

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Птушенко Василий Витальевич

**Фотозащита оксигенных фототрофных организмов при действии
стрессовых факторов различной природы**

1.5.2. Биофизика

1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена в отделах фотобиофизики и биоэнергетики
Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени
А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный консультант: **Соловченко Алексей Евгеньевич,**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Булычев Александр Александрович,**
доктор биологических наук, доцент,
кафедра биофизики биологического
факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,
профессор

Борисова Мария Мансуровна,
доктор биологических наук,
Институт фундаментальных проблем
биологии РАН — обособленного
подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН,
ведущий научный сотрудник, зам.
директора по научной работе

Стадничук Игорь Николаевич,
доктор биологических наук,
Институт физиологии растений имени
К.А. Тимирязева РАН,
ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «14» марта 2024 г. в 14 часов 00 минут на
заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова по адресу:
119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, аудитория «Новая».
E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на
портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.5/2820>
Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук П.В. Фурсова



ОГЛАВЛЕНИЕ

I.	Введение. Общая характеристика работы. Актуальность проблемы.....	3
I.1.	Актуальность исследования	8
I.2.	Цель исследования	9
I.3.	Задачи исследования	9
I.4.	Научная новизна	10
I.5.	Положения, выносимые на защиту.....	10
I.6.	Личный вклад автора.....	11
I.7.	Апробация работы	12
I.8.	Публикации	12
I.9.	Структура и объем диссертации	12
II.	Содержание работы	13
III.	Заключение	40
IV.	Выводы.....	42
V.	Основные публикации Птушенко Василия Витальевича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях	44

I. Введение. Общая характеристика работы. Актуальность проблемы

К настоящему времени детально изучена структура фотосинтетического аппарата растений, последовательность фотоиндуцированных реакций, протекающих в нём. Началом всей цепочки реакций является поглощение кванта света пигментами фотосинтетической антенны. Образовавшееся возбуждённое электронное состояние молекул пигмента, в конечном итоге, захватывается реакционным центром одной из фотосистем. Происходящее вследствие этого первичное разделение зарядов вызывает перенос электрона, сопряжённый с переносом протонов внутрь тилакоидов (замкнутые мембранные образования внутри хлоропластов). Образовавшийся протонный потенциал используется для синтеза АТФ, а перенесённые по всей цепи электроны — для образования восстановительной силы (NADPH). АТФ и NADPH в дальнейшем используются в биосинтетических реакциях и, в первую очередь, в реакциях фиксации углерода (Говинджи и др. 1987; Рубин 2017).

Однако свет, необходимый растениям для фотосинтеза, представляет опасность при избыточных дозах облучения: «лишний» свет приводит к накоплению электронно-возбуждённых состояний основного фотосинтетического пигмента, хлорофилла, которые, в свою очередь, провоцируют окислительный стресс (Apel and Hirt 2004; Sharma et al. 2012). В связи с этим все ныне живущие группы растений выработали механизмы защиты от избыточного освещения (рис. 1). К защитным механизмам относятся различные способы снижения количества поглощаемого света, отличающиеся по механизму и характерным временам функционирования, (i) на уровне листа в целом (изменение формы или расположения листа по отношению к падающему свету, образование защитного опушения или окраски, экранирующих фотосинтетический аппарат (Соловченко и Мерзляк 2010)), (ii) на уровне клетки (фототропин-зависимое перемещение хлоропластов (Kasahara et al. 2002; Heber et al. 2007; Suetsugu et al. 2016)) или (iii) отдельных пигмент-белковых комплексов (изменение организации и количества фотосинтетических антенн при каждом реакционном центре (Anderson and Andersson 1988; Wientjes et al. 2013)).

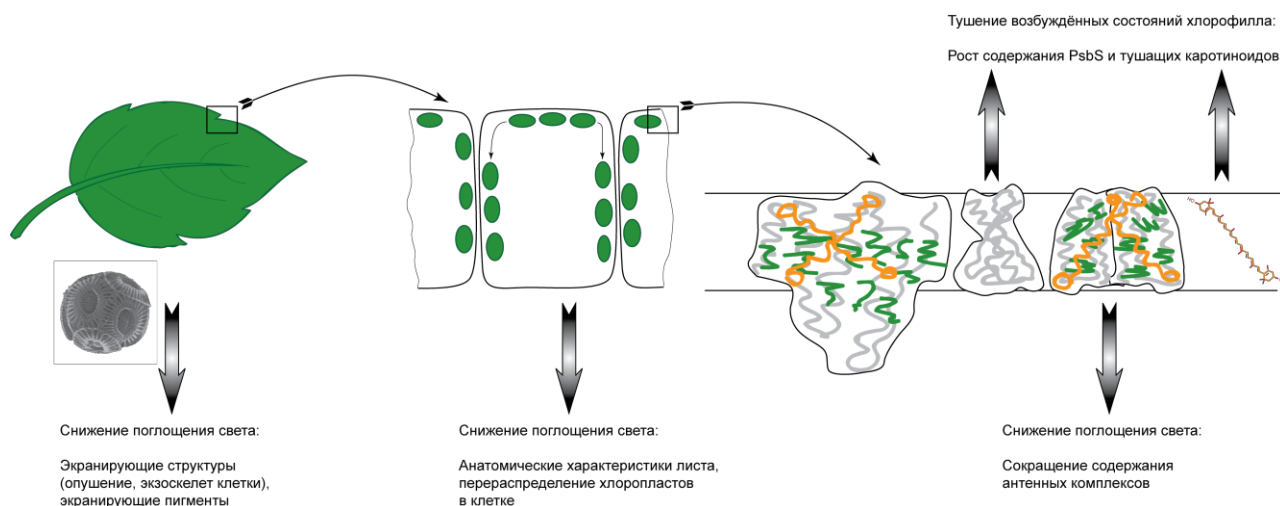


Рис. 1. Основные механизмы защиты ФСА от избыточного освещения

Следующим «рубежом обороны» служат (iv) механизмы дезактивации возбуждённых молекул хлорофилла, к которой относят «нефотохимическое тушение», при котором происходит тушение флуоресценции хлорофилла

(Niyogi and Truong 2013; Demmig-Adams et al. 2014; Ruban 2016). В нефотохимическом тушении (НФТ) активируется тепловая диссипация энергии возбуждённых состояний хлорофилла. Выделяют несколько фаз НФТ (по механизму и характерному времени индукции), наиболее существенной и быстрой из которых является так называемое энергозависимое тушение (qE). qE, которое непосредственно активируется при энергизации тилакоидной мембраны, начинает проявляться при величине трансмембранной разности pH около единицы и далее растёт с ростом ΔpH (Johnson and Ruban 2011). Другими компонентами qE служат (iv-a) некоторые формы каротиноидов (у высших растений и зелёных водорослей это, в первую очередь, зеаксантин и антераксантин; у других групп водорослей ту же роль могут играть другие каротиноиды, например, диатоксантин у диатомовых водорослей) и (iv-b) белки, схожие по строению с белками фотосинтетической антенны. У высших растений это — преимущественно PsbS, компонент фотосистемы II (ФСII), у водорослей — LhcSR и близкие к нему LHCX белки. Схема, иллюстрирующая пути активации НФТ в хлоропластах, приведена на рис. 2.

Активные формы кислорода (АФК), которые хотя и могут образовываться в хлоропластах несмотря на перечисленные выше механизмы защиты, (v) дезактивируются антиоксидантными ферментами клетки (Edreva 2005; Sharma et al. 2012). «Первичные» АФК (непосредственно образуемые при взаимодействии O_2 с ФСА), синглетный кислород (1O_2) и супероксид (O_2^-), живут в условиях клетки относительно недолго (порядка 10^{-6} с и 10^{-1} с, соответственно), но достаточно, для диффузии на заметное расстояние от места образования (10^{-7} м и 10^{-5} м) (Khorobrykh et al. 2020; (Dmitrieva et al. 2020). Вместе с тем, O_2^- при дисмутации образует пероксид водорода, который, наряду с участием в окислительных реакциях, играет сигнальную роль (Khorobrykh et al. 2020). Наконец, наряду со всеми этими механизмами защиты в хлоропластах происходит (vi) активный ре-синтез повреждённых компонентов фотосинтетического аппарата (ФСА) (Nishiyama and Murata 2014).

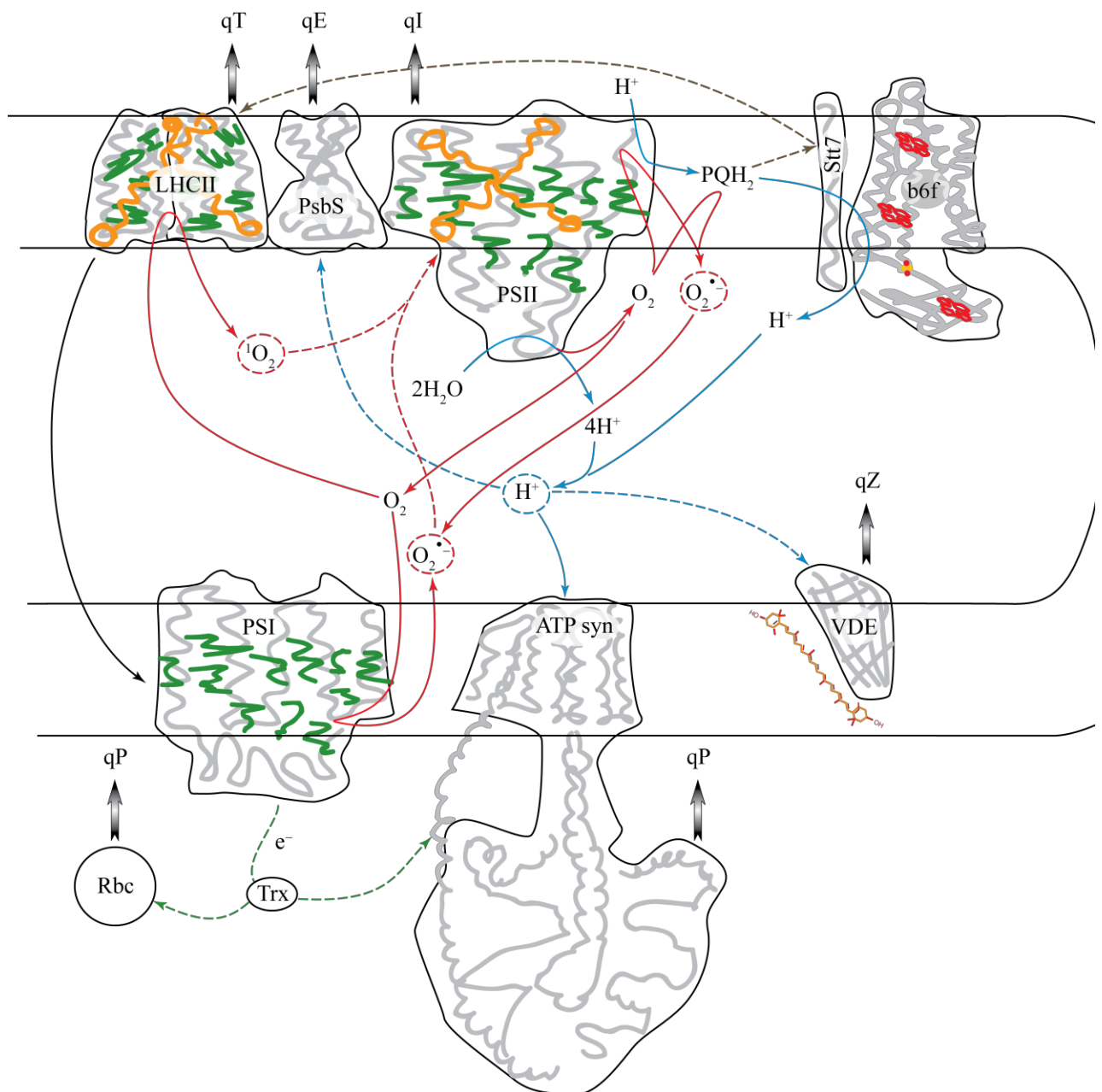


Рис. 2. Основные пути активации НФТ в хлоропластах

Избыточность падающего на растение света по отношению к его потребностям определяется не только собственно 1) интенсивностью освещения, но и 2) другими экологическими факторами: температурой, доступностью воды и элементов минерального питания, газовым составом атмосферы, наличием в атмосфере или почве загрязнителей, оказывающих ингибирующее действие на процессы фотосинтеза или иные физиологические функции растения. Имеет значение также 3) спектральный состав света, получаемого растением. При отклонении какого-либо из перечисленных

экологических факторов от области оптимальных значений растение оказывается в стрессовых условиях, в условиях угнетения тех или иных его физиологических функций. Угнетение какой-либо функции, как правило, приводит к снижению интенсивности ассимиляции и последующего использования атмосферного углерода растением. Это, в свою очередь, снижает использование растением продуктов световой фазы фотосинтеза и тем самым приводит к перевосстановлению компонентов электрон-транспортной цепи (пула хинонов и кофакторов на акцепторных участках ФСІ и ФСІІ), которая, в итоге, становится местом генерации АФК при восстановлении акцепторной части ФСІІ за счёт одноэлектронного восстановления кислорода до O_2^- или же образования 1O_2 в антеннах ФСІІ. Таким образом, понижается порог стрессового воздействия падающего света. Таким образом, практически любые неблагоприятные воздействия на растение, в конечном итоге, создают условия избыточности света для обеспечения нормальной работы ФСА, вызывая в итоге окислительный стресс. ФСА в этих условиях оказывается одним из наиболее уязвимых элементов растительного организма и одновременно ключевым рубежом его защиты от воздействия стрессовых факторов. Это делает вопрос о функционировании ФСА в условиях стресса и механизмах его защиты от избыточного освещения актуальным как для фундаментальных, так и прикладных исследований. Из сказанного выше видно, что любые стрессовые условия в конечном итоге провоцируют развитие светового стресса и активацию всего набора фотозащитных механизмов ФСА. Однако роль отдельных механизмов в общей светозащитной реакции и то, в какой степени они характерны для стрессовых факторов разной природы, во многих случаях остаётся неясным. Так, остаются неясны общие закономерности профилей активации светозащитных реакций под действием различных стрессовых факторов (под профилем активации мы далее будем понимать совокупность динамических характеристик светозащитных механизмов, описывающих их степень и динамику активации в ходе ответа на стрессовое воздействие). В то же время, понимание этих закономерностей позволило бы глубже понять

принципы адаптации ФСА к изменяющимся условиям среды и уточнить наши представления о механизмах устойчивости фотосинтетической функции к действию неблагоприятных экологических факторов. В связи с этим, в данной работе изучены профили активации светозащитных реакций ФСА при действии различных стрессовых факторов и проанализирована роль отдельных светозащитных механизмов ФСА в общем стресс-индуцированном ответе. Целью работы состояла в том, чтобы определить стратегию использования растением разных защитных процессов и выявить их роль при различных стрессовых воздействиях.

