущественно в формировании отдельных «ПД-образных» спайков [10], которые в некоторых случаях развиваются на фоне медленной и длительной деполяризации, являющейся основой ВП [2, 3, 11]. Распространение ВП не является активным процессом; считается, что он представляет собой местную электрическую реакцию на распространение сигнала гидравлической и(или) химической природы [3, 10, 12–14].

Предполагается [3, 15], что именно генерация и распространение ПД и ВП являются механизмом формирования системного функционального ответа растения на локальное действие раздражителей. В частности, показано, что локальная стимуляция может вызывать в нераздраженных частях растения активацию экспрессии ряда генов [16, 17], синтез фитогормонов

* Адресат для корреспонденции.

[17–19], изменения активности транспортных процессов [20], активацию дыхания [21] и сложные по своей динамике фотосинтетические ответы [19, 22–33]. Считается [34], что конечным результатом таких функциональных изменений является повышение устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов, что подтверждается отдельными экспериментальными работами [33–35].

Наиболее активно исследуемыми функциональными ответами растения на локальное действие стрессоров являются фотосинтетические ответы. В первую очередь, это показанная для растений различных видов быстрая инактивация фотосинтеза, которая обычно достигает максимальных значений в пределах первых 2–15 мин после локального раздражения [19, 23–33]. Она проявляется в снижении уровня ассимиляции CO_2 (A), возрастании нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), уменьшении квантовых выходов фотосистем I и II (Φ_{PSI} и Φ_{PSII}) и двухфазном изменении величины циклического потока электронов. Кроме быстрой инактивации фотосинтеза, в некоторых работах наблюдались также относительно медленно развивающиеся изменения фотосинтетической активности, которые достигали максимальной величины в пределах 20–50 мин после стимуляции [23, 32].

В отличие от медленно развивающихся фотосинтетических ответов, которые могут быть связаны не только с электрическими, но и с гормональными сигналами [19, 23], связь быстрой инактивации фотосинтеза с ПД и ВП была подтверждена в ряде работ [27, 29, 31, 32]. В то же время сам механизм влияния электрической реакции на фотосинтез остается достаточно дискуссионным. Исследование влияния ПД на фотосинтез харовых водорослей показало, что наиболее вероятным механизмом формирования ответа является вход ионов кальция [25]. Вариабельный потенциал, наблюдаемый преимущественно у высших растений, имеет специфические механизмы генерации и распространения [7–14], что позволяет предположить существование специфического пути влияния ВП на фотосинтез. Учитывая ключевую роль инактивации H^+ -АТФазы в развитии ВП [3, 4, 7], его влияние может быть связано со входом протонов в клетку [27, 31]. Грамс с соавт. [27] показали, что распространение ВП у кукурузы сопровождается закислением цитоплазмы и защелачиванием апопласта. При этом фотосинтез выделенных хлоропластов зависел от pH среды инкубации, в то время как его зависимости от концентрации кальция выявлено не было. Проведенный нами ранее анализ показал [31], что

вход протонов действительно является вероятным механизмом развития, вызванного ВП фотосинтетического ответа у проростков гороха. В то же время остается открытым вопрос — насколько универсальным для высших растений является такой механизм? Ранее было показано [30], что обратимая инактивация фотосинтеза, вызванная у проростков тыквы локальным ожогом и, вероятно, распространением ВП, существенно отличалась от ответов других исследованных объектов [29, 31, 32]. В частности, у тыквы наблюдалось лишь небольшое возрастание NPQ и снижение A, в то время как выраженное снижение Φ_{PSI} и Φ_{PSII} отсутствовало.

Таким образом, изучение влияния изменения внутри- и внеклеточного pH в индукции фотосинтетического ответа у проростков тыквы имеет значение для оценки универсальности роли протонов, в развитии вызванной ВП быстрой инактивации фотосинтеза у высших растений. Такой анализ стал целью настоящей работы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили двух-трехнедельные проростки тыквы (*Cucurbita pepo* L., сорт Мозолеевская). Проростки выращивали гидропонным способом (керамзит, 50%-ная среда Хоглэнда–Арнона) в климатической камере (KBW-240, «Binder», Германия) при освещении люминесцентными лампами (16-часовой световой период) и температуре 24°.

Электрофизиологические измерения осуществляли экстраклеточно после полуторачасовой адаптации проростков (рис. 1). Для регистрации использовали две пары Ag/AgCl-макроэлектродов (ЭВЛ-1МЗ, «Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь), высокоомный усилитель (ИПЛ-113, «Семико», Россия) и ПК. Измерительные электроды контактировали с основанием черешка листа (E_1) и поверхностью листа, на границе с зоной измерения фотосинтеза (E_2) через каплю электропроводящего геля. Электроды сравнения (E_R) контактировали с омывающим корни раствором. ВП индуцировали ожогом одного из семядольных листьев (открытое пламя, 3–4 с, около 2–3 см² поверхности).

Фотосинтетические измерения проводили одновременно с регистрацией электрической активности. Для этого применяли стандартную систему для исследования фотосинтетических процессов («Heinz Walz GmbH», Германия), включающую в себя газоанализатор (GFS-3000), РАМ-флуориметр с возможностью регистрации поглощения света фотосистемой I (Dual-PAM-100) и измерительную головку для их одновременно-

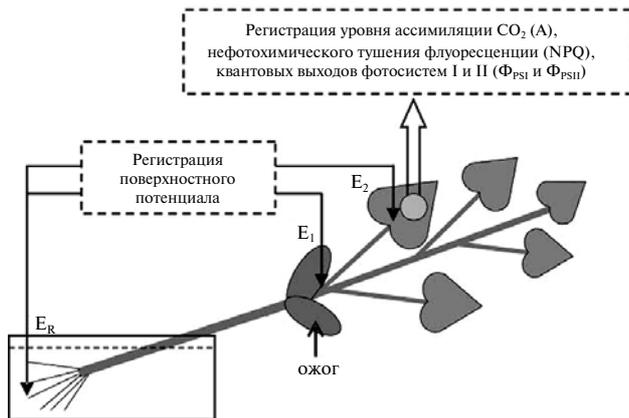


Рис. 1. Схема нанесения ожога, расположения электродов и регистрации параметров фотосинтеза у проростков тыквы. E_1 и E_2 — измерительные электроды, E_R — электрод сравнения. Стрелкой обозначена область нанесения локального ожога семядольного листа (открытое пламя, 3–4 с, ~2–3 см² поверхности)

