

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

УДК 577.355, 577.23

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
доктор биологических наук
А.Е. Соловченко

Москва
2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений:.....	5
В. Введение.	7
В.1. Актуальность исследования	7
В.2. Цель исследования	8
В.3. Задачи исследования	8
В.4. Научная новизна	8
В.5. Положения, выносимые на защиту	9
В.6. Личный вклад автора.....	10
В.7. Апробация работы	10
В.8. Публикации	11
В.9. Структура и объем диссертации	11
I. Глава 1. Обзор литературы.	12
I.1. Механизмы защиты фотосинтезирующих организмов от избыточного освещения .	17
I.1.1. Нефотохимическое тушение	18
I.1.2. Фотоиндуцированное перераспределение хлоропластов в клетке	25
I.1.3. Механизмы защиты у организмов, подверженных долговременному воздействию неблагоприятных факторов среды	29
I.2. Взаимодействие различных стрессовых факторов как индукторов механизмов защиты от избыточного освещения	31
I.3. Экологическая специфичность стратегий защиты от избыточного освещения.....	33
I.4. Искусственные модуляторы механизмов защиты от избыточного освещения.....	35
I.5. Разработка методов исследования фотосинтетического аппарата	36
II. Глава 2. Методы и материалы	40
II.1. Объекты исследования.....	40
II.1.1. Зелёные одноклеточные водоросли:.....	40
II.1.2. Лишайники.....	41
II.1.3. Мох <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp.....	41
II.1.4. Деревянистые дикорастущие высшие растения.....	42
II.1.5. Деревянистые и травянистые комнатные высшие растения: бобы (<i>Vicia faba</i> L.), китайская капуста (<i>Brassica chinensis</i> L.), китайская роза (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>).....	42
II.2. Методы сбора и культивации	43
II.2.1. Водоросли	43
II.2.2. Лишайники.....	44
II.2.3. Мох <i>Physcomitrella patens</i>	44
II.2.4. Деревянистые высшие растения	45
II.2.5. Деревянистые и травянистые комнатные высшие растения.....	45
II.2.6. Хлоропласты	47
II.3. Моделирование факторов окружающей среды	48
II.3.1. Освещение.....	48
II.3.2. Состав атмосферы	49
II.3.3. Температурные воздействия	50
II.3.4. Дегидратация	51
II.4. Измерительные методы.....	51
II.4.1. ЭПР-спектроскопия (P700+, спиновые зонды)	51
II.4.2. Оптические методы.....	52
II.4.3. Электронная микроскопия	56
II.4.4. Экстракция и определение состава пигментов и жирных кислот методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии	57
II.4.5. Редокс-титрование	59
II.4.6. рН-метрия, оксиметрия в растворах, регуляция содержания CO ₂ , O ₂	60

II.4.7.	Измерения скорости транспирации и ассимиляции CO ₂ в листе	61
II.4.8.	Измерения скорости фотофосфорилирования и активности фактора CF1 в хлоропластах	61
II.4.9.	Оптическая микроскопия и подготовка материала.....	63
II.5.	Методы расчётов	66
II.5.1.	Расчёт электрических взаимодействий в белках.....	66
III.	Глава 3. Акклимация фотосинтетического аппарата к низкой положительной температуре.....	68
III.1.	Аннотация главы.....	68
III.2.	Индукция низкотемпературно-зависимого светового стресса в ФСА <i>L. incisa</i>	69
III.2.1.	Введение.....	69
III.2.2.	Результаты.....	71
III.3.	Структура и физико-химические свойства белка PsbS зелёной водоросли <i>L. incisa</i>	76
III.4.	Выводы.....	86
IV.	Глава 4. Акклимация ФСА к изменению интенсивности освещения	88
IV.1.	Аннотация главы.....	88
IV.2.	Индукция и релаксация нефотохимического тушения в листьях традесканции....	89
IV.3.	Светозависимое перераспределение хлоропластов в клетках мезофилла	107
IV.4.	Анатомическая структура листа как фактор, определяющий эффективность механизмов защиты ФСА	112
IV.5.	Выводы.....	126
V.	Глава 5. Роль спектрального состава освещения в обеспечении эффективности работы ФСА.....	128
V.1.	Аннотация главы	128
V.2.	Влияние спектрального состава освещения на характеристики фотосинтетического аппарата	128
V.3.	Теоретическая оценка влияния взаимной затенённости листьев на общую фотосинтетическую продуктивность растения.....	137
V.4.	Выводы	141
VI.	Глава 6. Устойчивость и эффективность работы ФСА при изменении газового состава среды	143
VI.1.	Аннотация главы.....	143
VI.2.	Влияние концентрации кислорода и углекислого газа в среде на активность транспорта электронов и индукцию нефотохимического тушения в хлоропластах.....	143
VI.3.	Влияние высокой концентрации углекислого газа в среде на индукцию нефотохимического тушения.....	149
VI.4.	Выводы.....	153
VII.	Глава 7. Индукция светового стресса и активность ФСА в растениях в природных условиях, в присутствии поллютантов и экзогенных антиоксидантов.....	154
VII.1.	Аннотация главы.....	154
VII.2.	Индукция светового стресса и активность ФСА у древесных растений в осенний период	155
VII.3.	Анализ чувствительности биофизических параметров листьев к действию поллютантов	158
VII.4.	Индукция светового стресса в присутствии экзогенных антиоксидантов.....	162
VII.5.	Выводы:	170

VIII. Глава 8. Индукция нефотохимического тушения и устойчивость фотосинтетического аппарата к стрессовым воздействиям у пойкилогидрических растений	171
VIII.1. Аннотация главы.....	171
VIII.2. Индукция НФТ у <i>P. patens</i> в ответ на мацерацию клеточной стенки.....	172
VIII.3. Устойчивость ФСА лишайника <i>Peltigera aphthosa</i> к воздействию стрессовых факторов, моделирующих условия космического полёта	177
VIII.4. Выводы.....	180
IX. Глава 9. Заключение и выводы.....	181
IX.1. Заключение	181
IX.2. Выводы.....	183
X. Приложение. Алгоритм построения диэлектрической модели белка и расчёта электрических взаимодействий в белке	185
X.1. Аннотация главы	185
X.2. Особенности алгоритма и учитываемые им свойства белков.....	185
X.3. Применение алгоритма для анализа характеристик ФСЦ растений и фотосинтетического реакционного центра пурпурных бактерий.....	192
X.4. Выводы:	196
XI. Литература.....	197
XII. Список статей по теме диссертации	217

Список используемых сокращений:

Ант (также Ant или A)— антраксантин

АФК — активные формы кислорода

БРЦ — бактериальный фотосинтетический реакционный центр

БС — белый свет

ВАЗ — пигменты виолаксантинового цикла: виолаксантин, антраксантин, зеаксантин

Вио (также Vio или V) — виолаксантин

ДНАТ (также HPSL) — натриевая лампа высокого давления

ЖК — жирные кислоты

Зеа (также Zea или Z) — зеаксантин

ИФХ — индукция флуоресценции хлорофилла

Кар — каротиноиды

Кс — ксантофиллы

НФТ (также NPQ) — нефотохимическое тушение

ППФ — плотность потока фотонов

РЦ — реакционный центр фотосистемы

СД (также LED) — светодиодный осветитель

ТЛ — термолюминесценция

ФАР — фотосинтетически активная радиация

ФСА — фотосинтетический аппарат

ФСII и ФСI — фотосистема II и фотосистема I

фЭТЦ — фотосинтетическая электрон-транспортная цепь

Хл (в формулах — также Chl) — хлорофилл

ЭПР — электронный парамагнитный резонанс

AL — актиничное освещение (используемое для изменения состояния ФСА)

DE — коэффициент дезоксидации пула ВАЗ (см. формулу IV.2)

F_X — интенсивность флуоресценции при длине волны X нм

HL / LL — высокая / низкая освещённость

LhcSR и PsbS — фотопротекторные белки, участвующие в НФТ у водорослей и высших растений, соответственно

LHCII — внешний антенный комплекс ФСII

MDA — малоновый диальдегид

P680 и P700 — первичный донор ФСII и ФСI, соответственно

PQ — пластохинон

SkQ — проникающие антиоксиданты на основе пластохинона (см. рис. VII.9)

T — оптическое пропускание листа

qE — энергозависимое тушение (наиболее быстро индуцируемая компонента НФТ)

Φ_{PSII} — квантовая эффективность ФСII

В. Введение.

В.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 and Fu 2022) и находятся в центре внимания исследовательских групп по всему миру (Demmig-Adams et al. 2012, 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. (Idi et al. 2015; Jha et al. 2017; Kleine et al. 2021). 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.

В.2. Цель исследования

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

В.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.

В.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.

В.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.

В.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.

В.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).

В.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.

В.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.

I. Глава 1. Обзор литературы.

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 2004).

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. I.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).

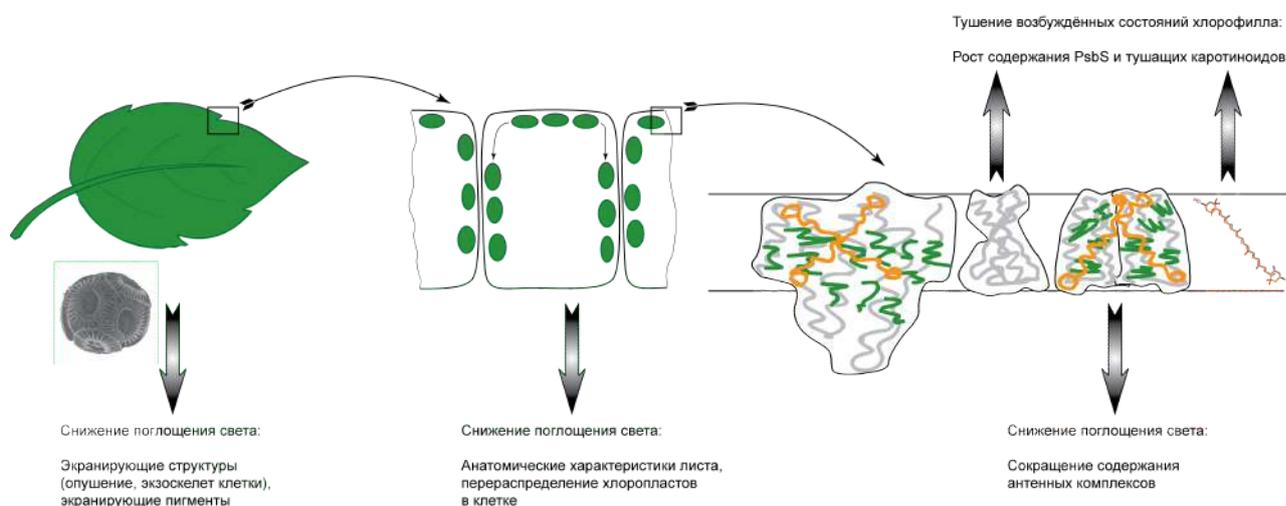


Рис. 1.1. Основные механизмы защиты ФСА от избыточного освещения

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 рН 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. I.2.

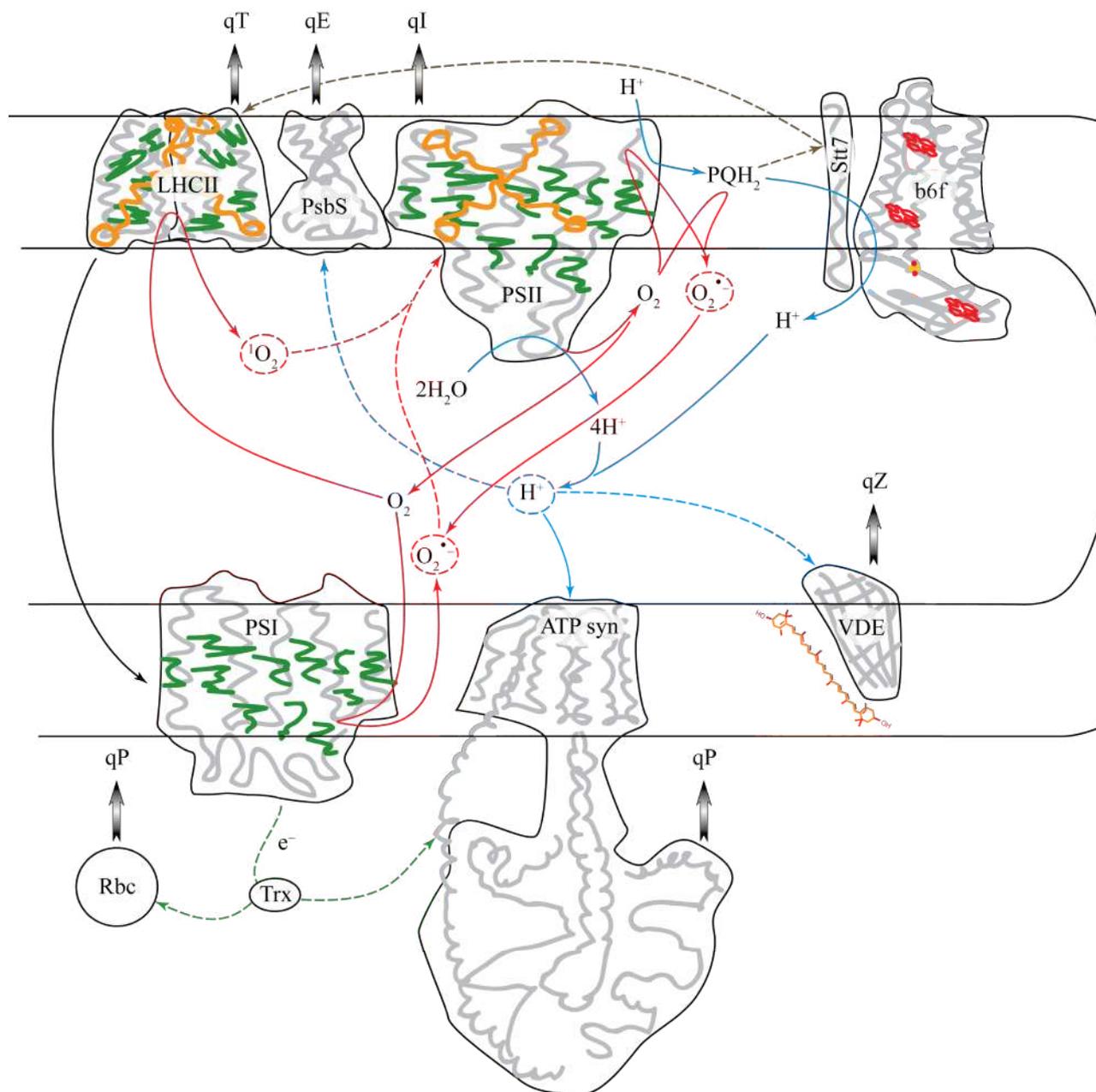


Рис. I.2. Основные пути активации НФТ в хлоропластах

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 ($^1\text{O}_2$) 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) (Dmitrieva et al. 2020; Khorobrykh 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).

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 поллютантов, 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 $^1\text{O}_2$ 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.

Ниже мы рассмотрим основные механизмы защиты ФСА растения от светового стресса и их взаимосвязь с воздействием стрессовых факторов разной природы.

I.1. Механизмы защиты фотосинтезирующих организмов от избыточного освещения

Механизмы защиты ФСА от избыточного освещения можно условно разделить на четыре группы: механизмы а) снижающие поглощение света в ФСА, б) снижающие время жизни электронного возбуждения в фотосинтетической антенне, в) дезактивирующие активные формы кислорода, образующиеся в результате стресса, и г) обеспечивающие репарацию повреждённых компонентов ФСА (Pascal et al. 2005; Curien et al. 2016; Nawrocki et al. 2016). В то время как последние две группы обладают достаточно широкими функциями в организме, первые две в большей степени специфичны для защиты ФСА от избыточного освещения и реализуются как на биохимическом или органелльном, так и на клеточном и морфологическом уровнях. Так, снижение количества поглощённого ФСА света за счёт уменьшения поглощения света всем организмом в целом характерно как для микроводорослей, за счёт отрицательного фототаксиса, так и для растений, обладающих листостебельной формой (мхи, лишайники, сосудистые растения), за счёт перераспределения хлоропластов в клетке (Kasahara et al. 2002; Sztatelman et al. 2010).

Вторая группа механизмов функционирует, в основном, на биохимическом уровне организации ФСА. Среди механизмов, распространённых в большинстве групп фототрофных организмов, можно назвать так называемое энергозависимое тушение (qE), виолаксантиновый цикл, агрегация антенных комплексов и их перераспределение между фотосистемами (state transition) (Nawrocki et al. 2016). Все перечисленные

механизмы — светоактивируемые, они достаточно быстро индуцируются и релаксируют (характерные времена — порядка единиц и десятков минут).

1.1.1. Нефотохимическое тушение

Остановимся подробнее на этом комплексе механизмов, обеспечивающих тушение возбужденных форм хлорофилла с рассеянием энергии в виде тепла. В результате снижается вероятность реакции возбуждённого хлорофилла с растворённым в среде кислородом и, следовательно, образования активных форм кислорода (Müller et al. 2001). Этот процесс сопровождается легко детектируемым снижением интенсивности флуоресценции хлорофилла, поэтому его часто называют также нефотохимическим тушением флуоресценции (НФТ; эпитет «нефотохимическое» означает, что это тушение не связано с фотохимической реакцией в фотосинтетическом реакционном центре).

В наблюдаемом снижении квантового выхода флуоресценции Хл, как правило, отчётливо наблюдаются несколько фаз. Самая быстрая, протекающая в секундном диапазоне времён, определяется образованием ΔpH на тилакоидной мембране и называется энергозависимым (также энергетическим или рН-зависимым) НФТ (qE). Изменения других характеристик системы защиты ФСА приводят к возникновению более медленных фаз индукции НФТ. НФТ обеспечивается взаимодействием нескольких молекулярных компонентов — пигментов ксантофиллов (Kc) (Demmig-Adams 1990; García-Plazaola et al. 2012) и белков, локализованных в тилакоидной мембране и взаимодействующих с ксантофиллами и/или с фотосинтетическими антенными комплексами. Известно два белка, непосредственно обеспечивающих НФТ: Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins (LhcSR) (Peers et al. 2009; Pinnola 2019) и компонент фотосистемы II (ФСII) PsbS (Li et al. 2002). Оба белка относятся к

суперсемейству антенных белков. Показано, что в отсутствие белка PsbS ФСА не проявляет НФТ и чувствителен к повреждающему действию света, в то время как в генетически модифицированных линиях, содержащих его повышенное количество (оверэкспрессоры PsbS), НФТ и защита от повреждений ФСА избыточным светом выражены сильнее, чем в диком типе (Sirikhachornkit and Niyogi 2010; Erickson et al. 2015).

Белок LhcSR имеет пространственную структуру, схожую со структурой минорной антенны ФСII (CP29) или мономеров комплекса ЛНСII (включающую три трансмембранных альфа-спиральных столба), и, подобно им, также связывает молекулы Хл и Кс (7 молекул Хл *a* и одну дополнительную молекулу Хл *a* или *b* и 3 или 4 молекулы Кс, включая лютеин и виолаксантин) (Guarnetti Prandi et al. 2022). Существуют различные представления о том, каким образом LhcSR или близкие к нему белки ЛНСХ вызывают тушение электронного возбуждения Хл в антенне: за счёт переноса возбуждения с Хл на Кс с последующей быстрой конверсией Кс* в Кс, за счёт переноса электрона с Кс на Хл, или же за счёт образования экситонного сопряжения между молекулами Хл и Кс (Pinnola et al. 2016; Park et al. 2019), однако, в любом из этих случаев предполагается, что именно LhcSR является центром тушения.

Некоторое время аналогичный механизм тушения предполагался и для PsbS (Li et al. 2000b; Aspinall-O'Dea et al. 2002a). Однако появившиеся в 2000-х гг. данные о биохимических свойствах PsbS (Dominici et al. 2002), а также по мутагенезу PsbS (Bonente et al. 2008a), а затем и данные о трёхмерной структуре этого белка (Fan et al. 2015) показали, что он не содержит молекул пигментов. В отличие от LhcSR и антенных белков PsbS имеет дополнительную (четвертую) трансмембранную спираль и более компактную структуру, которая не оставляет достаточно пространства для связывания Хл и Кс (Fan et al. 2015). В связи с этим высказываются различные гипотезы о возможном механизме участия PsbS в тушении возбуждения в антенне, предполагающие его взаимодействие

(непосредственное или с участием молекул Кс) с белками внешней и внутренней антенн и переключение самих этих антенн в «тушащее» состояние. Это переключение сопряжено с кластеризацией внешних антенных комплексов ФСII, LHСII (Ruban and Wilson 2021) и, возможно, связано с изменением взаимодействия LHСII с их липидным окружением и, как результат, их подвижности в тилакоидной мембране (Daskalakis et al. 2019). После того, как обнаружено, что PsbS может существовать в тилакоидной мембране как в форме мономера, так и гомодимера, причём соотношение мономер/димер обратимо изменяется светоиндуцированным образом (при снижении рН равновесие сдвигается в сторону мономерной формы), в качестве одной из основных рассматривается гипотеза, что рН-зависимая активация PsbS обусловлена его превращением из димера в мономер (Bergantino et al. 2003). Эта мономеризация опровождается изменением расположения PsbS внутри суперкомплекса ФСII, а именно ассоциацией мономеров со светособирающими антеннами, в то время как димеры имеют тенденцию ассоциироваться с ядром ФСII. Недавно было высказано предположение, что переходы димер-мономер, в свою очередь, связаны с изменениями в двух коротких амфипатических спиральях Н2 и Н3 на люменальной стороне белка. Так, данные ЯМР- и ИК-спектроскопии выявили перемещение спирали Н2 в белке PsbS мха *Physcomitrella patens* из водной фазы в мембранную и переход Н3 из сегмента петли в спираль, вызванный протонированием ключевых остатков глутамата (Krishnan-Schmieden et al. 2021).

Однако, независимо от молекулярных механизмов, которыми обеспечивается LhcSR- и PsbS- зависимое тушение, полагают, что каждый из этих белков служит детектором рН в тилакоидном люмене и, следовательно, обеспечивает энергозависимый компонент НФТ (qE). А именно, закисление люмена приводит к протонированию экспонированных в люмен аминокислотных остатков и образованию центра тушения в самом белке или же в контактирующих с ним антенных комплексах. Более того,

оба белка оказываются аналогами друг друга в эволюционной перспективе. Так, LhcSR (или близкие к нему LHCX-подобные белки) выполняет фотопротекторную функцию у зелёных (включая Chlorophyta и Charophyta), бурых, диатомовых, гаптофитовых и других групп водорослей (Niyogi and Truong 2013; Giovagnetti and Ruban 2018), а также мхов (насколько нам известно, в литературе упоминается лишь главный модельный объект из этой группы — *Physcomitrella patens* - (Alboresi et al. 2010)). Он исчезает у сосудистых растений, у которых его функции выполняет белок PsbS. У мхов также обнаруживается PsbS, где он работает вместе с LhcSR (Alboresi et al. 2010). Так, для модельного мха *Physcomitrella patens* показано, что в стресс-индуцированном НФТ участвуют оба белка, хотя основной вклад в фотозащиту даёт LhcSR (Tibiletti et al. 2016), особенно при флуктуирующем освещении (Gao et al. 2022), что связано, скорее всего, не с различием в эффективности LhcSR и PsbS, а с малым содержанием последнего (Gerotto et al. 2012). Для харовых водорослей было показано, что световой стресс вызывает рост экспрессии гена, кодирующего PsbS. У зелёных водорослей ген, кодирующий PsbS, был обнаружен в геноме, но детектировать белок или обнаружить его дифференциальную экспрессию в каких-либо условиях долгое время не удавалось, из чего делали вывод об отсутствии функциональной активности белка у этой группы фотосинтетических организмов (Anwaruzzaman et al. 2004; Bonente et al. 2008b). Позже условия, стимулирующие рост уровня мРНК PsbS в клетке, были найдены для клеток модельной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: азотное голодание (Miller et al. 2010) и фотопериод (переход от темноты к освещению, (Zones et al. 2015)). Лишь несколько лет назад сам белок PsbS и стресс-индуцированные изменения его содержания были обнаружены в клетках модельной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в ответ на значительное повышение освещённости (Correa-Galvis et al. 2016; Tibiletti et al. 2016) или перенос из темноты на свет (Strenkert et al. 2019). Однако этот ответ был очень кратковременным (порядка нескольких часов, хотя при

низкой концентрации CO₂ в среде его удавалось продлить более чем на сутки (Correa-Galvis et al. 2016)), в отличие от значительно более пролонгированного эффекта стресса на экспрессию LhcSR. На этом основании был сделан вывод о вспомогательной функции PsbS для LhcSR-зависимого тушения (Correa-Galvis et al. 2016).

Наряду с PsbS для LhcSR, ключевыми детерминантами НФТ являются также состав и содержание пигментов (в первую очередь — дезоксидированных форм ксантофиллов, зеаксантина (Zea) и лютеина (Demmig-Adams 1990; García-Plazaola et al. 2012)) и содержание других фотопротекторных белков (Hliр, Sep, Elip, PsbS; (Verhoeven 2014)). Эти белки принадлежат к семейству хлорофилл-связывающих белков, родственны белкам светособирающей антенны, но имеют иные функции, которые, однако, не до конца ясны. Так, во многих работах показано возрастание содержания этих белков в клетках растительных организмов, подверженных действию тех или иных стрессовых факторов (Zarter et al. 2006a, b; Demmig-Adams et al. 2014) и корреляция их содержания со степенью повреждений, получаемых ФСА.

Полагают, что, в отличие от PsbS, который обеспечивает быстро регулируемое энергетически- зависимое (pH-зависимое) НФТ, другие перечисленные выше фотопротекторные белки, по-видимому, отвечают за энерго-независимое, конститутивное НФТ (Demmig-Adams et al. 2014). Однако, в отличие от PsbS, их конкретная роль в защите ФСА от повреждения избыточным светом остаётся не вполне ясной. Так, у белков Elip показано наличие целого ряда функций, существенных для метаболизма пластид и общеорганизменных функций, но никак не связанных с НФТ, таких как регуляция синтеза предшественников хлорофилла, участие в светозависимых сигнальных путях, запускающих прорастание семян, и др. (Юрина и др. 2013). Для Hliр/Ohp показано участие в стабилизации тримеров ФСІ и регуляция синтеза тетрапирролов (Юрина и др. 2013). Hliр/Ohp также приписывается роль в транспорте вновь

синтезируемых пигментов и участии в сборке обеих фотосистем (Акулинка и др. 2015). На растениях генетически модифицированных линий *Arabidopsis thaliana* показано, что отсутствие этих белков приводит почти полному подавлению фотосинтеза даже при оптимальных для фотосинтеза условиях (Beck et al. 2017). В то же время, ряд других данных свидетельствует против наличия у белков семейства Elip (Hlip/Ohp, Sep) функций защиты от избыточного освещения (Casazza et al. 2005; Rossini et al. 2006).

Для всех белков данного семейства предполагается способность связывать молекулы пигментов (Jansson et al. 2000), в том числе защитные каротиноиды (Funk et al. 1995; Aspinall-O'Dea et al. 2002b), хотя в последнее время это подвергается сомнению (Fan et al. 2015). Показано, что с индукцией НФТ коррелирует содержание именно дезоксидированных форм, Зеа и лютеина у высших растений (Garcia-Plazaola et al. 2007; Jahns and Holzwarth 2012), а также нескольких дополнительных дезоксидированных ксантофиллов у водорослей (Lohr and Wilhelm 1999), в то время как эпоксидированный ксантофилл виолаксантин либо не участвует в НФТ (Gilmore 1997), либо, по другим данным, ингибирует его индукцию (Каһа et al. 2016). Несмотря на то, что имеются сомнения в необходимости Зеа для индукции НФТ (Johnson and Ruban 2011), существуют и доказательства непосредственного участия Зеа в НФТ как необходимого фотохимического компонента (Holt et al. 2005). У растений при действии низких температур на фоне интенсивного освещения показано накопление Зеа по мере роста интенсивности стрессовых факторов (Zarter et al. 2006a, b).

Наряду с Зеа- и Ohp/Sep/Elip/PsbS-зависимым тушением, показано также существование НФТ в реакционном центре (РЦ) ФСII, происходящее с участием катион-радикальных форм хлорофилла (Bruce et al. 1997; Schweitzer and Brudvig 1997). По-видимому, основную роль в этом тушении играет первичный донор ФСII P680⁺, а главным механизмом тушения

является рекомбинация разделённых зарядов (Ivanov et al. 2008). Показано, что интенсивность НФТ этого типа растёт с понижением температуры за счёт изменения редокс-потенциалов кофакторов на акцепторной стороне ФСII (Sveshnikov et al. 2006). При этом существенно, что данная перестройка, по-видимому, является не прямым изменением конформации пигмент-белкового комплекса ФСII при понижении температуры, а более сложным механизмом, имеющим долговременную компоненту. Так, «закаливание» растений (т.е. их предварительная обработка пониженными температурами до начала измерений) активирует рекомбинационно-зависимый механизм НФТ и повышает устойчивость ФСА к повреждающему действию света (Sane et al. 2003). Кроме этого, возможно и НФТ в результате непосредственного взаимодействия окисленного первичного донора ФСII P680+ с возбуждённым хлорофиллом фотосинтетической антенны, эффективность которого была оценена в недавней работе (Paschenko et al. 2016). Однако, данный механизм НФТ, по-видимому, требует особых условий для своей реализации, при которых образуются заметные концентрации P680+ (что не характерно для обычных условий функционирования ФСII).

Несмотря на наличие большого объёма данных о перечисленных выше механизмах НФТ, остаётся открытым вопрос об их фактической роли в обеспечении устойчивости ФСА при воздействии стрессовых факторов, в частности — о соотношении их вкладов в общее НФТ. Механизмы НФТ в РЦ ФСII, как правило, рассматриваются отдельно от Zea-зависимого НФТ, и попыток оценить фактическую эффективность этих механизмов в растении, подверженном действию конкретных стрессовых факторов, насколько нам известно, никогда не было сделано.

В отличие от НФТ в РЦ, Zea- и Ohp/Sep/Elip/PsbS-зависимые механизмы НФТ часто рассматриваются совместно. К настоящему времени опубликован ряд работ, в которых приводятся данные по изменениям одновременно белкового и пигментного состава для растений,

подверженных действию тех или иных неблагоприятных условий окружающей среды (Zarter et al. 2006a, b; Mishra et al. 2012; Demmig-Adams et al. 2014, 2015; Moy et al. 2015). Эти работы содержат ценную информацию об участии данных механизмов в защитной реакции организма в естественных условиях. Однако количественный анализ дифференциальной индукции отдельных механизмов в зависимости от интенсивности стрессоров не проводился, и вопрос о количественной оценке вклада конкретных механизмов остается открытым.

1.1.2. Фотоиндуцированное перераспределение хлоропластов в клетке

Эффективность фотосинтеза и индукция молекулярных механизмов защиты ФСА от избыточного освещения не одинаковы по всему объёму фотосинтетической ткани, что обусловлено наличием градиента освещённости в листе вдоль направления падения света (как правило, в направлении, перпендикулярном к плоскости листовой пластины). Этот градиент, в свою очередь, является фоторегулируемым, то есть его изменения также выполняют функции защиты ФСА от избыточного освещения и регуляции фотосинтеза. Физическим механизмом его регуляции служит светозависимое перераспределение хлоропластов в клетках, характерное практически для всех высших и многих низших растений. Возможность существования в фотосинтетической клетке разных «схем» расположения хлоропластов и зависимость выбора между ними от условий освещения была обнаружена ещё в середине 19-го века (Böhm 1856; Frank 1871), детальное же исследование этого явления было выполнено Сенном в начале 20-го века (Senn 1908). При этом долгое время считалось, что перемещение хлоропластов определяется непосредственно поглощением света локализованным в них ФСА, так что «хлоропласты ориентируются на свет, определяя, где в клетке наилучшие или, по крайней

мере, освещённые участки. Чтобы определить это, они должны поглотить свет и «измерить» его» (Haupt 1966). Данные о спектральной чувствительности фотоиндуцированного перераспределения хлоропластов (сине-фиолетовый спектральный диапазон 450–480 нм как наиболее активный, а также на дополнительный пик в области 360 нм (Babushkin 1955; Zurzycki 1962, 1967; Lechowski 1973)) первоначально рассматривались как указание на роль каротиноидов как хромофоров (например, (Babushkin 1955)). Однако к началу 1960-х гг. накопились данные, свидетельствующие, что хромофорами являются флавины (Fischer-Arnold 1963), уже известные к тому времени как хромофоры фоторецепторов, ответственных за фототропизм (Galston and Baker 1949), причём локализованные не в самих хлоропластах, а в цитоплазме (Bock and Haupt 1961). В соответствии с современными представлениями рибофлавин является хромофором фоторецептора фототропина (Huala et al. 1997). У семенных растений два типа фототропина, phot1 и phot2, участвуют в регуляции движения хлоропластов. Оба фототропина — мембранно-ассоциированные белки, локализованные преимущественно в плазматической мембране, но также и во внешней хлоропластной мембране (преимущественно — phot2) (Ishishita et al. 2020). Слабый свет вызывает положительный фототаксис хлоропластов, результатом которого является так называемое светоулавливающее перераспределение хлоропластов (accumulation photorelocation). Реакция хлоропласта на сильный свет — отрицательный фототаксис, который проявляется как светоизбегающее перераспределение (avoidance photorelocation) хлоропластов в клетке. При этом за светоулавливающее перераспределение хлоропластов ответственны phot1 в широком диапазоне интенсивностей света (0,4–100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) и phot2 в области умеренной интенсивности (2–20 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), а за светоизбегающее перераспределение — только phot2 в области высоких интенсивностей (20–100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) (Kong and Wada 2016), причём преимущественно — хлоропластная

фракция phot2 (Ishishita et al. 2020). Непосредственно перемещение хлоропластов осуществляют специальные актиновые микрофиламенты, закоренные во внешней мембране хлоропласта и привязывающие его к плазмалемме (Kong and Wada 2014; Kim et al. 2020). Это обстоятельство позволяет использовать агенты, разрушающие актиновые филаменты или препятствующие их сборке, в качестве ингибиторов светозависимого перераспределения хлоропластов.

Наряду с описанной выше схемой организации перемещения хлоропластов в клетке, типичной для высших растений, у низших и некоторых высших растений также встречается организация фоторецепторной системы, включающей фитохром или гибридный фоторецептор неохром, т.е. чувствительной к красному свету — например, зеленых водорослей *Mougeotia scalaris* и *M. caldariorum*, мха *Physcomitrella patens* или папоротника *Adiantum capillus-veneris* (Suetsugu and Wada 2008). Кроме того, для ряда растений характерно участие системы микротрубочек в светозависимом перемещении хлоропластов (например, для *Physcomitrella patens* (Suetsugu and Wada 2008)).

Несмотря на, казалось бы, очевидную адаптивную роль светозависимого перераспределения хлоропластов, его физиологическое значение для растения до сих пор остаётся предметом дискуссий. Так, первое количественное исследование влияния этого эффекта на скорость ассимиляции атмосферного углерода было выполнено в 1950-х годах Яном Зуржицким (Zurzycki 1955) и не выявило никакого влияния расположения хлоропластов на фотосинтез. Возможно, такой результат был обусловлен низкой интенсивностью используемого им освещения. Это привело к гипотезе о том, что уменьшение поглощения света при его высокой интенсивности призвано ограничивать его вредное воздействие на растительный организм. Прямые доказательства этой гипотезы появились лишь полвека спустя в работе с мутантами *A. thaliana*, дефектными в отношении светоизбегающего перераспределения (Kasahara et al. 2002).

Было показано, что нарушение нормального ответа хлоропластов на интенсивный свет сделало растения более восприимчивыми к световым ожогам. Тем не менее, в последние годы появились данные о том, что «отключение» реакции светоизбегающего перераспределения у того же самого объекта, *A. thaliana*, приводит к более эффективному росту растений на интенсивном свете, то есть создаёт для растения преимущество в росте вместо ожидаемой ущербности (Gotoh et al. 2018). Кроме того, показано, что светозависимое перераспределение хлоропластов в клетке неэффективно у растений, адаптированных к интенсивному освещению (Higa and Wada 2016; Pfündel et al. 2018).

Защитное действие перераспределения хлоропластов в клетке частично обусловлено уменьшением интегрального поглощения света листом. Это уменьшение различно как у разных видов растений, так и для разных условий роста. В среднем, для большинства растений изменения поглощения света листом при переходе от слабого к интенсивному освещению составляют от нескольких процентов до 20%. Так, для 24 видов растений умеренного климата было показано, что изменения пропускания красного света составляют от 2% в листьях, выращенных на солнце, до 6% для листьев, выращенных в тени (Davis et al. 2011). Для других одиннадцати видов были показаны изменения от 8% до 30%, причём увеличение поглощения на слабом свете по сравнению с адаптированными к темноте листьями составляло от 1% до 12%, а уменьшение на интенсивном свете по отношению к тому же темноадаптированному состоянию давало вклад от 7% до 20%) (Königer and Bollinger 2012). Примечательно, что весьма высокие значения по сравнению с большинством других растений показывала *A. thaliana* (23% и 38% для реакций на слабый и сильный свет, соответственно) (Königer and Bollinger 2012).

Однако гораздо большее значение для защиты от повреждающего действия избыточного освещения и оптимизации эффективности

фотосинтеза имеет изменение градиента интенсивности света внутри листа и, вместе с тем, изменение поперечного профиля поглощения света. Эти изменения приводят к более эффективному использованию света во всём объёме листа за счёт снижения фотоингибирующего воздействия интенсивного света на ФСА в верхних слоях клеток мезофилла листа и увеличения освещённости в затенённых нижних слоях. При этом относительно небольшое изменение интегрального поглощения света листом сопровождается существенным изменением поглощения в отдельных (наиболее подверженных световому стрессу и наиболее затенённых) слоях листа. Так, расчёты показывают, что интегральному снижению поглощения на 8,4% соответствует 1,6-кратное снижение поглощения света в верхней трети поперечного сечения листа и одновременное 1,7-кратное увеличение поглощения света клетками мезофилла в нижней части листа, составляющей две трети его толщины (Davis and Hangarter 2012). В результате фотосинтетический аппарат верхних клеток мезофилла может избежать фотоингибирования, в то время как более глубоко лежащие клетки получают возможность захватывать больше света и повысить свою фотосинтетическую активность.

1.1.3. Механизмы защиты у организмов, подверженных долговременному воздействию неблагоприятных факторов среды

В то время как набор механизмов, используемых фотосинтезирующими организмами в защите от стресса, а также их физическая природа, в целом, более или менее полно изучены к настоящему времени, остаётся неясной «приоритетность» их использования в естественных условиях и вклад каждого из них в общую защитную реакцию организма. Предполагается, что для разных механизмов их роль может быть различна в зависимости от вида растения и, в первую очередь, его экологических особенностей, а также от конкретных условий.

Особый интерес представляют механизмы защиты от долговременного действия стрессоров, по фенотипическому проявлению часто сходные с «оперативными» механизмами, упомянутыми выше. Так, у пойкилогидрических организмов предполагается также наличие светонезависимого механизма, связанного с конформационными перестройками пигмент-белкового фотосинтетического реакционного центра (Heber and Shuvalov 2005; Heber et al. 2006b, 2007, 2011). Следует отметить, что во многих случаях выдающаяся устойчивость фототрофных организмов к длительному действию различных экстремальных факторов среды (отрицательные температуры, дегидратация, засоление) на фоне высокой инсоляции связана с индукцией и долговременным поддержанием высоких уровней НФТ. Однако «механика» долговременной защиты от действия стрессоров, особенно комбинированных, а также механизмы генерации и поддержания НФТ в этих случаях изучены существенно хуже.

Среди неблагоприятных условий одним из наиболее распространённых является понижение температуры окружающей среды, которое приводит к снижению текучести мембран клеток, замедлению реакций метаболизма, в том числе участвующих в ассимиляции углекислого газа и дальнейшем вовлечении продуктов ассимиляции в реакции роста и морфогенеза растения. Наряду с индукцией общих структурных и функциональных адаптаций организма к низкой температуре (например, снижения вязкости мембраны за счёт десатурации жирных кислот мембранных липидов или образование защитных осмолитов (Theocharis et al. 2012; Los et al. 2013)) в ФСА происходит также специфическая адаптация, направленная на снижение светового давления на ФСII (Huang et al. 2010).

I.2. Взаимодействие различных стрессовых факторов как индукторов механизмов защиты от избыточного освещения

Фотосинтезирующие организмы характеризуются наличием эффективной системы поглощения света, используемого ими для осуществления энергоакцепторных биохимических реакций (Osborne and Raven 1986; Croce and Van Amerongen 2014; Walla et al. 2014; Amarnath et al. 2016). Однако воздействие стрессовых факторов разной природы на растение сказывается на общей физиологической активности, а следовательно, и на возможности эффективной утилизации энергии поглощаемого растением света. Поэтому, с одной стороны, многие стрессовые факторы (включая водный дефицит, недостаток минерального питания, воздействие высокой или низкой температуры, и др.) провоцируют также световой стресс, т.е. состояние растения, при котором значительная часть поглощаемого им света оказывается избыточной и может приводить к повреждению ФСА (Navaux 1992; Goh et al. 2012; Liu et al. 2012). Это приводит к необходимости функционирования в растении эффективных механизмов регуляции работы ФСА и его защиты от светового и окислительного стресса, наряду со специфическими реакциями растения на конкретные стрессовые воздействия. С другой стороны, для многих стрессовых факторов известно, что реакция на них автоматически включает в себя такие изменения, которые подготавливают растение к встрече со световым стрессом (Azzabi et al. 2012). Такое многоплановое взаимодействие светового стресса и стрессов другой природы в растении представляет богатые возможности как для исследований механизмов перекрёстной устойчивости растений к стрессу, так и для установления физиологической значимости отдельных защитных механизмов для растения в различных условиях, лабораторных или естественных.

Так, в случае микроводорослей, которые были одним из главных объектов представленного в данной работе исследования, одним из

наиболее распространённых естественных стрессовых факторов являются низкие температуры окружающей среды. Также существует ряд факторов, относительно редко встречающихся в естественных условиях обитания, но важных для задач биотехнологии, биоремедиации и др. К последним можно отнести высокое содержание диоксида углерода в среде культивации. Воздействие низких температур приводит к снижению текучести мембран клеток, замедлению реакций метаболизма, в том числе участвующих в ассимиляции углекислого газа и дальнейшем вовлечении продуктов ассимиляции в реакции роста растения. Наряду с индукцией общих структурных и функциональных адаптаций организма к низкой температуре (например, снижения вязкости мембраны за счёт десатурации жирных кислот мембранных липидов или образование защитных осмолитов (Theocharis et al. 2012; Los et al. 2013) в ФСА происходит также специфическая адаптация, направленная на снижение светового давления на ФСII (Huang et al. 2010). Как уже было отмечено выше, у высших растений при действии низких температур на фоне интенсивного освещения происходит накопление зеаксантина (Zea) (Zarter et al. 2006a, b), а также индукция НФТ с участием катион-радикальных форм хлорофилла (Bruce et al. 1997; Schweitzer and Brudvig 1997) и рекомбинации разделённых зарядов в РЦ ФСII (Ivanov et al. 2008). В разделе I.1.1 мы также уже упоминали о том, что предварительная обработка растений пониженными температурами («закаливание») активирует рекомбинационно-зависимый механизм НФТ и повышает устойчивость ФСА к повреждающему действию света (Sane et al. 2003).

Негативное воздействие на фотосинтез микроводорослей повышенной концентрации диоксида углерода в среде обусловлено в значительной степени закислением среды, которое может сопровождаться снижением рН в строме и люмене хлоропластов ниже оптимального уровня (Птушенко и Соловченко 2016). В частности, снижение рН в строме хлоропласта приведёт к падению активности рибулозобисфосфат-

карбоксилазы/оксигеназы (Rubisco), для которой оптимален слабощелочной диапазон (Portis Jr et al. 2008). Второй вероятной мишенью воздействия этого фактора являются реакции депротонирования пластохинола в b6f-комплексе фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), которые замедляются при закислении люмена (Tikhonov 2013). Одним из специфических механизмов защиты от данного типа негативных воздействий окружающей среды может служить быстрая регуляция активности CO₂-концентрирующего механизма (Птушенко и Соловченко 2016), который в норме позволяет до 10³ раз повышать концентрацию CO₂ вблизи активного центра Rubisco (Wang et al. 2015). Своевременное отключение этого механизма позволяло бы избежать накопление избытка CO₂ в клетке и, следовательно закисления её компартментов. Наряду со специфическими механизмами, избыток CO₂ в среде также активирует механизмы снижения концентрации возбуждённых состояний хлорофилла в ФСII, а также вызывает миграцию светособирающей антенны от ФСII к ФСI (Solovchenko et al. 2015).

I.3. Экологическая специфичность стратегий защиты от избыточного освещения

Тем не менее, функционирование ФСА и индукция защитных механизмов в растениях, находящихся в условиях комбинированного стресса, остаются пока малоизученными. Малоизучена также видоспецифичность и «экологическая специфичность» защитных механизмов и стратегии их использования. В данном исследовании была сделана попытка в какой-то мере восполнить этот пробел, сделав акцент на сравнительном изучении растений, относящихся к различным экологическим и таксономическим группам. Так, ряд исследований выполнен на нескольких видах рода *Tradescantia* (*T. albiflora*, *T. fluminensis*,

T. sillamontana, *T. zebrina*, *T. navicularis*), «перекрывающих» практически весь диапазон возможных экологических потребностей растения по отношению к свету. Такой набор модельных объектов удобен для анализа адаптивности близкородственных видов и индивидуальной пластичности растений. Наряду с традесканциями, целый ряд других травянистых и древесных высших растений был использован в данном исследовании, в зависимости от решаемой задачи.

Большое разнообразие стратегий адаптации к изменению в широких пределах различных экологических факторов, влияющих на эффективность работы ФСА, представляют эукариотические зелёные микроводоросли. Так, в качестве модельных объектов в данной работе были использованы клетки свободноживущей микроводоросли *Chlorella vulgaris*, симбиотической микроводоросли *Desmodesmus sp.*, устойчивой к низким pH среды, и почвенной (аэрофильной) микроводоросли *Lobosphaera incisa* str. CALU-925, устойчивой к воздействию низких положительных температур. В то время как первая из них является классическим модельным объектом (Sayed and El-Shahed 2000; Xiong et al. 2014; Zhang et al. 2014), две другие — относительно недавно изолированные и описанные организмы, рассматриваемые как перспективные объекты для фундаментальных исследований в области физиологии растений и для задач биотехнологии.

Наряду со свободноживущими водорослями, необходимо отдельно выделить водоросли — симбионты лишайников. Устойчивость их ФСА по отношению к внешним воздействиям определяется не только их собственными механизмами, но и, по-видимому, в большей степени теми условиями, которые создаются для водоросли её партнёром — микобионтом. В данной работе ещё одним объектом исследования служил трёхкомпонентный лишайник *Peltigera aphthosa* (L.) Willd., содержащий в качестве первичного фотобионта эукариотическую зелёную водоросль рода *Coccoluxa*.

К группе, являющейся во многих отношениях, в том числе в способах организации защиты ФСА от избыточного освещения, переходной между водорослями и высшими растениями, относится другой объект данного исследования — пойкилогидрический мох *Physcomitrella patens*. *P. patens* достаточно хорошо изучен (Thornton et al. 2005; Wang et al. 2012), это было первое мохообразное растение, геном которого был полностью прочитан к 2008 году (Rensing et al. 2008), и с этого момента он служит классическим модельным объектом в разнообразных областях биологии растений. Так, для *P. patens* проводились исследования влияния на фотосинтетическую активность разнообразных стрессовых воздействий, включая дегидратацию, осмотический и солевой стрессы, действие повышенных и пониженных температур, световой стресс (Fernández-Marín et al. 2009; Azzabi et al. 2012; Gerotto et al. 2016).

I.4. Искусственные модуляторы механизмов защиты от избыточного освещения

Наряду с реакцией растения на естественные стрессовые воздействия, мы также рассмотрели в нашей работе действие модуляторов стресса — проникающих антиоксидантов. Проникающие антиоксиданты становятся в последнее время всё более распространённым инструментом воздействия и исследования на митохондриях животных (Skulachev et al. 2011; Плотников et al. 2012; Antonenko et al. 2013), на клетках одноклеточных грибов и культурах клеток (Skulachev et al. 2011; Antonenko et al. 2013; Омарова и Антоненко 2014), наконец, на животных *in vivo* (Бакеева и др. 2008; Skulachev et al. 2011; Исаев и др. 2013). Однако в исследованиях фотосинтеза и фотосинтетических живых систем они остаются ещё совершенно невостребованными (из работы последних лет нам известна лишь единственная работа (Самуилов и Киселевский 2015), рассматривающая взаимодействие SkQ1 с ФСА).

I.5. Разработка методов исследования фотосинтетического аппарата

В то время как часть механизмов защиты от избыточного освещения, таких как фотоиндуцированное перераспределение хлоропластов в клетке, регулируется непосредственно светом, другие механизмы (энергетическое нефотохимическое тушение, эпоксидация виолаксантина и др.) регулируются по принципу обратной связи, величиной тилакоидной трансмембранной разности рН (ΔpH) или непосредственно значением рН в одном из компартментов (стромы хлоропласта или тилакоидный люмен). рН-регуляция осуществляется за счёт протонирования/депротонирования аминокислотных остатков в составе белков или каких-либо других физиологически активных молекул (например, пластохинона) и тем самым определяется значениями pK_a соответствующих групп/молекул. В связи с этим оказываются востребованными методы теоретической оценки влияния белкового окружения на кислотно-основные свойства входящих в их состав протонируемых групп и, таким образом, их значений pK_a .

Влияния белкового окружения связано с электрическими взаимодействиями функциональных групп с другими группами белка и в случае, если не происходит образования химических связей, может быть оценено методами электростатики. В теоретических исследованиях электростатики белков существует два основных подхода (см. обзоры (Honig and Nicholls 1995; Schaefer et al. 1998; Warshel and Papazyan 1998; Simonson 2001, 2003; Bashford 2004)). Первый подход, микроскопический, предполагает явное рассмотрение взаимодействий всех атомов друг с другом. Результатом такого рассмотрения (методами молекулярной динамики и статистического моделирования (метод Монте-Карло)) является моделирование эволюции белка к равновесному состоянию и, в конечном итоге, определение его равновесных характеристик. Такой

подход выглядит чрезвычайно привлекательным, однако значительный объём требуемых вычислений, до последнего времени вносивший существенные ограничения в его практические применения, требует ряд упрощений и приближений. Второй подход — полумагроскопический (его также называют полумикроскопическим или полуконтинуальным). В рамках этого подхода молекула белка рассматривается как система зарядов (частичных зарядов атомов), погруженных в непрерывную диэлектрическую среду. Существует также ряд методов, объединяющих оба этих подхода (см., например, (Georgescu et al. 2002)).

Полумагроскопический подход сочетает в себе ясность физической картины описания электрических взаимодействий в белке и разумные требования к объёму расчетов. С точки зрения этого подхода, можно выделить две компоненты электрического влияния белка на сродство заданной химической группы к протону: 1) диэлектрический отклик среды и 2) внутрибелковое электрическое поле. Диэлектрический отклик представляет собой поляризацию среды в ответ на внесение в неё нового электрического заряда; эта поляризация снижает энергию создаваемого зарядом электрического поля и тем самым стабилизирует заряд. Однако в случае переноса заряда из легко поляризуемой среды в среду с низкой поляризуемостью стабилизация заряда, наоборот, снижается. Именно эта ситуация имеет место в случае аминокислотных остатков в белке, если мы сравниваем их pK_a со значениями pK_a свободных аминокислот. Поляризуемость среды описывается её диэлектрической проницаемостью, ϵ , поэтому оценка ϵ внутри белка является ключевым моментом для применения методов полумагроскопической электростатики. Второй компонент, внутрибелковое электрическое поле, определяется не поляризуемостью, а полярностью белка, т.е. наличием в нём уже существующих электрических зарядов и дипольных моментов и создаваемого им электрического поля.

Необходимо отметить, что электрическое влияние белка и сформулированный выше принцип его полумакроскопического описания относится к любому изменению заряда химической группы, т.е. позволяет рассчитать изменение сродства как к протону, так и к электрону. Поэтому описанный здесь подход и разработанный в данной работе метод в равной степени применимы к расчётам кислотно-основных и окислительно-восстановительных свойств групп, инкорпорированных в белок.

При всех описанных достоинствах полумакроскопического подхода, есть ряд связанных с ним проблем. Основная сложность, возникающая при использовании этого метода, заключается в правильном выборе значения диэлектрической проницаемости белка. Во-вторых, не вполне ясны границы применимости макроскопических характеристик среды, к которым относится диэлектрическая проницаемость, в области малых (микроскопических) расстояний (Parazyan and Warshel 1997). Тем не менее, для белков этот подход дает, как правило, вполне удовлетворительные результаты (Simonson 2003). В-третьих, существует принципиальная проблема, заключающаяся в том, что частичные заряды атомов выполняют одновременно две роли в электростатике белков: 1) частичные заряды атомов являются источниками электрического поля внутри белка; 2) сдвиг их равновесных положений под действием электрического поля обуславливает инерционную часть всего диэлектрического отклика среды, т.е. существенную часть статической диэлектрической проницаемости белка. Эта двойственная роль каждого частичного заряда, связанного с белком, составляет внутреннее противоречие полумакроскопического подхода и приводит к тому, что описанное выше вычленение двух компонент влияния белкового окружения на протонирование/депротонирование (или же окисление/восстановление) функциональной группы оказывается некорректным. Фактически, один и тот же физический процесс (смещения парциальных зарядов в белке) количественно учитывается дважды: при рассмотрении парциальных

зарядов атомов белка как источников поля и как частиц, обуславливающих поляризацию белка и экранирующих это поле (King et al. 1991). Разрешение этого противоречия было впервые предложено в работе (Krishtalik et al. 1997) и основано на применении различных диэлектрических характеристик (статической и оптической диэлектрической проницаемости) для расчёта диэлектрического отклика и электрического поля внутри белка.

II. Глава 2. Методы и материалы

II.1. Объекты исследования

В данном разделе перечислены виды растений, служившие объектами исследования. Большая часть из них культивировалась в лабораторных условиях. Деревянистые растения произрастали в естественных условиях в открытом грунте, неинвазивные измерения преимущественно производились на интактных растениях; в некоторых случаях с растений были собраны листья, измерения проведены в лаборатории в тот же день. Лишайники были собраны в дикой природе, после чего сохранялись в комнатных условиях в воздушно-сухом состоянии в течение нескольких недель. Более подробные сведения об условиях культивирования приведены в следующем разделе. Здесь приведены основные характеристики используемых объектов, существенные для понимания постановки задач и полученных результатов.

II.1.1. Зелёные одноклеточные водоросли:

II.1.1.1 *Chlorella vulgaris Beijerinck*

Одноклеточная свободноживущая эукариотическая зелёная водоросль (отдел *Chlorophyta*). Классический объект исследований биологии растений и, в частности, фотосинтеза. При исследованиях микроводорослей в наших исследованиях выполняла роль контрольного растения.

II.1.1.2 *Desmodesmus sp. IPPAS_2014*

Одноклеточная симбиотическая эукариотическая зелёная водоросль (отдел *Chlorophyta*), изолированная из гидроидного полипа Белого моря *Dynamena pumila*. Характеризуется толерантностью к высоким (20–100%) концентрациям CO₂ в среде. Поэтому интересна как новый модельный объект в исследованиях физиологии и биохимии низших растений, в том

числе — с точки зрения устойчивости фотосинтетического аппарата (ФСА) к высокой концентрации CO₂.

II.1.1.3 *Lobosphaera incisa str. IPPAS-C2047*

Одноклеточная эукариотическая зелёная водоросль (отдел *Chlorophyta*), изолированная из талых снежных покровов на склонах горной цепи Татеяма (Япония) — среды обитания, характеризующейся быстрыми изменениями температуры, освещенности и доступности питательных веществ. В силу этого интересна как новый модельный объект в исследованиях физиологии и биохимии низших растений, в том числе — с точки зрения устойчивости ФСА к высокой инсоляции и низким температурам. Для неё также показано высокое содержание арахидоновой кислоты, являющейся одним из модуляторов активности виолаксантинового цикла, что представляет интерес с точки зрения возможных стратегий адаптации к условиям светового стресса.

II.1.2. *Лишайники*

Будучи исключительно устойчивыми к действию широкого спектра экстремальных факторов среды в воздушно-сухом состоянии, являются классическими модельными объектами для изучения действия стрессоров разной природы.

Листоватый эпигейный лишайник, содержащий в качестве фитобионтов цианобактерии рода *Nostoc* (азотфиксаторы) и эукариотическую зелёную водоросль рода *Coccomyxa* (первичный фотобионт); микобионт — аскомицет, относящийся к порядку *Peltigerales*.

II.1.3. *Mox Physcomitrella patens (Hedw.) Bruch & Schimp.*

Новый «классический» модельный объект биологии растений, пойкилогидрическое растение, не поддерживающее постоянное содержание

воды в тканях, но способное в течение коротких периодов времени выдерживать сильное обезвоживание (соответствующее потере до 95% воды) (Liénard et al. 2008; Mishler and Oliver 2009). В настоящей работе был использован как объект для исследования отклика ФСА на действие стрессовых факторов, предположительно аналогичных дегидратации.

II.1.4. Деревянистые дикорастущие высшие растения.

Деревянистые дикорастущие высшие растения: липа сердцевидная (*Tilia cordata* Mill.), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.), ива ломкая (*Salix fragilis* L.), клен остролистный (*Acer platanoides* L.), клен американский (*A. negundo* L.), боярышник (*Crataegus* sp. L.), ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst), ель голубая (*Picea pungens* Engelm.), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.) и полукустарник с частично одревесневающими побегами – малина (*Rubus idaeus* L.) В основном — листопадные (кроме двух видов ели одного вида сосны) растения средней полосы, что позволило нам исследовать процессы осеннего старения листьев.

*II.1.5. Деревянистые и травянистые комнатные высшие растения: бобы (*Vicia faba* L.), китайская капуста (*Brassica chinensis* L.), китайская роза (*Hibiscus rosa-sinensis*)*

Бобы и китайская роза — классические объекты в исследованиях фотосинтеза, позволяющие работать как с интактными листьями, так и с высечками. Китайская капуста — удобный объект для комплексных исследований, включающих оценки ростовых показателей.

II.1.5.1 Виды рода Tradescantia: T. albiflora, T. fluminensis, T. sillamontana, T. zebrina, T. navicularis.

Набор близкородственных видов, «перекрывающих» практически весь диапазон возможных экологических потребностей растения (в отношении

света). Представляют собой удобный набор модельных объектов для анализа адаптивности данных видов и индивидуальной пластичности растений.

II.2. Методы сбора и культивации

II.2.1. Водоросли

Культура клеток *Desmodesmus* sp., исходно выделенная из беломорского гидроидного полипа *Dynamena pumila*, была получена из коллекции Института физиологии растений (ИФР) им. К.А. Тимирязева РАН. Культура клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 также была получена из коллекции ИФР РАН. Обе культуры выращивали на среде BG-11 в стеклянных колоннах (цилиндры диаметром 6,6 см и емкостью 1,5 л) при постоянном освещении светодиодными лампами белого света (фотосинтетически активная радиация 480 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹) при температуре 27 °С. Культуру барботировали воздухом либо газо-воздушной смесью с 20% CO₂, формируемой программируемым газовым смесителем УФПГС-4 («Совлаб», Новосибирск), со скоростью 300 мл/мин. Интенсивность освещения контролировали с помощью квантового измерителя LiCor 850 (LiCor, Lincoln, NE, USA).

Культура микроводорослей *Lobosphaera incisa* была получена из лаборатории биотехнологии микроводорослей Института исследований пустыни им. Дж. Блауштайна Университета Бен-Гуриона (Израиль). Культивировали на модифицированной среде BG-11 в колбах Эрленмейера в термостатированной качалке при освещённости 50 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ и температуре от 0 до 24 °С.

II.2.2. Лишайники

Образцы лишайника *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. были собраны с почвы в сосняке беломошнике с ольхой в Подмосковье в окрестностях государственного заказника «Биологическая станция МГУ имени С.Н. Скадовского», около села Луцино. В эксперименте использовали следующие группы слоевищ: свежесобранные воздушно сухие слоевища, а также слоевища, хранившиеся в течение 1 года при комнатной температуре. Слоевища тщательно очищали от субстрата и увлажняли при комнатной температуре.

II.2.3. Мох *Physcomitrella patens*

Протонемы мха *Physcomitrella patens* выращивали на модифицированной среде Кнопа (800 мг/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 250 мг/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 125 мкг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 г/л глюкозы, с добавлением микроэлементов: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KI, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, а также 500 мг/л тартрата аммония в специализированном инкубаторе для роста растений MLR-352H (Panasonic) с 16-часовым фотопериодом при температуре 24 °C. Как для оценки активности фотосистемы 2, так и для транскриптомного и пептидомного анализа использовали протонему в возрасте 5 дней.

Из протонемы мха *Physcomitrella patens* выделяли протопластов по методу (Liu and Vidali 2011) с незначительными изменениями. Пятидневные нити протонемы собирали шпателем с поверхности агара и 1 г ткани протонемы помещали в 14 мл 0,5% раствора дризелазы (Sigma) в 0,48 М маннитола. Ткань инкубировали в течение 60 мин в темноте при постоянном встряхивании. Затем суспензию фильтровали через стальную сетку с ячейкой 100 мкм и продолжали инкубацию в дризелазе в течение еще 15 минут. Полученные протопласты осаждали центрифугированием при 100 г в течение 5 мин и дважды отмывали 0,48 М раствором маннитола.

Обработка протонемы 0,025% и 0,0025% растворами дризелазы проводилась по аналогичному протоколу. Пятидневные нити протонемы собирали шпателем с поверхности агара и 1 г ткани протонемы помещали в 14 мл 0,025 % или 0,0025% раствора дризелазы (Sigma) в 0,48 М маннитола. В качестве контроля мы также инкубировали ткань протонемы в 0,48 М маннитола. После часовой инкубации ткань протонемы промывали и проводили измерения активности фотосистемы 2 или выделяли белок.

II.2.4. Деревянистые высшие растения

Измерения индукции флуоресценции хлорофилла в листьях древесных растений проводили на интактных листьях, не отделяя их от растения, в вечернее время суток (не ранее чем через 2 ч после захода солнца, чтобы обеспечить адаптацию листьев к темноте). Для лабораторных работ срезали листья или образцы ветвей соответствующих растений, ставили их в сосуд с водой на время проведения измерений. В зависимости от характера эксперимента, измерения проводили на высечке из листа, на целом листе или на листе, не отделённом от ветви.