I.1. Актуальность исследования

Вопросы регуляции процессов поглощения и утилизации энергии света и их интеграции с центральным метаболизмом в неблагоприятных условиях внешней среды являются в настоящее время одним из наиболее актуальных направлений в науке (Neto et al. 2021; Xu & Fu 2022) и находятся в центре внимания исследовательских групп по всему миру (Demmig-Adams et al. 2012; Demmig-Adams et al. 2014; Colombo et al. 2016; Fernández-Marín et al. 2016). Ответ на стрессовые воздействия, как одно из проявлений такой регуляции, является центром интереса многочисленных научных исследований, как фундаментальных, так и прикладных, связанных с использованием растений в качестве источника питания и сырья для различных производств, задач биоремедиации и проч. (Kleine et al. 2021; Idi et al. 2015; Jha et al. 2017). Наряду с очевидной практической важностью исследований реакции растительного организма, и, в частности, его фотосинтетических (или, шире, метаболических) процессов в ответ на стресс, эти исследования имеют огромное фундаментальное значение для понимания принципиальных основ устойчивости метаболизма, значимости разных регуляторных факторов и характера реакции организма на них, общности и специфики ответа на стрессовые факторы разной природы. Данное сравнительное исследование

широкого спектра модельных объектов из контрастных экологических и систематических групп фотоавтотрофных организмов направлено на решение актуальной задачи — выяснение принципов совместного использования различных защитных механизмов растением для обеспечения устойчивости ФСА к стрессу.

I.2. Цель исследования

Цель работы — выяснить роль конкретных фотозащитных механизмов у оксигенных фототрофных организмов при световом стрессе, индуцированном стрессовыми факторами различной природы.

I.3. Задачи исследования

1. Выявить роль различных фотозащитных механизмов фотосинтетического аппарата (ФСА) оксигенных фототрофных организмов на избыточное освещение в различных стрессовых условиях.
2. Оценить роль экологических характеристик растения в активации светозащитного ответа ФСА.
3. Установить динамические закономерности активации фотозащитных механизмов с разными характерными временами индукции фотозащитных реакций в ответ на изменения интенсивности освещения и действие положительных низких температур, изучить влияние содержания диоксида углерода и кислорода в среде на индукцию защитных механизмов ФСА.
4. Исследовать факторы, определяющие эффективность работы ФСА в условиях освещения разного спектрального состава.
5. Изучить активацию рН-, редокс- и пигмент-зависимых фотозащитных механизмов в условиях неоптимальных параметров окружающей среды, оценить активность различных механизмов и их значение для акклимации организма.

I.4. Научная новизна

Впервые обнаружена долговременная (длительностью до нескольких суток) стресс-индуцированная экспрессия гена фотозащитного белка PsbS, ответственного за генерацию энерго-зависимого НФТ, у представителя зелёных водорослей (Chlorophyta), что свидетельствует о долговременном участии PsbS в защите ФСА зелёных водорослей.

Определена роль основных механизмов защиты фотосинтетического аппарата (ФСА) в условиях избыточного освещения. Показаны принципы стратегии использования растением разных светозащитных механизмов.

Показано, что значение света жёлто-зелёного спектрального диапазона для продуктивности растения обусловлено его способностью проникать в нижние слои мезофилла листа и вглубь кроны. Показано, что изменение содержания CO_2 и O_2 в среде влияет на активность световых реакций фотосинтеза и индукцию механизмов защиты ФСА от избыточного освещения, причём механизм устойчивости CO_2 -толерантных микроводорослей к высокой концентрации CO_2 основан на устойчивости к низким рН среды. Впервые показано, что проникающие антиоксиданты — производные пластохинона ингибируют кислород-выделяющий комплекс ФСII, что исключает их использование для снижения окислительного стресса в ФСА.

На основании разработанной электростатической модели белка впервые в рамках единого подхода рассчитаны среднеточечные значения редокс-потенциалов всех редокс-кофакторов ФСI, энергии реорганизации реакций переноса электрона в ФСI, а также значения pK_a групп фотозащитного белка PsbS зелёных водорослей.

I.5. Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что эффективность и динамика активации и взаимодействия базовых фотозащитных механизмов определяется в каждом случае как природой стрессора, так и принадлежностью организмов к различным экологическим и систематическим группам.

2. Фотозащитные механизмы, характеризующиеся быстрой активацией, могут выполнять основную защитную функцию на фоне относительно слабой чувствительности более медленно индуцируемых механизмов к изменению внешних условий.
3. Пространственная организация листа высших растений обуславливает важную роль слабо поглощаемого компонента ФАР (излучения в жёлто-зеленом спектральном диапазоне) в увеличении продуктивности растения (до 50%).
4. Стресс-индуцируемая защитная функция белка PsbS — участника энергозависимого НФТ возникла в процессе эволюции у зелёных водорослей (Chlorophyta) до её появления у высших растений.

I.6. Личный вклад автора

Сбор и анализ литературных данных, формулирование цели исследования и постановка конкретных задач, выбор методов и разработка экспериментальных подходов для осуществления исследования, анализ экспериментальных данных, интерпретация результатов, подготовка публикаций и докладов по теме диссертационной работы. Часть работ по теме диссертации выполнена совместно с сотрудниками кафедр биофизики и общей физики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедр биоинженерии, физиологии растений, микологии и альгологии биологического факультета МГУ, НИИ митоинженерии МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Института электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Новосибирского института органической химии имени Н. Н. Ворожцова СО РАН, Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН.

I.7. Апробация работы

Основные положения диссертации представлены на 9-м и 10-м съездах Российского фотобиологического общества и Всероссийской конференции “Современные проблемы фотобиологии” (Шепси, 2023, 2021); на 10-й и 11-й международных конференциях «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability» (Стамбул, 2023; Санкт-Петербург, 2019); на международной конференции 10th International Voevodsky Conference “Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes” (Новосибирск, 2022); на Всероссийской конференции с международным участием «От первичных процессов фотосинтеза до альтернативной энергетики» (Пушино, 2022); на международной конференции «Magnetic Resonance – Current State and Future Perspectives» (Казань, 2019); на первом Европейском конгрессе по исследованиям фотосинтеза (1st European Congress on Photosynthesis Research, ePS-1; Упсала, 2018); на международной конференции «Photosynthesis Research for Sustainability – 2014» (Пушино, 2014); на 40-й научной ассамблее Комитета по космическим исследованиям (40th COSPAR Scientific Assembly; Москва, 2014).

I.8. Публикации

У автора имеется 56 публикаций в периодических рецензируемых научных изданиях и одна монография, из них по теме диссертации – 28 научных статей в индексируемых базах данных Web of Science, SCOPUS и RSCI.

I.9. Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 222 страницах и содержит 90 рисунков и 9 таблиц. Диссертация включает 9 глав, в том числе обзор литературы, описание методов исследования и результаты работы, их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы из 265 наименований, а также приложение.

II. Содержание работы

В главе I изложены современные представления об основных механизмах защиты фотосинтезирующих организмов от избыточного освещения у растений. Описаны механизмы индукции нефотохимического тушения (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла, ключевыми детерминантами которого являются состав и содержание пигментов (в первую очередь — дезпоксидированных форм ксантофиллов, зеаксантина (Zea) и лютеина (Demmig-Adams 1990; García-Plazaola et al. 2012)) и содержание фотозащитных хлорофилл-связывающих белков, родственных белкам светособирающей антенны (HLIP, Sep, ELIP, PsbS; (Verhoeven 2014)). Рассмотрена также возможность НФТ в реакционном центре (РЦ) ФСII, происходящего с участием катион-радикальных форм хлорофилла (Bruce et al. 1997; Schweitzer and Brudvig 1997), в котором, по-видимому, основную роль играет окисленный первичный донор ФСII P680+ и рекомбинация разделённых зарядов (Ivanov et al. 2008).

Описан механизм фотоиндуцированных изменений пространственного распределения хлоропластов в клетке и вызываемых им изменений оптических свойств листа (Suetsugu and Wada 2012). Проведён анализ существующих в литературе данных о его роли в защите ФСА от избыточного освещения (Kasahara et al. 2002; Gotoh et al. 2018). Приведены данные об эффективности данного механизма у разных видов растений. Подтверждается значение перераспределения хлоропластов в клетках мезофилла высших растений для изменения градиента интенсивности света внутри листа. Анализируется фактор перераспределения фотосинтетической активности и фотоингибирующего действия света между внешними (подвергающимися действию прямого света) и более глуболежащими слоями фотосинтетических тканей листа.

Описаны механизмы защиты у организмов, подверженных долговременному воздействию неблагоприятных факторов среды, взаимодействие различных стрессовых факторов как индукторов механизмов защиты от избыточного

освещения (Shuvalov and Heber 2003; Heber et al. 2007). Обсуждается вопрос об экологической специфичности стратегий защиты от избыточного освещения (Huang et al. 2010). Показано, что выбор используемых в исследовании модельных растений, позволяет сопоставить роль различных защитных механизмов как у близкородственных, так и систематически удалённых друг от друга видов растений. Обоснована актуальность исследования.

В главе II представлены использованные в диссертационной работе объекты исследования, методы сбора и культивации, моделирование факторов окружающей среды, измерительные методы и методы расчётов.

Объектами исследования служили высшие растения, одноклеточные водоросли и лишайники. Кроме классического модельного объекта биологии растений, включая исследования фотосинтеза, *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, исследования проводили на культурах микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS 2014 и *Lobosphaera* sp. IPPAS C-2047. Этот выбор был обусловлен особыми экологическими характеристиками данных организмов. *Desmodesmus* sp. в природе является симбионтом гидроидного полипа *Dynamena pumila*, что обуславливает его толерантность к высоким (20–100%) концентрациям CO₂ в среде и делает его интересным объектом с точки зрения устойчивости ФСА к этому физико-химическому фактору среды (Solovchenko et al. 2015). Некоторые штаммы *L. incisa* были изолированы из талых снежных покровов высокогорий (Watanabe et al. 1996) — среды обитания, характеризующейся быстрыми изменениями температуры, освещенности и доступности питательных веществ, что делает этот вид интересным с точки зрения устойчивости ФСА к высокой инсоляции и низким температурам. Особые условия обитания водорослей — в таллеме лишайников качестве фотосимбионта. Трёхкомпонентный лишайник *Peltigera aphthosa*, содержащий в качестве первичного фотобионта эукариотическую зелёную водоросль рода *Coccomyxa* (вторичный фотобионт-азотфиксатор — цианобактерия *Nostoc* sp.), также служил одним из объектов исследования.

Мох *Physcomitrella patens*, ставший за последние полтора десятилетия классическим модельным объектом биологии растений, в отношении экологии фотосинтеза и механизмов защиты ФСА обладает одновременно чертами, характерными как для низших, так и высших сосудистых растений. Часть исследований, описанных в диссертации, была выполнена на клетках протонемы *P. patens*. В зависимости от поставленной задачи, отдельные исследования были выполнены на различных видах высших сосудистых растений, включая такие классические объекты, как *Vicia faba* (бобы), *Hibiscus rosa-sinensis* (китайская роза), *Brassica chinensis* (китайская капуста), группа близкородственных видов (род *Tradescantia*), а также ряд деревянистых дикорастущих растений средней полосы.

Поскольку данное исследование предполагало изучение функционирования ФСА в разных экологических условиях, одной из задач было моделирование различных физических и физико-химических факторов окружающей среды. Среди главных анализируемых факторов было освещение (анализировали действие как интенсивности освещения, так и его спектрального состава), состав окружающей атмосферы, дегидратация, температурные воздействия.

Для исследований был использован ряд измерительных методов, главное место среди которых занимали оптические методы: флуориметрия (в том числе РАМ-флуориметрия и спектрально-разрешённая флуориметрия), оптическая спектроскопия, оптическая микроскопия. Эти методы применяли как для жидких рассеивающих сред (суспензий одноклеточных организмов), так и для тканей листа. Методы ЭПР-спектроскопии были использованы как для регистрации радикальных состояний компонентов ФСА (P_{700}^+ , P_{680}^+ , Y_Z^{ox}), так и для получения спектров спиновых зондов. Для изучения ультраструктуры ФСА подвергнутых стрессовому воздействию объектов использовали электронную микроскопию. Определение состава пигментов и жирных кислот методами высокоэффективной жидкостной или газовой хроматографии, соответственно. Измерения кислород-выделяющей или ассимиляционной активности ФСА осуществляли полярографическим методом и с помощью ИК-спектрометрии

CO₂, соответственно, как в водных суспензиях, так и в газовой фазе. Для определения уровня экспрессии целевых генов использовали метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. В работе также приводятся результаты расчётов окислительно-восстановительных и кислотно-основных свойств групп белков. В ходе этих расчётов применялись численные методы решения уравнения Пуассона-Больцмана для анализа электрического взаимодействия групп с белковым окружением и метод Монте-Карло для расчёта вероятности протонирования взаимодействующих групп белка. Также было применено молекулярно-динамическое моделирование подвижности белков.

В следующих главах (III–IX) приведены результаты и обсуждение экспериментальных работ и расчётов, выполненных автором. Обсуждается индукция защитных механизмов ФСА в ответ на повышение интенсивности света и воздействие других стрессовых факторов, роль спектрального состава освещения, роль газового состава среды в протекании реакций в ФСА, воздействие на ФСА дегидратации и её аналогов, воздействие других стрессовых факторов. Выбор модельных организмов осуществлялся с учётом специфики рассматриваемых стрессовых факторов, поэтому в списке объектов исследования присутствует достаточно широкий спектр видов высших растений и водорослей.

В главе III описаны результаты экспериментов, в которых изучали адаптацию ФСА к положительной низкой температуре. Основным объектом этих экспериментов были суспензионные культуры одноклеточных эукариотических водорослей *L. incisa*. Было показано, что охлаждение суспензии до близких к нулю положительных температур приводит к развитию светового стресса и активации нефотохимического тушения (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла (Хл) в фотосинтетической антенне, начиная с первых суток с начала охлаждения (рис. 3). Однако появление

характерных для светового стресса изменений пигментного аппарата (рост общего содержания каротиноидов и их дезоксидированных форм, рост отношения Хл а/б и снижение общего содержания Хл) начинается лишь через несколько (3-5) суток, когда достигается уже заметный уровень НФТ и существенно снижается активность ФСII (рис. 4). В то же время, в первые 4 суток наблюдается рост экспрессии генов защитных белков — LhcSR и PsbS, причём для последнего он достигает 10^3 - 10^4 -кратных значений в течение всего этого периода (рис. 5).