го использования (Dual-PAM gas-exchange Cuvette 3010-Dual). В экспериментах на хлоропластах использовали только PAM-флуориметр. Длительность темновой адаптации составляла 20 мин (интактные растения) или 2 мин (выделенные хлоропласты), интенсивность последующего актиничного света (460 нм) равнялась 240 мкмоль м⁻² с⁻¹ (интактные растения) или 100 мкмоль м⁻² с⁻¹ (выделенные хлоропласты). Насыщающие вспышки следовали каждые 10 с. В экспериментах с интактными растениями концентрация углекислого газа в окружающей среде составляла 360 мкл л⁻¹, а относительная влажность — около 60%. В работе исследовали уровень ассимиляции CO₂ (A), нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) и квантовые выходы фотосистем I и II (Φ_{PSI} и Φ_{PSII}); параметры рассчитывали автоматически на основании подходов, представленных в работах [36–38]. Для исследования дыхания листа его газообмен измеряли в условиях полного затемнения.

Выделение хлоропластов осуществляли согласно предыдущим работам [30, 31]. 2 г настоящих листьев от одного проростка тыквы были гомогенизированы в 15 мл среды выделения (0,35 М NaCl в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,1) при температуре 4°. При той же температуре полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин (200 g), после чего супернатант подвергали вторичному центрифугированию в течение 15 мин (2000 g). Осажденные хлоропласты ресуспендировали в среде выделения (4 мл). При этом большинство хлоропластов сохраняло свою целостность, что было оценено визуально

по изображениям, полученным с использованием комплекса лазерной сканирующей микроскопии Carl Zeiss LSM 510 META («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия), включающего в себя инвертированный микроскоп Axiovert 200M, лазерный сканирующий модуль, спектральный модуль Carl Zeiss 23 META.

Связанные с ВП изменения pH цитоплазмы и апопласта определяли ратиометрическим методом [31] с помощью pH-чувствительных флуоресцентных зондов BCECF, AM и FITC-dextran («Life Technologies», США).

FITC-dextran, который использовали для измерения pH в апопласте, загружали путем 12–14 ч инкубации в темноте участка стебля с удаленным эпидермисом (2×10^{-5} М зонда), после чего стебель отмывали. Измерение флуоресценции осуществляли с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-5301PC, «Shimadzu», Япония) и специального модуля для исследования твердых образцов («Гранат», Россия). В качестве показателя pH использовали отношение интенсивности флуоресценции (520 нм) при длине волны возбуждающего света 490 нм к ее интенсивности при возбуждающем свете с длиной волны 460 нм. Для построения калибровочной кривой это отношение измеряли при разведении FITC-dextran в буферных растворах 20 мМ Tris-MES («Sigma-Aldrich», США) с pH от 5,0 до 8,0.

BCECF, AM, который использовали для измерения pH в цитоплазме, загружали путем 12–14-часовой инкубации в темноте участка стебля проростка с удаленным эпидермисом (2×10^{-5} М зонда) при температуре 4°, после чего стебель отмывали при комнатной температуре в течение не менее 2 ч. Отношение интенсивности флуоресценции (530 нм) при длине волны возбуждающего света 490 нм к ее интенсивности при возбуждающем свете с длиной волны 450 нм было использовано для определения pH цитоплазмы. Калибровочную кривую определяли согласно кривой для FITC-dextran (pH изменялся от 5,5 до 9,0).

Избирательность локализации BCECF, AM в цитоплазме и FITC-dextran в апопласте была подтверждена путем измерения флуоресценции зондов в различных участках внутри- и внеклеточного объема с помощью комплекса лазерной сканирующей микроскопии Carl Zeiss LSM 510 META («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

Биологическая повторность экспериментов составляла 5–15. На рис. 2–7 представлены либо типичные эксперименты, либо средние значения и их стандартное отклонение. Для серии опытов с выделенными хлоропластами приведена диаграмма рассеивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние переменного потенциала на фотосинтез проростков тыквы. Показано, что локальный ожог семядольного листа вызывал распространение по проростку тыквы электрического сигнала переменной формы (рис. 2). Амплитуда сигнала лежала в диапазоне от 14 до 84 мВ (67 ± 4 мВ в черешке листа и 50 ± 6 мВ в листовой пластинке), длительность фазы реполяризации могла достигать 20 мин и более, а скорость

распространения не превышала нескольких миллиметров в секунду. Время прохождения электрического сигнала в листовую пластинку не превышало одной минуты после ожога семядольного листа. Параметры электрического сигнала позволили классифицировать его как переменный потенциал [1–3, 11], что хорошо согласовывалось с данными наших предыдущих работ [30], показывающих генерацию и распространение ВП при ожоге семядольного листа у проростков тыквы.

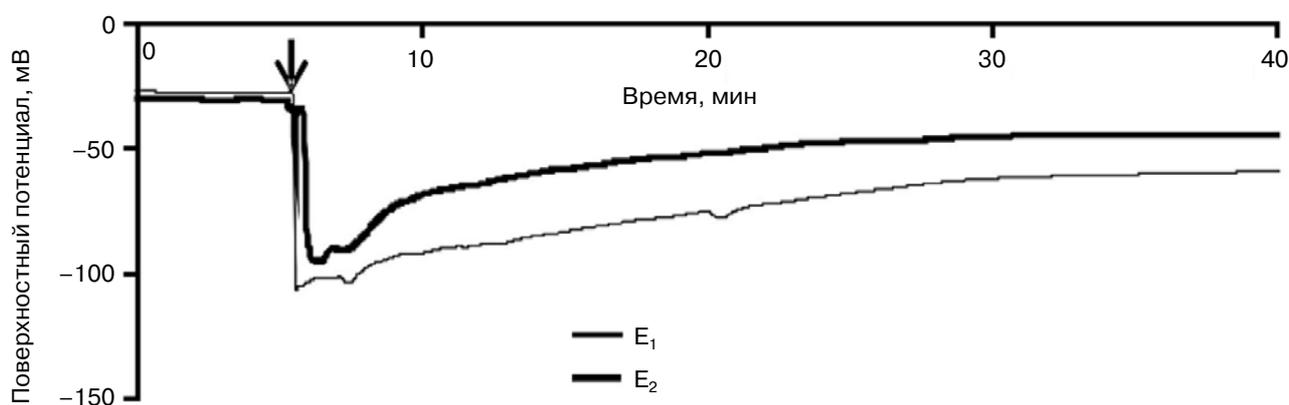


Рис. 2. Типичный пример вызванных локальным ожогом изменений поверхностного потенциала ($n = 15$). Стрелкой обозначен момент нанесения ожога