II.2.5. Деревянистые и травянистые комнатные высшие растения

Растения китайской капусты (*Brassica chinensis* L., сорт Веснянка селекции ВНИИССОК) выращивали на пористых металлокерамических трубках с использованием питательного раствора Чеснокова в дозе 0.5 нормы с добавлением микроэлементов по Хогланду (5 мМ KNO₃, 2.4 мМ Ca(NO₃)₂, 1.8 мМ KH₂PO₄, 0.8 мМ MgSO₄×7H₂O, 46 мкМ H₃BO₃, 9 мкМ MnCl₂, 0.8 мкМ ZnSO₄, 0.3 мкМ CuSO₄, 0.1 мкМ H₂MoO₄, 25 мкМ тартрата железа) при температуре 24–26 °С и относительной влажности воздуха 30–55%. Растения росли при непрерывном освещении при одном из двух уровней плотности потока фотонов (ППФ) на уровне верхнего листа: 400 (391 ± 24) мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ или 100 (107 ± 9) мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹

(далее “нормальная” и “низкая” ППФ, соответственно). В качестве источников освещения использовали дуговую натриевую лампу высокого давления ДНаТ-400 со стандартным отражателем («контрольная группа») или светильник (СД), составленный из красных ($\lambda_{\max} = 650$ нм) и синих ($\lambda_{\max} = 470$ нм) светодиодов, с соотношением красной и синей составляющих излучения 7:1 по плотности потока фотонов. Для анализов брали 4-й снизу лист 15-дневных растений.

Растения бобов (*Vicia faba* L.) выращивали из семян в почве при температуре 24–26 °С, относительной влажности воздуха 45–60% и естественном освещении. Для измерений использовали листья или целые растения до наступления цветения.

Растения вечнозелёного кустарника китайская роза (*Hibiscus rosa-sinensis*) содержали в лабораторных условиях при температуре 24-26° С, влажности 45-60% и естественном освещении. Для измерений использовали листья или высечки из листьев.

Растения рода *Tradescantia* выращивали из черенков, полученных из Главного ботанического сада (ГБС) им. Н.В. Цицина РАН. Черенки растений каждого вида были высажены в почву и укоренены в течение двух недель. Впоследствии регулярно проводили пересадку и переукоренение растений также черенками. Для измерений использовали полностью сформированные листья, 3-7 листья от вершины побега. Растения содержали и проводили измерения в оранжереях Отдела тропических и субтропических растений ГБС РАН при температуре 22-25° С, влажности 60-80% и смешанном освещении (естественное освещение интенсивностью до 30-40 клк ($150-200$ Вт/м²) с добавлением круглосуточного искусственного освещения люминесцентных ламп интенсивностью 1,5-2 клк ($7,5-10$ Вт/м²)), а также лабораторных условиях при температуре 24-26° С, влажности 45-60% и искусственном освещении интенсивностью до 60 или 800 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ (обозначаемых в дальнейшем как низкая и высокая интенсивность, соответственно) с 16 ч фотопериодом. В качестве

источника света использовали светодиодные осветители 11299 BVP150 LED8/WW (Philips, Нидерланды) и "УС-90 Магистраль-Ш" (ООО "ФОКУС", Московская область, Россия), оснащенный белыми светодиодами цветовой температуры 4750 К (Nichia, Япония).

II.2.6. Хлоропласты

Хлоропласты из листьев высших растений получали гомогенизацией образцов ткани листа в среде, содержащей 0,35 М NaCl и 0,05 М Tris-HCl буфера при рН 8,0 и последующим дифференциальным центрифугированием в той же среде (Arnon et al. 1956). Хлоропласты, полученные этим методом, в основном относились к классу С по классификации Холла (Hall 1972).

Хлоропласты мха *Physcomitrella patens* выделяли из протопластов по методу, описанному в работе (Скрипников и др. 2009). Протопласты ресуспендировали в буфере А (50 мМ HEPES-КОН, рН 7,5, 330 мМ сорбитола, 2 мМ ЭДТА и 0,4 мМ фенилметилсульфонилфторида) и фильтровали через двойной слой фильтрующего материала (Miracloth; Calbiochem Behring Corp., США). Дезинтеграцию протопластов оценивали с помощью светового микроскопа. Затем фильтрат центрифугировали при 1200 g в течение 3 мин, осадок ресуспендировали в небольшом объеме буфера А и фракционировали центрифугированием при 3800 g в течение 10 мин в ступенчатом градиенте 10-40-85% Percoll (Sigma, США). Интактные хлоропласты между слоями Перколла 40 и 85% собирали, промывали буфером А и центрифугировали при 1200 g в течение 3 мин и использовали осадок, содержащий хлоропласты.

II.3. Моделирование факторов окружающей среды

II.3.1. Освещение

Подробно условия освещения, его интенсивность и спектральный состав описаны в разделах, посвящённых культивации соответствующих видов растений. Здесь же приведены лишь наиболее краткие сведения об использовавшихся спектрах и интенсивностях освещения и его источниках.

II.3.1.1 Интенсивность освещения

В ряде экспериментов с некоторыми культурами использовали различные интенсивности освещения для культивации растений, тем самым выявляя адаптацию интересующих характеристик растения к долговременным изменениям интенсивности освещения. В экспериментах с китайской капустой был детально изучен рост растений при интенсивностях 100 и 400 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, в экспериментах с различными видами традесканции — 60 и 800 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

II.3.1.2 Спектральный состав освещения

Значение спектрального состава света для фотосинтеза и роста растений было изучено в экспериментах с китайской капустой. Сравнивали действие света, содержащего только красную и синюю компоненты света (650 нм и 470 нм в соотношении 7:1 по плотности потока фотонов, светодиодный светильник) и света, создаваемого дуговой натриевой лампой высокого давления (ДНаТ-400) который условно считается в агрономической практике и во многих физиологических исследованиях растений «белым светом» (в действительности, он не является непрерывным излучением и обеднён некоторыми компонентами белого света).

II.3.1.3 Источники освещения

В качестве источников освещения, использовавшихся для длительного воздействия на растение (в течение всего и значительной части периода роста растения), в работе были использованы преимущественно светодиодные светильники, содержащие белые светодиоды (11299 BVP150 LED8/WW, "УС-90 Магистраль-Ш", и др.) или смесь синих и красных светодиодов. Также использовались люминесцентные лампы и натриевые лампы высокого давления (ДНаТ-400).

В качестве источников действующего света, оказывающего воздействие на фотосинтетический аппарат лишь в течение относительно короткого периода измерений (длительностью порядка минут – десятков минут), использовались светодиоды синего (460 нм), голубого (475 нм), красного (635 нм) и дальне-красного света (730 нм), а также лампы накаливания с интерференционными светофильтрами (650 и 707 нм) и без них. В качестве зондирующего освещения использовали преимущественно светодиоды синего света (460 нм), а также ближнего инфракрасного (830 и 875 нм).

II.3.2. Состав атмосферы

Для адаптации суспензий микроводорослей к заданному содержанию CO_2 в окружающей среде барботировали суспензию газо-воздушными смесями (ГВС) с соответствующей долей CO_2 в ГВС.

Сухие талломы лишайника подвергали действию анаэробной атмосферы, помещая их в пластиковую камеру, заполненную газообразным азотом при атмосферном давлении. Концентрацию кислорода в камере контролировали с помощью электрохимического кислородного датчика «Оксик 3» (ООО «Оксоний», Россия). Показания датчика записывали непрерывно с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП) оригинальной конструкции. Чтобы избежать диффузии кислорода в камеру и поддерживать анаэробные условия в течение всего периода обработки,

камера непрерывно продувалась газообразным азотом со скоростью 1–2 мл/мин. Длительность содержания талломов в анаэробной атмосфере составляла 4 дня, цикл был повторён дважды для каждого таллома.

При измерениях спектров ЭПР в листьях высших растений лист помещали в кварцевую трубку, расположенную в резонаторе спектрометра ЭПР, газовый состав внутри которой поддерживали постоянным за счет продува через трубку газовых смесей с разными соотношениями кислорода, диоксида углерода и нейтрального газа (аргона или азота). При исследованиях флуоресценции листьев флуориметр вместе с прикрепленным к нему образцом помещали в пластиковую камеру, внутри которой поддерживали постоянный состав атмосферы также за счет продува через неё соответствующих газовых смесей. Потоки газов, продуваемых через резонатор спектрометра ЭПР или пластиковую камеру с флуориметром, регулировали с помощью вентиля тонкой регулировки, расположенных на пути от газовых баллонов к измерительному прибору. Концентрации O₂ и CO₂ в камере контролировали с помощью газоанализаторов Клевер-В («Дельта_Про», Россия) и С2000 («Oldham», Франция).

II.3.3. Температурные воздействия

При изучении воздействия высокой температуры на лишайники воздушно-сухие слоевища выдерживали 30 минут в термостате при +70°C, затем 30 минут при комнатной температуре, такой цикл повторяли 3 раза. Другую часть образцов подвергали воздействию низких температур, помещая их в морозильную камеру на -70°C, выдерживая то же время, что и в предыдущем случае. Для третьей группы образцов чередовали периоды нагрева и охлаждения по следующей схеме: +70°C, +23°C, -70°C, +23°C, +70°C (каждый период по 30 минут). Таким образом, колебания температуры для одного и того же образца достигали 140 °C.

II.3.4. Дегидратация

Для протонемы пойкилогидрического мха *Physcomitrella patens* дегидратацию моделировали воздействиями, приводящими к нарушению контакта клеточной стенки и плазматической мембраны. Одним из вариантов воздействия был осмотический стресс, для которого ранее было показано, что он вызывает схожее воздействие на активность фотосинтетического аппарата, оцениваемую по индукции флуоресценции хлорофилла, с воздействием дегидратации (Azzabi et al. 2012). Для создания осмотического стресса, к среде инкубации протонемы добавляли нейтральный моносахарид маннитол в концентрации 1,3 М. Воздействие гипертонической среды на клетки протонемы контролировали микроскопически, наблюдая плазмолиз. В качестве другого варианта воздействия рассматривали мацерацию клеточной стенки, для которой нами было показано феноменологическое сходство с воздействием осмотического стресса (Wang et al. 2008). С этой целью протонему обрабатывали раствором дривелазы в разных разведениях, от 0.0025% до 0.5% (см. раздел II.2.3. Мох *Physcomitrella patens*).

II.4. Измерительные методы

II.4.1. ЭПР-спектроскопия (P700+, спиновые зонды)

Для регистрации методом ЭПР сигнала окисленных реакционных центров P700+ в листьях высших растений помещали выечку из листа в прямоугольный резонатор ЭПР-спектрометра 3 см диапазона (X band) Varian E-4. Через щель в торцевой стенке резонатора освещали образец, записывали спектр ЭПР сигнала или кинетику его светозависимых изменений. В качестве осветителя использовали лампу накаливания с конденсором, создающую освещённость на поверхности образца до 350

Вт/м², а также интерференционные светофильтры, позволяющие получить узкополосный красный ($\lambda_{max}=650$ нм, $\Delta\lambda_{1/2}=15$ нм; далее — "свет λ_{650} ") или дальний красный свет ($\lambda_{max}=707$ нм, $\Delta\lambda_{1/2}=15$ нм; далее — "свет λ_{707} ").

Трансмембранную разность рН в хлоропластах определяли по концентрационной зависимости обратимых фотоиндуцированных изменений ЭПР-сигнала спиновой метки ТЕМПО-амин, добавляемой в суспензию хлоропластов в различных концентрациях в соответствии с методом, описанным в работе (Trubitsin and Tikhonov 2003).

Для измерения сигнала ЭПР тирозина Y_Z фотосистемы 2 (Tyr161 субъединицы D1) концентрированную (0,4 мг Хл /мл) суспензию клеток хлореллы помещали в кварцевую ЭПР-кювету и облучали через щель в стенке резонатора лазерными вспышками с интервалом 2 С (Mamedov et al. 1998b). Использовали Nd-YAG лазер Surelite I-10 с длиной волны $\lambda = 532$ нм и плотностью энергии излучения на поверхности образца в момент вспышки 10 мДж/см². Измерения проводили на ЭПР спектрометре 3-см диапазона ELEXSYS E580 (Bruker, Германия) с прямоугольным резонатором ER 4102ST (Bruker). Мощность СВЧ-излучения составляла 100 мВт, амплитуда модуляции – 7 Гс. Для каждого образца было записано 84 цикла релаксации сигнала тирозина после возбуждения, кинетики релаксации сигнала были усреднены.

II.4.2. Оптические методы

II.4.2.1 Флуориметрия, РАМ-флуориметрия, термолюминесценция

Флуоресценцию фотосинтетического аппарата листьев высших растений и слоевищ лишайника регистрировали с помощью портативного РАМ-флуориметра FluorPen FP100 (Photon System Instruments, Чехия). Флуоресценцию возбуждали синим светом (450-470 нм) и регистрировали в области красного и дальнего красного света (697-750 нм). Интенсивность действующего света составляла 100 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹,

насыщающего — 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. В слоевищах лишайника *P. aphthosa* измеряли флуоресценцию апикальных участков лопастей, перед измерениями слоевища увлажняли и адаптировали к темноте в течение 5-10 мин. Для всех растений (кроме *T. navicularis*) флуоресценцию измеряли с верхней (адаксиальной) поверхности листа. На листьях *T. navicularis* измеряли флуоресценцию преимущественно с нижней поверхности листа.

Для измерения медленной индукции флуоресценции (МИФ) использовали установку оригинальной конструкции, включающую цилиндрический корпус с держателем листа и двумя окнами, через которые проводилось облучение образца и регистрация флуоресценции, осветительную систему на основе диапроектора ЛЭТИ-55 и стеклянного сфетофильтра СЗС-22 с максимумом результирующего пропускания около 450 нм интенсивностью 50 Вт/м² для возбуждения флуоресценции, призмный монохроматор спектрофотометра СФ-4 и фотоумножитель ФЭУ-79 для регистрации флуоресценции на длине волны 686 нм, усилителя и самописца КСП-4.

Измерения термолюминесценции (ТЛ) выполняли по методике, описанной в работе (Солнцев 1995): для стандартизации начальных условий вначале освещали образцы через интерференционный фильтр с максимальным пропусканием 725 нм ($\Delta\lambda = 5$ нм) в течение одной минуты; после этого листья охлаждали до температуры $T_{\text{обл}} = -30$ °С и освещали полным спектром лампы накаливания в течение трех минут. Такое время экспозиции было достаточным для насыщения интенсивности всех пиков ТЛ. После охлаждения образца до -100 °С его нагревали со скоростью около 30 град/мин. Регистрацию ТЛ осуществляли с помощью ФЭУ-79, обладающего спектральной чувствительностью в области 300-830 нм

Для одновременного измерения индукции флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2 и редокс-превращений реакционного центра фотосистемы 1, Р700, использовали спектрометр Dual-РАМ-100 (Walz, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали последовательности слабых

импульсов синего света ($\lambda_{\max} = 460$ нм), длительностью по 30 мкс и различной частотой в отсутствие и в присутствии действующего света, что соответствовало средней интенсивности от 0,006 до 3 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, соответственно. Для индуцирования максимального выхода флуоресценции хлорофилла использовали насыщающие (интенсивностью 10000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) импульсы красного света ($\lambda_{\max} = 635$ нм, длительность 0,3 с), интенсивность непрерывного действующего света ($\lambda_{\max} = 635$ нм) составляла 126 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Для синхронной оценки изменений соотношения концентраций P700 и P700+ регистрировали разность коэффициентов пропускания листа при 830 и 875 нм; интенсивность измерительного света не превосходила 10 мкмоль фотонов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. В качестве света, насыщающего фотосистему 1, использовали дальний красный свет (730 нм) интенсивностью 128 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

II.4.2.2 Спектрально-разрешённая флуориметрия

Спектры флуоресценции хлорофилла были получены с использованием спектрофлуориметра CM2203 (Solar, Беларусь) при возбуждении флуоресценции излучением синего ($\lambda_{\max} = 475$ нм, $\Delta\lambda_{1/2} = 20$ нм) светодиода LXHL LB3C (Phillips Lumileds, США) интенсивностью (на поверхности образца) от 50 до 500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (13-130 Вт м^{-2}). Запись кинетики медленной (в минутном интервале времён) индукции флуоресценции хлорофилла одновременно на двух длинах волн (685 и 740 нм) также осуществлялась с помощью спектрофлуориметра CM2203.

II.4.2.3 Абсорбционная оптическая спектроскопия

Оптические спектры поглощения растворов (экстрактов фотосинтетических пигментов органическими растворителями, растворов окрашенных зондов и др.) измеряли с помощью спектрофотометра Agilent Cary 300 (Agilent, США). Оптические спектры поглощения суспензий

(мутных сред) регистрировали с помощью того же спектрофотометра с интегрирующей сферой CA-30I (Agilent) диаметром 150 мм, либо с использованием спектрофотометра Specord 50 plus (Analytik Jena, Германия) с малым расстоянием между кюветным отделением и детектором.

Для измерения изменений оптического поглощения или пропускания листьев высших растений интактные растения адаптировали к темноте в течение 4-5 ч до начала измерений, затем лист отделяли от растения и подвергали облучению синим светом ($\lambda_{\max} = 475$ нм) интенсивностью 150 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ в течение 30 минут. Спектры пропускания листьев регистрировали в процессе облучения и последующей темновой адаптации листа в диапазоне 400-800 нм с помощью спектрофотометра Agilent Cary 300 с интегрирующей сферой CA-30I. Действующим и измерительным светом облучали адаксиальную (верхнюю) сторону листа.

II.4.2.4 Измерение спектров отражения листьев и расчет координат цветности

Спектры отражения листьев традесканции, $r(\lambda)$, измеряли с помощью спектрофотометра с помощью спектрофотометра Agilent Cary 300 с интегрирующей сферой CA-30I в диапазоне 380–780 нм. Измерения проводили на целых листьях, отделённых от стебля или без отделения от стебля.

Спектры отражения листьев древесных растений измеряли с помощью портативного спектрофотометра PolyPen RP 400 (Photon System Instruments, Чехия) в диапазоне 380–780 нм.

Для определения координат цветности высежки листа рассчитывали спектр отраженного света $\varphi(\lambda)$ при освещении образца дневным светом. Распределение энергии $S(\lambda)$ в спектре дневного света было принято в соответствии со стандартом Международной комиссии по освещению

(МКО) D₆₅ (Джадд и Вышецки 1978, с. 136). Тогда распределение энергии в отраженном от листа свете:

$$\varphi(\lambda) = r(\lambda) S(\lambda). \quad (\text{II.1})$$

Далее, для описания зрительного восприятия цвета поверхности с данным спектром отраженного света средним человеческим глазом (который в номенклатуре МКО называется «стандартным колориметрическим наблюдателем» стандарта МКО 1931 г.) были рассчитаны три цветовые компоненты каждого данного цвета: X , Y и Z , соответствующие, с некоторой долей условности, желто-синей, зеленой и сине-зеленой спектральным составляющим анализируемого излучения. Расчет цветовых координат производился по формулам:

$$X = k \int_{\lambda} \varphi(\lambda) \bar{x}(\lambda) d\lambda, \quad Y = k \int_{\lambda} \varphi(\lambda) \bar{y}(\lambda) d\lambda, \quad Z = k \int_{\lambda} \varphi(\lambda) \bar{z}(\lambda) d\lambda, \quad k = 100 / \int_{\lambda} S(\lambda) \bar{y}(\lambda) d\lambda, \quad (\text{II.2})$$

где $\bar{x}(\lambda)$, $\bar{y}(\lambda)$ и $\bar{z}(\lambda)$ – т.н. *функции сложения цветов*, называемые также *удельными координатами цвета*, характеризующие цветовосприятие «стандартного колориметрического наблюдателя МКО 1931 г.». Табличные значения этих функций, утвержденные МКО, взяты из работы Джадда и Вышецки (Джадд и Вышецки 1978, с. 156). Наконец, из координат X , Y и Z , описывающих воспринимаемый цвет в цветовом пространстве МКО, были рассчитаны т.н. координаты цветности x и y , характеризующие, собственно, цвет объекта (в отличие от координат цвета X , Y и Z , которые наряду с цветом характеризуют также и яркость (Джадд и Вышецки 1978, с. 172–176)):

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}, \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z}. \quad (\text{II.3})$$

II.4.3. Электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического исследования талломов лишайника (сканирующая электронная микроскопия) брали апикальные части лопастей

таллома. Образцы фиксировали в течение 1 часа в 2,5% глютаровом альдегиде, растворенном в 0,1М Na-фосфатном буфере рН 7,2, и выдерживали четверо суток в холодильнике при +4 °С. Трижды промывали буфером по 5-10 минут. Обезвоживали образцы, последовательно помещая их в 30%, 50%, 70% и 96% спирт, а затем дважды в ацетон по 15 минут. После высушивания образцы напыляли смесью платина/палладий и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380 (JEOL Ltd., Япония).

Образцы микроорганизмов для просвечивающей электронной микроскопии готовили по стандартному протоколу (Gorelova et al. 2015): фиксировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Для фиксации использовали 2% раствор глутаральдегида в 0,1 М какодилате натрия (рН 6,8-7,2). Затем в течение 4 ч проводили пост-фиксацию в 1% растворе OsO₄ в том же буфере. Осуществляли дегидратацию образцов в серии водных растворов этанола (до безводного этанола), насыщенных уранилацетатом, заливали образцы эпоксидной смолой. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультратома LKB-8800 (LKB, Швеция), помещали на покрытые формваром сетки, окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds 1963) и исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония).

II.4.4. Экстракция и определение состава пигментов и жирных кислот методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии

Фотосинтетические пигменты из листьев высших растений экстрагировали 80%-ным ацетоном из листовой высежки до или после других измерений, проведённых с листом, в зависимости от постановки эксперимента. Оптический спектр поглощения экстракта измеряли с помощью спектрофотометра Cary-50 («Varian», США), содержание пигментов в экстракте определяли на основании спектров поглощения по Лихтенталеру (Lichtenthaler 1987). Фотосинтетические пигменты из клеток

микроводорослей экстрагировали по методу Фолча смесью хлороформа с метанолом (объёмное соотношение 2:1), содержание Хл *a* и *b*, а также суммы каротиноидов (Кар) определяли в хлороформной фракции экстракта также методом оптической спектрофотометрии (Wellburn 1994).

Состав каротиноидов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для этого замороженный осадок клеточной суспензионной культуры растирали в ацетоне, осаждали центрифугированием. Супернатант, содержащий экстракт хлорофиллов и каротиноидов из клеток микроводорослей, инкубировали в течение 30 мин при 0 °С и непрерывном перемешивании с хроматографическим сорбентом Ambersep 900 («Merck», Германия) для омыления хлорофилла (Larsen and Christensen 2005). Обработанный таким образом экстракт анализировали с помощью хроматографа Smartline («Knauer», Германия) с каротиноидной колонкой YMC30, идентификацию осуществляли на основе хроматографических стандартов («CaroteNature», Швейцария). Определяли содержание каждого каротиноида по отношению к общему содержанию каротиноидов, в том числе суммарное содержание пигментов виолаксантинового цикла (ВАЗ):

$$\text{BA3} = \text{Вио} + \text{Ант} + \text{Зеа}. \quad (\text{II.4})$$

Коэффициент деэпоксидации пула ВАЗ рассчитывали по формуле:

$$\text{DE} = (\text{Зеа} + 0,5 \times \text{Ант}) / (\text{Зеа} + \text{Ант} + \text{Вио}). \quad (\text{II.5})$$

Состав жирных кислот суммарных липидов анализировали методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A («Agilent Technologies», США), оснащенного капиллярной колонкой HP5MS UI, соединенной с масс-селективным детектором Agilent 5970 («Agilent Technologies»). Экстракцию липидов проводили согласно методу Фолча (Folch et al. 1957). Осажденную клеточную суспензию гомогенизировали в смеси хлороформ : метанол (2 : 1) с предварительным охлаждением в жидком азоте. Внутренний стандарт — 50 мкг маргариновой кислоты («Sigma», США) — добавляли в

экстракты перед трансметилированием. Трансметилирование жирных кислот липидов проводили путем инкубации с 2%-ной серной кислотой в метаноле (Kates 1986). Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах (вес. %) от суммарного содержания в пробе.

II.4.5. Редокс-титрование

Окислительно-восстановительное титрование цитохрома *c* (cyt *c*) проводили в анаэробных условиях и при непрерывном перемешивании раствора в оптической ячейке спектрофотометра Varian "Care 50" (США). Соотношение окисленной и восстановленной форм cyt *c* определяли по спектрам поглощения (по величине $A_{549}-A_{556}$). Среда содержала 1 мМ cyt *c*, 20 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,5), 10 мМ диаминодурола и 100 мМ КСl. Окисление или восстановление cyt *c* осуществляли путем добавления раствора феррицианида калия или аскорбата соответственно. Окислительно-восстановительный потенциал раствора измеряли с помощью измерительного платинового (Pt) и референсного хлорсеребряного (Ag/AgCl) электродов. Платиновый электрод перед экспериментами калибровали стандартным раствором 5 мМ ферро/феррицианида (1:1) в 1 М КСl ($E_m = +420$ мВ, (Clark 1960)).

Анаэробное окислительно-восстановительное титрование гема *a* цитохромоксидазы проводили на спектрофотометре Cary 300 Bio (Varian) в спектрофотометрической ячейке, продуваемой аргоном, также с использованием пары электродов Pt и Ag/AgCl в присутствии окислительно-восстановительных медиаторов. Степень восстановленности гема *a* определяли по разностным спектрам поглощения (восстановленный минус окисленный) при различных значениях окислительно-восстановительного потенциала по изменениям поглощения ΔA при 605 нм (с учётом коррекции базовой линии). Зависимость ΔA от окислительно-

восстановительного потенциала описывали на основании уравнения Нернста с учетом антикооперативного взаимодействия гема *a* и редокс-кофактора Cu_B в ходе их окислительно-восстановительных переходов:

$$\frac{\Delta A(E_h)}{\Delta A_{\max}} = \frac{10^{(E_{m(H)} - E_h)/59} + 10^{(E_{m(H)} - E_h)/59} \cdot 10^{\delta/59} \cdot 10^{(E_{m(L)} - E_h)/59}}{1 + 10^{(E_{m(H)} - E_h)/59} + 10^{(E_{m(H)} - E_h)/59} \cdot 10^{\delta/59} + 10^{(E_{m(H)} - E_h)/59} \cdot 10^{\delta/59} \cdot 10^{(E_{m(L)} - E_h)/59}}$$

(II.6)

Здесь E_h обозначает окислительно-восстановительный потенциал среды, $E_{m(H)}$ и $E_{m(L)}$ — среднеточечные потенциалы высоко- и низкопотенциальных переходов на кривой редокс-титрования гема *a*, обусловленных антикооперативным взаимодействием гема *a* и Cu_B. Значение $\Delta E_m = E_{m(H)} - E_{m(L)}$ при этом характеризует величину анти-кооперативного взаимодействия. Параметр $\delta = E_m(\text{heme } a) - E_m(\text{Cu}_B)$ характеризует различие собственных (без взаимодействия) значений E_m этих двух редокс-кофакторов. Все значения окислительно-восстановительных потенциалов выражены в милливольтгах, знаменатели в показателях экспонент представляют собой $(kT/e) \times \ln 10 = 59$ мВ.

II.4.6. рН-метрия, оксиметрия в растворах, регуляция содержания CO₂, O₂.

рН суспензий микроводорослей измеряли комбинированным стеклянным электродом с рН-метром РВ11.1 («Sartorius», Швейцария).

Фотосинтетическое выделение кислорода в образцах суспензии клеток водорослей измеряли с помощью системы Chlorolab III (Hansatech Instruments, Великобритания) с дисковым электродом Кларка. Объем терморегулируемой камеры — 10 мл, измерения выполняли при постоянном перемешивании суспензии магнитной мешалкой и при освещенной красным светом (источник — светодиодный осветитель, $\lambda_{\max} = 620$ нм).

Регуляция содержания CO₂ и O₂ в окружающей атмосфере или в среде инкубации описана в разделе II.3. «Моделирование факторов окружающей среды», подраздел II.3.2. «Состав атмосферы».

II.4.7. Измерения скорости транспирации и ассимиляции CO₂ в листе

Интенсивность газообмена слоевищ лишайника измеряли при помощи инфракрасного датчика углекислого газа TCOD-IR (Oldham, Франция). Слоевище помещали в прозрачную пластиковую кювету объёмом 20 мл, герметично соединённую с датчиком. Кювету в зависимости от цели эксперимента либо держали в темноте, либо освещали. В качестве источника освещения использовали люминесцентную лампу (интенсивность света от 2 до 7 клк, что соответствует примерно 50-175 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹) либо светодиодный светильник, дающий белый свет (от 50 до 110 клк, что соответствует примерно 1250-2750 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹). Показания датчика непрерывно регистрировали с помощью АЦП Flash-Recorder-SD (ADClab, Россия), подключённого к персональному компьютеру.

II.4.8. Измерения скорости фотофосфорилирования и активности фактора CF1 в хлоропластах

Активность циклического фотофосфорилирования в хлоропластах определяли по протоколу, описанному в (Гавриленко и Жигалова 2003) по истощению неорганического фосфата в реакционной среде при освещении в присутствии феназинметосульфата (ФМС); нециклического фотофосфорилирования — в присутствии K₃Fe(CN)₆. Выделенные хлоропласты освещали в течение 5 мин при интенсивности света 1200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Содержание неорганических фосфатов определяли по методу Лоури (Lowry et al. 1951). В качестве разбавителя использовали с хлорид аммония NH₄Cl в концентрации 10⁻³ М. Аликвоты суспензии хлоропластов, добавленные в реакционную среду во всех опытах, содержали 0,05-0,10 мг Хл. Оптическую плотность образцов определяли на

длине волны 650 нм на спектрофотометрическом иммуноферментном анализаторе «Униплан» (Пикон, Россия).

Фосфатазную активность комплекса CF1 АТФ-синтетазы оценивали по содержанию фосфата в среде, содержащей изолированные комплексы CF1. Для выделения CF1 по методу, описанному в работе (Strotmann et al. 1973), листья растирали при температуре 0–4 °С в среде, содержащей 0,3 М сахарозы, 50 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl буфера при pH 8,0 (среда I). Гомогенат фильтровали через мелкопористый нейлон и центрифугировали 10 мин при 1000g. Осадок, содержащий хлоропласты, ресуспендировали в среде, содержащей 0,5 мМ Na₂-EDTA, 50 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl буфера при pH 8,0 (среда II) до конечной концентрации хлорофилла 0,1-0,2 мг/мл. Полученную суспензию снова центрифугировали в течение 10 мин при 1000g, осадок дважды отмывали средой II и ресуспендировали в среде, содержащей 0,5 мМ Na₂-EDTA, 10 мМ Tris-HCl буфера при pH 8,0 (среда III). Конечная концентрация хлорофилла составляла 0,2 мг/мл. Суспензию инкубировали при комнатной температуре в темной колбе на магнитной мешалке в течение 30 мин., затем центрифугировали 20 мин при 16000g при 4°С и отбирали супернатант, содержащий CF1.

Первичную очистку и концентрирование экстракта CF1 и определение активности АТФазы проводили по методу, предложенному Степановой и др. (1978). К неочищенному экстракту добавляли при непрерывном перемешивании сульфат аммония в количестве 7,83 г соли на 30 мл экстракта. После перемешивания в течение 30 минут раствор центрифугировали при 16000 g в течение 20 минут в охлажденной центрифуге (0-4 °С). Осадок, содержащий CF1, суспендировали в 3 мл 0,025 М Tris-HCl буфера, pH 8,0 и подвергали диализу в течение 12 ч против 0,015 М Tris-HCl буфера, pH 8,0, при 0-4 °С для полного удаления сульфата аммония из раствора белка.

Для дальнейших измерений использовали четыре образца CF1 (0,06 мл, содержащие 6-10 мг CF1). Три из них добавляли в 1 мл реакционной среды,

содержащей 50 мМ Tris-HCl буфера, pH 8,0, 5 мМ АТФ, 10 мМ CaCl₂, и нагревали в течение 5 мин при 61 °С для активации CF1. В первом из них аТФазную реакцию останавливали сразу после процедуры активации добавлением 0,1 мл 20% трихлоруксусной кислоты (образец 1). Второй образец выдерживали после активации при 61°С в течение 10 минут, после чего реакцию останавливали (образец 2). Третий образец охлаждали после активации до 37 °С, выдерживали в течение 10 минут, а затем реакцию останавливали (образец 3). Активность фермента при 37 °С оценивали как разность содержания фосфатов в образцах 3 и 1. Активность фермента при 61 °С оценивали как разность содержания фосфатов в образцах 2 и 1. (Данные по активности фермента CF1, представленные и обсуждаемые в главе 6, получены при температуре 37°С, если не указано иное). Четвертый образец был использован для определения общего содержания белка препаратах CF1. К образцу добавляли 1 мл 20% ТСА, выдерживали при 4 °С в течение 24 ч, затем количество белка определяли по методу Лоури (Lowry et al. 1951). Гидролизную активность фактора CF1 АТФ-синтазы выражали в микромолях неорганического фосфата, образующегося под действием 1 мг белка в 1 час.

Определение содержания малонового диальдегида (MDA) определяли спектрофотометрически при 532 нм (Janero 1990). Активность супероксид-дисмутазы и аскорбат-пероксидазы также определяли спектрофотометрически по восстановлению *p*-нитро-синего тетразолийхлорида супероксидными радикалами в присутствии рибофлавина и метионина (при 560 нм; (Giannopolitis and Ries 1977)) и по окислению аскорбата (при 290 нм; (Nakano and Asada 1981)).

II.4.9. Оптическая микроскопия и подготовка материала

Срезы апикальных участков увлажненных лопастей *P. aphthosa* просматривали в микроскоп Axioskop 40 FL. Для определения

жизнеспособности клеток срезы окрашивали нейтральным красным в концентрации 1:50000 в течение 10 минут

Измерения анатомических характеристик листьев проводили с помощью цифрового фотомикроскопа Eclipse 90i (Nikon, Япония). Для измерения размеров хлоропластов делали срезы живых листьев (без фиксации), для измерения других анатомических характеристик листа (толщины листа или слоя мезофилла, размера клеток мезофилла) готовили срезы из листьев, обезвоженных 80% этанолом. Для каждого вида и условий роста растений получали от 10 до 40 измерений толщины листа и мезофилла, от 40 до 110 измерений размеров хлоропластов и клеток.

Для изучения анатомии поверхности листа растений рода *Tradescantia*, включая размеры и распределение устьиц по поверхности, использовали лаковые реплики, снятые с поверхности полностью сформированных листьев (от 3-го до 7-го от верхушки побега) по методике, описанной и использованной в работах (Voleníková and Tichá 2001; Camargo and Marengo 2011). Микрофотографии реплик были сделаны с помощью цифровой камеры микроскопа Olympus DP30BW с использованием светового микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Токио, Япония), и цифровой камеры MVV 3000 (Quasmo, Индия) с использованием светового микроскопа Bresser Junior (Bresser GmbH, Германия). Для анализа использовали участки поверхности вблизи центральной части листовой пластинки вдали от крупных жилок. Поле зрения составляло 7,44 мм² при использовании камеры MVV 3000 и 0,58 мм² или 0,036 мм² при использовании камеры DP30BW. Также были получены снимки непосредственно листовой эпидермы, отделённой от листа, которые позволяют судить о достоверности данных, полученных с помощью лаковых реплик. Для количественной оценки изучаемых анатомических признаков эпидермы использовали программу ImageJ.

II.4.9.1 Оценка устьичной проводимости на основании данных об анатомии листа

Устьичную проводимость g_s оценивали как проводимость по отношению к водяному пару, пользуясь соотношениями, предложенными в работе Parlange and Waggoner (Parlange and Waggoner 1970) и модифицированными Gardingen *et al.* (Gardingen *et al.* 1989):

$$g_s = SD \frac{PD_w}{RT \left(\frac{d}{\pi ab} + \frac{\ln(4a/b)}{\pi a} \right)}, \quad (\text{II.7})$$

где a , b , d , и SD — полудлина, полуширина и глубина устьица, а также плотность расположения устьиц на поверхности листа; атмосферное давление $P = 1.01 \times 10^5$ Па, абсолютная температура воздуха T , коэффициент диффузии воды в воздухе $D_w = 2.14 \times 10^{-5}$ м² с⁻¹, газовая постоянная $R = 8.31$ Дж моль⁻¹К⁻¹. Для анализа литературных данных были также использованы эмпирические соотношения, полученные в работе (Douhovnikoff *et al.* 2016):

$$d = 0.125SS, 2a = 0.75SS, 2b = 0.1SS, \quad (\text{II.8})$$

где SS — длина устьица.

Проводимость межклеточных воздухоносных пространств листа g_{ias} была оценена на основе полуэмпирического соотношения, полученного в работе (Syvertsen *et al.* 1995):

$$g_{ias} = (r_{ias})^{-1} = (\rho/l)D_w (f_{ias})^{1.55} \quad (\text{II.9})$$

Здесь $\rho = 38.2$ моль м⁻³ — молярная плотность воздуха, l — толщина слоя клеток между устьицами и клетками мезофилла, f_{ias} — доля объёма ткани листа, занятой межклеточным воздухоносным пространством. Для единообразия всех оценок, здесь был использован коэффициент диффузии воды D_w , а не CO₂ $D_C = 1.55 \times 10^{-5}$ м² с⁻¹, как в оригинальной работе (Syvertsen *et al.* 1995).

II.5. Методы расчётов

II.5.1. Расчёт электрических взаимодействий в белках

Расчеты электрических взаимодействий в белках производили в рамках полуконтинуальной диэлектрической модели, рассматривающей белок как диэлектрическую среду, в которую погружены парциальные заряды, принадлежащие отдельным атомам белка или его кофакторов. Окружающая белок среда также рассматривалась как непрерывная диэлектрическая среда, однофазная (вода) или двухфазная (вода и липидное окружение), содержащая ионы электролита. Электрические поля, создаваемые парциальными зарядами в этой среде, рассчитывали на основе уравнения Пуассона-Больцмана с трёхмерной сеткой с расстоянием между узлами от 0.5 до 0.7 Å. Численное решение искали с помощью программ MEAD и DelPhi (Nicholls and Honig 1991). Использовали известные трёхмерные структуры белков из базы данных PDB, для размеров атомов брали значения радиусов Ван дер Ваальса по Полингу, принятые в параметризации PARSE (Sitkoff et al. 1994), радиус молекулы растворителя (воды) принимали за 1,4 Å. Парциальные заряды атомов белка также брали в соответствии с параметризацией PARSE. Парциальные заряды на протонируемых аминокислотных остатках и редокс-кофакторах были определены методом Monte Carlo с использованием программ Karlsberg (Hansmann 1997; Rabenstein et al. 1998) и MEAD (Bashford and Karplus 1990) при pH 7.

В расчётах принимали во внимание различие диэлектрического отклика среды на вновь введённые в неё и «предсуществующие» заряды в соответствии с алгоритмом, предложенным Кришталиком с соавт. (Krishtalik et al. 1997), учитывая как статический отклик среды, характеризующийся статическим значением диэлектрической проницаемости (ϵ_s), так значением, характерным для «оптических» частот (ϵ_o) Оптическую диэлектрическую проницаемость (ϵ_o) для белка принимали равной 2,5, для воды — 1,8. Статические значения диэлектрической

проницаемости белков оценивали на основе экспериментальных данных и оригинального алгоритма, описанного в Приложении.

Для расчётов энергии реорганизации среды (λ) использовали формулу (Krishtalik 2011):

$$\lambda = \frac{1}{2} \int_V (\varphi_0(\Delta\rho(\vec{r}), \vec{r}) - \varphi_s(\Delta\rho(\vec{r}), \vec{r})) \Delta\rho(\vec{r}) d\vec{r} , \quad (\text{II.10})$$

где $\Delta\rho(\vec{r})$ — изменение распределения плотности заряда в среде, $\varphi_0(\Delta\rho(\vec{r}), \vec{r})$ — потенциал электрического отклика среды на это изменение, обусловленный её оптической (электронной) диэлектрической проницаемостью ε_0 , $\varphi_s(\Delta\rho(\vec{r}), \vec{r})$ — потенциал электрического отклика среды на это же изменение, но обусловленный её полной (статической) диэлектрической проницаемостью ε_s .

III. Глава 3. Акклимация фотосинтетического аппарата к низкой положительной температуре.

III.1. Аннотация главы¹

В данной главе изложены результаты исследований акклимации зелёной водоросли *L. incisa* к низкой положительной температуре (0 °C). Изучены изменения активности ФСА, индукции НФТ, изменения состава фотосинтетических пигментов и содержания жирных кислот в клетке. Показано, что, несмотря на умеренную интенсивность освещения (50 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹), температурное стрессовое воздействие приводит к возникновению условий для светового стресса и индукции НФТ, которое развивается в шкале времени порядка нескольких суток. При этом периоде, в течение которого происходит наиболее заметный рост НФТ и падение активности ФСА, соответствует наиболее существенный рост экспрессии генов, кодирующих защитные (участвующие в индукции НФТ) белки LhcSR и PsbS на фоне относительно слабых изменений в содержании и составе защитных каротиноидов, и также хлорофилла. Стресс-индуцированная экспрессия PsbS в таком длительном масштабе времён впервые обнаружена у зелёных водорослей (Chlorophyta), что может

¹ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. **Птушенко В. В.**, Бондаренко Г. Н., Виноградова Е. Н., Глаголева Е. С., Карпова О. В., Птушенко О. С., Соловченко А. Е., Трубицин Б. В., Чивкунова О. Б., Шибзухова К. А., Щербаков П. Н. Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C 2047 // Биохимия. – 2021. – Т. 86. – № 12. – С. 1853–1864. – DOI: 10.31857/S0320972521120095 (WoS JIF 2.8 / 0.75 п.л. / **0.4 п.л.**)
2. **Птушенко В. В.**, Бондаренко Г. Н., Виноградова Е. Н., Глаголева Е. С., Карпова О. В., Птушенко О. С., Шибзухова К. А., Соловченко А. Е., Лобакова Е. С. Индукция экспрессии фотозащитных белков PsbS и LhcSR в клетках зелёной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 под действием низкой положительной температуры // Биохимия. – 2022. – Т. 87. – № 12. – С. 2089–2098. – DOI: 10.31857/S0320972522120235 (WoS JIF 2.8 / 0.85 п.л. / **0.6 п.л.**)
3. **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.**)

указывать на его фотопротекторную функцию в хлоропластах Chlorophyta, ранее рассматривавшуюся как гораздо более позднее приобретение фототрофных организмов (PsbS активен у харовых водорослей, мохообразных и сосудистых растений). Проведён анализ физико-химических свойств PsbS, определяющих его физиологическую активность: выполнен расчёт значений констант кислотной диссоциации протонируемых аминокислотных остатков, экспонированных в люмен. Определена первичная и третичная структура белка; показано, что, несмотря на существенные отличия PsbS из *L. incisa* от гомологичного белка высших растений по аминокислотной последовательности, их пространственные структуры очень близки друг к другу. При этом PsbS из *L. incisa* содержит значительно меньше протонируемых остатков в экспонированной в люмен области, чем PsbS высших растений. Тем не менее, в обоих белках имеются аминокислотные остатки, обладающие значениями pK_a в слабокислом диапазоне, важном для функционирования PsbS как индуктора НФТ.

III.2. Индукция низкотемпературно-зависимого светового стресса в ФСА *L. incisa*

III.2.1. Введение

Фотосинтезирующие организмы характеризуются наличием эффективных защитных механизмов ФСА от избыточного освещения. Важнейшим механизмом защиты ФСА от светового стресса является тушение возбужденных форм хлорофилла с рассеянием энергии в виде тепла, так называемое нефотохимическое тушение флуоресценции (НФТ). Ключевыми детерминантами НФТ являются состав и содержание пигментов, в первую очередь, деэпоксидированных форм ксантофиллов (зеаксантина, Зеа, и лютеина, Лют (Demmig-Adams 1990; García-Plazaola et

al. 2012)), а также содержание фотопротекторного белка LhcSR, родственного белкам светособирающей антенны. Этот белок присутствует преимущественно у низших растений (Peers et al. 2009; Pinnola 2019). У сосудистых растений он замещается своим функциональным аналогом — белком PsbS, являющимся компонентом фотосистемы II (ФСII), а у представителей промежуточных групп (наиболее изученным является мох *Physcomitrella patens*) функционируют оба белка (Verhoeven 2014).

НФТ служит механизмом «быстрого реагирования» ФСА на световой стресс. На более длительных временах в процесс акклимации организма к избыточному освещению включаются и другие механизмы. К ним относят изменения в соотношении пигмент-белковых комплексов обеих фотосистем (ФС I и ФС II) и фотосинтетических антенных (светособирающих) комплексов (ССК), а также в общем содержании компонентов ФСА в клетке (Bonente et al. 2012; Kouvril et al. 2013). Каротиноиды, наряду с участием в НФТ, способны дезактивировать активные формы кислорода, возникающие в ФСА в условиях избыточного освещения (Jørgensen and Skibsted 1993; Telfer et al. 1994), поэтому для растений характерно увеличение содержания каротиноидов по отношению к хлорофиллу при длительной акклимации к интенсивному свету (Demmig-Adams and Adams 1996; Solovchenko et al. 2011, 2013; Lichtenthaler et al. 2013; Aburai et al. 2015).

В неблагоприятных условиях низкой температуры, снижающих интенсивность протекания метаболических процессов в организме, когда ФСА не в состоянии полностью утилизировать поглощаемую световую энергию, также развивается световой стресс и ответ ФСА на него (Demmig-Adams et al. 2012), например, накопление зеаксантина (Zarter et al. 2006a, b), а также специфическая акклимация организма к низкой температуре, в первую очередь, снижение вязкости мембраны за счёт десатурации жирных кислот (ЖК) мембранных липидов (Theocharis et al. 2012; Los et al. 2013).

В работе, описанной в данном разделе, была поставлена цель выяснить, какую роль играют перечисленные выше механизмы защиты ФСА в акклимации микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 к низкой температуре за времена порядка нескольких суток. Для этого необходимо было решить следующие задачи: 1) охарактеризовать активацию НФТ и изменения активности ФСА микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 в результате акклимации к низкой температуре; 2) определить изменения пигментного состава и соотношения содержания пигмент-белковых комплексов ФСА, которые влияют на активность НФТ; 3) оценить изменение активности защитных белков LhcSR, ответственных за индукцию НФТ; 4) выяснить характерные изменения содержания ненасыщенных ЖК (НЖК) в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 при действии низкой температуры.

III.2.2. Результаты

Было показано, что охлаждение суспензии до близких к нулю положительных температур приводит к развитию светового стресса и активации НФТ возбуждённых состояний хлорофилла (Хл) в фотосинтетической антенне, начиная с первых суток с начала охлаждения (рис. III.1). Эта активация, однако, развивается относительно медленно: снижение квантового выхода ФСII, F_v/F_m , происходит в течение нескольких (4-5) суток в 2-2,5 раза (рис. III.1,а). Одновременно происходит снижение активности фотосинтетического транспорта электронов (рис. III.1,б) и рост теплового рассеяния поглощённой энергии света в фотосинтетической антенне (рис. III.1,в). На более длительных временах низкотемпературной акклимации снижение активности ФСII и рост скорости теплового рассеяния замедляются. Наблюдаемые изменения в ФСII и связанной с ней антенне отражают развитие светового стресса в хлоропластах микроводорослей, о котором свидетельствует изменение световых кривых квантового выхода фотохимической реакции в ФСII и скорости

фотосинтетического выделения кислорода суспензией клеток *L. incisa* IRPAS C-2047 при переходе от инкубации при нормальной температуре (25 °C) к инкубации при 0 °C в течение 4 суток (рис. III.2). Полунасыщающая интенсивность света, $I_{1/2}$, при нормальной температуре составляет около 100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, что вдвое превышает интенсивность освещения, при котором растут микроводоросли. Однако при низкой температуре $I_{1/2}$ падает до значений <10 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, что существенно ниже фактической освещённости суспензии и соответствует условиям светового стресса.

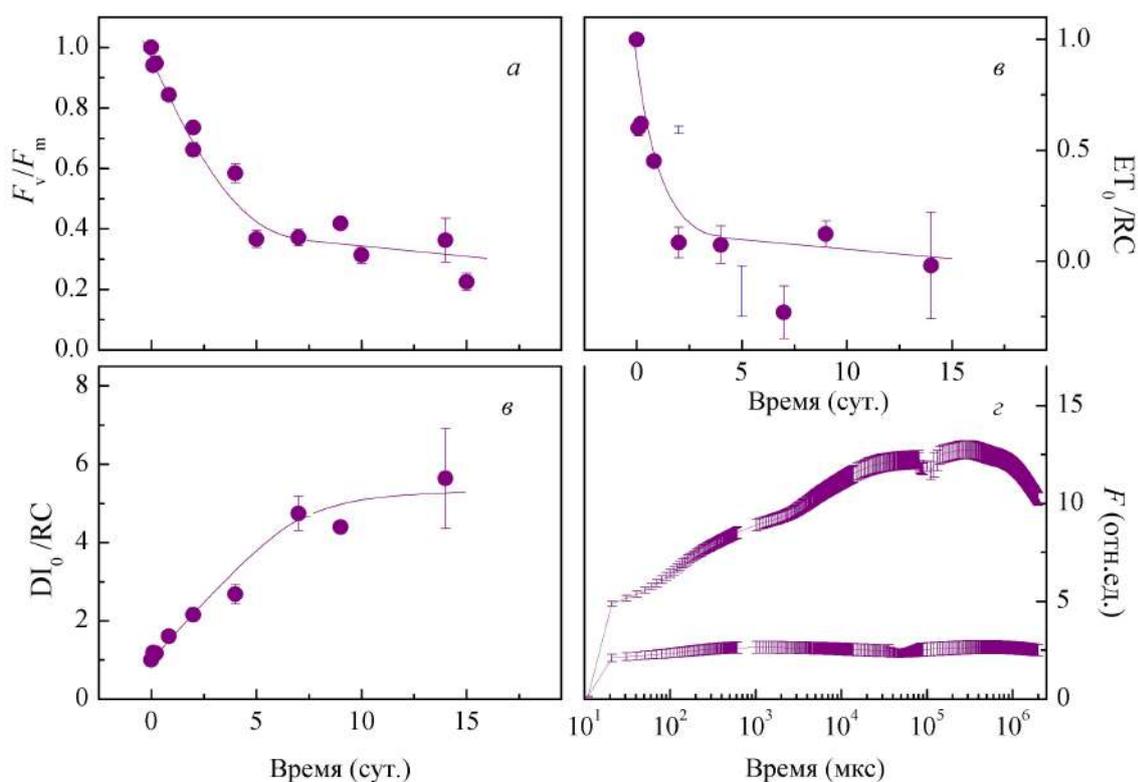


Рис. III.1. Снижение активности ФСII (а) и скорости фотосинтетического транспорта электронов (б), рост тепловой диссипации поглощённой световой энергии в антенне (в) по мере адаптации культуры одноклеточных водорослей *L. incisa* к низкой температуре (0 °C). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

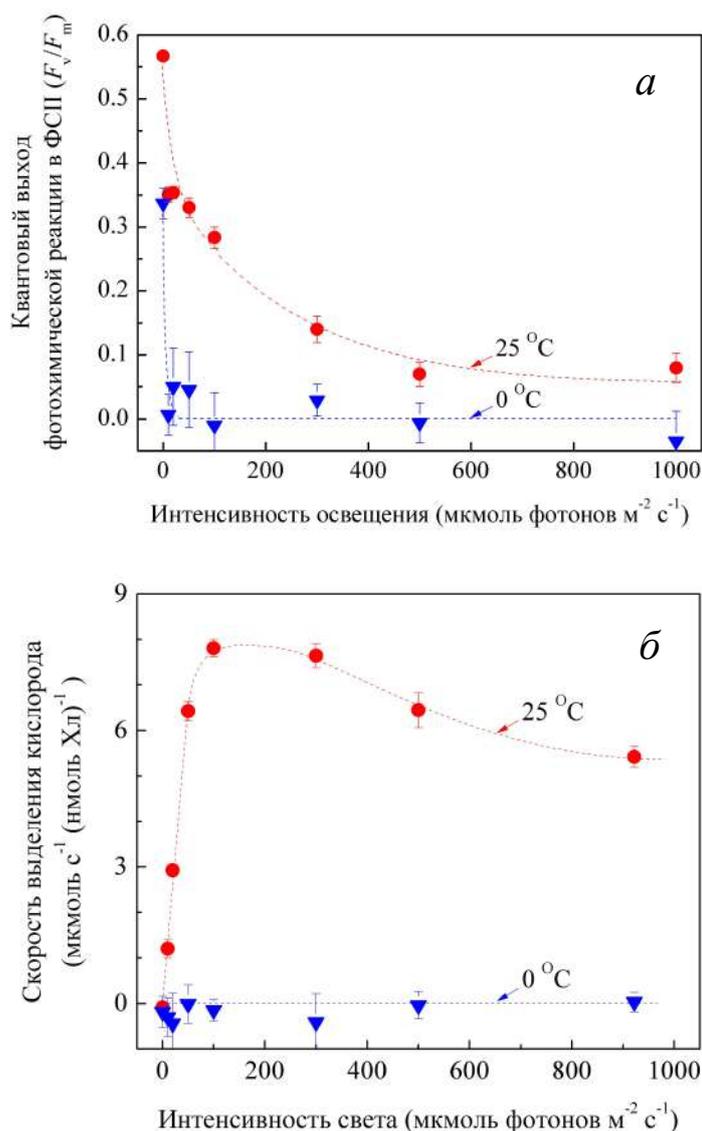


Рис. III.2. Зависимость квантового выхода фотохимической реакции в ФСII (а) и скорости фотосинтетического выделения кислорода (б) суспензией клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, инкубируемой при температуре 25 °С (круги) и 0 °С (треугольники) в течение 4 суток, от интенсивности освещения. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n=4$).

В ходе акклимации культуры микроводорослей *L. incisa* к низкой температуре наблюдается также 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 (рис. III.3). Однако заметные изменения этих показателей светового начинают проявляться лишь через 3-5 суток после начала низкотемпературной акклимации, то есть когда уже

достигается заметный уровень НФТ и существенно снижается активность ФСII.

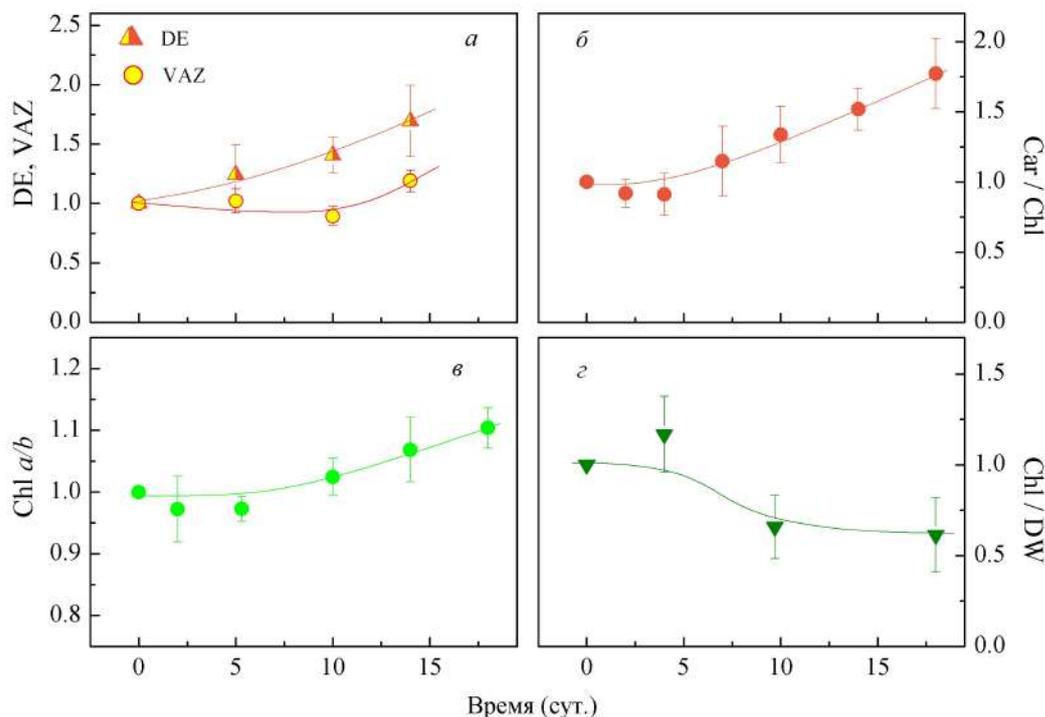


Рис. III.3. Изменения содержания и состава пигментов в ФСА микроводоросли *L. incisa* в ходе акклимации к низкой температуре (0 °С): доля каротиноидов виолаксантинового цикла, VAZ, и коэффициент дезпоксидации, DE (а), молярное отношение содержания каротиноидов и хлорофилла, Car/Chl (б), молярное отношение 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 ± стандартная ошибка среднего (n = 3).

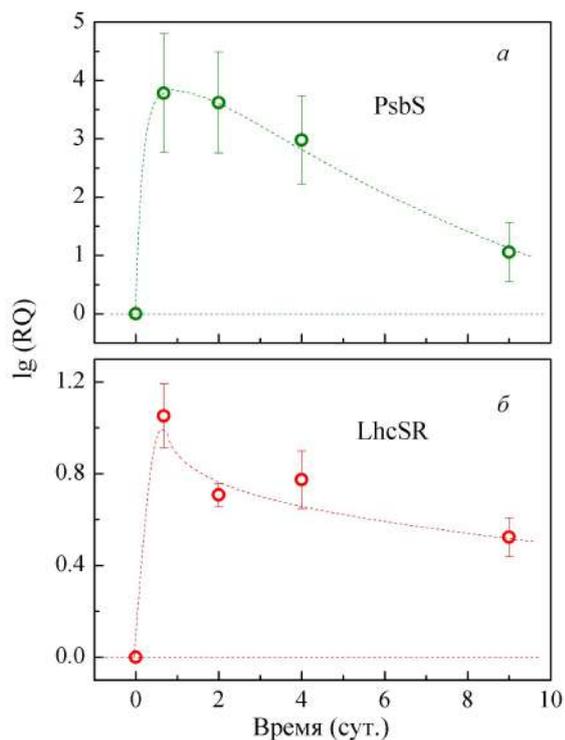


Рис. III.4. Изменения содержания мРНК защитных белков PsbS (а) и LhcSR (б) в клетках микроводоросли *L. incisa* в ходе акклимации к низкой температуре (0 °С). Приведен логарифм относительного количества мРНК (RQ), средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 3).

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. III.4). Таким образом, можно утверждать, что специфика ответа психротолерантной водоросли *L. incisa* на световой стресс, индуцированный понижением температуры, проявляется в индукции преимущественно LhcSR- и PsbS-зависимого НФТ на первом этапе акклимации, который лишь позже дополняется развитием других характерных для светового стресса реакций.

Необходимо подчеркнуть необычно высокую продолжительность повышенной экспрессии гена PsbS, составляющую в наших экспериментах несколько суток. 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 в начале стресса.

Одновременно было измерено содержание транскриптов генов некоторых других белков, ответственных за акклимацию ФСА к низкой температуре или избыточному освещению: генов фермента виолаксантидеэпоксидазы, VDE, обеспечивающей синтез зеаксантина, одного из основных светозащитных пигментов; зеаксантинэпоксидазы, ZEP, катализирующей обратную реакцию, превращение зеаксантина и антераксантина в светособирающий пигмент виолаксантин; и δ -5-дезатуразы, DES, ответственной за синтез арахидоновой кислоты. Последний фермент важен потому, что образование арахидоновой кислоты является не только характерной для низкотемпературной акклимации

реакцией десатурации жирных кислот, но и, возможно, участвует в регуляции НФТ. Так, предполагается, что арахидоновая кислота служит модулятором работы мембранных пигмент-белковых комплексов за счёт липид-белкового взаимодействия. В наших экспериментах мы наблюдали незначительное (2-3-кратное) повышение уровня экспрессии гена DES. Однако в течение всего исследованного периода акклимации к низкой температуре сколь-либо заметных изменений в уровне экспрессии гена VDE не наблюдалось.

III.3. Структура и физико-химические свойства белка PsbS зелёной водоросли *L. incisa*

Как было отмечено в обзоре литературы, представление о механизме PsbS-зависимой индукции НФТ существенно изменилось за последнее десятилетие и в настоящее время этот механизм связывается, в конечном итоге, с генерацией центров тушения в фотосинтетической антенне (Ruban and Wilson 2021). Однако, независимо от деталей этого механизма, он индуцируется закислением тилакоидного люмена и, следовательно, зависит от протонирования экспонированных в люмен аминокислотных остатков белка. Поэтому эффективность PsbS-индуцированной защиты от фотоповреждения будет зависеть от констант кислотной диссоциации (K_a) этих групп. Это обстоятельство делает важной оценку величины pK_a для протонируемых групп белка PsbS для дальнейшего анализа его роли в фотопротекторном ответе. Для получения этой оценки а) была определена аминокислотная последовательность PsbS; б) по полученной последовательности была предсказана трёхмерная структура белка; в) на основании структуры была построена молекулярно-динамическая модель, а на основании результатов моделирования г) построена диэлектрическая модель белка и выполнен расчёт значений pK_a протонируемых групп белка в рамках полуконтинуальной электростатики. Кроме значений pK_a , это

исследование также позволило нам сравнить первичную и третичную структуру белка PsbS из зелёной водоросли *L. incisa* с известными структурами гомологичных белков из других водорослей и высших растений.

На рис. III.5 показано множественное выравнивание последовательностей белка PsbS из *L. incisa* (*L.i.*-PsbS) и четырех других видов зелёных водорослей, принадлежащих к трем различным классам (*Botryococcus braunii*, Trebouxiophyceae; *C. reinhardtii* и *Haematococcus lacustris*, Chlorophyceae; *Micromonas pusilla*, Mamiellophyceae), а также из представителя высших растений — шпината (*S. oleracea*). В структуре белка имеется 19 высококонсервативных участков. Это значительно меньше, чем было выявлено при сравнении последовательностей PsbS из различных видов высших растений (включая мох *Physcomitrella patens*), которое показывает наличие 130 высококонсервативных остатков из приблизительно 200. Более того, консервативные остатки у белка из высших растений расположены компактными (или даже непрерывными) группами длиной до 23 аминокислотных остатков (а.о.) (Fan et al. 2015). Это, вероятно, указывает не только на большую эволюционную дистанцию между высшими растениями и зелёными водорослями, но и на более низкое давление отбора в группе зелёных водорослей, обладающих наряду с PsbS его аналогом — фотозащитным белком LhcSR. Выравнивание последовательностей белков двух выбранных видов, *L. incisa* и *S. oleracea*, выявляет 68 идентичных а.о. из 210/212 а.о., составляющих белок *L. incisa* / или *S. oleracea*, т.е. менее одной трети. Более того, все 68 а.о. в основном распределены вдоль гена поодиночке или группами по 2 или 3 а.о., и только 16 а.о. сосредоточены в трёх относительно небольших группах (7, 5 и 4 последовательно расположенных а.о.) (рис. III.6). Большинство консервативных а.о. расположены в первой и третьей трансмембранных спиралях (TM1, TM3) и в соседних с ними участках петель, экспонированных в люмен, а также в компактном (5 а.о.)