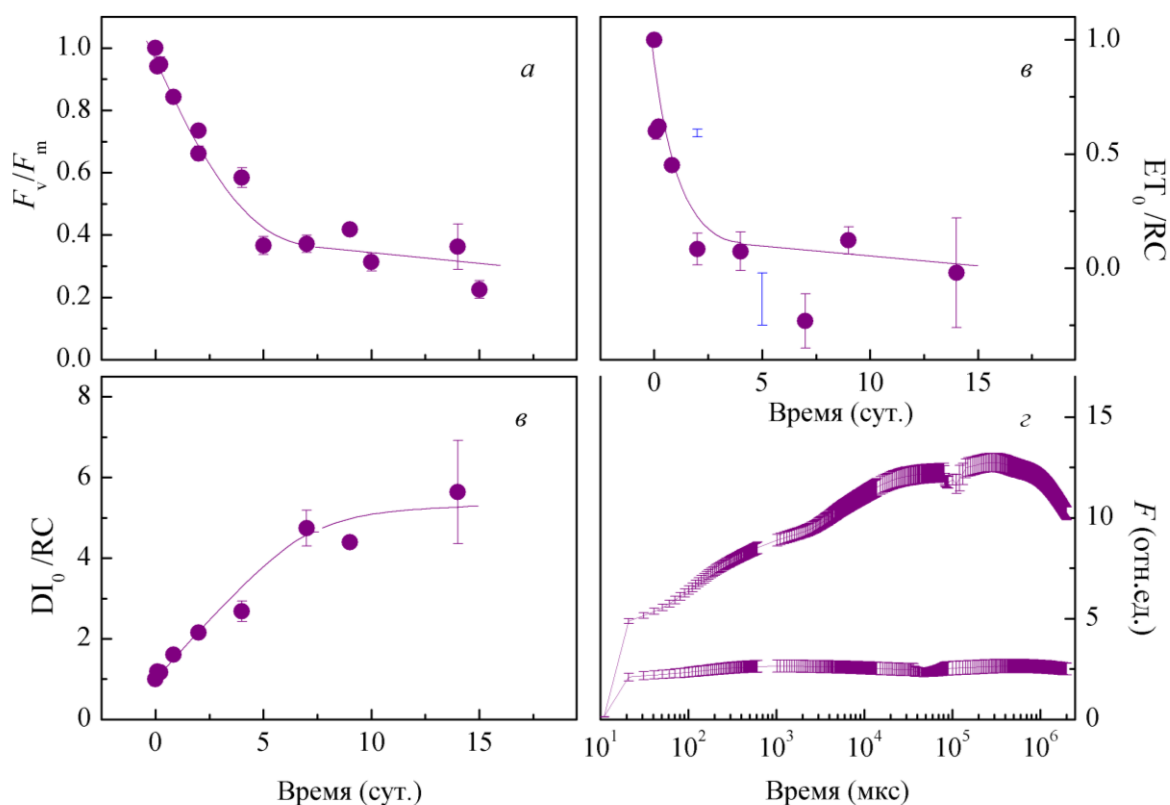


Рис. 3. Снижение активности ФСII, F_v/F_m (а) и скорости фотосинтетического транспорта электронов (б), рост тепловой диссипации поглощённой световой энергии в антенне (в) по мере акклимации культуры одноклеточных водорослей *L. incisa* к низкой температуре (0 °С). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$). Снижение F_v/F_m происходит за счёт падения F_m , при том что F_0 также испытывает некоторое снижение в ходе акклимации.

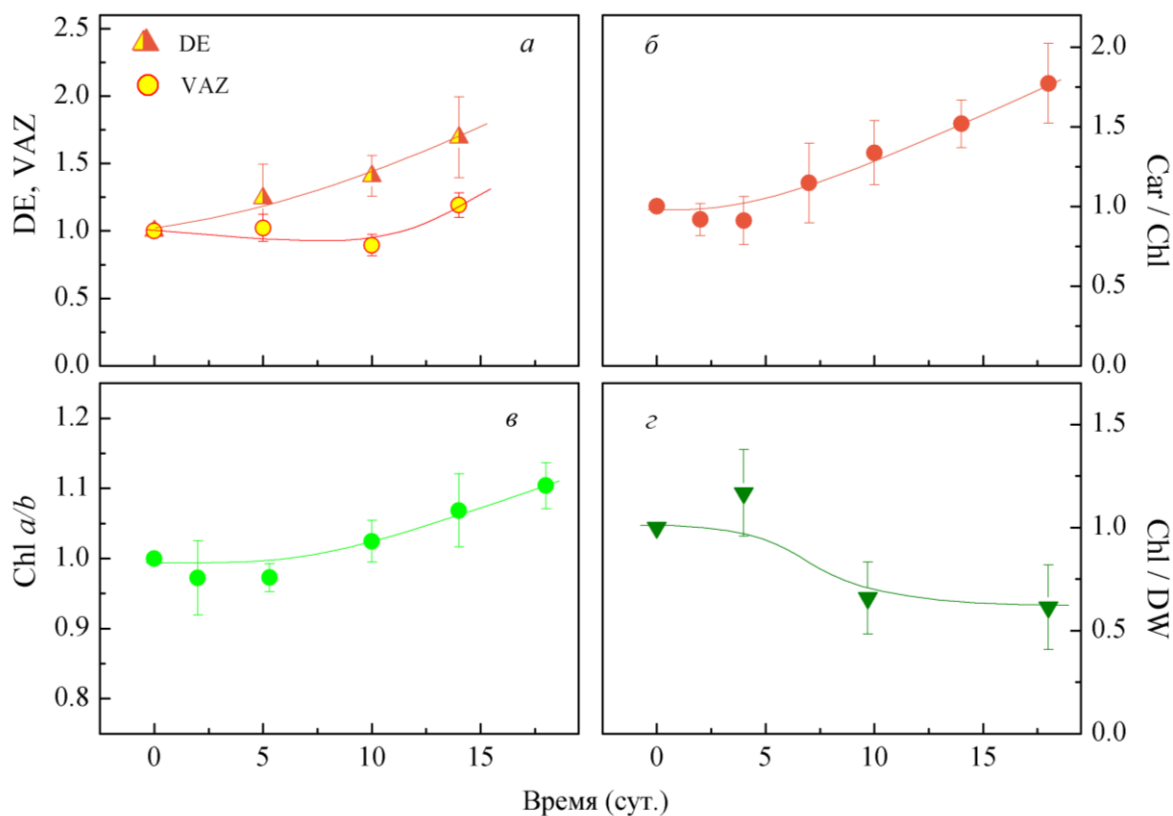


Рис. 4. Изменения содержания и состава пигментов в ФСА микроводоросли *L. incisa* в ходе акклимации к низкой температуре (0 °C): доля каротиноидов виолаксантинового цикла, VAZ, и коэффициент дезоксидации, DE (а), молярное отношение содержания каротиноидов и хлорофилла, Car/Chl (б), молярное отношение содержания хлорофиллов а и б (в), общее содержание хлорофилла на единицу сухого веса, Chl/DW (г). Значения всех величин нормированы на соответствующие начальные значения. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

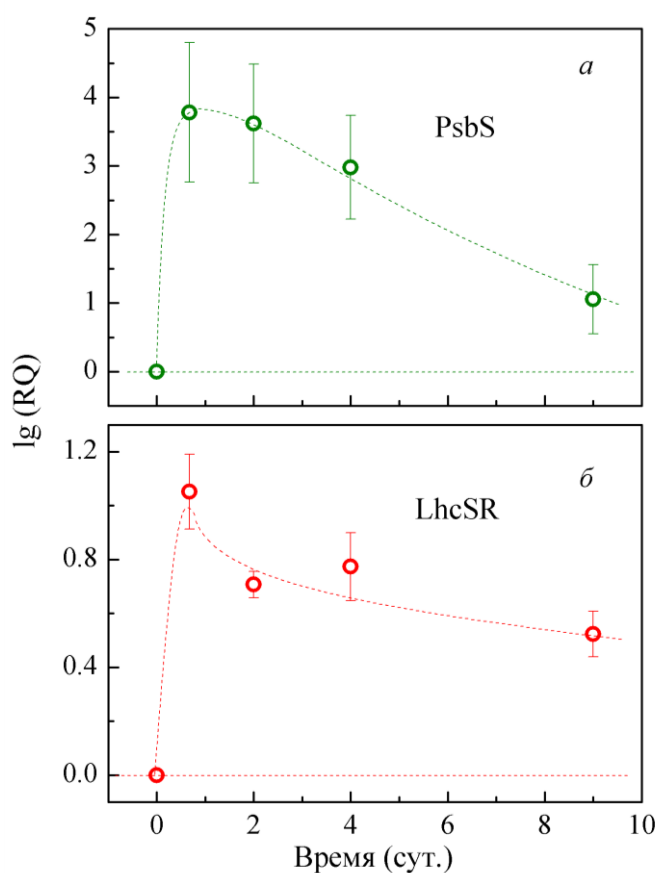


Рис. 5. Изменения содержания мРНК защитных белков PsbS (а) и LhcSR (б) в клетках микроводоросли *L. incisa* в ходе акклимации к низкой температуре (0 °C). Приведен логарифм относительного количества мРНК (RQ), средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

Ранее было известно лишь кратковременное (длительностью в часовой шкале времён) возрастание экспрессии гена PsbS в ответ на стресс у

классического модельного объекта *C. reinhardtii*, на основании чего делался вывод о лишь вспомогательной роли PsbS у зелёных водорослей (Chlorophyta) в LhcSR-зависимой защитной реакции. Впервые обнаруженный нами у представителя Chlorophyta продолжительный стресс-индуцированный рост экспрессии гена PsbS позволяет предположить, что этот белок является ключевым в защитной реакции ФСА на стресс, не ограниченной переходным периодом порядка нескольких часов в начале стресса. При этом в течение всего исследованного периода акклимации к низкой температуре не наблюдалось сколь-либо заметных изменений в уровне экспрессии гена фермента виолаксантидеэпоксидазы, VDE, ответственной за синтез обеспечивающего НФТ каротиноида зеаксантина. Однако наблюдалась активация генов δ -5-дезатуразы, ответственной за синтез арахидоновой кислоты, которая может влиять на активность VDE за счёт липид-белкового взаимодействия (Zorin et al. 2017).

Фотозащитная роль белка PsbS предполагает его рН-чувствительность, поскольку снижение рН в люмене тилакоида используется ФСА как индикатор светового стресса. Поэтому принципиальным для функционирования PsbS является наличие в его составе групп с pK_a в функционально важном диапазоне 5,5–7,5. Для определения таких групп был проведён расчёт методами полумагроскопической электростатики с использованием предсказанной нами трёхмерной структуры белка. Для построения структуры была сначала амплифицирована и секвенирована мРНК PsbS из исследованной нами микроводоросли *L. incisa*, по которой с помощью *ab initio* алгоритма предсказана аминокислотная последовательность белка, а затем с использованием как гомологии полученной последовательности, так и *ab initio* моделирования структуры, построена трёхмерная модель белка. Полученная структура в дальнейшем была использована для молекулярно-динамического моделирования. Расчёты вдоль молекулярно-динамической траектории белка значений pK_a его протонируемых групп показали наличие среди экспонированных в

люмен аминокислотных остатков с pK_a в диапазоне 6,3–6,5, что приблизительно соответствует известным из литературы pK_a для PsbS из шпината (единственный вид, для которого на данный момент известна пространственная структура PsbS), $pK_a \sim 6,1–6,4$. В то же время, незначительно более высокие значения pK_a для PsbS из *L. incisa* могут приводить к более раннему срабатыванию PsbS-зависимого НФТ у этого вида и, следовательно, к его высокой эффективности в фотозащитной реакции ФСА.

В главе IV приведены результаты экспериментов по отклику ФСА на изменения интенсивности освещения в широком диапазоне времён (от минут до недель). Как будет показано ниже, существенным механизмом акклимации ФСА в ответ на изменения освещённости является светозависимое перемещение хлоропластов в клетке, приводящее к изменению условий прохождения света через клетку и перераспределению световой нагрузки между хлоропластами. В отличие от энергозависимого тушения или активации синтеза зеаксантина данный механизм активируется не энергизацией тилакоидной мембраны, а непосредственно управляется действием света (фоторецептором служит фототропин). Наиболее заметным образом этот механизм проявляется при многослойном расположении клеток. Поэтому в качестве модельного объекта для данного исследования высшие растения с развитой листовой пластиной были более предпочтительны, чем одноклеточные водоросли. При этом в качестве модельных объектов были выбраны представители контрастных экологических групп, то есть для которых характерна эволюционная адаптация к освещению разной интенсивности.

Основные исследования были выполнены на 2–5 модельных видах, принадлежащих к одному роду *Tradescantia*, но относящихся к разным экологическим группам: теневыносливым (*T. albiflora*, *T. fluminensis*), умеренно теневыносливым (*T. zebrina*) и светолюбивым растениям

(*T. sillamontana*, *T. navicularis*). Было показано, что скорость реакции ФСА на изменения интенсивности освещения выше для светолюбивых растений. Так, релаксация НФТ в темноте в листьях *T. sillamontana* происходит быстрее, чем в листьях *T. fluminensis*, причём на всех временных масштабах. Иными словами, разные компоненты НФТ (энергозависимое НФТ, релаксирующее за времена порядка секунд; зеаксантин-зависимое и/или обусловленное перераспределением антенн НФТ; фотоингибирование ФСИ) характеризуются бóльшими временами релаксации в листьях *T. fluminensis* по сравнению с *T. sillamontana*. (рис. 6, табл. 1).

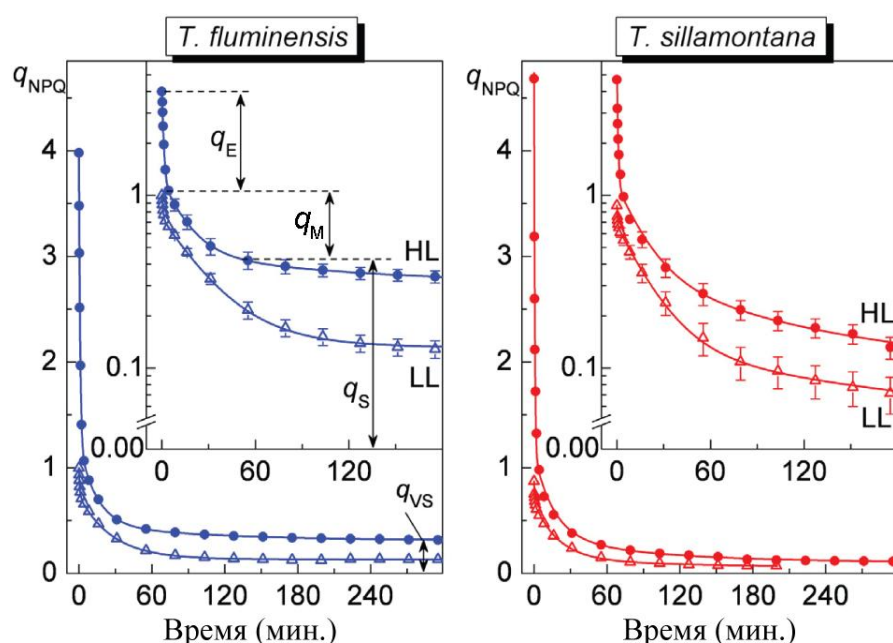


Рис. 6. Кинетика темновой релаксации нефотохимического тушения (NPQ) в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, адаптированных в течение 20 минут к интенсивному (HL) или слабому (LL) освещению (800 и 60 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, соответственно). Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$). Экспериментальные

данные аппроксимированы теоретическими кривыми, включающими несколько экспоненциальных компонент: $q_{NPQ} = q_E \times \exp(-t/\tau_E) + q_M \times \exp(-t/\tau_M) + q_S \times \exp(-t/\tau_S) + q_{VS}$ (кроме наиболее быстрой компоненты q_E , соответствующей энерго-зависимому тушению, выделены также средняя (M, medium) и медленная (S, slow) компоненты, а также необратимые изменения, релаксации которых за время наблюдения не удалось зарегистрировать (VS, very slow)).

