

Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук (ИФПБ РАН)

Обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный
центр биологических исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

на правах рукописи

Борисова Мария Мансуровна

**Молекулярные механизмы участия пула пластохинона в регуляции
структурно-функциональной организации фотосинтетического
аппарата высших растений**

Специальность: 03.01.02 – «Биофизика»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

**Научный консультант:
доктор биологических наук
Иванов Б.Н.**

Пушино – 2021

Оглавление

Список сокращений	5
Введение. Общая характеристика работы	6
Глава 1. Обзор литературы	16
1.1. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь	16
1.1.1. Общее строение фотосинтетической электрон-транспортной цепи ..	16
1.1.2. Структура комплекса ФС II-ССК II	18
1.1.3. Структура комплекса ФС I-ССК I	22
1.1.4. Цитохромный <i>b₆/f</i> комплекс	25
1.1.5. АТФ-синтаза	27
1.1.6. Переносчики фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов: пластохинон и пластоцианин	28
1.1.6.1. Пластохинон	28
1.1.6.2. Пластоцианин	29
1.2. Образование АФК компонентами фотосинтетической электрон- транспортной цепи	30
1.2.1. АФК и реакция Мелера	30
1.2.2. Образование супероксидных анион-радикалов компонентами пула пластохинона и кофакторами фотосистемы I вне и внутри тилакоидной мембраны	31
1.2.3. Образование пероксида водорода компонентами стромы и компонентами тилакоидной мембраны	37
1.2.4. Возможные реакции форм кислорода и компонентов пула пластохинона, влияющие на окислительно-восстановительное состояние пула и определяющие роль пула пластохинона в метаболизме высших растений	41
1.3. Влияние факторов среды на функционирование высших растений и механизмы приспособления растений к условиям окружающей среды	48
1.3.1. Условия освещения и регуляторная роль окислительно- восстановительного состояния пула пластохинона	48
1.3.2. Условия засухи	55
1.3.3. Засоление почвы	59
1.3.4. Колонизация ризосферными бактериями	61
1.4. Сигнальная функция АФК	63
Глава 2. Материалы и методы	73
2.1. Растительный материал	73
2.2. Выделение тилакоидов из листьев гороха и шпината	73
2.3. Выделение тилакоидов из листьев ячменя	74
2.4. Выделение тилакоидов из листьев арабидопсиса	74

2.5.	Выделение хлоропластов из листьев шпината	74
2.6.	Определение концентрации хлорофилла	75
2.7.	Выделение протопластов из листьев арабидопсиса.....	75
2.8.	Определение фотосинтетической активности хлоропластов и тилакоидов.	76
2.9.	Измерение флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев	76
2.10.	Измерение индукционных кривых флуоресценции хлорофилла <i>a</i> ФС II высокого разрешения, JР-тест.....	77
2.11.	Измерение скорости восстановления цитохрома <i>c</i> в суспензии тилакоидов	78
2.12.	Измерение содержания H ₂ O ₂ в листьях.....	78
2.13.	Измерение карбоангидразной активности	79
2.14.	Измерение содержания белка	79
2.15.	Выделение мембранной оболочки хлоропластов.....	79
2.16.	Проведение денатурирующего электрофореза.....	79
2.17.	Проведение вестерн-блот анализа.....	80
2.18.	Измерение количества крахмала в листьях.....	80
2.19.	ЭПР измерения спиновой пробы SASL-16.....	80
2.20.	ЭПР измерения спиновой пробы 4-POBN.....	80
2.21.	Измерение образования H ₂ O ₂ в суспензии хлоропластов с помощью спектрофлуориметра	81
2.22.	Масс-спектрометрические измерения	81
2.23.	Конфокальная микроскопия	82
2.24.	Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	83
2.25.	Условия культивирования микроорганизмов	83
2.26.	Определение колонизирующей способности ризосферных бактерий ..	84
Глава 3.	Результаты	85
3.1.	Образование пероксида водорода компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи.....	85
3.2.	Реакция ПХН ₂ с O ₂ ^{•-} в тилакоидной мембране	91
3.3.	Влияние интенсивности света на образование супероксидного анион-радикала в фотосинтетической электрон-транспортной цепи.....	102
3.4.	Обнаружение выхода пероксида водорода, образованного компонентами ФЭТЦ внутри хлоропласта, за пределы хлоропласта.....	105
3.5.	Изучение механизма диффузии H ₂ O ₂ из хлоропластов.....	115
3.6.	Установление сигнальной роли H ₂ O ₂ в регуляции размера светособирающего «антенного» комплекса фотосистемы II	121

3.7. Уменьшение размера антенны ФС II в условиях засухи и засоления почвы при увеличении содержания пероксида водорода в листьях	129
3.8. Увеличение размера антенны ФС II при колонизации растений ризосферными бактериями	140
Глава 4. Обсуждение результатов	146
Заключение	154
Библиографический список	158
Список иллюстраций	199
Список таблиц	203

Список сокращений

- ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь
ФС I – фотосистема I
ФС II – фотосистема II
РЦ – реакционный центр
ПХ пул – пул пластохинона
ПХ – окисленный пластохинон
ПХ^{•-} – однократно восстановленный пластохинон, пластосемихинон
ПХН₂ – двукратно восстановленный пластохинон, пластогидрохинон
Хл – хлорофилл
Мв – метилвиологен
Фд – ферредоксин
НФТ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*
СОД – супероксиддисмутаза
Lhca – белки светособирающего комплекса фотосистемы I
Lhcb – белки светособирающего комплекса фотосистемы II
ССК II – пигмент-белковый светособирающий «антенный» комплекс фотосистемы II
АФК – активные формы кислорода
Н₂О₂ – пероксид водорода
DCMU – дихлорфенилдиметилмочевина, диурон
ДНФ-ИНТ – динитрофенил эфир 2-йод-4-нитротимол

Введение. Общая характеристика работы

Актуальность темы и степень ее разработанности

Фотосинтез – физико-химический процесс преобразования энергии квантов света в энергию химических связей органических соединений – вызывает пристальное внимание ученых всего мира. Установлены его характеристики, описана последовательность реакций от поглощения энергии кванта света до включения молекулы CO_2 в состав органических соединений. Получены данные об изменении скорости и характера протекания отдельных фотосинтетических реакций и изменении структуры фотосинтетического аппарата при действии внешних факторов, таких как интенсивность освещения, температура, содержание углекислого газа, влагообеспеченность, засоление почвы и др. Эти изменения можно рассматривать как приспособительные (акклимационные), т.е. направленные на обеспечение оптимального в данных условиях фотосинтеза, от чего в значительной степени зависит рост и развитие фотосинтезирующих организмов. Для практических потребностей человека это означает сохранение высокой продуктивности, прежде всего, сельскохозяйственных культур.

Согласованная работа клеточных органелл поддерживается благодаря постоянному обмену информацией об их функциональном состоянии. В настоящее время одной из «горячих» точек является изучение молекулярных механизмов передачи сигнала от электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата другим компартментам клетки. Именно эта проблема и явилась темой диссертационного исследования. Очевидно, что количественные и качественные изменения компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи являются результатом изменения в процессах их биосинтеза и/или деградации. Но откуда и как поступает сигнал о направленном изменении этих процессов? Безусловно, факторы окружающей среды влияют на скорость реакций фотосинтеза. Однако они действуют в рамках уже имеющейся структуры фотосинтетического аппарата хлоропластов и не могут сами влиять на приспособительный характер изменения этой структуры.

Процесс передачи сигнала из хлоропласта в ядро получил название ретроградной сигнализации. Несмотря на возросшее число публикаций по этой теме, наблюдается недостаток комплексных работ, раскрывающих механизмы ретроградной сигнализации. Важным наблюдением, сделанным в начале 90-х годов XX века, явилось обнаружение того, что ядерные системы

фотосинтезирующих организмов реагируют на окислительно-восстановительное состояние пластохинонового пула (ПХ пул) (Lindahl и др., 1995; Pfannschmidt и др., 1993; Pfannschmidt и др., 2003; Karpinski и др., 1999). В частности, было показано, что ПХ пул вовлечен в акклимационную регуляцию структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений, а именно в регуляцию экспрессии ядерных генов белков внешнего пигмент-белкового светособирающего антенного комплекса фотосистемы II (ССК II), приводящую к изменению содержания этих белков и, как следствие, к изменению размера антенны фотосистемы II (ФС II) (Escoubas и др., 1995; Yang и др., 2001). Фотохимически активный ПХ пул сосредоточен в тилакоидных мембранах хлоропластов, и возникает вопрос, как его окислительно-восстановительное состояние влияет на экспрессию ядерных генов?

В регуляции экспрессии ядерных генов в ретроградной сигнализации участвуют фитохромы, гормоны (абсцизовая, салициловая, жасмоновая кислоты), МАПК-киназы (митоген-активируемые протеинкиназы), тиоредоксины, Ca_2^+ , оксид азота и др. При изучении проблемы передачи сигналов из хлоропласта в ядро возникли предположения, что носителями сигнала, первичными или вторичными, могут быть и активные формы кислорода (АФК), которые ранее рассматривали только как деструктивные агенты, способные нарушать функциональную активность ферментов и разрушать белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Основным направлением диссертационной работы было получение новых экспериментальных результатов для обоснования существования механизма ретроградной сигнализации с вовлечением молекул АФК в высших растениях. Для этого требовалось детально изучить биофизические и биохимические механизмы образования АФК в реакциях фотосинтеза и выяснить функциональную значимость одной из стабильных АФК – пероксида водорода (H_2O_2) в клетках растений.

Для решения вопроса о молекулярном носителе сигнала об окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула необходимо было установить, участвуют ли компоненты ПХ пула в образовании H_2O_2 в хлоропластах высших растений. Нами были рассмотрены возможные реакции компонентов ПХ пула с супероксидным анион-радикалом и выбрана наиболее термодинамически выгодная реакция восстановления этого радикала, в результате которой происходит образование пероксида водорода. В рамках диссертационной работы был осуществлен поиск путей для экспериментального подтверждения

протекания такой реакции в фотосинтетической электрон-транспортной цепи высших растений.

С учетом механизмов образования H_2O_2 , которые были раскрыты в ходе проделанной работы, возникли новые задачи, которые также стали предметом исследования диссертационной работы. Предстояло установить возможность и механизмы диффузии молекул H_2O_2 из хлоропластов и получить экспериментальные данные о том, является ли H_2O_2 сигнальным агентом, который способен изменять экспрессию ядерных генов, кодирующих белки ССК II.

Цель и задачи работы

Цель: Исследовать образование пероксида водорода в хлоропластах с участием компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи и изучить роль пероксида водорода в передаче информации об окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула системам регуляции экспрессии ядерных генов.

Задачи:

- 1) Установить участие компонентов ПХ пула в образовании H_2O_2 в фотосинтетической электрон-транспортной цепи и выяснить молекулярный механизм этого процесса.
- 2) Выявить роль ПХ пула в общем образовании H_2O_2 в тилакоидных мембранах при разной интенсивности света.
- 3) Выяснить возможность и механизм диффузии молекул H_2O_2 , образующихся внутри хлоропласта, за пределы хлоропласта.
- 4) Установить зависимость экспрессии ядерных генов, кодирующих белки внешней антенны ФС II, от окислительно-восстановительного состояния ПХ пула и уровня содержания пероксида водорода в фотосинтезирующих клетках.
- 5) Оценить влияние абиотических факторов, таких как снижение влагообеспеченности и засоление почвы, на функционирование фотосинтетического аппарата высших растений, окислительно-восстановительное состояние ПХ пула, скорость образования H_2O_2 и размер ССК II.

- б) Оценить влияние биотических факторов (на примере колонизации растений ризосферными бактериями) на окислительно-восстановительное состояние ПХ пула, скорость образования H_2O_2 и размер ССК II в высших растениях.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования были высшие растения: резуховидка Таля (*Arabodopsis thaliana*), горох посевной (*Pisum sativum*), шпинат огородный (*Spinacia oleracea*) и ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare*). Эксперименты проводили как на выделенных структурах (протопласты, хлоропласты, тилакоиды), так и на целых листьях. Предметом исследований являлось изучение механизма образования пероксида водорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) с участием компонентов ПХ пула и установление зависимости экспрессии ядерных генов, кодирующих белки внешней антенны ФС II фотосинтетического аппарата высших растений, от окислительно-восстановительного состояния ПХ пула и уровня содержания пероксида водорода в листьях растений.

Научная новизна

Материалы, изложенные в диссертации, раскрывают ранее неизученные механизмы участия компонентов ПХ пула в образовании сигнальной молекулы H_2O_2 , вовлеченной в процессы ретроградной сигнализации высших растений. Изменение размера пигмент-белкового антенного комплекса ФС II при действии абиотических и биотических факторов является принципиально новым полученным результатом, показывающим, что изменение размера антенны ФС II является универсальным механизмом приспособления растений к факторам среды. Такая регуляция определяется скоростью образования H_2O_2 в фотосинтезирующих клетках и скоростью диффузии H_2O_2 через мембранную оболочку хлоропласта. Полученные данные раскрывают механизм участия ПХ пула в регуляции структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений, а именно, в изменении содержания белков ССК II при действии факторов среды.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты существенно расширяют фундаментальные представления о функциональной роли ПХ пула тилакоидных мембран. В новом свете представлены биофизические аспекты взаимодействия

компонентов ПХ пула с формами кислорода, а также пути акклимационной регуляции количества поглощаемой энергии света в антенных комплексах ФС II фотосинтетического аппарата при действии факторов окружающей среды. Данные о механизме образования и сигнальной функции H_2O_2 , которые были получены в ходе выполнения диссертационной работы, могут быть использованы для создания более полной схемы внутриклеточной сигнализации.

Результаты исследований механизма образования H_2O_2 с участием компонентов ПХ пула и роли H_2O_2 в регуляции биосинтеза белков, от экспрессии генов которых зависит размер ССК II, могут быть использованы в подготовке лекций для студентов высших учебных заведений по программе курсов Биофизика и Биохимия растений.

Данные о возможности регулирования размера ССК II могут быть востребованы при решении вопросов повышения устойчивости культурных растений к неблагоприятным факторам внешней среды, а также при выведении новых высокопродуктивных линий сельскохозяйственных культур.

Основные положения, представленные в работе, могут быть использованы при разработке акклимационных моделей взаимодействия природы и общества в свете больших вызовов, стоящих перед обществом на современном этапе.