консервативном участке, прилегающем к ТМ3 со стороны стромы. Поэтому неудивительно, что почти две трети совпадающих а.о. являются гидрофобными или неполярными (42 а.о.); остальные представляют собой 10 полярных и 16 заряженных а.о. (9 катионных и 7 анионных).

Для построения пространственной структуры хлоропластного белка на основе последовательности его мРНК следует учитывать сигнальный пептид хлоропластной локализации на N-конце аминокислотной цепи. Для различных хлоропластных белков длина этого пептида варьирует в широких пределах, от 13 до 146 а.о., хотя большая их часть (>80%) состоит из 30-80 остатков (Zhang and Glaser 2002). Для исследуемого белка длина сигнального пептида была оценена в 41 а.о.

Предсказанная трехмерная структура белка, оптимизированная с помощью молекулярно-динамического моделирования, очень близка к структуре PsbS из шпината (*S.o.*-PsbS), несмотря на значительную разницу в их аминокислотных последовательностях (рис. III.7). Оба белка обладают четырьмя трансмембранными альфа-спиралями, ТМ1-ТМ4. Спираль ТМ1 (Val-61—Gly-91) у *L.i.*-PsbS немного длиннее (на 1-1,5 витка), чем у *S.o.*-PsbS (Thr-33—Gly-59), другие трансмембранные спирали почти одинаковы по длине: ТМ2, ТМ3 и ТМ4 *L.i.*-PsbS построены из Ile-111—Leu-125, Lys-175—Thr-198 и Leu-215—Ala-234 соответственно, что соответствует альфа-спиральным областям ТМ2-ТМ4 у *S.o.*-PsbS: Pro-79—Ile-93, Ser-139—Gly-163 и Asn-179—Asn-198. ТМ1 и ТМ2, а также ТМ3 и ТМ4 соединены между собой относительно короткими участками, экспонированными в тилакоидный люмен, с короткой (2-2,5 витка) альфа-спиралью, расположенной между ТМ3 и ТМ4 и приблизительно параллельной мембране в обоих белках. Также в обоих белках ТМ2 и ТМ3 соединены большой (около 50 а.о.) петлей, экспонированной в строму. Структура этой петли не разрешена в структуре *S.o.*-PsbS, полученной методами рентгеновской дифракции (код PDB: 4RI2), что говорит о её высокой

подвижности. Наши данные по молекулярно-динамическому моделированию *L.i.*-PsbS согласуются с этим выводом.

```

L.incisa
          1          10          20          30          40
L.incisa      .....MQTSPFTTSRSSLSAKSNVAQRLAAPLRPAVVPHRMLAP
B.braunii      .....MLVP.....LQMHHTLGLARIKAGIVGFVVLK.....
C.reinhardtii  .....MAMTLSTKAFARQGVSAARKN.TVRVYAATTKVNPKLASKTEV
H.lacustris    .....MLTLPSARAFAPT.RSARRSP.AVRVHAVLRTA.PKPVG....
M.pusilla      .....MLGFFFFTTVGDVVTREGGEPLEQLVDEEMFIGAHAS....
S.oleracea     MAQAMLMLMMPGVSTTNTIDLKRNALLKQIQKIKPKSSTSNIFFSPLPSSSSSSSTVFKT
consensus>70  .....
  
```

```

L.incisa
          50          60          70          80          90
L.incisa      TAALKSKVKYDPSAKTVDSPVVS.....AFTRRRREVFVGR TAMGFLAAVIGELLT
B.braunii      ..CLKNKGQSNSTGAFEENPAQP.....VFSRRREVFVAGR LAMFGWAASLIGEIST
C.reinhardtii  ERFKQATGLPAPAINGKQFPLKL.....GFTKTNELFVGR LAMVGFSSALIGEILT
H.lacustris    ...KNAS..SAPTSSRKSRGLQL.....GFTKENELFVGR AAMLGFALS LIGELLT
M.pusilla      .....SVLFHPPRFRTLNVNHVNP.....YELAKDALEVA GFYVESVFVLWV
S.oleracea     LALFKSKAKAPKKVEKPKLVEDGLFGTSGGIGFTKENELFVGR VAMI GF AASLLGEGIT
consensus>70  .....f....E.f.gr.am.Gf....ige..t
  
```

```

L.incisa
          100          110          120
L.incisa      GKGPISLQLSLVDPGLINIF.....FLGLVAVNFVTA LFPGS
B.braunii      GRGALGQLQLBTG...LPPYAIIDLNFDLCYASVQDLA FGVQV LGIVAYS AIGALNPAS
C.reinhardtii  KGKALAQFQYETG...LNGIEVDGL.....VIGLIAFN LIAAVLPAS
H.lacustris    KGKALAQFQYEIFDDKVNMLQVDEL.....VVG LILFNLVAAVLPAS
M.pusilla      TLGLVFLAVQQG.....NALG.....KPVRTYSANAKA AKN
S.oleracea     GKGILSQLNLETG...IPIYEAEP L.....L LFFILFTL LGALG
consensus>70  g.G...q...#.g.....#.l.....i.f...A.....
  
```

```

L.incisa
          130          140          150          160          170          180
L.incisa      ..PTFSESNQDVRKRPSGPIQKPKTSAADRPFDFGTSSQFGFTKKNELFVGR TAMIG
B.braunii      ..PTWSRENQSDVNKRGA GPTQKPK.I NLVGNPGEFLGVT.EFGFSKKNELFVGRVAQLG
C.reinhardtii  ..QTFVPEEQDTISERPAGPLQDPR.ITLLE.PKKFFGVQG.FGFTKENELFVGRAAQLG
H.lacustris    ..GT FVPDEE..VAQRPKGALQDPR.VSLAN.PARFFGISGGFGFTKENELFVGRVAQLG
M.pusilla      G.AKRVDAITAGVKEAITDVVREQR.....PYEVFN GR LAMDG
S.oleracea     DRGRFVDEPTTGLKAVIIPPGKDVR..SALG...LKT KGPLFGFTKSNELFVGR LAAQLG
consensus>70  .....v.....fgf.k.nElFvGR.A.lG
  
```

```

L.incisa
          190          200          210          220          230          240
L.incisa      FASALIGEKLTGKKGPLGQLGVPLGLELNPTYGWVGLAVVWGFVFLVAAIGYGNFGQQ.EG
B.braunii      FVASIIGEKVTC.FGPKLQFGLLETGIPLGAAS..FGLLVFI GFLFVAAVFEGNFPPFRGDD
C.reinhardtii  FAFSLIGEA VTC.KGALAQFDIETGLSLRDTE..FGLVVFI LFLFAAINEGSGKFVDEE
H.lacustris    FAASLIGETLTG.KGALAQFDIETGLPLQDTE..FGLAVFI LFLFAA INPGTGRFAKEE
M.pusilla      ITFAIAGDKVTCGMGPLEQLRGETGVPIEVELFAAFFLFGVBFNVVAITGVTVGKRAWQS
S.oleracea     FAFSLIGETITG.KGALALQNL IETGVPI NEIEP..LVLLNVVFFFAA INPGTKGKITDD
consensus>70  f....iG#..TG..G.L.Q...etG.....i.F...aAi..g.....#.
  
```

```

L.incisa
          250
L.incisa      DEEIIY
B.braunii      DKSTY
C.reinhardtii  SA...
H.lacustris    PDA..
M.pusilla      GKKVM
S.oleracea     EEED.
consensus>70  .....
  
```

Рис. III.5. Выравнивание последовательностей белка PsbS из шпината (*S. oleracea*) и пяти видов зелёных водорослей (Chlorophyta), включая *L. incisa*. Последовательности PsbS из *L. incisa* предсказана в этой работе, остальные последовательности взяты из баз данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Консервативные а.о. или а.о. с близкими физико-химическими свойствами показаны зелёным шрифтом, высококонсервативные а.о. отмечены зеленым фоном.

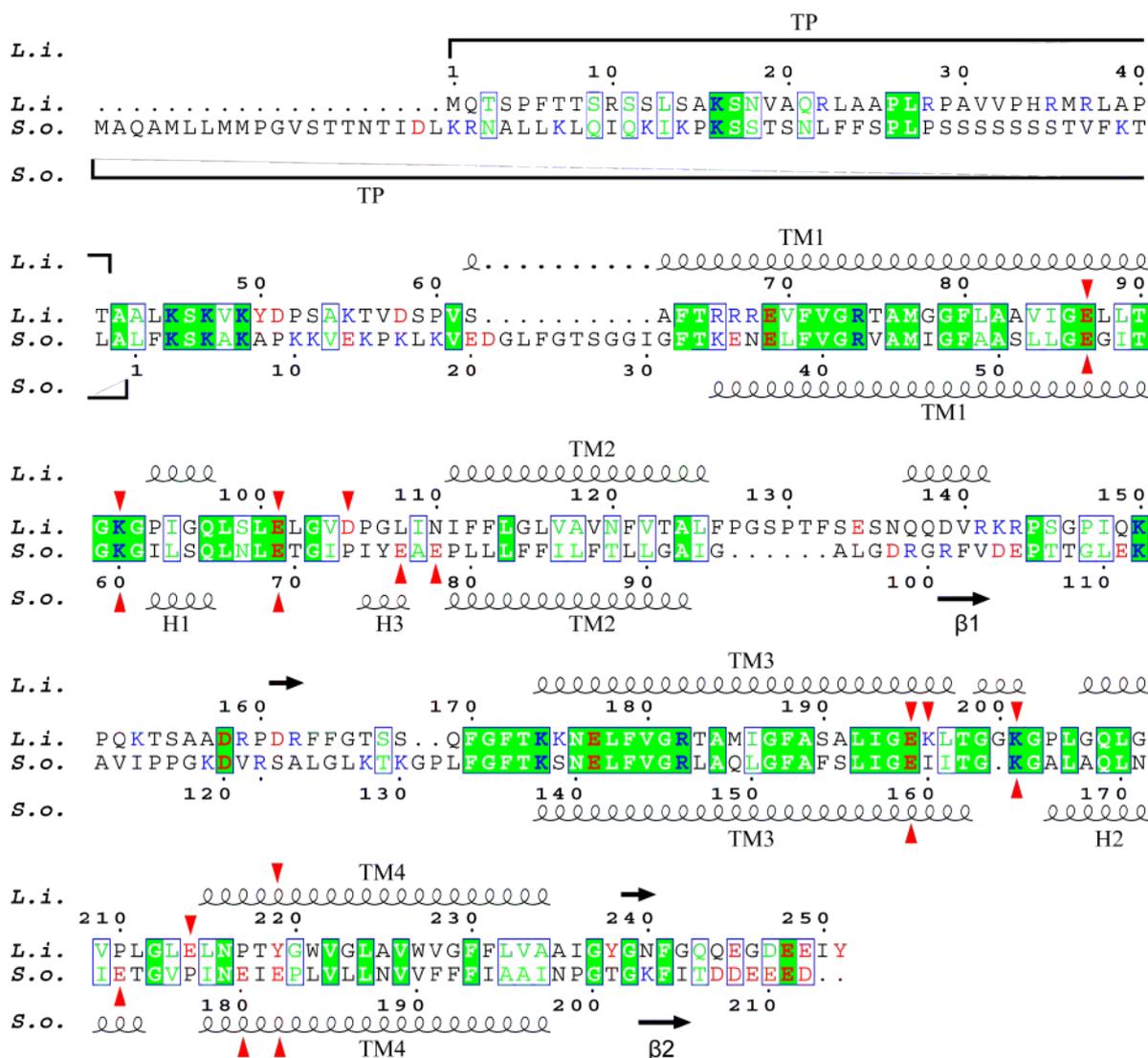


Рис. III.6. Выравнивание последовательностей белков PsbS из *L. incisa* (*L.i.*-PsbS) и *S. oleracea* (*S.o.*-PsbS). Нумерация а.о. для *L.i.*-PsbS приведена, начиная с первого а.о. предсказанного белка (включая предсказанный сигнальный пептид хлоропластной локализации, TP). Для *S.o.*-PsbS приведена устоявшаяся нумерация а.о. (начиная с первого а.о. зрелого белка). Протонируемые остатки показаны красным (анионогенные а.о.: Asp, Glu и Tyr) или синим шрифтом (катионогенные а.о.: Lys и Arg). Красными стрелками для обоих белков показаны остатки глутамата, а также остатки аспартата и лизина *L.i.*-PsbS, находящиеся в экспонированной в люмен области белка. Также показаны элементы вторичной структуры обоих белков, в первую очередь, трансмембранные альфа-спирали TM1-TM4.

L.i.-PsbS содержит 42 ионогенных остатка, включая 9 Arg, 12 Lys, 4 Tyr, 10 Glu и 7 Asp остатков (здесь речь идёт о зрелом белке; предсказанный сигнальный пептид хлоропласта содержит еще 7 ионогенных остатков: 5 Arg, 1 Lys и 1 His. Ни остатков His, ни Cys, которые также можно было бы рассматривать как кандидатов на роль сенсоров pH, в зрелом белке нет). Девять из них расположены на люменальной стороне белка: глутаматы 101, 195, 87 и 214, аспарат 105, тирозин 219, лизины 92, 196, 201 (рис. III.8). Четыре глутамата представляют собой две почти симметричные пары: Glu-87 и Glu-195 расположены симметрично на концах “внутренних” трансмембранных спиралей, TM1 и TM3, кратчайшее расстояние между их атомами составляет около 6-7 Å. Glu-101 и Glu-214 расположены вблизи концов “внешних” трансмембранных спиралей TM2 и TM4, расстояние между ними превышает 27 Å. (Glu-101 скорее расположен в люменальной петле, соединяющей TM1 с TM2, что слегка нарушает симметрию расположения люменальных остатков глутамата). Два остатка лизина, Lys-92 и Lys-201, также расположены симметрично в двух люменальных петлях почти между Glu-87 и Glu-195 (но на 4-5 Å ближе к поверхности белка). Два других остатка, Asp-105 и Lys-196, расположены ближе к Glu-101 и Glu-195. Остаток тирозина, Tyr-219, расположен в TM4.

Остатки Glu-87, -101, -195 и -214 в *L.i.*-PsbS соответствуют остаткам Glu-55, -69 (один из двух глутаматов, существенных для pH-зависимого переключения PsbS в тушащий режим), -159, -180 в *S.o.*-PsbS (рис. III.8). Glu-173 из *S.o.*-PsbS, который является одним из двух pH-чувствительных глутаматов этого белка, не имеют аналогов в *L.i.*-PsbS, однако в *L.i.*-PsbS им приблизительно симметричен Asp-105 (в то же время, в люменальной области *S.o.*-PsbS остатки аспартата отсутствуют). Lys-92 и Lys-201 в *L.i.*-PsbS соответствуют Lys-60 и Lys-164 в *S.o.*-PsbS, а Lys-196 и Tyr-219 в *L.i.*-PsbS не имеют аналогов в *S.o.*-PsbS.

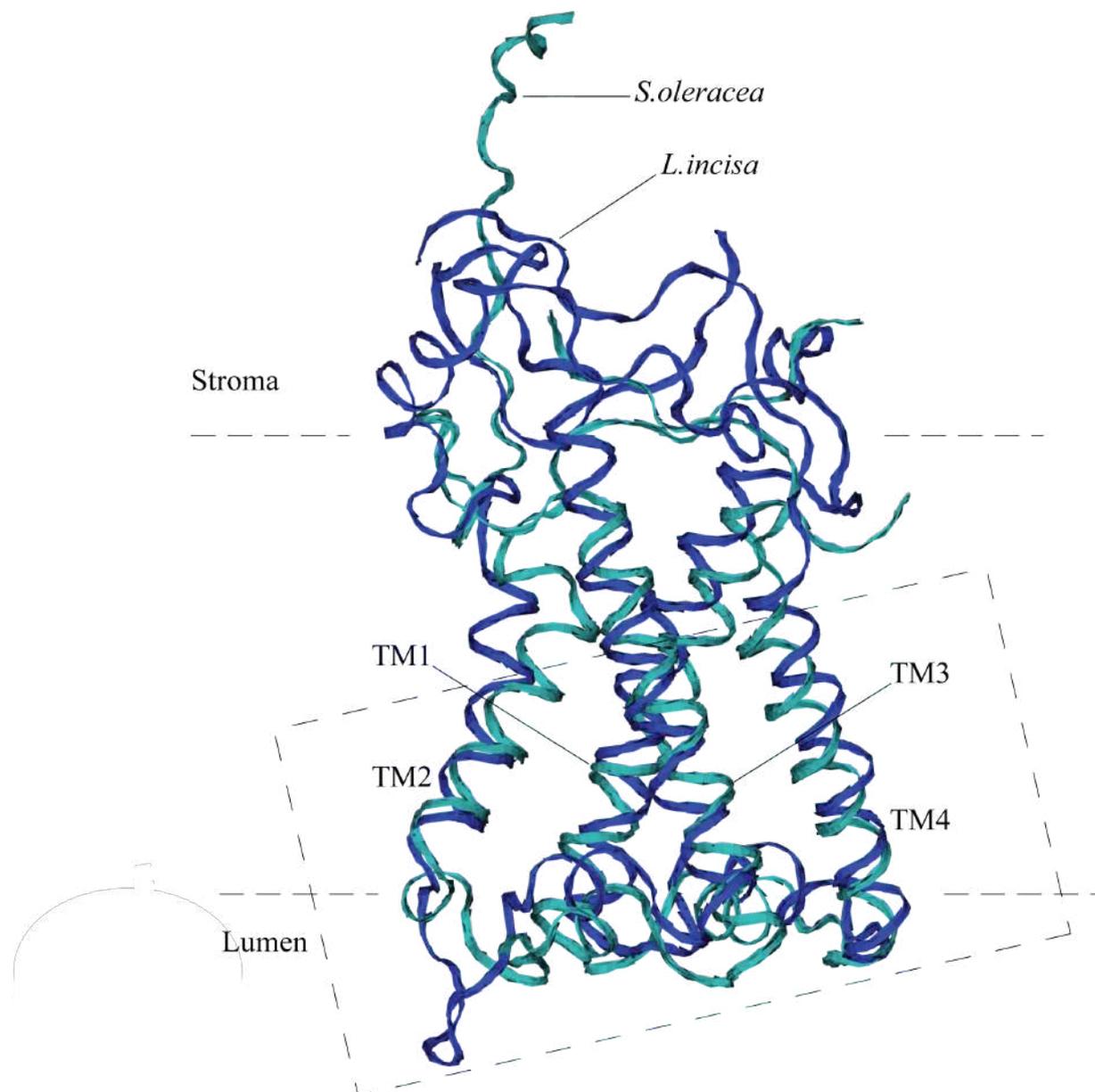


Рис. III.7. Предсказанная трёхмерная структура *L.i.*–PsbS, сравнение со структурой *S.o.*–PsbS, общий вид. Показаны только пептидные цепи. Обозначены четыре трансмембранные спирали (TM1–TM4). Пунктирный прямоугольник обозначает область, подробно показанную на рис. III.8.

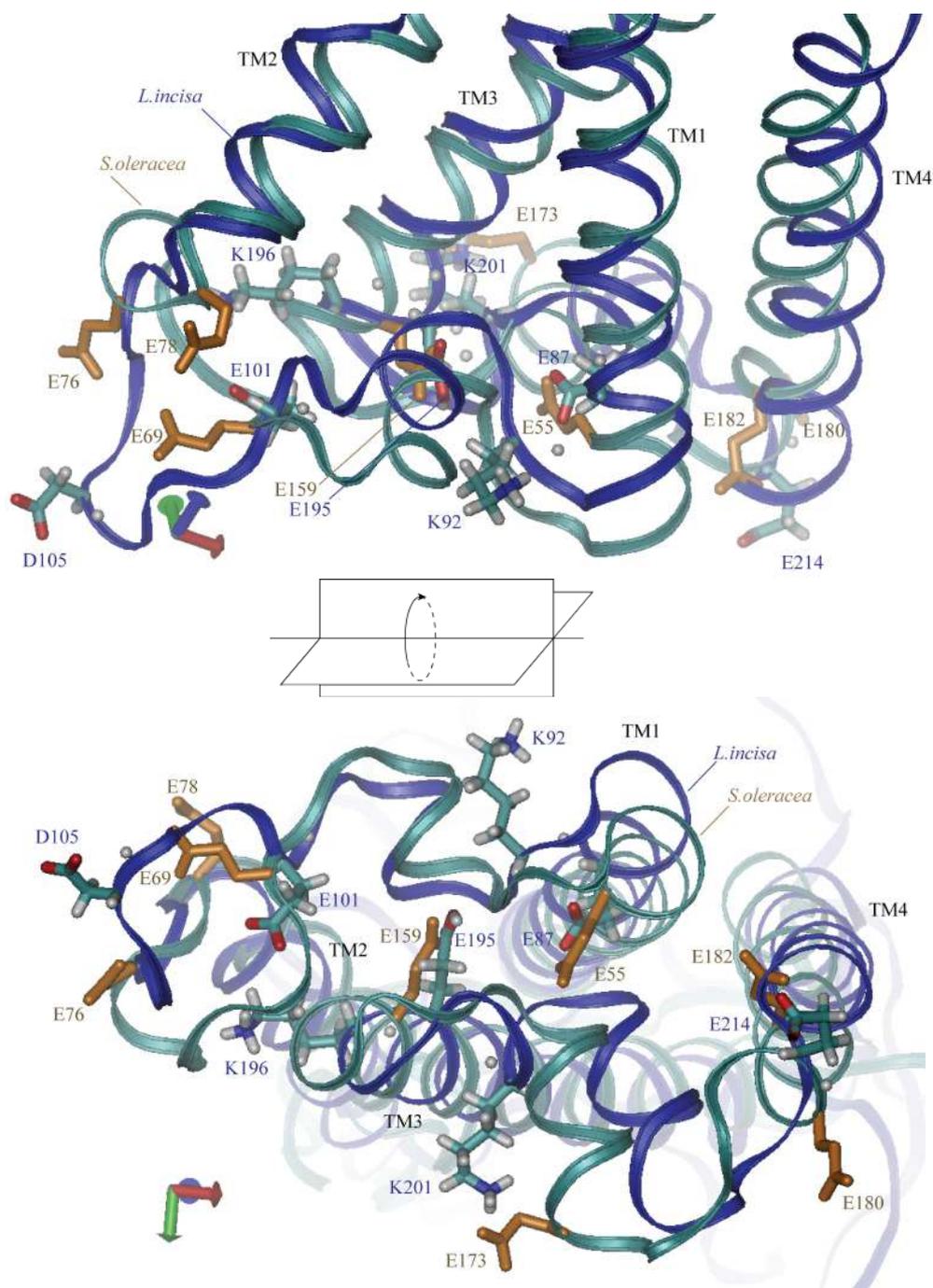


Рис. III.8. Предсказанная трёхмерная структура *L.i.*-PsbS, сравнение со структурой *S.o.*-PsbS, Люменальная область белка, вид вдоль мембраны (а) и со стороны люмена (б). Наряду с основными цепями (отмечены синим для *L.i.*-PsbS и голубым для *S.o.*-PsbS) показаны боковые цепи ионных остатков (раскраска отдельных атомов голубым, серым, синим и красным для *L.i.*-PsbS и однотонной охрой для *S.o.*-PsbS). Обозначены трансмембранные спирали (TM1–TM4).

Центральная часть белка, расположенная в мембране, содержит, в основном, гидрофобные а.о. Поэтому при построении электростатической модели белка эта область характеризуется наиболее низкой диэлектрической проницаемостью (ϵ) во всём объёме белка (рис. III.9). В областях, окруженных полярными головными группами липидов, плотность полярных а.о., а вместе с ней и величина ϵ намного выше. Область белка, расположенная в водной фазе со стороны стромы, заметно превышает по объёму область, экспонированную в люмен, поэтому вклад полярных и ионных а.о. в суммарную поляризуемость белка и, следовательно, в её ϵ значительно больше в стромальной части белка. В итоге, диэлектрическая проницаемость этой области достаточно высока, $\epsilon \approx 20$. В то же время, относительно малый объём гидрофильных петель, соединяющих трансмембранные спирали со стороны тилакоидного люмена, не позволяет существенно увеличить ϵ для этой области. Можно предположить, что такой дизайн диэлектрических свойств белка не случаен и имеет значение для правильного функционирования белка. Так, низкая диэлектрическая проницаемость области белка, экспонированной в люмен, является необходимым условием для обеспечения а) сильных локальных электрических полей и б) высоких значений диэлектрического отклика среды. Оба фактора обеспечивают большой сдвиг pK_a протонируемых а.о., который необходим как анионогенным а.о. (которые представлены в люменальной части белка, в основном, глутаматом), так и катионогенным а.о. (лизин) для достижения физиологически осмысленных значений pK_a в слабокислой области.

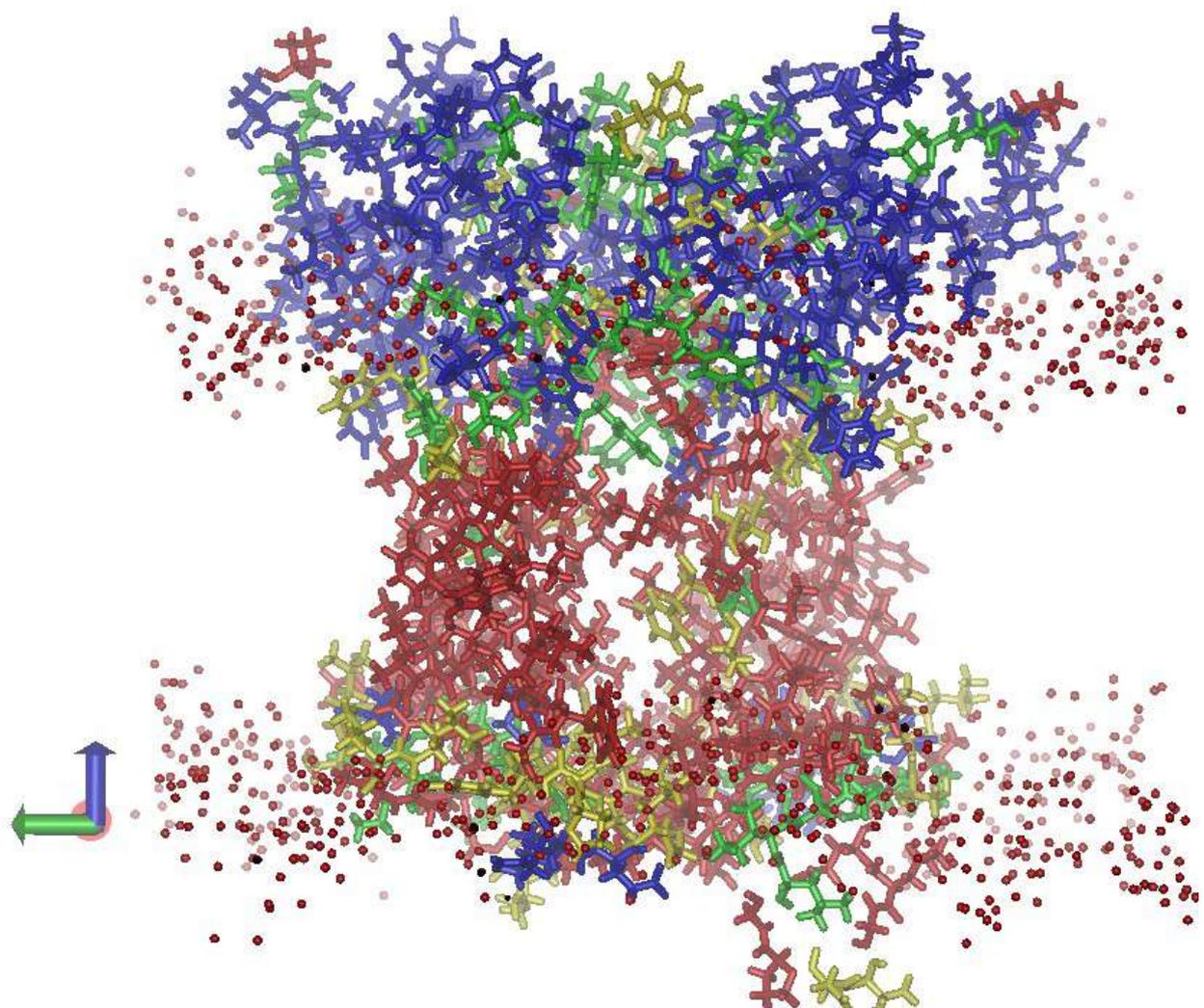


Рис. III.9. Распределение диэлектрической проницаемости (ϵ) в объеме *L.i.-PsbS* (вид вдоль липидной мембраны). Показан димер PsbS, погруженный в липидную мембрану. Области белка с наименьшим ϵ (около 3,0) показаны красным цветом; более полярные области со значениями ϵ около 5, 10 и 20 показаны желтым, зеленым и синим соответственно. Атомы кислорода в полярных головках мембранных липидов показаны в виде красных сфер.

Выполненные в рамках описанной диэлектрической модели оценки pK_a ионных а.о. в люменальной части белка *L.i.-PsbS* позволили выявить два остатка, значения pK_a которых находятся в физиологически осмысленном диапазоне 5,0–7,0: Glu-87 (pK_a 6,75 \pm 0,03) и Lys-196 (pK_a 5,81 \pm 0,02). Эти изменения коррелируют с наблюдаемой пространственной структурой белка. Так, в структуре белка видно, что боковая цепь Lys-196 отчасти погружена в белок; это должно сдвигать равновесие между состояниями протонируемой группы в сторону нейтрального состояния, т.е. уменьшать значение pK_a , приближая его к нейтральным значениям. Заметим, однако, что при молекулярно-динамическом моделировании димера PsbS возникала

некоторая асимметрия между мономерами, приводившая также к различиям в оцененных значениях pK_a для одноимённых групп разных мономеров. Однако мы предполагаем, что эта асимметрия имеет место лишь на относительно коротких временах, использовавшихся нами при молекулярно-динамическом моделировании (~ 1 мкс), в то время как на больших временах, характерных для протонного обмена, асимметрия должна исчезать.

Таким образом, несмотря на значительные отличия в аминокислотной последовательности от белка высших растений (шпината), PsbS зелёной водоросли *L. incisa* обладает практически идентичной трёхмерной структурой (в отношении пептидной цепи). Функционально значимые протонируемые а.о. в люменальной области есть у обоих белков, причём у белка шпината имеется гораздо более мощный кластер протонируемых а.о. Однако среди люменальных ионогенных а.о. PsbS *L. incisa* также удаётся выявить два а.о., Glu-87 и Lys-196, обладающие значениями pK_a в подходящем диапазоне (pK_a $6,75 \pm 0,03$ и $5,81 \pm 0,02$, соответственно).

III.4. Выводы

1. Низкая положительная температура вызывает световой стресс у психротолерантной зелёной микроводоросли *L. incisa*, в ходе которого наблюдается относительно медленное (в масштабе времён порядка нескольких суток) снижение активности ФСА и индукция НФТ. В период наиболее значительного снижения активности ФСА и роста интенсивности теплового рассеяния в энергии поглощённого света (первые 3-5 суток инкубации культуры микроводорослей при низкой температуре) состав и содержание хлорофилла и защитных каротиноидов, а также соотношения пигмент-белковых комплексов ФСII, ФСI и внешних антенн, практически

не изменяется, однако происходит существенный рост экспрессии генов белков LhcSR и PsbS, ответственных за индукцию НФТ.

2. Впервые показана долговременная (в масштабе времён порядка нескольких суток) стресс-индуцированная активация экспрессии гена фотозащитного белка PsbS у зелёных водорослей (Chlorophyta). Этот белок характерен для высших растений, и ранее была показана лишь его кратковременная стресс-индуцированная экспрессия у зелёных водорослей, что давало основание предполагать лишь вспомогательную роль PsbS в ответе на стресс. Наши данные показывают, что PsbS может быть одним из основных компонентов ответа на стресс у зелёных водорослей.

3. Белок PsbS из зелёной водоросли *L. incisa* существенно отличается от гомологичного белка высших растений по аминокислотной последовательности, однако имеет очень близкую пространственную структуру. Несмотря на значительно меньшее количество протонируемых остатков в экспонированной в люмен области (т.е. тех, которые отвечают за функционирование PsbS как индуктора НФТ) у PsbS из *L. incisa* по сравнению с белком высших растений, в обоих белках имеются аминокислотные остатки, обладающие значениями pK_a в функционально важном слабокислом диапазоне.

IV. Глава 4. Акклимация ФСА к изменению интенсивности освещения

IV.1. Аннотация главы²

В главе описано исследование влияния интенсивности освещения (в диапазоне времён минут до недель) на протекание световых реакций фотосинтеза, индукцию теплового рассеяния избыточной поглощённой энергии света, пигментный состав, фотоиндуцированные изменения структуры клетки и анатомию листа высших растений. 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 проанализировано различие в реакции перечисленных

² При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. Samoilova 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.**)
2. **Ptushenko V.V.**, Ptushenko E.A., Samoilova 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.**)
3. **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.**)
4. **Птушенко В.В.**, Птушенко О.С., Самойлова О.П., Соловченко А.Е. Анализ кажущегося нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и устойчивости к фотоповреждению листьев традесканции на основе скорости светозависимых изменений прозрачности // *Биохимия*. – 2017. – Т. 82. – № 1. С. 157-166. – DOI: 10.1134/S0006297917010072 (WoS JIF 2.8 / 0.63 п.л. / **0.42 п.л.**)
5. 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.**)
6. **Ptushenko V.V.**, Zhigalova T.V., Averbcheva O.V., Tikhonov A.N. Three phases of energy-dependent induction of P₇₀₀⁺ 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.**)
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.**)

характеристик на интенсивность освещения у растений, принадлежащих к разным экологическим группам. Показано, что скорость реакции на изменения интенсивности освещения выше для светолюбивых растений. Обнаружены исключительно интенсивные светозависимые изменения поглощения света листом у изученных модельных видов, обусловленные перераспределением хлоропластов в клетках мезофилла; высказаны предположения об определяющей роли этого механизма в адаптации к изменениям интенсивности освещения. Проанализирована роль светозависимых анатомических и цитологических перестроек листа, обеспечивающих высокую эффективность механизма снижения поглощения света листом при интенсивном освещении. Проанализирована роль проводимости устьиц для диффузии CO_2 в обеспечении его доступности для фотосинтетической фиксации в хлоропластах.

IV.2. Индукция и релаксация нефотохимического тушения в листьях традесканции

Для анализа роли интенсивности света в активации фотозащитных механизмов, действующих на разных интервалах времён (от минутной временной шкалы до времён, характерных для всего периода онтогенеза растения), нами был выбран ряд модельных видов, принадлежащих к одному роду *Tradescantia*, но относящихся к разным экологическим группам. В том числе, теневыносливые виды: *T. albiflora*, *T. fluminensis*, являющиеся типичными обитателями тропических лесов; умеренно теневыносливый вид *T. zebrina*, характерный как для тропических лесов, так и для болотистых, затопляемых территорий, встречающийся на открытых и затененных территориях; светолюбивые виды: *T. sillamontana*, *T. navicularis*, типичные для пустынь и полупустынь (см. рис. IV.1). Использование такого набора модельных растений позволило нам проанализировать наличие специфических механизмов защиты от

избыточного освещения, выработанных в ходе эволюционной адаптации к тем или иным условиям освещения. Одновременно, для выявления «индуцибельных» механизмов защиты, активируемых в ходе онтогенетической адаптации к тем или иным условиям, растения каждого из видов были выращены при низкой (60 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$; LL) или высокой интенсивности освещения (800 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$; HL).

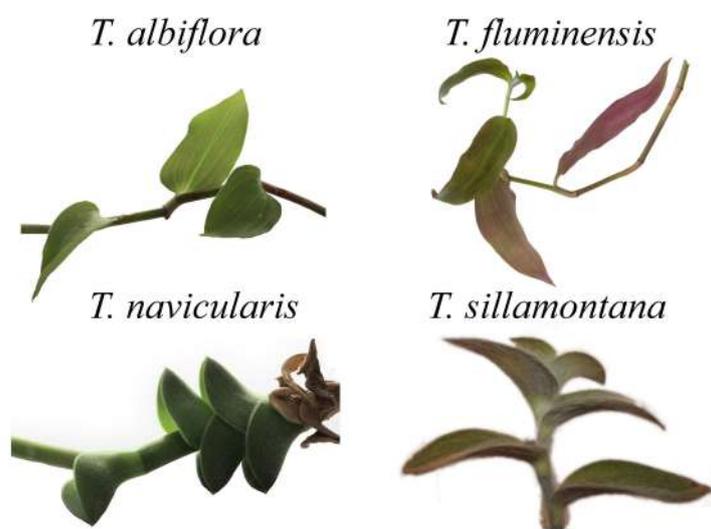


Рис. IV.1. Фотографии листьев четырёх видов традесканции: *T. albiflora*, *T. fluminensis*, *T. sillamontana*, *T. navicularis*

Для двух из модельных видов *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, было проведено исследование индукции теплового рассеяния избыточной поглощённой энергии света в зависимости от условий освещения. Тепловое рассеяние является одним из наиболее эффективных способов защиты ФСА от избыточного освещения, и имеет несколько механизмов, обеспечивающих его индукцию при попадании растения в условия интенсивного освещения. Среди них основные — т.н. энергетическое (рН-зависимое) тушение и зеаксантин-зависимое тушение. Несмотря на одинаковые проявления, каждый из механизмов обладает своими характерными временами генерации при интенсивном освещении и

релаксации после его прекращения. Это обстоятельство позволило нам выявить вклады разных механизмов в интегральную защиту ФСА и оценить их роль для растений разных экологических групп.

На рис. IV.2 и IV.3 показаны кинетики роста по мере адаптации к действующему свету (рис. IV.2) и спада в темноте коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла q_{NPQ} , который характеризует эффективность теплового рассеяния избыточной энергии поглощённого света. Из рис. IV.2 видно, что существует быстрая фаза роста q_{NPQ} (короче 1 мин.), которая характерна как для высокой (рис. IV.2a), так и для умеренной (б) и низкой (в) интенсивности действующего света. Эта фаза отражает образование внутритилакоидной трансмембранной ΔpH и вызванного им энергетического тушения. В то же время, у *T. sillamontana* при высокой интенсивности освещения, а у *T. fluminensis* также и при умеренной, возникает дополнительная фаза в росте q_{NPQ} , с характерным временем 7-15 мин. Такие времена типичны для конверсии ксантофилльных каротиноидов в светозащитный пигмент зеаксантин и генерации зеаксантин-зависимого тушения. Аналогичные фазы выявлены нами для темновой релаксации q_{NPQ} (рис. IV.3).

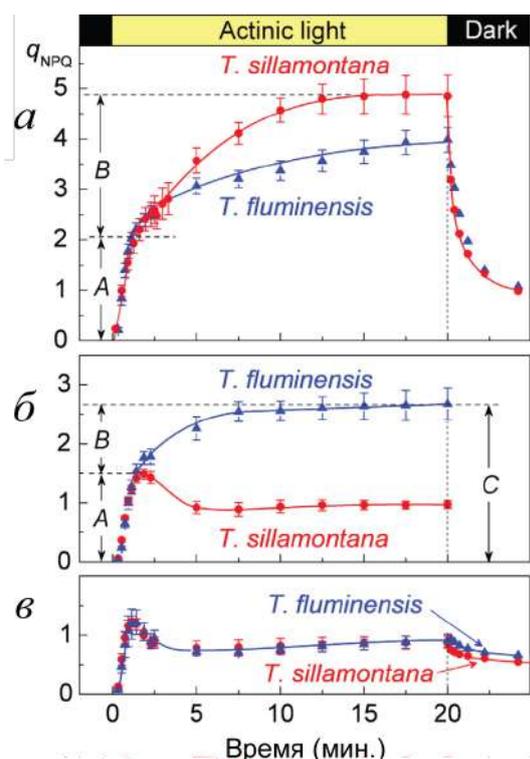


Рис. IV.2. Кинетика генерации нефотохимического тушения (NPQ) в адаптированных к темноте листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, под действием интенсивного, умеренного и слабого освещения (800, 100 и 30 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$, панели а, б и в, соответственно). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$).

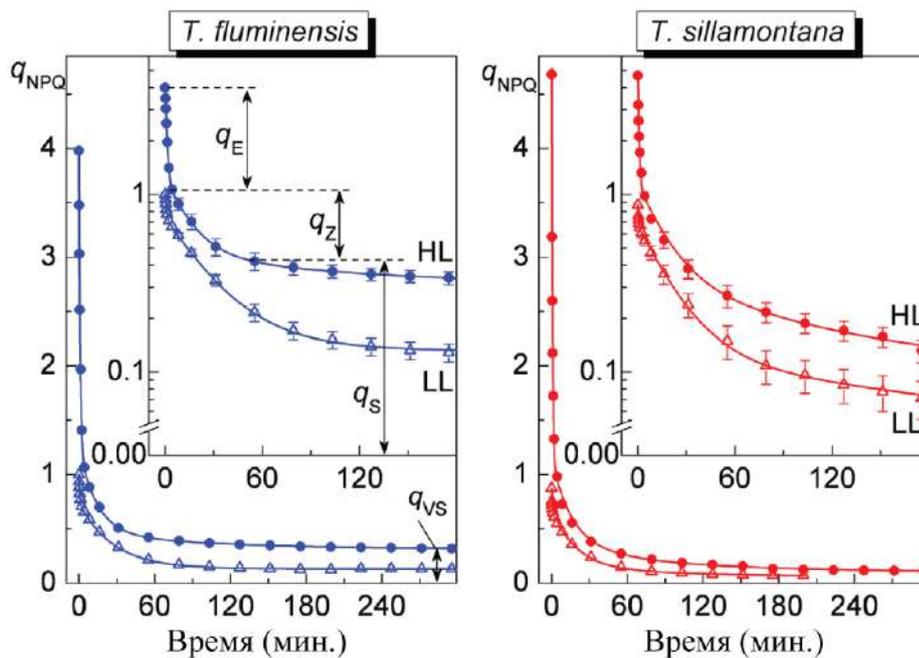


Рис. IV.3. Кинетика темновой релаксации нефотохимического тушения (NPQ) в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, адаптированных в течение 20 минут к интенсивному (HL) или слабому (LL) освещению (800 и 60 мкмоль фотонов $\text{м}^2 \text{с}^{-1}$, соответственно). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$). Экспериментальные данные аппроксимированы теоретическими кривыми, включающими несколько экспоненциальных компонент: $q_{\text{NPQ}} = q_E \times \exp(-t/\tau_E) + q_M \times \exp(-t/\tau_M) + q_S \times \exp(-t/\tau_S) + q_{\text{VS}}$

На рис. IV.4 показана зависимость амплитуды первой фазы роста q_{NPQ} (отражающей энергетическое тушение) от интенсивности света (рис. IV.4а), а также суммарной амплитуды обеих фаз (рис. IV.4б). Видно, что энергетическое тушение развивается уже при низких интенсивностях света, достигая наибольших значений при 100 мкмоль фотонов $\text{м}^2 \text{с}^{-1}$ и практически не меняясь при дальнейшем увеличении интенсивности. В то же время зеаксантин-зависимое тушение (а вместе с ним и суммарный фотозащитный эффект) продолжает расти, достигая насыщения у *T. fluminensis* при 200 мкмоль фотонов $\text{м}^2 \text{с}^{-1}$, а у *T. sillamontana* увеличиваясь без насыщения вплоть до 800 мкмоль фотонов $\text{м}^2 \text{с}^{-1}$. Обращает на себя внимание тот факт, что у светолюбивого вида защитное тепловое рассеяние световой энергии при умеренных освещённостях выражено слабее, чем у теневыносливого вида, а при высоких интенсивностях — наоборот, сильнее.

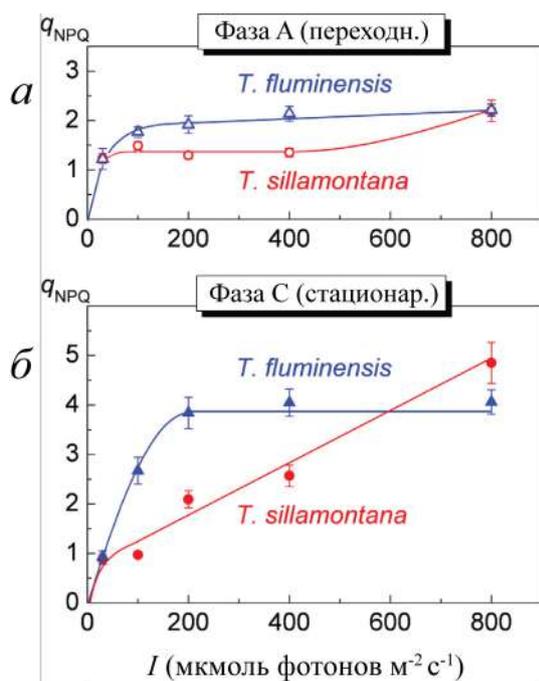


Рис. IV.4. Зависимость промежуточного и стационарного значений q_{NPQ} нефотохимического тушения (достигаемых через 2 или 20 минут освещения, верхняя и нижняя панели, соответственно) в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana* от интенсивности освещения. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$).

Табл. IV.1. Характерные времена темновой релаксации компонент нефотохимического тушения в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana* (см. графики кинетики и определение параметров на рис. IV.3).

	<i>T.fluminensis</i>		<i>T.sillamontana</i>	
Освещённость (мкЭ м ⁻² с ⁻¹)	60	800	60	800
τ_E (с)	48 \pm 1	58 \pm 1	29 \pm 7	30 \pm 2
τ_M (мин.)	28 \pm 1	14 \pm 1	18 \pm 1	10 \pm 2
τ_S (мин.)	-	108 \pm 36	64 \pm 5	75 \pm 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

Подчеркнём, однако, что коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла q_{NPQ} — не аддитивная величина, и простое сопоставление амплитуд нескольких фаз индукции тушения, обусловленных разными процессами, не отражает действительное соотношение их вкладов. Так, на рис. IV.2 вклад энергетического тушения в

суммарную фотозащитную реакцию кажется незначительным для обоих видов (несколько больший у *T. fluminensis* и меньший у *T. sillamontana*). В действительности, вклад разных фаз мультипликативен:

$$(q_0 + 1) = \prod_i (q_i + 1), \quad (\text{IV.1})$$

где q_0 — коэффициент, характеризующий суммарное тушение, обусловленное всеми процессами, характеризующимися собственным коэффициентом q_i каждый. Это позволяет нам, исходя из рис. IV.2, оценить коэффициент энергетического тушения q_E для двух традесканций при высокой интенсивности света как $q_E \approx 2$, а коэффициент зеаксантин-зависимого тушения как $q_Z = (4+1)/(2+1) - 1 \approx 0.7$ и $q_Z = (5+1)/(2+1) - 1 = 1$ для *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, соответственно. Близкую оценку для q_Z (~ 0.8 для обоих видов при высокой интенсивности света) позволяет получить анализ кинетики релаксации теплового тушения после выключения света, приведённой на рис. IV.3. В табл. IV.1 приведены значения параметров разложения кинетики спада q_{NPQ} для каждого из видов на три экспоненциальные компоненты. Наиболее существенным с точки зрения адаптации растения к условиям обитания нам представляется наличие медленнее спадающих компонент у тенелюбивого вида *T. fluminensis*. В условиях спорадических бликов солнечного света под пологом леса, приводящих к резким изменениям интенсивности освещения, указанное наличие медленно спадающих компонент обеспечивает более быструю реакцию ФСА на повторяющиеся блики и должно обеспечивать более надёжную защиту растению в данных условиях. Так, на рис. IV.5 показано, как растёт q_{NPQ} у обоих видов при включении света после длительной (24 ч) и относительно короткой (1 ч) темновой адаптации. Видно, что у *T. fluminensis* в течение часа после освещения ещё сохраняются частично активированными механизмы индукции защитного теплового рассеяния световой энергии, что позволяет ей существенно

быстрее восстановить создать высокий уровень q_{NPQ} , чем после первого после включения (с длительной предшествующей адаптацией к темноте). В то же время, для *T. sillamontana* часовая адаптация к темноте уже является достаточно длительной, и наблюдаемая кинетика индукции защитного теплового рассеяния световой энергии уже практически не отличается кинетики листа, адаптированного к темноте в течении 24 ч.

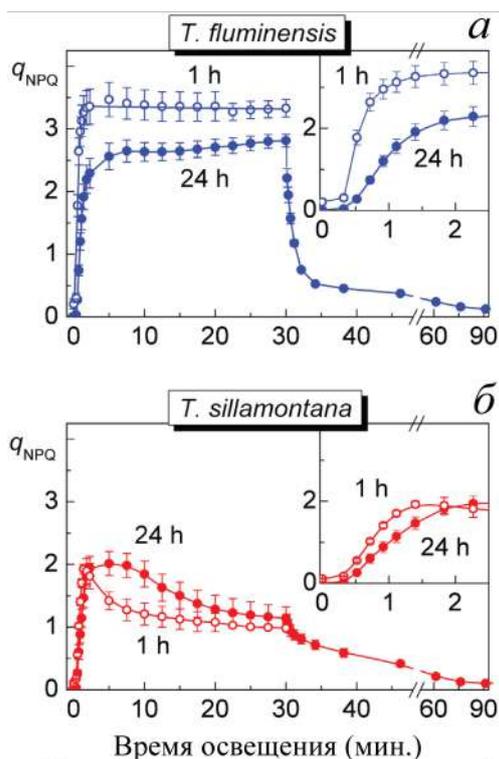


Рис. IV.5. Кинетика генерации на свету (при 150 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$) и последующей темновой релаксации нефотохимического тушения в листьях *T. fluminensis* (а) и *T. sillamontana* (б), адаптированных к темноте в течение 1 или 24 ч (перед темновой адаптацией — освещение при 800 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$).

Наша интерпретация кинетики релаксации q_{NPQ} и её мультиэкспоненциального разложения подтверждаются анализом темновой релаксации флуоресценции открытых реакционных центров, F_o (рис. IV.6). После выключения света F_o оказывается ниже, чем до освещения, и затем возрастает, приближаясь к незатухшему уровню. Основные изменения происходят в минутной шкале времени и обусловлены рассеянием трансмембранной ΔpH , что подтверждается отсутствием этих изменений в присутствии разобщителя (данные не приведены). Анализ характерных времён роста F_o показывает, что рассеяние ΔpH происходит за времена порядка 50–70 с у *T. fluminensis* и 30 с у *T. sillamontana* (рис. IV.7б), что

очень близко к временам, полученным из мультиэкспоненциального разложения кинетики релаксации q_{NPQ} и указанным в табл. IV.1. Величина относительных изменений флуоресценции после выключения действующего света, $\Delta F_{AL}/F_0$, характеризует величину образованной на свету ΔpH . График на рис. IV.7а показывает, что у *T. fluminensis* величина фотоиндуцированной ΔpH выше, чем у *T. sillamontana*, при всех интенсивностях освещения, и лишь при наиболее высокой, использованной нами (800 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$), оба вида демонстрируют близкие значения ΔpH . Эти выводы хорошо согласуются с результатами, полученными путём анализа кинетики роста q_{NPQ} и приведёнными на рис. IV.4б.

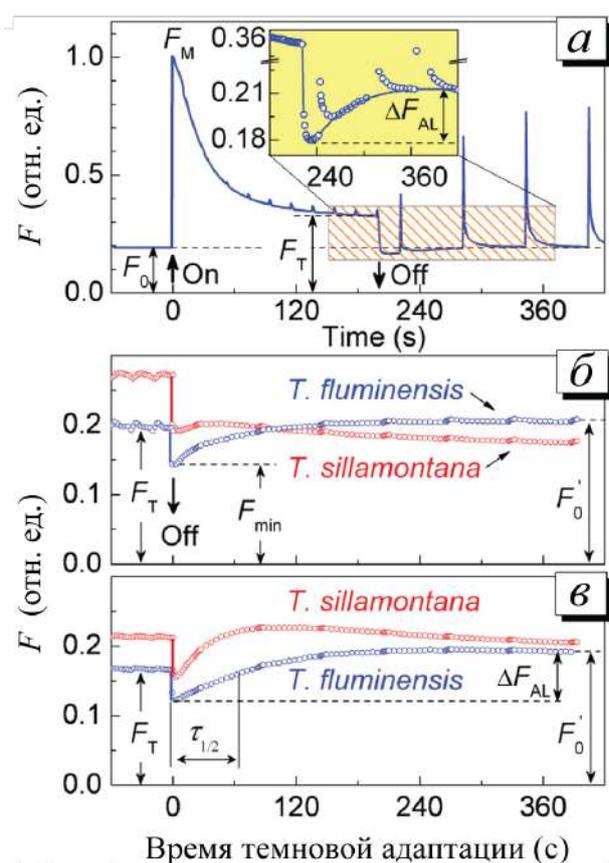


Рис. IV.6. Кинетика фотоиндуцированных изменений квантового выхода флуоресценции хлорофилла в листьях *T. fluminensis* (а, б, в) и *T. sillamontana* (б, в) при умеренной (а), низкой (б) и высокой (в) интенсивности действующего света (100, 30 и 800 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$, соответственно). На (б) и (в) показан только период темновой релаксации. Приведены типичные кривые.

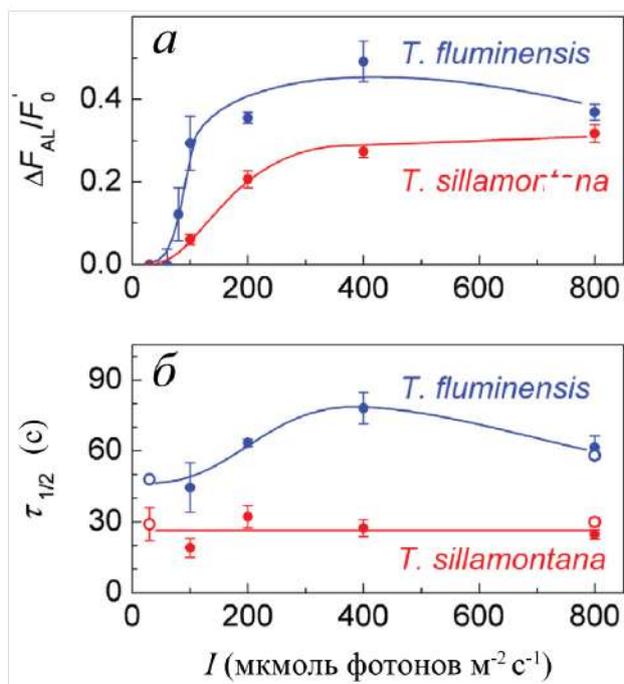


Рис. IV.7. Зависимость параметров $\Delta F_{AL}/F_0'$ (a) и $\tau_{1/2}$ (б), характеризующих темновые изменения квантового выхода флуоресценции хлорофилла в листьях *T. fluminensis* и *T. sillamontana*. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$).

Кинетика изменений q_{NPQ} и Φ_{PSII} при адаптации листа к действующему свету может иметь немонотонный характер, что отражает включение ряда различных механизмов регуляции транспорта электронов и протонов, синтеза АТФ, фиксации углерода и др. Однако, в целом, по мере освещения обычно наблюдается рост обоих показателей, q_{NPQ} и Φ_{PSII} . При этом возрастание Φ_{PSII} определяется как активацией процессов, приводящих к ускорению переноса электронов по фЭТЦ (так называемое фотохимическое тушение), так и активацией теплового рассеяния избыточной энергии света (нефотохимическое тушение). Таким образом, в процессе адаптации к свету происходит скоррелированный рост обоих параметров. В то же время, при изменении интенсивности освещения, наблюдается обратная корреляция между стационарными значениями q_{NPQ} и Φ_{PSII} . (рис. IV.8).

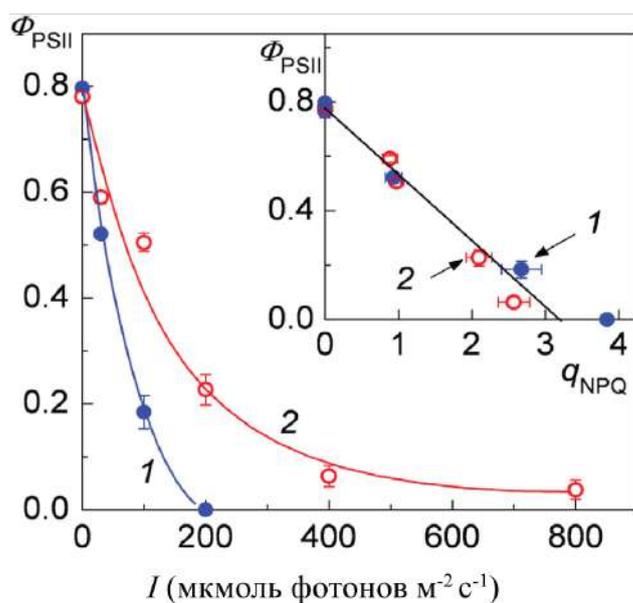


Рис. IV.8. Зависимость стационарных значений (достигаемых после 20-минутного освещения) квантовой эффективности ФСИ, Φ_{PSII} , в листьях *T. fluminensis* (1) и *T. sillamontana* (2) от интенсивности света. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 8-12$).

Рассматривая активацию защитных процессов, необходимо помнить, что защита ФСА от повреждения избыточным светом определяется не только нефотохимическим тушением и процессами, усиливающими его. При отсутствии других (кроме высокой освещённости) факторов, ограничивающих возможности ассимиляции углерода растением, не менее существенную роль в защите ФСА играет активация фотохимических процессов. Эта активация вызвана, прежде всего, светозависимой регуляцией цикла Кальвина, а также ряда других ферментов, ответственных за потребление продуктов световой фазы фотосинтеза (например, АТФ-синтазы). Однако по мере освещения листа в ФСА, наряду с активацией фотохимических процессов, может происходить и замедление реакций переноса электрона. По-видимому, такой вывод можно сделать из наших данных о том, как изменяется время восстановления ($\tau_{1/2}$) первичного донора ФСИ, P_{700}^+ , по мере освещения листа (рис. IV.9, IV.10).

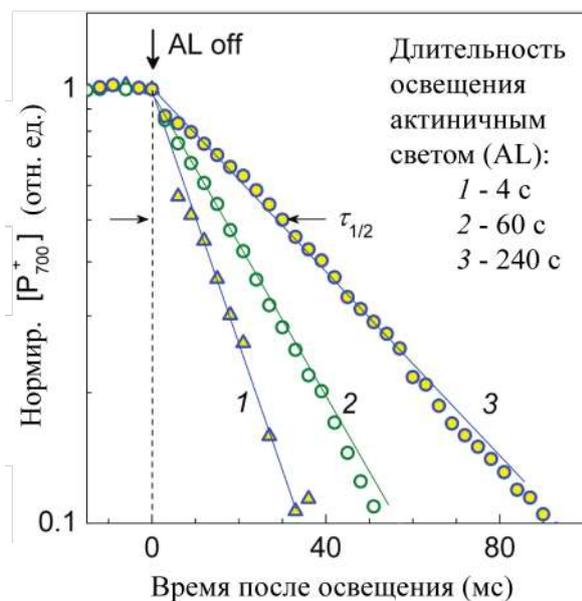


Рис. IV.9. Падение интенсивности сигнала ЭПР P700+ после выключения света. Приведены типичные кинетические кривые в полулогарифмической шкале для разной продолжительности предшествующего освещения.

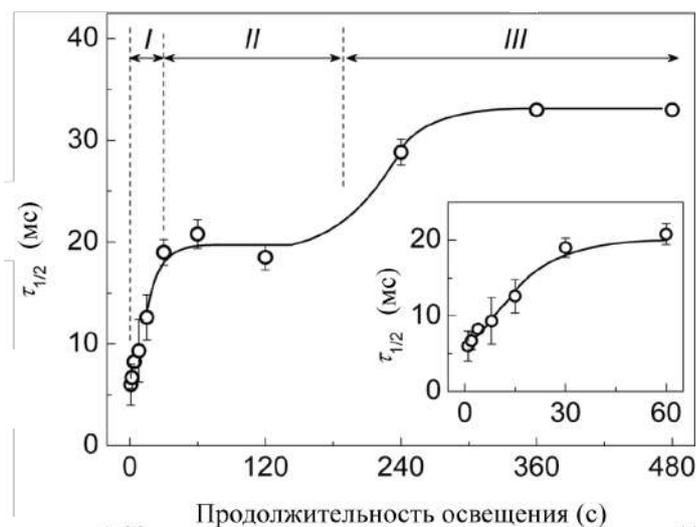


Рис. IV.10. Зависимость времени $\tau_{1/2}$ полуспада интенсивности сигнала ЭПР P700+ после выключения света от продолжительности предшествующего освещения. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4-8$).

В листьях *T. fluminensis*, адаптированных к темноте, восстановление P_{700}^+ после короткого (несколько секунд) освещения происходит достаточно быстро, за времена около 5 мс, что обусловлено наличием восстановленных интермедиатов в ЭТЦ между ФСII и ФСI, а также отсутствием кинетических барьеров на пути электрона между ними и P_{700}^+ . По мере освещения листа генерируется трансмембранный внутритилакоидный потенциал, о чём можно судить по росту параметра $\Delta F_{AL}/F_0$ кинетики флуоресценции хлорофилла в пост-иллюминационный период (рис. IV.11; использование этого параметра как индикатора трансмембранной ΔpH было обосновано выше, см. рис. IV.6). Образование трансмембранной ΔpH и, следовательно, закисление внутритилакоидного пространства приводит к замедлению окисления пластохинонов в b6f-комплексе и переноса

электронов к ФСІ в целом. Однако при более длительном освещении (более 2 мин.) мы наблюдали дополнительный рост $\tau_{1/2}$, т.е. замедление темнового восстановления P_{700}^+ (рис. IV.11), в то время как величина ΔpH достигала стационарного значения в течение приблизительно 1 мин. и дальнейшего её роста мы не наблюдали. (Рост $\tau_{1/2}$ на фоне постоянства ΔpH хорошо виден на рис. IV.12). Мы предполагаем, что это может быть связано с перевосстановлением пула эндогенных восстановителей стромы — доноров электрона для b_6f -комплекса, которое приводит к возникновению потока электронов к гемам c_1 и b_6^H и, в итоге, к блокированию Q-цикла (рис. IV.13).