Не только релаксация, но и индукция НФТ существенно различается у теневыносливых и светолюбивых видов: у первых НФТ возрастает до максимальных значений уже при умеренных интенсивностях света (~200 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹), а у вторых — относительно слабо индуцируется при умеренных интенсивностях света, но может существенно возрастать при их повышении (рис. 7).

	<i>T.fluminensis</i>		<i>T.sillamontana</i>	
Освещённость (мкЭ м ⁻² с ⁻¹)	60	800	60	800
τ_E (с)	48 ± 1	58 ± 1	29 ± 7	30 ± 2
τ_M (мин.)	28 ± 1	14 ± 1	18 ± 1	10 ± 2
τ_S (мин.)	-	108 ± 36	64 ± 5	75 ± 66
q_E	0,26	2,76	0,21	3,45
q_M	0,61	0,77	0,45	0,79
q_S	-	0,16	0,15	0,34
q_{VS}	0,13	0,31	0,06	0,11
q_{E_norm} (%)	26	69	24	74
q_{M_norm} (%)	61	19	52	17
q_{S_norm} (%)	-	4	17	7
q_{VS_norm} (%)	13	8	7	2

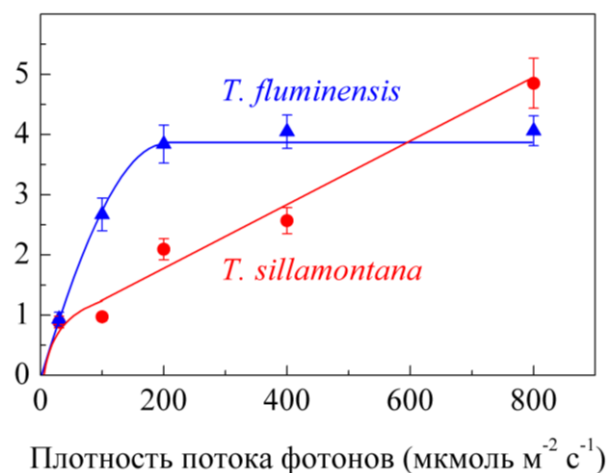


Рис. 7. Зависимость стационарного значения q_{NPQ} нефотохимического тушения (достигаемого через 20 минут освещения) в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana* от интенсивности освещения. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$).

Табл. 1. Характерные времена темновой релаксации и амплитуды соответствующих компонент нефотохимического тушения в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana* (см. графики кинетики и определение параметров на рис. 6). Приведены также нормированные значения амплитуд, характеризующие вклад каждой из компонент в суммарное НФТ, наблюдаемое в данных условиях.

Анализ кинетики темновой релаксации квантового выхода флуоресценции хлорофилла позволяет сделать ряд выводов о роли трансмембранного протонного потенциала в регуляции световых реакций в ФСА в тилакоидах исследуемых видов традесканций. Так, у обоих видов стационарное значение трансмембранной разности рН (ΔpH) в тилакоидах растёт с ростом интенсивности света, о чём говорит рост НФТ, (рис. 7). У *T. fluminensis* оно достигает максимальных значений уже при умеренной интенсивности света (100–200 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹), в то время как для *T. sillamontana* это происходит при приблизительно вдвое более высокой интенсивности света. Однако при любых интенсивностях света для *T. fluminensis*, скорее, характерны

более высокие значения трансмембранной ΔpH в тилакоидах, чем для *T. sillamontana*. При этом даже в условиях, когда в тилакоидах *T. fluminensis* достигается максимальная ΔpH , она не является лимитирующим фактором для переноса электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи в стационарном состоянии.

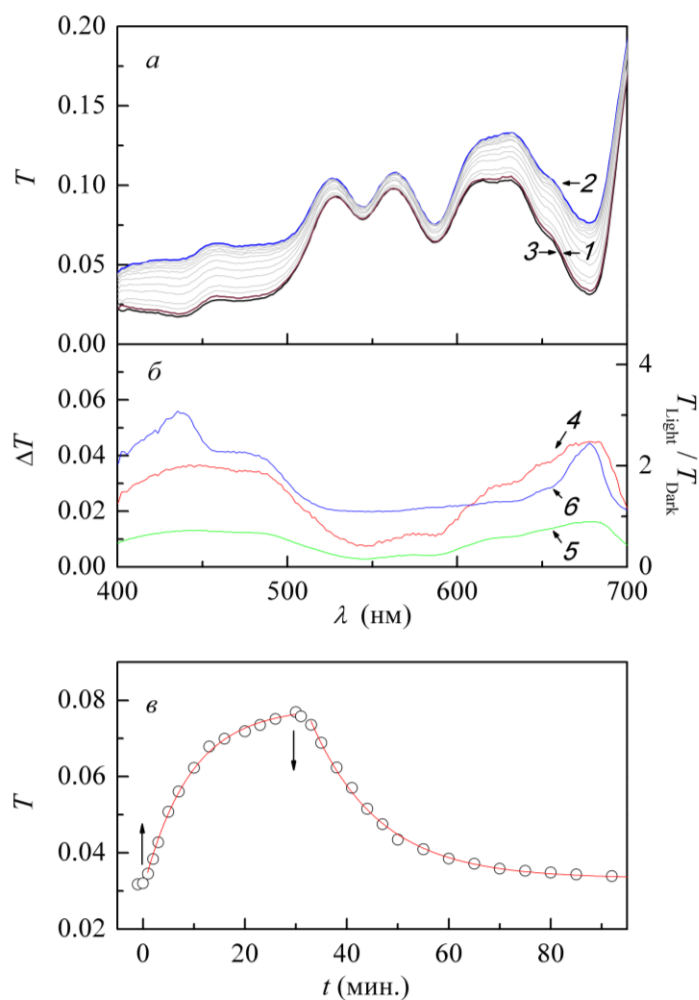


Рис. 8. *а* — типичные спектры оптического пропускания (T) листа традесканции: до освещения (1), после 30-минутного освещения (2) и после последующей 60-минутной адаптации в темноте (3). *б* — спектральные характеристики изменения пропускания листа: разностный спектр «свет минус темнота» ($T_{\text{Light}} - T_{\text{Dark}}$) (4), стандартное отклонение совокупности спектров, полученных в ходе освещения листа (5), и отношение «светового» и «темнового» спектров пропускания листа ($T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$) (6). *в* — кинетика изменений пропускания при 680 нм, T_{680} , в ходе освещения и последующей темновой адаптации. Вертикальные стрелки соответствуют началу и концу освещения.

Табл. 2. Изменение оптического пропускания при 680 нм листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana* при переходе от темноты к свету (150 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, T_{Light}), $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$. Растения выращены при освещённости 60 или 800 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3-7$).

Вид	Освещённость, мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$	$T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$
<i>T. fluminensis</i>	60	4.01 \pm 0.39
<i>T. fluminensis</i>	800	2.24 \pm 0.21
<i>T. sillamontana</i>	60	2.54 \pm 0.30
<i>T. sillamontana</i>	800	2.20 \pm 0.12

Наряду с описанными различиями между теневыносливыми и светолюбивыми видами рода *Tradescantia*, они также обладают рядом схожих черт реакции на изменение освещённости. Наиболее яркой чертой обоих видов, обнаруженной в нашем исследовании, оказались исключительно интенсивные светозависимые изменения оптической прозрачности листа, обусловленные фототропин-зависимым перераспределением хлоропластов в клетках мезофилла и обеспечивающие снижение поглощения света листом (рис. 8, табл. 2). В то время как для большинства изученных к настоящему времени видов растений эти изменения составляют не более нескольких процентов, у *T. fluminensis* и *T. sillamontana* наблюдаются в среднем 2–4-кратные изменения (более высокие у *T. fluminensis*, акклиматизированной к низкой интенсивности света). При относительно слабых адаптивных изменениях ФСА традесканций, касающихся пигментного состава и размера фотосинтетической антенны и известных из литературы, механизм, связанный с перераспределением хлоропластов, может играть ключевую роль в защите ФСА от фотоповреждения. Возникает вопрос о факторах, обеспечивающих столь высокую эффективность данного механизма у данных видов. С целью ответить на этот вопрос, было проведено анатомическое исследование строения листа обоих видов традесканции при разных интенсивностях освещения в ходе роста (рис. 9). В результате было показано, что известные к настоящему времени детерминанты эффективности регуляции оптических свойств листа, обусловленной светозависимым пространственным перераспределением хлоропластов в клетке, а именно, размер клеток мезофилла и число хлоропластов на клетку, недостаточны для объяснения оптических свойств листа традесканций. На основании анализа полученных в исследовании анатомических характеристик листа и их сопоставления с существующими моделями прохождения света через рассеивающие среды было показано, что ключевую роль в данном случае может играть структура мезофилла, и в первую очередь такой её показатель, как число слоёв клеток.

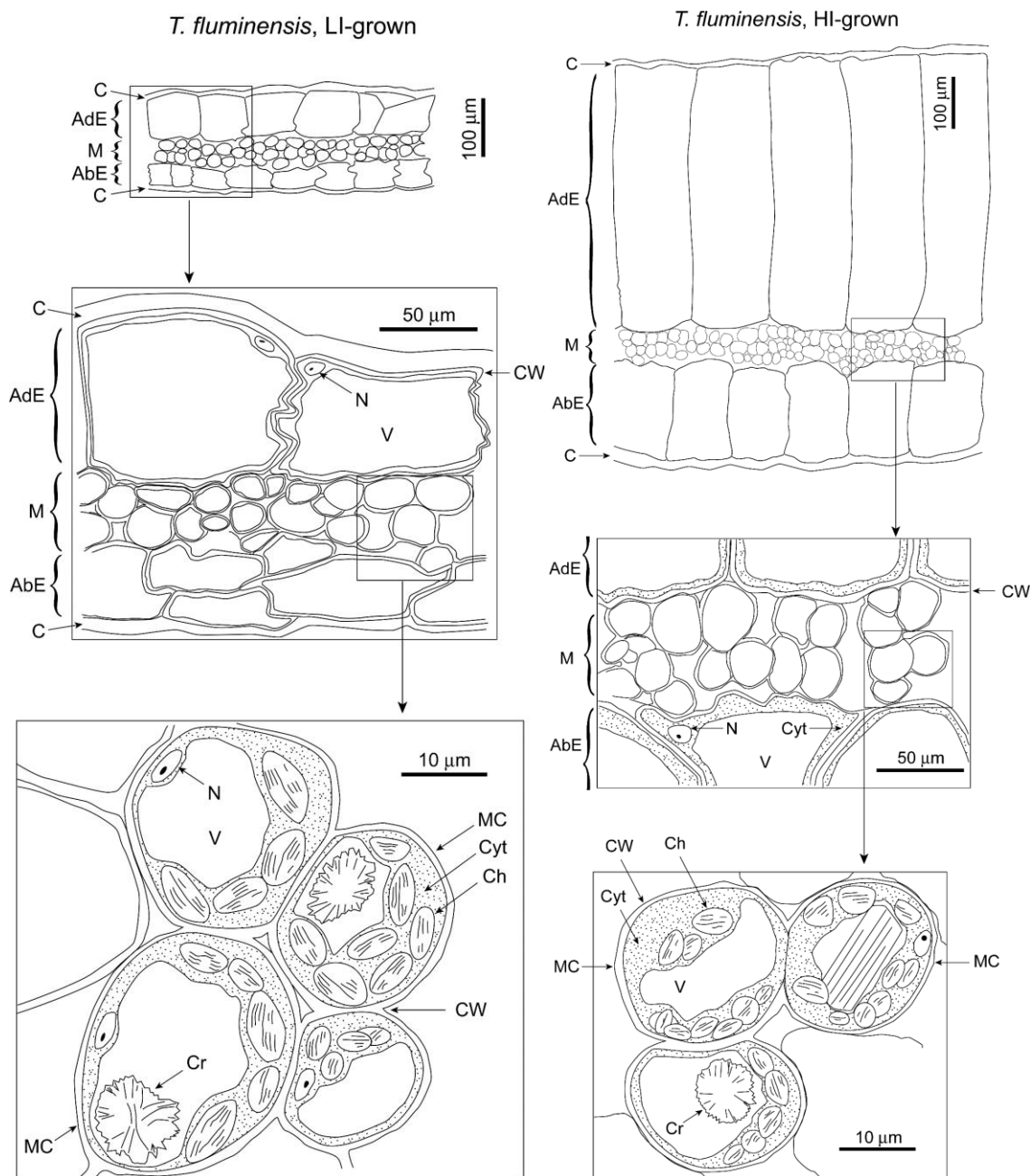


Рис. 9. Анатомическое строение листа *T. fluminensis*, выращенной при освещённости 60 (слева) или 800 $\mu\text{моль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (справа). С — кутикула, AdE — адаксиальная эпидерма, AbE — абаксиальная эпидерма, М — мезофилл, MC — клетка мезофилла, CW — клеточная стенка, N — ядро, V — вакуоль, Ch — хлоропласт, Cyt — цитоплазма, Cr — кристаллы оксалата кальция.

Наряду с межвидовыми различиями эффективности защитных механизмов, обусловленных перераспределением хлоропластов и дезоксидацией ксантофиллов, существует значительная индивидуальная вариабельность среди растений каждого вида. Это даёт возможность ответить на вопрос, каким образом связаны между собой эффективности двух различных механизмов на

индивидуальном уровне, проследив их корреляцию в популяции растений каждого вида. При этом в качестве нулевой гипотезы можно рассматривать предположение о том, что слабое проявление одного из двух механизмов с близкими характерными временами индукции компенсируется более сильным развитием второго из них. Такое предположение должно приводить к тому, что при сравнении между собой разных растений активность одного из механизмов будет отрицательно коррелировать с активностью другого. Это предположение, действительно, подтверждается экспериментальными данными об отрицательной корреляции между степенью изменений оптической прозрачности листа и коэффициента дезоксидации пула ксантофиллов в ответ на кратковременное действие света у растений разных видов (рис. 10, а). Однако на уровне не межвидовых, а индивидуальных различий (или же различий между близкородственными видами), отрицательная корреляция между этими характеристиками не наблюдается; скорее, можно предполагать наличие положительной корреляции между ними: листья с более заметными светозависимыми изменениями оптического пропускания характеризуются не менее, а то и более высоким светозависимыми изменениями коэффициента дезоксидации (рис. 10, б). По-видимому, это связано с тем, что за время эволюции вида различные механизмы успевают «подстроиться» друг под друга, и эта взаимная подстройка, закреплённая на генетическом уровне, проявляется в корреляции различных характеристик. В то же время, различия между разными особями одного или близкородственных видов обусловлены в большей степени физиологическими или анатомическими различиями, и на онтогенетических временах может не быть механизма столь же эффективной взаимной подстройки различных фотозащитных механизмов.