Методология диссертационного исследования

Для решения поставленных экспериментальных задач был привлечен комплекс биофизических, биохимических и молекулярно-генетических методов, в частности, метод пульс-амплитудной модуляции (ПАМ флуориметрия), амперометрия, спектрофотометрический метод, метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), электрофоретические методы и метод вестерн блоттинга, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией, флуоресцентные методы, конфокальная микроскопия, а также метод измерения индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II высокого разрешения (ОЛР). Подробное описание методов представлено в главе 2.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Образование H_2O_2 в хлоропластах происходит не только в строме хлоропластов, но и в тилакоидной мембране. Последний процесс происходит в

- результате реакции $O_2^{\cdot-}$ с восстановленным пластохиноном, молекулой пластогидрохинона, ПХН₂, что приводит к образованию «мембранного» H₂O₂.
- 2) Увеличение суммарной продукции H₂O₂ компонентами ФЭТЦ при увеличении интенсивности света происходит, в основном, за счет увеличения образования «мембранного» H₂O₂.
 - 3) Молекулы H₂O₂, образующиеся внутри хлоропластов, диффундируют через мембрану хлоропластов за пределы хлоропластов. Количество молекул H₂O₂, вышедших из хлоропластов, значительно увеличивается с увеличением времени и интенсивности освещения, а также при ингибировании активности антиоксидантной системы хлоропластов. Диффузия молекул H₂O₂ из хлоропласта осуществляется через аквапорины мембранной оболочки хлоропласта, регуляция активности которых, возможно, связана с функционированием карбоангидраз оболочки хлоропласта.
 - 4) Повышение содержания H₂O₂ в листьях является сигналом для уменьшения размера ССК II, а понижение содержания H₂O₂, наоборот, – для увеличения размера ССК II.
 - 5) Регуляция размера антенны ФС II является одним из универсальных механизмов изменения структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений при изменении условий окружающей среды как абиотической (повышенная освещенность, засуха, засоление почвы), так и биотической природы (колонизация ризосферными бактериями).

Личный вклад автора заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке цели и задач исследования и разработке путей их решения, а также в непосредственном участии в экспериментальной работе и представлении полученных результатов научному сообществу. Часть работ по теме диссертации выполнена совместно с сотрудниками научно-исследовательского центра СЕА Саклэй (Франция), университета г. Вероны (Италия), а также Австралийского национального университета (г. Канберра, Австралия).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается их публикацией в рецензируемых журналах международного уровня с высокими импакт-факторами. Материалы диссертации были многократно представлены на научных семинарах лаборатории фотосинтетического электронного транспорта ИФПБ РАН, на

кафедре биофизики биологического факультета МГУ, на семинарах научно-исследовательского центра СЕА Саклэй (Франция), университета г. Вероны (Италия) и Австралийского национального университета (г. Канберра), а также на конференциях, конгрессах и симпозиумах в качестве устных приглашенных докладов. Кроме того, материалы диссертации были представлены в качестве стендовых и устных докладов на других, более 70-ти, конференциях.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному консультанту и наставнику д.б.н. Борису Николаевичу Иванову за помощь в подготовке диссертационной работы, а также за ценные замечания по содержанию диссертации. Автор благодарит к.б.н. Ветошкину Дарью Васильевну, к.б.н. Козулеву Марину Алексеевну, к.б.н. Руденко Наталью Николаевну, к.б.н. Игнатову Людмилу Казимировну, к.б.н. Найдова Илью Александровича, к.б.н. Федорчук Татьяну Петровну, к.б.н. Надееву Елену Михайловну, асп. Вильянен Дарью Валентиновну и других сотрудников лаборатории фотосинтетического электронного транспорта ИФПБ РАН за всестороннюю поддержку и помощь. Автор также благодарит заведующего лабораторией молекулярной спектроскопии ИФПБ РАН д.ф.-м.н. Проскурякова Ивана Игоревича и сотрудника группы экологии и физиологии фототрофных организмов ИФПБ РАН д.б.н. Любимова Валерия Юрьевича за плодотворное сотрудничество.

Автор выражает благодарность своей семье за поддержку и особенно своей маме, Мубаракшиной Нине Михайловне, без которой написание этой работы не было бы возможным.

Публикации

Автором опубликовано 35 публикаций в рецензируемых научных изданиях, из них по теме диссертации – 19 научных статей в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, SCOPUS, RSCI, и 3 монографии. Ссылки в диссертации на статьи автора приведены цифрами со звездочкой.

Публикации автора по теме диссертации. В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

Статьи

*1. Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins / М.М. Borisova-Mubarakshina, М.А.

Kozuleva, N.N. Rudenko, I.A. Naydov, I.B. Klenina, B.N. Ivanov // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1817. – P. 1314–1321. – DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.036 – **IF WoS 3.422** – (0.92/0.64).

*2. Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling / M.M. Mubarakshina, B.N. Ivanov, I.A. Naydov, W. Hillier, M.R. Badger, A. Krieger-Liszkay // *Journal of Experimental Botany*. – 2010. – Vol. 61. – P. 3577–3587. – DOI: 10.1093/jxb/erq171 – **IF WoS 5.09** – (1.27/1.14).

*3. Naydov I. A. Formation kinetics and H₂O₂ distribution in chloroplasts and protoplasts of photosynthetic leaf cells of higher plants under illumination / I.A. Naydov, M.M. Mubarakshina, B.N. Ivanov // *Biochemistry*. – 2012 – Vol. 77. – P. 179–189. – DOI: 10.1134/S0006297912020046 – **IF RINC 2.314, IF WoS 1.978** – (1.27/0.25).

*4. Ivanov B.N. Formation mechanisms of superoxide radical and hydrogen peroxide in chloroplasts, and factors determining the signaling by hydrogen peroxide / B.N. Ivanov, M.M. Borisova-Mubarakshina, M.A. Kozuleva // *Functional Plant Biology*. – 2017. – Vol. 45. – P. 102–110. – DOI: 10.1071/FP16322 – **IF WoS 2.62** – (1.04/0.21).

*5. Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction / D.V. Vetoshkina, B.N. Ivanov, I.I. Proskuryakov, M.M. Borisova-Mubarakshina // *Physiologia Plantarum*. – 2017. – Vol. 161. – P. 45–55. – DOI: 10.1111/ppl.12560 – **IF WoS 4.1** – (1.27/0.76).

*6. Mubarakshina M.M. The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes. Minireview / M.M. Mubarakshina, B.N. Ivanov // *Physiologia Plantarum*. – 2010. – Vol. 140. – P. 103–110. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01391.x – **IF WoS 4.1** – (0.92/0.46).

*7. Антиоксидантные свойства пластохинона и перспективы его практического применения / М.М. Борисова-Мубаракшина, Б.Н. Иванов, Н.И. Орехова, С.С. Осочук // *Биофизика*. – 2018. – Т. 63. – С. 1103-1110. DOI:10.1134/S0006302918060078 – **IF RINC 1.236** – (0.92/0.55).

*8. Сравнение функциональной активности ксантиноксидаз, выделенных из микроорганизмов и из коровьего молока / А.С. Горбунова, М.М. Борисова-Мубаракшина, И.А. Найдов, С.С. Осочук, Б.Н. Иванов // *Доклады Академии наук*. – 2018. – Т. 483. – С. 564–567. – DOI: 10.31857/S086956520003309-2 – **IF RINC 0.994, IF WoS 0.67** – (0.46/0.32).

*9. Borisova-Mubarakshina M.M. Oxidation of the plastoquinone pool in chloroplast thylakoid membranes by superoxide anion radicals / M.M. Borisova-Mubarakshina, I.A.

Naydov, B.N. Ivanov // *FEBS Letters*. – 2018. – Vol. 592. – P. 3221–3228. – DOI: 10.1002/1873-3468.13237 – **IF WoS 3.37** – (0.92/0.46).

*10. Исследование восстановления кислорода в фотосистеме 1 высших растений с применением доноров электронов для этой фотосистемы в целых тилакоидах / М.А. Козулева, Д.В. Ветошкина, А.А. Петрова, М.М. Борисова-Мубаракшина, Б.Н. Иванов // *Биологические мембраны*. 2014. – Vol. 31. – P. 427–434. DOI: 10.7868/S0233475514060024 – **IF RINC 0.703** – (0.92/0.09).

*11. Borisova-Mubarakshina M.M. Antioxidant and signaling functions of the plastoquinone pool in higher plants / M.M. Borisova-Mubarakshina, D.V. Vetoshkina, B.N. Ivanov // *Physiologia Plantarum*. – 2019. – Vol. 166. – P. 181–187. – DOI: 10.1111/ppl.12936 – **IF WoS 4.1** – (2.08/1.66).

*12. Minimizing an Electron Flow to Molecular Oxygen in Photosynthetic Electron Transfer Chain: An Evolutionary View / M.A. Kozuleva, B.N. Ivanov, D.V. Vetoshkina, M.M. Borisova-Mubarakshina // *Frontiers in Plant Sciences*. – 2020. – P. 11. – DOI: 10.3389/fpls.2020.00211 – **IF WoS 4.4** – (0.81/0.24).

*13. Advances in understanding the physiological role and locations of carbonic anhydrases in C3 plant cells / N.N. Rudenko, L.K. Ignatova, E.M. Nadeeva-Zhurikova, T.P. Fedorchuk, B.N. Ivanov, M.M. Borisova-Mubarakshina // *Protoplasma*. – 2020. – DOI: 10.1007/s00709-020-01566-1 – **IF WoS 2.77** – (1.62/0.49).

*14. Carbonic anhydrases in photosynthesizing cells of C3 higher plants / L. Ignatova, N. Rudenko, E. Zhurikova, M. Borisova-Mubarakshina, B. Ivanov // *Metabolites*. 2019 – Vol. 9. – P. 73. – DOI: 10.3390/metabo9040073 – **IF WoS 3.3** – (1.73/0.17).

*15. Сравнение изменений состояния фотосинтетической антенны арабидопсиса и ячменя при кратковременном действии света / Д.В. Ветошкина, М.А. Козулева, В.В. Терентьев, Е.М. Журикова, М.М. Борисова-Мубаракшина, Б.Н. Иванов // *Биохимия*. – 2019. – Vol. 84. – P. 1311 – 1321. – DOI: 10.1134/S0320972519090094 – **IF RINC 2.314, IF WoS 1.978** – (1.27/0.76).

*16. The Size of the Light-Harvesting Antenna of Higher Plant Photosystem II Is Regulated by Illumination Intensity through Transcription of Antenna Protein Genes / M.M. Borisova-Mubarakshina, D.V. Vetoshkina, N.N. Rudenko, G.N. Shirshikova, T.P. Fedorchuk, I.A. Naydov, B.N. Ivanov // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 79. – P. 661–665. – DOI: 10.1134/S0006297914060042 – **IF RINC 2.314, IF WoS 1.978** – (0.46/0.18).

*17. Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size / M.M. Borisova-Mubarakshina, B.N. Ivanov, D.V. Vetoshkina, V.Y. Lubimov, T.P. Fedorchuk, I.A.

Naydov, M.A. Kozuleva, N.N. Rudenko, L. Dall'Osto, S. Cazzaniga, R. Bassi // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 66. – P. 7151–7164. – DOI: 10.1093/jxb/erv410 – **IF WoS 5.09** – (1.62/1.13).

*18. Regulation of the size of photosystem II light harvesting antenna represents a universal mechanism of higher plant acclimation to stress conditions / M.M. Borisova-Mubarakshina, D.V. Vetoshkina, I.A. Naydov, N.N. Rudenko, E.M. Zhurikova, N.V. Balashov, L.K. Ignatova, T.P. Fedorchuk, B.N. Ivanov // *Functional Plant Biology*. – 2020. – Vol. 47. – P. 959–969. – DOI: 10.1071/FP19362 – **IF WoS 2.49** – (1.27/0.89).

*19. Возрастание потенциала адаптации к повышенной освещенности растений ячменя, колонизированных ризобактериями *P. Putida* BS3701 / Д.В. Ветошкина, И.Ю. Позднякова-Филатова, Е.М. Журикова, А.А. Фролова, И.А. Найдов, Б.Н. Иванов, М.М. Борисова-Мубаракшина // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55. – С. 181–190. – DOI: 10.1134/S0555109919020132 – **IF WoS 1.02** – (1.16/0.17).

Монографии

1. Иванов Б.Н., Хоробрых С.А., Козулева М.А., Борисова-Мубаракшина М.М. Роль кислорода и его активных форм при фотосинтезе. *Современные проблемы фотосинтеза*. (Аллахвердиев С.И., Рубин А.Б., Шувалов В.А., ред.) Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва), 2014, т. 1, стр. 407-460; ISBN 978-5-4344-0181-4.
2. Ivanov B.N., Kozuleva M.A. and Mubarakshina M.M. (2012) Oxygen Metabolism in Chloroplast in *Cell Metabolism – Cell Homeostasis and Stress Response*, Ed. P. Bubulya, 39–72, ISBN 978-953-307-978-3.
3. Rudenko N.N., Borisova-Mubarakshina M.M., Ignatova L.K., Fedorchuk T.P., Nadeeva-Zhurikova E.M., Ivanov B.N. (2020) Role of Plant Carbonic Anhydrases under Stress Conditions. *In book: Plant Stress Physiology*, DOI: 10.5772/intechopen.91971

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 203 страницах, включая 11 рисунков в обзоре литературы, 32 рисунка в результатах работы и 1 рисунок в обсуждении, а также 9 таблиц. Диссертация включает 4 главы, в том числе обзор литературы, описание методов исследования, результаты работы и обсуждение результатов, заключение с выводами и список цитируемой литературы из 434 наименований.