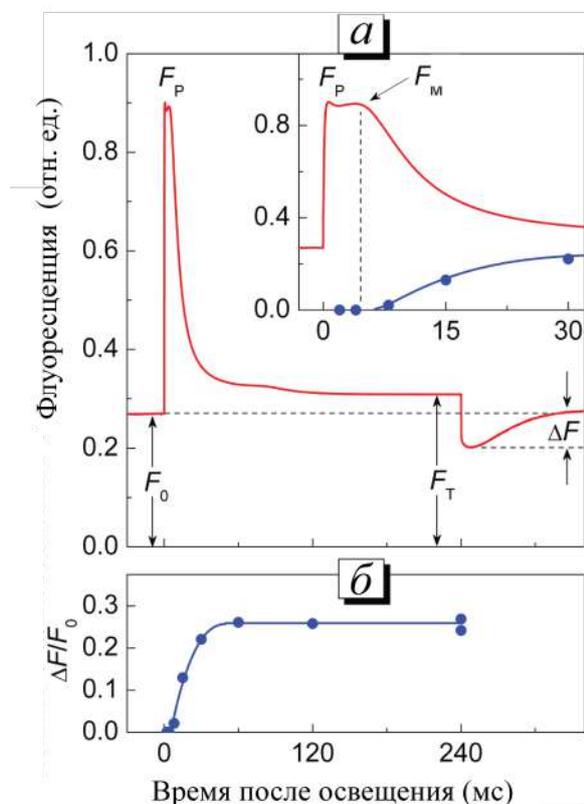


Рис. IV.11. Сопоставление кинетики фотоиндуцированных изменений квантового выхода флуоресценции (а) и зависимости параметра $\Delta F_{AL}/F_0$ от времени освещения (б) (см. определение параметров на рис. IV.6). Начальные участки кривых (в интервале времен от 0 до 30 с) обеих зависимостей показаны на врезке на панели (а).

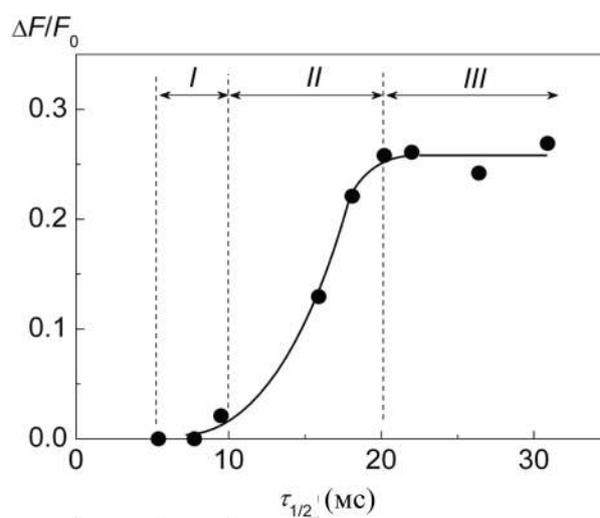


Рис. IV.12. Соотношение между временем $\tau_{1/2}$ полуспада интенсивности сигнала ЭПР P_{700}^+ после выключения света и параметра $\Delta F_{AL}/F_0$ флуоресценции, измеренных на одном и том же образце, при разной продолжительности предшествующего освещения.

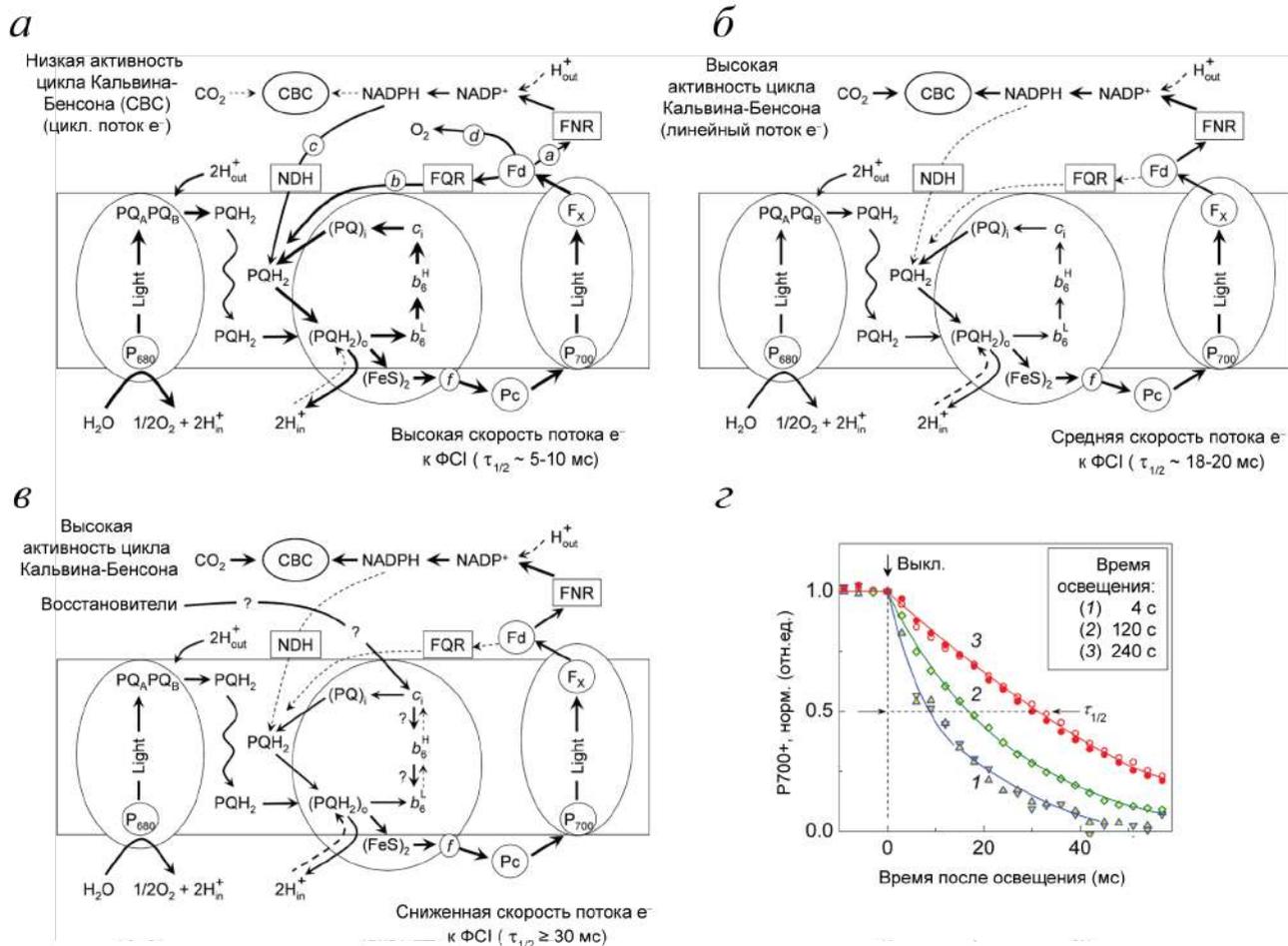


Рис. IV.13. Схема основных путей переноса электрона в фотосинтетической цепи хлоропластов в разных состояниях ФСА: в листьях, адаптированных к темноте (в течение первых 3-5 с после начала освещения (а); в ходе адаптации к освещению (через 2 минуты после начала освещения; панель (б); и в стационарном состоянии (через 4 минуты после начала освещения (в)). Кинетика спада сигнала ЭПР $P700^+$ в листьях *T. fluminensis* (z), соответствующая трём указанным периодам адаптации листа к освещению.

Приведённые на рис. IV.6 кривые кинетики изменений флуоресценции и рассчитанные на их основании параметры основаны на измерениях интегральной интенсивности флуоресценции. Однако следует учитывать, что в спектре флуоресценции ФСА при комнатной температуре, как правило, содержатся две полосы: коротковолновая с максимумом вблизи 685 нм и длинноволновая с максимумом вблизи 740 нм, причём эти полосы имеют различный характер тушения (рис. IV.14).

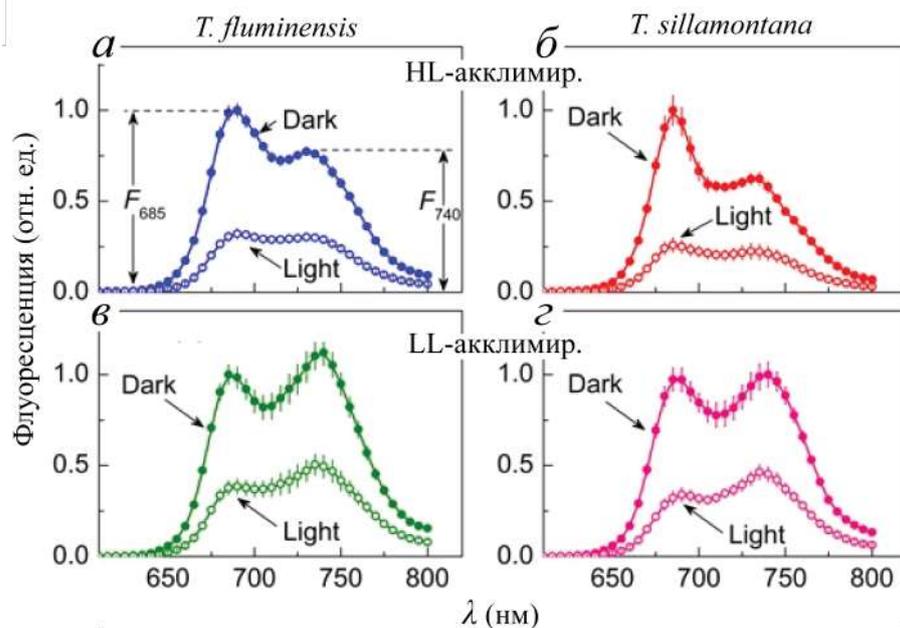


Рис. IV.14. Спектры излучения флуоресценции листьев *T. fluminensis* (а, в) и *T. sillamontana* (б, г), выращенных при интенсивном (HL; панели а, б) или слабом освещении LL (панели в, г). Закрашенные круги — спектры листьев, адаптированных к темноте («Dark») в течение 15 минут (нормированы на 1 по высоте коротковолнового пика); открытые круги — спектры, записанные сразу после освещения (обозначены «Light»; 6 минут, 400 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$; нормированы с использованием тех же коэффициентов, что и соответствующие «Dark» спектры).

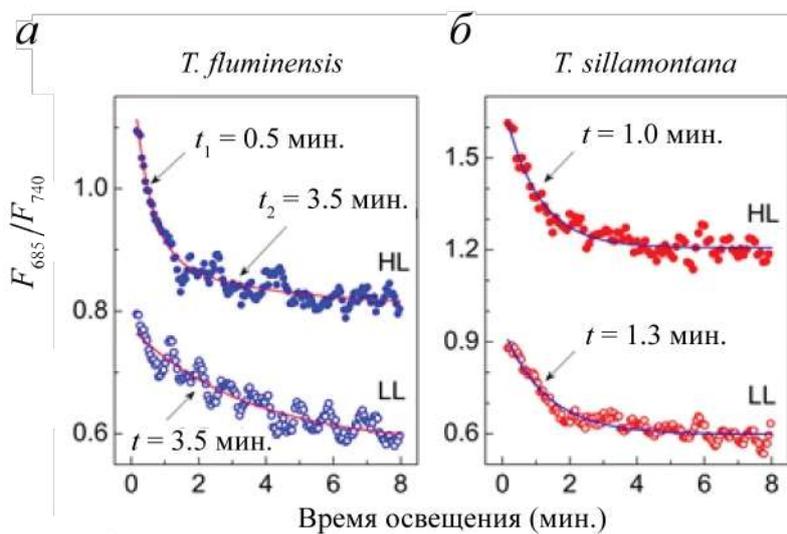


Рис. IV.15. Кинетика изменений соотношения высоты пиков в спектре флуоресценции, F_{685}/F_{740} , в ходе освещения (интенсивность 500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) листьев *T. fluminensis* (а) и *T. sillamontana* (б), предварительно адаптированных к темноте (в течение 15 мин). Приведены типичные кривые для листьев, выращенных при интенсивном (HL) или слабом освещении (LL). Характерные времена для моно- или биэкспоненциального разложения кинетики указаны около соответствующих кривых.

Принято считать, что коротковолновая полоса («красная полоса», или F_{685}) принадлежит Хл *a* кор-комплекса ФСII, в то время как длинноволновая («дальняя красная полоса», или F_{740}) содержит вклады от флуоресценции обеих фотосистем (Govindjee 2004; Lichtenthaler and Babani 2004). По этой причине, тушение, происходящее в ФСII, приводит к более заметному тушению коротковолновой полосы. В итоге, по мере освещения изменяется соотношение пиков (рис. IV.15).

Наряду с активацией теплового рассеяния поглощённой световой энергии, которое является тушением флуоресценции в прямом смысле, к снижению флуоресценции также должны приводить перераспределение антенных комплексов между ФСII и ФСI (так называемое явление *state transition*) и перераспределение хлоропластов в клетках мезофилла, приводящее к снижению поглощения света листом. При этом *state transition* должно также приводить к снижению отношения F_{685}/F_{740} , поскольку ему соответствует перераспределение света между фотосистемами в пользу ФСI. Перераспределение хлоропластов также может изменять F_{685}/F_{740} , поскольку с изменением глубины проникновения света в лист и изменением поглощения света листом может изменяться реабсорбция флуоресценции, затрагивающая преимущественно красную полосу. Однако в данном случае следует ожидать, скорее, увеличения отношения F_{685}/F_{740} . Наши данные позволяют предполагать, что в наших модельных видах изменение отношения F_{685}/F_{740} связано в основном с процессами собственно тушения флуоресценции в ФСII, в то время как перераспределение антенн между ФСII и ФСI (*state transition*) и хлоропластов (*chloroplast avoidance movement*) практически не видны в его кинетике. Такой вывод вытекает из наших данных по действию разобшителя, который снимал практически все светозависимые изменения спектра флуоресценции (рис. IV.16). Наряду с энергетическим тушением, которое непосредственно зависит от внутриталакоидной трансмембранной ΔpH (или, точнее, от pH_{in}), зеаксантин-зависимое тушение также зависит от

ΔpH через активацию виолаксантин-деэпоксидазы низкими значениями pH внутри тилакоида (pH_{in}). Поэтому оба механизма тушения должны ингибироваться добавлением разобщителя в лист, что мы и наблюдаем. В то же время, перераспределение хлоропластов в клетке определяется рецепторами синего света фототропинами и не связано с генерацией ΔpH . Перераспределение антенных комплексов активируется высоким уровнем восстановленности пула PQ (Vetoshkina and Borisova-Mubarakshina 2023); его окисление может быть лимитировано транспортом протонов, и, следовательно, величиной трансмембранной ΔpH , однако оно также лимитировано оттоком электронов из фЭТЦ, т.е. имеет pH -независимую компоненту.

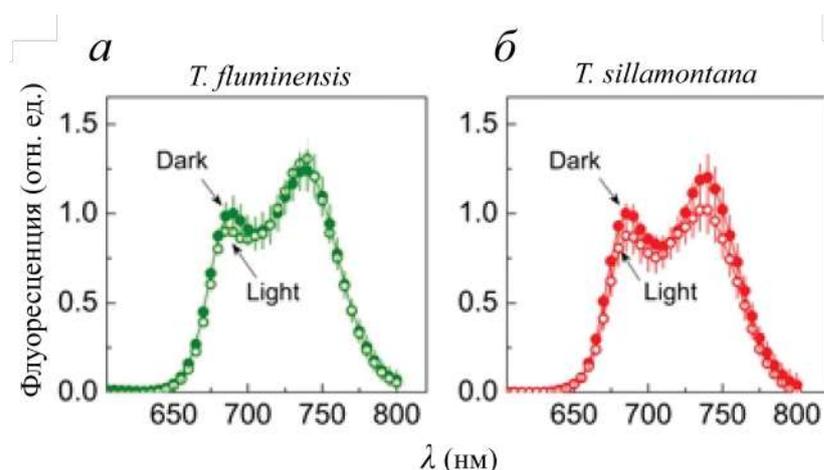


Рис. IV.16. Спектры излучения флуоресценции листьев *T. fluminensis* (а) и *T. sillamontana* (б), выращенных при слабом освещении (LL), в присутствии разобщителя (моненсин, 100 мкМ). Закрашенные круги — спектры листьев, адаптированных к темноте («Dark») в течение 15 минут (нормированы на 1 по высоте коротковолнового пика); открытые круги — спектры, записанные сразу после освещения (обозначены «Light»; 6 минут, 400 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$; нормированы с использованием тех же коэффициентов, что и соответствующие «Dark» спектры).

Как уже было сказано выше, среди основных механизмов защиты ФСА от избыточного освещения — зеаксантин-зависимое тушение и энергетическое тушение (т.е. определяемое образованием внутритилакоидной трансмембранной ΔpH), которое также модулируется накоплением или деградацией зеаксантина. В свою очередь, зеаксантин

образуется за времена порядка минут из предшественников (виола- и антраксантина), менее активных или неактивных в отношении фотопротекторных свойств, но обладающие схожим углеродным каркасом и синтезируемые за более длительные времена. В связи с этим особенное значение для фотопротекторной функции ФСА приобретают динамика и глубина изменений пигментного состава. Мы проанализировали изменения пигментного состава ФСА у двух выбранных нами модельных видов, *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, на двух масштабах времён: минуты-десятки минут и дни-недели. Само по себе сопоставление этих двух видов, характеризующихся противоположными по освещённости естественными местообитаниями, даёт также представление о третьем масштабе времени — эволюционном.

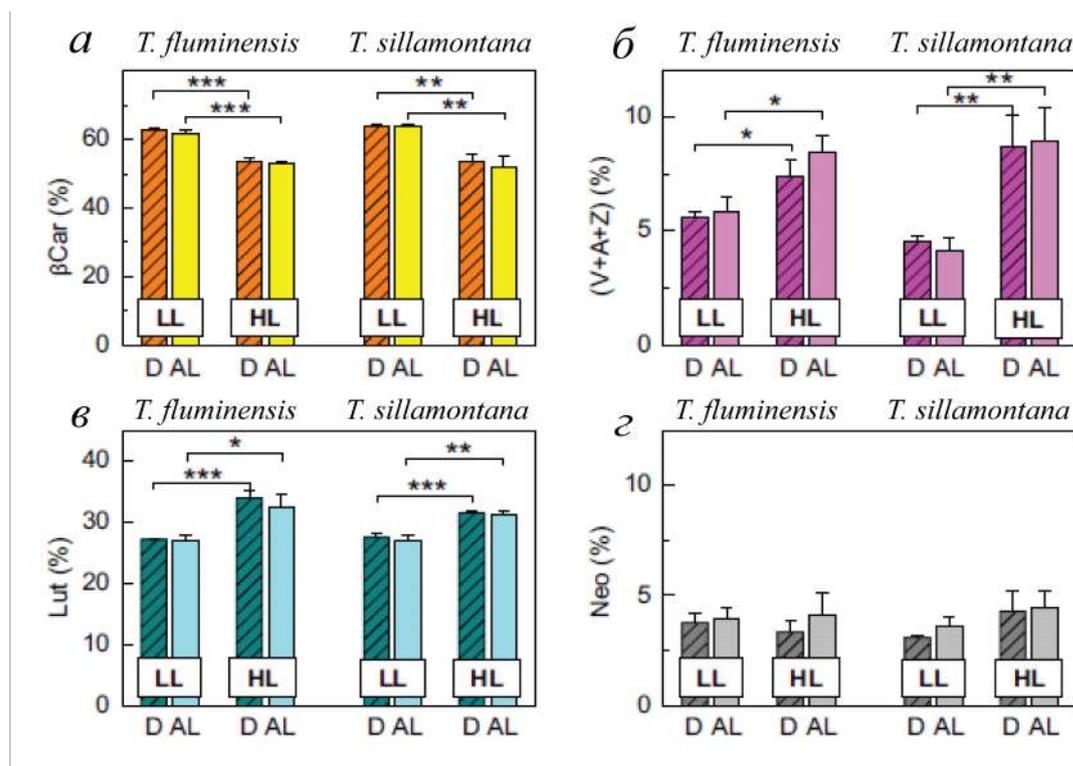


Рис. IV.17. Состав основных каротиноидов в ФСА листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, адаптированных к темноте (D) или к свету (AL; 20 минут, 800 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹). Приведено сравнение листьев, выращенных при интенсивном (HL) и слабом освещении (LL). V — виолаксантин, А — антраксантин, Z — зеаксантин, β Car — β -каротин, Lut — лютеин, Neo — неоксантин. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего (n = 3). Квадратными скобками показаны пары сравниваемых значений, звёздочки указывают уровень значимости отличий (P) согласно t-критерию Стьюдента (*P < 0.10; **P < 0.05; ***P < 0.01).

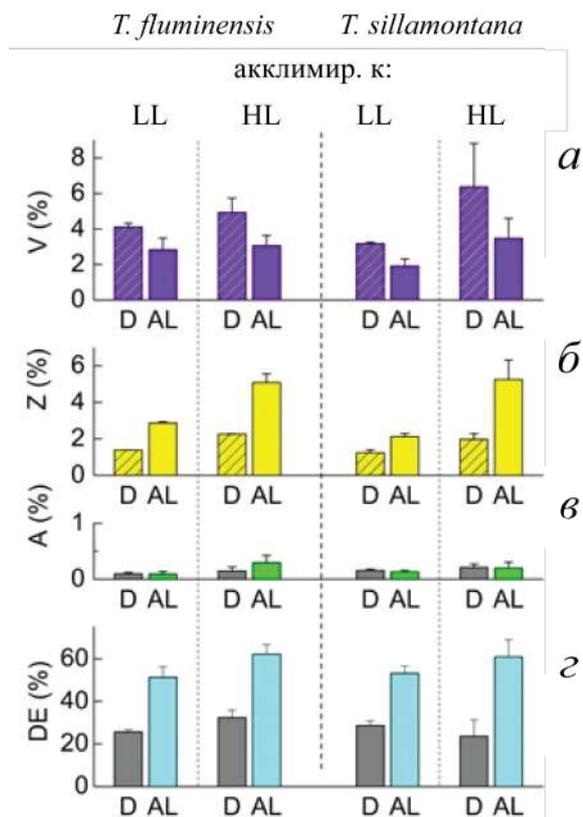


Рис. IV.18. Изменения содержания пигментов виолаксантинового (ксантофиллового) цикла под действием освещения (AL; 20 минут, 800 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) в листьях *T. sillamontana* и *T. fluminensis*, выращенных при интенсивном (HL) и слабом освещении (LL). Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 3) для виолаксантина (а), зеаксантина (б), антраксантина (в) и коэффициента депозоксидации (г).

Полученные нами данные (рис. IV.17, IV.18) показывают, что пигментный состав очень близок у обоих видов традесканций, не проявляя сколь-либо заметных различий, характерных для тене- и светолюбивых растений. При адаптации растений к интенсивному освещению в течение недель наблюдается очень незначительный рост относительного содержания лютеина и более заметный (до 1,5-2 раз) рост суммарного содержания ксантофиллов, служащих пулом предшественников для быстрой конверсии в фотопротекторный пигмент зеаксантин. Таким образом, «медленная» (онтогенетическая) компонента адаптации к интенсивности освещения у обоих видов выражена слабо. В то же время, «быстрая» компонента (в минутной шкале) демонстрирует заметный рост содержания зеаксантина за счёт виолаксантина, что в наиболее удобном виде выражается индексом депозоксидации:

$$DE = (Z + 0.5 A) / (Z + A + V), \quad (IV.2)$$

(где V, A и Z — содержание виола- антра- и зеаксантина, соответственно). В нашем случае изменение DE происходило от ~20%

после относительно кратковременной (1 ч) адаптации к темноте до 50-60% после 20-минутного освещения. Характерно, что заметных различий в реакции на кратковременное освещение как между растениями, выращенными при разной освещённости, так и между двумя видами практически не было выявлено. Иными словами, для обоих видов характерна определённая непластичность пигментного состава ФСА.

IV.3. Светозависимое перераспределение хлоропластов в клетках мезофилла

Отсутствие пластичности пигментного состава у изученных видов контрастирует с их способностью расти в очень широком диапазоне условий освещения и даёт основание думать, что необходимая пластичность обеспечивается другими механизмами. В связи с этим мы исследовали эффективность и пластичность ещё одного фотопротекторного механизма, активируемого в близком к зеаксантин-зависимому тушению диапазоне времён, а именно, светозависимого перераспределения хлоропластов в клетках мезофилла. В отличие от среды с однородным распределением пигмента, компартиментализация главного пигмента листа, хлорофилла, приводит к существенной зависимости общего поглощения света листом в зависимости от распределения хлорофилл-содержащих органелл, хлоропластов, в клетке. Обладая индивидуальной подвижностью и чувствительностью к свету за счёт системы рецепторов синего света, фототропинов, и характеризуясь положительным фототаксисом по отношению к слабому свету и отрицательным — к сильному, хлоропласты обеспечивают согласованный коллективный ответ клетки на изменения освещённости. При слабом освещении они распределяются вдоль верхней стороны клетки, параллельной поверхности листа (так называемое периклинальное расположение), а при высокой интенсивности занимают положение вдоль вертикальных (перпендикулярных поверхности листа)

стенок (антиклинальное расположение). При этом существенно изменяется оптическая прозрачность листа (рис. IV.19, IV.20).

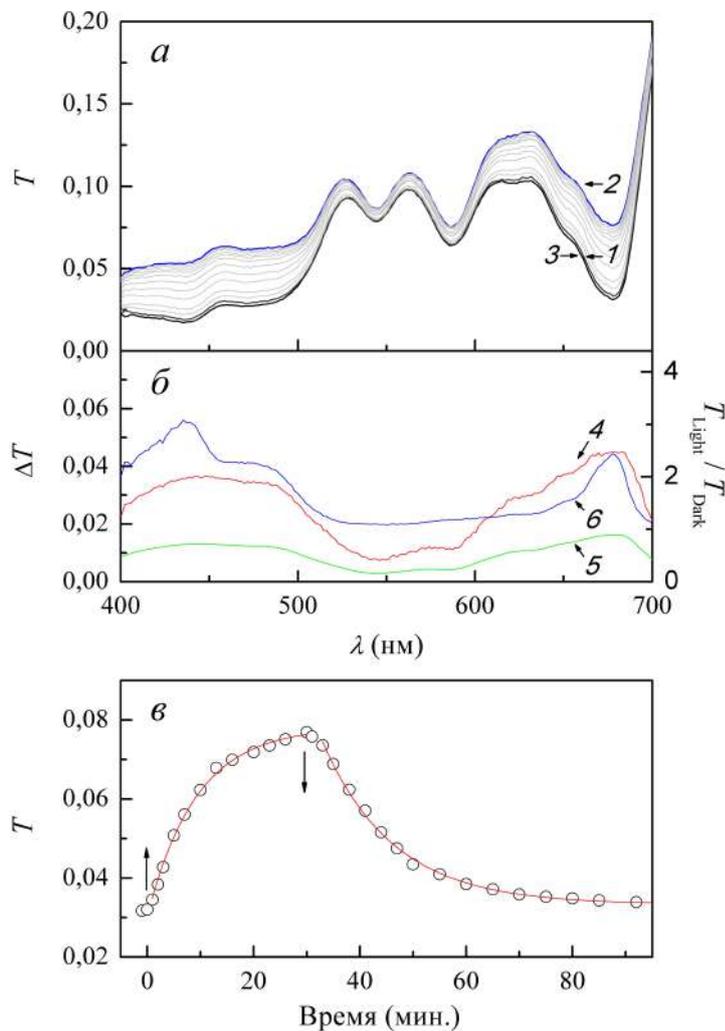


Рис. IV.19. *a* — типичные спектры оптического пропускания (T) листа традесканции: до освещения (1), после 30-минутного освещения (2) и после последующей 60-минутной адаптации в темноте (3). *б* — спектральные характеристики изменения пропускания листа: разностный спектр «свет минус темнота» ($\Delta T = T_{\text{Light}} - T_{\text{Dark}}$) (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). *б'* — кинетика изменений пропускания при 680 нм, T_{680} , в ходе освещения и последующей темновой адаптации. Вертикальные стрелки соответствуют началу и концу освещения.

Для обоих изученных видов традесканции мы показали наличие очень значительных светозависимых изменений оптического поглощения листа, существенно превосходящих по величине соответствующие изменения, характерные для всех изученных к настоящему времени растений. Так, для большинства растений изменения оптического пропускания листа в максимуме поглощения хлорофилла, $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$, составляют 10-15%. Рекордсменом по этому параметру является «главный» модельный объект в мире растений, *A. thaliana*, для которой изменения $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$ составляют около 40%. В то же время, у *T. sillamontana* мы наблюдали 2-кратные изменения оптической прозрачности, $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$, а у *T. fluminensis* — до 4-кратных.

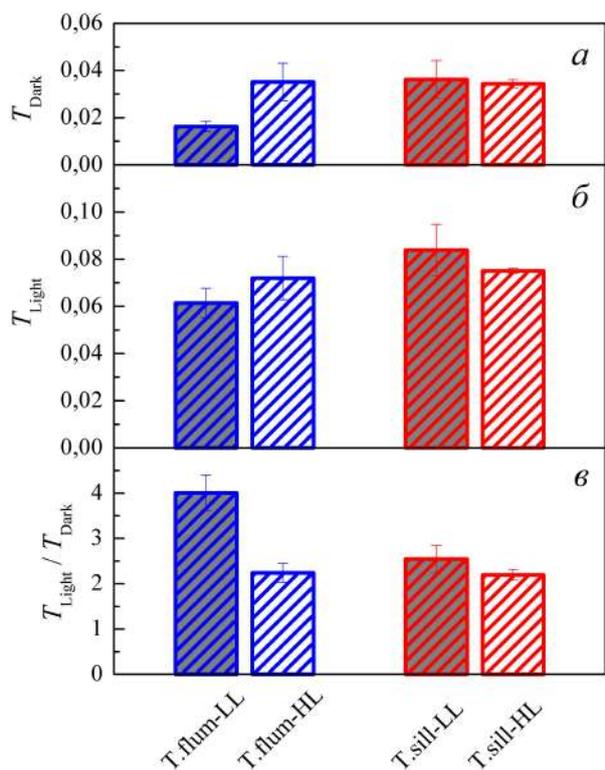


Рис. IV.20. Стационарные значения оптического пропускания листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana* в темноте (T_{Dark} , панель *a*) и при освещении (150 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$, T_{Light} , панель *б*), а также их отношения (T_{Light}/T_{Dark} , панель *в*). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3-7$).

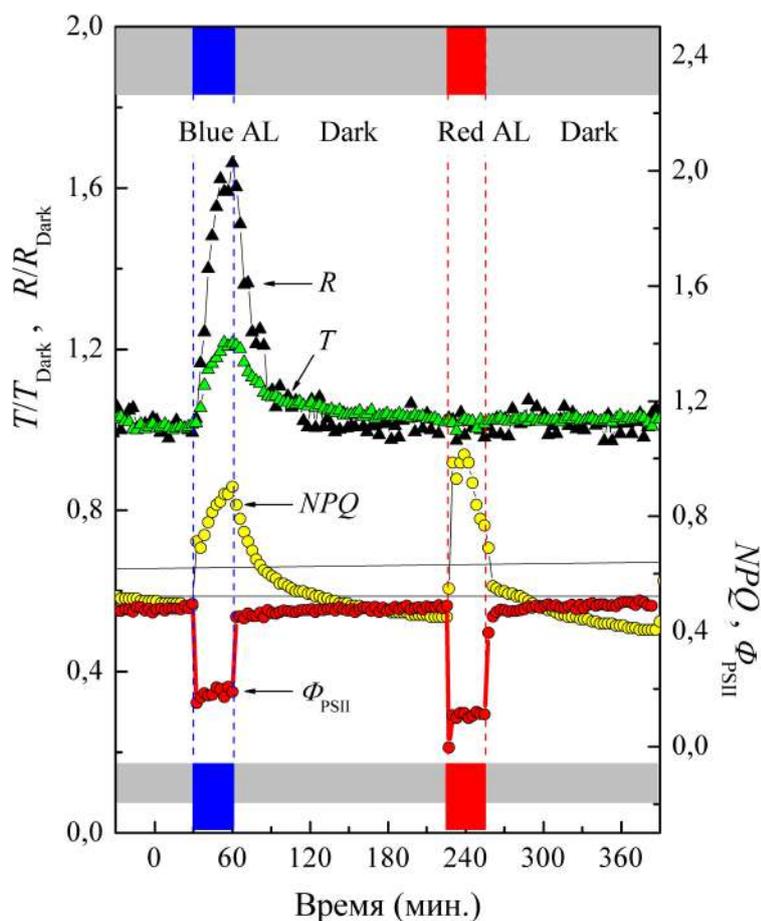


Рис. IV.21. Светозависимые изменения отражения (R) и пропускания (T) света листом *T. fluminensis*, записанные одновременно с регистрацией квантовой эффективности ФСII (Φ_{PSII}) и индукции нефотохимического тушения (NPQ). Периоды освещения синим (Blue AL) или красным действующим светом (Red AL; интенсивность — 155 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$) обозначены синим и красным прямоугольниками вдоль горизонтальных осей.

Столь значительные изменения позволяют думать, что именно этот фотопротекторный механизм обеспечивает необходимую пластичность для данных видов и, как следствие, высокую адаптивность к условиям роста. В

пользу этой гипотезы служат также наши данные о спектральной зависимости повреждающего эффекта интенсивного освещения у *T. fluminensis*. Так, при облучении интенсивным красным светом, не возбуждающим фототропин-зависимого внутриклеточного перемещения хлоропластов, листья *T. fluminensis* проявляли гораздо более заметное фотоингибирование, чем при освещении синим светом той же интенсивности (рис. IV.21).

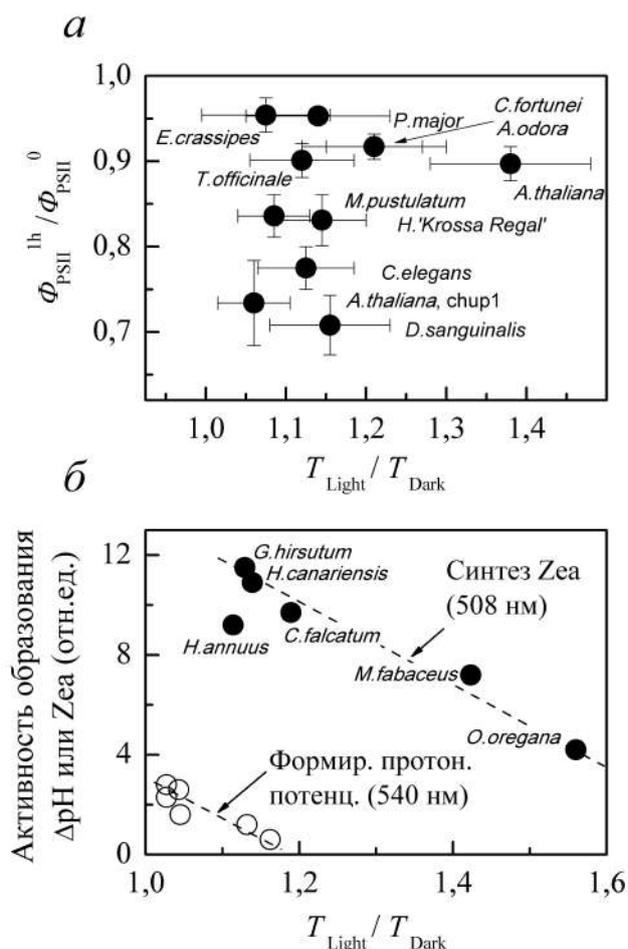


Рис. IV.22. Соотношение между фотоиндуцированными изменениями коэффициента пропускания листьев (T_{Light}/T_{Dark}), вызванными перераспределением хлоропластов в клетке, и восстановлением активности ФСII через 1 час после освещения ($\Phi_{PSII}^{1h}/\Phi_{PSII}^0$) у 10 видов растений (а), а также между T_{Light}/T_{Dark} и активностью образования зеаксантина (*Zea*) в ходе виолакантинового цикла или генерацией светозависимого протонного потенциала в хлоропластах 6 видов растений (б) (последние две активности оценены по спектральным изменениям листьев в области 508 и 540 нм, соответственно). Интенсивность освещения составляла 1000 или 940 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$ (для (а) и (б), соответственно). Графики построены по данным, приведённым в работах (Königer and Bollinger 2012) (а) и (Brugnoli and Björkman 1992) (б).

Заметим, что высказанное выше предположение об определяющей роли фототропин-зависимого внутриклеточного перераспределения хлоропластов в общей фотопротекторной функции ФСА находится в некотором противоречии с аналогичными данными по другим высшим растениям, известным из литературы. Так, судя по данным, приведённым в работе (Königer and Bollinger 2012), не наблюдается какой-либо корреляции между величиной T_{Light}/T_{Dark} , характерной для вида, и восстановлением активности ФСII после интенсивного освещения (рис. IV.22). Это позволяет

думать, что светозависимое перераспределение хлоропластов, являясь универсальным механизмом в растительном мире, в то же время не является универсальным с точки зрения его относительной фотопротекторной роли. Растения рода *Tradescantia* могут служить модельным объектом растений, в которых данный механизм играет определяющую роль.

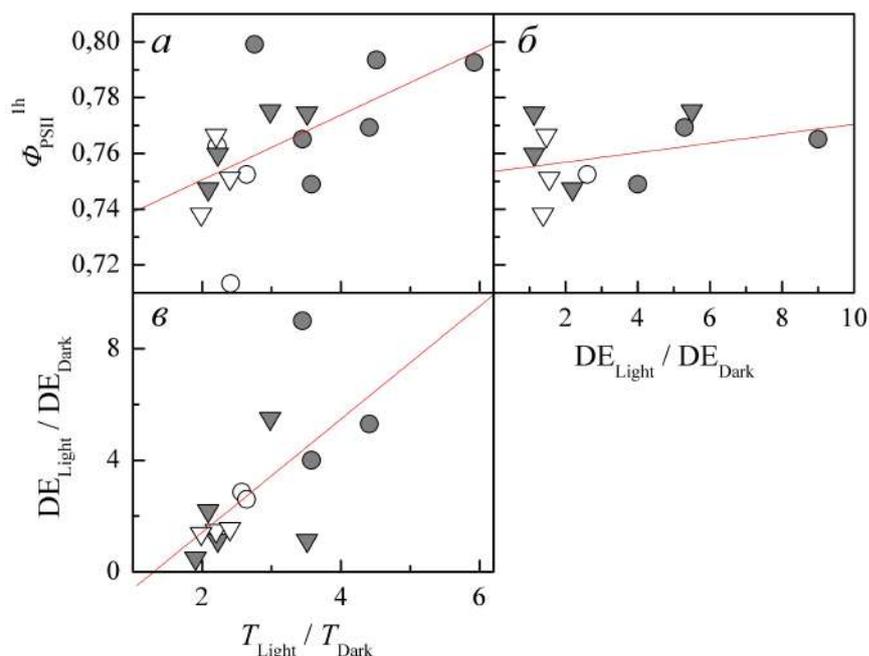


Рис. IV.23. Соотношение между фотоиндуцированными изменениями коэффициента пропускания листьев ($T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$), вызванными перераспределением хлоропластов в клетке, и активностью ФСII через 1 час после освещения ($\Phi_{\text{PSII}}^{1\text{h}}$) у *T. fluminensis* (круги) и *T. sillamontana* (треугольники) (а), а также между изменениями коэффициента дезоксидации ($DE_{\text{Light}}/DE_{\text{Dark}}$) и $\Phi_{\text{PSII}}^{1\text{h}}$ (б). Интенсивность освещения в ходе измерений составляла $150 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Показана корреляция между изменениями оптического пропускания листьев ($T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$) и коэффициента дезоксидации ($DE_{\text{Light}}/DE_{\text{Dark}}$) (в). Приведены данные для растений, выращенных при слабом (LL, серые символы) или интенсивном освещении (HL, белые символы).

Заметим также, что в нашем случае, на массиве листьев растений двух данных видов, мы наблюдали положительную корреляцию между способностью конкретного листа к светозависимому изменению прозрачности (характеризуемому значением $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$) и восстановлением активности ФСII после освещения (рис. IV.23). Аналогичная корреляция наблюдается также и для способности листа к «оперативному» светозависимому изменению коэффициента дезоксидации пула ксантофиллов при освещении. В то же время, мы наблюдали

положительную корреляцию между эффективностью светозависимых изменений прозрачности ($T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$) и коэффициента дезоксидации ($DE_{\text{Light}}/DE_{\text{Dark}}$) (рис. IV.23), в отличие от отрицательной корреляции в случае, описанном в работе (Brugnoli and Björkman 1992) (рис. IV.22 б). Можно предположить, что это различие связано с различной степенью взаимной эволюционной отдалённости видов, сравниваемых в работе (Brugnoli and Björkman 1992), и двух видов традесканции, рассматриваемых нами. Так, в то время как соотношение между эффективностью двух механизмов защиты, полученное в работе (Brugnoli and Björkman 1992), следует рассматривать как эволюционную адаптацию, в нашем случае это соотношение выражает, скорее, согласованную физиологическую регуляцию разных механизмов у одинаковых или близкородственных растений.

IV.4. Анатомическая структура листа как фактор, определяющий эффективность механизмов защиты ФСА

Исключительно высокие значения $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$ у традесканций среди всего изученного к настоящему времени растительного мира ставят вопрос об анатомических/цитологических предпосылках для этой функциональной особенности традесканций. Очевидно, что возможности эффективного изменения поглощения света листом за счёт перераспределения хлоропластов связаны как с анатомией листа, определяющей распространение света в листе (включая светорассеяние, увеличение эффективного оптического пути света и т.п.), так и с пространственными ограничениями, накладываемыми строением клетки. В самом деле, ранее было показано, что более высокие значения $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$ наблюдаются у растений с крупными (30-50 мкм) клетками мезофилла (Davis et al. 2011) (рис. IV.24), а также при более мелких хлоропластах (Jeong et al. 2002; Königer et al. 2008) (рис. IV.25).

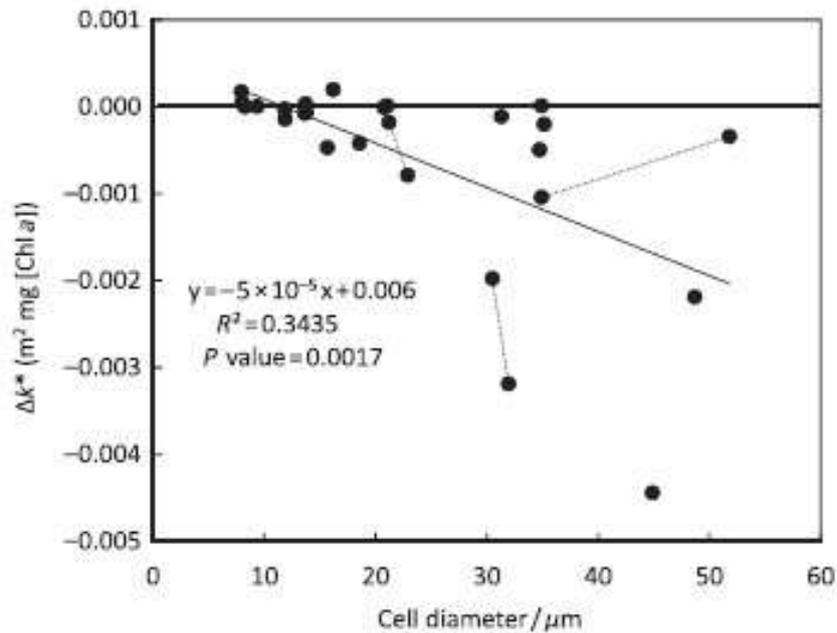


Рис. IV.24. Соотношение между размером клетки и фотоиндуцированным изменением эффективного коэффициента поглощения листа у разных видов растений. Рисунок из работы (Davis et al. 2011).

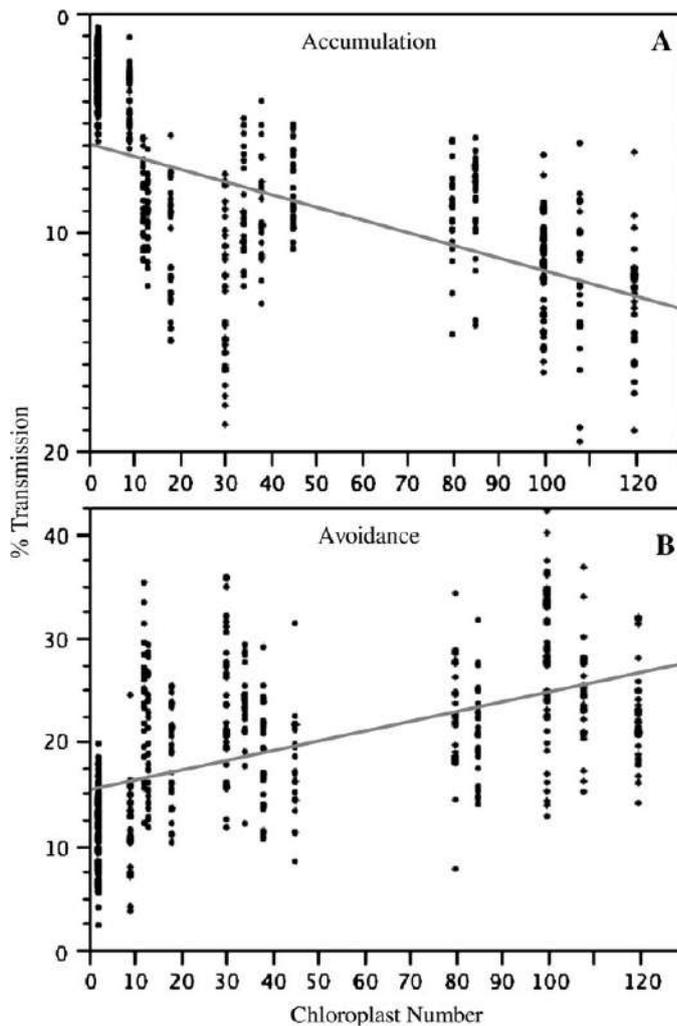
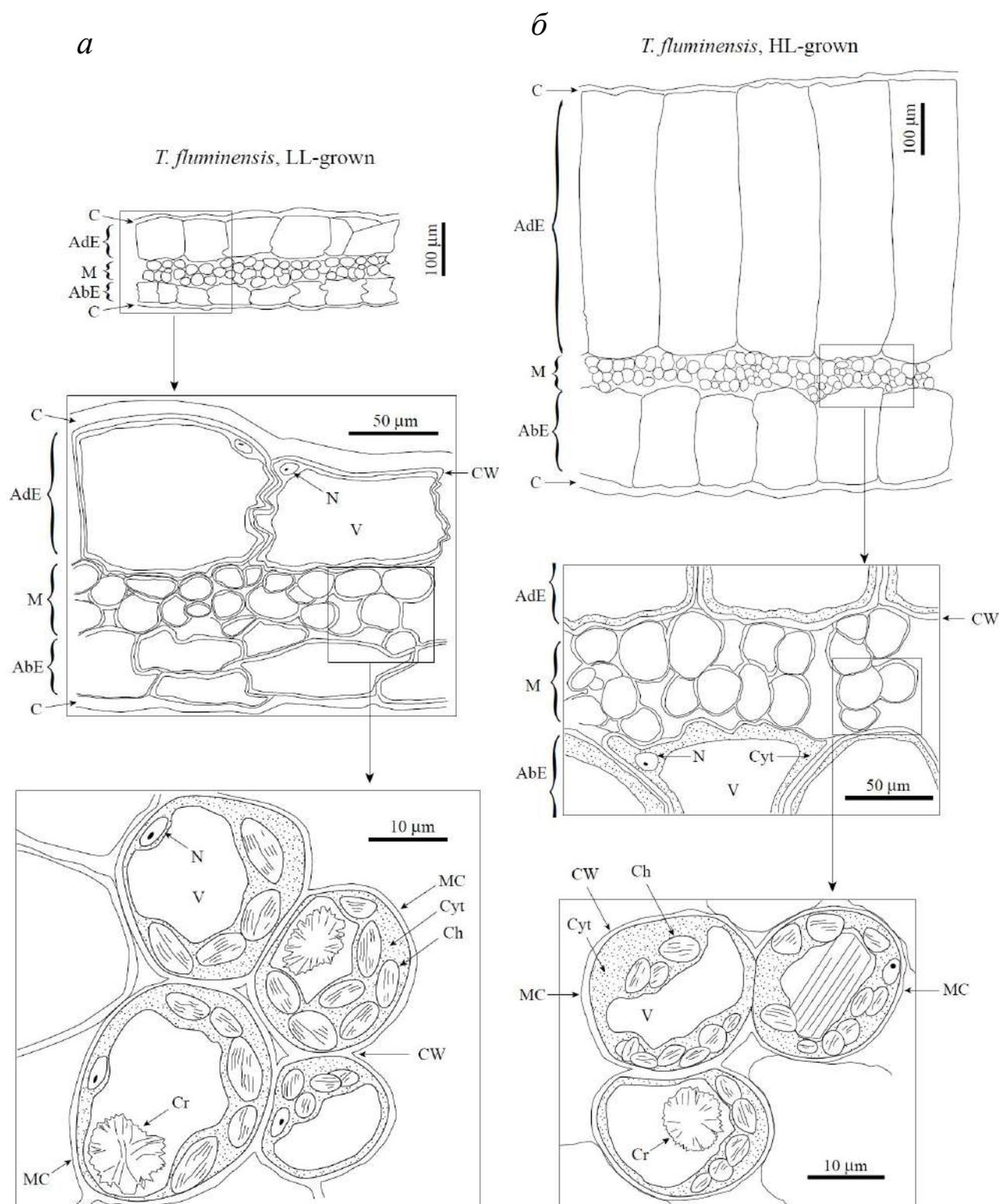


Рис. IV.25. Соотношение между числом хлоропластов в клетке и фотоиндуцированным изменением эффективного коэффициента поглощения листа в ответ на слабый свет ($0,1 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, светоулавливающее перераспределение хлоропластов; панель А) или сильный свет ($100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, светоулавливающее перераспределение хлоропластов; панель В) в листьях мутантов *A.thaliana* по делению хлоропластов. Рисунок из работы (Königer et al. 2008).

В то же время, наши исследования анатомии листа традесканций показали, что как *T. fluminensis*, так и *T. sillamontana* обладают относительно мелкими клетками (17–25 мкм, в зависимости от вида и условий освещения; рис. IV.26, IV.27).



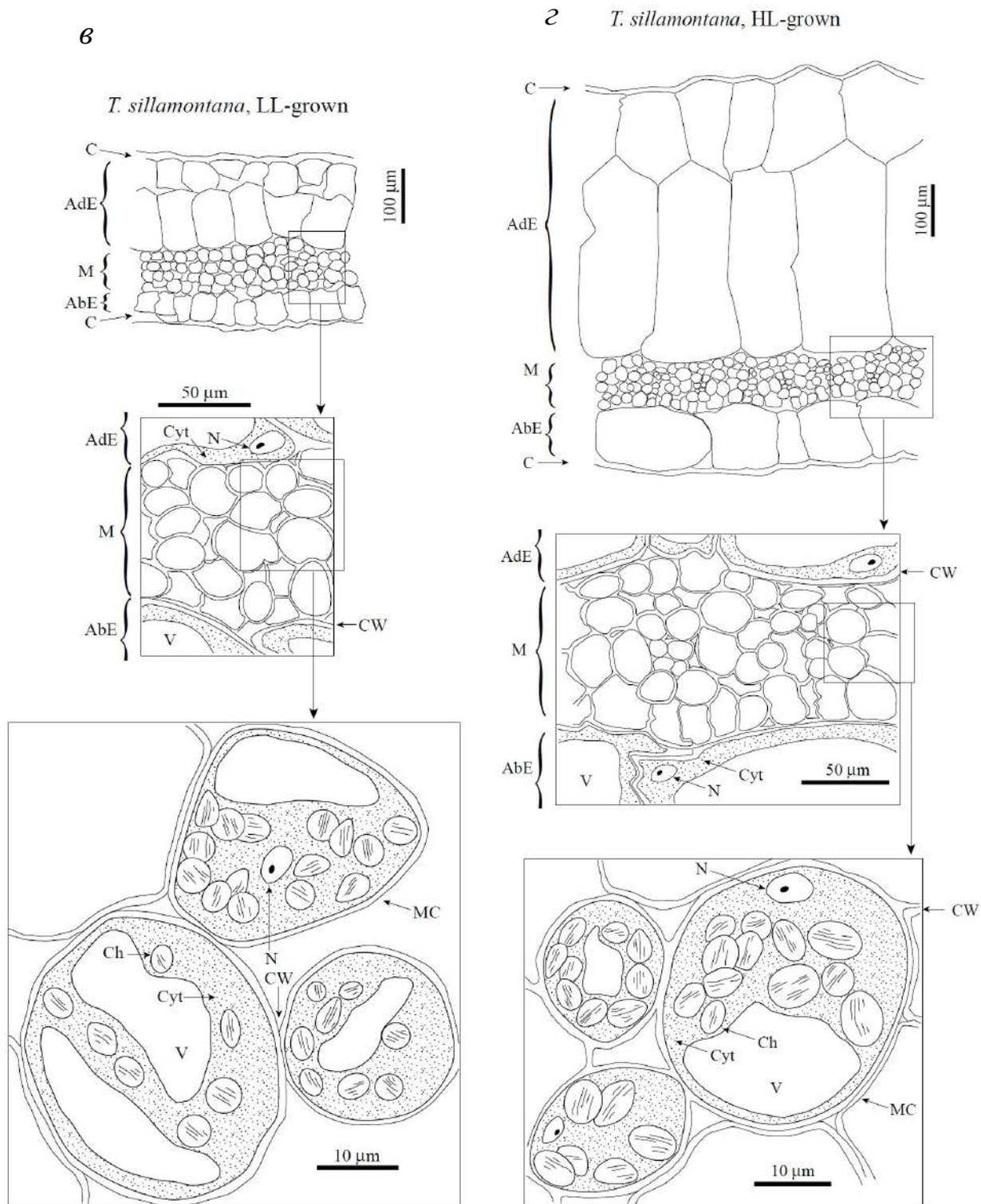


Рис. IV.26. Анатомическое строение листьев *T. fluminensis* (а, б) и *T. sillamontana* (в, г), выращенных при слабом (LL, 60 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹) (а, в) или интенсивном (HL, 800 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹) освещении (HL) (б, г). С — кутикула, AdE — адаксиальная эпидерма, AbE — абаксиальная эпидерма, М — мезофилл, MC — клетка мезофилла, CW — клеточная стенка, N — ядро, V — вакуоль, Ch — хлоропласт, Cyt — цитоплазма, Cr — кристаллы оксалата кальция.

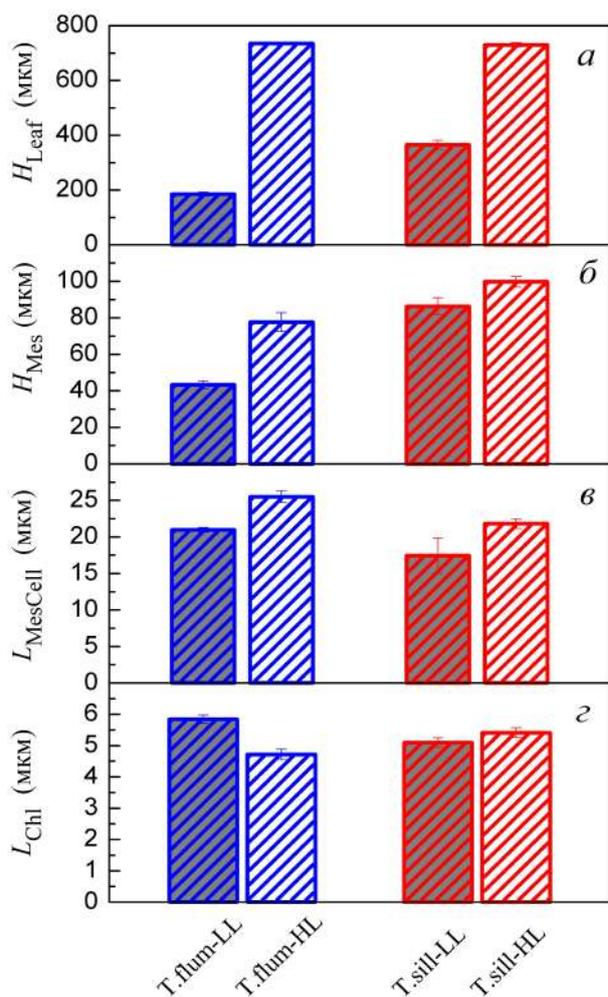


Рис. IV.27. Анатомические характеристики листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, выращенных при слабом (LL) или интенсивном освещении (HL): толщина листа, H_{Leaf} (а), толщина мезофилла, H_{Mes} (б), размер клетки мезофилла, L_{MesCell} (в) и длина хлоропласта, L_{ChI} (г). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 10-110$).

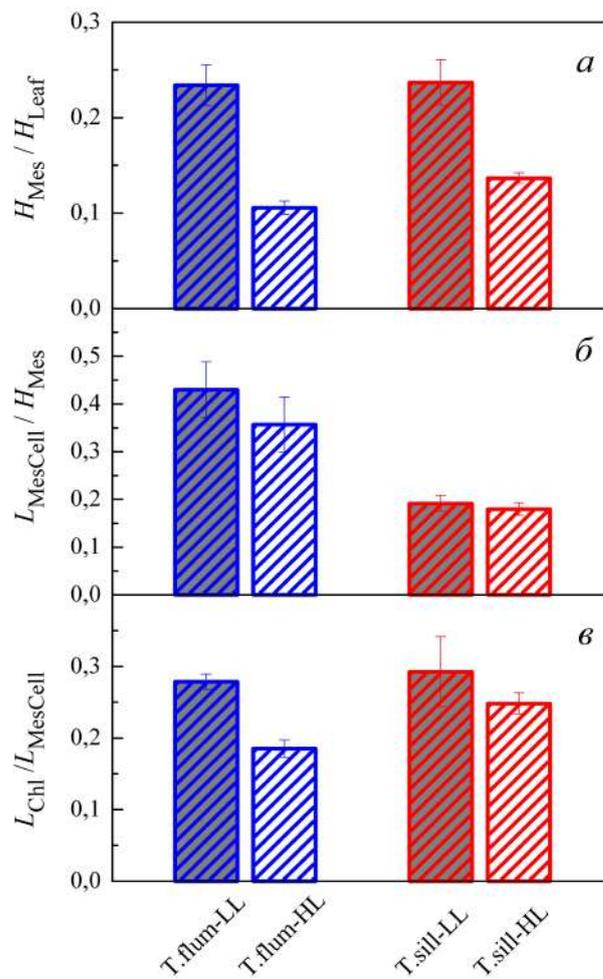


Рис. IV.28. Соотношение анатомических характеристик листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, выращенных при слабом (LL) или интенсивном освещении (HL): отношение толщины мезофилла к общей толщине листа $H_{\text{Mes}}/H_{\text{Leaf}}$ (а); отношение размера клетки мезофилла к толщине мезофилла $L_{\text{MesCell}}/H_{\text{Mes}}$ (б); отношение длины хлоропласта к размеру клетки мезофилла $L_{\text{ChI}}/L_{\text{MesCell}}$ (в). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 10-110$).

Размер хлоропласта по отношению к клетке мезофилла также достаточно велик (0.2–0.3; рис. IV.28) и, что ещё более удивительно, увеличивается при росте на слабом свете. Обратим внимание, что рост на слабом свете вызывает у традесканции *T. fluminensis* существенное увеличение $T_{\text{Light}}/T_{\text{Dark}}$ (рис. IV.20). Эти данные показывают, что, наряду с «лежащими на

поверхности» геометрическими характеристиками клеток мезофилла, эффективность перераспределения хлоропластов в клетке определяется другими, ещё не идентифицированными параметрами. По нашему предположению, роль таких параметров может играть относительный объём центральной вакуоли в клетке (и, следовательно, остающийся доступным хлоропластам объём цитоплазмы).

Вопрос об относительной роли разных защитных механизмов связан не только с величиной обусловливаемого ими снижения светового давления на фотосинтетическую антенну, но также и со скоростью их индукции в листе при облучении интенсивным светом. Так, степень восстановления активности ФСII после освещения интенсивным светом, определённая на выборке из листьев одного вида (*T. fluminensis*), имеет обратную корреляцию с характерным временем генерации нефотохимического тушения флуоресценции, τ_{DL}^{NPQ} (рис. IV.29).

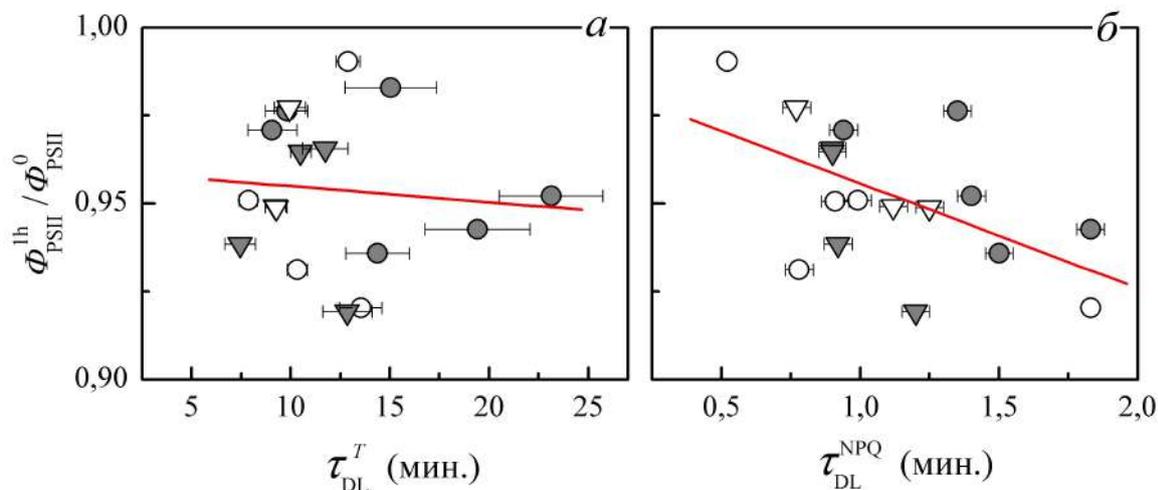


Рис. IV.29. Соотношение между временем изменения оптического пропускания листа, τ_{DL}^T (а) или индукции нефотохимического тушения, τ_{DL}^{NPQ} (б) при включении света и степенью восстановления активности ФСII ($R = \Phi_{PSII}^{1h} / \Phi_{PSII}^0$) после его выключения (через 1 час адаптации к темноте) в популяции листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana*. Прямая линия – график линейной регрессии $R = A + B \tau_{DL}^{T, NPQ}$ ($A = 0,960 \pm 0,017$; $B = -0,00046 \pm 0,00133 \text{ мин}^{-1}$ для связи между R и τ_{DL}^T и $A = 0,985 \pm 0,014$; $B = -0,030 \pm 0,012 \text{ мин}^{-1}$ для связи между R и τ_{DL}^{NPQ}).