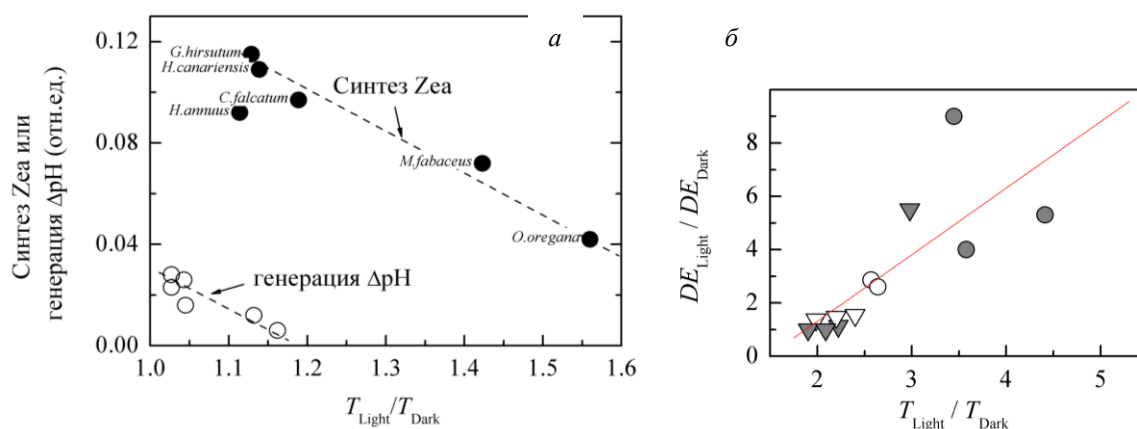


Рис. 10. Соотношение между фотоиндуцированными изменениями коэффициента пропускания листьев ($T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$), вызванными перераспределением хлоропластов в клетке, и образованием зеаксантина в ходе виолактининового цикла или генерацией светозависимой ΔpH в хлоропластах 6 видов растений по данным работы (Brugnoli and Björkman 1992) (a) и в индивидуальных листьях традесканций *T. fluminensis* (круги) и *T. sillamontana* (треугольники) по данным настоящей работы (б). Серыми и белыми символами на рис. (б) отмечены «тенивые» и «солнечные» растения (выращенные при освещении 60 и 800 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, соответственно). Интенсивность действующего освещения составляла 940 и 150 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (для a и б, соответственно).

Сравнение индивидуальных различий растений по скорости индукции НФТ, изменениям оптической прозрачности листа и подверженности ФСII фотоповреждению, показало, что между скоростью активации НФТ и фоточувствительностью ФСII имеется отрицательная корреляция (более быстрая активация НФТ соответствует меньшим потерям активности ФСII). В то же время, скорость изменения оптической прозрачности листа не коррелирует с фоточувствительностью ФСII. Это говорит о том, что для осуществления защитной функции ФСА существенна скорость активации самых ранних механизмов защиты, в то время как скорость активации механизмов «второго эшелона» несущественна. В то же время, если анализировать не скорость, а интенсивность медленно индуцируемых механизмов, то, по нашим данным, она коррелирует с чувствительностью ФС2 к фотоповреждению.

Отметим, что взаимная «подстройка» разных механизмов, приводящая к компенсационному усилению одного из механизмов при ослаблении другого, хорошо видна при сопоставлении компонент НФТ, активирующихся в минутном диапазоне времён, и фототропин-зависимом снижении поглощения

света листом. «Отключение» последнего за счёт облучения листа светом красного спектрального диапазона (к которому нечувствительны фототропины) приводит к существенному росту НФТ (рис. 11).

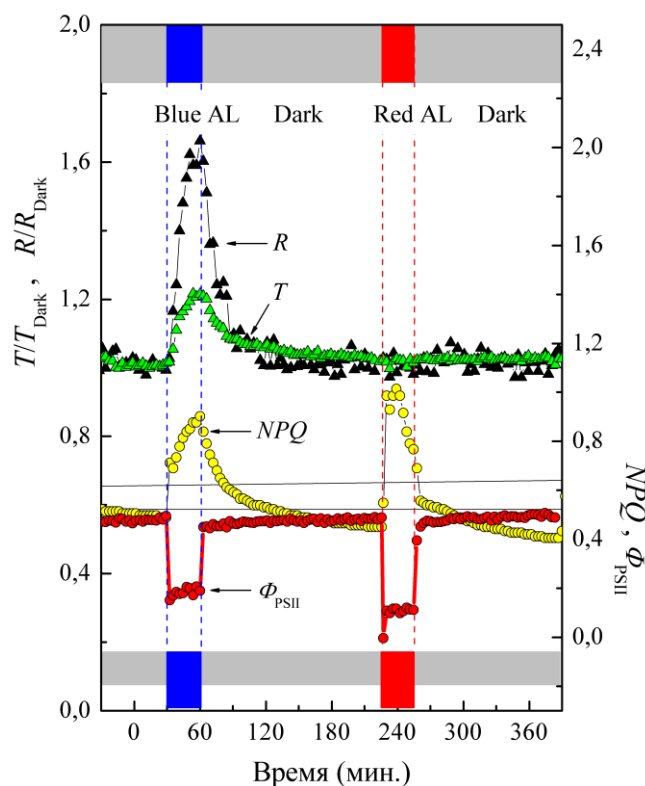


Рис. 11. Светозависимые изменения отражения (R) и пропускания (T) света листом *T. fluminensis*, записанные одновременно с регистрацией квантовой эффективности ФСП (Φ_{PSII}) и индукции нефотохимического тушения (NPQ). Периоды освещения синим (Blue AL) или красным действующим светом (Red AL; интенсивность — $155 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) обозначены синим и красным прямоугольниками вдоль горизонтальных осей.

Описанный выше механизм защиты ФСА от избыточного освещения за счёт перераспределения световой

нагрузки на хлоропласты использует особенности трёхмерной организации ФСА у высших растений. Ещё один фактор, для акклимации к изменениям которого принципиальной является трёхмерная пространственная организация ФСА растения — это спектральный состав освещения. В главе V обсуждается вопрос о роли спектрального состава в формировании, функционировании и эффективности работы ФСА и приводится экспериментальное доказательство значения жёлто-зелёной компоненты для повышения интегрального фотосинтеза листа и целого растения.

Цикл экспериментов был выполнен на растениях китайской капусты (*Brassica chinensis*). Анализ данных о фотохимической и фосфорилирующей активности изолированных хлоропластов и активности отдельных ферментов, о содержании фотосинтетических пигментов, продуктов фотосинтеза, белковых и низкомолекулярных маркеров окислительного

стресса, об оптических характеристиках листьев, а также о ростовых и морфометрических характеристиках растений позволил показать, что свет жёлто-зелёного спектрального диапазона играет ключевую роль в обеспечении высокой интегральной интенсивности фотосинтеза растений. Эта роль обусловлена более слабым, чем для синего и красного света, но всё же заметным (из-за оптически неоднородной внутренней среды листа, приводящей к возрастанию эффективной длины оптического пути) поглощением света данного спектрального диапазона фотосинтетическим аппаратом растения. Более слабое поглощение даёт возможность свету этого диапазона проникать вглубь листа и/или «кроны» растения и обеспечивать протекание фотосинтеза в нижних слоях мезофилла и в листьях нижних ярусов, практически недоступных для света сине-фиолетового и красного диапазона. Описанную роль спектрального состава в обеспечении эффективного фотосинтеза схематично иллюстрирует рис. 12.

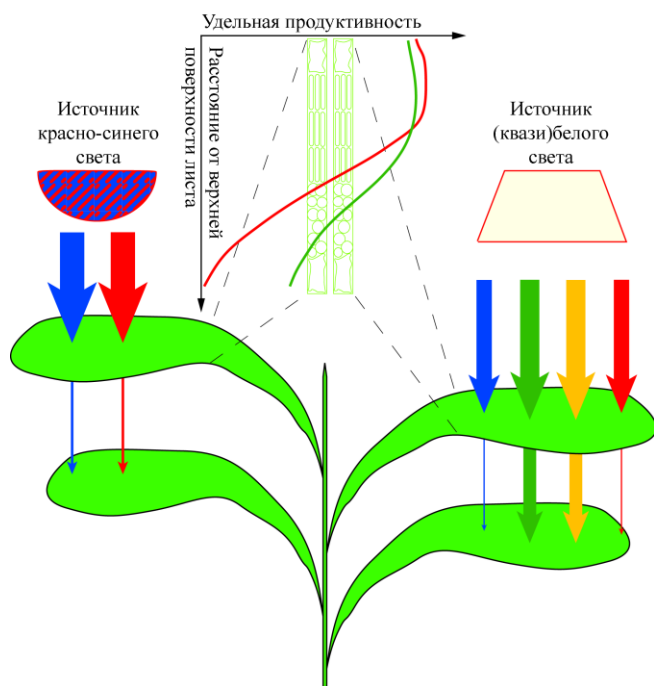


Рис. 12. Схематичная иллюстрация роли спектральных компонент жёлто-зелёной области в поддержании эффективного фотосинтеза в нижних слоях освещённых листьев и в нижних ярусах листовой кроны растений.

Были выполнены расчёты, учитывающие взаимное затенение листьев и профиль количества света, поглощённого разными слоями листа (расчёт, выполненный на основании теории Кубелки-Мунка, описывающей распространение света в светорассеивающих средах (Allen and Richardson 1968)) (рис. 13), и оценена суммарная (по всем слоям) продуктивность листа при освещении светом различного спектрального

состава. Для исследуемых растений китайской капусты оценка дала предсказание приблизительно 15%-ного различия в продуктивности листа при освещении красным или зелёным светом в пользу зелёного света (рис. 13). Взаимное затенение листьев даёт дополнительное снижение эффективности света сине-фиолетового и красного диапазона по сравнению с жёлто-зелёным диапазоном на величину от 8–9 до 35% при разумных значениях индекса листовой поверхности от 2 до 5.

Необходимо подчеркнуть, что классические работы конца 1990-х — начала 2000-х гг., в которых был впервые установлен профиль распределения освещённости и спектрального состава внутри листа и показано значение зелёного света для фотосинтеза в глубинных слоях мезофилла, имели дело лишь с фотосинтетической активностью в единичном листе в секундной или минутной шкале времени (Evans and Vogelmann 2003; Sun et al. 1998; Nishio 2000; Terashima et al. 2009). Проблема роста целого растения, учитывающая возможности неэнергетической (регуляторной) роли зелёного освещения, была впервые исследована в обсуждаемой здесь работе (Ptushenko et al. 2015).

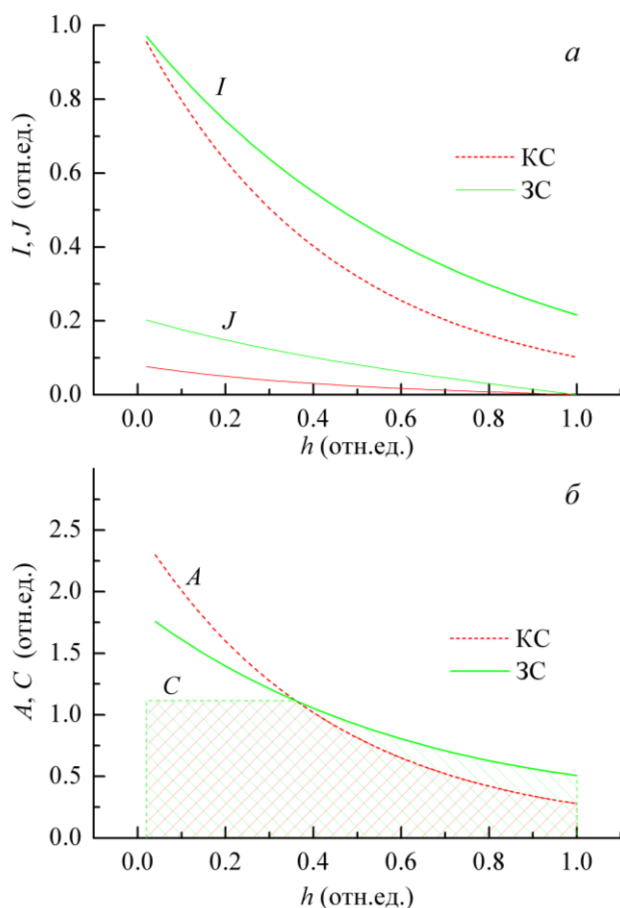


Рис. 13. Зависимость интенсивности падающего (I) и рассеянного (J) света внутри листа (a) и профили поглощения света (A) и фотосинтетической активности (C) в листьях (b), освещённых зелёным (ЗС) и красным светом (КС), от расстояния от верхней поверхности листа (h). Профили I , J , и A рассчитаны на основании теории Кубелки-Мунка (Allen and Richardson 1968). Профиль C представлен упрощённой моделью фермент-лимитированной продуктивности на основании экспериментальных данных работ Нишио (Nishio 2000) и Эванса и Vogельманна (Evans and Vogelmann 2003). Заштрихованная площадь даёт оценку полной продуктивности листа.

В главе VI рассмотрена активация защитных механизмов и эффективность световых процессов фотосинтеза под действием изменений содержания в окружающей среде диоксида углерода и кислорода, которое связано с активностью фотосинтетических реакций рядом прямых и обратных связей. Молекулы этих веществ могут выполнять роль акцептора электрона у ЭТЦ, тем самым влияя на степень восстановленности её компонентов и определяя возможность развития или, наоборот, смягчения светового стресса. Рост концентрации любого из этих акцепторов приводит к снижению НФТ, росту скорости оттока электронов от ФСІ и активности ФСІІ, однако схожие эффекты наблюдаются для O_2 при концентрациях на два-три порядка выше, чем для CO_2 (единицы процентов и десятки-сотни ppm, соответственно). В то же время, молекулы кислорода превращают развившийся световой стресс в окислительный за счёт взаимодействия с восстановленными редокс-кофакторами ЭТЦ и возбуждёнными молекулами хлорофилла (при этом образуются активные формы кислорода, в первую очередь, 1O_2 и O_2^-).

Наши эксперименты на листьях высших растений показали, что удаление кислорода из среды приводит к падению активности ФСІІ, оцениваемой по величине F_v/F_m , за счёт снижения F_m , т.е. одновременного роста НФТ (рис. 14). При этом данный эффект сильно зависит от присутствия в среде углекислого газа: эффект особенно велик, если при деаэрации среды (например, за счёт вытеснения воздуха инертным газом, азотом или аргоном) вместе с O_2 удаляется и CO_2 . Добавление же в среду CO_2 может частично восстановить нормальный (аэробный) уровень активности ФСІІ или привести к его увеличению по сравнению с нормальными условиями (при высоких концентрациях CO_2 , ~0.2% и выше, т.е. в 5 и более раз превышающих атмосферную концентрацию), и одновременно снизить нефотохимическое тушение (рис. 14).