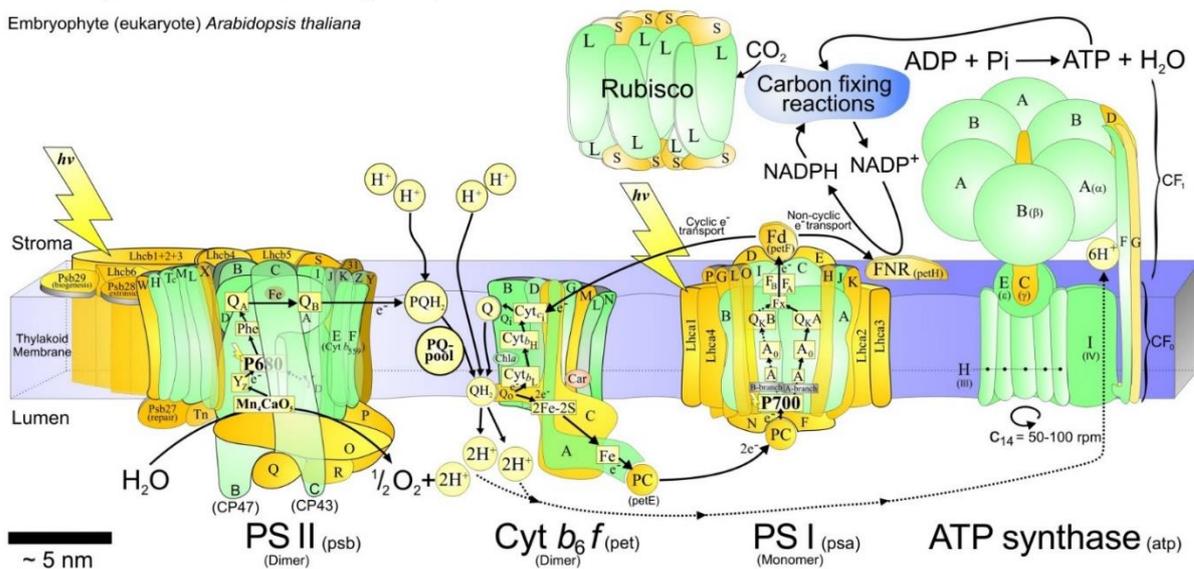
Глава 1. Обзор литературы

1.1. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь

1.1.1. Общее строение фотосинтетической электрон-транспортной цепи

В фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) тилакоидных мембран хлоропластов высших растений поглощение энергии квантов солнечного света и последующая фотохимическая трансформация энергии осуществляются пигмент-белковыми мембранными комплексами. Фотосинтетические световые реакции, протекающие в двух фотосистемах: фотосистеме 2 (ФС II) и фотосистеме 1 (ФС I), – преобразуют энергию квантов солнечного света в химическую. В составе каждой фотосистемы выделяют пигмент-белковый коровый комплекс (кор-комплекс) и светособирающий «антенный» комплекс (ССК), также состоящий из пигмент-белковых комплексов. Энергия квантов солнечного света улавливается антенными комплексами обеих фотосистем, при этом светособирающий комплекс I (ССК I) улавливает энергию возбуждения только для ФС I, в то время как светособирающий комплекс II (ССК II) может функционировать как антенна для обеих фотосистем, поскольку часть ССК II высших растений, а также водорослей, способна мигрировать от ФС II к ФС I и обратно (Rantala, Tikkanen, 2018; Grieco и др., 2015; Wientjes и др., 2013). Этот процесс называется «переходы состояний» (state transitions в англоязычной литературе) и представляет собой реорганизацию светособирающих пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран под действием света посредством фосфорилирования/дефосфорилирования белков ССКII (Allen, Pfannschmidt 2000) (см. главу 3.1).

При освещении растений электроны, появившиеся в результате разложения воды, переносятся от ФС II через пул пластохинона (ПХ пул) к цитохромному *b₆/f* (цит. *b₆/f*) комплексу и в дальнейшем с участием пластоцианина к ФС I (Рис. 1) для восстановления ферредоксина, который служит донором электронов для восстановления НАДФ⁺ в НАДФН, катализируемом ферредоксин-НАДФ⁺-редуктазой (ФНР). При транспорте электронов происходит закачка протонов в люмен – щелевидное внутритилакоидное пространство, и создается электрохимический градиент через тилакоидную мембрану, необходимый для работы АТФ-синтазы. Получаемый в результате АТФ вместе с НАДФН служат источником энергии для обмена веществ в хлоропласте.

Embryophyte (eukaryote) *Arabidopsis thaliana*

See online version for legend

Trends in Plant Science, December 2011, Vol. 16 (No. 12)

Рис. 1. Организация фотосинтетического аппарата высших растений. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь расположена в тилакоидной мембране хлоропластов. Выделяют три основных комплекса: PS II – фотосистема II; PS I – фотосистема I; *cyt b₆f* – цитохромный *b₆f* комплекс. Перенос электронов между фотосистемой II и цитохромным *b₆f* комплексом осуществляет пластохинон – мембранный липофильный переносчик, между цитохромным *b₆f* комплексом и фотосистемой I – пластоцианин – водорастворимый переносчик электронов. ATP synthase – АТФ (аденозинтрифосфат) синтаза – также расположена в тилакоидной мембране. Rubisco – Рубиско (рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа) – фермент стромы хлоропластов, катализирующий присоединение углекислого газа к рибулозо-1,5-бисфосфату на первой стадии цикла Кальвина-Бенсона.

Тилакоидная мембрана хлоропласта высших растений представлена плотно спрессованными гранами с высокой белковой плотностью и «неспрессованными» ламеллами с низкой белковой плотностью (Kirchhoff и др., 2004). Фотосинтетические белковые комплексы неравномерно распределены в гранах и ламеллах: ФС II и ССК II в основном располагаются в гранах, в то время как объемные ФС I и АТФ-синтазы – в ламеллах (Andersson, Anderson, 1980; Daum, Kuhlbrandt, 2011; Dekker, Voeckema, 2005; Nevo и др., 2012). Точная локализация цит. *b₆f* комплекса пока неясна (Kirchhoff и др., 2017; Nevo и др., 2012). Несмотря на гетерогенность белковых комплексов, функциональный линейный транспорт электронов требует значительной пространственной близости между ФС II, ПХ пулом и цит. *b₆f* комплексом, а также между *cyt b₆f* комплексом, пластоцианином и ФС I. Внешняя граница гран обеспечивает связь

обогащенных ФС II–ССК II гранами и обогащенными ФС I–ССК I и АТФ-синтазой ламеллами (Albertsson, 2001; Anderson, 1989; Iwai и др., 2014; Kettunen и др., 1991; Suorsa et al., 2015).

1.1.2. Структура комплекса ФС II–ССК II

ФС II – это пигмент-белковый комплекс, который использует поглощенную энергию квантов света для осуществления транспорта электронов с помощью редокс-активных кофакторов от молекул воды к ПХ пулу (Рис. 2). В реакционном центре (РЦ) ФС II представлены две ветви кофакторов переноса электрона, из которых только одна активна, а перенос по второй термодинамически запрещен. Процесс переноса электрона начинается с димера молекул хлорофилла (Хл) *a*, связанных с белками D1 и D2, называемого P680. Эта «специальная пара» Хл под действием света переходит в возбужденное состояние с более высокой энергией. Электрон от «специальной пары» переносится на молекулу феофитина (Фф), связанную с D1, что приводит к первичному разделению зарядов в активной ветви. Далее электрон переносится на молекулу ПХ в сайте Q_A на белке D2 и затем – на молекулу ПХ в сайте Q_B на белке D1.

Образующийся пластосемихинон в сайте Q_B дожидается второго электрона, восстанавливается до пластогидрохинона с участием двух протонов, захватываемых на стромальной стороне ФСII, и впоследствии высвобождается из белка D1 в мембрану. Тем временем, окисленный P680⁺ восстанавливается редокс-активным тирозином z (Tyrz), расположенным на белке D1, который переходит в форму нейтрального радикала Tyrz[•], обладающего достаточным окислительным потенциалом для отрыва электронов от воды в водоокисляющем комплексе (ВОК). Структура ВОК охарактеризована с высоким разрешением. В структуре ВОК обнаружены продукт/субстратные каналы, отвечающие за поставку субстрата и удаление продуктов реакции окисления воды. На основании структуры с разрешением 2,9 Å смоделировано 9 каналов, а также показана липидная область, по которой молекулы кислорода, высвободившиеся из молекулы воды, могут диффундировать в мембрану (Guskov et al 2010).

Часть второй ветви кофакторов участвует в циклическом транспорте электронов вокруг ФС II. В данном случае P680⁺ окисляет β-каротин, связанный с белком D2 (кар_{D2}), который далее восстанавливается с участием или цит. *b*₅₅₉, или мономерного Хл_{D2} в том случае, когда цит. *b*₅₅₉ уже окислен. Окисленный цит.

*b*₅₅₉, в свою очередь восстанавливается молекулами ПХ из свободного пула или Q_B-сайта (Faller и др., 2001; Tracewell, Brudvig, 2003). Такой путь может играть защитную роль, предотвращая накопление P680⁺ и катиона β-каротина (Pospisil, 2009).

Структура ФС II определена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 3.8-1.9 Å (Guskov и др., 2009; Umena и др., 2011; Suga и др., 2015; Wei и др., 2016). Подробное исследование комплекса ФСII на атомарном уровне позволило проанализировать состав его белковых субъединиц и кофакторов. Наибольшую активность ФС II имеет в суперкомплексе ФС II-ССК II, который организован в димер и состоит из двух коровых и двух ССК II частей с молекулярным весом 1400 кДа (Caffarri et al., 2009) (Рис. 3) Каждый мономерный комплекс коровой части ФСII включает почти 40 белков, куда входят гомологичные белки D1 и D2, которые связывают "специальную пару" хлорофиллов P680 и другие редокс-кофакторы (Shi and Schröder 2004). Кроме того, комплекс ФСII включает гетеродимерный цитохром *b*₅₅₉ (Allen и др., 2011) и субъединицы Psb A-Z, два из которых представлены двумя структурно схожими белками внутренней антенны CP43 и CP47 (Dekker, Boekema, 2005; Dang и др., 2008; Nosek и др., 2017). Функции многих низкомолекулярных белковых субъединиц пока не до конца исследованы, но каждый белок увеличивает стабильность комплекса ФС II (Rokka et al., 2005; Loll et al., 2005; Allen и др., 2011).

В состав каждого комплекса ФСII входят пигменты (хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды, феофитины), хиноны и неорганические кофакторы (Mn²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ и Fe^{2+/3+}) (Umena, 2011). У высших растений и зеленых водорослей реакция окисления воды проходит в каталитическом центре, представляющем из себя марганцево-кислородно-кальциевый кластер (Mn₄O₅Ca) на внутренней (люменальной) стороне ФСII, стабилизированный внешними белками (PsbO, PsbQ, PsbP и PsbR) (Kawakami и др., 2011; Ifuku, Noguchi, 2016). Кор-комплекс ФС II окружен комплексами, включающими полипептиды, которые принадлежат к семейству генов *lhcb* (light-harvesting complex b) и связывают в разных пропорциях хлорофиллы *a* и *b* и каротиноиды (Jansson, 1994). В растениях фотосинтетическая антенна состоит из двух слоев белковых комплексов: 1) внешняя большая антенна ССК II и 2) внутренняя малая антенна (Dekker, Boekema, 2005).

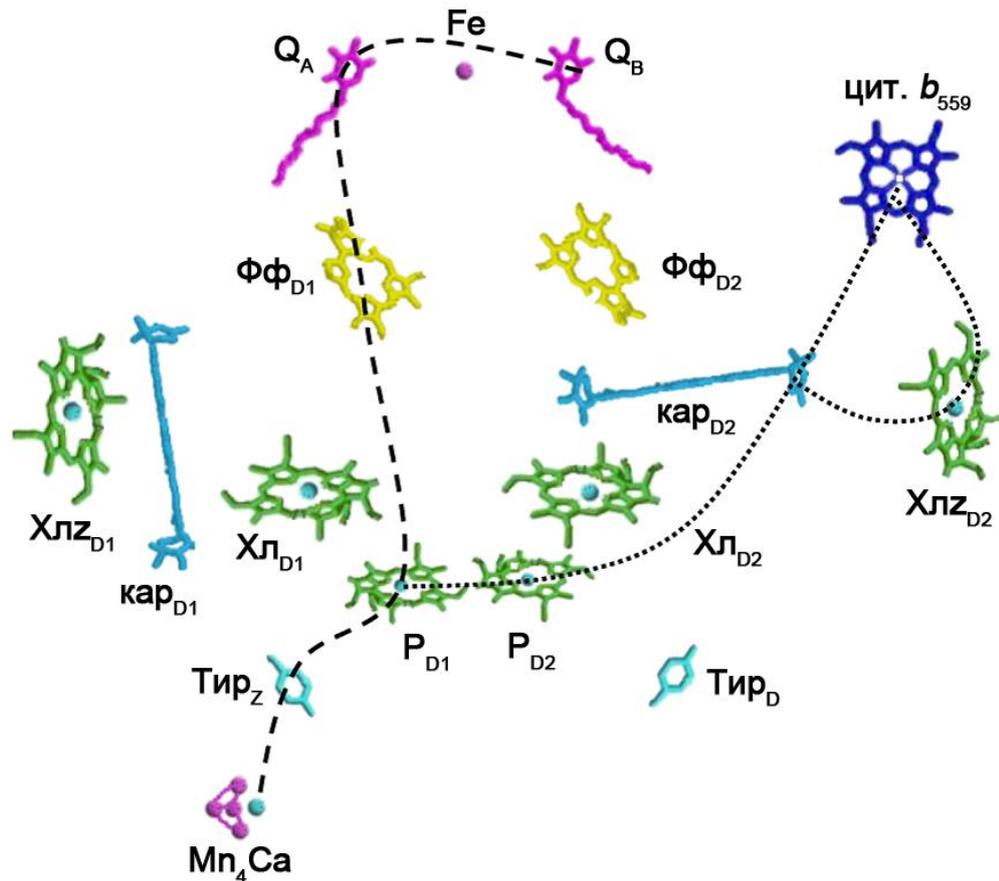


Рис. 2. Пути переноса электрона в электрон-транспортной цепи фотосистемы II (рисунок из статьи Pospisil 2009, модифицирован). Mn_4Ca – марганцево-кальциевый кластер, Tyr_Z – фотохимически активный остаток аминокислоты тирозин белка D2, Tyr_D – остаток аминокислоты тирозин белка D1, $цит. b_{559}$ – цитохром b_{559} , Q_A и Q_B – пластохиноны, связанные в соответствующих сайтах, Fe – ион негемового железа, P_{D1} и P_{D2} – димер Хл a (P680), Xl_{D1} и Xl_{D2} – мономерные Хл, XlZ_{D1} и XlZ_{D2} – периферические Хл, $ФФ_{D1}$ и $ФФ_{D2}$ – феофитины, $кар_{D1}$ и $кар_{D2}$ – β -каротины. Штриховой пунктир – перенос электрона от молекулы воды до пластохинона, точечный пунктир – вторичный путь донирования электронов к $P680^+$.