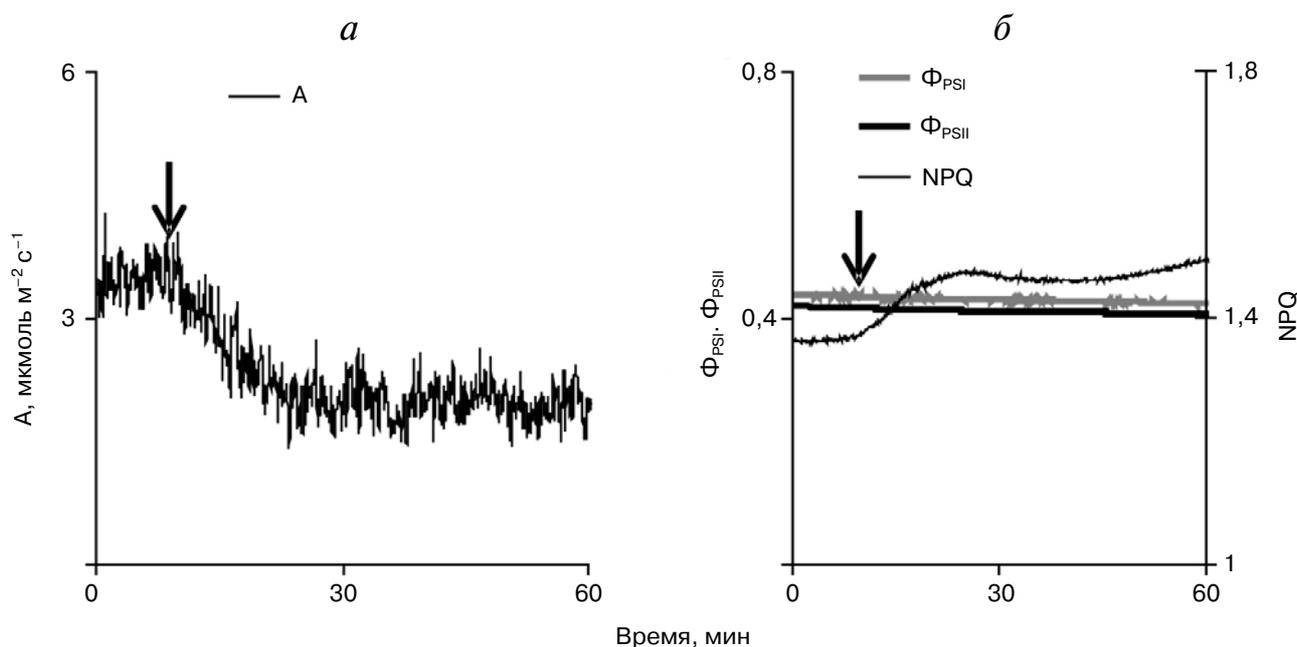


Рис. 3. Типичный пример вызванных локальным ожогом изменений интенсивности поглощения углекислого газа (а) и параметров световой стадии фотосинтеза (б) в листе проростка тыквы в условиях освещения ($n = 15$). А – уровень ассимиляции CO₂, Φ_{PSI} и Φ_{PSII} – квантовые выходы фотосистем I и II, NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции. Стрелкой обозначен момент нанесения ожога

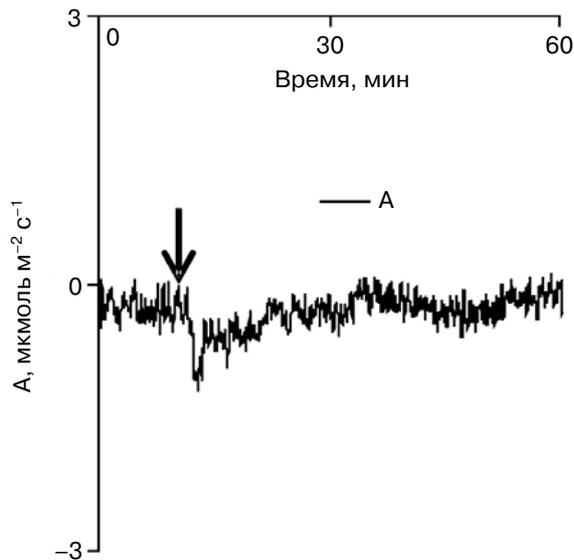


Рис. 4. Типичный пример вызванных локальным ожогом изменений интенсивности газообмена листа в условиях затемнения ($n = 5$). A – уровень ассимиляции CO_2 (отрицательные значения A соответствуют поглощению углекислого газа). Стрелкой обозначен момент нанесения ожога

Локальный ожог оказывал влияние на фотосинтетические процессы, вызывая длительное снижение уровня ассимиляции CO_2 в условиях освещения (рис. 3, *a*). Величина такого снижения равнялась $1,0 \pm 0,2$ мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, что сос-

тавляло $\sim 22\%$ от общего уровня ассимиляции углекислого газа на свету ($4,5 \pm 0,2$ мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). Время между началом развития ВП в листовой пластинке и началом снижения уровня ассимиляции углекислого газа составляло 76 ± 15 с. Снижение ассимиляции CO_2 достигало максимальной величины приблизительно через 12 мин после стимуляции.