Можно предположить, что такое воздействие O_2 и CO_2 на активность ФСІІ и на генерацию нефотохимического тушения обусловлено изменением

доступности акцепторов электронов, которые являются продуктом световых реакций с участием ФСII. Об этом говорят следующие данные:

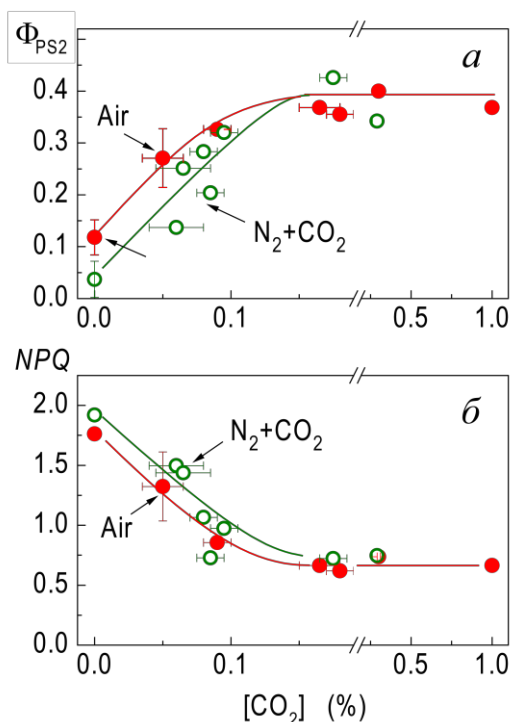


Рис. 14. Квазистационарные значения квантового выхода фотохимических реакций в ФС2, Φ_{PS2} (а), и коэффициента нефотохимического тушения, q_{NPQ} (б) в листьях *Hibiscus rosa-sinensis* в зависимости от концентрации CO₂ в деаэрированной атмосфере (зелёная кривая и символы; N₂ + CO₂) и в среде, содержащей 21% O₂ (красная кривая и символы). Отдельно показана точка (Air), соответствующая атмосферному содержанию CO₂ и O₂.

А) Снижение содержания кислорода в окружающей атмосфере приводит к снижению стационарной концентрации окисленных центров ФСI, P700+ (рис. 15,а).

К снижению стационарной концентрации P700+ может приводить снижение оттока электронов от ФСI на акцепторной стороне либо ускорение притока электронов на донорной стороне. Такое ускорение, в принципе, могло бы происходить за счёт активации линейного либо циклического транспорта электронов. Однако, как было показано выше, активность ФСII в анаэробных условиях падает, что не согласуется с предположением об активации ФСII-зависимого линейного (нециклического) транспорта электронов. Что же касается циклического транспорта, о нём можно судить по скорости восстановления P700+ в темноте (после выключения света) при неактивной ФСII. Наши данные показывают, что в присутствии ингибитора ФСII (DCMU) скорость восстановления P700+ в темноте практически не различается в аэробных и анаэробных условиях (рис. 15,б). Таким образом, единственным возможным объяснением наблюдаемого нами снижения стационарной концентрации P700+ остаётся снижение оттока электронов на акцепторной стороне ФСI.

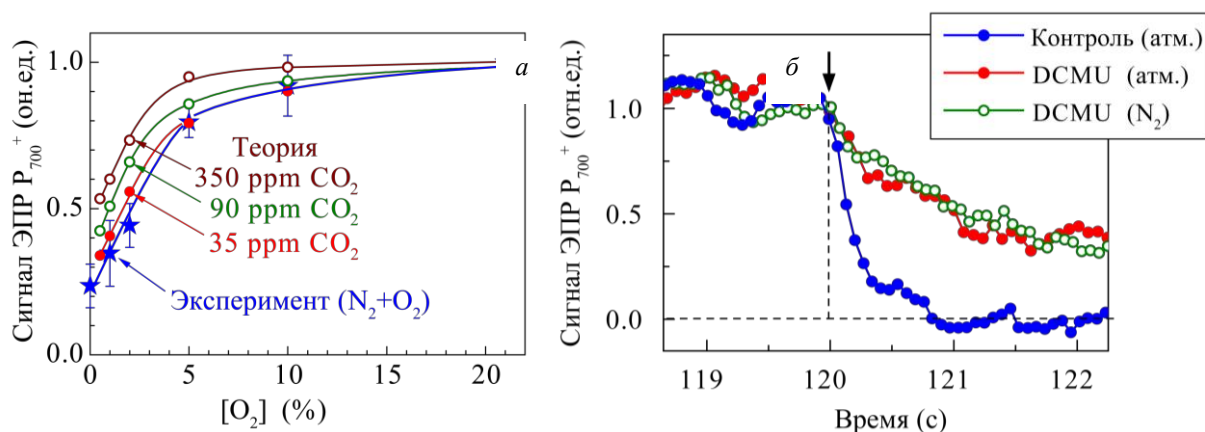


Рис. 15. Влияние кислорода на стационарную концентрацию окисленных реакционных центров ФСІ, P_{700}^+ (а) и кинетику его восстановления в темноте (б) в листьях *Hibiscus rosa-sinensis*. На рис. (а) показаны экспериментальные данные (обозначены маркерами — звёздочками) и результаты расчёта в рамках модели Тихонова и Вершубского (2010). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4-7$). На рис. (б) показаны типичные кривые.

Влияние кислорода на отток электронов от ФСІ, очевидно, обусловлено его участием в псевдоциклическом транспорте электронов, при котором молекула O_2 служит конечным акцептором. Сравнение наших экспериментальных данных с теоретической моделью, построенной Вершубским с соавт. (2010), показывает, что интенсивность потока электронов на кислород может в аэробных условиях достигать $\sim 10\%$, а в некоторых случаях — и 40% . Несмотря на относительно небольшую величину, этот поток может играть существенную роль в переносе электронов и генерации трансмембранного протонного потенциала в тех условиях, когда цикл Кальвина не активен.

Б) Эффект анаэробноз снимается увеличением концентрации CO_2 .

Углекислый газ, являясь естественным конечным акцептором электронов, стимулирует поток электронов от акцепторного участка ФСІ в цикл Кальвина, то есть действует на том же участке ЭТЦ, что и кислород, и проявляет с ним синергический эффект.

Одновременно кислород влияет и на другой участок ЭТЦ — между ФСІІ и ФСІ. А именно, в аэробных условиях в темноте происходит постепенное неспецифическое окисление пула пластохинолов фЭТЦ до пластохинона (в

наших экспериментах — с характерным временем 5 минут), т.е. возрастает ёмкость пула акцепторов ФСII. Об этом говорят изменения индукции флуоресценции хлорофилла: параметр W , характеризующий ёмкость пула акцепторов ФСII (рис. 16, а), возрастает в аэробных условиях после прекращения освещения (рис. 16, б).

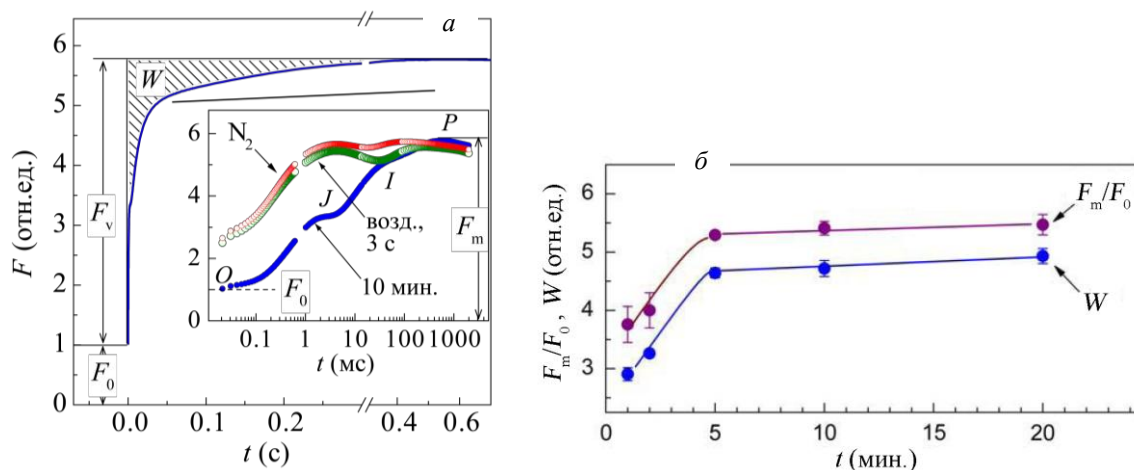


Рис. 16. Быстрая кинетика индукции флуоресценции (F) хлорофилла в листьях *Hibiscus rosa-sinensis*, адаптированных к темноте в нормальной атмосфере (возд.) в течение 10 минут или 3 с или в атмосфере азота (N_2) в течение 10 минут (а); зависимость параметров флуоресценции F_m/F_0 и W , отражающих окислительно-восстановительное состояние пула пластохинонов, от времени адаптации листа к темноте в атмосферном воздухе (б).

Углекислый газ, CO_2 , не только является акцептором электрона, он может закислять внутреннюю среду клетки и хлоропласта, что, в свою очередь, может влиять на реакции фотосинтеза и на индукцию механизмов защиты ФСА. При относительно невысоких концентрациях CO_2 , рассмотренных выше (<1%) этот эффект, по-видимому, заметно не проявляется. В то же время, даже непродолжительная (5-10 минут) адаптация ФСА к среде с высоким содержанием CO_2 (20%) приводит к возникновению отклика ФСА, несомненно, связанного с изменениями рН среды. Этот отклик заключается в снижении квантовой эффективности ФС2 и тушении флуоресценции хлорофилла (как максимальной, F_m , так и темноадаптированной, F_0). Соответствующие измерения были проведены на суспензионных культурах зелёных микроводорослей *Desmodesmus* sp. и показали, что при этом происходит закисление среды инкубации клеток до рН ~ 6 , причём аналогичные измерения

наблюдаются и при подкислении среды добавлением соляной кислоты (рис. 17).

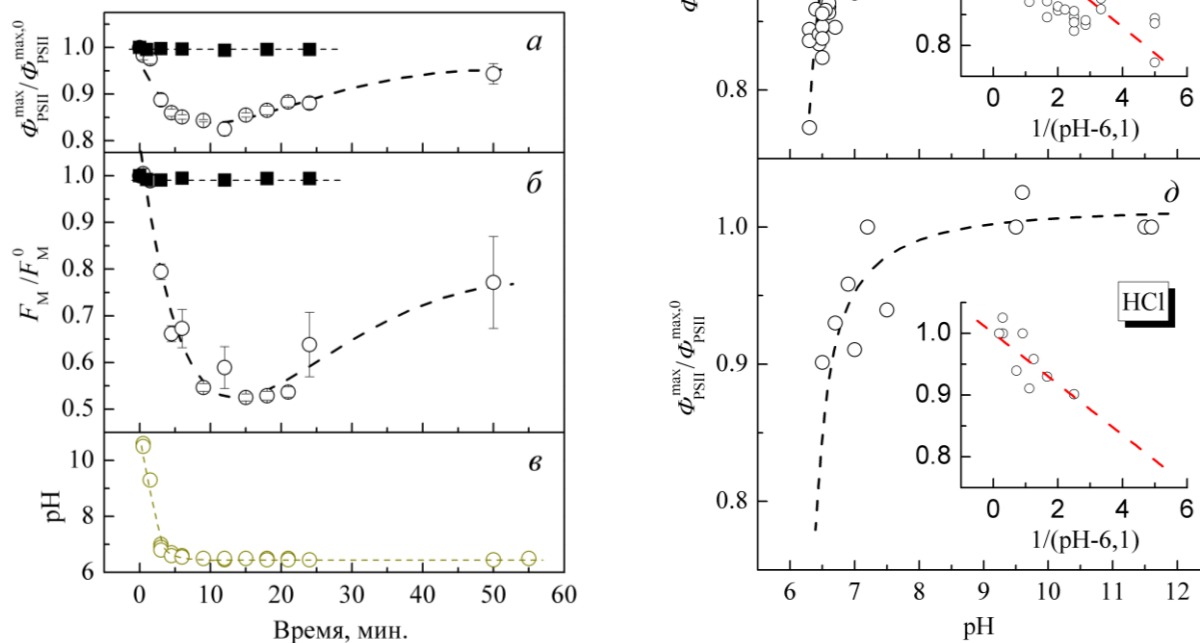


Рис. 17. Кинетика изменений квантовой эффективности ФСИ, $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}/\Phi_{\text{PSII}}^0$, (а), интенсивности флуоресценции хлорофилла (б) в клетках зелёных микроводорослей *Desmodesmus* sp. (открытые символы — в нормальной среде инкубации, закрашенные символы — в среде с повышенной буферной ёмкостью) и рН среды при уравнивании с атмосферой с высоким (20%) содержанием CO_2 (в); зависимость снижения $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}/\Phi_{\text{PSII}}^0$, от изменений рН среды инкубации, индуцированных высоким содержанием CO_2 в среде инкубации (z) или добавлением HCl (d). Прямые линии на врезках показывают графики линейной аппроксимации $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}/\Phi_{\text{PSII}}^0 = 1 + Vx$, где x — эмпирическая функция рН, $x = 1/(\text{pH}-6,1)$.

В этой же главе описаны эксперименты по исследованию устойчивости трёхкомпонентного лишайника *P. aphthosa* к воздействию анаэробной атмосферы, а также высоких и низких температур.

В главе VII описаны результаты экспериментов по индукции светового стресса в ФСА в присутствии антиоксидантов. Было исследовано действие проникающих антиоксидантов, являющихся производными пластохинона и гидрофобного катиона тетрафенилфосфония (так называемые «ионы Скулачёва»; далее обозначены SkQ). В наших экспериментах одноклеточными

зелёными водорослями (*L. incisa*, *Chlorella vulgaris*) и хлоропластами высших растений (*Pisum sativum*) было показано, что данные антиоксиданты существенно снижают стационарную концентрацию возбуждённых состояний хлорофилла в антенне ФС2. Наряду с вероятным тушением возбуждения в антенне с участием самого SkQ, было сделано предположение, что SkQ провоцирует P_{680}^+ -зависимое тушение. Оптические спектральные измерения показали SkQ-зависимое образование P_{680}^+ в клетках (рис. 18). P_{680}^+ накапливается в ФСА в результате необратимого восстановления марганцевого кластера кислород-выделяющего комплекса (КВК) ФС2, что приводит к ингибированию КВК. Об ингибировании КВК говорит возникновение окисленного тирозина Y_Z (Y_Z^{ox}) в ФС2 в ответ на импульсное освещение, которое является маркером неактивного КВК. Y_Z^{ox} был зарегистрирован с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса по появлению сигнала с характерным спектром и временем жизни (рис. 19).