У зеленых растений есть три основных белка ССК II, кодируемых генами: *lhcb1*, *lhcb2* и *lhcb3*, из которых формируются гомо- и гетеротримеры S-типа (прочно связанные с РЦ), M-типа (умеренно связанные) и L-типа (слабо связанные) (Воекета и др., 1999; Minagawa 2013; Kouril и др., 2012). Тример S, по-видимому, состоит двух белков *Lhcb1* и одного белка *Lhcb2*, а тример M из двух *Lhcb1* и одного *Lhcb3* (Damkjær и др., 2009). Три малых мономерных белка CP29, CP26 и CP24 кодируются генами *lhcb4*, *lhcb5* и *lhcb6* соответственно (Jansson, 1994).

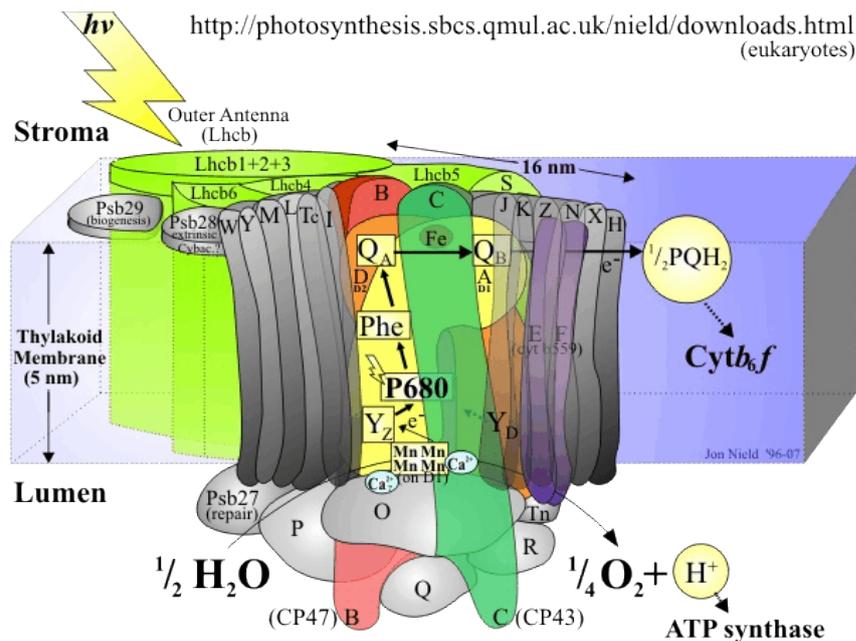
Методом электронной микроскопии индивидуальных пигмент-белковых комплексов показано, что целый ряд белков ССК II может связываться с димерным комплексом коровой части ФСII, формируя так называемый

суперкомплекс ФС II-ССК II. Белки CP29, CP26 и CP24 непосредственно связаны с коровой частью ФС II, кроме того, М-тример связан с ФС II через белки CP29 и CP24, а S-тример – через CP26 (Voekema и др., 1999; Kouril и др., 2012).

Полученный в итоге комплекс ФС II-ССК II может дополнительно ассоциироваться со слабосвязанным ССК II (Voekema и др., 1999; Kouril и др., 2012; Rantala и др., 2017).

Стэкинг тилакоидных мембран и, следовательно, расстояние между компонентами световой реакции динамично реагируют на изменение количества и качества света. Проблеме влияния освещенности растений на функционирование фотосинтетического аппарата и светособирающих комплексов посвящено большое количество статей, обзоров и монографий (Иванов и др., 1974; Кренделева и др., 1975; Boardman, 1997; Anderson, 1986; Bailey и др., 2001).

Rantala и Tikkanen в 2018 г. показали, что специфическое взаимодействие между отдельными тримерами ССК II – необходимое условие для энергетически связанной и нормально функционирующей тилакоидной мембраны.



Photosystem II (PSII)

(*dimer)

Рис. 3. Строение комплекса ФС II-ССК II. P680 – димер хлорофиллов *a* РЦ ФС II; D1 и D2 – белки кор-комплекса ФС II; CP47 и CP 43 – светособирающие пигмент-белковые комплексы кор-комплекса; Lhcb 1+2+3 – мажорная часть светособирающей антенны ФС II (ССК II); Lhcb 4, 5, 6 – минорные белки антенны; Mn₄O₅Ca – марганец-кислород-кальциевый кластер водоокисляющего комплекса; минорные субъединицы ФС II обозначены серым цветом; Yz, Y_D – остатки тирозина белков D1 и D2, соответственно; Chl_{D1}, Chl_{D2} – хлорофилл D1 и D2 белков, соответственно, Phe – феофитин; Q_A и Q_B – пластохиноновые переносчики электронов ФС II; Fe – негемовое железо; cyt *b*₅₅₉ – цитохром *b*₅₅₉; PQ(H₂) – пластогидроксидин.

1.1.3. Структура комплекса ФС I-ССК I

Комплекс ФС I обеспечивает светозависимый транспорт электронов от пластоцианина (ПЦ) к ферредоксину (Фд). Электроны от восстановленного Фд транспортируются к ФНР, которая катализирует восстановление НАДФ⁺ до НАДФН.

Как и в РЦ ФС II, в РЦ ФС I существуют две ветви кофакторов переноса электрона, но в отличие от ФС II, они обе активны. Транспорт электрона начинается со «специальной пары» Хл, формирующих димер, названный по максимуму поглощения в области 700 нм, P700. Эта «специальная пара» осуществляет фотохимическую работу: получив энергию от антенных Хл, P700 переносит электрон на первичный акцептор, A₀, также являющийся молекулой Хл *a*. Далее электрон переносится на филлохинон (ФХ) в сайте A₁, и [4Fe-4S] кластеры F_X, F_A, F_B. Кофакторы переноса электрона от P700 до F_X организованы в две псевдосимметричные ветви, расположенные в белках PsaA и PsaB (Рис. 4, *Synechococcus elongatus*, разрешение 2,5 Å).

Согласно структуре ФС I высших растений с разрешением 2.8 Å, ФС I-ССК I включает 12-14 белковых субъединиц кор-комплекса (PsaA-L и две субъединицы PsaN и PsaO, которые недавно были показаны (Pan и др., 2018)), четыре антенных белка (Lhca 1-4), а также примерно 200 хлорофиллов и 15 каротиноидов (Jansson, 1999; Amunts и др., 2010; Busch, Hippler 2011; Mazor и др., 2015). Из ключевых субъединиц две самые большие белковые субъединицы (PsaA и PsaB) формируют гетеродимерный РЦ. Гетеродимерная часть кор-комплекса ФС I связывает 96 молекул хлорофилла *a* и большинство редокс-кофакторов: P700 (димер хлорофиллов *a*), A₀ (хлорофилл *a*), A₁ (ФХ), и F_X, железосерный [4Fe-4S] кластер. Два других железосерных кластера [4Fe-4S] (F_A и F_B), терминальные кофакторы транспорта электронов ФС I, связаны с субъединицей PsaC. Белок PsaC, вместе с белковыми субъединицами PsaD и PsaE, образуют сайт связывания для Фд.

ССК I транспортирует световую энергию к РЦ ФС I. Он состоит из 4 отдельных полипептидов (Lhca1-4) (Рис. 5), объединённых в два гетеродимера: Lhca1-Lhca4 и Lhca2-Lhca3. Эти два димера образуют «пояс» ССК I в форме полумесяца, стыкующийся с субъединицами PsaG и PsaJ комплекса ядра ФС I (Ben Shem et al., 2003). Сторона напротив этого пояса с субъединицами PsaH, PsaI, PsaL и PsaO открыта, по крайней мере, в условиях неизменной световой интенсивности (Amunts и др., 2010)

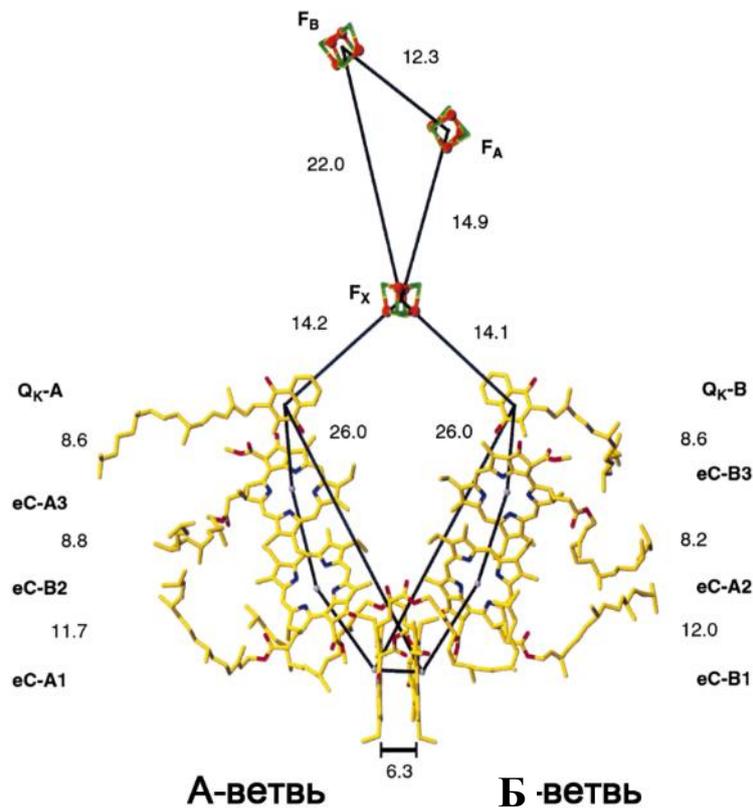
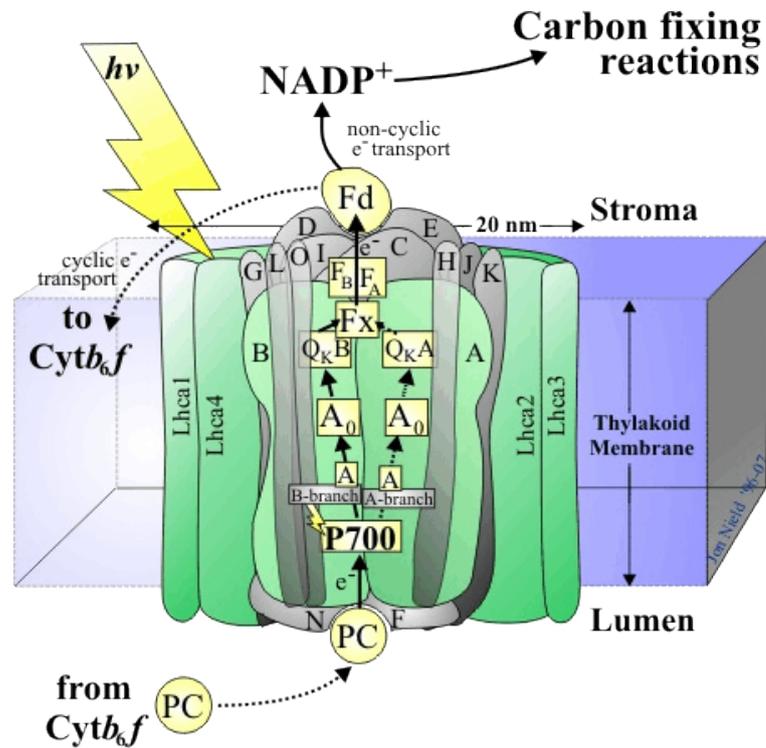


Рис. 4. Пути переноса электрона в фотосистеме I (рисунок из статьи Fromme и др., 2001). $eC-A/B$ – хлорофиллы, участвующие в переносе электрона, ион Mg^{2+} которых лигандирован аминокислотными остатками PsaA/B, соответственно; 1, 2, 3 указывают на порядковый номер Хл, начиная от люменальной стороны. Q_k-A и Q_k-B – A_1 , или филлохинон, А и В-цепей, соответственно. Числа указывают на расстояние между кофакторами от центра до центра (в Å).

Как уже было упомянуто, ССК I является антенной только для ФС I, в то время как ССК II может работать как антенна для обеих фотосистем (state transitions). Сайт пристыковки ССК II к ФС I состоит из трех белковых субъединиц PsaH, PsaL и PsaI (Lunde и др., 2000; Zhang, Scheller 2004). Было установлено, что по меньшей мере два белка, PsaH и PsaL, играют ключевую роль в переносе энергии от фосфорилированного ССК II к ФС I.

В отличие от ФС II, ФС I, в целом, устойчива к фотоповреждению. Фотоингибирование ФС I изучали на примере теплолюбивых растений, например, огурцов, при низких температурах; выяснилось, что реакция зависит от транспорта электронов от ФСII к ФСI (Sonoike, Terashima, 1994; Sonoike, 1995); а также было показано ингибирование ФС I активными формами кислорода (Takagi и др., 2016).

<http://photosynthesis.sbcs.qmul.ac.uk/nield/downloads.html>
(eukaryotes)



Photosystem I (PSI)

(*monomer - higher plants; trimer - cyanobacteria)

Рис. 5. Строение комплекса ФС I-ССК I. P700 – димер хлорофиллов *a* РЦ ФС I; Lhca 1-4 – минорные белки антенны; серым цветом обозначены минорные субъединицы ФС I; A₀ – первичный электронный акцептор хлорофилл *a*; Q_kB Q_kA – филохиноны ветвей B и A, соответственно, F_x – железосерный [4Fe-4S] центр; F_A и F_B – два железосерных кластера. PC – пластоцианин; Fd – ферредоксин.

В условиях нормальной освещенности, фотосинтетический транспорт электронов от ФС II через цит. *b₆f* комплекс к ФС I не превышает пропускной способности акцепторов электрона в ФС I, и комплекс ФС I сохраняет стабильность (Munekage и др., 2002). Если поток электронов от ФС II превышает пропускную способность переносчиков электронов на акцепторной стороне ФС I, система теряет стабильность. Последующая регенерация ФС I происходит медленно (Sonoike, 1995; Munekage и др., 2002).

1.1.4. Цитохромный b_6/f комплекс

Погруженный в тилакоидную мембрану цит. b_6/f комплекс расположен между ФС II и ФС I, и функционирует как при линейном, так и при циклическом транспорте электронов. Этот комплекс служит посредником в транспорте электронов между фотосистемами путем окисления восстановленного ПХ (пластогидрохинона PQH_2) и восстановления ПЦ (Kurisu и др., 2003; Allen 2004; Smith и др., 2004), т.е. функционирует как пластогидрохинон:пластоцианин оксидоредуктаза (Рис. 6).