При исследовании влияния локального ожога на параметры световой стадии фотосинтеза (рис. 3, *б*) наблюдалось лишь небольшое, медленно развивающееся возрастание нефотохимического тушения флуоресценции, величина которого составляла $0,16 \pm 0,03$. Время между началом развития ВП в листовой пластинке и началом возрастания NPQ составляло 134 ± 23 с, что было достоверно больше аналогичного времени для начала развития снижения ассимиляции CO_2 . Изменения величины квантовых выходов фотосистем I и II в большинстве экспериментов выявлены не были. Однако, в единичных опытах, в которых наблюдалась высокая амплитуда изменений A (~ 2 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и более), локальный ожог вызывал небольшое снижение квантовых выходов фотосистем I и II.

Анализ влияния локального ожога семядоли на газообмен настоящего листа в темноте показал, что в этих условиях наблюдается лишь небольшое и кратковременное снижение A (рис. 4). Повидимому, такое снижение отражало вызванную локальным ожогом активацию дыхания, которая ранее была показана у ряда растений [29, 31].

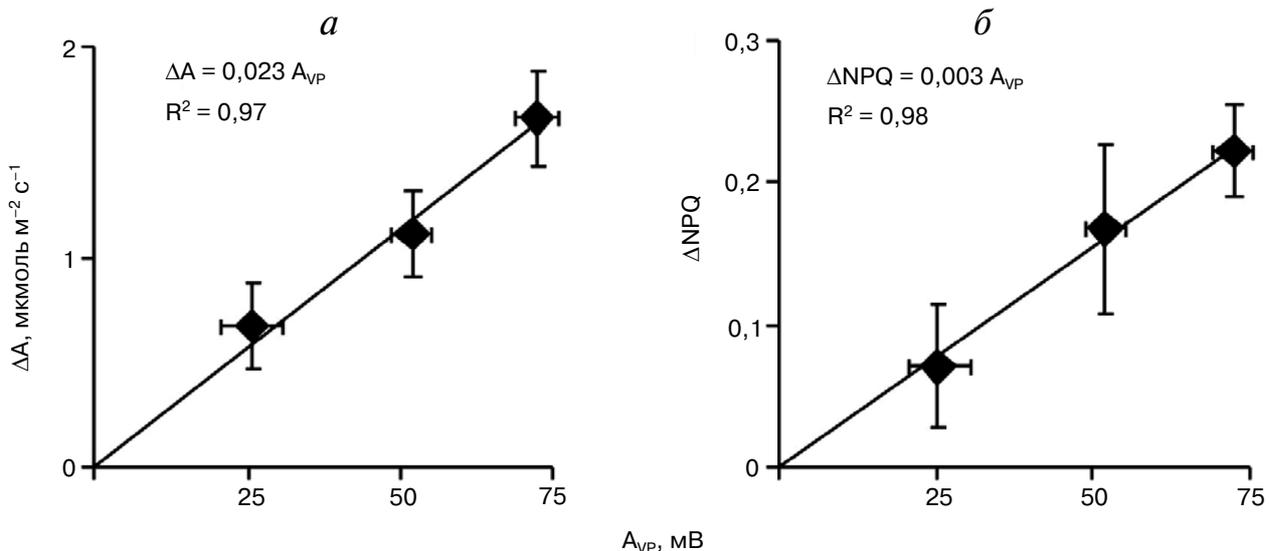


Рис. 5. Зависимость максимального снижения уровня ассимиляции CO_2 (*a*) и максимального возрастания нефотохимического тушения флуоресценции (*б*) от амплитуды переменного потенциала (A_{VP}) после ожога семядольного листа у проростков тыквы в условиях освещения ($n = 5$). R^2 – коэффициент детерминации

В то же время небольшая величина ($0,4 \pm 0,1$ мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) и длительность (несколько мин) реакции показывают, что ее вклад в наблюдаемые на свету изменения газообмена листа тыквы после ожога является незначительным. Вследствие этого, можно полагать, что вызванные локальным ожогом изменения газообмена листа обусловлены преимущественно фотосинтетическим ответом.

Для анализа связи между амплитудой ВП в листовой пластинке и изменениями А и NPQ в ней все растения в этой серии были ранжированы по возрастанию амплитуды, после чего разделены на три равные группы (с низкой, средней и высокой амплитудой переменного потенциала, $n = 5$). На рис. 5, а показана зависимость величины снижения уровня ассимиляции CO_2 от амплитуды ВП в группах. Такая зависимость имела выраженный линейный характер, причем различия между снижением А в группе с низкой амплитудой ВП и в группе с высокой амплитудой были достоверными. При использовании аналогичного подхода для анализа возрастания NPQ (рис. 5, б) также была выявлена линейная зависимость нефотохимического тушения флуоресценции от амплитуды ВП. Различия NPQ между группами с низкой и высокой амплитудой ВП были достоверными. Так как начало развития ВП предшествовало началу изменений фотосинтетических параметров, полученные результаты показывают, что именно

распространение переменного потенциала было, по-видимому, механизмом, индуцирующим фотосинтетический ответ у проростков тыквы.

Изменения внутри- и внеклеточного рН при генерации переменного потенциала. Согласно нашим [31] и литературным [27] данным изменения внутри- и внеклеточного рН могут быть механизмом влияния ВП на фотосинтез высших растений. Для проверки такого предположения был исследован рН апопласта и цитоплазмы клеток тыквы в условиях генерации переменного потенциала.

Анализ рН апопласта был осуществлен с помощью ратиометрического, рН-чувствительного флуоресцентного зонда FITC-dextran. Показано, что величина рН апопласта в условиях покоя отличалась высокой вариабельностью и составляла, в среднем, $5,80 \pm 0,14$. При распространении ВП наблюдалось защелачивание апопласта (рис. 6, а), причем максимальное возрастание рН достигала $0,40 \pm 0,07$ (рис. 6, в). Общая длительность увеличения рН апопласта существенно варьировала, равняясь, в среднем, 8 мин.