Таким образом, быстрое срабатывание светорассеивающего механизма обеспечивает большую надёжность в защите ФСА при включении интенсивного освещения. Однако данное время, τ_{DL}^{NPQ} , характеризует, прежде всего, быструю компоненту индукции фотозащитных механизмов (то есть, главным образом, скорость индукции энергетического тушения). При этом характерное время изменения оптического поглощения листа, τ_{DL}^T , вызванное перераспределением хлоропластов, которое также варьирует в выборке листьев, не проявляет корреляции с темновым восстановлением активности ФСII (рис. IV.29,a). Отметим, что речь идёт о скорости индукции, а не самом механизме или его интенсивности. Как мы отмечали раньше, полное «отключение» светозависимого перераспределения хлоропластов (например, при освещении светом, не имеющим синей спектральной компоненты) приводит к заметному снижению активности ФСII, а интенсивность этого механизма (характеризуемая величиной T_{Light}/T_{Dark}) коррелирует с активностью ФСII после освещения.

Отдельную задачу представляет собой определение характерных времён индукции и релаксации разных фотопротекторных механизмов. Выше мы уже описывали способы определения времени релаксации энергетического тушения (рис. IV.3, IV.6, IV.7, табл. IV.1), которые могут быть основаны как на скорости рН-зависимой релаксации флуоресценции открытых реакционных центров F_o , так и на основе релаксации нефотохимического тушения q_{NPQ} . Светозависимое перераспределение хлоропластов в клетке также может быть зарегистрировано непосредственно по изменениям оптических свойств листа. В то же время, непосредственное измерение кинетики изменений пигментного состава листа затруднительно, поскольку требует разрушения листа для анализа пигментов. В связи с этим мы предложили простую математическую модель, позволяющую оценить характерное время этого процесса, и основанную на анализе кинетики

темновой релаксации НФТ. Как было показано выше, она содержит, как минимум, несколько компонент экспоненциального спада, поэтому мы аппроксимировали её функцией вида:

$$q_{\text{NPQ}} = A_f \times \exp(-(t - t_0)/\tau_f) + A_m \times \exp(-(t - t_0)/\tau_m) + A_s, \quad (\text{IV.3})$$

где t_0 — момент выключения света, а индексы f , m и s соответствуют быстрой (fast), средней (medium) и медленной (slow) компонентам спада, соответственно.

Кинетика изменения оптической проницаемости листа в ответ на освещение или затемнение проще и может быть аппроксимирована функцией моноэкспоненциального спада:

$$\Delta T = A \times \exp(-(t - t_0)/\tau) + B, \quad (\text{IV.4})$$

где t_0 — момент включения или выключения света, $\tau = \tau_{\text{DL}}$ для кинетики в ответ на освещение после темновой адаптации и $\tau = \tau_{\text{LD}}$ для кинетики в ответ на затемнение после адаптации к свету.

Кинетика темновой релаксации НФТ была сопоставлена с выводами простой математической модели, рассматривающей кинетику некоторого процесса $x_0(t)$ как результата одновременного развёртывания двух независимых процессов, $x_1(t)$ и $x_2(t)$, каждый из которых по отдельности изменяет интенсивность $x_0(t)$ по экспоненциальному закону с характерным временем τ_1 или τ_2 :

$$x_1(t) = a_1 + a_2 \times \exp(-t/\tau_1), \quad (\text{IV.5})$$

$$x_2(t) = a_3 + a_4 \times \exp(-t/\tau_2), \quad (\text{IV.6})$$

$$x_0(t) = x_1(t) \times x_2(t). \quad (\text{IV.7})$$

Если $x_0(t)$ аппроксимируют экспоненциальной функцией того же вида,

$$x_0(t) = a_5 + a_6 \times \exp(-t/\tau_0), \quad (\text{IV.8})$$

то можно оценить τ_0 как функцию τ_1 и τ_2 , при каких-либо определённых условиях аппроксимации (например, при постоянном диапазоне t , на котором осуществляется аппроксимация) и при некотором наборе коэффициентов a_i .

Если в качестве двух независимых процессов $x_1(t)$ и $x_2(t)$ в этой модели рассматривать составляющие релаксации НФТ, обусловленные темновыми процессами эпоксидации зеаксантина (q_z) и снижения оптической прозрачности листа (q_{LD}) с характерными временами τ_z и τ_{LD} , соответственно, а в качестве результирующего, «суммарного» процесса — среднюю компоненту релаксации НФТ (q_m) с характерным временем τ_m , то данная модель позволяет описать изменение τ_m при изменениях τ_z и (или) τ_{LD} . Мы рассмотрели, как будет изменяться τ_m в соответствии с данной моделью при варьировании τ_{LD} , в предположении, что τ_z остаётся неизменным. Значение $\tau_z = 20$ мин. для построения модели было выбрано равным среднему значению τ_{LD} , полученному нами экспериментально; при равных значениях τ_{LD} и $\tau_z = 20$ мин. модель предсказывает значение τ_m , наиболее близкое к наблюдаемому в серии проанализированных нами образцов. Были рассчитаны зависимости

$$\tau_m = f(\tau_{LD}) \quad (\text{IV.9})$$

при разных соотношениях (a_2/a_4) вкладов q_z и q_{LD} в общую кинетику q_m . Для каждой из модельных зависимостей была рассчитана остаточная дисперсия $s^2_{y|x}$:

$$s^2_{y|x} = \sum (\tau_m^{\text{эксп}} - \tau_m^{\text{мод}})^2 / (n-2), \quad (\text{IV.10})$$

где $\tau_m^{\text{эксп}}$ — экспериментально полученное для конкретного листа значение τ_m , $\tau_m^{\text{мод}}$ — рассчитанное на основании данной модели и измеренного τ_{LD} , n — число измерений.

Таким образом, соотношение между τ_{LD} и τ_m может быть описано моделью, представленной уравнениями (IV.5–IV.9), в которой τ_m соответствует общему времени релаксации НФТ τ_0 (уравнение IV.9) и определяется временами протекания темновых процессов эпоксидации зеаксантина ($\tau_1 \equiv \tau_z$) и уменьшения оптической прозрачности листа ($\tau_2 \equiv \tau_{LD}$). На рис. IV.30 показан график модельной (предсказываемой уравнениями (IV.5–IV.9)) зависимости $\tau_m = f(\tau_{LD})$ при одинаковых вкладах обоих

процессов ($a_1 = a_2 = a_3 = a_4 = 1$), весьма близко совпадающий с графиком линейной регрессии.

Степень соответствия модели наблюдаемому в эксперименте соотношению между τ_m и τ_{LD} можно количественно оценить с помощью остаточной дисперсии $s^2_{y|x}$ (уравнение IV.10). При одинаковых вкладах процессов эпексидации (q_z) и снижения прозрачности листа (q_{LD}) величина $s^2_{y|x}$ составила 13,5 мин.², в то время как при заметно различающихся вкладах q_z и q_{LD} она была существенно больше: 23,6 мин.² в случае определяющего вклада q_z ($a_2 = 10, a_4 = 1$) и 38,7 мин.² в случае определяющего вклада q_{LD} ($a_2 = 1, a_4 = 10$). Как видно из приведённого анализа, наши данные указывают на характерные времена конверсии зеаксантина в виолаксантин $\tau_z \sim 20$ мин., и на сопоставимые вклады двух механизмов, зеаксантин- и хлоропласт-зависимого, в общую фотопротекторную реакцию.

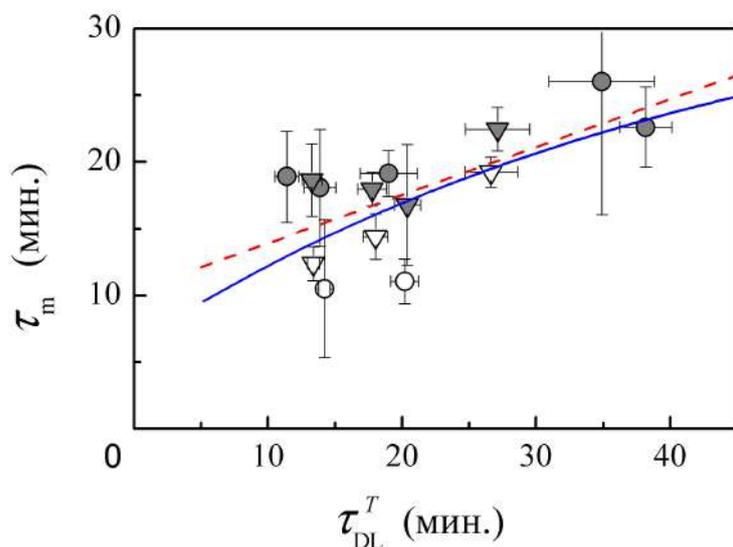


Рис. IV.30. Соотношение между характерным временем средней компоненты релаксации кажущегося нефотохимического тушения, τ_m , и характерным временем изменения оптического пропускания, τ_{LD}^T , в популяции листьев *T. fluminensis* и *T. sillamontana*. Пунктирная прямая линия – график линейной регрессии $\tau_m = A + B \tau_{LD}^T$ ($A = 10,3 \pm 2,6$; $B = 0,36 \pm 0,12$). Сплошная линия – график модельной зависимости $\tau_m = f(\tau_{LD}^T)$, рассматривающей кинетику релаксации кажущегося нефотохимического тушения как результат одновременного образования зеаксантина и перераспределения хлоропластов в клетке (подробности в тексте).

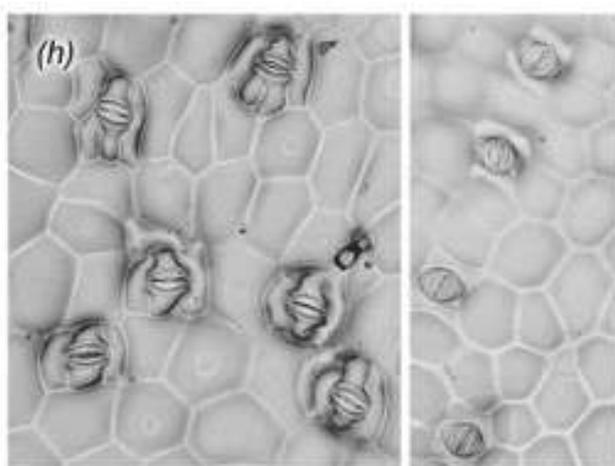
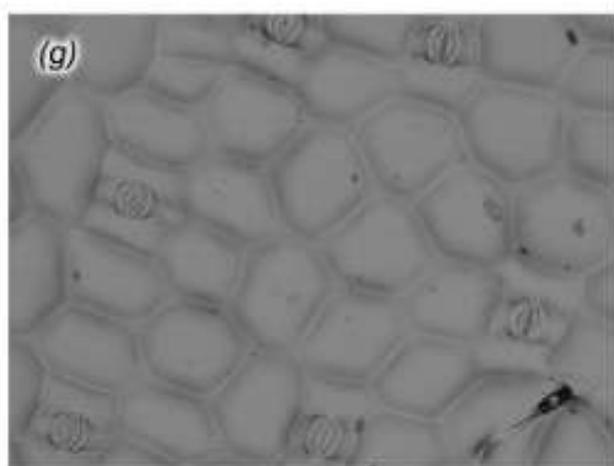
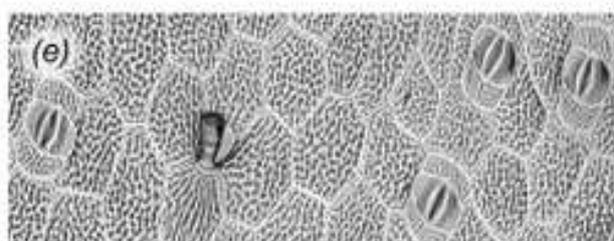
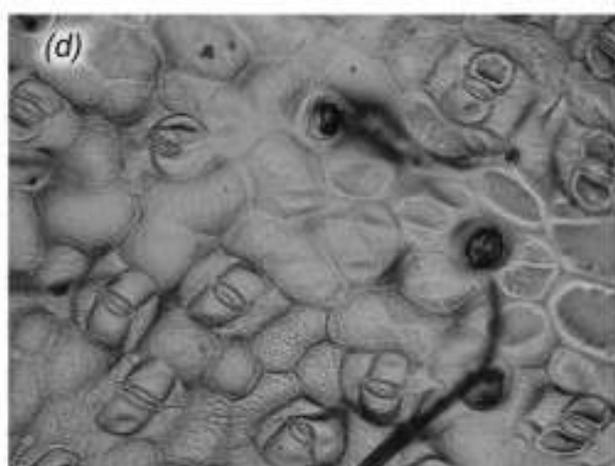
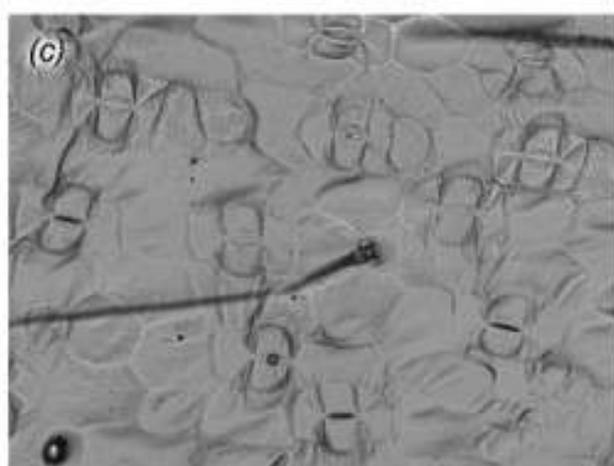
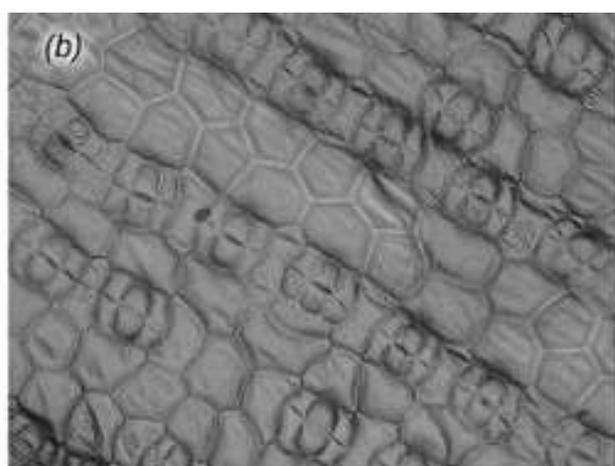
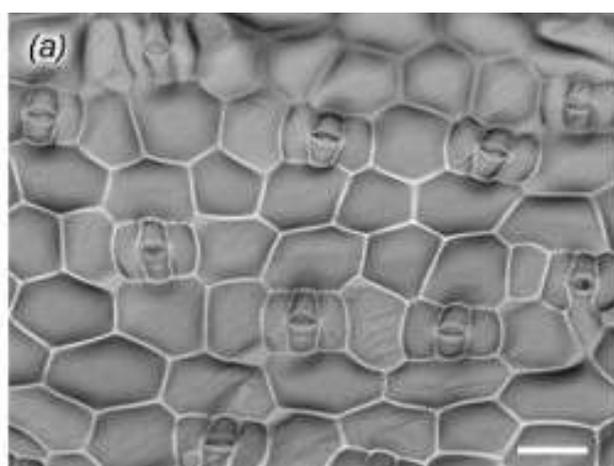




Рис. IV.31. Микрофотографии абаксиальной поверхности листьев четырёх видов традесканции, выращенных при слабом (*a, c, e, g*) или интенсивном освещении (*b, d, f, h*). Микрофотографии получены с использованием прозрачных лаковых отпечатков. Хорошо различимы устьица тетрацитного типа и основания трихом на поверхности некоторых клеток эпидермы. В ряде случаев хорошо видна фактура поверхности эпидермы. (*a, b*) — *T. fluminensis*, (*c, d*) — *T. sillamontana*, (*e, f*) — *T. navicularis*, (*g, h*) — *T. zebrina*. Масштабная метка 100 мкм.

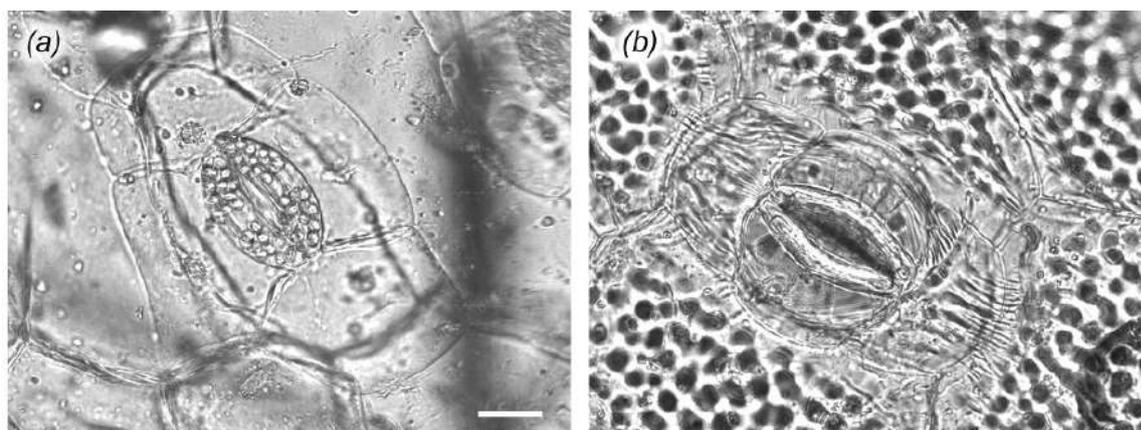


Рис. IV.32. Микрофотографии устьиц *T. sillamontana* (*a*) и *T. navicularis* (*b*) (выращенных при слабом и интенсивном освещении, соответственно), полученные непосредственно с эпидермы, отделённой от листа (без использования лаковых отпечатков). Данные снимки показывают, что лаковые отпечатки достаточно хорошо воспроизводят особенности анатомии поверхности листа. Масштабная метка 25 мкм.

Наряду с рассмотренными выше механизмами, существенную роль в защите ФСА от избыточного освещения играют процессы, активирующие фотосинтетическую фиксацию CO_2 в хлоропластах. Существенным фактором, ограничивающим скорость фиксации CO_2 , является доступность атмосферного CO_2 , которая определяется диффузией CO_2 через эпидерму листа и толщу мезофилла. Диффузия через эпидерму происходит преимущественно через устьица — специальные отверстия в эпидерме с регулируемым просветом. Плотность расположения устьиц на поверхности листа и их размеры определяют диффузионное сопротивление покровов листа проникновению газа к фотосинтезирующим клеткам. В связи с этим мы выполнили исследование характеристик устьичного аппарата нескольких видов традесканции, и их зависимости от условий роста

(освещения) растений (рис. IV.31, IV.32). Как показало наше исследование, для традесканций (*T. fluminensis*, *T. sillamontana*, *T. zebrina* и *T. navicularis*) характерны исключительно большие устьица (47-69 мкм) с предельно низкой плотностью (11–30 мм⁻²) их расположения по поверхности листа. Оба показателя близки к предельным значениям, известным для высших растений в целом (рис. IV.33).

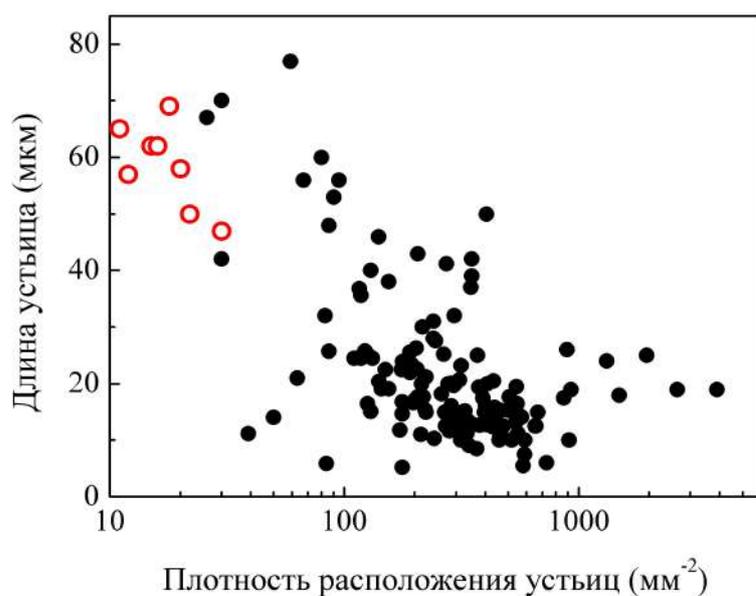


Рис. IV.33. Размеры устьиц и плотность расположения устьиц на поверхности листа у 140 видов и сортов растений, описанных в литературе (чёрные круги). Использованы данные работ (Abrams and Kubiske 1990; Willmer and Fricker 1996; Cao 2000; Lee et al. 2007; Camargo and Marengo 2011; O’Carrigan et al. 2014; Douhovnikoff et al. 2016). На этом же графике показаны данные по четырём видам традесканций (открытые красные круги).

Для оценки устьичной проводимости g_s мы воспользовались теоретическим выражением для g_s , полученным в работе (Parlange and Waggoner 1970) и модифицированным (Gardingen et al. 1989):

$$g_s = SD \frac{PD_w}{RT \left(\frac{d}{\pi ab} + \frac{\ln(4a/b)}{\pi a} \right)} \quad (\text{IV.11})$$

где a , b и d — полудлина, полуширина и глубина устьичной щели, SD — плотность расположения устьиц на поверхности листа, P — атмосферное давление (1.01×10^5 Па), T — температура листа, D_w — коэффициент диффузии для молекул воды в воздухе (2.14×10^{-5} м² с⁻¹), R — газовая

постоянная ($8.31 \text{ Дж моль}^{-1} \text{ К}^{-1}$). Отметим при этом, что устьичную проводимость можно оценивать как по отношению к воде, так и к CO_2 . Мы выбрали первый вариант, поскольку он чаще встречается в литературе и позволяет проще сопоставлять наши данные с данными других авторов. Сами величины a , b , и d были оценены на основании наших измерений длины устьица SS в соответствии с эмпирическими формулами (Douhovnikoff et al. 2016):

$$d = 0.125SS, 2a = 0.75SS, 2b = 0.1SS. \quad (\text{IV.12})$$

Таким образом, наши данные позволяют оценить характерную устьичную проводимость g_s для нескольких видов традесканций в диапазоне $0.26\text{--}0.32 \text{ моль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Эта величина является достаточно типичной для высших растений, однако совершенно нетипична её независимость от условий освещения. Так, для большинства видов растений характерно существенное (до 3-кратного) увеличение плотности устьиц с ростом интенсивности освещения, а следовательно, и рост устьичной проводимости. Биологический смысл этой подстройки — в обеспечении хлоропластов более интенсивным потоком CO_2 в условиях интенсивного освещения, когда выше потенциальная скорость его фиксации в цикле Кальвина. На наш взгляд, причина парадоксальной нечувствительности устьичного аппарата традесканций к интенсивности освещения в ходе его формирования может быть связана со спецификой анатомии их листьев. А именно, для традесканций характерна толстая гиподерма, то есть водоносный слой бесхлорофилльных клеток, отделяющих мезофилл от устьиц. Как показали наши исследования на *T. fluminensis* и *T. sillamontana*, толщина гиподермы может возрастать от 2-х до 4-кратных величин при увеличении интенсивности освещения, достигая сотен микрометров. При такой толщине слоя клеток его диффузионное сопротивление возрастает (а проводимость g_{ias} , наоборот, падает) и может оказываться лимитирующим звеном при определении скорости диффузии

CO₂ к клеткам мезофилла. Сделанные нами оценки на основании полуэмпирической формулы (Syvertsen et al. 1995):

$$g_{ias} = (r_{ias})^{-1} = (\rho/l)D_w (f_{ias})^{1.55} < 0.39 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}. \quad (\text{IV.13})$$

(где $f_{ias} \sim < 20\%$ — объёмная доля воздушных полостей в объёме гиподермы, толщина гиподермы $l = 173$ мкм для *T. fluminensis* – HL).

Таким образом, диффузионная проводимость слоя гиподермы может оказываться сравнимой или даже ниже, чем проводимость устьиц, что делает излишней регуляцию устьичного сопротивления как нелимитирующего звена.

IV.5. Выводы

1. Для стационарных состояний ФСА, характерных для разных интенсивностей действующего освещения, наблюдается обратная корреляция между квантовой эффективностью ФСII (Φ_{PS2}) и коэффициентом нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (q_{NPQ}).

2. При умеренных интенсивностях освещения трансмембранная ΔpH и ΔpH -зависимое НФТ (q_E) выше у теневыносливого вида у *T. fluminensis*, чем у светолюбивого вида *T. sillamontana*. При этом рассеяние ΔpH у *T. fluminensis* происходит за характерное время, в 1,5-2 раза большее, чем у *T. sillamontana*.

3. Для теневыносливых видов характерны более высокие значения трансмембранной ΔpH и более замедленная диссипация, чем для светолюбивых.

4. Способность к тепловому рассеянию избыточной поглощённой энергии света при умеренной освещённости (< 500 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) в

большей степени проявляется у теневыносливых видов, а при высокой освещенности — у светолюбивых.

5. Для теневыносливых видов характерны более медленные активация и дезактивации рН- и зеаксантин-зависимых механизмов теплового рассеяния избыточной поглощённой энергии света после прекращения освещения.

6. Перераспределение хлоропластов в клетках мезофилла обеспечивает исключительно интенсивные изменения поглощения света листом у изученных нами видов традесканций и, по-видимому, представляет собой основной механизм пластичности по отношению к изменениям интенсивности освещения у этих растений.

7. Для изученных нами видов традесканций характерна относительная непластичность анатомических и цитологических характеристик, связанных с фотосинтетической функцией (толщина и структура мезофилла листа, размеры клеток мезофилла и хлоропластов, строение и плотность распределения устьичного аппарата).

8. Устьичная проводимость, по-видимому, не является лимитирующим фактором в доступности CO_2 для фотосинтеза рассмотренных нами видов традесканций.

V. Глава 5. Роль спектрального состава освещения в обеспечении эффективности работы ФСА

V.1. Аннотация главы³

В этой главе представлены результаты исследования влияния спектрального состава освещения на формирование и функционирование ФСА, рост и продуктивность растений. В качестве модельного объекта использовали растения китайской капусты (*Brassica chinensis*). Показана энергетическая роль зелёного света, основанная на обеспечении протекания фотосинтеза в нижних слоях мезофилла и в листьях нижних ярусов.

V.2. Влияние спектрального состава освещения на характеристики фотосинтетического аппарата

Значение спектрального состава света для функционирования ФСА и, как следствие, роста и развития растений, исследуется достаточно давно и связывается, прежде всего, с ролью фоторецепторов. С появлением новых источников света стал более актуален и энергетический аспект. Большой объём исследований был выполнен с освещением светом в красной спектральной области, которое наиболее эффективно с энергетической точки зрения.

³ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. 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.**)
2. **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.**)

В качестве модели мы выбрали растения китайской капусты (*Brassica chinensis* L.), освещаемые узкополосным светодиодным источником света (далее в тексте — СД или LED), включающим красный и синий спектральный диапазоны, либо натриевыми лампами высокого давления (ДНаТ или HPSL), содержащими значительную долю света в жёлто-зелёной области (см. рис. V.1).

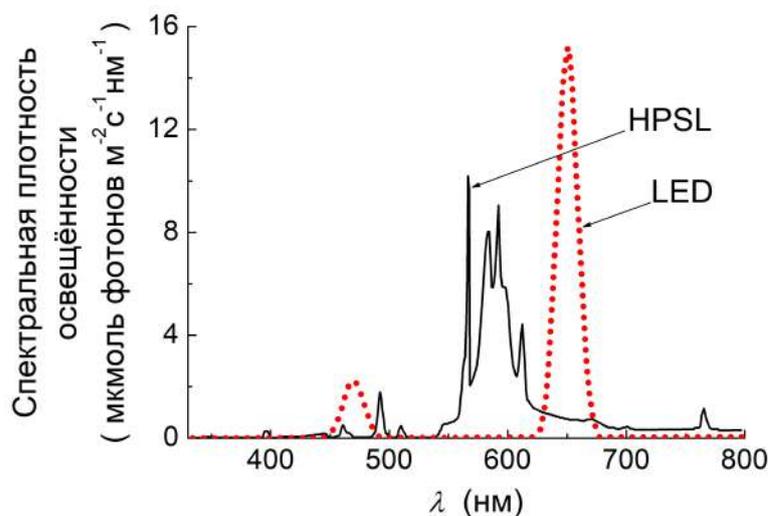


Рис. V.1. Спектр излучения натриевой лампы (HPSL) и светодиодного осветителя (LED).

В нескольких сериях экспериментов были измерены биофизические, биохимические и физиологические параметры ФСА (табл. V.1), а также морфометрические параметры китайской капусты (табл. V.2) в ходе роста при освещении разного спектрального состава (контрольные точки 15 и 28 дней). При этом для каждого спектрального состава были выполнены измерения при разных интенсивностях освещения: 100 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ (которую далее здесь будем называть «низкой интенсивностью») и 400 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ («высокая интенсивность»), а также при изменении интенсивности с низкой на высокую на 13-й день роста, что позволяло наблюдать за кратковременной (2 дня) и долговременной (15 и 28 дней) адаптацией ФСА к интенсивности освещения.

Таблица V.1. Параметры фотосинтетического аппарата растений китайской капусты (*Brassica chinensis* L.), выращенных под красно-синим светом светодиодного светильника (СД) или условно-белым светом натриевой лампы высокого давления (ДНаТ).

а) 15-дневные растения

Параметр	Источник света	Интенсивность освещения (мкмоль фотонов м ⁻² с ⁻¹)		
		100	400	100 → 400
Хл, мг/дм ²	ДНаТ	1.49 ± 0.10	2.10 ± 0.12	2.07 ± 0.21
	СД	1.50 ± 0.11	2.78 ± 0.26	1.91 ± 0.11
Хл <i>a/b</i>	ДНаТ	2.69 ± 0.12	2.58 ± 0.15	3.05 ± 0.26
	СД	2.94 ± 0.11	2.82 ± 0.20	2.79 ± 0.19
Кар, мг/дм ²	ДНаТ	0.30 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.41 ± 0.03
	СД	0.31 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.40 ± 0.03
Скорость нециклического переноса электронов в изолированных хлоропластах, мкмоль К ₃ Fe(CN) ₆ /мг Chl·час	ДНаТ	163.56 ± 1.03	210.57 ± 21.45	178.66 ± 16.45
	СД	182.16 ± 17.25	188.04 ± 7.30	189.87 ± 6.19
ΔрН в изолированных хлоропластах	ДНаТ	1.72 ± 0.02	1.75 ± 0.15	1.40 ± 0.10
	СД	1.85 ± 0.22	1.60 ± 0.10	1.57 ± 0.27
<i>F_v/F_m</i>	ДНаТ	0.767 ± 0.015	0.801 ± 0.010	0.797 ± 0.018
	СД	0.822 ± 0.011	0.808 ± 0.010	0.806 ± 0.009
qP	ДНаТ	1.071 ± 0.053	1.300 ± 0.064	1.271 ± 0.058
	СД	1.173 ± 0.026	1.441 ± 0.088	1.333 ± 0.107
NPQ	ДНаТ	0.124 ± 0.034	0.444 ± 0.118	0.293 ± 0.038
	СД	0.213 ± 0.007	0.377 ± 0.038	0.328 ± 0.059

б) 28-дневные растения

Параметр	Источник света	Интенсивность освещения (мкмоль фотонов м ⁻² с ⁻¹)		
		100	400	100 → 400
Хл, мг/дм ²	ДНаТ	2.11 ± 0.25	2.04 ± 0.18	2.23 ± 0.21
	СД	1.91 ± 0.16	2.76 ± 0.22	3.06 ± 0.22

Хл <i>a/b</i>	ДНаТ	2.27 ± 0.25	2.65 ± 0.19	2.61 ± 0.13
	СД	2.95 ± 0.16	2.78 ± 0.10	2.82 ± 0.16
Кар, мг/дм ²	ДНаТ	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.04
	СД	0.35 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.58 ± 0.05
Скорость нециклического переноса электронов в изолированных хлоропластах, мкмоль К ₃ Fe(CN) ₆ /мг Chl·час)	ДНаТ	153.15 ± 17.96	170.97 ± 43.69	171.17 ± 25.86
	СД	147.70 ± 7.58	144.88 ± 7.59	156.27 ± 16.01
ΔрН в изолированных хлоропластах	ДНаТ	1.50 ± 0.11	1.97 ± 0.02	1.92 ± 0.01
	СД	2.01 ± 0.20	2.03 ± 0.10	1.66 ± 0.05
<i>F_v</i> / <i>F_m</i>	ДНаТ	0.822 ± 0.005	0.827 ± 0.007	0.811 ± 0.016
	СД	0.822 ± 0.017	0.816 ± 0.018	0.805 ± 0.025
qP	ДНаТ	1.206 ± 0.030	1.235 ± 0.071	1.269 ± 0.122
	СД	1.112 ± 0.032	1.371 ± 0.062	1.281 ± 0.036
NPQ	ДНаТ	0.210 ± 0.019	0.379 ± 0.067	0.312 ± 0.053
	СД	0.122 ± 0.012	0.312 ± 0.053	0.237 ± 0.021

Таблица V.2. Ростовые и биохимические параметры растений китайской капусты (*Brassica chinensis* L.), выращенных под красно-синим светом светодиодного светильника (LED) или условно-белым светом натриевой лампы высокого давления (HPSL).

а) 15 -дневные растения

Параметр	Источник света	Интенсивность освещения (мкмоль фотонов м ⁻² с ⁻¹)		
		100	400	100 → 400
Сырой вес, отношение побег/корень	ДНаТ	5.77 ± 0.08	9.99 ± 0.48	7.79 ± 0.00
	СД	7.14 ± 0.09	8.20 ± 0.07	9.16 ± 0.01
Побег, отношение сухой вес/сырой вес, %	ДНаТ	5.5 ± 0.4	9.0 ± 1.7	10.0 ± 1.5
	СД	6.7 ± 0.8	9.8 ± 3.8	10.0 ± 1.6
Содержание	ДНаТ	4.4 ± 1.6	8.1 ± 3.0	12.0 ± 1.7

растворимых углеводов, мг/г сырого веса	СД	0.7 ± 0.4	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1
Доля растворимых углеводов, %	ДНаТ	76 ± 7	49 ± 1	53 ± 4
	СД	36 ± 9	45 ± 3	28 ± 0
Содержание аскорбата, мг/г сырого веса	ДНаТ	0.324 ± 0.024	0.309 ± 0.013	0.366 ± 0.012
	СД	0.325 ± 0.004	0.448 ± 0.050	0.548 ± 0.090

б) 28-дневные растения

Параметр	Источник света	Интенсивность освещения (мкмоль фотонов м ⁻² с ⁻¹)		
		100	400	100 → 400
Сырой вес, отношение побег/корень	ДНаТ	11.38 ± 0.24	8.01 ± 0.26	11.12 ± 0.12
	СД	13.85 ± 0.28	11.55 ± 0.21	7.64 ± 0.21
Побег, отношение сухой вес/сырой вес, %	ДНаТ	6.0 ± 0.5	7.4 ± 0.6	5.4 ± 0.5
	СД	5.6 ± 1.1	8.1 ± 0.8	9.6 ± 1.2
Содержание растворимых углеводов, мг/г сырого веса	ДНаТ	7.4 ± 0.9	8.8 ± 1.5	10.2 ± 1.3
	СД	2.9 ± 0.4	11.3 ± 2.3	6.1 ± 0.1
Доля растворимых углеводов, %	ДНаТ	76 ± 4	46 ± 1	68 ± 3
	СД	70 ± 2	101 ± 2	92 ± 6
Содержание аскорбата, мг/г сырого веса	ДНаТ	0.412 ± 0.004	0.373 ± 0.070	0.861 ± 0.191
	СД	0.447 ± 0.010	0.440 ± 0.076	0.506 ± 0.107

Было показано, что при любой освещённости и динамике её изменения растения, адаптированные к свету красно-синего спектрального состава (СД), практически не уступали (или опережали) растения, адаптированные к жёлто-зелёному свету (ДНаТ) по большинству параметров,

характеризующих «потенциальную» (*in vitro*, или *in vivo* при заданных внешних условиях) активность ФСА (рис. V.2, V.3).

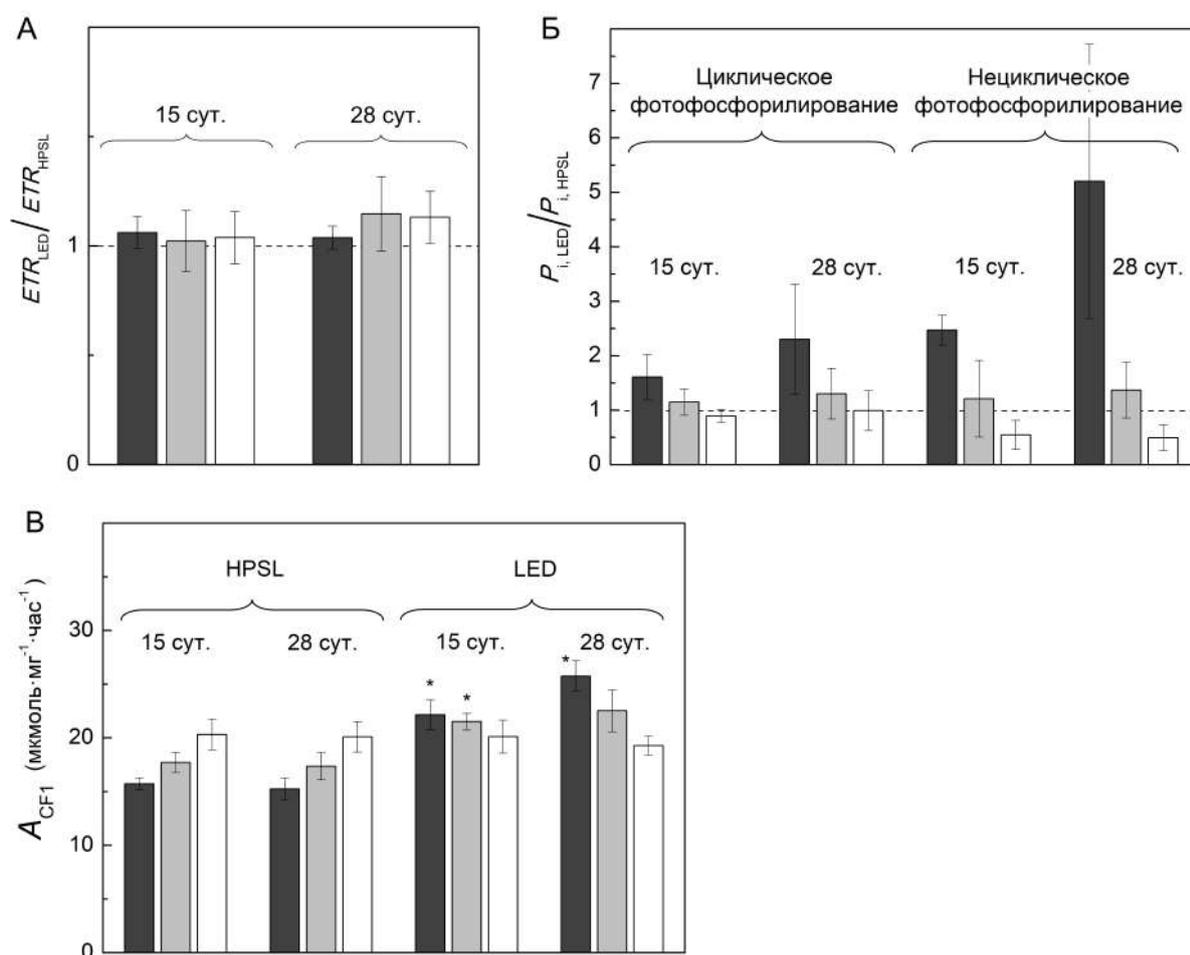


Рис. V.2. Сравнение характеристик листьев китайской капусты, выращенной под красно-синими светодиодами (СД) и условно-белым светом натриевой лампы высокого давления (ДНаТ): соотношение скорости нециклического переноса электронов (ETR; получены на основании данных об индукции флуоресценции хлорофилла) *in vivo* (A), активности циклического и нециклического фотофосфорилирования (P_i) в изолированных хлоропластах (B), а также АТФ-азная активность (A_{CF1}) изолированного сопрягающего фактора CF1 (B). Представлены данные на 15 и на 28 день роста растений: 1) выращенных при слабом освещении ($100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) в течение всего времени роста; 2) выращенных при слабом освещении в течение первых 12 дней, затем — при интенсивном освещении ($400 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$); и 3) выращенных при интенсивном освещении в течение всего времени роста; обозначены черными, серыми и белыми колонками, соответственно. Звёздочками на панели (B) обозначены значения A_{CF1} , значительно различающиеся между растениями, выращенными под светодиодными светильниками и под натриевыми лампами в соответствии с тестом Тьюки ($P < 0.05$).

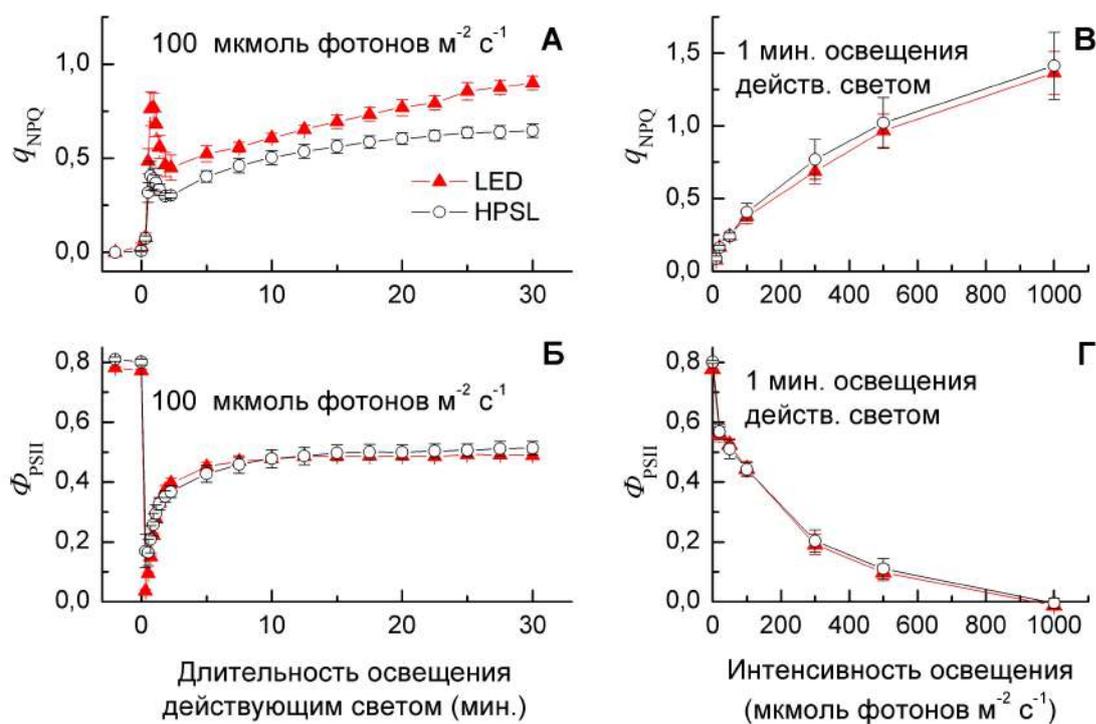


Рис. V.3. Параметры индукции флуоресценции хлорофилла в листьях китайской капусты, выращенных при низкой интенсивности освещения. А, Б — кинетика фотоиндуцированных изменений величины нефотохимического тушения, q_{NPQ} (А) и эффективности ФСII, Φ_{PSII} (Б) (интенсивность освещения $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). В, Г — зависимость значений q_{NPQ} (В) и Φ_{PSII} (Г) от интенсивности освещения (после 1 минуты освещения). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

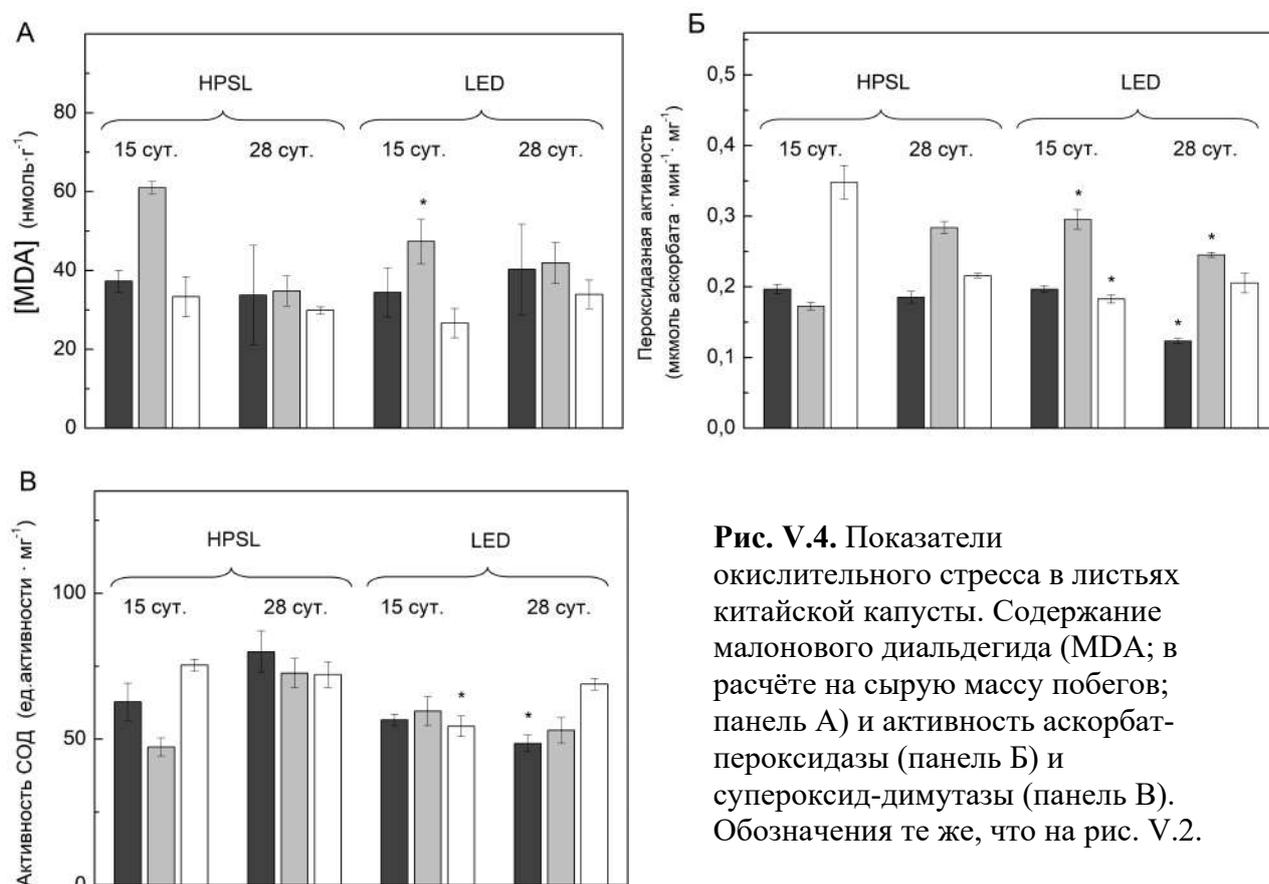


Рис. V.4. Показатели окислительного стресса в листьях китайской капусты. Содержание малонового диальдегида (MDA; в расчёте на сырую массу побегов; панель А) и активность аскорбат-пероксидазы (панель Б) и супероксид-димутазы (панель В). Обозначения те же, что на рис. V.2.

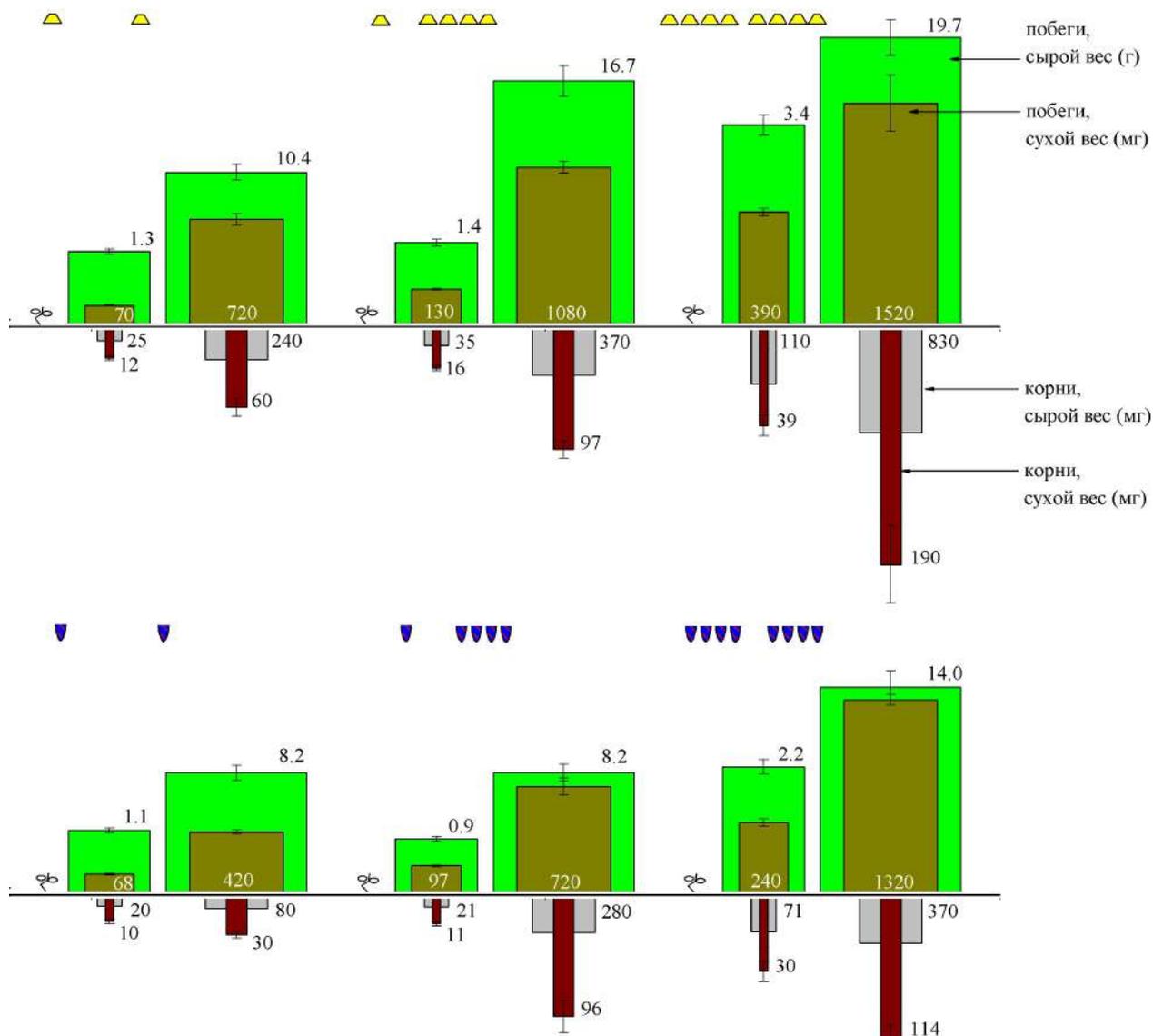


Рис. V.5. Ростовые показатели китайской капусты. Представлены данные по сырой и сухой массе побегов (зелёные и тёмно-жёлтые столбцы, соответственно), а также сырой и сухой массе корней (серые и коричневые столбцы, соответственно). Массы указаны рядом со столбцами в граммах (для сырого веса побегов) или в миллиграммах (в остальных случаях). Растения выращены под условно-белым светом натриевой лампы высокого давления (вверху) или под красно-синим излучением светодиодных светильников (внизу). Две левые группы колонок представляют данные по растениям, выращенным при низкой, две центральные — при переменной, и две правые — при высокой освещённости. 1-я, 3-я и 5-я группы колонок соответствуют 15-дневным растениям, 2-я, 4-я и 6-я — 28-дневным.

Наш анализ показателей окислительного стресса, который мог бы быть спровоцирован высокой освещенностью, также показал, что свет красно-синего диапазона в наших условиях не приводил к развитию окислительного стресса. Так, СД- и ДНаТ-акклимированные растения

обладали близкими значениями содержания стресс-индуцируемых антиоксидантных ферментов аскорбатпероксидазы (АРХ) и супероксиддисмутазы (SOD), а также продукта перекисного окисления мембран малонового диальдегида (MDA) (рис. V.4).

В то же время, СД-акклимированные растения отставали от ДНаТ-акклимированных растений как в росте и по накоплению органических веществ в целом (сырая и сухая масса как надземной, так и подземной части растения, рис. V.5), так и по накоплению запасных и «мобильных» органических компонентов (углеводов в целом и растворимых углеводов, рис. V.6).

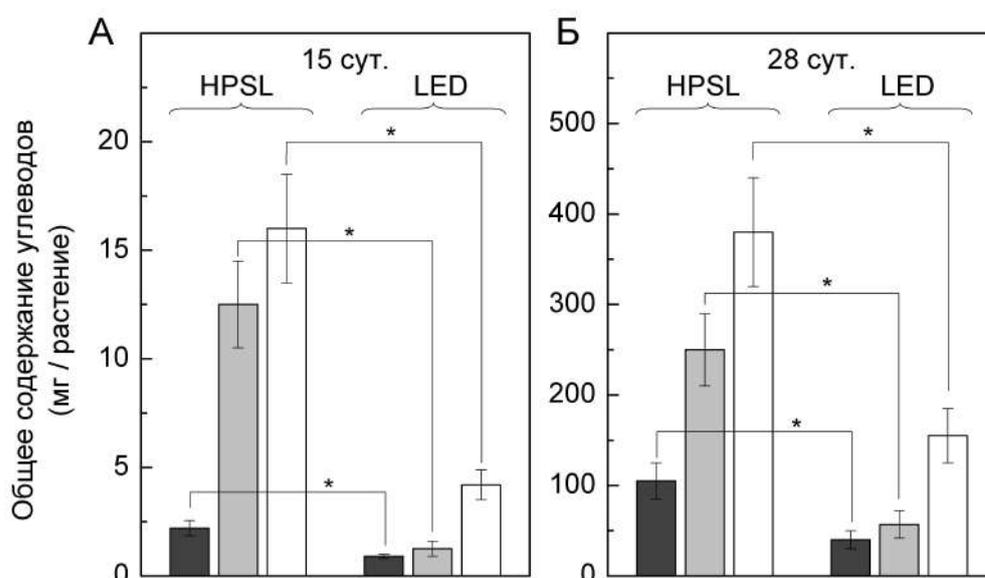


Рис. V.6. Общее содержание углеводов в растениях китайской капусты в возрасте 15 (А) и 28 суток (Б). Обозначения те же, что на рис. V.2. Звёздочками отмечены статистически различные значения. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4-10$).

Полученные нами данные вновь возвращают нас к вопросу о соотношении фотосинтеза и продуктивности растительных организмов. Таким образом, при освещении красно-синим светом мы наблюдаем снижение продуктивности растений, несмотря на отсутствие каких-либо признаков снижения активности ФСА или возникновения стрессовых условий, которые могли бы приводить к избыточному потреблению

продуктов фотосинтеза. На наш взгляд, данное противоречие разрешается учётом часто недооцениваемого обстоятельства — изменение спектрального состава света и повышении энергетической роли зелёного света по мере проникновения вглубь листа и листовой кроны в целом. Так, на основании простой математической модели, учитывающей ослабление света при прохождении через верхний слой листьев, непосредственно экспонированных падающему свету, можно сделать оценку вклада нижележащих слоёв листьев и роли более глубоко проникающих спектральных компонент. Рассмотрим этот вопрос подробнее.

V.3. Теоретическая оценка влияния взаимной затенённости листьев на общую фотосинтетическую продуктивность растения

Обозначим продуктивность листа через P , долю незатенённой поверхности листа через S , интенсивность света на поверхности освещённого или затенённого листа через I_0 и I_1 , соответственно. В линейном приближении, будем предполагать, что продуктивности (в расчёте на единицу площади) затенённой и освещённой поверхности листа соотносятся как $P(I_1)/P(I_0) \approx (I_1 - I_{cp})/(I_0 - I_{cp})$, где I_{cp} обозначает световой компенсационный пункт (ок. 25 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ для китайской капусты (Tazawa 1999)). Тогда полная продуктивность P_t растения, у которого доля S его площади листьев экспонирована свету с интенсивностью I_0 , равна:

$$P_t = S \cdot P(I_0) + (1 - S) \cdot P(I_1) = S \cdot P(I_0) + (1 - S) \cdot P(I_0) \frac{I_1 - I_{cp}}{I_0 - I_{cp}} \quad (V.1)$$

Поскольку интенсивность света I_1 , «отфильтрованного» вышележащими слоями листьев и достигшего затенённого участка листа, зависит от спектра падающего света, а следовательно, и от источника света, то от него зависит и выражение $\frac{I_1 - I_{cp}}{I_0 - I_{cp}}$, входящее в формулу (V.1). Обозначим соответствующую

величину $\frac{I_1^{LED} - I_{cp}}{I_0 - I_{cp}}$, характерную для красно-синего светодиодного освещения

(LED), через α_{LED} , а величину $\frac{I_1^{HPSL} - I_{cp}}{I_0 - I_{cp}}$, характерную для света натриевой

лампы (HPSL), через α_{HPSL} . Тогда соотношение полных продуктивностей растения P_t^{HPSL} и P_t^{LED} (при его освещении HPSL- и LED- источником, соответственно) может быть представлено следующим образом:

$$\frac{P_t^{HPSL}}{P_t^{LED}} = \frac{S \cdot P(I_0) + (1-S) \cdot P(I_0) \cdot \alpha_{HPSL}}{S \cdot P(I_0) + (1-S) \cdot P(I_0) \cdot \alpha_{LED}} = \frac{S + (1-S) \cdot \alpha_{HPSL}}{S + (1-S) \cdot \alpha_{LED}} \quad (V.2)$$

Принимая во внимание, что, независимо от источника, свет в затенённой области намного слабее прямого света, т.е. обе величины α_{LED} , $\alpha_{HPSL} \ll 1$, получим:

$$\begin{aligned} \frac{P_t^{HPSL}}{P_t^{LED}} &\approx \frac{1}{S^2} (S + (1-S) \cdot \alpha_{HPSL}) \cdot (S - (1-S) \cdot \alpha_{LED}) \approx \frac{1}{S^2} (S^2 + S(1-S) \cdot (\alpha_{HPSL} - \alpha_{LED})) = \\ &= 1 + \Delta\alpha \frac{1-S}{S} \end{aligned} \quad (V.3)$$

(мы здесь ввели обозначение $\Delta\alpha = \alpha_{HPSL} - \alpha_{LED}$).

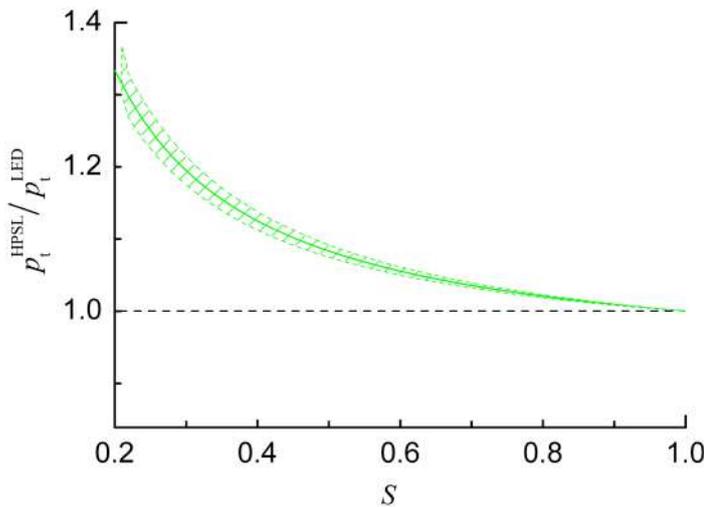


Рис. V.7. Оценка полной продуктивности растения при освещении условно-белым светом натриевой лампы высокого давления (P_t^{HPSL}) по отношению к продуктивности при

освещении красно-синим светом светодиодного светильника (P_t^{LED}), $\frac{P_t^{HPSL}}{P_t^{LED}}$, для различных значений коэффициента затенения (S) в соответствии с простой моделью, учитывающей лишь однократное взаимное затенение листьев (см. подробности в тексте). Заштрихованная область соответствуют диапазону оцененных значений $\Delta\alpha$ (см. уравнение V.3).

На рис. V.7 показана зависимость отношения продуктивностей растения $\frac{P_t^{HPSL}}{P_t^{LED}}$ от параметра затенённости S в предположении, что $\Delta\alpha \approx 0.075 \div 0.092$ (такое значение было получено на основе анализа спектров оптического пропускания листьев китайской капусты; см. рис. V.9).

Описанная модель показывает, что с учётом взаимного затенения листьев, использование красно-синего света должно приводить к 8-9% потере продуктивности, если доля непосредственно экспонированной свету листовой поверхности S составляет 50% всей листовой площади, и 35% при $S = 20\%$ (рис. V.7).

Наряду с фактором взаимного затенения листьев, также может играть определённую роль распределение интенсивности фотосинтеза по толщине листа в силу различного проникновения вглубь листа света разного спектрального состава. Так, расчёт профиля количества света, поглощённого разными слоями листа, может быть выполнен на основании теории Кубелки-Мунка (Kubelka–Munk theory, см. (Allen and Richardson 1968)) и использован для оценки суммарной (по всем слоям) продуктивности листа при освещении светом различного спектрального состава. С учётом оптических свойств листьев китайской капусты, в нашем случае эта оценка даёт до 15%-го различия в продуктивности листа при освещении красным или зелёным светом (рис. V.8).