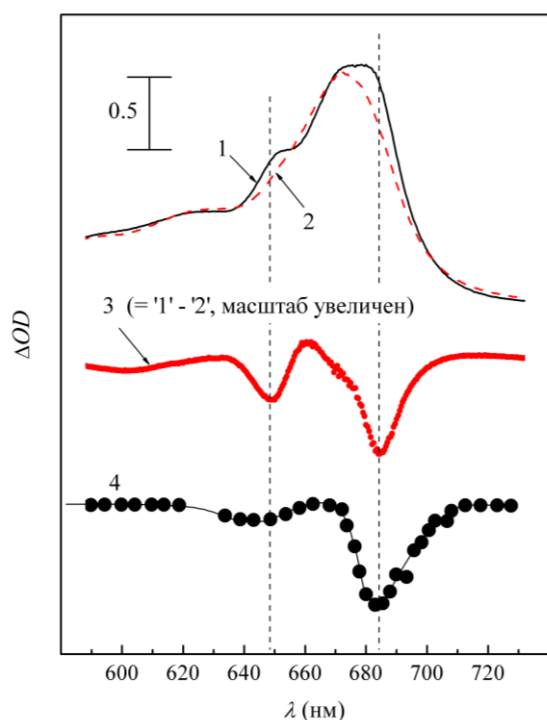
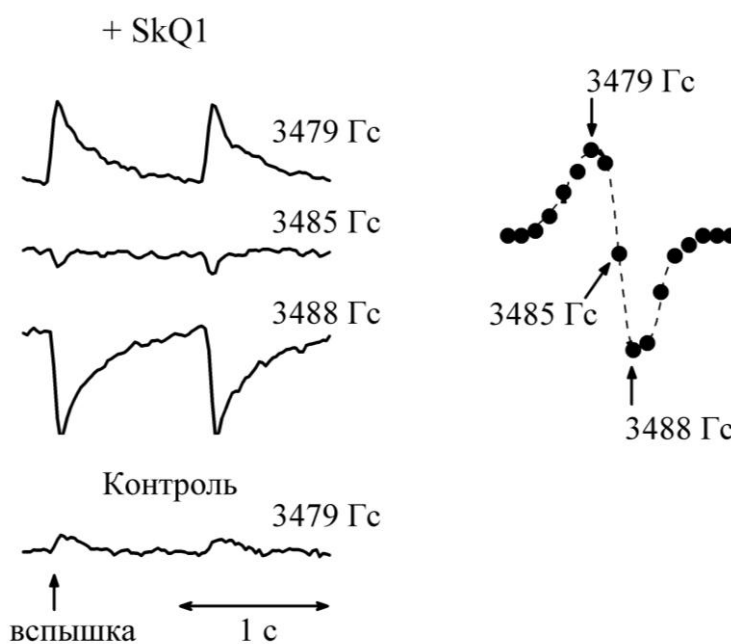


Рис. 18. Спектры оптического поглощения суспензии клеток *C. vulgaris* контрольной (кривая 1), в присутствии 300 мкМ SkQ1 (кривая 2) и их разность (кривая 3, увеличен масштаб). Показан также сигнал выцветания P_{680}^+ (Witt 1991) (кривая 4). Приведены типичные спектры.

Рис. 19. Кинетика исчезновения фотоиндуцированного (в ответ на вспышку) сигнала ЭПР окисленного тирозина D1-161 (Y_Z^{ox}) в суспензии клеток *C. vulgaris* в присутствии SkQ1 (вверху) и в контроле (внизу).



Каждая кривая является результатом усреднения по 42 циклам ответа на вспышку. Магнитное поле соответствует положению низко- или высокопольного экстремума (3479 Гс и 3488 Гс, соответственно) и значению g -фактора сигнала Y_Z^{ox} (3485 Гс). Зависимость амплитуды ответа сигнала ЭПР от величины поля показана справа и соответствует сигналу ЭПР Y_Z^{ox} (сверхтонкая структура сигнала не разрешается в силу высоких значений мощности микроволнового излучения и амплитуды модуляции магнитного поля, использованных в эксперименте для повышения чувствительности).

Использование метода молекулярного докинга позволило показать, что молекулы SkQ могут проникать внутрь белкового комплекса ФСII, подходя к атомам марганца КВК на расстояние 12–13 Å. Расчёты энергии активации переноса электрона по модели Маркуса с использованием разработанного нами ранее алгоритма построения диэлектрической модели белка и константы реакции в приближении Мозера и Даттона дают оценку константы переноса $k_{\text{et}} = 2.3 \times 10^5 - 4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Это означает возможность восстановления атомов марганца КВК от SkQ1 в микросекундном диапазоне времён, что приводит к их выходу из КВК и ингибированию разложения воды.

Таким образом, было показано, что проникающие антиоксиданты на основе пластохинола могут ингибировать КВК ФСII, причём это ингибирование вызвано именно их антиоксидантными свойствами. С одной стороны, это обстоятельство указывает, по-видимому, на бесперспективность использования данных антиоксидантов для предотвращения вызванных световым стрессом окислительных повреждений в ФСА растений. С другой стороны, оно позволяет рассматривать применение этих вещества в качестве перспективных ингибиторов ФСII на донорной стороне, имеющих существенные преимущества перед ингибиторами ФСII на акцепторной стороне (напр., DCMU) за счёт тушения опасных для ФСА возбуждённых состояний Хл в антенне.

В главе VIII описаны эксперименты по активации НФТ у пойкилогидрических растений в ответ на дегидратацию. Как и другие стрессовые условия, дегидратация снижает ассимиляционную способность ФСА и тем самым провоцирует световой стресс. Однако, в отличие от

гомойогидрических организмов, которые не способны переносить заметное обезвоживание, пойкилогидрические растения, наряду с другими адаптационными механизмами, обладают способностью к существенному снижению риска светового стресса в условиях дегидратации. Для экспериментов был использован классический модельный объект биологии растений, пойкилогидрический мох *P. patens*. Его особенностью является функционирование одновременно двух систем НФТ: PsbS-зависимой, характерной для высших растений, и LhcSR-зависимой, типичной для водорослей (Gerotto et al. 2012). LhcSR-зависимое НФТ индуцируется в устойчивых к обезвоживанию растениях стрессовыми условиями (обезвоживанием или плазмолизом) независимо от освещения (Peers et al. 2009). Механизм этого тушения до конца не ясен, хотя известно, что он также может включать у разных организмов опосредованную дегидратацией активацию виолаксантинового цикла (Fernández-Marín et al. 2011), конформационные перестройки пигмент-белковых комплексов (Heber 2008), а также и PsbS-зависимые процессы (Peers et al. 2009).

Для выяснения связи между свето- и дегидратационно-зависимым НФТ нами были проведены исследования в модельной системе, имитирующей обезвоживание: на протонеме пойкилогидрического мха *P. patens*, подвергнутой плазмолизу или же ферментативной мацерации клеточных стенок. Для плазмолиза, вызванного осмотическим стрессом, ранее было показано в литературе, что он может вызывать в хлоропластах пойкилогидрических организмов НФТ, аналогичное дегидратационно-зависимому НФТ (Azzabi et al. 2012; Gao et al. 2014).

Наши эксперименты показали, что ферментативное разрушение клеточной стенки также вызывает аналогичное НФТ и падение фотосинтетической активности, постепенно индуцируемые по мере мацерации клеточных стенок (рис. 20). Эти функциональные изменения коррелировали со снижением относительного содержания практически всех компонентов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ; от 2 до 13-кратного снижения представленности

разных субъединиц ФС2 и LHC и до 30-кратного для *psaA* и *psaB*), при том что содержание белков, ответственных за защитное тушение флуоресценции хлорофилла, *PsbS* и *LhcSR*, в протопластах *P. patens* практически не снижалось.

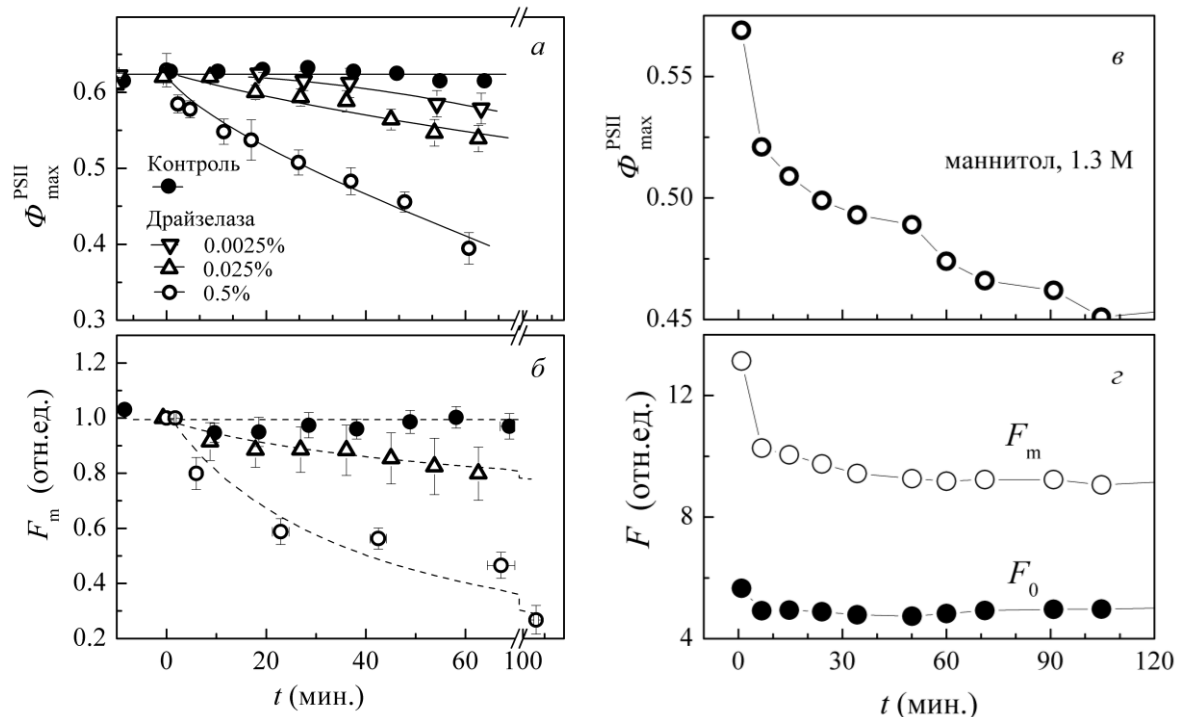


Рис. 20. Кинетика снижения максимальной квантовой эффективности ФСII (*a*, *в*) и тушения флуоресценции (*б*, *з*) в клетках протонемы *P. patens*, подвергнутой ферментативному разрушению клеточной стенки (*a*, *б*) или плазмолизу в гипертонической среде (*в*, *з*; маннитол, 1,3 М). Приведены средние значения \pm стандартные ошибки среднего, $n = 6-14$ (*a*) и 4-7 (*б*), или типичные кривые (*в*, *з*).

В последней главе (**Глава IX**) обобщены полученные в работе результаты и сформулированы основные выводы.

Диссертация снабжена **Приложением**, в котором приведён алгоритм построения диэлектрической модели белка и основанного на ней расчёта электрических взаимодействий в белке, используемого в разных разделах данной работы. Разработанный алгоритм основан на принципах, сформулированных Л.И. Кришталиком, и является развитием полумакроскопической (полуконтинуальной) диэлектрической модели, рассматривающей белок как диэлектрическую среду, в которую погружены парциальные заряды, принадлежащие отдельным атомам белка или его

кофакторов. Предложенный алгоритм показал свою эффективность в выполненных автором расчётах окислительно-восстановительных потенциалов кофакторов фотосистемы I растений и значений pK_a кислотных групп бактериального фотосинтетического реакционного центра.

II.1. Заключение

Конструкция ФСА соответствует балансу между необходимостью получения возможно больше световой энергии и защитой от её избытка. Каким образом различные растительные организмы в разных условиях находят путь между этими «Сциллой и Харибдой», является предметом диссертации. Результаты представленной работы свидетельствуют, что механизмы защиты ФСА, активируемые в условиях интенсивного освещения, активируются также в условиях стрессов различной природы, играя роль «первого эшелона» защиты ФСА. Механизмы защиты, специфические для конкретных стрессовых условий, включаются на более поздних этапах акклимации растения к стрессовым условиям, в то же время не исключая развитие медленно индуцируемых ответов растения на световой стресс. При этом, несмотря на универсальность среди растений большинства механизмов защиты ФСА от светового стресса (Demmig-Adams et al. 2020; Pinnola 2019), различные виды могут использовать разные «стратегии» реализации всего набора имеющихся в распоряжении растения адаптивных (акклимационных) механизмов. Различные стратегии могут проявляться как в акцентах на разные механизмы с близкими временными характеристиками, так и в относительной роли быстро и медленно индуцируемых механизмов. Так, на примере растений рода *Tradescantia* нами была показана возможность относительно слабой чувствительности к интенсивности освещения состава защитных каротиноидов на фоне высокоэффективного механизма снижения световой нагрузки на ФСА за счёт перераспределения хлоропластов в клетках мезофилла. На этой же группе

растений нами было показано, что плотность расположения устьиц на поверхности листа, определяющая доступность CO_2 для ФСА и, следовательно, риск развития светового стресса, и при этом являющаяся медленно изменяющейся характеристикой, может быть малочувствительной к изменениям интенсивности света, при том что основная регуляция устьичной проводимости обеспечивается значительно более быстро индуцируемой регуляцией ширины устьичной щели. У одноклеточной зелёной водоросли *L. incisa* в ходе светового стресса, индуцированного понижением температуры, в первую очередь активируется защита ФСА, связанная с белками PsbS и LhcSR, и лишь спустя несколько дней активируются другие механизмы защиты ФСА (связанные с пигментным составом и стехиометрией фотосинтетических белковых комплексов ФСА). При этом в настоящей работе впервые показана долговременная индукция экспрессии гена PsbS в ответ на стресс у зелёных водорослей, что даёт основания пересмотреть роль этого белка у данной группы организмов.

Поскольку ряд наиболее быстро индуцируемых защитных ответов ФСА на избыточное освещение (энергозависимое нефотохимическое тушение возбуждения в фотосинтетической антенне, перестройка светособирающих антенн, активация деэпоксидации пула ксантофиллов) активируются изменениями рН среды и редокс-состояний компонент цепи электронного транспорта, этим процессам было уделено внимание в настоящей работе. Было показано, что молекулы CO_2 и O_2 , присутствующие в среде, могут активировать процессы нефотохимического тушения, модулируя интенсивность потоков электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи или рН среды. Были изучены изменения скоростей переноса электрона в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, определяемые генерацией трансмембранного протонного потенциала в тилакоидах и изменением редокс-состояния компонентов цепи, по мере акклимации ФСА к интенсивному освещению.

Наряду с механизмами, затрагивающими непосредственно компоненты ФСА, в растении существует целый ряд механизмов, определяющих

фотосинтез листа и растения в целом как трёхмерной структуры. Одним из таких механизмов служит светозависимое перераспределение хлоропластов в клетках мезофилла листа, обеспечивающее максимальный захват энергии света при слабом освещении и более равномерное распределение световой нагрузки на ФСА в разных участках листа и листовой системы — при интенсивном освещении. Закономерности индукции и проявления действия этого механизма были изучены в настоящей работе и показана его взаимосвязь с особенностями структуры клетки мезофилла и роль в ряду механизмов защиты ФСА.

С функционированием листа как пространственно распределённой трёхмерной фотосинтетической структуры связан вопрос о фотосинтетической активности и значении для фотосинтеза разных спектральных компонент фотосинтетически активной радиации. Так, одной из давних проблем в понимании адаптивной природы характеристик ФСА является проблема «провала» в спектре поглощения фотосинтетических пигментов высших растений (хлорофилла *a* и *b* и каротиноидов) в зелёно-жёлтой области спектра (Nishio 2000). Предположение о том, что свет этого диапазона может быть полезен для фотосинтеза в глубоких слоях листа, до которых доходит мало света красного и синего диапазонов, было высказано в конце 1990-х — начале 2000-х гг. на основе расчётов и экспериментальных данных об оптических свойствах листа (Evans Vogelmann 2003; Terashima et al. 2009). В настоящей работе эта роль света зелёно-жёлтой области спектра была впервые показана экспериментально.