Величина рН цитоплазмы была определена с помощью ратиометрического, рН-чувствительного флуоресцентного зонда BCECF, AM. В условиях покоя рН цитоплазмы в клетках проростков тыквы составлял $6,90 \pm 0,10$. Распространение ВП вызывало закисление цитоплазмы (рис. 6, б), максимальное снижение рН при этом

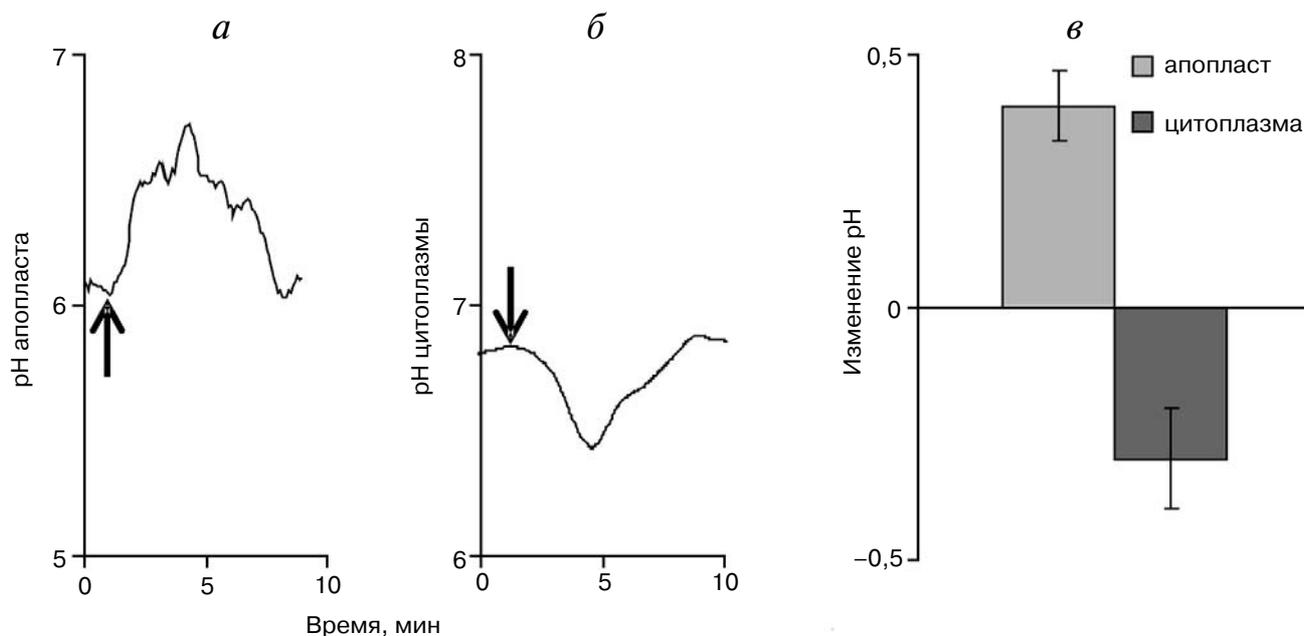


Рис. 6. Типичные примеры изменения рН апопласта (а) и цитоплазмы (б) после индукции переменного потенциала и максимальные значения таких изменений (в) ($n = 8-12$). Стрелкой обозначен момент нанесения ожога

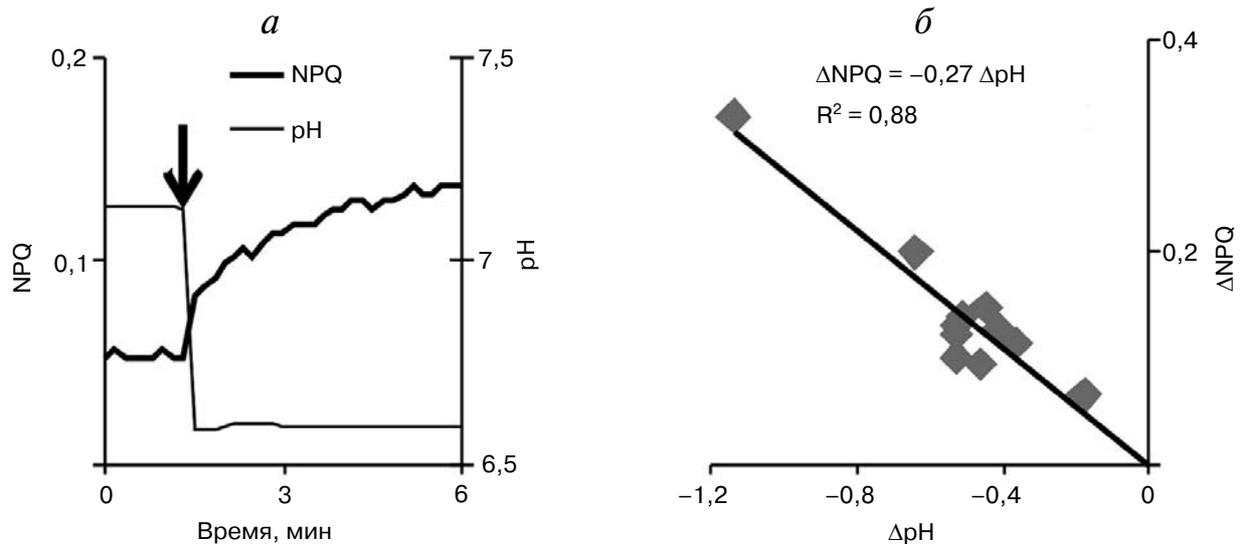


Рис. 7. Пример изменения нефотохимического тушения флуоресценции у выделенных хлоропластов тыквы при снижении pH среды инкубации (а) и диаграмма рассеяния, показывающая зависимость возрастания NPQ от величины снижения pH (б) ($n = 12$). pH среды инкубации меняли путем добавления 0,1 М HCl, момент добавления обозначен стрелкой. R^2 – коэффициент детерминации

равнялось $0,30 \pm 0,10$ (рис. 6, в). Общая длительность изменений pH цитоплазмы составляла ~8 мин.