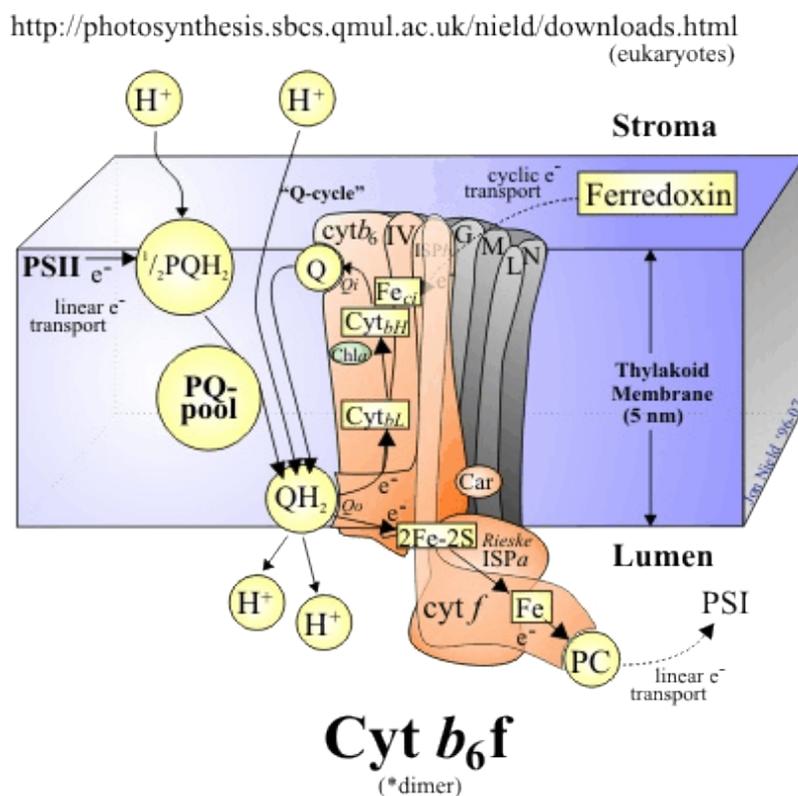


Рис. 6. Строение цитохромного b_6/f комплекса. 2Fe-2S – FeS кластер белка Риске; $\text{cyt } f$ – цитохром f ; cyt_{bL} и cyt_{bH} – низко- и высокопотенциальные формы цитохрома b_6 , car – каротиноид. Q_o – хинол-окисляющий сайт; Q_i – хинол-восстанавливающий сайт. Cyclic, linear transport – циклический и линейный транспорт электрона.

Фотосинтетический транспорт электронов сопряжен с транслокацией протонов через тилакоидную мембрану, что создает трансмембранный градиент протонов, который используется АТФ-синтазой для синтеза АТФ. Постепенное возрастание протонного градиента в тилакоидной мембране, например, в

стрессовых условиях, уменьшает скорость транспорта электронов через цит. *b₆f* комплекс. Было показано, что защитную роль в этом случае выполняет белок тилакоидов PGR5 (Munegage и др., 2002; Tiwari и др., 2016).

Цит. *b₆f* комплекс представляет собой симметричный димер массой 220 кДа (Kurisu и др., 2003; Yamashita и др., 2007; Stroebel и др., 2003). Каждый мономер состоит из 8 субъединиц: 4 больших (цит. *f*, цит. *b₆*, железосерный белок Риске (с кластером [2Fe–2S]) и субъединица IV) и 4 малых субъединицы (PetG, L, M и N) (Cramer и др., 2010; Dashdorj и др., 2005). Каждый мономер несет 7 кофакторов: 2 гема *b₆* (низкопотенциальный, *b_{6L}*, и высокопотенциальный, *b_{6H}*) и гем *c* (все три расположены в белке цит. *b₆*); гем *f* (расположен в белке цит. *f*), [2Fe–2S]-кластер (в белке Риске), и два пигмента: молекула Хл и β-каротин. Структура цит. *b₆f* комплекса с разрешением 3 Å была опубликована в 2003 г (Kurisu и др., 2003) (Рис. 6).

В цит. *b₆f* комплексе функционируют две ветви переноса электрона: высоко- и низкопотенциальная (Рис. 7). Высокопотенциальная ветвь начинается с окисления ПХН₂ до пластосемихинона (ПХ^{•-}) в хинон-окисляющем сайте (Qo); электрон переносится на кластер белка Риске и далее – на цит. *f* и ПЦ.

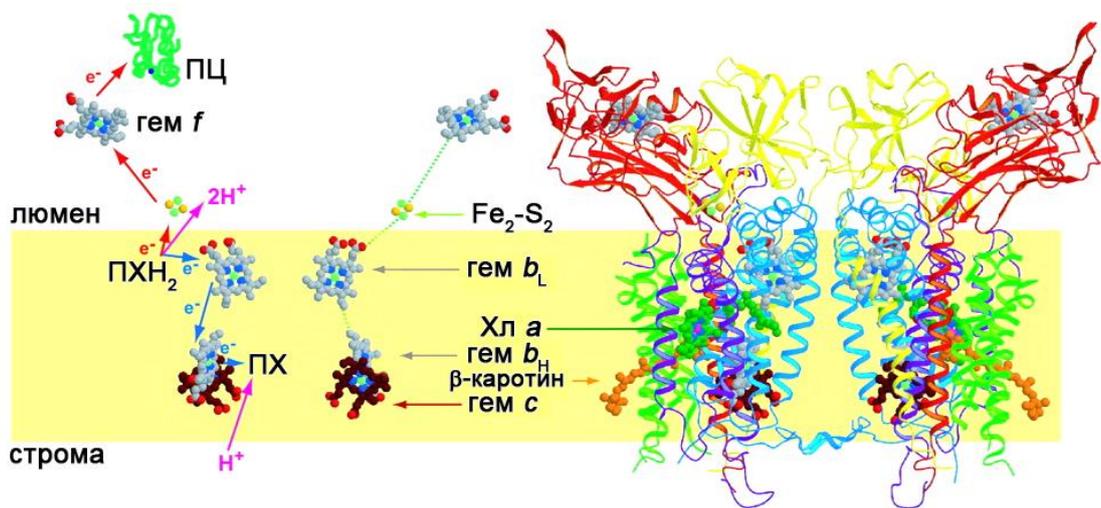


Рис. 7. Пути переноса электрона в цитохромном *b₆f* комплексе (рисунок из статьи Kurisu и др., 2003, модифицирован). ПХ – пластохинон, ПХН₂ – пластогидрохинон, ПЦ – пластоцианин, Fe₂-S₂ – железосерный центр белка Риске, Хл *a* – молекула Хл *a*, гем *b_L* и *b_H* – низкопотенциальный и высокопотенциальный гемы цитохрома *b*, гем *f* – гем цитохрома *f*, гем *c* – гем цитохрома *c*.

Образование PQH^+ приводит к запуску переноса электрона по низкопотенциальной ветви: PQH^+ окисляется гемом b_{6L} , который впоследствии восстанавливает b_{6H} , расположенный вблизи от хинон-восстанавливающего сайта (Q_i), где происходит восстановление молекул ПХ из пула. В результате окисления второй молекулы PQH_2 в хинол-окисляющем сайте и второго функционирования обеих ветвей переноса электрона, PQH^+ в хинон-восстанавливающем сайте восстанавливается до пластохинола (Baniulis и др., 2008). Таким образом функционирует Q-цикл.

1.1.5. АТФ-синтаза

Хлоропластная АТФ-синтаза катализирует образование АТФ из аденозиндифосфата (АДФ) и фосфата (P_i) за счёт трансмембранного градиента протонов, генерируемого светозависимым потоком электронов. Конструктивно хлоропластная АТФ-синтаза состоит из двух структурно и функционально различных частей (Lawrence и др., 2011): внешней мембранной «головки», обозначенной как « F_1 », и внутренней мембранной части, обозначенной как « F_0 » (Рис. 8). F_1 включает стромальные субъединицы α , β , γ , δ и ϵ . Субъединицы a , b , b' и c_n включены в F_0 . F_0 и F_1 части соединены вращающимся γ -стеблем и неподвижным b/b' -стеблем и, таким образом, механически связаны. В F_0 протоны из люмена направляются к остатку глутаминовой кислоты на субъединицах c_l (мономерные субъединицы) через предполагаемый полуканал, обеспечиваемый соседней α -субъединицей. Когда протоны в необходимом количестве приходят из люмена и связываются с c -субъединицами, происходит полное вращение на 360° c_n (мультимерного) кольца, что позволяет отдельным протонам высвободиться индивидуально на каждом шаге и направляться в строме через другую предполагаемую половину канала, обеспечиваемую α -субъединицей (Fillingame и др., 2003).

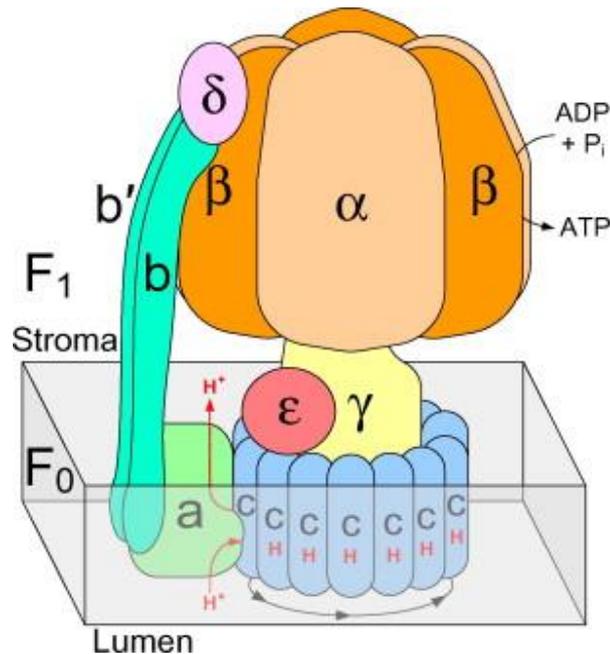


Рис. 8. Структурная схема расположения субъединиц АТФ-синтазы F-типа. Серая рамка показывает область клеточной мембраны. Представлено тетрадекамерное с-субъединичное кольцо, которое было обнаружено в хлоропластной АТФ-синтазе шпината.

Вращение кольца c_n связано с вращением γ -ножки в области F_1 , где субъединица γ функционирует как стержень внутри головки $\alpha\beta\beta$. Вращение γ -стебля управляет катализом реакции $ADP + P_i \rightarrow ATP$, которая происходит на каждом из трех интерфейсов α - β -субъединиц в F_1 части (Nakamoto и др., 2008; Richter и др., 2005; Turina и др., 2003). Этот процесс является обратимым и классифицируется как фермент F-типа. Архейные (A-типа) АТФ-синтазы также обратимы, в то время как вакуолярные (V-типа) АТФ-азы функционируют только как протонные или ионные насосы, управляемые гидролизом АТФ.

1.1.6. Переносчики фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов: пластохинон и пластоцианин

1.1.6.1. Пластохинон

Пластохинон (ПХ) – это молекула прениллипида, состоящая из 2,3-диметил-1,4-бензохинона и боковой цепи из 9 изопрениловых единиц; редокс-активной частью служит бензохиноновое кольцо, а боковая цепь обеспечивает нахождение молекулы в гидрофобном матриксе тилакоидной мембраны.

Биосинтетический путь ПХ включает биосинтез предшественников

бензохинонового кольца и боковой цепи с последующей их конденсацией (Liu, 2016).

Количество молекул ПХ в мембране тилакоидов на один РЦ ФС II и ФС I выше, чем других переносчиков. Общее содержание ПХ, и фотоактивного (в тилакоидной мембране) и неактивного (запасенного в пластоглобулах и в оболочке хлоропласта (Lichtenthaler и др., 1981)), в хлоропластах составляет от 10 до 40 на РЦ ФС I и то 5 до 10 на РЦ ФС II (McCauley, Melis, 1986; Kruk, Karpinski, 2006), и эти молекулы ПХ могут быть использованы различными ФС II комплексами. Эти два фактора определили название молекул ПХ как пул пластохинона. ПХ представлен в мембране тремя окислительно-восстановительными формами: окисленная молекула (ПХ), однократно восстановленная молекула (радикал пластосемихинон, $\text{ПХ}^{\cdot-}$ или ПХН^{\cdot}) и дважды восстановленная молекула (пластохинол или пластогидрохинон, ПХН_2). ПХ участвует в переносе электронов в фотосинтетической цепи, являясь мобильным липорастворимым переносчиком между ФС II и цит. *b₆/f* комплексом. Кроме того, ПХ пул вовлечен в реакцию Мелера (восстановление молекулярного кислорода до пероксида водорода через супероксидный анион радикал) (Ivanov и др., 2007), а также в циклический транспорт электронов вокруг ФС I (Munekage и др., 2004).

При освещении ПХ восстанавливается до ПХН_2 либо в акцепторной части ФС II, либо в акцепторной части цит. *b₆/f* комплекса. Восстановление ПХ в ФС II происходит через стадию пластосемихинона, $\text{Q}_\text{В}^-$, прочно связанного с белком. ПХН_2 окисляется в донорной части цит. *b₆/f* комплекса Fe_2S_2 центром Риска до $\text{ПХ}^{\cdot-}$, который окисляется низкопотенциальным гемом цитохрома *b₆* до ПХ. Также возможно восстановление ПХ пула в темноте; оно осуществляется электронами от НАДФН с участием связанных с тилакоидной мембраной НАД(Ф)Н-дегидрогеназ (Peng и др., 2011), что представляет собой и начальный этап хлородыхания (Peltier, Courpas, 2002), и путь возвращения электронов в фотосинтетическую электрон-транспортную цепь в одном из предполагаемых вариантов циклического электронного транспорта вокруг ФС I (Rochaix, 2011).

1.1.6.2. Пластоцианин

Пластоцианин (ПЦ) – водорастворимый переносчик электронов, представляет собой белок с молекулярной массой 10 кДа. Пластоцианин располагается в люмене тилакоидов; содержит атом меди, который координируется двумя гистидинами, метионином и цистеином. Осуществляет

перенос электронов по одноэлектронному типу, при этом атом меди изменяет свою валентность ($\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$). Окислительно-восстановительный потенциал пластоцианина равен + 0,37 В. ПЦ восстанавливает окисленный пигмент РЦ ФС I P700^+ и окисляет цитохром f цитохромного b_6f -комплекса. Имеет два потенциальных сайта связывания для партнеров по реакции. Сайт 1 состоит из лиганда Н87 с медью, а сайт 2 – из Y83, который окружен двумя кластерами отрицательных зарядов, высоко консервативными у пластоцианина высших растений (Gross, 1993).