II.2. Выводы

1. Показаны возможные стратегии реализации фотозащитного потенциала у оксигенных фототрофных организмов из разных систематических и экологических групп.

2. Показано, что при наличии защитных механизмов с различными характерными временами отклика индукция эффективных механизмов акклимации ФСА к стрессовым условиям с более короткими временами может обеспечивать экологическую пластичность высших растений при относительно невысокой степени индукции механизмов с более медленным откликом.
3. Показана сохраняющаяся в течение нескольких суток стресс-индуцированная активация экспрессии гена фотозащитного белка PsbS у зелёных водорослей (Chlorophyta), сопровождающаяся индукцией нефотохимического тушения (НФТ). Получены оценки диапазона значений рН тилакоидного люмена, в котором активируется фотопротекторная активность PsbS. Разработан и валидирован алгоритм полумакроскопического расчёта окислительно-восстановительных и кислотно-основных свойств белка, учитывающий его диэлектрическую неоднородность, позволивший сделать эти оценки.
4. Экспериментально показано, что свет в жёлто-зелёном диапазоне спектра важен для продуктивности растения, поскольку слабее поглощается хлорофиллом и обеспечивает энергией ассимиляционные ткани во всем объёме листа и растения в целом.
5. Показано, что высокая эффективность фотозащиты ФСА у пойкилогидрических организмов, способных переносить значительный недостаток воды без потери жизнеспособности, может обеспечиваться существенным снижением содержания ФСII и ФСI на фоне незначительных изменений уровня белков контролируемых НФТ.
6. Показано (на примере симбиотической зелёной микроводоросли *Desmodesmus* sp.), что устойчивость организма к закислению среды может служить фактором, обуславливающим устойчивость его ФСА к высокой концентрации диоксида углерода в среде.
7. Показано, что проникающие антиоксиданты на основе пластохинона (SkQ) ингибируют ФС2 на донорном участке, вызывая тушение возбуждения в фотосинтетической антенне с участием долгоживущего катиона P_{680}^+ .

III. Основные публикации Птушенко Василия Витальевича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки) (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах)

1. **Ptushenko V.V.**, Knorre D.D., Glagoleva E.S. The photoprotective protein PsbS from green microalga *Lobosphaera incisa*: the amino acid sequence, 3D structure and probable pH-sensitive residues // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – N 20. – 15060. – DOI: 10.3390/ijms242015060 (**WoS JIF 5.6** / 1.15 п.л. / 0.9 п.л.)
2. **Ptushenko V.V.**, Bondarenko G.N., Vinogradova E.N., Glagoleva E.S., Karpova O.V., Ptushenko O.S., Shibzukhova K.A., Solovchenko A.E., Lobakova E.S. Chilling upregulates expression of the PsbS and LhcSR genes in the chloroplasts of the green microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 // Biochemistry (Moscow). – 2022. – V. 87. – N. 12-13. – P. 1699-1706 (**WoS JIF 2.8** / 0.85 п.л. / 0.6 п.л.)
3. **Ptushenko V.V.**, Bondarenko G.N., Vinogradova E.N., Glagoleva E.S., Karpova O.V., Ptushenko O.S., Solovchenko A.E., Trubitsin B.V., Chivkunova O.B., Shibzukhova K.A., Shcherbakov P.N. The effect of chilling on the photosynthetic apparatus of microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 // Biochemistry (Moscow). – 2021. – V. 86. – N. 12-13. – P.1590–1598. 10.1134/S0006297921120087 (**WoS JIF 2.8** / 0.75 п.л. / 0.4 п.л.)
4. **Ptushenko V.V.** Electric cables of living cells. I. Energy transfer along coupling membranes // Biochemistry (Moscow). – 2020. – V. 85. – N. 7. – P. 820-832. – DOI: 10.1134/S000629792007010X (**WoS JIF 2.8** / 0.93 п.л. / 0.93 п.л.)
5. Ptushenko O. S., **Ptushenko V. V.**, Solovchenko A. E. Spectrum of light as a determinant of plant functioning: a historical perspective // Life. – 2020. – V. 10. – N 3. – 25. – DOI: 10.3390/life10030025 (**WoS JIF 3.2** / 1.1 п.л. / 0.8 п.л.)
6. **Ptushenko V. V.**, Solovchenko A.E., Bychkov A.Y., Chivkunova O.B., Golovin A.V., Gorelova O.A., Ismagulova T.T., Kulik L.V., Lobakova E.S., Lukyanov A.A.,

- Samoilova R.I., Scherbakov P.N., Selyakh I.O., Semenova L.R., Vasilieva S.G., Baulina O.I., Skulachev M.V., Kirpichnikov M.P. Cationic penetrating antioxidants switch off Mn cluster of photosystem II in situ // *Photosynthesis Research*. – 2019. – V. 142. – N 2. – P. 229-240. – DOI: 10.1007/s11120-019-00657-2 (WoS JIF 3.7 / 2.6 п.л. / 1.0 п.л.)
7. Ptushenko O.S., **Ptushenko V.V.** *Tradescantia*-based models: a powerful looking glass for investigation of photoacclimation and photoadaptation in plants // *Physiologia Plantarum*. – 2019. – V. 166. – N 1. – P. 120-133. – DOI: 10.1111/ppl.12963 (WoS JIF 6.4 / 1.0 п.л. / 0.7 п.л.)
 8. **Ptushenko V.V.**, Zhigalova T.V., Avercheva O.V., Tikhonov A.N. Three phases of energy-dependent induction of P_{700}^{+} and Chl *a* fluorescence in *Tradescantia fluminensis* leaves // *Photosynthesis Research*. – 2019. – V. 139. – N 1-3. – P. 509-522. – DOI: 10.1007/s11120-018-0494-z (WoS JIF 3.7 / 0.88 п.л. / 0.44 п.л.)
 9. **Ptushenko V.V.**, Krishtalik L.I. Reorganization energies of the electron transfer reactions involving quinones in the reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* // *Photosynthesis Research*. – 2018. – V. 138. – N 2. – P. 167-175. – DOI: 10.1007/s11120-018-0560-6 (WoS JIF 3.7 / 0.56 п.л. / 0.23 п.л.)
 10. Vygodina T.V., Kaminskaya O.P., Konstantinov A.A., **Ptushenko V.V.** Effect of Ca^{2+} on the redox potential of heme a in cytochrome c oxidase // *Biochimie*, – 2018. – V. 149. – P. 71-78. – DOI: 10.1016/j.biochi.2018.04.005 (WoS JIF 3.9 / 0.5 п.л. / 0.2 п.л.)
 11. Mishanin V.I., Trubitsin B.V., Patsaeva S.V., **Ptushenko V.V.**, Solovchenko A.E., Tikhonov A.N. Acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species to growth light: chlorophyll a fluorescence, electron transport, and xanthophyll content // *Photosynthesis Research*. – 2017. – V. 133. N 1–3. P. 87–102. – DOI: 10.1007/s11120-017-0339-1 (WoS JIF 3.7 / 1.0 п.л. / 0.17 п.л.)
 12. **Ptushenko V.V.**, Ptushenko O.S., Samoilova O.P., Solovchenko A.E. Analysis of photoprotection and apparent non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Tradescantia* leaves based on the rate of irradiance-induced changes

- in optical transparence // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – V. 82. – N. 1. – P. 67-74. – DOI: 10.1134/S0006297917010072 (**WoS JIF 2.8** / 0.63 п.л. / 0.42 п.л.)
13. Fesenko I., Seredina A., Arapidi G., **Ptushenko V.**, Urban A., Butenko I., Kovalchuk S., Babalyan K., Knyazev A., Khazigaleeva R., Pushkova E., Anikanov N., Ivanov V., Govorun V. The *Physcomitrella patens* chloroplast proteome changes in response to protoplastation // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – V. 7. – 1661. DOI: 10.3389/fpls.2016.01661 (**WoS JIF 5.6** / 1.2 п.л. / 0.1 п.л.)
 14. **Ptushenko V.V.**, Solovchenko A.E. Tolerance of the photosynthetic apparatus to acidification of the growth medium as a possible determinant of CO₂-tolerance of the symbiotic microalga *Desmodesmus* sp. IPPAS-2014 // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – V. 81. – N. 12. – P. 1531-1537. – DOI: 10.1134/S0006297916120142 (**WoS JIF 2.8** / 0.5 п.л. / 0.25 п.л.)
 15. **Ptushenko V.V.**, Ptushenko O.S., Samoilova O.P., Solovchenko A.E. An exceptional irradiance-induced decrease of light trapping in two *Tradescantia* species: an unexpected relationship with the leaf architecture and zeaxanthin-mediated photoprotection // *Biologia Plantarum*. – 2016. – V. 60. – N 2. – P. 385-393. – DOI: 10.1007/s10535-016-0593-7 (**WoS JIF 1.5** / 0.56 п.л. / 0.36 п.л.)
 16. Dyakov M., Insarova I., Kharabadze D., **Ptushenko V.**, Shtaeer O. Influence of extreme ambient temperatures and anaerobic conditions on *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. viability // *Life Sciences in Space Research*. – 2015. – V. 7. – P. 66-72. – DOI: 10.1016/j.lssr.2015.10.002 (**WoS JIF 2.5** / 0.44 п.л. / 0.3 п.л.)
 17. **Ptushenko V.V.**, Avercheva O.V., Bassarskaya E.M., Berkovich Yu.A., Erokhin A.N., Smolyanina S.O., Zhigalova T.V. Possible reasons of a decline in growth of Chinese cabbage under a combined narrowband red and blue light in comparison with illumination by high-pressure sodium lamp // *Scientia Horticulturae*. – 2015. – V. 194. – P. 267-277. – DOI: 10.1016/j.scienta.2015.08.021 (**WoS JIF 4.3** / 1.3 п.л. / 1.0 п.л.)
 18. **Ptushenko V.V.**, Cherepanov D.A., Krishtalik L.I. Electrostatics of the photosynthetic bacterial reaction center. Protonation of Glu L 212 and Asp L 213 – a new method of calculation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Bioenergetics*. –

2015. – V. 1847. – N 12. – P. 1495-1508. – DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.07.010
(**WoS JIF 4.3** / 1.5 п.л. / 0.75 п.л.)

19. Fesenko I.A., Arapidi G.P., Skripnikov A.Yu, Alexeev D.G., Kostryukova E.S., Manolov A.I., Altukhov I.A., Khazigaleeva R.A., Seredina A.V., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Zgoda V.G., Novikova S.E., Semashko T.A., Slizhikova D.K., **Ptushenko V.V.**, Gorbachev A., Govorun V.M., Ivanov V.T. Specific pools of endogenous peptides are present in gametophore, protonema, and protoplast cells of the moss *Physcomitrella patens* // BMC plant biology. – 2015.– V. 15. – 87. – DOI: 10.1186/s12870-015-0468-7 (**WoS JIF 5.3** / 1.0 п.л. / 0.07 п.л.)
20. Ptushenko V.V., Ptushenko O.S., Tikhonov A.N. Chlorophyll fluorescence induction, chlorophyll content, and chromaticity characteristics of leaves as indicators of photosynthetic apparatus senescence in arboreal plants // Biochemistry (Moscow). – 2014. – V. 79. – N. 3. – P. 260-272. – DOI: 10.1134/S0006297914030122 (**WoS JIF 2.8** / 0.94 п.л. / 0.63 п.л.)
21. Avercheva O., Berkovich Y., Smolyanina S., Bassarskaya E., Pogosyan S., **Ptushenko V.**, Erokhin A., Zhigalova T. Biochemical, photosynthetic and productive parameters of Chinese cabbage grown under blue–red LED assembly designed for space agriculture // Advances in Space Research. – 2014. – V. 53. – N 11. – P. 1574-1581. – DOI: 10.1016/j.asr.2014.03.003 (**WoS JIF 2.6** / 0.5 п.л. / 0.13 п.л.)
22. **Ptushenko V.V.**, Ptushenko E.A., Samoiloa O.P., Tikhonov A.N. Chlorophyll fluorescence in the leaves of *Tradescantia* species of different ecological groups: Induction events at different intensities of actinic light // Biosystems. – 2013. – V. 114. – N 2. – P. 85-97. DOI: 10.1016/j.biosystems.2013.08.001 (**WoS JIF 1.6** / 0.8 п.л. / 0.4 п.л.)
23. **Ptushenko V.V.**, Karavaev V.A., Solntsev M.K., Tikhonov A.N. Biophysical methods of ecological monitoring. Photosynthetic characteristics of tree plants growing in Moscow city // Biophysics. – 2013. – V. 58. – N. 2. –P. 228-233. – DOI: 10.1134/S0006350913020152 (**WoS JIF 0.43** / 0.5 п.л. / 0.25 п.л.)
24. Samoiloa O.P., **Ptushenko V.V.**, Kuvykin I.V., Kiselev S.A., Ptushenko O.S., Tikhonov A.N. Effects of light environment on the induction of chlorophyll

- fluorescence in leaves: A comparative study of *Tradescantia* species of different ecotypes // Biosystems. – 2011. – V. 105. – N 1. – P. 41-48. DOI: 10.1016/j.biosystems.2011.03.003 (WoS JIF 1.6 / 0.5 п.л. / 0.2 п.л.)
25. Kuvykin I.V., **Ptushenko V.V.**, Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. Regulation of electron transport in C₃ plant chloroplasts *in situ* and *in silico*: Short-term effects of atmospheric CO₂ and O₂ // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2011. –V. 1807. – N 3. – P. 336-347. – DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.12.012 (WoS JIF 4.3 / 0.75 п.л. / 0.25 п.л.)
26. Glazunova S.A., **Ptushenko V.V.**, Gunar L.E., Karavaev V.A., Solntsev M.K., Tikhonov A.N. Slow fluorescence induction and CO₂ exchange in bean plants treated with *Reynoutria sachalinensis* extract // Biophysics. –V 54. – N. 3. – P. 343-344. – DOI: 10.1134/S0006350909030154 (WoS JIF 0.43 / 0.15 п.л. / 0.05 п.л.)
27. Kuvykin I.V., Vershubskii A.V., Ptushenko V.V., Tikhonov A.N. Oxygen as an alternative electron acceptor in the photosynthetic electron transport chain of C₃ plants // Biochemistry (Moscow). – 2008. – V. 73. – N. 10. – P. 1063-1075. – DOI: 10.1134/S0006297908100027 (WoS JIF 2.8 / 0.94 п.л. / 0.31 п.л.)
28. **Ptushenko V.V.**, Cherepanov D.A., Krishtalik L.I., Semenov A.Yu. Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I // Photosynthesis Research. – 2008. – V. 97. – P. 55–74. – DOI 10.1007/s11120-008-9309-y (WoS JIF 3.7 / 1.25 п.л. / 0.63 п.л.)