Заметим также, что у листьев китайской капусты наблюдалась адаптация к красно-синему освещению, заключающаяся в увеличении оптической прозрачности листа, которая могла бы отчасти скомпенсировать недостаточную освещённость нижних слоёв листа и нижележащих листьев, возникающую из-за отсутствия в спектре относительно легко проникающих через лист спектральных компонент (рис. V.9). Тем не менее, даже эта адаптация не позволяет полностью избежать негативного эффекта затенения (приведённые выше цифры, учитывающие эффект взаимного затенения, и рис. V.7 получены с учётом адаптации, демонстрируемой рис. V.9). Показанная

нами вероятная энергетическая роль зелёного света может быть суммирована на рис. V.10.

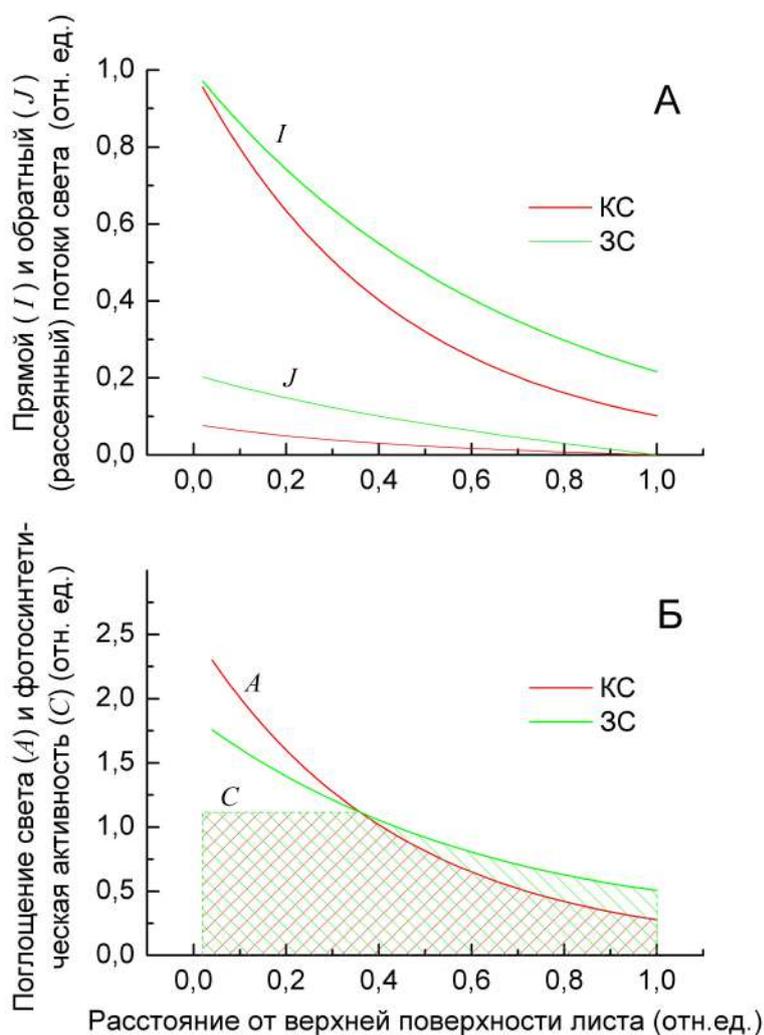


Рис. V.8. Градиенты интенсивности света внутри листа (А) и профили поглощения света и фотосинтетической активности (Б) в листьях, освещённых зелёным и красным светом. Градиенты интенсивности падающего (I) и рассеянного (J) света и профиль поглощения (А) красного (КС) и зелёного (ЗС) света рассчитаны на основании теории Кубелки-Мунка (Allen and Richardson 1968). Профиль фотосинтетической продуктивности (С) представлен упрощённой моделью фермент-лимитированной продуктивности на основании экспериментальных данных работ Нишио (Nishio 2000) и Эванса и Вогельманна (Evans and Vogelmann 2003). Заштрихованная площадь под кривой С даёт оценку полной продуктивности листа.

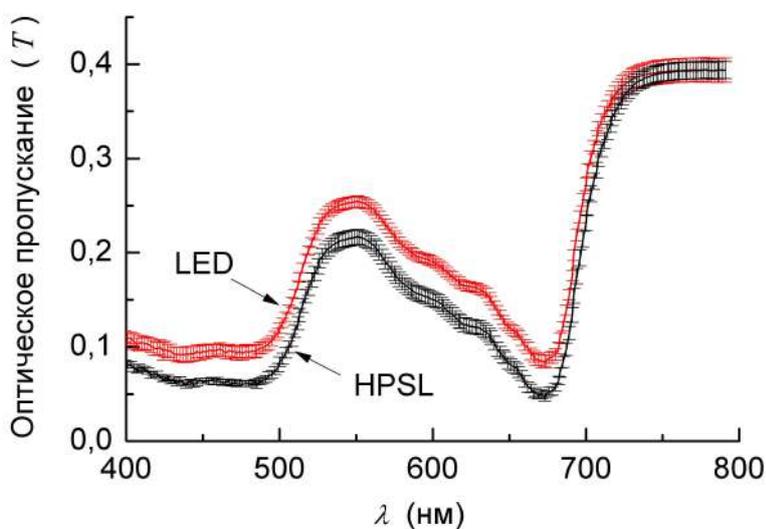


Рис. V.9. Спектры оптического пропускания листьев китайской капусты, выращенной под светом светодиодных светильников (LED) или натриевой лампы (HPSL) в течение 14 дней при низкой освещённости ($100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 10$).

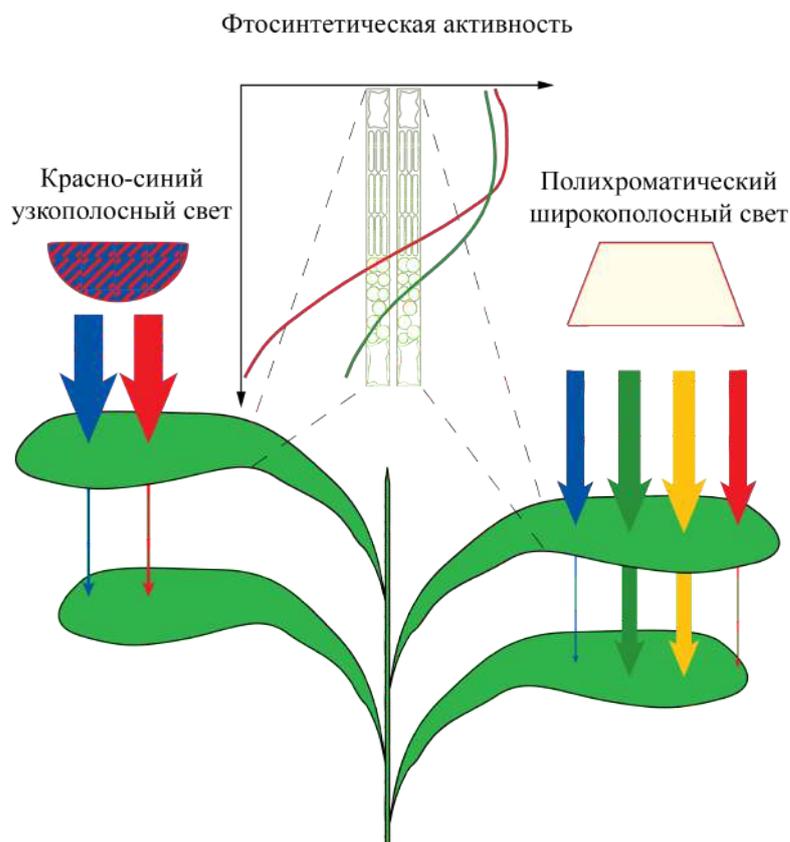


Рис. V.10. Схематичная иллюстрация роли спектральных компонент жёлто-зелёной области в поддержании эффективного фотосинтеза в нижних слоях освещённых листьев и в нижних ярусах листовой кроны растений.

V.4. Выводы

1. Необходимость различных спектральных компонент фотосинтетически активной радиации (ФАР) для нормального фотосинтеза и роста растения, показанная ранее во многих работах, может быть обусловлена не только регуляторной, но и энергетической функцией соответствующих компонент. На основании всестороннего анализа биофизических, биохимических, физиологических и морфометрических показателей листьев китайской капусты (*Brassica chinensis* L.) нами получены данные, свидетельствующие о заметной энергетической роли жёлто-зелёной спектральной компоненты в фотосинтезе.

2. Предполагаемая энергетическая роль жёлто-зелёной спектральной компоненты обусловлена её меньшим поглощением хлорофиллом и, как следствие, более глубоким проникновением как вглубь листа, так и вглубь листовой кроны растения в целом.

VI. Глава 6. Устойчивость и эффективность работы ФСА при изменении газового состава среды

VI.1. Аннотация главы⁴

Эта глава содержит описание исследований влияния концентрации основных атмосферных газов, CO₂ и O₂, на протекание световых реакций фотосинтеза и защитные реакции ФСА. Показано, что устойчивость организма к закислению среды может служить фактором, обуславливающим устойчивость его ФСА к высокой концентрации диоксида углерода в среде. Получены количественные оценки изменений активности ФСII и нефотохимического тушения при изменениях содержания CO₂ и O₂ в среде, а также вклада псевдоциклического транспорта электронов в суммарный фотосинтетический транспорт электронов в хлоропластах.

VI.2. Влияние концентрации кислорода и углекислого газа в среде на активность транспорта электронов и индукцию нефотохимического тушения в хлоропластах

⁴ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. **Птушенко В.В.**, Соловченко А.Е. Толерантность фотосинтетического аппарата к закислению среды как возможная детерминанта CO₂-толерантности симбиотической микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPASS-2014 // Биохимия. – 2016. – V. 81. – N 12. – P. 1849-1856. – DOI: 10.1134/S0006297916120142 (**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) (WoS JIF 2.8 / 0.5 п.л. / **0.25 п.л.**)
2. 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.**)
3. Кувыкин И.В., Вершубский А.В., **Птушенко В.В.**, Тихонов А.Н. Кислород как альтернативный акцептор в фотосинтетической цепи электронного транспорта C₃-растений // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – № 10. – С. 1329–1343. – DOI: 10.1134/S0006297908100027 (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) (WoS JIF 2.8 / 0.94 п.л. / **0.31 п.л.**)

Было исследовано кратковременное (минуты — десятки минут) влияние газового состава атмосферы или находящейся с ней в равновесии жидкой среды на протекание световых реакций фотосинтеза и индукцию фотозащитных механизмов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений и клетках микроводорослей.

Для анализа состояния ФСА регистрировали изменения квантовой эффективности ФСII (Φ_{PSII}) и эффективности теплового рассеяния энергии избыточного электронного возбуждения в фотосинтетической антенне с помощью регистрации индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ; рис. VI.1), а также скорость притока электронов к ФСI и оттока от неё путём регистрации спектров ЭПР окисленного первичного донора ФСI (P_{700}^+ ; рис. VI.2).

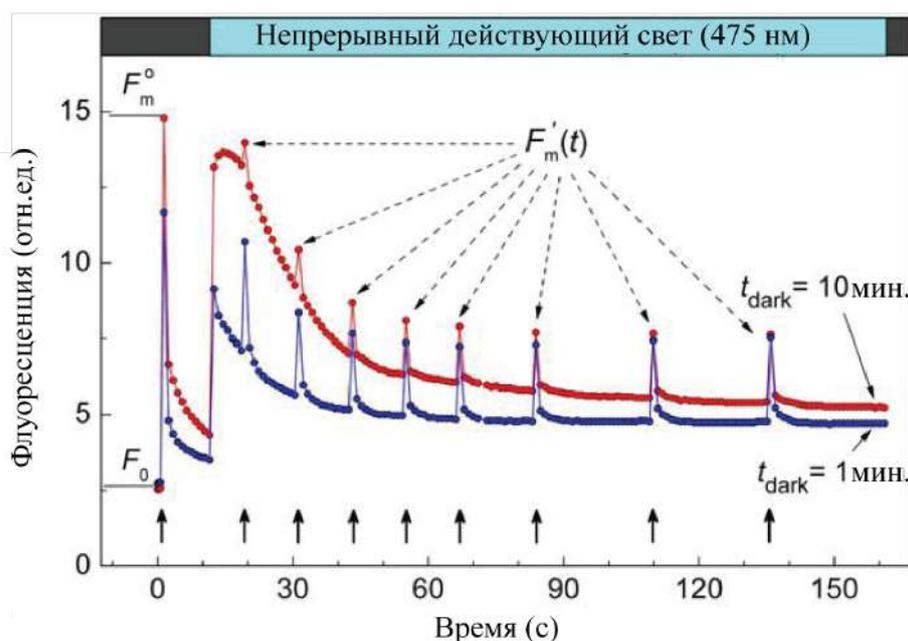


Рис. VI.1. Светозависимые изменения флуоресценции хлорофилла в листьях *Hibiscus rosa-sinensis*, преадаптированных к темноте (в течение 1 или 10 мин., как указано на рисунке). Вертикальными стрелками обозначены моменты вспышек насыщающего света, подаваемых на фоне действующего света.

Было показано, что для функционирования фотосинтетической цепи переноса электронов существенным является её взаимодействие с молекулами кислорода, как минимум, на двух участках: на акцепторной стороне ФСI и между фотосистемами. Так, на свету для работы всей ЭТЦ

лимитирующим является отток электронов от ФСИ. Нами было показано, что в анаэробных условиях этот отток чрезвычайно затруднён, что видно по состоянию первичного донора ФСII, остающегося практически полностью в восстановленном состоянии при освещении (рис. VI.3; ср. кривые 1 и 2).

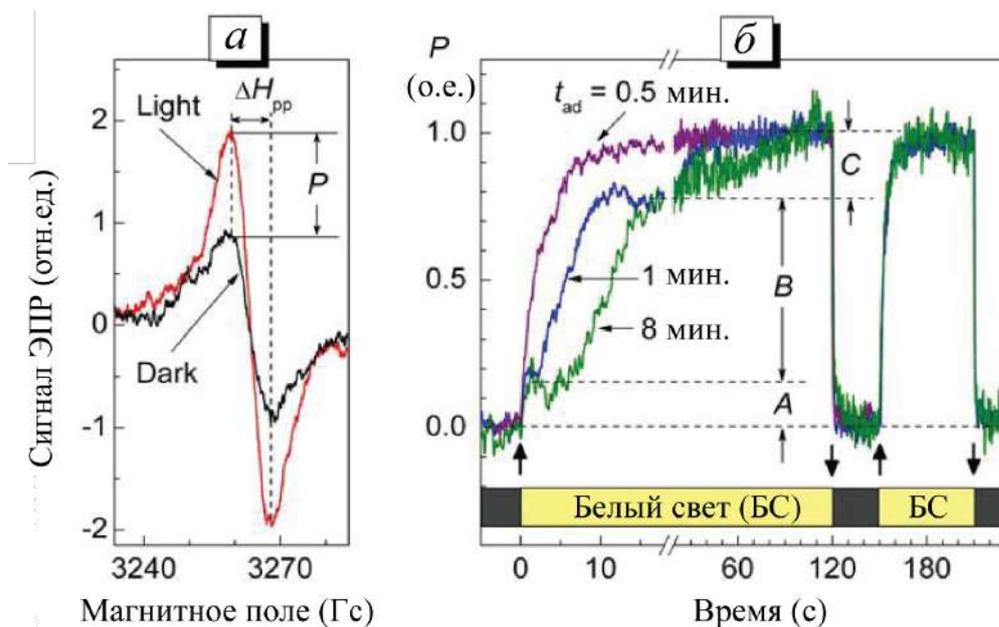


Рис. VI.2. Спектры ЭПР листа *Hibiscus rosa-sinensis*, измеренные в темноте и на свету (а), и кинетика светозависимых изменений амплитуды сигнала ЭПР P_{700^+} (б). После 1 мин. преадаптации к белому свету образцы были адаптированы к темноте в течение 0,5, 1 или 8 мин., как показано на рисунке.

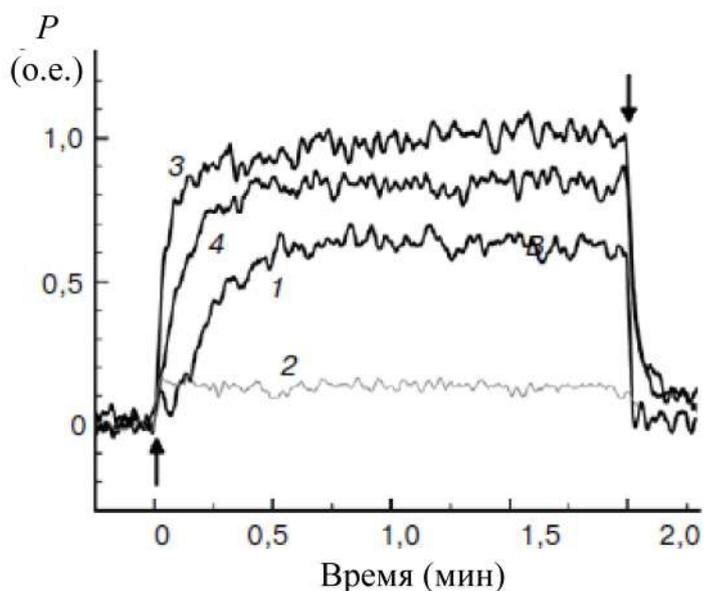


Рис. VI.3. Кинетика фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР от P_{700^+} в листе китайской розы, адаптированном к темноте (10 мин) после предварительного освещения белым светом (1 мин). Условия адаптации: 1 – контрольный образец, аэробные условия ($[O_2] = 21\%$); 2 – контрольный образец, анаэробные условия ($[O_2] < 0,5\%$); 3 – аэробные условия ($[O_2] = 21\%$), инфильтрация 0,1 мМ раствора диурона; 4 – анаэробные условия ($[O_2] < 0,5\%$), инфильтрация 0,1 мМ раствора диурона.

О том, что незначительная степень окисленности P_{700} обусловлена именно снижением скорости оттока электронов от ФСІ, а не гипотетической активацией притока от ФСІІ, говорит тот факт, что при ингибировании ФСІІ диуроном также наблюдается снижение стационарной концентрации P_{700}^+ на свету (рис. VI.3; ср. кривые 3 и 4). Другой источник притока электронов к ФСІ, цепь циклического транспорта электронов, также не активируется анаэробными условиями, о чём говорит сравнение скорости восстановления P_{700}^+ при выключении света в листьях с ингибированной ФСІІ в аэробных и анаэробных условиях, соответственно (рис. VI.4, вверху).

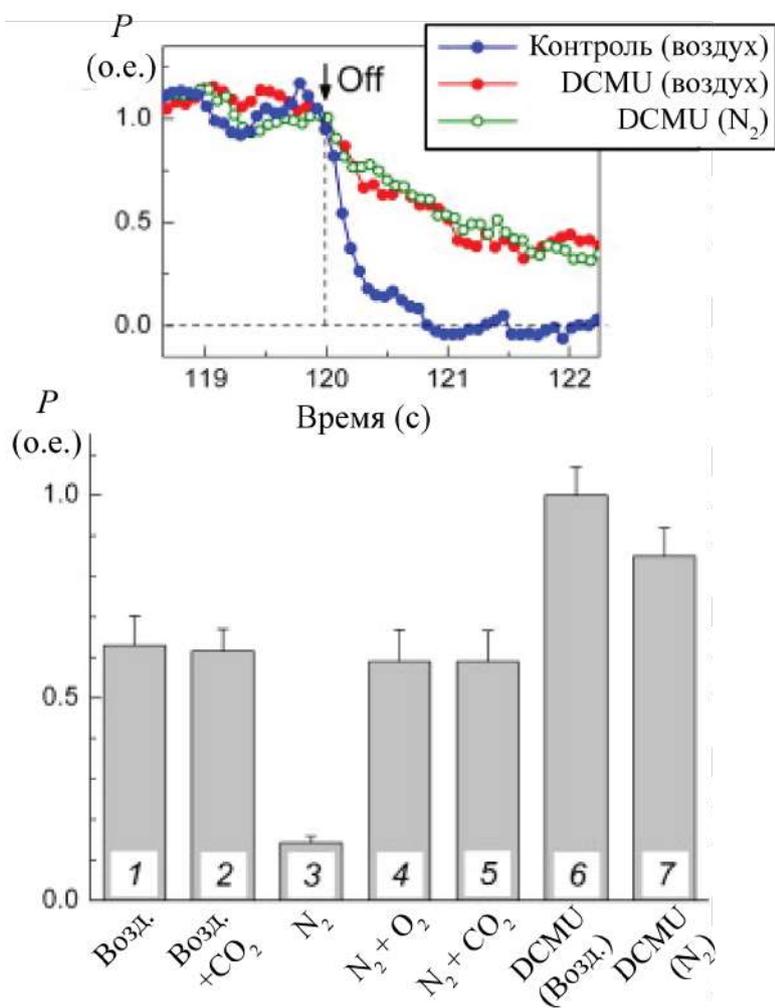


Рис. VI.4. Влияние газового состава атмосферы на стационарное содержание P_{700}^+ (столбцы 1–7 на нижней панели). На верхней панели показана кинетика восстановления P_{700}^+ после прекращения освещения в контрольных листьях и в листьях, инфильтрованных DCMU. Концентрация O_2 в экспериментах, соответствующих столбцам 1, 2, 4 и 6, составляла 21%. Концентрация CO_2 в экспериментах, соответствующих столбцам 2 и 5, составляла 1%.

При этом недостаток кислорода как конечного акцептора электронов, лимитирующего перенос электронов в фЭТЦ, может быть отчасти скомпенсирован увеличением концентрации CO_2 в среде (рис. VI.5).

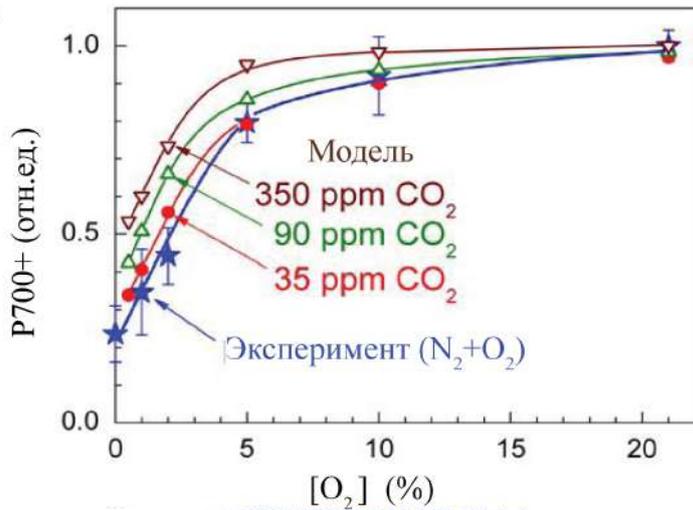


Рис. VI.5. Влияние атмосферного кислорода на стационарную амплитуду сигнала ЭПР от окисленных центров P700+ в листьях *Hibiscus rosa-sinensis* (звездочки на графике; приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего, $n = 4-7$). На графике также показаны зависимости, полученные с помощью математического моделирования для различных концентраций CO₂ (круги и треугольники на графике).

Другой участок, на котором кислород модулирует работу фЭТЦ, это участок между фотосистемами, прежде всего, пул пластохинонов (PQ). В темноте пул PQ окисляется, как нами показано, с характерным временем 5 минут; об этом говорит изменение т.н. «рабочего интеграла» кривой индукции флуоресценции хлорофилла, который пропорционален фактической ёмкости пула акцепторов электронов ФСII (рис. VI.6).

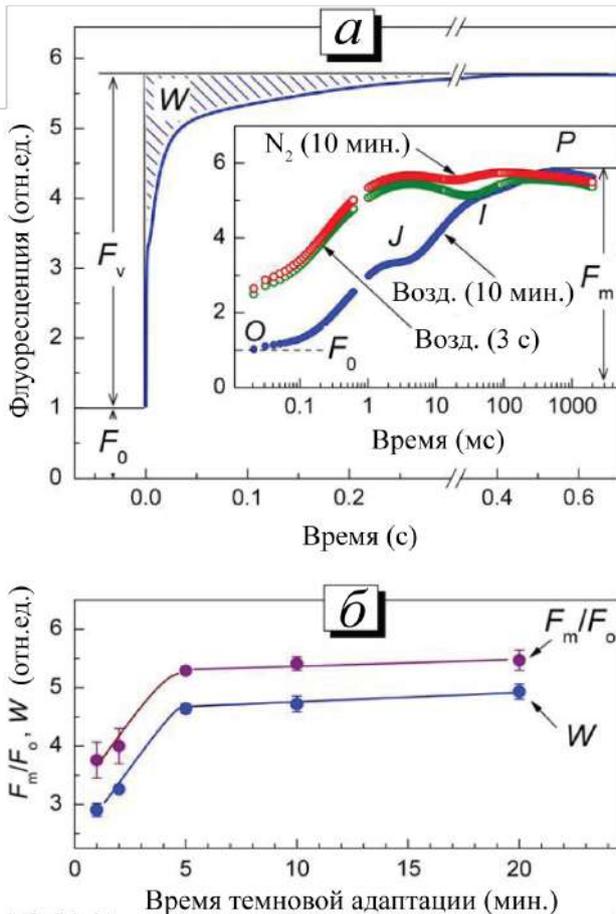


Рис. VI.6. а — быстрая кинетика индукции флуоресценции хлорофилла в листьях *Hibiscus rosa-sinensis*, адаптированных к темноте в нормальной атмосфере (в течение 10 минут или 3 с) или в атмосфере азота (в течение 10 минут). б — зависимость параметров флуоресценции F_m/F_0 и W от времени адаптации листа к темноте в атмосферном воздухе.

Однако в анаэробных условиях за рассмотренные времена (десятки минут) окисления пула PQ практически не происходит, что видно по кинетике ИХФ в листьях, адаптированных к темноте в анаэробных условиях (рис. VI.6).

Таким образом, наличие кислорода в среде оказывается существенным фактором, определяющим работу ЭТЦ в первый период освещения листа после темновой адаптации. Анализ полученных нами данных на основе математической (динамической) модели процессов транспорта электронов показал, что в аэробных условиях (20% O₂) поток электронов на O₂ составляет до 40% от общего потока электронов, проходящих через ФСІ (Кувыкин и др. 2008). Эти оценки хорошо согласуются с данными (Osmond and Grace 1995; Miyake and Yokota 2000; Makino et al. 2002), которые показали, что потенциальный вклад цикла «вода–вода» является достаточно высоким. Как следует из работы (Makino et al. 2002), при нормальных условиях вклад цикла «вода–вода» в поток электронов через ФСІ может достигать 50%, что существенно превышает оценки других исследователей (Asada 1999; Peltier and Cournac 2002; Heber 2005).

В итоге, деаэрация окружающей среды листа приводит к падению квантового выхода фотохимических реакций в ФСІІ (Φ_{PS2}) и, как следствие, к некоторому росту теплового рассеяния поглощённой световой энергии, которое характеризуется коэффициентом нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (q_{NPQ} ; рис. VI.7). Этот эффект, однако, нивелируется повышением содержания CO₂ в среде. Так, при повышении CO₂ до ~0.15% (т.е. в несколько раз выше атмосферного содержания) квантовая эффективность ФСІІ заметно возрастает, а тепловое рассеяние снижается, независимо от аэрированности среды (рис. VI.8).

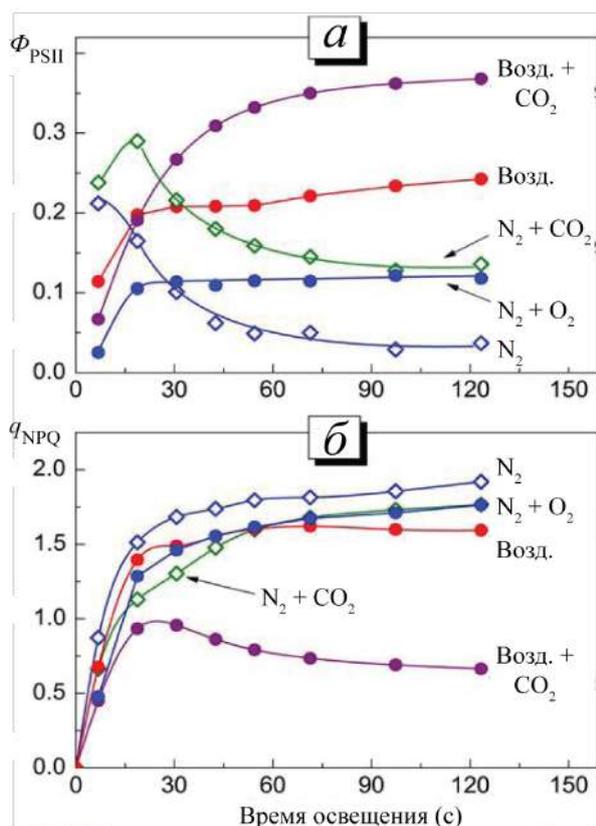


Рис. VI.7. Влияние газового состава атмосферы на кинетику изменений параметров флуоресценции Φ_{PSII} (a) и q_{NPQ} (б) в листьях *Hibiscus rosa-sinensis*. Лист адаптировали к темноте в течение 10 минут в атмосфере одного из следующих составов: 1) N₂ ([O₂] < 0,5%, [CO₂] < 0,005%); 2) N₂ + O₂ ([O₂] = 21%); 3) N₂ + CO₂ ([O₂] < 0,5%, [CO₂] = 0,11 ± 0,01%); 4) воздух; 5) воздух + CO₂ ([CO₂] = 0,15 ± 0,05%).

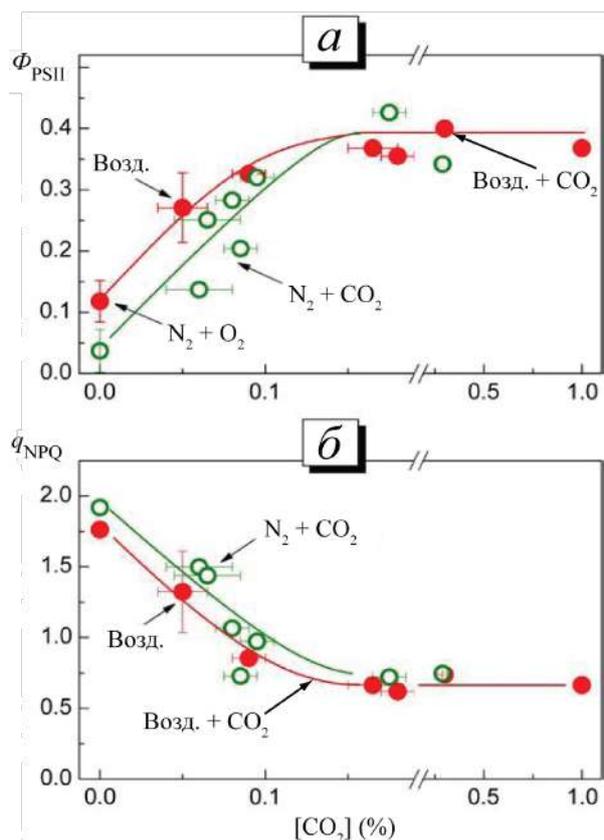


Рис. VI.8. Квазистационарные значения параметров флуоресценции Φ_{PSII} (a) и q_{NPQ} (б) в листьях *Hibiscus rosa-sinensis* в зависимости от концентрации CO₂ в воздухе или в деаэрированной атмосфере (N₂ + CO₂).

VI.3. Влияние высокой концентрации углекислого газа в среде на индукцию нефотохимического тушения

Роль CO₂ в протекании световых реакций фотосинтеза и индукции защитного теплового рассеяния поглощённой световой энергии, как уже было отмечено выше, в целом, также определялась его функцией как конечного акцептора электронов. В этом отношении, на исследованных нами временах порядка минут — десятков минут, CO₂ и O₂ были

«взаимозаменяемы»: увеличение концентрации одного из них компенсировало эффект снижения другого, а удаление обоих газов из среды приводило к драматическому падению скорости переноса электронов через ФСІ (рис. VI.4, VI.5) и ФСІІ (рис. VI.8). Однако при этом концентрация O_2 в среде изменялась от 0 до 21%, в то время как содержание CO_2 — от 0 до 1%. Остаётся не до конца ясным вопрос, насколько быстро и эффективно изменения содержания CO_2 в атмосфере сказываются на его концентрации в хлоропластах листа, какую роль играют CO_2 –буферные системы листа, и т.п.

В связи с этим, действие более высоких концентраций CO_2 на ФСА было изучено нами на клетках микроводорослей, в которых решение отмеченных вопросов не усложнено учётом анатомо-физиологических особенностей листа, таких как состояние устьичного аппарата листа, проводимостью воздухоносных тканей, структурой мезофилла и др. Как было показано ранее в литературе, с ростом концентрации в среде растворённого CO_2 , скорость фотосинтеза возрастает лишь в относительно небольшом диапазоне концентраций CO_2 (до нескольких процентов в воздухе, уравновешенном с суспензией), после чего начинается угнетение фотосинтетической активности. CO_2 -толерантные виды, способные расти при экстремально высоких концентрациях CO_2 (выше 40%), также были обнаружены, хотя такая способность, по-видимому, мало распространена в природе (Miyachi et al. 2003). В наших экспериментах мы исследовали CO_2 -толерантный вид *Desmodesmus sp.* при концентрации CO_2 20%, что близко к экстремально высоким значениям, угнетающим рост большинства водорослей.

Начало инкубации клеток в CO_2 -обогащённой среде приводило к некоторому падению квантовой эффективности ФСІІ (Φ_{PSII} ; рис. VI.9). Падение Φ_{PSII} сопровождалось значительным тушением флуоресценции хлорофилла, как в условиях открытых центров ФСІІ (F_o), так и закрытых (F_m). Однако, спустя некоторое время (в минутной шкале), генерация

тушения флуоресценции останавливалась, и начинался постепенный рост (в шкале десятков минут) F_0 , F_m и Φ_{PSII} . Как было показано в наших экспериментах, тушение флуоресценции хлорофилла было вызвано CO_2 -зависимым снижением pH среды с характерных для этих водорослей щелочных значений до приблизительно pH 6.5 (рис. VI.9z). Существенное увеличение pH-буферной ёмкости среды инкубации перед её насыщением CO_2 снимало всю описанную динамику адаптации ФСА водорослей к высокому уровню CO_2 . При этом тушение флуоресценции коррелировало с pH среды (рис. VI.10a). Более того, аналогичное тушение флуоресценции хлорофилла, коррелирующее с pH, нами было получено в отсутствие избыточного CO_2 , за счёт изменений pH среды инкубации водорослей соляной кислотой (рис. VI.10б).

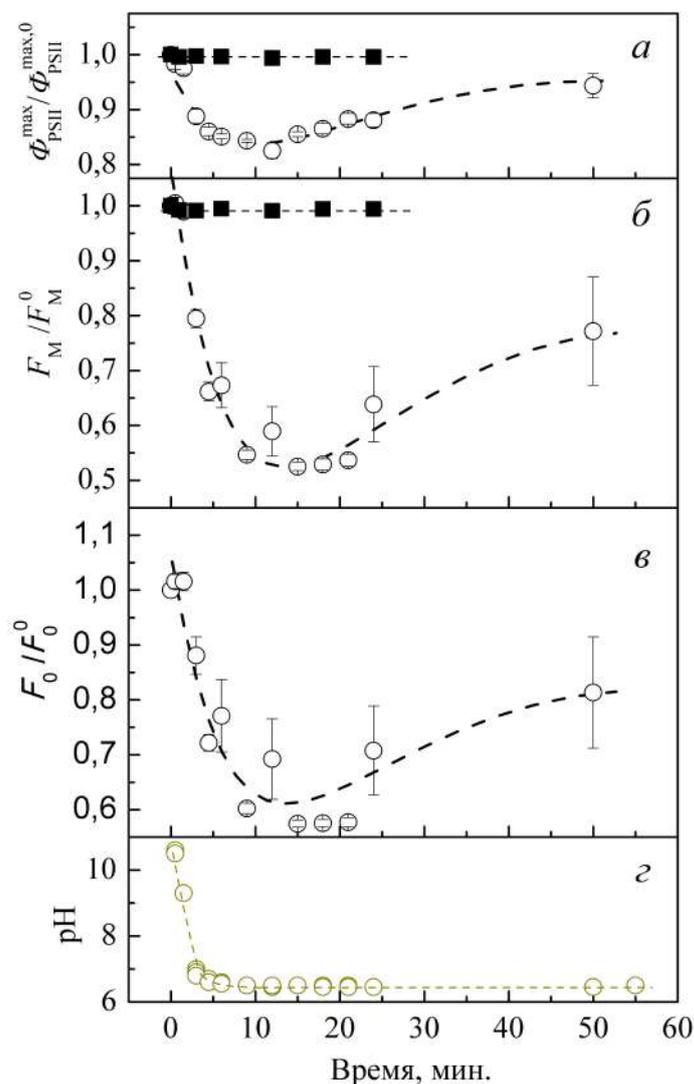


Рис. VI.9. Кинетика изменений квантовой эффективности ФСП, $\Phi_{PSII}^{max}/\Phi_{PSII}^0$ (a), максимальной световой (б) и темновой (в) флуоресценции, а также pH среды инкубации (z), индуцированных высоким содержанием CO_2 в среде инкубации. Чёрными квадратами показана контрольная суспензия. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего (n = 3–5).

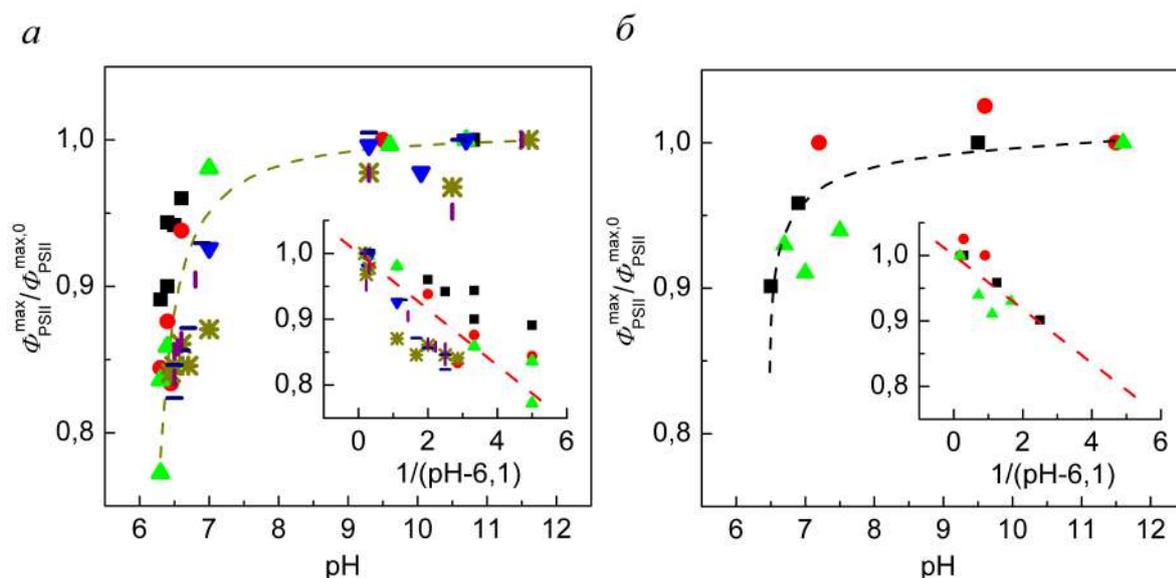


Рис. VI.10. Зависимость снижения квантовой эффективности ФСII, $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max,0}}/\Phi_{\text{PSII}}^0$, от изменений рН среды инкубации, индуцированных высоким содержанием CO_2 в среде инкубации (а) или добавлением HCl (б). Различные символы соответствуют разным сериям измерений. Прямые линии на врезках показывают графики линейной аппроксимации $y = 1 + Bx$, где y — относительная квантовая эффективность ФСII, $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max,0}}/\Phi_{\text{PSII}}^0$, а x — эмпирическая функция рН, $1/(\text{pH}-6,1)$.

Подчеркнём, однако, что динамика тушения флуоресценции, очевидно, не определялась «простым» физико-химическим механизмом действия рН. Так, падение рН среды происходило заметно быстрее, чем снижение флуоресценции (рис. VI.9б). Также, после снижения до рН 6.5, кислотность среды больше не изменялась (в часовом интервале времён), в то время как падение флуоресценции сменялось ростом (на восходящей ветви кинетики изменений F_o , F_m и Φ_{PSII} корреляция между этими величинами и рН исчезала). Таким образом, в то время как первый период адаптации клеток к высокой концентрации CO_2 и обусловленной ею низким рН среды может иметь «чистую» физико-химическую компоненту, в дальнейшем изменения характеристик ФСА определяются внутренними регуляторными процессами в клетках микроводорослей. На это указывают также данные по изменениям F_o , F_m и Φ_{PSII} в тех же условиях у клеток *Chlorella vulgaris*, для которых не характерна CO_2 -толерантность. У *C. vulgaris* также наблюдается быстрое снижение перечисленных параметров в начале инкубации при

высокой концентрации CO_2 , однако последующего их роста в случае *C. vulgaris* не происходит.

Таким образом, при рассмотрении эффектов повышения концентрации CO_2 необходимо, кроме его непосредственной электрон-акцепторной функции, также учитывать его влияние на pH среды. В случае микроводорослей, нами было показано, что так называемая CO_2 -толерантность, в действительности, определяется их pH-толерантностью.

VI.4. Выводы

1. Наряду с CO_2 , кислород играет существенную роль на акцепторном участке ЭТЦ, являясь конечным акцептором.

2. Удаление обоих конечных акцепторов из среды приводит к торможению реакций переноса электронов за счёт снижения нециклического и псевдоциклического транспорта электронов.

3. Инкубация в анаэробных условиях ингибирует темновое окисление пула PQ между фотосистемами. Характерное время полуокисления пула PQ в аэробных условиях в листьях высших растений составляет несколько минут (по данным ИХФ в ФСII и кинетики окисления P700 в ФСI).

4. Удаление кислорода не активирует циклический транспорт электронов.

5. Повышение концентрации CO_2 в интервале до 1% приводит к росту рабочей эффективности ФСII (Φ_{PSII}).

6. Более высокие концентрации CO_2 в среде (до 20%) приводят к падению (Φ_{PSII}) и тушению флуоресценции за счёт закисления среды.

7. Устойчивость фотосинтетических организмов к повышенным концентрациям CO_2 , в действительности, определяется их устойчивостью к низким pH.

VII. Глава 7. Индукция светового стресса и активность ФСА в растениях в природных условиях, в присутствии поллютантов и экзогенных антиоксидантов.

VII.1. Аннотация главы⁵

Здесь приведены результаты исследований защитных реакций ФСА в ответ на стрессовые воздействия, не имеющей чёткой классификации: сезонные факторы в жизни дикорастущих растений и антропогенное загрязнение их местообитаний. Проведён анализ наиболее часто используемых биофизических показателей состояния ФСА, показаны области их чувствительности к разным стрессовым условиям, сделаны рекомендации о применении различных показателей. В эту же главу включены данные по действию проникающих антиоксидантов на устойчивость ФСА по отношению к световому стрессу.

⁵ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. Глазунова С.А., Птушенко В.В., Гунар Л.Э., Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н. Медленная индукция флуоресценции и CO₂-обмен листьев бобов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* // Биофизика. – 2009. – Т. 54. – № 3. – С. 492-494. – DOI: 10.1134/S0006350909030154 (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) (WoS JIF 0.43 / 0.15 п.л. / **0.05 п.л.**)
2. Птушенко В.В., Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н. Биофизические методы экологического мониторинга. Фотосинтетические показатели листьев древесных растений в условиях города Москвы // Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 2. – С. 313-320. – DOI: 10.1134/S0006350913020152 (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) (WoS JIF 0.43 / 0.5 п.л. / **0.25 п.л.**)
3. Птушенко В.В., Птушенко О.С., Тихонов А.Н. Индукция флуоресценции, содержание хлорофилла и цветовые характеристики листьев как показатели старения фотосинтетического аппарата древесных растений // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – № 3. – С. 338–352. – DOI: 10.1134/S0006297914030122 (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) (WoS JIF 2.8 / 0.94 п.л. / **0.63 п.л.**)
4. 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., Samoiloa 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.**)

VII.2. Индукция светового стресса и активность ФСА у древесных растений в осенний период

Растениям, произрастающим в естественной среде в средней полосе, приходится сталкиваться с такими стрессовыми факторами, как загрязнение атмосферы и почвы продуктами сгорания топлива, гербицидами и другими веществами сельскохозяйственного назначения, и др. Такие факторы, как правило, плохо поддаются формализации по причине отсутствия точных данных о существующих загрязнениях, недостаточной разработанности простых и дешёвых экспресс-методов их оценки, а также большому разнообразию действующих веществ. С другой стороны, физиологическое состояние ФСА модулируется сезонными изменениями. В этой связи, для эффективного применения биофизических показателей для оценки физиологического состояния ФСА в условиях стрессового воздействия необходим предварительный анализ естественной изменчивости рассматриваемых показателей, их сезонных изменений, а также их чувствительности в разных стрессовых условиях. С этой целью нами был выполнен ряд работ на наиболее распространённых видах древесных (липа, клён, рябина, лиственница, ель, сосна и др.) и сельскохозяйственных (бобы) растений.

Так, по нашим данным для десяти видов древесных растений средней полосы, включая лиственные и хвойные, значения максимальной активности ФСА, Φ_{PSII}^{\max} , очень стабильны: обладают незначительной дисперсией ($SD = 0,012 \div 0,034$), средние значения лежат для разных видов в диапазоне 0,822–0,855 (рис. VII.1, VII.2). При этом листья, начинающие желтеть, и визуально отличимые от основной массы, дают широкое распределение Φ_{PSII}^{\max} от 0 до 0,8 (рис. VII.2). Однако это снижение Φ_{PSII}^{\max} наблюдается фактически лишь при очень существенном снижении содержания хлорофилла в листе (см. рис. VII.3a), иными словами, остаётся практически нечувствительным к деградации хлорофилла листа в очень

широком диапазоне его концентраций. В то же время, в период массового пожелтения листьев (в октябре) тот же параметр становится заметно чувствительнее к деградации хлорофилла в листе (рис. VII.3б).

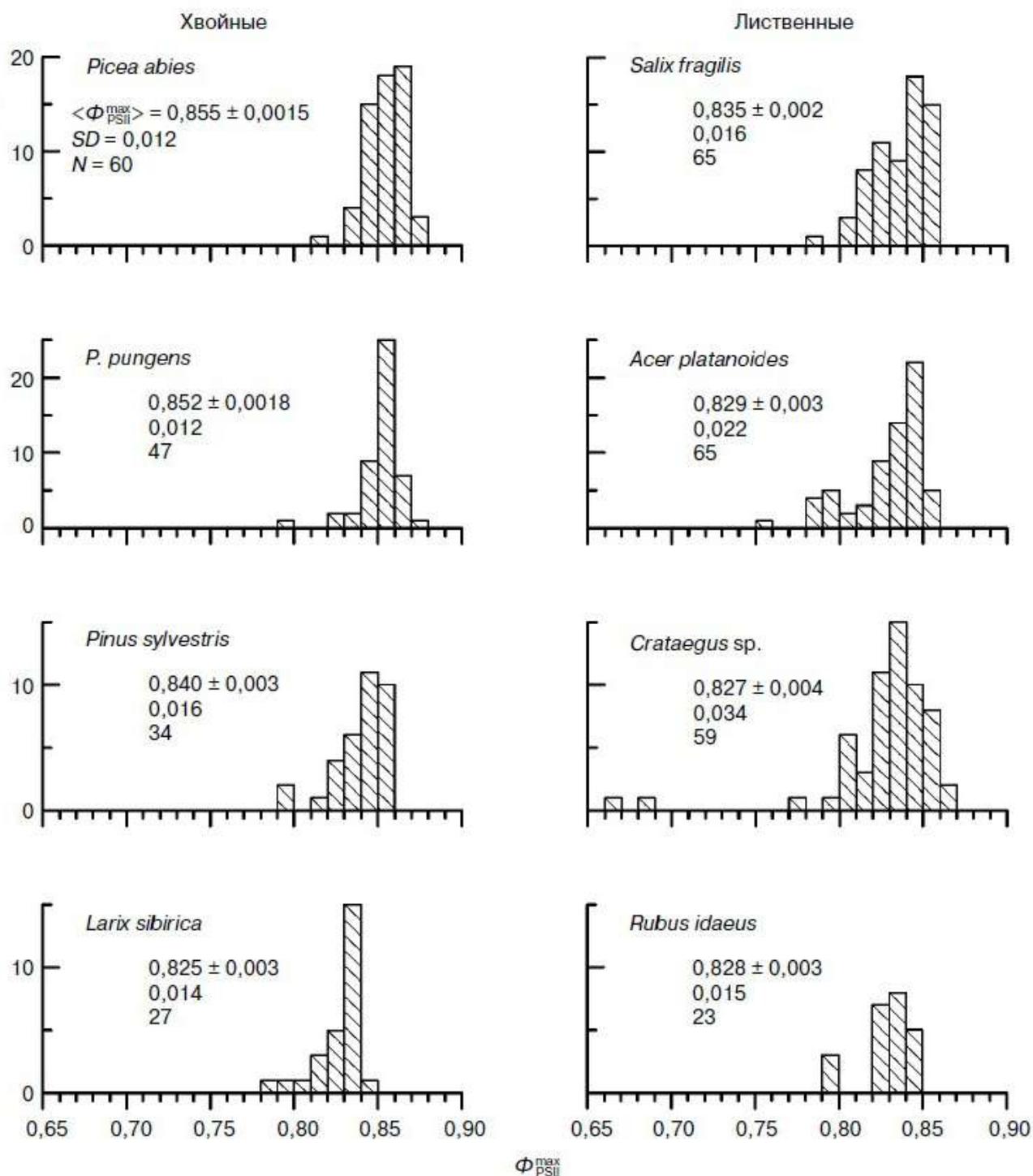


Рис. VII.1. Гистограммы распределения максимальной (темноадаптированной) эффективности ФСП, Φ_{PSII}^{max} , в листьях хвойных и лиственных древесных растений средней полосы по данным измерений в августе. На каждой гистограмме подписаны среднее значение Φ_{PSII}^{max} и его стандартная ошибка, среднее отклонение величины Φ_{PSII}^{max} и число измерений.

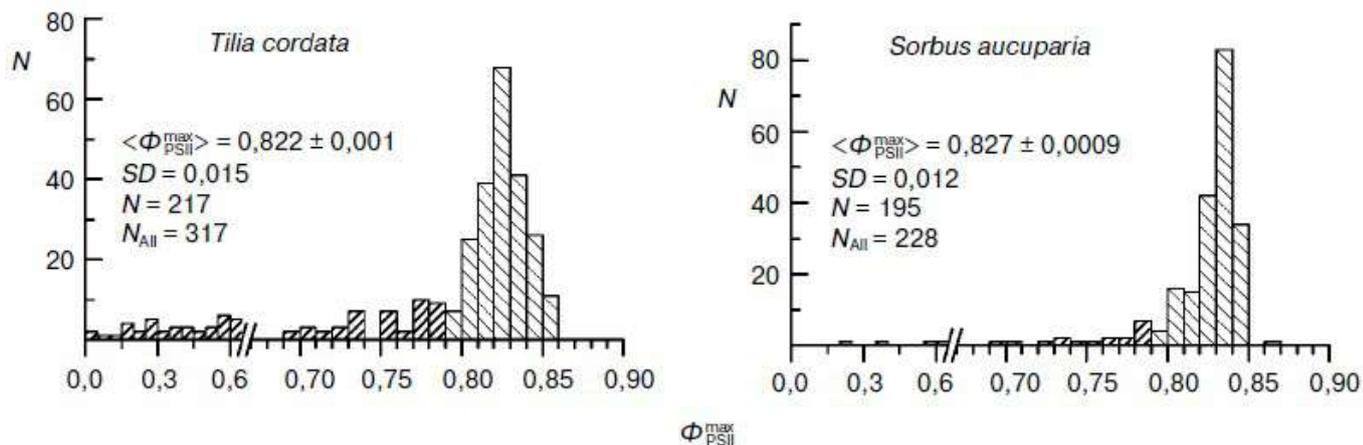


Рис. VII.2. Гистограммы распределения величины максимальной (темноадаптированной) эффективности ФСП, $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}$, в листьях древесных растений средней полосы по данным измерений в августе–сентябре: липа сердцевидная (*Tilia cordata* Mill.), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.). Столбцами с плотной штриховкой показаны данные, полученные по листьям, начинающим желтеть. На каждой гистограмме подписаны среднее значение $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}$ и его стандартная ошибка, среднее отклонение величины $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}$, число измерений на зеленых листьях (N) и общее число измерений (N_{All})

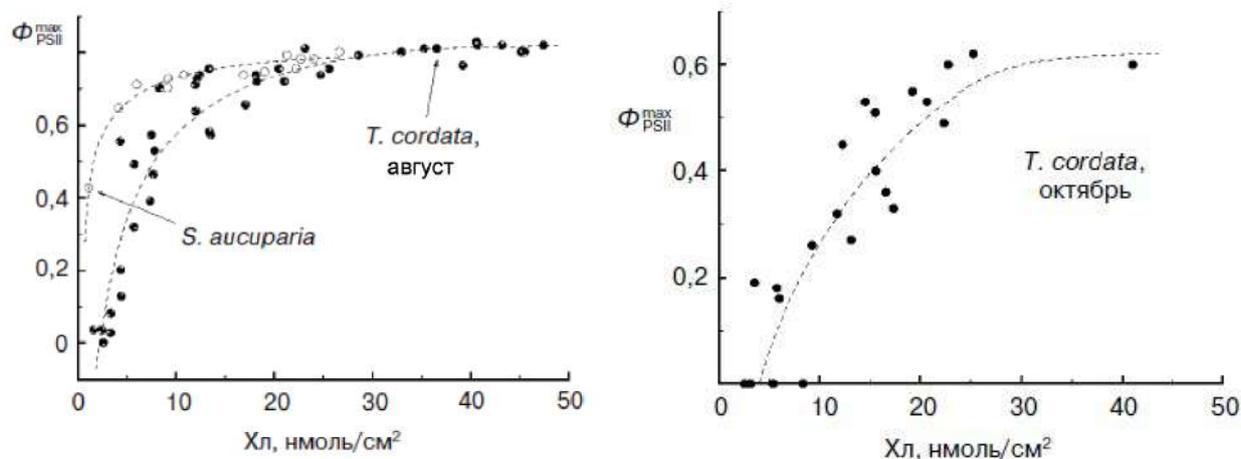


Рис. VII.3. Зависимость параметра $\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}$ от содержания хлорофилла в листьях липы сердцевидной по данным измерений в августе (слева) и в период массового пожелтения листьев (в октябре; справа)

Выбор других параметров (например, R_{Fd}) позволяет ещё более повысить чувствительность данных флуоресцентного анализа к степени деградации ФСА листа в осенний период (рис. VII.4).

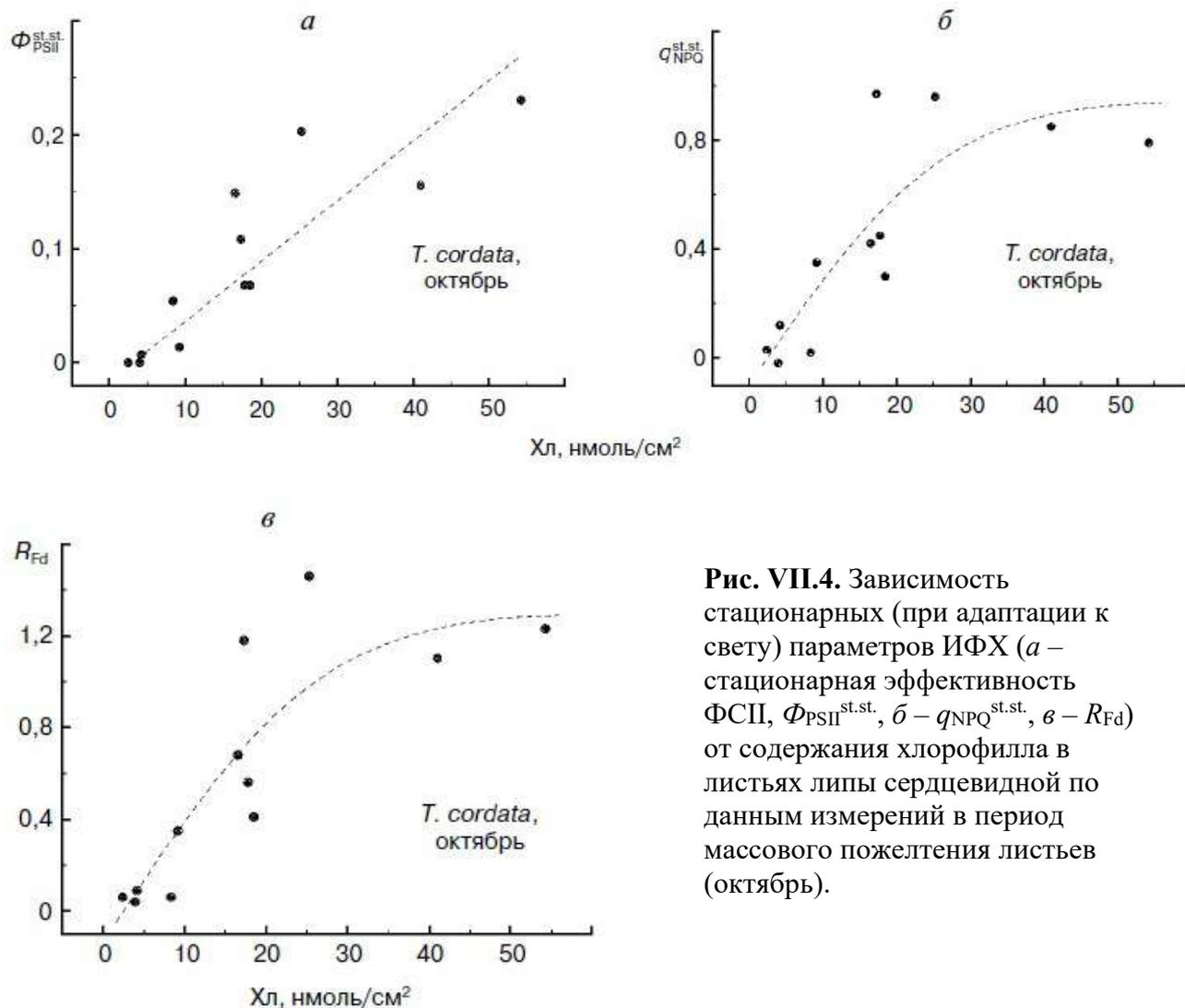


Рис. VII.4. Зависимость стационарных (при адаптации к свету) параметров ИФХ (*a* – стационарная эффективность ФСП, $\Phi_{PSII}^{st.st.}$, *б* – $q_{NPQ}^{st.st.}$, *в* – R_{Fd}) от содержания хлорофилла в листьях липы сердцевидной по данным измерений в период массового пожелтения листьев (октябрь).

VII.3. Анализ чувствительности биофизических параметров листьев к действию поллютантов

Наши попытки использовать параметр R_{Fd} для оценки состояния ФСА в условиях загрязнения атмосферы и почвы показали, что в этом случае он также может быть достаточно чувствительным индикатором. Так, для растений рябины (*Sorbus aucuparia*), произрастающих на разных расстояниях от автомагистрали с интенсивным движением, параметр R_{Fd} систематически изменялся по мере удаления растения от автомагистрали (см. рис. VII.5; на рис. VII.5б вместо R_{Fd} отложен аналогичный параметр $F_M/F_T = R_{Fd} + 1$). На первый взгляд, парадоксальным выглядит знак

изменения R_{Fd} — возрастание по мере приближения к источнику загрязнения, в то время как стрессовые условия должны приводить к его снижению (Lichtenthaler et al. 1986, 2005; Karavaev et al. 1998; Roháček 2002). Однако параллельно полученные данные по другим биофизическим показателям позволяют дать объяснение этому неожиданному эффекту. Листья растений вблизи автомагистрали характеризуются относительно короткой фазой светозависимого окисления ФСІ (рис. VII.6). Как показывает математическое моделирование реакций переноса электронов в ЭТЦ, длительность фазы окисления ФСІ определяется необходимостью активации реакций, ответственных за использование продуктов световой фазы фотосинтеза и ассимиляцию углерода (прежде всего, цикла Кальвина) с началом освещения после адаптации ФСА к темноте (Kuvykin et al. 2011). Таким образом, листья растений вблизи магистрали характеризуются сниженной темновой дезактивацией цикла Кальвина и/или хлоропластных АТФ-синтаз, что может быть связано, например, с присутствием редокс-активных примесей в выхлопах автотранспорта (гидрид серы, оксида азота и др.). Перманентная активированность цикла Кальвина может приводить (при условии, что другие воздействия негативного характера на ФСА незначительны) к росту интегральной ассимиляции углерода в течение нескольких минут освещения листа, адаптированного к темноте, в условиях эксперимента. При этом, в литературе была показана корреляция R_{Fd} со скоростью ассимиляции углерода листьями, P_N (Lichtenthaler et al. 2005), что объясняет наблюдаемую нами тенденцию изменений R_{Fd} с расстоянием от автомагистрали. Заметим также, что наблюдаемые эффекты не связаны с возможными различиями в затенённости листьев. Так, в работе на лабораторных растениях с контролируемым освещением нами было показано, что изменение интенсивности освещения приводит к изменению соотношения коротко- и длинноволнового пиков флуоресценции хлорофилла в листе (см. рис. IV.14). Однако в данном случае изменения соотношения интенсивности пиков флуоресценции не наблюдалось

(рис. VII.7). При этом, однако, близость автомагистрали, наряду с подавлением темновой инактивации цикла Кальвина, может вызывать повреждения ФСА, что можно выявить по росту площади высокотемпературного пика С (60–80°C) кривой термолюминесценции (ТЛ) (рис. VII.8). Интенсивность этого пика является той характеристикой спектра ТЛ, которая наиболее чувствительна к повреждениям фотосинтетического аппарата растений (Солнцев 1989; Johnson and Krieger 1994).