Влияние закисления среды инкубации на нефотохимическое тушение выделенных хлоропластов тыквы. Наличие связанных с ВП изменений pH апопласта и цитоплазмы делает актуальным вопрос о возможности влияния таких изменений на фотосинтез у проростков тыквы. Ранее нами было качественно показано [30], что закисление среды инкубации может вызывать возрастание нефотохимического тушения изолированных хлоропластов у проростков тыквы. Задачей настоящего исследования стал анализ зависимости возрастания NPQ от величины закисления среды инкубации, которое имитировало закисление цитоплазмы при развитии ВП.

Показано (рис. 7, а), что закисление среды инкубации хлоропластов тыквы (добавление различных объемов 0,1 М HCl) вызывало у них возрастание NPQ, которое развивалось в течение нескольких минут после добавления кислоты. При этом в исследованном диапазоне изменений pH (начальный уровень – ~7,1, минимальный уровень – ~6,0) величина возрастания NPQ линейно повышалась с ростом величины закисления (рис. 7, б). Важно отметить, что значительное возрастание нефотохимического тушения (~40% от начального уровня) наблюдалось при снижении pH на 0,3 единицы, что соответствовало уменьшению pH в цитоплазме при ВП.

Существенных изменений Φ_{PSI} и Φ_{PSII} выявлено не было (данные не приведены), что согласуется с отсутствием их изменений в экспериментах на интактном растении и ранее полученными нами данными [30].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время существует большое количество работ [19, 22–33], в которых показано, что локальная стимуляция растения может вызывать быструю и обратимую инактивацию фотосинтеза в нераздраженных листьях, что обычно связывают с генерацией и распространением электрических сигналов. Однако количество исследований, в которых был проведен экспериментальный анализ участия электрических сигналов в инактивации фотосинтеза высших растений, достаточно ограничено [27, 29, 32]. При этом существуют две группы аргументов в пользу ключевой роли таких сигналов в формировании фотосинтетического ответа. Во-первых, было показано [27], что при удалении от проводящих пучков, являющихся основным каналом распространения ВП, инактивация фотосинтеза развивается позже. Кроме того, более позднее начало фотосинтетического ответа наблюдается и при возрастании расстояния от зоны повреждения. Во-вторых, установлено [29, 32], что прохождение ВП в лист является необходимым условием развития быстрой инактивации фото-

синтеза. Важным результатом настоящей работы стало выявление связи между амплитудой ВП и величиной фотосинтетического ответа, что с одной стороны является новым аргументом в пользу ключевой роли электрических сигналов в развитии инактивации фотосинтеза, а с другой — служит основой для анализа механизмов влияния переменного потенциала на фотосинтез.

Обратимая инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны клеток растения считается основным механизмом генерации ВП [3, 7, 11]. Важным следствием такой инактивации является закисление цитоплазмы и защелачивание апопласта растительных клеток [27, 31], величины которых коррелируют с амплитудой ВП [31]. Согласно предложенной ранее гипотезе [31], основанной на экспериментах с проростками гороха, изменения внутри- и внеклеточного pH могут быть ключевым механизмом в развитии быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной ВП у высших растений. Показанные нами изменения pH апопласта и цитоплазмы, сопровождающие развитие переменного потенциала у проростков тыквы, а также возрастание NPQ суспензии хлоропластов при имитации закисления цитоплазмы подтверждают предложенную гипотезу и показывают ее применимость к различным растительным объектам. Вследствие этого становится актуальным вопрос — каким образом закисление цитоплазмы и защелачивание апопласта может вызывать обратимую инактивацию фотосинтеза у растений?

Согласно ряду работ [28, 29, 31–33], снижение активности темновой стадии является начальным этапом развития фотосинтетического ответа, вызванного электрическими сигналами. Полученные в настоящей работе результаты также согласуются с данной гипотезой. У проростков тыквы наблюдается, в среднем, только относительно небольшое снижение ассимиляции CO_2 в ответ на ВП (~22% от уровня ассимиляции на свету) и в большинстве случаев отсутствуют изменения квантовых выходов фотосистемы I и II. Однако у отдельных проростков величина снижения ассимиляции может быть существенно выше (>40%) и в этом случае при ВП развивается также небольшое уменьшение Φ_{PSI} и Φ_{PSII} . При этом ранее проведенные нами исследования [31, 32] показали, что у проростков гороха ВП вызывает снижение уровня ассимиляции на 55% и уменьшение квантовых выходов фотосистем на ~0,10. У герани уменьшение ассимиляции составляет ~100% от уровня поглощения CO_2 на свету [29], в то время как квантовые выходы фотосистем снижаются на 0,15–0,20. На основании этого можно заключить, что

именно снижение поглощения CO_2 является одним из ключевых механизмов развития фотосинтетического ответа на ВП, причем если такое снижение ниже определенного уровня (<40% от уровня ассимиляции углекислого газа на свету), то оно не оказывает значимого влияния на квантовые выходы фотосистем.

Уменьшение поступления CO_2 в клетку может быть одним из механизмов снижения активности темновой стадии фотосинтеза при ВП [31]. Известно [39, 40], что у высших растений CO_2 проходит через биологические мембраны преимущественно в нейтральной форме, в то время как транспорт заряженных форм, в первую очередь ионов гидрокарбоната, затруднен. Пренебрегая обратным переносом углекислого газа из цитоплазмы в среду, можно принять, что поток CO_2 в клетку через плазматическую мембрану растений (J_{CO_2}) описывается уравнением (1):

$$J_{CO_2} = kC \frac{1}{1 + 10^{pH_a - pK}}, \quad (1)$$

где C — общая концентрация CO_2 , $pK = 6,35$ — отрицательный десятичный логарифм константы равновесия реакции $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ [39], pH_a — pH апопласта, k — константа пропорциональности, зависящая от проницаемости плазматической мембраны для CO_2 . Считая C и k постоянными, с помощью уравнения (2) можно оценить величину снижения потока CO_2 внутрь клетки при защелачивании апопласта в ходе развития ВП:

$$\text{Снижение } J_{CO_2}, \% = 100 \cdot \left(1 - \frac{1 + 10^{pH_a - pK}}{1 + 10^{pH_a + \Delta pH_a - pK}}\right), \quad (2)$$

где ΔpH_a — максимальное изменение pH апопласта во время ВП. Если принять, что изменения pH_a в условиях их регистрации и при развитии фотосинтетического ответа приблизительно равны, то, подставив в уравнение (2) значения pH_a 5,8 и ΔpH_a 0,4 (рис. 6, в), можно оценить снижение потока CO_2 , связанного с защелачиванием апопласта при ВП. Такое снижение составляет около 25%, что достаточно близко к наблюдаемому в эксперименте уменьшению уровня ассимиляции CO_2 (22%). Таким образом, снижение поступления углекислого газа через плазматическую мембрану может быть одним из механизмов влияния изменения pH апопласта на фотосинтез.