У цианобактерий и некоторых водорослей ПЦ может быть заменен гемовым белком цитохром c_6 (Zhang и др., 1994; Merchant, Bogorad, 1987). Было показано, что в хлоропласте цветущего растения *Arabidopsis thaliana* присутствует цитохром c_6 -подобный белок, и было предположено, что такой белок может функционировать в качестве альтернативного электронного переносчика в высших растениях (Gupta и др., 2002). Впоследствии было показано, что растения арабидопсиса с нокаутом обоих генов, и кодирующего ПЦ, и цитохром c_6 -подобного белка, не могут расти фотоавтотрофно из-за полного блокирования электронного транспорта на свету (Weigel и др., 2003).

1.2. Образование АФК компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи

1.2.1. АФК и реакция Мелера

В результате фотосинтетических реакций происходит не только выделение молекулярного кислорода (O_2), но и поглощение, т.е. связывание молекул O_2 . В основном состоянии молекула O_2 имеет два неспаренных электрона, локализованных на различных разрыхляющих орбиталях (триплетное состояние). Большинство органических молекул находится в синглетном состоянии, что ограничивает их спонтанную реакцию с молекулами кислорода, и это является благоприятным фактором для жизни организма. При восстановлении молекулярного кислорода переносчиками фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) происходит образование различных активных форм кислорода (АФК). К АФК относят: супероксидный анион радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и его протонированную форму, пергидроксильный радикал (HO_2^{\cdot}), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), а также гидропероксиды (ROOH) и радикалы органических молекул: пероксидный

радикал (ROO^{\bullet}) и алкоксильный радикал (RO^{\bullet}). В хлоропласте синглетный кислород образуется в ФС II, супероксидный анион радикал – преимущественно компонентами ФС I, а также в пуле пластохинона.

Впервые образование H_2O_2 при освещении растений стали изучать в начале XX века (Bakh, Shoda. 1902). Позднее Мелер (1951) показал, что в изолированных фрагментах хлоропласта происходит светозависимое восстановление молекулярного кислорода, вслед за которым наблюдается образование H_2O_2 . Эту реакцию светоиндуцированного восстановления O_2 в хлоропластах назвали реакцией Мелера. По законам термодинамики, восстановление кислорода в ФЭТЦ высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий – неизбежный процесс в современной атмосфере. *In vivo* восстановление O_2 и CO_2 происходят одновременно, в разных растениях на кислород приходится от 5 до 50% электронов от ФЭТЦ (Badger и др., 2000). Было установлено, что $\text{O}_2^{\bullet-}$ – первичный продукт восстановления O_2 в ФЭТЦ (Allen, Hall 1973; Asada, Kiso 1973).

1.2.2. Образование супероксидных анион-радикалов компонентами пула пластохинона и кофакторами фотосистемы I вне и внутри тилакоидной мембраны

ФС I считается основным местом восстановления O_2 в ФЭТЦ до $\text{O}_2^{\bullet-}$ – продукта одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода. Доказательства восстановления O_2 в ФС I *in vivo* были описаны Баджером (1985) (Badger, 1985). Ферродоксин (Фд), водорастворимый белок с $E_m = 0.42$ В, который почти не зависит от pH, долгое время считался главным восстановителем O_2 . Он расположен в строме хлоропласта и служит для переноса электронов из терминального акцептора в ФС I к Фд-НАДФ-редуктазе, где Фд, восстановленный дитионитом или фотохимически, может восстанавливать кислород. Однако Асада и др. (1974), наблюдая очень низкую стимуляцию продукции $\text{O}_2^{\bullet-}$ после добавки Фд в суспензию тилакоидов, предположили, что Фд не участвует в восстановлении O_2 *in vivo*. Голбек и Радмер (Golbeck, Radmer, 1984) определили, что константа окисления молекулярного кислорода Фд равна $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Недавно был опубликован детальный обзор литературных исследований (Kozuleva and Ivanov 2016), где было доказано, что многие исследования, показывающие, что Фд принимает важное участие в восстановлении O_2 *in vivo* (Allen, 1975; Ivanov и др., 1980; Furbank, Badger, 1983), не могут считаться надежной основой для

подтверждения данного предположения. Благодаря низкой константе скорости второго порядка, значительное восстановление кислорода с помощью Фд могло быть достигнуто только при значительном увеличении количества самого Фд.

Козулева и Иванов (Kozuleva, Ivanov 2010) показали, что в присутствии НАДФ⁺, т.е. в оптимальных условиях восстановления, Фд-зависимое восстановление кислорода составляло лишь 5–7% от общего количества. При этом, с увеличением интенсивности света увеличение общего восстановления кислорода происходило, преимущественно, за счет увеличения восстановления компонентами мембраны тилакоидов, а не за счет Фд.

Стоит отметить, что *in vivo* восстановленный Фд используется не только для восстановления НАДФ⁺, но и как источник восстановленных эквивалентов для многочисленных реакций в строме, поэтому он не может присутствовать в значительной концентрации. Часто наблюдаемая *in vivo* высокая скорость восстановления кислорода в фотосинтетических клетках в оптимальных условиях освещенности – результат транспорта электронов на O₂ от мембранных компонентов ФЭТЦ. Доля Фд в восстановлении кислорода может увеличиться при недостатке НАДФ⁺ и при недостаточной активности цикла Кальвина-Бенсона, например, в условиях недостатка CO₂, или в условиях ингибирования ферментов цикла Кальвина-Бенсона. При рассмотрении возможных компонентов, участвующих в восстановлении молекулярного кислорода в ФЭТЦ, необходимо учитывать окислительно-восстановительный потенциал пары O₂/O₂^{•-}, который равен –160 мВ при 1М O₂ в воде и ~ –550 мВ в гидрофобной среде (Рис. 9).

Утверждается, что электроны переносятся на O₂ от терминальных кофакторов ФС I, F_A/F_B, расположенных в белковой субъединице PsaC, расположенной со стороны стромы тилакоидной мембраны. Однако F_A и F_B, железо-серные кластеры, согласно окислительно-восстановительному потенциалу, не являются термодинамически выгодными восстановителями молекулярного кислорода, но, тем не менее, способны к восстановлению кислорода (Kozuleva, Ivanov, 2016) (Рис. 9А). Быстрый поток электронов от F_A/F_B на O₂ *in vivo* очевидно нежелателен, поскольку это может препятствовать восстановлению Фд. Предполагают, что более высокий окислительно-восстановительный потенциал предпоследнего кофактора ФС I F_A по сравнению с потенциалом последнего кофактора F_B может служить эволюционной адаптацией для минимизации восстановления O₂ кофактором F_B (Shinkarev и др., 2000). Такахаши и Асада (1988), изучая светоиндуцированное H₂O₂-зависимое

иодирование белков в изолированных тилакоидах, обнаружили, что PsaA/PsaB иодировались больше всего. Это подтвердило, что генерация $O_2^{\cdot-}$ происходит в большей степени в ФС I, и Fx, по-видимому, отвечает за восстановление O_2 . Участие другого кофактора ФС I, филлохинона (ФХ), в восстановлении O_2 предполагалось из-за стимуляции поглощения O_2 ФХ при его добавлении в тилакоидные мембраны, которые обработали гексаном, чтобы удалить хиноны (Kruk и др., 2003). В работах (Cherepanov и др., 2017; Milanovsky и др., 2017) с применением математического моделирования также было показано, что ФХ способен восстанавливать молекулярный кислород до $O_2^{\cdot-}$. Важно, что восстановленные железо-серные центры «слабее» с точки зрения восстановления O_2 , чем семихиноны; например, константа восстановления O_2 восстановленным Фд (см. выше) примерно на 6 порядков ниже, чем константа восстановления O_2 семихинонами с $E_m(X/X^{\cdot-})$ близкими к $E_m(Фд/Фд^{\cdot-})$ (Wardman, 1990).

Образование $O_2^{\cdot-}$ внутри тилакоидной мембраны на свету было доказано в исследованиях (Kozuleva и др., 2011, Kozuleva и др., 2015).

Супероксиддисмутаза (СОД), являясь водорастворимым белком, полностью препятствовала детектируемому ЭПР накоплению нитроксидных радикалов, образуемых в реакции $O_2^{\cdot-}$ с гидрофильным циклическим гидроксиламином DCP-H, в то время как накопление нитроксидного радикала липофильных циклических гидроксиламинов TMT-H, TMT $^{\cdot}$, было значительным (Kozuleva и др., 2011). На СОД-независимое накопление TMT $^{\cdot}$ не влияли ни тушители 1O_2 , ни ловушки HO^{\cdot} (Kozuleva и др., 2015), что подтверждало то, что сигнал ЭПР возникал вследствие реакции этого циклического гидроксилamina с $O_2^{\cdot-}$. Недавно было показано (Kozuleva и др., 2016), что добавление Фд, также, как и Фд совместно с НАДФ $^+$ к суспензии тилакоидов, не приводило к подавлению индуцированного светом накопления TMT $^{\cdot}$, что указывало на образование $O_2^{\cdot-}$ в мембранах. Более того, фракция образовавшегося внутри мембраны $O_2^{\cdot-}$ увеличивалась в присутствии НАДФ $^+$, что указывало на то, что место образования $O_2^{\cdot-}$ может зависеть от функционирования цикла Кальвина-Бенсона.

Кроме того, Козулева и др. (2014) исследовали восстановление O_2 в ФС I и сравнивали этот процесс в комплексах ФС I, изолированных из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа и мутантного штамма с заблокированным биосинтезом филлохинона (ФХ) (*menB*), в котором вместо ФХ встраивается ПХ. Было доказано, что зависимость восстановления O_2 от уровня освещения различалась в ФХ-содержащих и ПХ-содержащих ФС I. В условиях низкой

освещенности оба типа фотосистем восстанавливали O_2 с одинаковой интенсивностью, т.е. с одинаковыми скоростями. В условиях среднего и высокого уровней освещенности скорость восстановления увеличивалась незначительно в ПХ-содержащих ФС I, в то время как в ФХ-содержащих ФС I скорость увеличилась значительно. Одновременно с этим транспорт электронов от F_A/F_B не изменился, следовательно, восстановление O_2 компонентами F_A/F_B происходило одинаково в обоих комплексах. Разница во влиянии света на восстановление O_2 приписывается большей способности ФХ^{*} (в сравнении с ПХ^{*}) восстанавливать O_2 . Величины E_m ФХ/ФХ^{*} пар в А- и В-ветвях ФС I равны -671 и -844 мВ, соответственно (Ptushenko и др., 2008) (Рис. 9А). Окислительно-восстановительный-потенциал пар ПХ/ПХ^{*} в местах связывания хинонов с А- и В-ветвями на 100 мВ положительнее, чем у ФХ/ФХ^{*} пары (Semenov и др., 2000), что может быть причиной более низкой скорости восстановления кислорода при замене ФХ на ПХ. Можно сделать вывод, что восстановление O_2 в ФС I может происходить компонентами F_A/F_B при недостатке Фд, однако больший вклад в этот процесс вносит ФХ, особенно при повышенной интенсивности света.

ПХ пул хлоропластных тилакоидных мембран – аналог убихинонового пула внутренней митохондриальной мембраны, бактериальной мембраны и мембраны дрожжей. Восстановление O_2 в пуле убихинона давно известно (Turgens и др., 1985), и этот пул считается источником АФК, влияющим на множество процессов в клетках животных и человека.

Первые данные о возможности восстановления O_2 в ПХ пуле были получены в экспериментах с изолированными тилакоидами в присутствии ДНФ-ИНТ (динитрофенил эфир 2-йод-4-нитротимол), ингибитора окисления ПХН₂ цит. *b₆/f* комплексом (Khorobrykh, Ivanov 2002). Супероксид-зависимое восстановление экзогенного цитохрома *c*, ловушки $O_2^{\cdot-}$, в присутствии ДНФ-ИНТ на свету, и отсутствие такого восстановления в присутствии диурона (ингибитора переноса электронов от Q_A к Q_B), свидетельствует об одноэлектронном восстановлении O_2 в ПХ пуле (Khorobrykh, Ivanov 2002). Участие ПХН₂ в такой реакции кажется маловероятным, поскольку E_{m7} пары ПХН^{*}/ПХН₂ ($+370$ мВ) намного выше, чем E_{m7} пары $O_2/O_2^{\cdot-}$ (-160 мВ) даже в водной фазе (Рис. 9В).

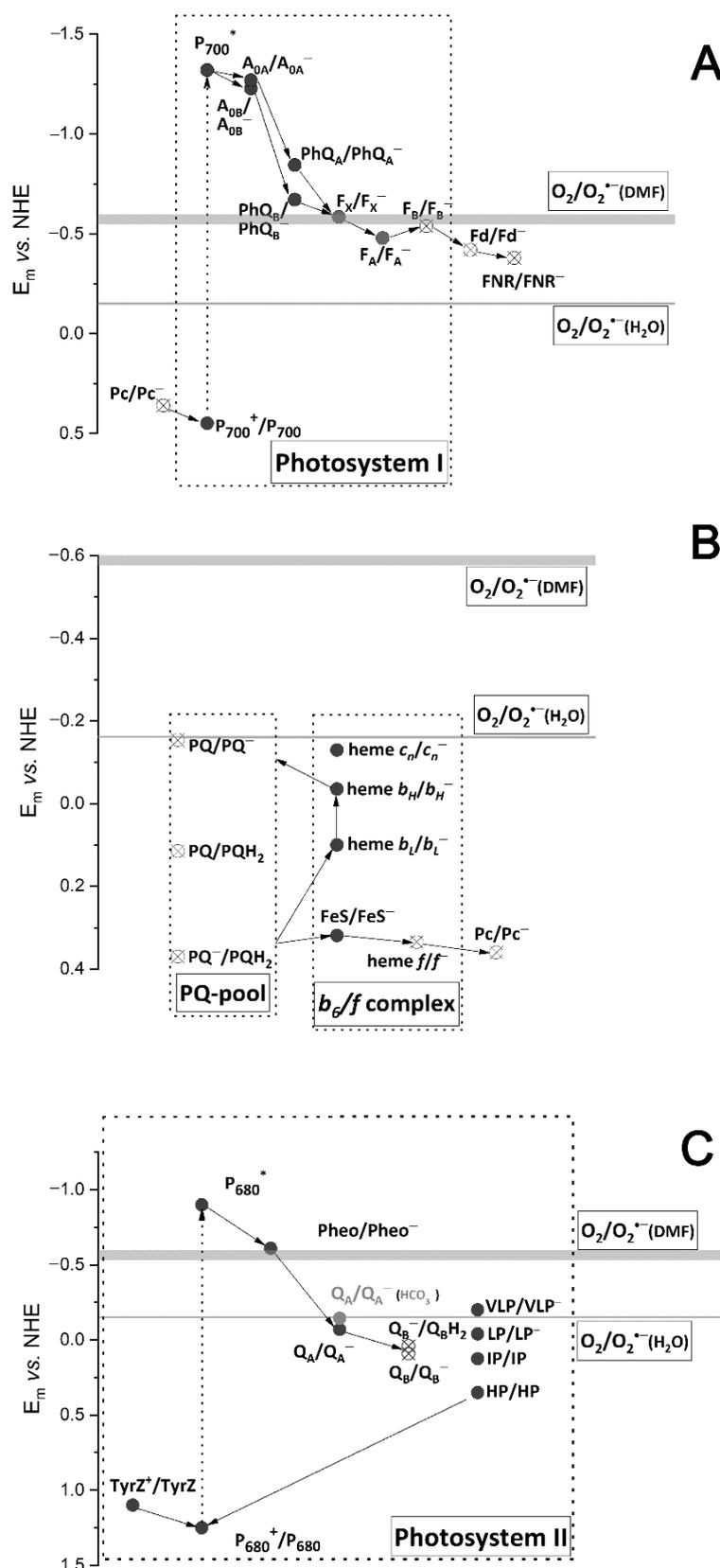


Рис. 9. Схема линейного переноса электронов в ФС I (A), ПХ пуле и цит. b_6/f комплексе (B), и ФС II (C) (рисунок их статьи Kozuleva и др., 2020). Представлены значения E_m кофакторов ФЭТЦ. Значения E_m пары $O_2/O_2^{\cdot-}$ в воде (-160 мВ) и диметилформамиде (DMF), (-550 ÷ -600 мВ) показаны тонкими и толстыми серыми горизонтальными линиями, соответственно.