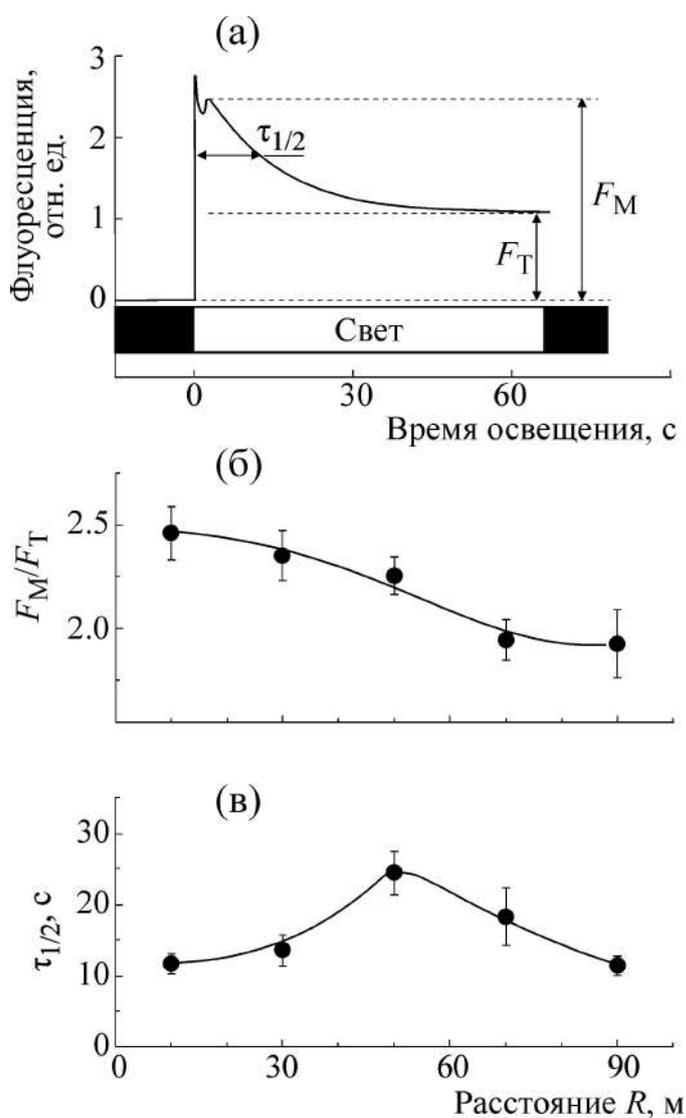


Рис. VII.5. (а) – Кинетика медленной индукции флуоресценции хлорофилла в листе рябины. (б) – Зависимость отношения F_M/F_T от удаленности места произрастания растения от перекрестка. (в) – Зависимость параметра $\tau_{1/2}$ от удаленности места произрастания растения. Определение параметров F_M/F_T и $\tau_{1/2}$ дано на панели (а). На панелях (б) и (в) приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 7-17$).

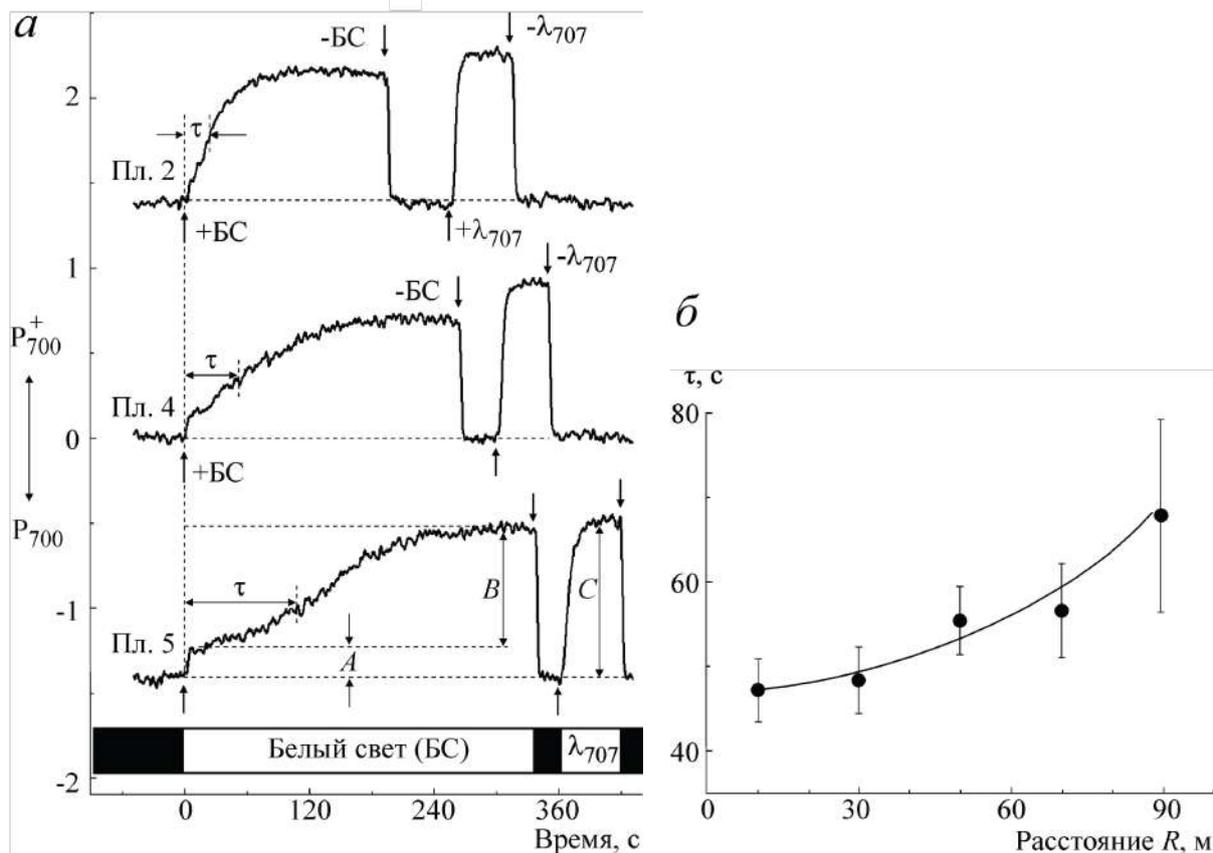


Рис. VII.6. (а) – Кинетики фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР I (пропорционального концентрации окисленных центров P_{700}^+) в листьях рябины (*S. aucuparia*), срезанных с растений на экспериментальных площадках № 2, 4 и 5, удаленных от перекрестка на расстояния 30, 70 и 90 м, соответственно. Вертикальными стрелками показано включение и выключение белого света (БС) или дальнего красного света с длиной волны вблизи 707 нм, возбуждающего преимущественно ФСИ (λ_{707}). (б) – Зависимость кинетического параметра τ в листьях рябины от удаленности места произрастания растения от перекрестка. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 9-36$).

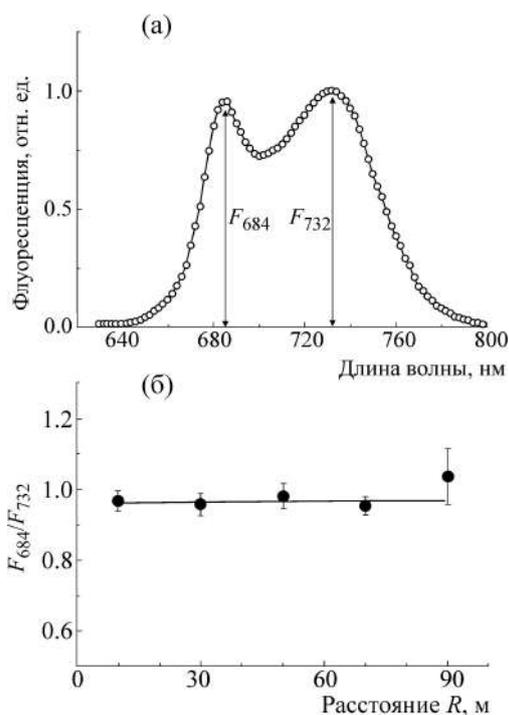


Рис. VII.7. (а) – Типичный спектр флуоресценции листьев рябины; (б) – зависимость отношения величин коротко- и длинноволнового пиков, F_{684}/F_{732} , от удаленности места произрастания растения от перекрестка. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 6-16$).

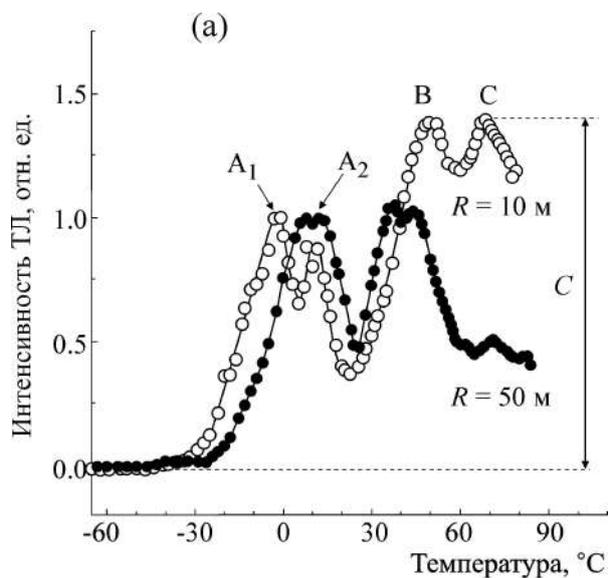
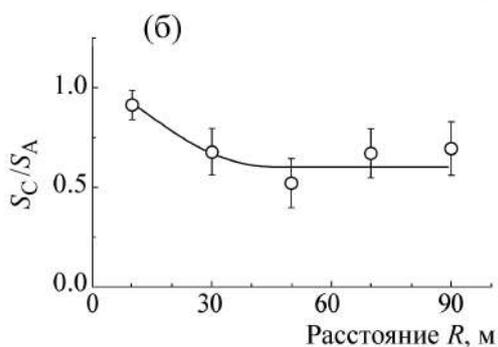


Рис. VII.8. (а) – Типичные спектры термолуминесценции (ТЛ) листьев растений рябины, произраставших на разной удаленности (R) от перекрестка ($R = 10$ и 50 м). (б) – Зависимость отношения светосумм полос ТЛ $S_C/(S_{A1}+S_{A2})$ от R . Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).



VII.4. Индукция светового стресса в присутствии экзогенных антиоксидантов

Поскольку световой стресс представляет опасность для растения вследствие возникновения при избыточном освещении активных форм кислорода (АФК) и последующего развития окислительного стресса, мы предприняли исследования воздействия антиоксидантов на устойчивость ФСА растений к световому стрессу. Эксперименты были проведены на изолированных хлоропластах растений и на различных культурах клеток микроводорослей (*Chlorella vulgaris*, *Lobosphaera incisa*, *Haematococcus pluvialis*) и показали сходные результаты. Были использованы проникающие антиоксиданты (то есть способные легко проникать через

мембраны клетки и органелл), принадлежащие ряду SkQ, в первую очередь SkQ1, являющийся тетрафенилфосфониевым производным пластохинона (рис. VII.9). Эксперименты показали, что действие SkQ зависит не только от его концентрации в среде, но от соотношения содержания в среде SkQ и клеток водорослей, поэтому все ключевые эксперименты были выполнены при стандартизованных концентрациях клеток. Ниже мы будем говорить о концентрации SkQ как об определяющем факторе, отвлекаясь от роли соотношения SkQ и его «мишеней».

При концентрации SkQ в среде ниже 1 мкМ заметного влияния SkQ на устойчивость ФСА к воздействию излучения высокой интенсивности не было. При концентрации выше 1 мкМ SkQ возникали одновременно разнонаправленные действия на ФСА. Так, в исследованиях с аналогом SkQ, не содержащим редокс-группы (хинонного кольца; C12TPP, рис. VII.9), было показано, что чувствительность клеток к интенсивному освещению существенно возрастает (рис. VII.10), что может быть связано с негативным воздействием липофильного компонента SkQ на структуру фотосинтетических мембран. В то же время полноценная молекула агента, содержащая и «транспортную» липофильную, и антиоксидантную части, обеспечивала устойчивость ФСА к интенсивному свету, сравнимую с контролем (рис. VII.10). Это может говорить о том, что редокс-группа антиоксиданта оказывает стабилизирующее воздействие на ФСА.

Исследование механизма возможного стабилизирующего влияния SkQ на ФСА выявило наличие ряда ингибиторных эффектов SkQ по отношению к ФСА, а точнее, к ФСII, которые, тем не менее, могут предохранять ФСА в целом от стремительного АФК-зависимого разрушения при интенсивном освещении. Так, было показано снижение активности выделения кислорода клетками в присутствии SkQ (рис. VII.11). Было установлено, что это снижение кислород-выделяющей активности обусловлено ингибированием ФСII не на акцепторной, а на донорной стороне, т.е. ингибированием восстановления первичного донора ФСII P680+ от водорасщепляющего

комплекса (ВРК). Об этом свидетельствует возникновение долгоживущего (в субсекундной шкале времени) светоиндуцируемого сигнала ЭПР окисленного тирозина D1-Tyr-161 (Y_Z^{ox}) (рис. VII.12), как было показано в (Mamedov et al. 1998a). Ингибирование ВРК приводит к накоплению окисленного первичного донора ФСII P680+, что видно из появления в оптическом спектре поглощения суспензии клеток компоненты, принадлежащей P680+ (рис. VII.13). По-видимому, как P680+ (Butler 1972) или другие катион-радикалы хлорофилла (Schweitzer and Brudvig 1997), так и непосредственно SkQ (Evstigneev and Krasnovsky 1948; Livingston and Ke 1950; Bukhov et al. 2003), взаимодействуя с фотосинтетической антенной, тушат возбуждённые формы хлорофилла, что проявляется в существенном тушении флуоресценции хлорофилла в присутствии SkQ.

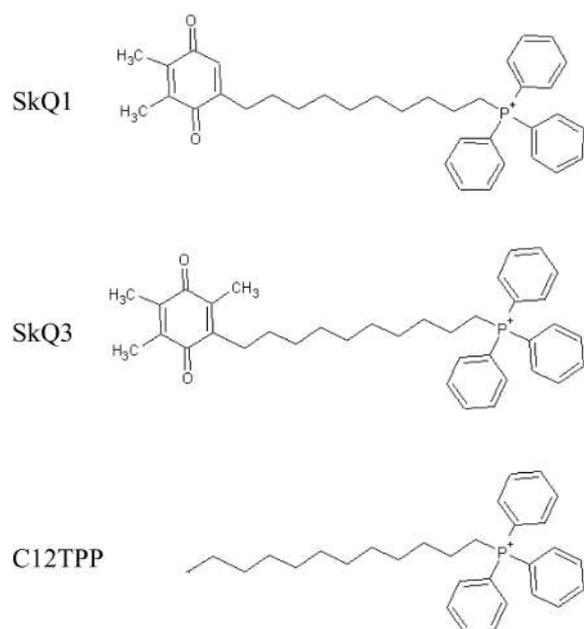


Рис. VII.9. Молекулы проникающих антиоксидантов SkQ1 и SkQ3 и их аналог C12TPP, не имеющий редокс-группы.

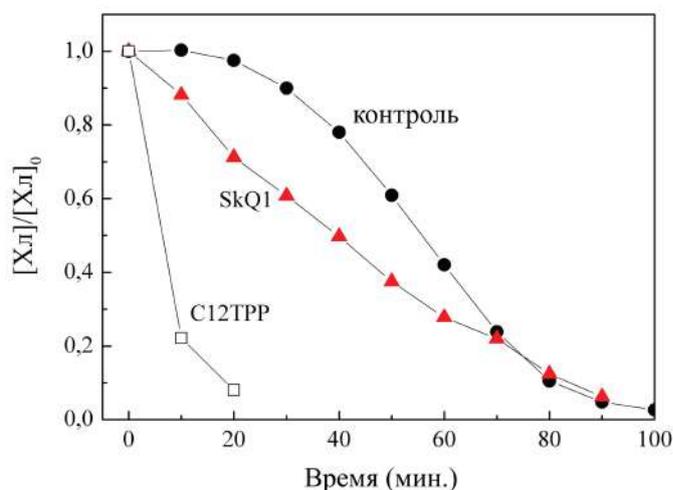


Рис. VII.10. Кинетика фотовыцветания хлорофилла в клетках культуры микроводоросли *C. vulgaris* при высокой интенсивности света ($2000 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) в контрольной суспензии (черные круги), в присутствии 300 мкМ SkQ1 (красные треугольники) или его аналога C12TPP, не имеющего редокс-группы (открытые квадраты). Показаны типичные кривые.

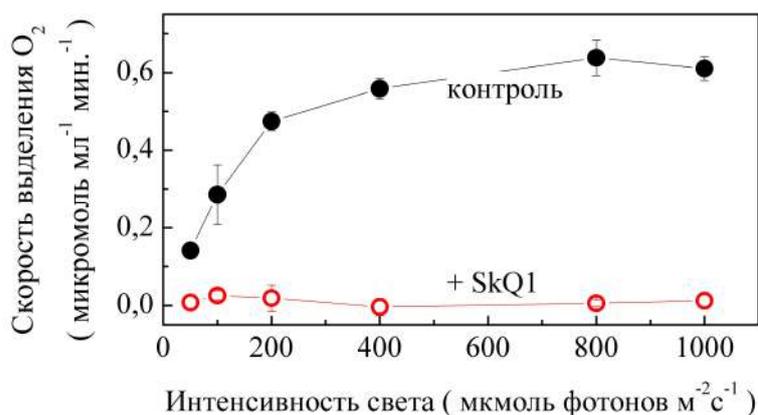


Рис. VII.11. Световые кривые выделения кислорода культурой микроводоросли *C. vulgaris* в контрольной суспензии (черные круги), в присутствии 300 мкМ SkQ1 (открытые круги). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 2$ для контрольной суспензии и $n = 4$ для суспензии, обработанной SkQ1).

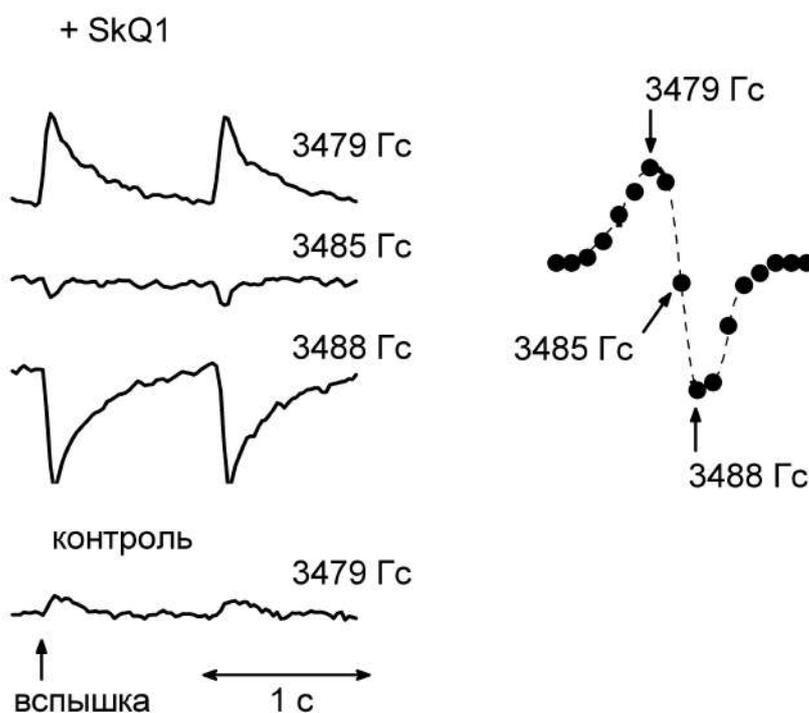


Рис. VII.12. Кинетика исчезновения фотоиндуцированного (в ответ на вспышку) сигнала ЭПР окисленного тирозина D1-161 (Y_Z^{ox}) в суспензии клеток *C. vulgaris* в присутствии SkQ1 (вверху) и в контроле (внизу). Каждая кривая является результатом усреднения по 42 циклам ответа на вспышку. Магнитное поле 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).

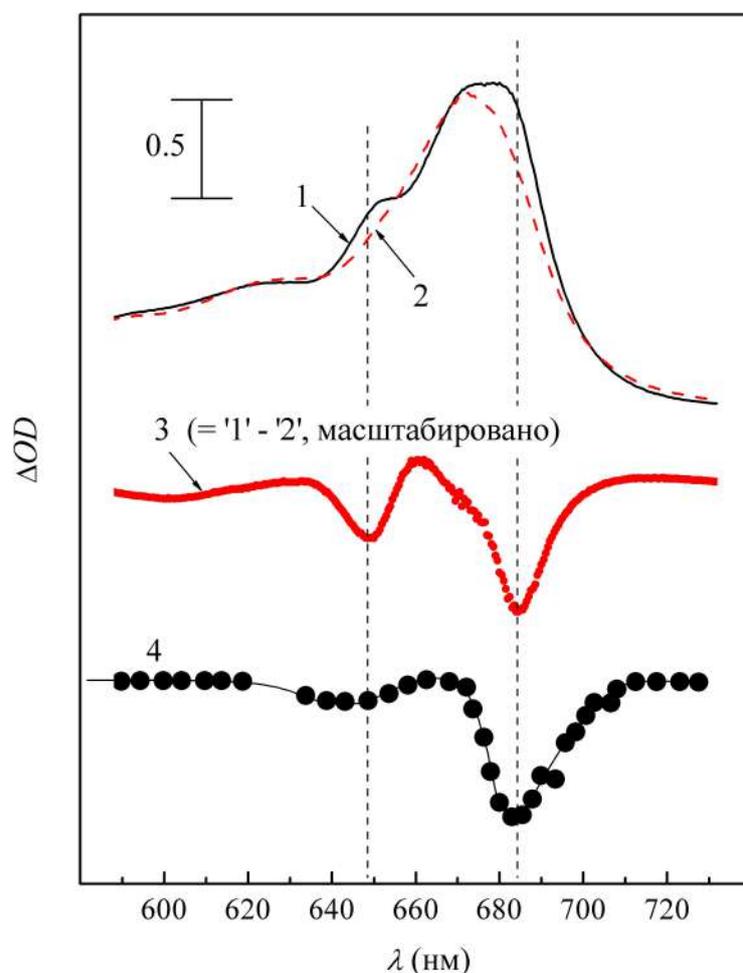


Рис. VII.13. Спектры оптического поглощения суспензии клеток *C. vulgaris* контрольной (кривая 1), в присутствии 300 мкМ SkQ1 (кривая 2) и их разность (кривая 3, увеличен масштаб). Показан также сигнал выцветания P_{680}^+ bleaching spectrum (Witt 1991) (кривая 4). Показаны типичные спектры.

Таким образом, SkQ одновременно ингибирует выделение кислорода и препятствует накоплению возбуждённых форм хлорофилла, взаимодействие которого с молекулярным кислородом приводит к образованию синглетного кислорода, порождающего в дальнейшем другие АФК (Krieger-Liszka 2005). Тем самым, SkQ, наряду с очевидно негативным действием — ингибированием нециклического транспорта электронов в хлоропластах — также одновременно снижает возможности для образования АФК в ФСА клетки и препятствует развитию окислительного стресса. Здесь нужно подчеркнуть, что подавление генерации АФК за счёт проникающих антиоксидантов ряда SkQ было показано и в работах других авторов (Samuilov et al. 2019), однако в

описанных случаях оно было связано именно с действием аниоксидантов на процессы образования АФК в митохондриях. Кроме того, в изученных до сих пор случаях в воздействия SkQ на растения антиоксидантный (пластохиноновый) модуль молекулы не играл определяющей роли (Дзюбинская и др. 2013; Долгих и др. 2013). В то же время, предполагается, что SkQ в тех же концентрациях не оказывает заметного действия на ФСЦ (Самуилов и Киселевский 2015). Возможно, такое действие SkQ удастся в дальнейшем использовать в методических целях для отключения ФСЦ у растений без существенного влияния на другие компоненты ФСА и без вызванного развитием окислительного стресса быстрого повреждения ФСА в целом.

Поскольку фотопротекторная составляющая действия SkQ на ФСА отчасти связана с тушением возбуждённых состояний хлорофилла, мы также попытались проанализировать вопрос о локализации центра тушения (в фотосинтетической антенне или в реакционном центре (РЦ)) на основе данных о тушении флуоресценции хлорофилла. Для этого мы воспользовались простой моделью релаксации энергией возбуждения в антенне и в РЦ и обмена между ними, предложенной Буховым и др. (Bukhov et al. 2001). Данная модель может быть представлена схемой, приведённой на рис. VII.14, и описана следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{d[Chl^*]}{dt} = I\sigma - (k_{10} + k_{1Z} + k_{12})[Chl^*] + k_{21}[P^*] \\ \frac{d[P^*]}{dt} = k_{12}[Chl^*] - (k_{20} + k_{2Z} + k_{21} + k_{23})[P^*] + k_{23}\alpha[P^+I^-] \\ \frac{d[P^+I^-]}{dt} = k_{23}[P^*] - (k_{30} + k_{3Z} + k_{23}\alpha + k_{34})[P^+I^-] \end{cases} \quad (VII.1)$$

где $[Chl^*]$ и $[P^*]$ обозначают концентрации возбуждённых молекул хлорофилла в антенне и в РЦ, соответственно, а $[P^+I^-]$ — концентрацию первичных ион-радикальных пар, возникающих в результате разделения зарядов в РЦ.

Отметим, что тушение флуоресценции хлорофилла, обусловленное катион-радикалом первичного донора ФСII P680+, в этой модели следует отнести к тушению возбуждения в антенне, поскольку взаимодействие Chl* с P680+ должно приводить к дополнительному члену $-k_{12}'[P680+][Chl*]$ в первом уравнении, которое проявится как увеличение эффективного значения k_{1Z} . В то же время, нельзя исключить взаимодействие P680+ с возбужденными молекулами хлорофилла в РЦ и/или с первичными ион-радикальными парами, образовавшимися в результате разделения зарядов (например, расположенными в соседних РЦ внутри суперкомплексов ФСII). Эта модель позволяет различить тушение в антенне и в РЦ с помощью анализа соотношения между тушением флуоресценции в открытых (q_0) и закрытых РЦ (q_N). На рис. VII.15 показаны кривые $q_0 - q_N$, предсказанные моделью Бухова и др. и соответствующие тушению только в антенне (кривая 1), только в РЦ (кривая 3), или же в условиях, когда вклад от центров тушения в антенне и в РЦ одинаков (кривая 2). На этот же график нанесены экспериментальные точки, соответствующие различным концентрациям SkQ1 или восстановителей P680+, добавленных на фоне SkQ1 и снижающих наблюдаемое тушение. Результаты сопоставления теоретических кривых и экспериментальных данных показывают, что НФТ, индуцированное добавлением в культуру клеток проникающего антиоксиданта SkQ1, скорее, развивается как за счёт тушения в антенне, так и в РЦ, причём их вклады могут зависеть от интенсивности тушения. Так, при небольшой интенсивности тушения всё оно происходит, по-видимому, в антенне. При увеличении его интенсивности за счёт увеличения концентрации SkQ1 в среде к тушению добавляется и компонента, принадлежащая РЦ.

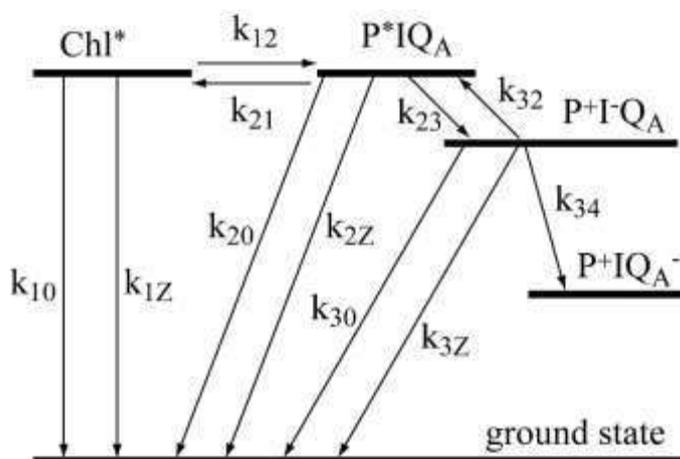


Рис. VII.14. Схема переноса нейтрального возбуждения и электрона в ФСII, рассматриваемая в модели Бухова и др. (Bukhov et al. 2001). Использована схема из статьи (Bukhov et al. 2001).

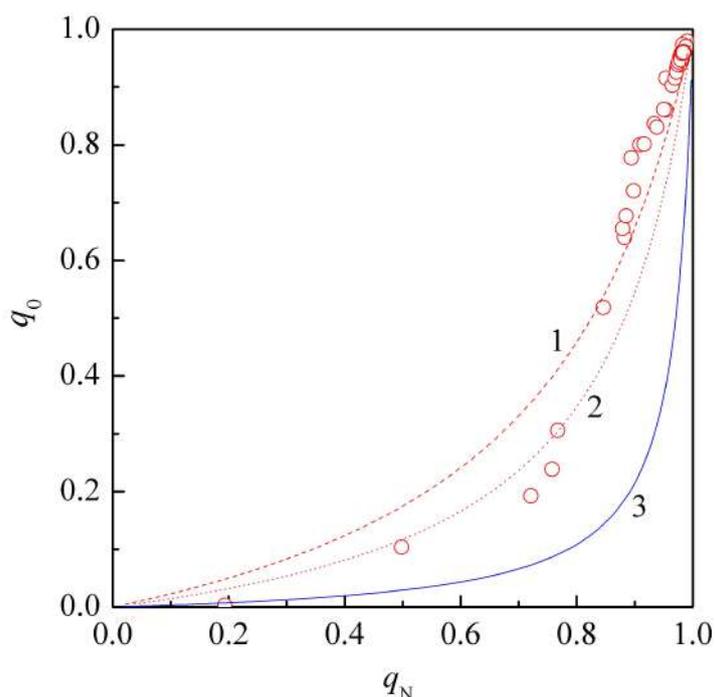


Рис. VII.15. Тушение флуоресценции открытых РЦ, q_0 , в сравнении с тушением флуоресценции закрытых РЦ, q_N . Зависимости рассчитаны в соответствии с моделью Бухова и др. (Bukhov et al. 2001): 1—тушение только в антенне ($k_{2z} = k_{3z} = 0$), 2—тушение в антенне и в РЦ, характеризующееся одинаковыми константами ($k_{1z}/k_{2z} = 1, k_{3z} = 0$), 3— тушение только в РЦ ($k_{2z}/k_{3z} = 1, k_{1z} = 0$). Точки на графике соответствуют индивидуальным измерениям флуоресценции клеток *C. vulgaris*, обработанных SkQ1 в различных концентрациях.

VII.5. Выводы:

1. Показано, что показатели, характеризующие кинетику процессов в ФСА, более чувствительны к действию стрессовых факторов, чем стационарные характеристики. В то же время, выбор оптимального показателя, характеризующего физиологическое состояние ФСА, зависит от ряда условий (в первую очередь, для высших растений средней полосы — от сезона).

2. С использованием отобранных показателей проведены исследования ФСА высших растений в условиях загрязнений окружающей среды выхлопами автотранспорта, высказано предположение о роли редокс-активных компонентов поллютантов в модуляции активности цикла Кальвина и/или других реакций, ответственных за использование продуктов световой фазы фотосинтеза.

3. Показан механизм действия проникающих антиоксидантов на ФСА и предложено их использование в качестве «мягких» ингибиторов ФСII в изучении фотосинтеза одноклеточных фотосинтетических организмах.

VIII. Глава 8. Индукция нефотохимического тушения и устойчивость фотосинтетического аппарата к стрессовым воздействиям у пойкилогидрических растений

VIII.1. Аннотация главы⁶

На модельном объекте *Physcomitrella patens* нами были изучены состояния ФСА, моделирующие дефицит влаги и дегидратацию клеток пойкилогидрических растений, такие как солевой стресс и мацерация клеточной стенки. Показано возникновение интенсивного тушения флуоресценции в ответ на воздействие данных стрессовых факторов. Высказано предположение о роли нарушения контакта плазмалеммы с клеточной стенкой в индуцировании затушенного состояния ФСА. Также в эту главу включены данные по изменениям функциональной активности ФСА трёхкомпонентного лишайника *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. в условиях, имитирующих условия космического полёта (в нетермостатируемой зоне космической станции), полученные в рамках предполётного испытания.

⁶ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. Dyakov M., Insarova I., Kharabadze D., **Ptushenko V.**, Shtaer 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.**)
2. 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.**)
3. 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.**)

VIII.2. Индукция НФТ у *P. patens* в ответ на мацерацию клеточной стенки

Спецификой многих пойкилогидрических организмов является интенсивное тушение флуоресценции, возникающее в клетках в ответ на обезвоживание (Heber et al. 2006a; Nabe et al. 2007; Fukuda et al. 2008; García-Plazaola et al. 2012). Известно также, что аналогичное тушение может возникать в хлоропластах пойкилогидрических организмов также в ответ на осмотический стресс (Azzabi et al. 2012; Gao et al. 2014). Механизм этого тушения до конца не ясен; известно, что он включает у разных организмов опосредованную дегидратацией активацию виолаксантинового цикла (Fernández-Marín et al. 2011), Psbs- и LHCSR-зависимые пути (Peers et al. 2009), конформационные перестройки пигмент-белковых комплексов (Heber 2008). Для *P. patens* показано наличие одновременно двух путей, Psbs-зависимого, характерного для высших растений, и LHCSR-зависимого, типичного для водорослей (Gerotto et al. 2012). Характерной особенностью данного типа тушения флуоресценции является то, что оно индуцируется в устойчивых к обезвоживанию (desiccation-tolerant) растениях стрессовыми условиями (обезвоживанием или плазмолизом) независимо от освещения.

Для прояснения связи между свето- и дегидратационно-зависимым тушением флуоресценции нами были проведены исследования в модельной системе, имитирующей обезвоживание: на протонеме пойкилогидрического мха *P. patens*, подвергнутой плазмолизу или же мацерации клеточных стенок. Мацерация достигалась за счёт обработки грибным экстрактом драйзелазой. При этом следили как за физиологическими и биохимическими изменениями ФСА (активность ФСII, содержание хлорофилла), так и за изменением количественного состава белков ФСА (с помощью масс-спектрометрического анализа).

В клетках протонемы, подвергнутой обработке драйзелазой, мы наблюдали постепенное падение фотосинтетической активности (рис. VIII.1), сопровождавшееся снижением (тушением) флуоресценции хлорофилла (рис. VIII.2). Эти функциональные изменения коррелируют с наблюдаемым нами снижением представленности практически всех компонентов ЭТЦ (табл. VIII.1). Так, содержание основных белков ФСІ (psaA и psaB) снижается до 30 раз, что должно приводить к существенному ингибированию реакций переноса электронов в ЭТЦ. Снижение представленности белков комплексов ФСІІ и LHC не столь значительно (от 2 до 13 по разным белкам), однако оно также имеет место. Учитывая, что комплексы ФСІІ и LHC — это основные содержащие хлорофилл комплексы ЭТЦ, дающие вклад в регистрируемую при физиологических условиях флуоресценцию хлорофилла растений, их снижение должно приводить к тушению флуоресценции, которое мы и наблюдаем. При этом следует обратить внимание, что в протопластах практически не снижается содержание белков, ответственных за защитное тушение флуоресценции хлорофилла у *P. patens*, PsbS и LHCSR. Таким образом, на фоне определённого снижения фотосинтетической активности, светозащитные функции ФСА поддерживаются на неизменном уровне, что соответствует ожидаемой стратегии реакции растения на стресс.

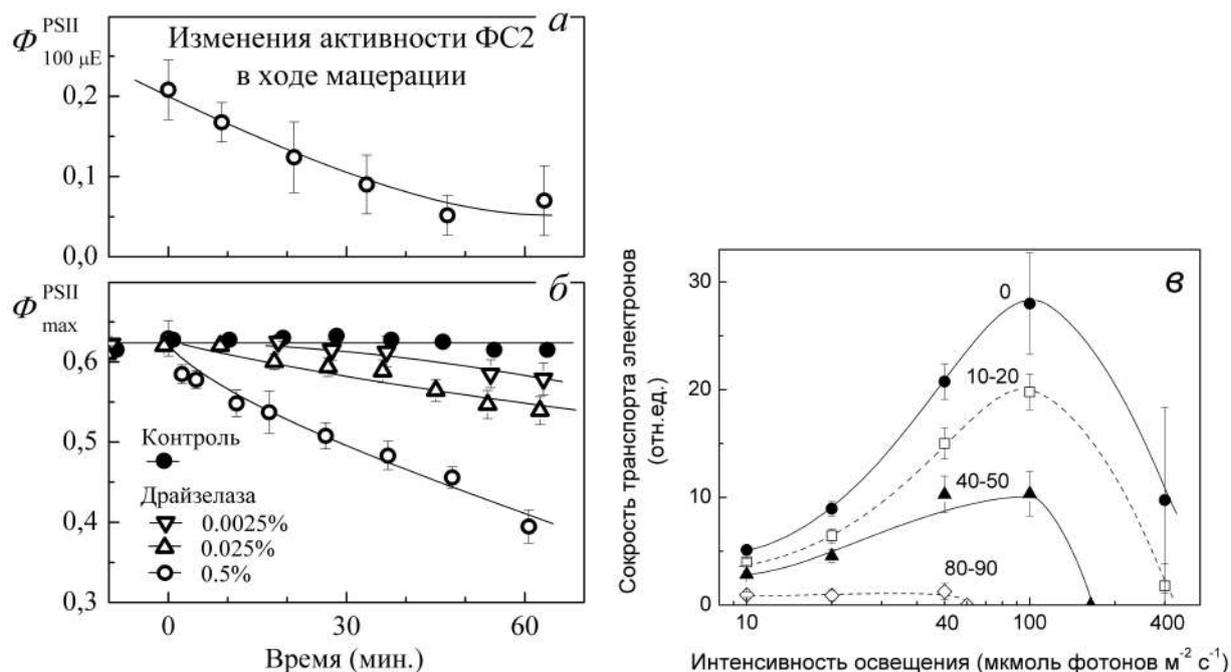


Рис. VIII.1. Кинетика изменений активности ФСII — (а) «рабочей» эффективности ФСII при умеренной интенсивности света ($100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$; $\Phi_{100\mu E}^{PSII}$) и (б) максимальной квантовой эффективности ФСII (темноадаптированной; Φ_{max}^{PSII}) в клетках протонемы *P. patens* при обработке раствором драйзелазы (0,5%, 0,025% и 0,0025%); (в) световая кривая скорости нециклического переноса электронов в клетках протонемы *P. patens* при обработке раствором 0,5% драйзелазы в течение разного времени (указано в минутах около соответствующих графиков). Значения рассчитаны на основании данных о рабочей квантовой эффективности ФСII. Приведены средние значения \pm стандартные ошибки среднего ($n = 4-7$).

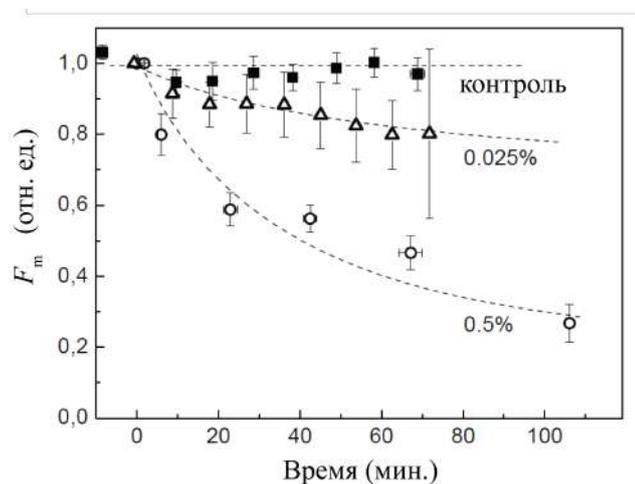


Рис. VIII.2. Кинетика тушения флуоресценции протонемы *P. patens*, подвергнутой воздействию драйзелазы. По оси ординат — F_m , интенсивность флуоресценции, соответствующая нулевому квантовому выходу фотохимического разделения зарядов. Протонема инкубирована в 0,48 М маннитоле. Числа около кривых указывают концентрацию драйзелазы. Приведены средние значения \pm стандартные ошибки среднего ($n = 6-14$).

Табл. VIII.1. Снижение содержания белков, участвующих в световых реакциях фотосинтеза, в хлоропластах *P.patens* в результате мацерации протонемы.

Белок	Снижение содержания
ФCI, суб. А	27
ФCI, суб. В	36
ФCI, суб. С	2,4
ФСII, суб. А (D1)	6,7
ФСII, суб. В (CP47)	6,2
ФСII, суб. С (CP43)	14
ФСII, суб. D (D2)	12
ССК ФCI (Lhca5)	2,4
ССК ФСII (CP26)	2,8
ССКII (Lhcb1.4)	2,5
ССКII (Lhcb1.5)	3,6
АТФ-синтаза, CF1- α	2,3
АТФ-синтаза, CF1- β	2,0
PsbS	2,3
LhcSR1	1,7
LhcSR2	1,1

На наш взгляд, наблюдаемая нами картина развития тушения флуоресценции в клетках *P. patens*, подвергаемых мацерации, полностью соответствует картине, наблюдаемой в случае обезвоживания или осмотического стресса (рис. VIII.3). Нам кажется разумным предположение, что эти виды стресса, в действительности, индуцируют защитные ответы на них, не просто феноменологически совпадающие между собой, но имеющие общий механизм (по крайней мере, в некоторой части). Это предположение выглядит разумным также в связи с общностью процессов, приводящих к запуску этих механизмов: во всех трёх случаях происходит изменение взаимодействия мембраны с клеточной стенкой — частичная потеря контакта между ними, изменение тургорного давления.

Как было показано нами (рис. VIII.2, VIII.3), некоторое (хотя и менее заметное) тушение флуоресценции начинает проявляться в протонеме *P. patens* уже при достаточно низких концентрациях драйзелазы, не вызывающих визуально наблюдаемой мацерации, однако вызывающих некоторый ответ клеточного пептидома (Fesenko et al. 2015). Нам кажется, что процесс мацерации, таким образом, может рассматриваться как удобная модель обезвоживания, дающая возможность достаточно тонко количественно регулировать интенсивность данного стрессового воздействия. Отметим, на данный момент имеется лишь ограниченный набор данных об изменениях протеома *P. patens* в ходе обезвоживания (Wang et al. 2009; Cui et al. 2012).

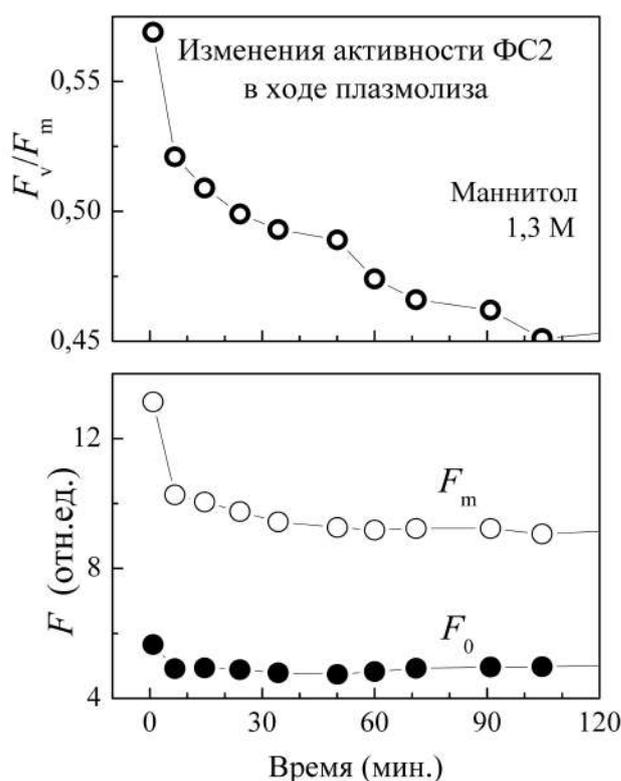


Рис. VIII.3. Тушение флуоресценции хлорофилла с снижением активности ФСII в клетках протонемы *P. patens*, индуцируемые плазмолизом (в гипертонической среде, содержащей 1.3 М маннитола).

VIII.3. Устойчивость ФСА лишайника *Peltigera aphthosa* к воздействию стрессовых факторов, моделирующих условия космического полёта

В отличие от высших растений, ФСА пойкилогидрических растений, и, прежде всего, лишайников, характеризуется исключительно высокой устойчивостью к стрессовым воздействиям любой природы. Устойчивость ФСА лишайников обусловлена их симбиотической природой, поскольку фотобионты лишайников (эукариотические зелёные водоросли или цианобактерии), встречающиеся в свободноживущем виде, как правило, обладают меньшей устойчивостью к стрессовым воздействиям. Несмотря на то, что эта особенность лишайников давно исследуется (так, первые исследования термоустойчивости лишайников были выполнены в 1950-х гг. см., например, (Lange 1953; MacFarlane and Kershaw 1978; Larson 1987; Pisani et al. 2007)), до настоящего времени практически не было изучено воздействие резких неоднократных перепадов температур, а также газового состава среды на физиологические параметры лишайников. В связи с этим, исследование влияния бескислородной среды и многократного повышения/понижения температуры, включая перепады от +70 °С до -70°С на газообмен, параметры флуоресценции и морфологию трёхкомпонентного лишайника *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. было выполнено нами в качестве предполётного испытания как модель условий, характерных для космического полёта.

Мы показали, что повторяющийся нагрев слоевищ до 70° С не приводит к снижению ни дыхания, ни фотосинтеза (рис. VIII.4А). Заметим, что дыхание лишайника обусловлено, в первую очередь, микобионтом, составляющим основную массу слоевища, в то время как фотосинтез обусловлен исключительно фотобионтом. Таким образом, наши данные по газообмену слоевища указывают на сохранность функций как мико-, так и фотобионта. Кроме газообмена, мы также регистрировали индукцию флуоресценции хлорофилла и её тушение методом РАМ-флуориметрии, что

также подтвердило сохранность фотосинтетических функций после температурной обработки (рис. VIII.4B). Изменения всех контролировавшихся показателей в результате воздействия каждого из исследованных температурных режимов и анаэробноа приведены в табл. VIII.2. Данные электронной микроскопии позволили заключить, что указанные варианты обработки слоевищ не вызывают также нарушений на морфологическом уровне (каких-либо повреждений фотосинтезирующих клеток или нарушений их связи с микобионтом не наблюдается; рис. VIII.5). Что же касается устойчивости функциональной активности, то она оказывается характерна не только для энергетических процессов (фотосинтез, дыхание), но и для роста лишайника в целом. Это видно из того, что в слоевище после обработки наблюдается образование новых дочерних клеток фотобионта (так называемых автоспор; рис. VIII.5).

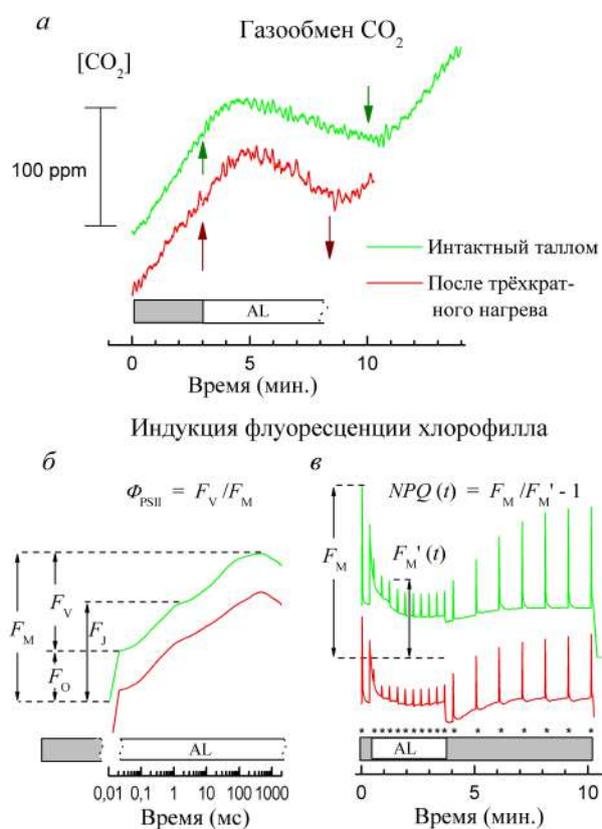


Рис. VIII.4. Влияние трёхкратной экспозиции таллома *Peltigera aphthosa* высокой температуре (+70 °С) на его фотосинтетические характеристики. Зеленым или красным цветом показаны кривые, соответствующие таллomu до или после трёхкратного цикла высокотемпературной обработки, соответственно. Приведены типичные кривые, соответствующие одному и тому же таллomu. Серые и белые прямоугольники вдоль оси абсцисс отмечают период темновой адаптации или освещения таллomu действующим светом (AL), соответственно. Интенсивность действующего света составляет 1500 моль фотонов м⁻²с⁻¹. (а)– выделение CO₂ в темноте в результате дыхания таллomu и фотосинтетическое поглощение CO₂ при освещении. Вертикальные стрелки показывают моменты включения и выключения света во время измерений газообмена.

(б)– быстрая фаза индукции флуоресценции хлорофилла таллomu (в диапазоне от 10 мкс до 2 с). (в)– кинетика медленной индукции флуоресценции хлорофилла (от 0 до 10 минут) при импульсно-модулированном освещении. Звездочки показывают моменты включения насыщающих световых импульсов. На панелях B и C показаны основные параметры индукции флуоресценции хлорофилла.

Табл. VIII.2. Влияние стрессовых факторов на дыхательные и фотосинтетические параметры таллома лишайника *P. aphthosa*. Представлены отношения указанных параметров в эксперименте по отношению контролю (среднее значение \pm SE; $n = 4-18$). Звездочками отмечены значения, значительно отличающиеся от единицы в соответствии с критерием знаковых рангов Уилкоксона или t-критерием Стьюдента ($P < 0.05$).

	Анаэробноз	Нагрев	Замораживание	Нагрев-замораживание
Дыхание	0.94 \pm 0.22	1.36 \pm 0.22*	—	—
Фотосинтез	0.99 \pm 0.05	1.09 \pm 0.17	—	—
Φ_{PSII}	1.00 \pm 0.16	0.77 \pm 0.15*	1.18 \pm 0.18	1.01 \pm 0.30
V_J	1.06 \pm 0.14	1.27 \pm 0.17*	1.21 \pm 0.16*	0.91 \pm 0.09
q_P	1.03 \pm 0.24	0.76 \pm 0.25	1.03 \pm 0.20	0.78 \pm 0.18*
F_M/F_M'	0.98 \pm 0.03	0.93 \pm 0.06	0.90 \pm 0.16	0.90 \pm 0.13

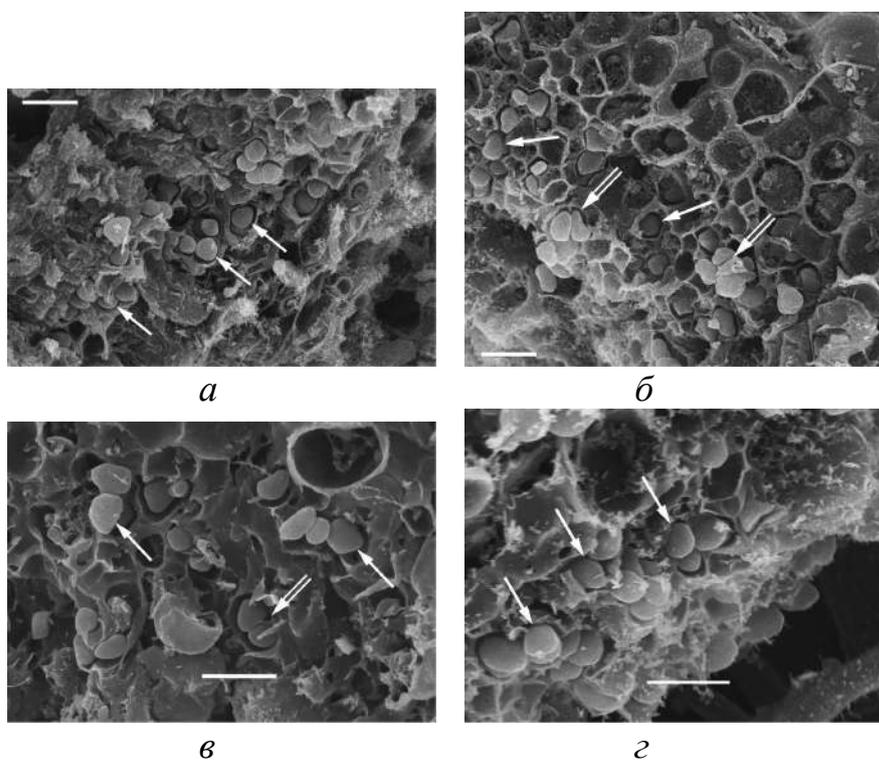


Рис. VIII.5. Водорослевый слой таллома *P. aphthosa*, сканирующая электронная микроскопия. (а) – контроль; (б) - после трёхкратного замораживания при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (в) – после попеременного воздействия высоких ($+70\text{ }^{\circ}\text{C}$) и низких ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) температур. (г) - после трёхкратного воздействия высокой ($+70\text{ }^{\circ}\text{C}$) температуры. Масштабная метка 10 мкм. Стрелками показаны клетки водорослей, двойными стрелками показаны новые дочерние клетки (аутоспоры).

VIII.4. Выводы

1. Предложена удобная модель стресса, вызванного обезвоживанием (дегидратацией) клеток пойкилогидрических организмов, использующая фермент-зависимую мацерацию клеточных стенок. Показано развитие значительного тушения флуоресценции хлорофилла в мацерируемых клетках, аналогичное развитию тушения при плазмолитическом воздействии на них.

2. Показано, что тушение флуоресценции хлорофилла в клетках, подверженных мацерации клеточных стенок, сопровождается существенным снижением основных хлорофилл-содержащих белков: субъединиц ФСІ (psaA и psaB), ФСІІ и LHC не столь значительно (от 2 до 30-кратного снижения по разным белкам), в то время как содержание белков, ответственных за защитное тушение флуоресценции хлорофилла у *P. patens*, PsbS и LHCSR, в мацерируемых клетках практически не снижается. Высказано предположение, что именно такая картина изменений в протеоме клеток пойкилогидрических организмов может отвечать за высокую эффективность механизма защиты ФСА в условиях дегидратации, проявляющегося в значительном тушении флуоресценции хлорофилла.

3. В рамках предполётного испытания проведено исследование ФСА, а также функциональной активности и морфологических изменений слоевища в целом трёхкомпонентного лишайника *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. в условиях, имитирующих условия космического полёта (в нетермостатируемой зоне космической станции или на поверхности планеты (Марса)). Показана устойчивость ФСА дегидратированного слоевища *P. aphthosa* по отношению к экстремальным значениям температуры (+70 и –70 °С) и резким колебаниям температуры между ними.

IX. Глава 9. Заключение и выводы

IX.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 (Pinnola 2019; Demmig-Adams et al. 2020), 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 CO₂ 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 and Vogelmann 2003; Terashima et al. 2009). В настоящей работе эта роль света зелёно-жёлтой области спектра была впервые показана экспериментально.

IX.2. Выводы

1. Показаны возможные стратегии реализации фотозащитного потенциала у кислородных 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 pH 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 контролирующих 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 ФСII на донорном участке, вызывая тушение возбуждения в фотосинтетической антенне с участием долгоживущего катиона P_{680}^+ .

Х. Приложение. Алгоритм построения диэлектрической модели белка и расчёта электрических взаимодействий в белке

Х.1. Аннотация главы⁷

В этой главе описан оригинальный алгоритм расчёта окислительно-восстановительных и кислотно-основных свойств групп белков, необходимых для анализа функционирования ФСА на молекулярном уровне. Показана необходимость учёта диэлектрической неоднородности белка, предложен способ её описания на основе данных рентгеноструктурного анализа.

Х.2. Особенности алгоритма и учитываемые им свойства белков

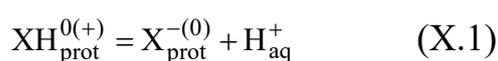
В реализации защитных механизмов ФСА существенную роль играют редокс-взаимодействия (например, в регуляции активности многих ферментов, за счёт взаимодействия редокс-кофакторов друг с другом и с компонентами шунтирующих и регуляторных путей, и т.п.), а также протон-донорные группы белков (как в процессах транспорта протонов, сопряжённого с фотосинтетическим транспортом электронов, так и в случае реакций, регулируемых величиной рН среды). Для моделирования этих

⁷ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования (в скобках приведён импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах):

1. **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.**)
2. **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.**)
3. **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.**)

механизмов *in silico*, а также для правильной интерпретации получаемых экспериментальных данных, необходимы сведения о редокс- или кислотно-основных свойствах белков, участвующих в реализации рассматриваемых механизмов, о значениях свободной энергии соответствующих реакций, и т.п. В связи с этим мы предприняли разработку алгоритма для оценки этих величин на основе существующих к настоящему времени данных о трёхмерной структуре ряда фотосинтетических белков.

Влияние белкового окружения на кислотно-основные или редокс-свойства функциональных групп может быть описано наиболее простым способом в рамках континуальной электростатической модели. Оно включает в себя электрическое поле, создаваемое заряженными и полярными группами белка в области расположения кофактора, а также изменение энергии диэлектрического отклика среды (аналог Борновской энергии сольватации для жидких растворителей). Потенциал электрического поля определяется расположением в белке атомов, несущих парциальные электрические заряды, и рассчитывается с помощью уравнения Пуассона-Больцмана, а Борновская энергия сольватации определяется диэлектрической проницаемостью белкового окружения. Для расчёта изменения pK_a протонируемой группы XH_{prot} :



указанные нами слагаемые учитываются в двух слагаемых — энергиях переноса протонированной и депротонированной форм:

$$2.3RTpK_{\text{prot}}^{\text{in}} = 2.3RTpK_{\text{aq}} - \Delta G_{XH}^{\text{tr}}(w \rightarrow p) + \Delta G_X^{\text{tr}}(w \rightarrow p) \quad (\text{X.2})$$

(для редокс-групп уравнение аналогично (X.2), только вместо энергий переноса протонированной и депротонированной форм XH и X содержит энергии переноса восстановленной и окисленной форм, X^{red} и X^{ox}).

Однако этот традиционный подход, в действительности, не применим для водных растворов, поскольку не учитывает разрыв водородных связей,

которые группа образует с водой. Вместе с тем, как мы показали, этот эффект может быть весьма велик (до нескольких единиц рН). Чтобы учесть его, мы предложили подход, комбинирующий электростатический расчёт и использование экспериментальных данных по энергиям переноса основных протон-донорных групп белков между водой и органическим апротонным растворителем. Предложенная нами поправка выглядит следующим образом:

$$2.3RTpK_{prot}^{in} = 2.3RTpK_{aq} - \Delta G_{XH}^{tr,el}(w \rightarrow p) + \Delta G_X^{tr,el}(w \rightarrow p) + \Delta G_{XH}^{tr,el}(w \rightarrow s) - \Delta G_X^{tr,el}(w \rightarrow s) + \Delta G_{XH-S} - \Delta G_{H^+}^{tr}(w \rightarrow s) + 2.3RT\Delta pK_s \quad (X.3)$$

где первые три слагаемые — это традиционно учитываемые компоненты, четвёртое и пятое (с индексами el) — поправки, которые также могут быть рассчитаны электростатически, а последние три могут быть непосредственно получены или выведены из экспериментальных данных: ΔG_{XH-S} — энергия водородной связи группы ХН с молекулами растворителя, $\Delta G_{H^+}^{tr}(w \rightarrow s)$ — энергия переноса протона из воды в соответствующий растворитель, ΔG_{XH-S} , ΔpK_s — разность рK_a группы в воде и апротонном растворителе. Рассматриваемые реакции и учитываемые компоненты энергии переноса схематично показаны на рис. X.1. Значения соответствующих поправок для основных протон-донорных аминокислотных остатков белка, рассчитанных нами, приведены в табл. X.1.

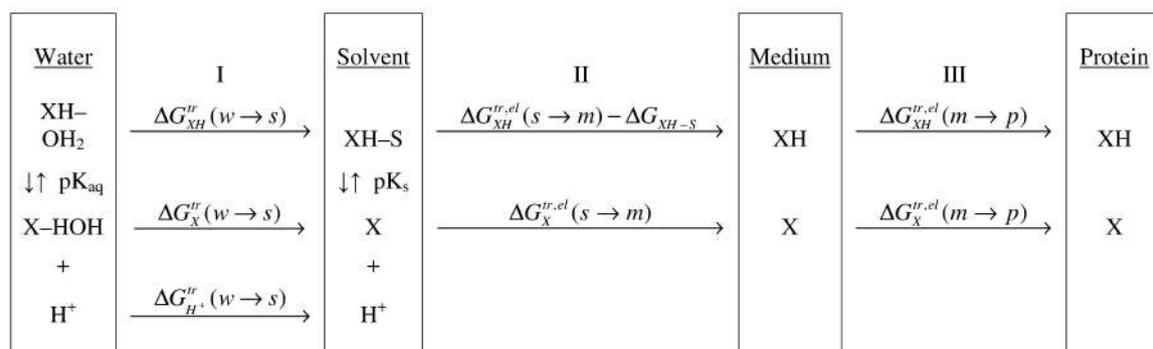


Рис. X.1. Схема трёхэтапного расчёта величины рК группы: I) перенос группы из воды в апротонный растворитель, затем II) перенос в воображаемую апротонную среду, не образующую водородных связей с растворённым веществом, затем III) перенос в белок.

Таблица X.1. Компоненты поправки на образование водородных связей, кДж/моль (ДМФ — диметилформамид, АН — ацетонитрил).

Соединение	$5,7 \times \Delta pK_s$	$\Delta G_{H^+}^{tr}$	ΔG_{XH-S}	$\Delta \Delta G^{tr,el}$	$\Delta G_{h.b.}$	$\Delta pK_{h.b.}$
CH ₃ COOH в ДМФ	36,2	-28,3	-21	-4,5	39	6,8
CH ₃ COOH в АН	95,8	+31,8	-14,5	-4,5	45	7,9
ImH ⁺ в ДМФ	-3,6	-28,3	-34	+3,4	-5,9	-1
C ₃ H ₇ NH ₃ ⁺ в АН	43,3	+31,8	-21	+3,9	-5,6	-1

Вторая особенность предложенного нами алгоритма расчёта — использование разных диэлектрических констант для двух принципиально разных составляющих энергии переноса $\Delta G^{tr,el}(w \rightarrow p)$: изменения энергии за счёт взаимодействия с существующим в белке электрическим полем и изменения энергии диэлектрического отклика среды. Следует иметь в виду, что эти две компоненты имеют принципиально разную природу: внесение в среду электрического заряда, связанного с рассматриваемой группой, вызывает отклик всех компонент поляризации среды, что может быть адекватно описано величиной статической диэлектрической проницаемости среды, ϵ_s . В то же время, для расчёта электрического потенциала, создаваемого в заданной области белка его заряженными и полярными группами следует использовать оптическую проницаемость среды, ϵ_o , в том случае, если для расчётов используется трехмерная структура белка, полученная при том же зарядовом состоянии кофактора/группы. Поясним это на примере потенциала, создаваемого одним заряженным атомом белка. Поле, создаваемое атомом, частично экранируется средой, причём в экранировке участвуют как электронная компонента поляризации среды, так и атомная. Иными словами, потенциал, создаваемый атомом в данной

точке, компенсируется потенциалами других атомов среды, и сумма их вкладов (а также вклада самого атома) в данный потенциал учитывается множителем $1/\epsilon_s$. Однако, если нам известна трёхмерная структура белка, то потенциал, создаваемый каждым атомом, будет учтён в явном виде при расчётах суммарного потенциала от всех заряженных атомов белка. Иными словами, атомная поляризация белка автоматически учитывается при расчёте суммарного электрического потенциала, создаваемого всеми атомами белка. В то же время, электронная поляризация не отражена в трёхмерной структуре, и её экранирующее действие не может быть учтено в явном виде. Поэтому её следует учитывать введением оптической проницаемости среды, ϵ_o , которая как раз и отражает электронную поляризацию. Насколько большую ошибку даёт подход, не учитывающий этого обстоятельства и использующий статическую диэлектрическую проницаемость ϵ_s для расчёта обеих компонент, видно из табл. X.2.