В то же время влияние pH на NPQ наблюдается также в суспензии хлоропластов, где описанный механизм отсутствует. Можно предпо-

ложить, что в этом случае закисление среды инкубации приводит к входу протонов в строму и люмен хлоропластов [31]. Снижение pH люмена в свою очередь является основным механизмом развития энергозависимого тушения флуоресценции [37], т.е. повышения NPQ. Такой механизм инактивации фотосинтеза уже не будет связан со снижением активности его темновой стадии, что хорошо согласуется с ранее полученными нами данными [29, 31, 33] о существовании также прямого влияния ВП на световую стадию фотосинтеза высших растений.

Отдельно следует отметить вопрос, почему вызванное ВП снижение NPQ не приводит к уменьшению квантовых выходов фотосистем у проростков тыквы. Можно предположить, что это связано с относительно низкой величиной такого снижения, наблюдающейся у проростков тыквы ($\Delta NPQ = 0,15$). Ранее нами было показано [31, 32], что снижение внешней концентрации углекислого газа до близких к нулю значений приводит к подавлению ассимиляции CO_2 и позволяет исключить инактивацию темновой стадии из вызванного ВП фотосинтетического ответа. В этих условиях индуцированные ВП изменения световых показателей составляют $\Delta NPQ \approx 0,75$, $\Delta \Phi_{PSI} \approx -0,04$ и $\Delta \Phi_{PSII} \approx -0,04$ [31]. Такой результат показывает, что даже увеличение NPQ, которое в пять раз превосходит ответ, выявленный ВП у проростков тыквы, индуцирует лишь относительно небольшие изменения квантовых выходов фотосистем. На основании

этого можно заключить, что вызванные ВП изменения нефотохимического тушения у проростков тыквы слишком малы по своей величине, чтобы индуцировать существенное снижение квантовых выходов фотосистем.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что связанные с генерацией ВП изменения внутри- и внеклеточного pH являются важным механизмом развития быстрой инактивации фотосинтеза у проростков тыквы, свидетельствуя в пользу универсального характера такого механизма у высших растений. Дальнейшее развитие ответа может быть связано как со снижением активности темновой стадии фотосинтеза [28, 31–33], так и с pH-зависимыми изменениями процессов световой стадии [31]. При этом, можно предполагать [32, 33], что следствием индуцированной ВП инактивации фотосинтеза является накопление избытка АТФ в клетке [28, 29, 32], активация циклического потока вокруг фотосистемы I [33], образование активных форм кислорода [41–43], рост нефотохимического тушения флуоресценции [31–33] и др. По-видимому, конечным результатом всех этих процессов является повышение устойчивости фотосинтетического аппарата и растения в целом к действию неблагоприятных факторов [32, 34, 35].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (контракт № 6.2050.2014/К).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Оприлов В.А., Пятагин С.С., Ретивин В.Г. (1991) *Биоэлектрогенез высших растений*, Наука, Москва.
- Davies, E. (2006) in *Plant Electrophysiology. Theory and Methods* (Volkov, A.G., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y., pp. 407–422.
- Fromm, J., and Lautner, S. (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants, *Plant Cell Environ.*, **30**, 249–257.
- Dziubinska, H. (2003) Ways of signal transmission and physiological role of electrical potential in plants, *Acta Soc. Bot. Polon.*, **72**, 309–318.
- Felle, H.H., and Zimmermann, M.R. (2007) Systemic signaling in barley through action potentials, *Planta*, **226**, 203–214.
- Воденеев В.А., Оприлов В.А., Пятагин С.С. (2006) Обратимое изменение внеклеточного pH при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo*, *Физиология растений*, **53**, 538–545.
- Stahlberg, R., and Cosgrove, D.J. (1996) Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L., *Planta*, **200**, 416–425.
- Воденеев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова Л.А., Сухов В.С. (2011) Анализ роли ионов Ca^{2+} , H^+ , Cl^- в генерации переменного потенциала у высшего растения *Cucurbita pepo* L., *Физиология растений*, **58**, 826–833.
- Katicheva, L., Sukhov, V., Akinchits, E., and Vodeneev, V. (2014) Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1511–1519.
- Sukhov, V., Akinchits, E., Katicheva, L., and Vodeneev, V. (2013) Simulation of variation potential in higher plant cells, *J. Membr. Biol.*, **246**, 287–296.
- Stahlberg, R., Robert, E., Cleland, R.E., and van Vollenburgh, E. (2006) in *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life* (Baluska, F., Mancuso, S., and Volkmann, D., eds), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 291–309.
- Malone, M. (1994) Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L., *New Phytol.*, **128**, 49–56.
- Mancuso, S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*, *Aust. J. Plant Physiol.*, **26**, 55–61.
- Vodeneev, V., Orlova, A., Morozova, E., Orlova, L., Akinchits, E., Orlova, O., and Sukhov, V. (2012) The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves. *J. Plant Physiol.*, **169**, 949–954.
- Пятагин С.С., Оприлов В.А., Воденеев В.А. (2008) Сигнальная роль потенциала действия у высших растений, *Физиология растений*, **55**, 312–319.
- Stankovic, B., and Davies, E. (1996) Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato, *FEBS Lett.*, **390**, 275–279.