Среди компонентов ПХ пула только пластосемихинон ($\text{ПХ}^{\bullet-}$) может считаться восстановителем O_2 , поскольку E_{m7} пары $\text{ПХ}/\text{ПХ}^{\bullet-}$ (-170 мВ; Hauska и др., 1983) (Рис. 9В) более отрицательный, чем пары $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$. рН-зависимость поглощения O_2 в присутствии ДНФ-ИНТ подтверждает это предположение (Khorobrykh, Ivanov 2002), а также свидетельствует о том, что восстановление молекулярного кислорода, O_2 , до $\text{O}_2^{\bullet-}$ происходит в водной среде, т.е. на границе мембрана\вода при щелочных рН (Mubarakshina, Ivanov, 2010).

Восстановление молекул O_2 молекулами $\text{ПХ}^{\bullet-}$, также, как и компонентами F_A/F_B , расположенными на выступающем со стромальной стороны тилакоидной мембраны белке ФС I PsaC, вероятно, ведет к появлению $\text{O}_2^{\bullet-}$ вне тилакоидной мембраны.

Способность $\text{ПХ}^{\bullet-}$ восстанавливать молекулярный кислород появляется только тогда, когда окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{ПХ}/\text{ПХ}^{\bullet-}$ становится более отрицательным, чем пары $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$. В диапазоне рН от 5.0 до 6.5 разница в окислительно-восстановительных потенциалах пары $\text{ПХ}/\text{ПХ}^{\bullet-}$ ($pK = 6.0$; $E_{m7} = -170$ мВ) и $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$ ($pK = 4,8$; $E_{m7} = -160$ мВ) сдвигается от $+50$ мВ, что неблагоприятно для восстановления O_2 , до -10 мВ. Как упомянуто выше, в работе (Khorobrykh, Ivanov 2002) было экспериментально показано, что поглощение, т.е. восстановление кислорода в ПХ пуле в присутствии ДНФ-ИНТ, обнаруживали только при значениях рН выше 5.5. Максимальная скорость восстановления кислорода в ПХ пуле достигалась при рН 6.5 и далее существенно не менялась при более высоких значениях рН. Ранее предполагалось, что $\text{ПХ}^{\bullet-}$ должен выйти из хинол-окисляющего сайта цит. b_6/f комплекса и стать частью ПХ пула прежде чем быть окисленным кислородом (Forquer и др., 2006). Было показано, что семихинон, образующийся в результате окисления гидрохинонов на донорной стороне $bc1$ комплекса может окисляться кислородом с образованием $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Muller и др., 2002). Измеренная скорость образования $\text{O}_2^{\bullet-}$ выделенным цит. b_6/f комплексом оказалась выше, чем у $bc1$ комплекса из дрожжей (Baniulis и др., 2013). Авторы предполагают, что это может быть связано с более длительным временем нахождения $\text{ПХ}^{\bullet-}/\text{ПХН}_2$ в хинол-окисляющем сайте b_6/f комплекса около белка Риске, чем около железо-серного кластера в случае $bc1$ комплекса. Константа скорости реакции восстановления кислорода пластосемихиноном равна $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Wardman, 1990).

В ФС II, несмотря на то, что восстановленный феофитин (Pheo^-) обладает $E_m = -610$ мВ (Rappaport и др., 2002), т.е. достаточно негативным, чтобы

восстановить O_2 даже в гидрофобных средах (Рис. 9С), его время жизни довольно короткое (300 пс), что предотвращает утечку электронов к O_2 . Реакция O_2 с Q_A^- (Иванов и Хоробрых, 2003; Pospíšil, 2012) является термодинамически неблагоприятной из-за более положительного значения $E_m(Q_A/Q_A^-)$, -70 мВ (Brinkert и др., 2016). Однако связывание HCO_3^- с негемовым Fe, расположенным между Q_A и Q_B , сдвигает $E_m(Q_A/Q_A^-)$ до -145 мВ, делая утечку электронов от Q_A^- к O_2 более вероятной (Kozuleva и др., 2020).

Была также предложена роль очень низко-потенциальной формы цитохрома b_{559} ($E_m -150 \div -200$ мВ, Рис. 9С) в восстановлении O_2 (Хоробрых, 2019). Однако доля этой формы чрезвычайно мала в нормальных условиях и увеличивается только тогда, когда функционирование ФС II сильно нарушено. Кроме того, цитохром b_{559} погружен в гидрофобную зону мембраны, где E_m пары $O_2/O_2^{\cdot-} = -550 \div -600$ мВ, поэтому фотовосстановление O_2 в этом случае является термодинамически неблагоприятным.

1.2.3. Образование пероксида водорода компонентами стромы и компонентами тилакоидной мембраны

$O_2^{\cdot-}$, которые образуются в строме восстановленным Фд или на границе мембраны, или те $O_2^{\cdot-}$, которые образовались в мембране, но вышли из мембраны в строму, диспропорционируют с образованием H_2O_2 в строме хлоропластов (реакция 1).



Диспропорционирование протекает, в основном, не как спонтанный процесс, а катализируется ферментом супероксиддисмутазой (СОД). Содержание СОД в строме довольно высоко, и большая часть фермента, приблизительно 70%, ассоциирована с внешней поверхностью тилакоидов (Ivanov, 2014). За счет высокой вязкости стромы, константа скорости реакции, катализируемой СОД в ней, почти на порядок ниже, по сравнению с константой скорости реакции в воде, $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

В строме хлоропластов присутствуют восстановители $O_2^{\cdot-}$ – прежде всего это аскорбат и глутатион. Содержание аскорбата в строме было определено, и его значение находится в интервале от 10 мМ до 150 мМ (Ivanov, 2014), и константа скорости реакции $O_2^{\cdot-}$ с аскорбатом на два порядка выше, чем с глутатионом.

В процессе и диспропорционирования, и восстановления $O_2^{\cdot-}$ в строме хлоропласта образуется пероксид водорода, H_2O_2 . В то же время в освещенных тилакоидах скорость образования общего $O_2^{\cdot-}$ снаружи тилакоидов, которая была посчитана на основе скорости поглощения H_2O_2 , была значительно выше, чем скорость образования $O_2^{\cdot-}$ снаружи тилакоидов, которое было измерено как супероксид-зависимое восстановление цитохрома *c*; и это различие увеличивалось по мере увеличения интенсивности света (Mubarakshina и др., 2006). Это различие говорит о том, что часть $O_2^{\cdot-}$ «исчезала» внутри тилакоидов. Диспропорционирование $O_2^{\cdot-}$, образовавшегося в гидрофобной фазе мембраны, затрудняется в силу сильного электростатического отталкивания в среде с низкой диэлектрической проницаемостью (Takahashi, Asada 1988). Однако, когда подавление возможного диспропорционирования $O_2^{\cdot-}$ (то есть образования H_2O_2) снаружи тилакоидов обеспечивалось как присутствием цитохрома *c* в насыщающих концентрациях, так и ингибиторами СОД, которая могла загрязнять препараты тилакоидов, по-прежнему наблюдалось образование H_2O_2 в суспензии тилакоидов (Mubarakshina и др., 2006). При высоком уровне освещенности эта продукция H_2O_2 может достигать 60% от общей продукции H_2O_2 в тилакоидах. Количество H_2O_2 , появляющегося в люмене, достигало только 5% от всего количества H_2O_2 , образуемого в таких условиях, из чего следует, что образование H_2O_2 происходило именно внутри мембраны тилакоида.

В экспериментах с изолированными тилакоидами с использованием различных подходов (Мубаракшина и др., 2006; Mubarakshina и др., 2006) было показано, что при увеличении уровня освещенности происходит увеличение продукции H_2O_2 в мембране. Образование $O_2^{\cdot-}$ внутри тилакоидной мембраны было показано в работах (Kozuleva и др., 2011; Kozuleva и др., 2014) в условиях, когда кислород является единственным акцептором электронов. Кроме того, показанное образование $O_2^{\cdot-}$ в мембране в присутствии физиологических акцепторов электронов, Фд и НАДФ⁺ (Kozuleva и др., 2016), также подтверждает существование в ФЭТЦ кислород-восстанавливающих путей, приводящих к продукции $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в мембране тилакоидов, даже в условиях, приближенных к условиям *in vivo*.

Нами было предположено, что H_2O_2 , регистрируемый как «мембранный» в присутствии цитохрома *c*, образуется в результате реакции восстановленного пластохинона ПХН₂ с $O_2^{\cdot-}$ (реакция 2), генерируемыми внутри тилакоидной

мембраны восстановленным филлохиноном, $\text{ФХ}^{\bullet-}$, и протекает данная реакция преимущественно на границе фаз мембрана/строма (реакция 2).



Эта реакция является термодинамически очень выгодной в водных растворах в силу высокой разницы между значениями E_{m7} окислительно-восстановительных пар $\text{ПХ}^{\bullet-}/\text{ПХН}_2$ (370 мВ) и $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2$ (940 мВ); рассчитанная константа равновесия выше 10^9 . Электростатическое отталкивание не тормозит реакцию, поскольку pK_1 ПХН_2 в водной среде близко к 11, и pK может быть выше в гидрофобной среде. Разница редокс потенциалов этих пар в апротонной среде меньше, чем в водной среде, однако быстрая реакция $\text{O}_2^{\bullet-}$ с восстановленным MitoQ_{10} (имеющим схожие с ПХН_2 и убигидрохиноном физико-химические свойства) в октаноле (James и др., 2005) подтверждает возможность протекания Реакции 2 в апротонных средах, вероятно, вследствие стабилизации и увеличения времени жизни $\text{O}_2^{\bullet-}$ в таких средах. Реакции с восстановленными хинонами были хорошо изучены, константа скорости реакции 2-го порядка в водной среде была измерена около $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Afanas'ev, 1989), в то время как в ацетонитриле эта константа была $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Khorobrykh, Tuustjärvi, 2018). Снижение величины константы скорости реакции может быть следствием сближения редокс потенциалов участвующих редокс-пар в ацетонитриле, апротонном растворителе, чья диэлектрическая проницаемость равна 37, по сравнению с диэлектрической проницаемостью воды, равной 81. Также стоит отметить, что дипольный момент ацетонитрила (3,82 D) выше, чем у воды (1,85 D). Реакция ПХН_2 с $\text{HO}\text{O}^{\bullet}$ была изучена меньше, однако существуют некоторые доказательства того, что эта реакция с участием $\text{HO}\text{O}^{\bullet}$ вместо $\text{O}_2^{\bullet-}$ протекает с меньшей константой скорости реакции, которая, по оценкам Maroz и др. (Maroz и др., 2009), в органических растворителях составила около $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Подчеркивается, что реакционная способность пергидроксильного радикала сильно зависит от его гидратации как в водных, так и в апротонных средах (Afanas'ev, 1989). Гидратация, как правило, приводит к уменьшению скоростей реакции с участием $\text{HO}\text{O}^{\bullet}$.

Атомы кислорода в молекуле ПХН_2 формируют водородные связи с молекулами воды (Rich, Harper, 1990), и в тилакоидной мембране это может происходить вблизи гидратированных участков и около поверхности мембраны. Если $\text{O}_2^{\bullet-}$ образуется внутри тилакоидной мембраны (Kozuleva и др., 2014;

Kozuleva и др., 2016), то, имея рК 12 в гидрофобной среде, он может превратиться в гидроперекисный радикал $\text{HO}\cdot$ (Afanas'ev, 1989). Однако $\text{HO}\cdot$ теряет протон при переходе из гидрофобной фазы мембраны в обогащённые водой области на границе мембраны, где $\text{HO}\cdot$ имеет рК 4.8. При этом рН люмена и стромы в нормальных физиологических условиях не опускаются ниже 4.8, что может быть важно для протекания Реакции 2 (Afanas'ev, 1989).

Реакция ПХН_2 с $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($\text{HO}\cdot$) может протекать как в обогащенных водой участках мембраны, так и в гидрофобных зонах. Константа скорости второго порядка для реакции $\text{O}_2^{\cdot-}$ с хинолами в водных растворах приблизительно равна $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Afanas'ev, 1989). Однако эта константа для реакции $\text{O}_2^{\cdot-}$ с ПХН_2 в метаноле существенно ниже $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Khorobrykh и др., 2016). Учитывая, что гидрофильное бензохиноновое кольцо ПХН_2 может формировать водородные связи с молекулами воды в строме, можно предположить, что ПХН_2 находится, преимущественно, на границе между гидрофобной фазой тилакоидной мембраны и фазой, обогащенной водой (Nilsson и др., 2001). Таким образом, можно утверждать, что Реакция 2 в представленном виде должна протекать преимущественно около поверхностей мембраны, граничащих со стромой или люменом.