Таблица X.2. Расчёт стандартных редокс-потенциалов железо-серных (Fe_4S_4) кластеров в ФСІ и в растворимых ферредоксинах на основе традиционного подхода (с использованием единственной диэлектрической константы $\epsilon = 4$).

Кофактор	E_m в ДМФ*	Диэлектрический отклик среды	Вклад внутрибелкового электрического поля	E_m (расчёт.)	E_m (exp)
Fe_4S_4 -кластеры					
Fx	-1,345	-1,370	+1,255	-1,460	-0.705÷-0,650
Fa	-1,345	-1,115	+0,910	-1,550	-0.540÷-0,440
Fb	-1,345	-0.980	+0,885	-1,440	-0.590÷-0,465
Ферредоесины ($\epsilon=5.5$)					
<i>A. vinelandii</i>	-1,345	-0.700	+0,630	-1,415	-0.640
<i>C. aciditrici</i>	-1,345	-0.615	+0,760	-1,200	-0.435

* - относительно стандартного водородного электрода

Третий предложенный нами элемент алгоритма расчёта — учёт диэлектрической неоднородности белка, что проявляется в использовании неоднородного распределения ϵ_s в белке. Диэлектрическая неоднородность белка была показана в литературе экспериментально, в частности, с

использованием метода прямой электрметрии (Semenov et al. 2003). На примере ФСЦ нами была показана корреляция между трансмембранным профилем экспериментально определённой величины ϵ_s и профилем распределения атомов полярных групп (кислорода и азота) в белке (рис. X.2).

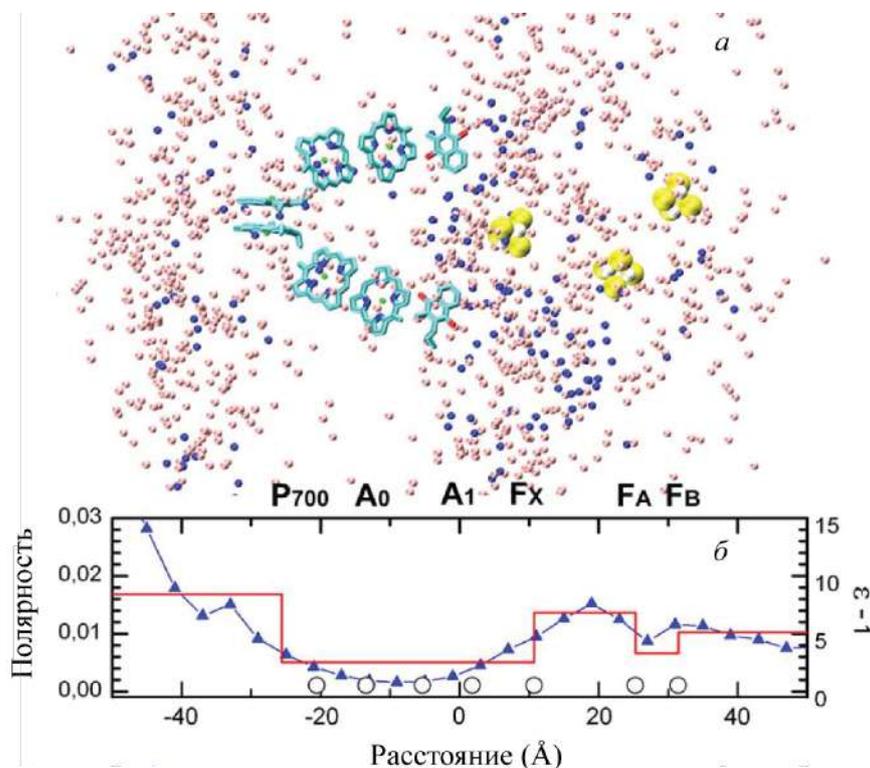


Рис. X.2. Пространственное распределение значений полярности и диэлектрической проницаемости в ФСЦ. *а* — распределение атомов кислорода и азота полярных боковых цепей аминокислотных остатков белка (красные шарики) и молекул кристаллографической воды (синие шарики). Показано также расположение редокс-кофакторов ФСЦ. *б* — распределение средней полярности белка (синяя кривая) и эффективной диэлектрической проницаемости (красная кривая) вдоль оси ФСЦ (перпендикулярной мембране). Открытые круги вдоль оси абсцисс указывают расположение кофакторов. Полярность определена как доля «полярных» атомов в слое толщиной 4Å, параллельном плоскости мембраны. Диэлектрическая проницаемость определена на основе экспериментальных данных прямой электрметрии (Semenov et al. 2003).

Основываясь на данной корреляции, мы построили алгоритм расчёта распределения диэлектрической проницаемости в белке на основании распределения полярных групп в нём, получаемого из данных о трёхмерной структуре. Алгоритм основан на эмпирической зависимости между полярностью и проницаемостью, полученной для фотосинтетического бактериального реакционного центра (БРЦ) из *Rhodobacter sphaeroides*

(рис. X.3). Пространственное распределение ϵ_s в БРЦ показано псевдоцветом на рис. X.4.

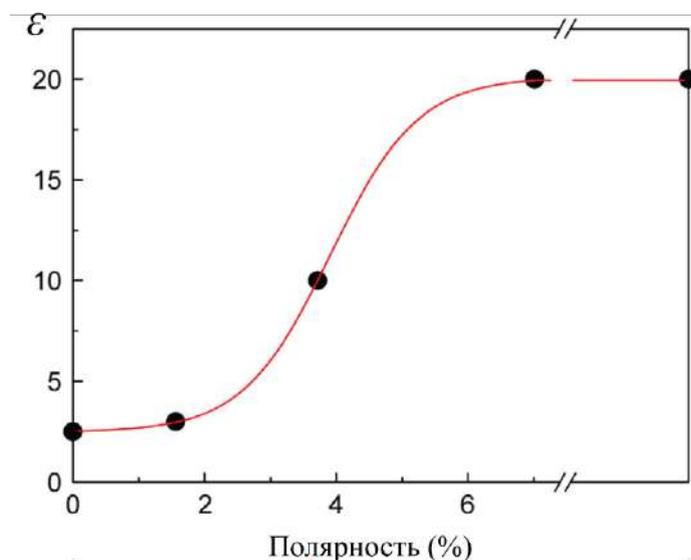


Рис. X.3. Феноменологическая зависимость статической диэлектрической проницаемости (ϵ) от средней полярности участка белка. Полярность была оценена как средняя величина по области, для которой средняя диэлектрическая проницаемость была оценена на основе экспериментальных данных по прямому электрогенезу.

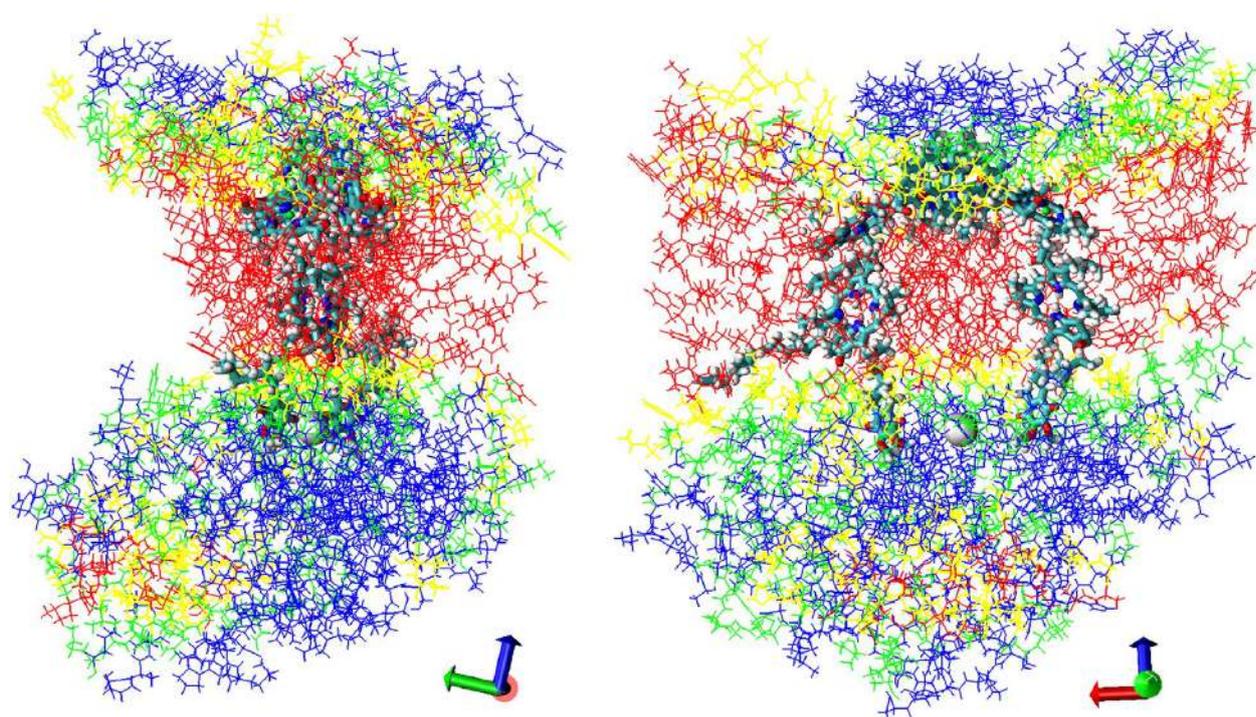


Рис. X.4. Пространственное распределение статической диэлектрической проницаемости в фотосинтетическом бактериальном реакционном центре. Структура получена из базы данных pdb (код 2GNU (Wadsten et al. 2006)). Красным цветом отмечена наиболее гидрофобная область ($\epsilon < 4$), жёлтым ($4 < \epsilon < 7.5$) и зелёным ($7.5 < \epsilon < 15$) показаны более гидрофильные области, синим раскрашены наиболее гидрофильные области ($\epsilon > 15$). Тонкими линиями показаны аминокислотные остатки белка, шаростержневыми моделями выделены редокс-кофакторы.

Х.3. Применение алгоритма для анализа характеристик ФСІ растений и фотосинтетического реакционного центра пурпурных бактерий

Использование данного подхода позволило нам рассчитать редокс-потенциалы всех кофакторов цепи переноса электронов ФСІ, для ряда из которых на тот момент не имелось надёжных экспериментальных или расчётных данных (см. табл. Х.3). Кроме того, нам удалось показать роль тесного расположения двух акцепторных молекул хлорофилла, расположенных в непосредственной близости от первичного донора P₇₀₀. Имея порфириновые кольца, расположенные параллельно друг другу и незначительно перекрывающиеся (т.е., вероятно, имеющие сопряжённые π-электронные структуры), эти две молекулы образуют пару (в каждой из ветвей ФСІ, А и В) и предположительно функционируют как единый первичный акцептор (рис. Х.5). Об этом говорят наши данные по свободной энергии первичного разделения зарядов, рассчитанной в предположении функционирования этих молекул хлорофилла по отдельности или в форме димера.

Таблица Х.3. Расчёт стандартных редокс-потенциалов всех кофакторов ФСІ и растворимых ферредоксинов с использованием многослойной диэлектрической модели белка и отдельным рассмотрением поля перманентных зарядов белка.

Кофактор	E_m в ДМФ*	Диэл. отклик среды (ϵ_{stat})	Перма- нентные заряды (ϵ_{opt})	Заряжен ные ам.ост. (D, E, K, R) (ϵ_{stat})	Заряжен ные кофак- торы (ϵ_{stat})	E_m (рабо- чий)	E_m (равно- весный)	E_m (эксп.)
P₇₀₀								
Chl1A	+0.535	+0.297	-0.242	-0.011	-0.036	+0.544		
Chl1B	+0.535	+0.273	-0.171	-0.023	-0.034	+0.580		
Dimer ¹⁾						+0.449	+0.449	+0.45
A₀(A)								
Chl2A	-1.160	-0.353	-0.020	+0.013	+0.104	-1.416		-1.29
Chl3A	-1.160	-0.369	+0.117	+0.179	-0.038	-1.271		
Dimer						-1.228		-1.07
A₀(B)								
Chl2B	-1.160	-0.362	-0.040	+0.041	+0.076	-1.445		-1.29
Chl3B	-1.160	-0.375	+0.111	+0.162	-0.052	-1.314		

Dimer ⁴⁾								-1.268		-1.07
A₁(A,B)										
PQ(A)	-0.800	-0.410	+0.290	+0.436	-0.188	-0.671				-0.81
PQ(B)	-0.800	-0.411	+0.246	+0.342	-0.220	-0.844				< -0.7
Fe ₄ S ₄ -clusters										
Fx	-1.345	-0.941	+1.302	+0.493	-0.094	-0.585	-0.654			-0.70
Fa	-1.345	-0.700	+1.642	+0.098	-0.174	-0.479	-0.481			-0.54
Fb	-1.345	-0.726	+1.613	+0.035	-0.116	-0.539	-0.585			-0.59
Ferredoxins ($\epsilon=5.5$)										
<i>A. vinelandii</i>	-1.345	-0.441	+1.328	-0.096	-0.095	-0.649	-0.649			-0.64
<i>C. acidurici</i>	-1.345	-0.382	+1.424	-0.082	-0.072	-0.457	-0.457			-0.43

* - относительно стандартного водородного электрода

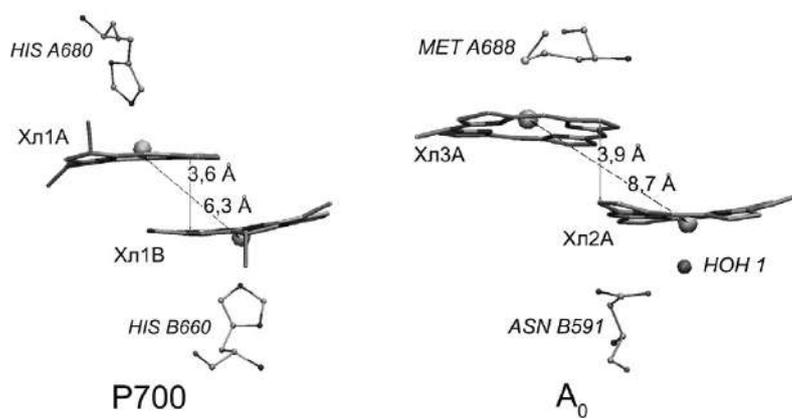


Рис. X.5. Взаимное расположение молекул хлорофилла в димерах, составляющих первичный донор P700 (Хл1А и Хл1В) и первичный акцептор электронов А0А (Хл2А/Хл3А) ФСІ в ветви А редокс_кофакторов. Отмечены аксиальные лиганды центральных атомов Mg молекул хлорофилла и расстояния между плоскостями порфириновых колец и атомами Mg

С использованием описанного выше подхода, нами также были рассчитаны кривые поглощения протонов БРЦ в зависимости от зарядового состояния хинонов (рис. X.6), позволившие подтвердить предположение о поглощении протонов БРЦ в состоянии с так называемым «проксимальным» (или «контактным») расположением хинона Q_B в реакционном центре.

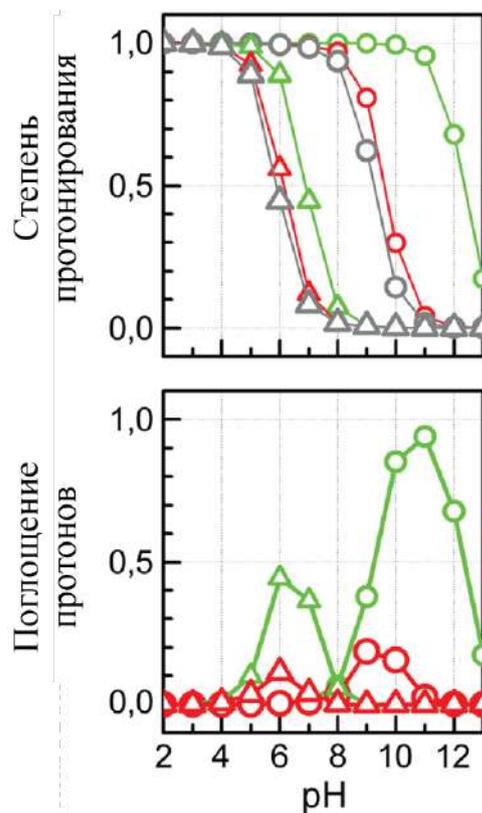


Рис. X.6. Влияние однократного заряжения хинона на протонирование белка и поглощение протонов из среды, при условии электрически взаимодействующих Glu-L212 и Asp-L213 (дикий тип). Серые кривые и символы соответствуют обоим нейтральным хинонам, красные и зелёные — заряженному QA или QB, соответственно. Круги соответствуют Glu-L212, треугольники – Asp-L213.

Значения свободных энергий (ΔG) переноса электрона в фотосинтетическом комплексе между редокс-кофакторами, наряду с другими факторами, определяют скорость переноса электрона. При этом температурная зависимость константы скорости переноса определяется, наряду с ΔG , также величиной энергии реорганизации белка λ . В тех случаях, когда λ определяется электрической поляризацией белка и не содержит значительных компонент «локальной» реорганизации (недиэлектрическая компонента), она может быть рассчитана также в рамках континуальной диэлектрической модели:

$$\lambda = \frac{1}{2} \int_V (\varphi_0(\Delta\rho(\vec{r}), \vec{r}) - \varphi_s(\Delta\rho(\vec{r}), \vec{r})) \Delta\rho(\vec{r}) d\vec{r} \quad (\text{X.4})$$

Используя наш подход, мы оценили значения λ для ряда реакций переноса электрона в фотосинтетическом БРЦ. Наши данные дают гораздо лучшее согласие с имеющимися экспериментальными данными, чем результаты расчётов без учёта неоднородного распределения диэлектрической проницаемости (табл. X.4). В то же время, сравнение

наших данных с экспериментом выявляет принципиальные ограничения континуальной диэлектрической модели и указывает на наличие недиэлектрической реорганизации в БРЦ в реакции рекомбинации зарядов $P^+ - Q_B^-$.

Таблица X.4. Сравнение рассчитанных и экспериментальных значений энергии реорганизации λ (эВ), а также экспериментально полученных значений максимальной (при $\Delta G = -\lambda$) константы скорости k (s^{-1}) при температуре 293-298 К

Реакция	$\lambda_{\text{теор}}$ в однород. белке, $\epsilon_s = 4$	$\lambda_{\text{теор}}$ в неоднор. белке, $\epsilon_s \sim \text{var.}$	$\lambda_{\text{эксп}}$ (экспе- рим.)	Диапазон констант реакции k и максимальное значение, k_o (при $\Delta G = -\lambda$)	Ссылки на экспериментальные работы
$Q_A^- - Q_B$	0.53	0.88	0.93	$3 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^6$; $5 \cdot 10^8$	(Li et al. 2000a)
$Bph^- -$ Q_A	0.37	0.54	0.60	$10^8 - 10^9$; 10^9	(Gunner and Dutton 1989)
$P^+ - Q_A^-$	0.47	0.74	0.82-0.9	5-11; (12) 5 -11; 11 4 - 20; 40	(Ortega et al. 1996) (Allen et al. 1998) (Schmid and Labahn 2000)
$P^+ - Q_B^-$	0.50	0.77	1.3-1.5	0.02 -1; 11 0.04 - 1; 40	(Allen et al. 1998) (Schmid and Labahn 2000)

Х.4. Выводы:

1. Предложен алгоритм расчёта кислотно-основных и редокс-свойств белка, а также энергий реорганизации, в рамках континуальной электростатической модели, основанный на а) учёте неоднородного распределения статической диэлектрической проницаемости ϵ_s , б) использовании оптической диэлектрической проницаемости ϵ_o для расчёта распределения электрического потенциала в белке, и в) учёте энергии разрыва водородных связей при использовании модельных (в водном растворе) кислотно-основных свойств протон-донорных групп белка.

2. Рассчитаны средноточечные значения редокс-потенциалов всех редокс-кофакторов ФСІ.

3. Высказано предположение о функционировании первичного акцептора электрона в ФСІ в форме «рыхлого» димера хлорофилла.

4. Рассчитаны рН-зависимости поглощения протонов в БРЦ, показана необходимость расположения вторичного хинона (Q_B) в проксимальном положении.

5. Оценены значения энергии реорганизации λ для ряда реакций переноса электрона в фотосинтетическом БРЦ, показано вероятное наличие недиэлектрической реорганизации в БРЦ в реакции рекомбинации зарядов $P^+ - Q_B^{\bullet-}$, показаны принципиальные ограничения континуальной диэлектрической модели.

XI. Литература

1. Акулинка ДВ, Болычевцева ЮВ, Еланская ИВ, и др. (2015) Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых белков HliA/HliB с тримерами и мономерами фотосистемы 1 в клетках цианобактерии *Synechocystis* PCC. Биохимия 80:1522–1531
2. Бакеева ЛЕ, Барсков ИВ, Егоров МВ, и др. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения 2. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных активными формами кислорода (сердечной аритмии, инфаркта миокарда, ишемии почки и инсульта головно. Биохимия 73:1607–1621
3. Гавриленко ВФ, Жигалова ТВ (2003) Большой практикум по фотосинтезу. Академия, Москва
4. Говинджи, Орт ДР, Уитмарш Д (1987) Фотосинтез: в 2 тт. Мир, Москва
5. Джадд Д, Вышецки Г (1978) Цвет в науке и технике. Мир, Москва
6. Дзюбинская ЕВ, Ионенко ИФ, Киселевский ДБ, и др. (2013) Митохондриально-адресованные катионы замедляют старение и гибель листьев *Arabidopsis thaliana*, увеличивают вегетационный период и улучшают структуру урожая пшеницы *Triticum aestivum*. Биохимия 78:92–99
7. Долгих ЮИ, Степанова АЮ, Трусова СВ, и др. (2013) Стимуляция морфогенеза в культуре тканей растений под действием антиоксиданта SkQ1. Физиология растений 60:747
8. Исаев НК, Стельмашук ЕВ, Стельмашук НН, и др. (2013) Старение головного мозга и митохондриально-адресованные антиоксиданты класса SkQ. Биохимия 78:391–397
9. Кувыкин ИВ, Вершубский АВ, Птушенко ВВ, Тихонов АН (2008) Кислород как альтернативный акцептор в фотосинтетической цепи электронного транспорта С3-растений. Биохимия 73:1329–1343
10. Омарова Е, Антоненко Ю (2014) Ингибирование окислительного гемолиза эритроцитов митохондриально направленными антиоксидантами семейства SkQ. Биохимия 79:187–195
11. Плотников ЕЮ, Силачев ДН, Янкаускас СС, и др. (2012) Частичное разобщение дыхания и фосфорилирования как один из путей реализации нефро-и нейропротекторного действия проникающих катионов семейства SkQ. Биохимия 77:1240–1250

12. Птушенко ВВ, Соловченко АЕ (2016) Толерантность фотосинтетического аппарата к закислению среды как возможная детерминанта CO₂-толерантности симбиотической микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS-2014. Биохимия 81:1849–1856
13. Рубин АБ (2004) Биофизика. Т. 2: Биофизика клеточных процессов. Издательство Московского университета : Наука, Москва
14. Самуилов В, Киселевский Д (2015) Действие катионного пластохинона SkQ1 на электронтранспортные реакции в хлоропластах и митохондриях из проростков гороха. Биохимия 80:489–496
15. Скрипников А, Поляков Н, Толчева Е, и др. (2009) Протеомный анализ мха *Physcomitrella patens* (Hedw.) BSG. Биохимия 74:593–606
16. Солнцев М (1995) Влияние спектрального состава действующего света на термолюминесценцию листьев бобов при 40-70° С. Биофизика 40:417
17. Солнцев М (1989) О природе полосы термолюминесценции фотосинтетических объектов при 40-80 С. Журнал физической химии 63:1959
18. Соловченко АЕ, Мерзляк МН (2010) Оптическое экранирование как фотозащитный механизм растений. А-Литера, Москва
19. Юрина Н, Мокерова Д, Одинцова М (2013) Светоиндуцируемые стрессовые белки пластид фототрофов. Физиология растений 60:611
20. Abrams MD, Kubiske ME (1990) Leaf structural characteristics of 31 hardwood and conifer tree species in central Wisconsin: influence of light regime and shade-tolerance rank. For Ecol Manage 31:245–253
21. Aburai N, Sumida D, Abe K (2015) Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp.(Chlorophyceae). Algal Res 8:30–36
22. Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, et al (2010) *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. Proc Natl Acad Sci 107:11128–11133
23. Allen JP, Williams JC, Graige MS, et al (1998) Free energy dependence of the direct charge recombination from the primary and secondary quinones in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. Photosynth Res 55:227–233
24. Allen WA, Richardson AJ (1968) Interaction of light with a plant canopy. JOSA 58:1023–1028
25. Amarnath K, Bennett DIG, Schneider AR, Fleming GR (2016) Multiscale model of light harvesting by photosystem II in plants. Proc Natl Acad Sci 113:1156–1161

26. Anderson JM, Andersson B (1988) The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends Biochem Sci* 13:351–355
27. Antonenko YN, Khailova LS, Knorre DA, et al (2013) Penetrating cations enhance uncoupling activity of anionic protonophores in mitochondria. *PLoS One* 8:e61902
28. Anwaruzzaman M, Chin BL, Li X-P, et al (2004) Genomic analysis of mutants affecting xanthophyll biosynthesis and regulation of photosynthetic light harvesting in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 82:265–276
29. Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399
30. Arnon DI, Allen MB, Whatley FR (1956) Photosynthesis by isolated chloroplasts IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *Biochim Biophys Acta* 20:449–461
31. Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol* 50:601–639
32. Aspinall-O’Dea M, Wentworth M, Pascal A, et al (2002a) The PsbS subunit of photosystem II binds zeaxanthin and activates it for non-photochemical fluorescence quenching. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16331–16335
33. Aspinall-O’Dea M, Wentworth M, Pascal A, et al (2002b) In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proc Natl Acad Sci* 99:16331–16335
34. Azzabi G, Pinnola A, Betterle N, et al (2012) Enhancement of non-photochemical quenching in the bryophyte *Physcomitrella patens* during acclimation to salt and osmotic stress. *Plant cell Physiol* 53:1815–1825
35. Babushkin LN (1955) The phototactic action spectrum of chloroplasts. In: *Doklady Akad. Nauk SSSR*. pp 333–335
36. Bashford D (2004) Macroscopic electrostatic models for protonation states in proteins. *Front Biosci* 9:1082–1099
37. Bashford D, Karplus M (1990) pKa’s of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry* 29:10219–10225
38. Beck J, Lohscheider JN, Albert S, et al (2017) Small One-Helix Proteins are essential for photosynthesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 8:
39. Bergantino E, Segalla A, Brunetta A, et al (2003) Light-and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc Natl Acad Sci* 100:15265–15270
40. Bock G, Haupt W (1961) Die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia*: III. Die

Frage der Lokalisierung des Hellrot-Dunkelrot-Pigmentsystems in der Zelle.
Planta 57:518–530

41. Böhm JA (1856) Beiträge zur näheren Kenntniss des Chlorophylls. Sitzungsberichte der kais Akad der Wissenschaften, Math Cl Bd. XXII:479–498
42. Bonente G, Howes BD, Caffarri S, et al (2008a) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283:8434–8445
43. Bonente G, Passarini F, Cazzaniga S, et al (2008b) The occurrence of the psbS gene product in *Chlamydomonas reinhardtii* and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching. *Photochem Photobiol* 84:1359–1370
44. Bonente G, Pippa S, Castellano S, et al (2012) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *J Biol Chem* 287:5833–5847
45. Bruce D, Samson G, Carpenter C (1997) The origins of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct quenching by P680+ in photosystem II enriched membranes at low pH. *Biochemistry* 36:749–755
46. Brugnoli E, Björkman O (1992) Chloroplast movements in leaves: influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to Δ pH and zeaxanthin formation. *Photosynth Res* 32:23–35
47. Bukhov NG, Heber U, Wiese C, Shuvalov VA (2001) Energy dissipation in photosynthesis: does the quenching of chlorophyll fluorescence originate from antenna complexes of photosystem II or from the reaction center? *Planta* 212:749–758
48. Bukhov NG, Sridharan G, Egorova EA, Carpentier R (2003) Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light--dark transitions. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1604:115–123
49. Butler WL (1972) On the primary nature of fluorescence yield changes associated with photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 69:3420–3422
50. Camargo MAB, Marengo RA (2011) Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. *Acta Amaz* 41:205–212
51. Cao K-F (2000) Leaf anatomy and chlorophyll content of 12 woody species in contrasting light conditions in a Bornean heath forest. *Can J Bot* 78:1245–1253

52. Casazza AP, Rossini S, Rosso MG, Soave C (2005) Mutational and expression analysis of ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 58:41–51
53. Clark WM (1960) Oxidation-reduction potentials of organic systems. Williams and Wilkins, Baltimore, MD
54. Colombo M, Suorsa M, Rossi F, et al (2016) Photosynthesis Control: An underrated short-term regulatory mechanism essential for plant viability. *Plant Signal Behav* 11:e1165382
55. Correa-Galvis V, Redekop P, Guan K, et al (2016) Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of LHCSR protein-dependent energy dissipation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 291:17478–17487
56. Croce R, Van Amerongen H (2014) Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat Chem Biol* 10:492–501
57. Cui S, Hu J, Guo S, et al (2012) Proteome analysis of *Physcomitrella patens* exposed to progressive dehydration and rehydration. *J Exp Bot* 63:711–726
58. Curien G, Flori S, Villanova V, et al (2016) The water to water cycles in microalgae. *Plant Cell Physiol* 57:1354–1363
59. Daskalakis V, Papadatos S, Kleinekathoefer U (2019) Fine tuning of the photosystem II major antenna mobility within the thylakoid membrane of higher plants. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* 1861:183059
60. Davis PA, Caylor S, Whippo CW, Hangarter RP (2011) Changes in leaf optical properties associated with light-dependent chloroplast movements. *Plant Cell Environ* 34:2047–2059
61. Davis PA, Hangarter RP (2012) Chloroplast movement provides photoprotection to plants by redistributing PSII damage within leaves. *Photosynth Res* 112:153–161
62. Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1020:1–24
63. Demmig-Adams B, Adams WWI (1996) Chlorophyll and carotenoid composition in leaves of *Euonymus kiautschovicus* acclimated to different degrees of light stress in the field. *Funct Plant Biol* 23:649–659
64. Demmig-Adams B, Cohu CM, Muller O, Adams III WW (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons. *Photosynth Res* 113:75–88
65. Demmig-Adams B, Koh S-C, Cohu CM, et al (2014) Non-photochemical fluorescence quenching in contrasting plant species and environments. In:

Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria. Springer, pp 531–552

66. Demmig-Adams B, Muller O, Stewart JJ, et al (2015) Chloroplast thylakoid structure in evergreen leaves employing strong thermal energy dissipation. *J Photochem Photobiol B Biol* 152:357–366
67. Demmig-Adams B, Stewart JJ, López-Pozo M, et al (2020) Zeaxanthin, a molecule for photoprotection in many different environments. *Molecules* 25:5825
68. Dmitrieva VA, Tyutereva E V, Voitsekhovskaja O V (2020) Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. *Int J Mol Sci* 21:3237
69. Dominici P, Caffarri S, Armenante F, et al (2002) Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J Biol Chem* 277:22750–22758
70. Douhovnikoff V, Taylor SH, Hazelton ELG, et al (2016) Maximal stomatal conductance to water and plasticity in stomatal traits differ between native and invasive introduced lineages of *Phragmites australis* in North America. *AoB Plants* 8:plw006
71. Edreva A (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric Ecosyst Environ* 106:119–133
72. Erickson E, Wakao S, Niyogi KK (2015) Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 82:449–465
73. Evans JR, Vogelmann TC (2003) Profiles of ¹⁴C fixation through spinach leaves in relation to light absorption and photosynthetic capacity. *Plant Cell Environ* 26:547–560
74. Evstigneev VB, Krasnovsky AA (1948) Quenching of fluorescence of magnesium phthalocyanine and chlorophyll by foreign molecules. In: *Dokl AN SSSR*. pp 623–626
75. Fan M, Li M, Liu Z, et al (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants. *Nat Struct Mol Biol* 22:729–735
76. Fernández-Marín B, Balaguer L, Esteban R, et al (2009) Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. *J Plant Physiol* 166:1734–1744
77. Fernández-Marín B, Holzinger A, García-Plazaola JI (2016) Photosynthetic strategies of desiccation-tolerant organisms. *Handb Photosynth* 719–737
78. Fernández-Marín B, Míguez F, Becerril JM, García-Plazaola JI (2011) Dehydration-mediated activation of the xanthophyll cycle in darkness: is it related to desiccation tolerance? *Planta* 234:579

79. Fesenko IA, Arapidi GP, Skripnikov AY, et al (2015) Specific pools of endogenous peptides are present in gametophore, protonema, and protoplast cells of the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 15:.
<https://doi.org/10.1186/s12870-015-0468-7>
80. Fischer-Arnold G (1963) Untersuchungen über die Chloroplastenbewegung bei *Vaucheria sessilis*. *Protoplasma* 56:495–520
81. Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
82. Frank B (1871) Über lichtwärts sich bewegende Chlorophyllkörner. *Bot Ztg* 29:209
83. Fukuda S, Yamakawa R, Hirai M, et al (2008) Mechanisms to avoid photoinhibition in a desiccation-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*. *Plant cell Physiol* 49:488–492
84. Funk C, Schroeder WP, Napiwotzki A, et al (1995) The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34:11133–11141
85. Galston AW, Baker RS (1949) Studies on the physiology of light action. II. The photodynamic action of riboflavin. *Am J Bot* 773–780
86. Gao S, Pinnola A, Zhou L, et al (2022) Light-harvesting complex stress-related proteins play crucial roles in the acclimation of *Physcomitrella patens* under fluctuating light conditions. *Photosynth Res* 151:1–10
87. Gao S, Zheng Z, Gu W, et al (2014) Photosystem I shows a higher tolerance to sorbitol-induced osmotic stress than photosystem II in the intertidal macroalgae *Ulva prolifera* (Chlorophyta). *Physiol Plant* 152:380–388
88. García-Plazaola JI, Matsubara S, Osmond CB (2007) The lutein epoxide cycle in higher plants: its relationships to other xanthophyll cycles and possible functions. *Funct Plant Biol* 34:759–773
89. García-Plazaola JI, Esteban R, Fernández-Marín B, et al (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the Arabidopsis model. *Photosynth Res* 113:89–103
90. Gardingen PR, Jeffree CE, Grace J (1989) Variation in stomatal aperture in leaves of *Avena fatua* L. observed by low-temperature scanning electron microscopy. *Plant Cell Environ* 12:887–898
91. Georgescu RE, Alexov EG, Gunner MR (2002) Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pK_as in proteins. *Biophys J* 83:1731–1748
92. Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, et al (2012) Coexistence of plant and

- algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol* 196:763–773
93. Gerotto C, Alboresi A, Meneghesso A, et al (2016) Flavodiiron proteins act as safety valve for electrons in *Physcomitrella patens*. *Proc Natl Acad Sci* 201606685
 94. Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309–314
 95. Gilmore AM (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* 99:197–209
 96. Giovagnetti V, Ruban A V (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes. *Biochem Soc Trans* 46:1263–1277
 97. Goh C-H, Ko S-M, Koh S, et al (2012) Photosynthesis and environments: photoinhibition and repair mechanisms in plants. *J Plant Biol* 55:93–101
 98. Gorelova O, Baulina O, Solovchenko A, et al (2015) Coordinated rearrangements of assimilatory and storage cell compartments in a nitrogen-starving symbiotic chlorophyte cultivated under high light. *Arch Microbiol* 197:181–195
 99. Gotoh E, Suetsugu N, Yamori W, et al (2018) Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production. *Plant Physiol* 178:1358–1369
 100. Govindjee (2004) Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, pp 1–41
 101. Guarnetti Prandi I, Sláma V, Pecorilla C, et al (2022) Structure of the stress-related LHCSR1 complex determined by an integrated computational strategy. *Commun Biol* 5:1–10
 102. Gunner MR, Dutton PL (1989) Temperature and- Δ dependence of the electron transfer from BPh. cndot.-to QA in reaction center protein from *Rhodobacter sphaeroides* with different quinones as QA. *J Am Chem Soc* 111:3400–3412
 103. Hall DO (1972) Nomenclature for isolated chloroplasts. *Nature* 235:125–126
 104. Hansmann UHE (1997) Parallel tempering algorithm for conformational studies of biological molecules. *Chem Phys Lett* 281:140–150
 105. Haupt W (1966) Phototaxis in plants. In: *International review of cytology*. Elsevier, pp 267–299

106. Havaux M (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiol* 100:424–432
107. Heber U (2005) Irrungen, Wirungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. In: *Discoveries in Photosynthesis*. Springer, pp 551–559
108. Heber U (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* 228:641–650
109. Heber U, Azarkovich M, Shuvalov V (2007) Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *J Exp Bot* 58:2745–2759
110. Heber U, Bilger W, Shuvalov VA (2006a) Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *J Exp Bot* 57:2993–3006
111. Heber U, Lange OL, Shuvalov VA (2006b) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J Exp Bot* 57:1211–1223
112. Heber U, Shuvalov VA (2005) Photochemical reactions of chlorophyll in dehydrated photosystem II: two chlorophyll forms (680 and 700 nm). *Photosynth Res* 84:85–91
113. Heber U, Soni V, Strasser RJ (2011) Photoprotection of reaction centers: thermal dissipation of absorbed light energy vs charge separation in lichens. *Physiol Plant* 142:65–78
114. Higa T, Wada M (2016) Chloroplast avoidance movement is not functional in plants grown under strong sunlight. *Plant Cell Environ* 39:871–882
115. Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, et al (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* (80-) 307:433–436
116. Honig B, Nicholls A (1995) Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* (80-) 268:1144–1149
117. Huala E, Oeller PW, Liscum E, et al (1997) Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* (80-) 278:2120–2123
118. Huang W, Zhang S-B, Cao K-F (2010) The different effects of chilling stress under moderate light intensity on photosystem II compared with photosystem I and subsequent recovery in tropical tree species. *Photosynth Res* 103:175–182
119. Idi A, Md Nor MH, Abdul Wahab MF, Ibrahim Z (2015) Photosynthetic bacteria: an eco-friendly and cheap tool for bioremediation. *Rev Environ Sci Bio/Technology* 14:271–285

120. Ishishita K, Higa T, Tanaka H, et al (2020) Phototropin2 Contributes to the Chloroplast Avoidance Response at the Chloroplast-Plasma Membrane Interface. *Plant Physiol* 183:304–316
121. Ivanov AG, Hurry V, Sane P V, et al (2008) Reaction centre quenching of excess light energy and photoprotection of photosystem II. *J Plant Biol* 51:85
122. Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817:182–193
123. Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515–540
124. Jansson S, Andersson J, Kim SJ, Jackowski G (2000) An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Mol Biol* 42:345–351
125. Jeong WJ, Park Y-I, Suh K, et al (2002) A large population of small chloroplasts in tobacco leaf cells allows more effective chloroplast movement than a few enlarged chloroplasts. *Plant Physiol* 129:112–121
126. Jha D, Jain V, Sharma B, et al (2017) Microalgae-based pharmaceuticals and nutraceuticals: an emerging field with immense market potential. *ChemBioEng Rev* 4:257–272
127. Johnson G, Krieger A (1994) Thermoluminescence as a probe of Photosystem II in intact leaves: Non-photochemical fluorescence quenching in peas grown in an intermittent light regime. *Photosynth Res* 41:371–379
128. Johnson MP, Ruban A V (2011) Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced ΔpH . *J Biol Chem* 286:19973–19981
129. Jørgensen K, Skibsted LH (1993) Carotenoid scavenging of radicals. *Zeitschrift für Leb und Forsch* 196:423–429
130. Kaňa R, Kotabová E, Kopečná J, et al (2016) Violaxanthin inhibits nonphotochemical quenching in light-harvesting antenna of *Chromera velia*. *FEBS Lett* 590:1076–1085
131. Karavaev VA, Polyakova IB, Solntsev MK, Yurina TP (1998) Effect of various chemical agents on photosynthesis studied by the method of fluorescence induction. *J Lumin* 76:335–338
132. Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, et al (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420:829–832
133. Kates M (1986) *Techniques of lipidology; isolation, analysis and identification*

of lipids. Lab Tech Biochem Mol Biol 3:

134. Khorobrykh S, Havurinne V, Mattila H, Tyystjärvi E (2020) Oxygen and ROS in photosynthesis. *Plants* 9:91
135. Kim J, Ahn J, Bong H, et al (2020) ACTIN2 Functions in Chloroplast Photorelocation Movement in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Biol* 1–11
136. King G, Lee FS, Warshel A (1991) Microscopic simulations of macroscopic dielectric constants of solvated proteins. *J Chem Phys* 95:4366–4377
137. Kleine T, Nägele T, Neuhaus HE, et al (2021) Acclimation in plants--the Green Hub consortium. *Plant J* 106:23–40
138. Kong S-G, Wada M (2016) Molecular basis of chloroplast photorelocation movement. *J Plant Res* 129:159–166
139. Kong S-G, Wada M (2014) Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837:522–530
140. Königer M, Bollinger N (2012) Chloroplast movement behavior varies widely among species and does not correlate with high light stress tolerance. *Planta* 236:411–426
141. Königer M, Delamaide JA, Marlow ED, Harris GC (2008) *Arabidopsis thaliana* leaves with altered chloroplast numbers and chloroplast movement exhibit impaired adjustments to both low and high light. *J Exp Bot* 59:2285–2297
142. Kouvril R, Wientjes E, Bultema JB, et al (2013) High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1827:411–419. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.003>
143. Krieger-Liszkay A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56:337–346
144. Krishnan-Schmieden M, Konold PE, Kennis JTM, Pandit A (2021) The molecular pH-response mechanism of the plant light-stress sensor PsbS. *Nat Commun* 12:2291
145. Krishtalik LI (2011) The medium reorganization energy for the charge transfer reactions in proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807:1444–1456
146. Krishtalik LI, Kuznetsov AM, Mertz EL (1997) Electrostatics of proteins: description in terms of two dielectric constants simultaneously. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 28:174–182

147. Kuvykin I V, Ptushenko V V, Vershubskii A V, Tikhonov AN (2011) Regulation of electron transport in C₃ plant chloroplasts in situ and in silico: short-term effects of atmospheric CO₂ and O₂. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1807:336–347
148. Lange OL (1953) Hitze-und Trockenresistenz der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung. *Flora oder Allg Bot Zeitung* 140:39–97
149. Larsen E, Christensen LP (2005) Simple saponification method for the quantitative determination of carotenoids in green vegetables. *J Agric Food Chem* 53:6598–6602
150. Larson DW (1987) The absorption and release of water by lichens. *Bibl Lichenol* 25:1–360
151. Lechowski Z (1973) The action spectrum in chloroplast translocation in multilayer leaf cells. *Acta Soc Bot Pol* 42:461–472
152. Lee S-H, Tewari RK, Hahn E-J, Paek K-Y (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90:141–151
153. Li J, Takahashi E, Gunner MR (2000a) -DGAB and pH Dependence of the Electron Transfer from P+QA-QB to P+QAQB- in *Rhodobacter sphaeroides* Reaction Centers. *Biochemistry* 39:7445–7454
154. Li X-P, Björkman O, Shih C, et al (2000b) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403:391–395
155. Li X-P, Müller-Moulé P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci* 99:15222–15227
156. Lichtenthaler HK (1987) [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350–382
157. Lichtenthaler HK, Babani F (2004) Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In: *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer, pp 713–736
158. Lichtenthaler HK, Babani F, Navrátil M, Buschmann C (2013) Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees. *Photosynth Res* 117:355–366
159. Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the

- chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43:379–393
160. Lichtenthaler HK, Buschmann C, Rinderle U, Schmuck G (1986) Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat Environ Biophys* 25:297–308
 161. Liénard D, Durambur G, Kiefer-Meyer M-C, et al (2008) Water transport by aquaporins in the extant plant *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* 146:1207–1218
 162. Liu Y-C, Vidali L (2011) Efficient polyethylene glycol (PEG) mediated transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *JoVE (Journal Vis Exp)* e2560
 163. Liu YF, Qi MF, Li TL (2012) Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. *Plant Sci* 196:8–17
 164. Livingston R, Ke C-L (1950) Quenching of the fluorescence of chlorophyll a solutions1. *J Am Chem Soc* 72:909–915
 165. Lohr M, Wilhelm C (1999) Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc Natl Acad Sci* 96:8784–8789
 166. Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res* 116:489–509
 167. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem* 193:265–275
 168. MacFarlane JD, Kershaw KA (1978) Thermal sensitivity in lichens. *Science* (80-) 201:739–741
 169. Makino A, Miyake C, Yokota A (2002) Physiological functions of the water--water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant Cell Physiol* 43:1017–1026
 170. Mamedov F, Sayre RT, Styring S (1998a) Involvement of histidine 190 on the D1 protein in electron/proton transfer reactions on the donor side of photosystem II. *Biochemistry* 37:14245–14256
 171. Mamedov MD, Gourovskaya KN, Vassiliev IR, et al (1998b) Electrogenicity accompanies photoreduction of the iron-sulfur clusters FA and FB in photosystem I. *FEBS Lett* 431:219–223
 172. Miller R, Wu G, Deshpande RR, et al (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol* 154:1737–1752

173. Mishler BD, Oliver MJ (2009) Putting *Physcomitrella patens* on the tree of life: the evolution and ecology of mosses. *Annu Plant Rev Vol 36 Moss Physcomitrella patens* 36:1–15
174. Mishra Y, Jänkänpää HJ, Kiss AZ, et al (2012) *Arabidopsis* plants grown in the field and climate chambers significantly differ in leaf morphology and photosystem components. *BMC Plant Biol* 12:6
175. Miyachi S, Iwasaki I, Shiraiwa Y (2003) Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high-CO₂ conditions. *Photosynth Res* 77:139–153
176. Miyake C, Yokota A (2000) Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol* 41:335–343
177. Moy A, Le S, Verhoeven A (2015) Different strategies for photoprotection during autumn senescence in maple and oak. *Physiol Plant* 155:205–216
178. Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125:1558–1566
179. Nabe H, Funabiki R, Kashino Y, et al (2007) Responses to desiccation stress in bryophytes and an important role of dithiothreitol-insensitive non-photochemical quenching against photoinhibition in dehydrated states. *Plant Cell Physiol* 48:1548–1557
180. Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880
181. Nawrocki WJ, Santabarbara S, Mosebach L, et al (2016) State transitions redistribute rather than dissipate energy between the two photosystems in *Chlamydomonas*. *Nat plants* 2:16031
182. Neto MCL, Carvalho FEL, Souza GM, Silveira JAG (2021) Understanding photosynthesis in a spatial--temporal multiscale: The need for a systemic view. *Theor Exp Plant Physiol* 33:113–124
183. Nicholls A, Honig B (1991) A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson--Boltzmann equation. *J Comput Chem* 12:435–445
184. Nishio JN (2000) Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant Cell Environ* 23:539–548
185. Nishiyama Y, Murata N (2014) Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8777–8796
186. Niyogi KK, Truong TB (2013) Evolution of flexible non-photochemical

- quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 16:307–314
187. O’Carrigan A, Hinde E, Lu N, et al (2014) Effects of light irradiance on stomatal regulation and growth of tomato. *Environ Exp Bot* 98:65–73
 188. Ortega JM, Mathis P, Williams JC, Allen JP (1996) Temperature dependence of the reorganization energy for charge recombination in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 35:3354–3361
 189. Osborne BA, Raven JA (1986) Light absorption by plants and its implications for photosynthesis. *Biol Rev* 61:1–60
 190. Osmond CB, Grace SC (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J Exp Bot* 46:1351–1362
 191. Papazyan A, Warshel A (1997) Continuum and dipole-lattice models of solvation. *J Phys Chem B* 101:11254–11264
 192. Park S, Steen CJ, Lyska D, et al (2019) Chlorophyll--carotenoid excitation energy transfer and charge transfer in *Nannochloropsis oceanica* for the regulation of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 116:3385–3390
 193. Parlange J-Y, Waggoner PE (1970) Stomatal dimensions and resistance to diffusion. *Plant Physiol* 46:337–342
 194. Pascal AA, Liu Z, Broess K, et al (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* 436:134–137
 195. Paschenko VZ, Churin AA, Gorokhov V V, et al (2016) The efficiency of non-photochemical fluorescence quenching by cation radicals in photosystem II reaction centers. *Photosynth Res* 130:325–333
 196. Peers G, Truong TB, Ostendorf E, et al (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462:518–521
 197. Peltier G, Cournac L (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol* 53:523–550
 198. Pfündel EE, Latouche G, Meister A, Cerovic ZG (2018) Linking chloroplast relocation to different responses of photosynthesis to blue and red radiation in low and high light-acclimated leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Photosynth Res* 137:105–128
 199. Pinnola A (2019) The rise and fall of Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins as photoprotection agents during evolution. *J Exp Bot* 70:5527–5535

200. Pinnola A, Staleva-Musto H, Capaldi S, et al (2016) Electron transfer between carotenoid and chlorophyll contributes to quenching in the LHCSR1 protein from *Physcomitrella patens*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 1857:1870–1878
201. Pisani T, Paoli L, Gaggi C, et al (2007) Effects of high temperature on epiphytic lichens: issues for consideration in a changing climate scenario. *Plant Biosyst* 141:164–169
202. Portis Jr AR, Li C, Wang D, Salvucci ME (2008) Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J Exp Bot* 59:1597–1604
203. Rabenstein B, Ullmann GM, Knapp E-W (1998) Energetics of electron-transfer and protonation reactions of the quinones in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemistry* 37:2488–2495
204. Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, et al (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* (80-) 319:64–69
205. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208
206. Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40:13–29
207. Rossini S, Casazza AP, Engelmann ECM, et al (2006) Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis* does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress. *Plant Physiol* 141:1264–1273
208. Ruban A V (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol* 170:1903–1916
209. Ruban A V, Wilson S (2021) The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces. *Plant Cell Physiol* 62:1063–1072
210. Samuilov VD, Kiselevsky DB, Oleskin A V (2019) Mitochondria-targeted quinones suppress the generation of reactive oxygen species, programmed cell death and senescence in plants. *Mitochondrion* 46:164–171
211. Sane PV, Ivanov AG, Hurry V, et al (2003) Changes in the redox potential of primary and secondary electron-accepting quinones in photosystem II confer increased resistance to photoinhibition in low-temperature-acclimated *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132:2144–2151
212. Sayed OH, El-Shahed AM (2000) Growth, photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) in response to growth

- temperature. *Cryptogam Algal* 21:283–290
213. Schaefer M, Van Vlijmen HWT, Karplus M (1998) Electrostatic contributions to molecular free energies in solution. *Adv Protein Chem* 51:1–58
 214. Schmid R, Labahn A (2000) Temperature and free energy dependence of the direct charge recombination rate from the secondary quinone in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Phys Chem B* 104:2928–2936
 215. Schweitzer RH, Brudvig GW (1997) Fluorescence quenching by chlorophyll cations in photosystem II. *Biochemistry* 36:11351–11359
 216. Semenov AY, Mamedov MD, Chamorovsky SK (2003) Photoelectric studies of the transmembrane charge transfer reactions in photosystem I pigment-protein complexes. *FEBS Lett* 553:223–228
 217. Senn G (1908) Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren: mit einer Beilage: Die Lichtbrechung der lebenden Pflanzenzelle. W. Engelmann
 218. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* 2012:
 219. Simonson T (2001) Macromolecular electrostatics: continuum models and their growing pains. *Curr Opin Struct Biol* 11:243–252
 220. Simonson T (2003) Electrostatics and dynamics of proteins. *Reports Prog Phys* 66:737
 221. Sirikhachornkit A, Niyogi KK (2010) Antioxidants and photo-oxidative stress responses in plants and algae. In: *The Chloroplast*. Springer, pp 379–396
 222. Sitkoff D, Sharp KA, Honig B (1994) Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J Phys Chem* 98:1978–1988
 223. Skulachev M V, Antonenko YN, Anisimov VN, et al (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies. *Curr Drug Targets* 12:800–826
 224. Solovchenko A, Gorelova O, Selyakh I, et al (2015) A novel CO₂-tolerant symbiotic *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Desmodesmaceae): Acclimation to and performance at a high carbon dioxide level. *Algal Res* 11:399–410
 225. Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Recht L, Boussiba S (2011) Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids. *Mar Biotechnol* 13:527–535

226. Solovchenko A, Solovchenko O, Khozin-Goldberg I, et al (2013) Probing the effects of high-light stress on pigment and lipid metabolism in nitrogen-starving microalgae by measuring chlorophyll fluorescence transients: studies with a Δ 5 desaturase mutant of *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Algal Res* 2:175–182
227. Strenkert D, Schmollinger S, Gallaher SD, et al (2019) Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci* 116:2374–2383
228. Strotmann H, Hesse H, Edelmann K (1973) Quantitative determination of coupling factor CF1 of chloroplasts. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics* 314:202–210
229. Suetsugu N, Higa T, Wada M (2016) Ferns, mosses, and liverworts as model systems for light-mediated chloroplast movements. *Plant Cell Environ* 1–10. <https://doi.org/10.1111/pce.12867>
230. Suetsugu N, Wada M (2008) Chloroplast photorelocation movement. *Plant Cell Monogr* 235–266
231. Sveshnikov D, Ensminger I, Ivanov AG, et al (2006) Excitation energy partitioning and quenching during cold acclimation in Scots pine. *Tree Physiol* 26:325–336
232. Syvertsen JP, Lloyd J, McConchie C, et al (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environ* 18:149–157
233. Sztatelman O, Waloszek A, Katarzyna Banaś A, Gabryś H (2010) Photoprotective function of chloroplast avoidance movement: *In vivo* chlorophyll fluorescence study. *J Plant Physiol* 167:709–716
234. Tazawa S (1999) Effects of various radiant sources on plant growth (Part 1). *JAPAN Agric Res Q* 33:163–176
235. Telfer A, Dhami S, Bishop SM, et al (1994) Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* 33:14469–14474
236. Terashima I, Fujita T, Inoue T, et al (2009) Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol* 50:684–697
237. Theocharis A, Clément C, Barka EA (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* 235:1091–1105
238. Thornton LE, Keren N, Ohad I, Pakrasi HB (2005) *Physcomitrella patens* and *Ceratodon purpureus*, mosses as model organisms in photosynthesis studies.

239. Tibiletti T, Auroy P, Peltier G, Caffarri S (2016) Chlamydomonas reinhardtii PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light. *Plant Physiol* 171:2717–2730
240. Tikhonov AN (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth Res* 116:511–534
241. Trubitsin B V, Tikhonov AN (2003) Determination of a transmembrane pH difference in chloroplasts with a spin label tempamine. *J Magn Reson* 163:257–269
242. Verhoeven A (2014) Sustained energy dissipation in winter evergreens. *New Phytol* 201:57–65
243. Vetoshkina D V, Borisova-Mubarakshina MM (2023) Reversible protein phosphorylation in higher plants: focus on state transitions. *Biophys Rev* 15:1079–1093
244. Voleníková M, Tichá I (2001) Insertion profiles in stomatal density and sizes in *Nicotiana tabacum* L. plantlets. *Biol Plant* 44:161–165
245. Wadsten P, Wöhri AB, Snijder A, et al (2006) Lipidic sponge phase crystallization of membrane proteins. *J Mol Biol* 364:44–53
246. Walla PJ, Holleboom C-P, Fleming GR (2014) Electronic Carotenoid-Chlorophyll Interactions Regulating Photosynthetic Light Harvesting of Higher Plants and Green Algae. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer, pp 229–243
247. Wang X, Liu Y, Yang P (2012) Proteomic studies of the abiotic stresses response in model moss--*Physcomitrella patens*. *Front Plant Sci* 3:258
248. Wang X, Yang P, Gao Q, et al (2008) Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta* 228:167–177
249. Wang X, Yang P, Zhang X, et al (2009) Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens*. *Proteomics* 9:4529–4538
250. Wang Y, Stessman DJ, Spalding MH (2015) The CO₂ concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO₂: how *Chlamydomonas* works against the gradient. *Plant J* 82:429–448
251. Warshel A, Papazyan A (1998) Electrostatic effects in macromolecules: fundamental concepts and practical modeling. *Curr Opin Struct Biol* 8:211–217
252. Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of

- different resolution. *J Plant Physiol* 144:307–313
253. Wientjes E, van Amerongen H, Croce R (2013) Quantum yield of charge separation in photosystem II: functional effect of changes in the antenna size upon light acclimation. *J Phys Chem B* 117:11200–11208
 254. Willmer C, Fricker M (1996) *Stomata*. Springer Science & Business Media
 255. Witt HT (1991) Functional mechanism of water splitting photosynthesis. *Photosynth Res* 29:55–77
 256. Xiong B, Zhang W, Chen L, et al (2014) Effects of Pb (?) exposure on *Chlorella protothecoides* and *Chlorella vulgaris* growth, malondialdehyde, and photosynthesis-related gene transcription. *Environ Toxicol* 29:1346–1354
 257. Xu Y, Fu X (2022) Reprogramming of plant central metabolism in response to abiotic stresses: A metabolomics view. *Int J Mol Sci* 23:5716
 258. Zarter C, Adams WW, Ebbert V, et al (2006a) Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen *Arctostaphylos uva-ursi* as influenced by altitude and light environment. *Plant Cell Environ* 29:869–878
 259. Zarter CR, Adams WW, Ebbert V, et al (2006b) Winter down-regulation of intrinsic photosynthetic capacity coupled with up-regulation of Elip-like proteins and persistent energy dissipation in a subalpine forest. *New Phytol* 172:272–282
 260. Zhang H, Zhang GY, Wen XB, Others (2014) Effects of pH on the photosynthesis, growth and lipid production of *Chlorella* sp. XQ-200419 38:1084–1091
 261. Zhang X-P, Glaser E (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* 7:14–21
 262. Zones JM, Blaby IK, Merchant SS, Umen JG (2015) High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals continuous cell and metabolic differentiation. *Plant Cell* 27:2743–2769
 263. Zurzycki J (1962) The action spectrum for the light depended movements of chloroplasts in *Lemna trisulca* L. *Acta Soc Bot Pol* 31:489–538
 264. Zurzycki J (1967) Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica*. I. Action spectrum. *Acta Soc Bot Pol* 36:133–142
 265. Zurzycki J (1955) Chloroplasts arrangement as a factor in photosynthesis. *Acta Soc Bot Pol* 24:27–63

ХII. Список статей по теме диссертации

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. **Птушенко В. В.**, Бондаренко Г. Н., Виноградова Е. Н., Глаголева Е. С., Карпова О. В., Птушенко О. С., Шибзухова К. А., Соловченко А. Е., Лобакова Е. С. Индукция экспрессии фотозащитных белков PsbS и LhcSR в клетках зелёной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 под действием низкой положительной температуры // Биохимия. –2022. – Т. 87. – № 12. – С. 2089–2098. – DOI: 10.31857/S0320972522120235 (**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. **Птушенко В. В.**, Бондаренко Г. Н., Виноградова Е. Н., Глаголева Е. С., Карпова О. В., Птушенко О. С., Соловченко А. Е., Трубицин Б. В., Чивкунова О. Б., Шибзухова К. А., Щербаков П. Н. Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли *Lobosphaera incisa*

- IPPAS C 2047 // Биохимия. – 2021. – Т. 86. – № 12. – С. 1853–1864. – DOI: 10.31857/S0320972521120095 (**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. **Птушенко В.В.** Электрические кабели клеток. I. Перенос энергии вдоль сопрягающих мембран // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – № 7. – С. 963-977. – DOI: 10.1134/S000629792007010X (**Ptushenko V.V.** Electric cables of living cells. I. Energy transfer along coupling membranes // Biochemistry (Moscow). – 2020. – V. 85. – N. 7. – P. 820-832) (**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/pp1.12963 (**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 P₇₀₀⁺ 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 Ca²⁺ 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. **Птушенко В.В.**, Птушенко О.С., Самойлова О.П., Соловченко А.Е. Анализ кажущегося нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и устойчивости к фотоповреждению листьев традесканции на основе скорости светозависимых изменений прозрачности // *Биохимия*. – 2017. – Т. 82. – № 1. С. 157-166. – DOI: 10.1134/S0006297917010072 (**Ptushenko V.V.**, Ptushenko O.S., Samoiloa 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) (**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. **Птушенко В.В.**, Соловченко А.Е. Толерантность фотосинтетического аппарата к закислению среды как возможная детерминанта CO₂-толерантности симбиотической микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPASS-2014 // *Биохимия*. –

2016. – V. 81. – N 12. – P. 1849-1856. – DOI: 10.1134/S0006297916120142 (**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) (**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.**, Shtaer 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. **Птушенко В.В.**, Птушенко О.С., Тихонов А.Н. Индукция флуоресценции, содержание хлорофилла и цветовые характеристики листьев как показатели старения фотосинтетического аппарата древесных растений // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – № 3. – С. 338–352. – DOI: 10.1134/S0006297914030122 (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 arboreous plants // Biochemistry (Moscow). – 2014. – V. 79. – N. 3. – P. 260-272) (**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., Samoilova 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. **Птушенко В.В.**, Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н. Биофизические методы экологического мониторинга. Фотосинтетические показатели листьев древесных растений в условиях города Москвы // Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 2. – С. 313-320. – DOI: 10.1134/S0006350913020152 (**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) (**WoS JIF 0.43** / 0.5 п.л. / 0.25 п.л.)

24. Samoilova 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. Глазунова С.А., **Птушенко В.В.**, Гунар Л.Э., Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н. Медленная индукция флуоресценции и CO₂-обмен листьев бобов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* // *Биофизика*. – 2009. – Т. 54. – № 3. – С. 492-494. – DOI: 10.1134/S0006350909030154 (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) (**WoS JIF 0.43** / 0.15 п.л. / 0.05 п.л.)
27. Кувыкин И.В., Вершубский А.В., **Птушенко В.В.**, Тихонов А.Н. Кислород как альтернативный акцептор в фотосинтетической цепи электронного транспорта C₃-растений // *Биохимия*. – 2008. – Т. 73. – № 10. – С. 1329–1343. – DOI: 10.1134/S0006297908100027 (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) (**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.)