17. Fisahn, J., Herde, O., Willmitzer, L., and Pena-Cortes, H. (2004) Analysis of the transient increase in cytosolic Ca^{2+} during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca^{2+} transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression, *Plant Cell Physiol.*, **45**, 456–459.
18. Dziubinska, H., Filek, M., Koscielniak, J., and Trebacz, K. (2003) Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of *Vicia faba* minor seedlings, *J. Plant Physiol.*, **160**, 1203–1210.
19. Hlavackova, V., Krchnak, P., Naus, J., Novak, O., Spundova, M., and Strnad, M. (2006) Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning, *Planta*, **225**, 235–244.
20. Fromm, J., and Bauer, T. (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation, *J. Exp. Bot.*, **45**, 463–469.
21. Filek, M., and Koscielniak, J. (1997) 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.*, **123**, 39–46.
22. Fromm, J., and Fei, H. (1998) Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil, *Plant Sci.*, **132**, 203–213.
23. Pena-Cortes, H., Fisahn, J., and Willmitzer, L. (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4106–4113.
24. Bulychev, A.A., Kamzolkina, N.A., Luengviriya, J., Rubin, A.B., and Muller, S.C. (2004) Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells, *J. Membr. Biol.*, **202**, 11–19.
25. Krupenina, N.A., and Bulychev, A.A. (2007) Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 781–788.
26. Krupenina, N.A., Bulychev, A.A., Roelfsema, M.R.G., and Schreiber, U. (2008) Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 681–688.
27. Grams, T.E.E., Lautner, S., Felle, H.H., Matyssek, R., and Fromm, J. (2009) Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf, *Plant Cell Environ.*, **32**, 319–326.
28. Pavlovic, A., Slovakova, L., Pandolfi, C., and Mancuso, S. (2011) On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis), *J. Exp. Bot.*, **62**, 1991–2000.
29. Sukhov, V., Orlova, L., Mysyagin, S., Sinitsina, J., and Vodeneev, V. (2012) Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium, *Planta*, **235**, 703–712.
30. Сухов В.С., Сурова Л.М., Шерстнева О.Н., Румянцев Е.А., Воденеев В.А. (2013) Влияние варибельного потенциала на фотосинтез проростков тыквы (*Cucurbita pepo* L.), *Биофизика*, **58**, 468–473.
31. Sukhov, V., Sherstneva, O., Surova, L., Katicheva, L., and Vodeneev, V. (2014) Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea, *Plant Cell Environ.*, **37**, 2532–2541.
32. Sukhov, V., Surova, L., Sherstneva, O., and Vodeneev, V. (2014). Influence of variation potential on resistance of the photosynthetic machinery to heating in pea, *Physiol. Plant.*, **152**, 773–783.
33. Sukhov, V., Surova, L., Sherstneva, O., Katicheva, L., and Vodeneev, V. (2015) Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea, *Front. Plant Sci.*, **5**, 766.
34. Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Федупина С.Б. (1997) Преадаптация тканей стебля *Cucurbita pepo* к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалами действия, *Физиология растений*, **44**, 499–510.
35. Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Лобов С.А., Тараканов С.А., Худяков В.А. (1999) Модификация устойчивости фотосинтезирующих клеток к охлаждению и прогреву после раздражения корней раствором KCl, *Физиология растений*, **46**, 790–798.
36. Klughammer, C., and Schreiber, U. (2008) Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I, *PAM Application Notes*, **1**, 11–14.
37. Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide, *J. Exp. Bot.*, **51**, 659–668.
38. von Caemmerer, S., and Farquhar, G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, *Planta*, **153**, 376–387.
39. Булычев А.А., Черкашин А.А., Вреденберг В., Рубин А.Б., Зыков В.С., Мюллер С.Х. (2001) Флуоресценция и фотосинтетическая активность хлоропластов в кислых и щелочных зонах клеток *Chara corallina*, *Физиология растений*, **48**, 384–391.
40. Tholen, D., and Zhu, X.-G. (2011) The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO_2 diffusion, *Plant Physiol.*, **156**, 90–105.
41. Kim, K., and Portis, A.R., Jr. (2004) Oxygen-dependent H_2O_2 production by Rubisco, *FEBS Lett.*, **571**, 124–128.
42. Mubarakshina, M.M., and Ivanov, B.N. (2010) The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes, *Physiol. Plant.*, **140**, 103–110.
43. Mubarakshina-Borisova, M.M., Kozuleva, M.A., Rudenko, N.N., Naydov, I.A., Klenina, I.B., and Ivanov, B.N. (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1314–1321.

**PARTICIPATION OF INTRACELLULAR
AND EXTRACELLULAR pH CHANGES
IN PHOTOSYNTHETIC RESPONSE
DEVELOPMENT INDUCED BY VARIATION
POTENTIAL IN PUMPKIN SEEDLING**

**O. N. Sherstneva, V. A. Vodeneev, L. A. Katicheva,
L. M. Surova, V. S. Sukhov***

*N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod 603950, Russia;
E-mail: vssuh@mail.ru*

Received January 12, 2015
Revision received March 09, 2015

Electrical signals, namely action potential and variation potential (VP), can induce transient inactivation of photosynthesis in plants. Intracellular and extracellular pH changes during VP generation are potential mechanisms of photosynthetic response induction; however, this hypothesis requires additional experimental investigation. The aim of this study was to investigate participation of intracellular and extracellular pH changes in photosynthetic response induction. It was found that cotyledon burning induced VP, which propagated into leaves, decreased photosynthetic CO₂ assimilation rate, and increased non-photochemical quenching; respiration was weakly activated after variation potential. The magnitude of the photosynthetic response depended on VP amplitude in linear manner. Intracellular and extracellular H⁺ concentrations were investigated by means of pH-sensitive fluorescence dyes. It was found that VP generation was accompanied with apoplast alkalization (0.4 pH unit) and cytoplasm acidification (0.3 pH unit). The influence of changes in pH of incubation medium on non-photochemical quenching of isolated chloroplasts was also investigated. It was found that acidification of the medium stimulated non-photochemical quenching, and the magnitude of this stimulation depended on extent of pH decrease. Our results support participation of intracellular and extracellular pH changes in induction of photosynthetic response caused by VP. Potential mechanisms of the influence of pH changes on photosynthesis are discussed.

Key words: *Cucurbita pepo*, pH, CO₂ assimilation, variation potential, non-photochemical quenching, chloroplasts