Первые косвенные доказательства в пользу протекания реакции ПХН_2 с $\text{O}_2^{\cdot-}$ были получены в результате изучения окисления ПХ пула после прекращения освещения светом разной интенсивности (Ivanov и др., 2007). ПХ пул в тилакоидах, который был восстановлен во время освещения и состоял из молекул ПХН_2 , не окислялся в темноте в отсутствие кислорода (Kruk, Strzalka, 1999; Ivanov и др., 2007). В аэробных условиях в изолированных тилакоидах наблюдалась двухфазная кинетика окисления в секундном диапазоне, за первой быстрой фазой которого следовала вторая, более медленная (McCauley, Melis, 1986; Ivanov и др., 2007). Был сделан вывод о том, что быстрая фаза наблюдается в результате окисления молекул ПХН_2 накопившимися $\text{O}_2^{\cdot-}$ в мембране на свету. Несмотря на имеющиеся косвенные данные, указывающие на протекание Реакции 2, т.е. реакции ПХН_2 с $\text{O}_2^{\cdot-}$, все еще предстоит получить прямые свидетельства в пользу данной реакции в тилакоидных мембранах.

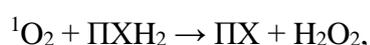
1.2.4. Возможные реакции форм кислорода и компонентов пула пластохинона, влияющие на окислительно-восстановительное состояние пула и определяющие роль пула пластохинона в метаболизме высших растений

Реакция 2, нейтрализация $O_2^{\cdot-}$ пластогидрохиноном, представляет собой антиоксидантную функцию ПХ пула (Hundal и др., 1995; Khorobrykh, Ivanov, 2002; Khorobrykh и др., 2004; Kruk и др., 2003). $O_2^{\cdot-}$, особенно в протонированной форме (пергидроксильный радикал, HO_2^{\cdot}), инициирует перекисное окисление мембранных липидов. Защитная функция восстановленного пластохинона в процессе перекисного окисления липидов (жирных кислот) в тилакоидных мембранах уже была ранее доказана (Hundal и др., 1995, Szymańska, Kruk, 2010; Nowicka и др., 2013, Kruk и др., 2016). Были представлены доказательства того, что PQH_2 имеет довольно высокую антиоксидантную активность, сравнимую по свойствам с токоферолом (Strzalka и др., 2009, Szymańska, Kruk, 2010). Перекисное окисление липидов обычно начинается с отделения бис-аллильного атома водорода от полиненасыщенных жирных кислот супероксидным анион-радикалом, и этот процесс происходит быстрее в присутствии HO_2^{\cdot} (Aikens, Dix 1991).

Отделение атома водорода от полиненасыщенных жирных кислот и, как следствие, перекисное окисление липидов может происходить также с участием синглетного кислорода, 1O_2 , который образуется в результате инверсии спина одного из неспаренных электронов в молекуле O_2 . Основной путь образования 1O_2 в тилакоидах заключается в передаче энергии возбуждения от триплетного хлорофилла на молекулярный кислород (Rutherford, Krieger-Liszkay, 2001; Neverov, Krasnovsky Jr, 2004; Triantaphylidès, Havaux, 2009, Fischer и др., 2013; Telfer, 2014; Pospíšil, 2016). В литературе известны два пути образования возбужденного триплетного хлорофилла. В первом случае электрон в возбужденном синглетном состоянии хлорофилла может поменять спин, приводя к переходу молекулы хлорофилла в более низкоэнергетическое триплетное состояние. Во втором случае хлорофилл может перейти в триплетное состояние в результате рекомбинации зарядов в реакции ион-радикальной пары $P680^+ Pheo^-$. Было установлено, что преимущественно второй путь приводит к образованию 1O_2 в хлоропластах (см. обзор Krieger-Liszkay, 2005). Хиноны могут тушить возбужденное состояние молекул хлорофилла, препятствуя образованию синглетного кислорода, одной из наиболее активных АФК (Rajagopal и др., 2003).

Пластохинон может также напрямую нейтрализовать $^1\text{O}_2$ (Kruk, Trebst, 2008; Yadav и др., 2014; Khorobrykh, Tuustjärvi, 2018), играя роль непосредственного физического или химического тушителя (Ferretti и др., 2018).

Значительное количество литературных данных показывает антиоксидантную активность ПХН₂ в отношении синглетного кислорода (Gruszka и др., 2008, Kruk, Trebst, 2008; Szymańska, Kruk, 2010), и, таким образом, можно представить Реакцию 3 как ещё один механизм антиоксидантной активности пула пластохинона. Приблизительная константа реакции равна $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ в ацетонитриле (Gruszka и др., 2008).



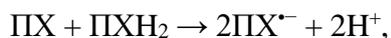
Реакция 3

Недавно были получены прямые свидетельства того, что ПХН₂ осуществляет химическое тушение $^1\text{O}_2$ (Ferretti и др., 2018). Работа была выполнена с использованием растений арабидопсиса, оверэкспрессирующих ген *SOLANESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 1 (SPS1oex)*, который участвует в биосинтезе пластохинона. Было показано, что интенсивность сигнала ЭПР от $^1\text{O}_2$ была значительно ниже в тилакоидах из растений *SPS1oex*, по сравнению с диким типом. Также было показано, что растения, гиперэкспрессирующие гены биосинтеза пластохинона, демонстрируют более высокую устойчивость к свету высокой интенсивности, а именно: меньшее выцветание листьев, менее выраженные перекисное окисление липидов и фотоингибирование (Ksas и др., 2015).

Протекание реакций 2 и 3 представляет собой нейтрализацию таких АФК, как $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{HO}_2^{\cdot}$ и $^1\text{O}_2$. В то же время, эти реакции влияют на окислительно-восстановительное состояние ПХ пула, приводя к его частичному окислению, что особенно важно в условиях высокой освещенности и других стрессовых условиях, когда ПХ пул перевосстановлен. Протекание упомянутых реакций снижает степень восстановления пула пластохинона и фотосинтетической электрон-транспортной цепи в целом, помогая избежать фотоингибирования и повреждения компонентов цепи.

Способность ПХ пула нейтрализовать H_2O_2 представлена в работе, где исследовалась способность гидрохинонов реагировать с H_2O_2 (Sanchez-Cruz и др., 2014). Авторы пришли к заключению, что окисление гидрохинонов с участием H_2O_2 происходит через реакцию H_2O_2 с семихинонами, которые всегда

присутствуют в растворах хинолов вследствие реакции конпропорционирования (Реакция 4).



Реакция 4

Однако, как подчеркивают авторы, константа скорости реакции гидрохинонов с H_2O_2 довольно низкая, приблизительно $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Sanchez-Cruz и др., 2014), по сравнению с реакцией окисления семихинонов кислородом (Реакция 4). Реакция между H_2O_2 и изолированным ПХН_2 , приводящая к окислению ПХН_2 , была продемонстрирована в модельной системе, в растворе метанола (Khorobrykh, Tuustjärvi 2018). Представленные данные также указывают на лимитирование этой реакции, так как даже добавка высокой концентрации H_2O_2 (до 5 мМ) в среду, содержащую всего 100 мкМ ПХН_2 , приводила к окислению менее половины молекул ПХН_2 .

Было показано, что восстановленные хиноны могут препятствовать перекисному окислению липидов не только путём обезвреживания АФК (Maroz и др., 2009). В данной работе исследователи использовали два хинона: идебенол и митохинол. Было показано, что в восстановленной форме эти хиноны могут напрямую реагировать с радикалами, образующимися при перекисном окислении липидов – такими, как $\text{НОСН}_2\text{OO}^{\cdot}$, $\text{CH}_2\text{OH}^{\cdot}$, $\text{C}_6\text{H}_{13}^{\cdot}$, $\text{OOC}_6\text{H}_{13}^{\cdot}$, CCl_3^{\cdot} и OOCCL_3^{\cdot} – и донировать им атом водорода. По оценкам авторов исследования, константа скорости такой реакции в органических растворителях составляет около $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. В этой же работе были исследованы реакции окисленных форм хинонов с $\text{O}_2^{\cdot-}$, и было показано, что в органических растворителях окисленные формы хинонов реагируют с $\text{O}_2^{\cdot-}$ довольно быстро, так как в неполярных растворителях $\text{O}_2^{\cdot-}$ выступает сильным восстановителем. Авторы предполагают, что эти реакции могут протекать в гидрофобной части биологических мембран, где расположены окисленные формы пластохинона и убихинона, в то время как реакция восстановленных форм хинонов с $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Реакция 2) происходит ближе к поверхности мембран.

Известно, что фотохимически неактивный пластохинон, преимущественно в форме ПХН_2 , находится в стромах в виде осмиофильных пластоглобул (Lichtenthaler, 2013). Акклимация растений к свету высокой интенсивности коррелирует со значительным ростом доли фотохимически неактивного ПХН_2 в пластоглобулах (Szymańska, Kruk 2010, Ksas и др., 2015).

Согласно литературным данным, регуляция перераспределения ПХН₂ между пластоглобулами и мембранами хлоропласта играет важную роль для осуществления антиоксидантной функции пластохинона (Singh и др., 2012).

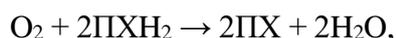
ПХ пул также участвует в антиоксидантной защите клеток через регуляцию активности антиоксидантных ферментов. Например, была показана ключевая роль редокс состояния пула пластохинона в регуляции активности цитозольных и хлоропластных аскорбатпероксидаз в условиях повышенной освещённости (Karpinska и др., 2000), а также в регуляции активности супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и каталазы в реакциях взаимодействия растение-патоген (Nosek и др., 2015). Таким образом, регуляторная функция ПХ пула проявляет себя при действии как абиотических, так и биотических стрессовых факторов (Mühlenbock и др., 2008, Nosek и др., 2015).

Определяющая роль линейного электронного транспорта в окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула достаточно очевидна. Далее кратко рассмотрим другие пути транспорта электронов, также влияющие на редокс состояние ПХ пула. Существует два пути циклического электронного транспорта, когда электроны от акцепторной стороны ФС I переносятся обратно в ФЭТЦ и восстанавливают ПХ пул. Основная физиологическая роль циклического электронного транспорта – формирование протонного градиента на мембране для синтеза АТФ. Первый возможный путь осуществляется с участием восстановленного Фд и белкового комплекса PGR5/PGRL1, который ранее рассматривался как путь с участием гипотетической «ферредоксин:хинон редуктазы». Роль циклического электронного транспорта в поддержании редокс состояния пула пластохинона возрастает в условиях затрудненной работы ФС II. В неповрежденных тилакоидах роль циклического электронного транспорта должна быть особенно большой в ламеллах стромы, где содержится меньше комплексов ФС II (Joliot, Joliot, 2002), а также в клетках обкладки проводящих пучков С4 растений, например, кукурузы, где практически отсутствует активность ФС II (Ivanov и др., 2005).

Известно, что ПХ пул может быть восстановлен мультисубъединичной НАДФ(Н) дегидрогеназой (NDH) 1 типа или мономерной NDH 2 типа. Эти NDH используют электроны от НАДФ(Н) для восстановления молекул пластохинона. В высших растениях NDH не содержат субъединицу, обеспечивающую связывание НАДФ(Н), поэтому считается, что вместо него роль донора электронов выполняет

Фд (Munekage и др., 2004; Ifuku и др., 2011). Несмотря на то, что в норме содержание NDH в тилакоидной мембране мало – 1 молекула на 100 комплексов ФС I (Ifuku и др., 2011) – активность NDH в хлоропластах может значительно возрастать в некоторых стрессовых условиях (Sazanov и др., 1998). Очень вероятно, что восстановление ПХ пула в темноте за счет НАДН, образованного в процессе деградации крахмала и гликолиза, с участием NDH, имеет большое значение для поддержания антиоксидантной функции ПХ пула в темноте, когда АФК могут образовываться ферментативно в реакциях, катализируемых некоторыми оксидазами. Восстановление ПХ пула через NDH считается вторым путем циклического электронного транспорта вокруг ФС I, известным как NDH-зависимый циклический электронный транспорт, который также приводит к формированию протон-движущей силы для последующего синтеза АТФ (Strand и др., 2016). Было также показано, что накопление H_2O_2 в хлоропластах приводит к активации NDH-зависимого циклического электронного транспорта (Strand и др., 2016). Предполагается, что H_2O_2 активирует сигнальный каскад, приводящий к фосфорилированию NDH комплекса и его активации (Lascano и др., 2003).

На редокс состояние пула пластохинона также может оказывать влияние работа пластидной терминальной оксидазы (ПТО). Перенос электронов от ПХН₂ на молекулу кислорода с образованием воды, катализируемый ПТО, представляет собой ферментативный путь окисления пула пластохинона (Реакция 5).



Реакция 5

Реакция 5 может протекать неферментативным путем, но константа скорости этой реакции очень низкая. В тилакоидных мембранах Реакция 5, катализируемая ПТО, преобразует O_2 до воды с использованием четырех электронов от двух молекул ПХН₂. Скорость окисления ПХН₂ через ПТО в высших растениях была оценена на уровне $0,3\text{--}0,4 \text{ e}^- \text{ c}^{-1} \text{ ФС II}^{-1}$ (Joliot, Joliot, 2002; Trouillard и др., 2012), а в альпийском растении *Ranunculus glacialis*, выращенном при высокой интенсивности света, эта величина была измерена на уровне $1,3 \text{ e}^- \text{ c}^{-1} \text{ ФС II}^{-1}$ (Laureau и др., 2013). Поскольку эти скорости на два порядка ниже скорости линейного электронного транспорта, считается, что ПТО не может выполнять роль защитного клапана, предохраняющего ПХ пул от излишнего восстановления на свету (Nawrocki и др., 2015).

Низкая скорость утечки электронов от ПХ пула через ПТО является следствием его малого количества в тилакоидной мембране, всего 1 молекула на 100 комплексов ФС II (Lennon и др., 2003), в то время как активность чистого фермента как такового в экспериментальных условиях при насыщающей концентрации субстрата была измерена на уровне 20 мкмоль O_2 мг⁻¹ белка мин⁻¹ (Yu и др., 2014). Увеличение содержания ПТО в стрессовых условиях приводит к росту утечки электронов через ПТО (Laureau и др., 2013). Таким образом, ПТО может играть роль дополнительного акцептора электронов только у некоторых видов растений в некоторых условиях. Работа обоих путей циклического электронного транспорта требует оптимального окислительно-восстановительного баланса ПХ пула, что было четко показано в некоторых исследованиях (Heber и др., 1995; Ivanov и др., 1998). Будучи расположенной в несостыкованных участках ламелл, ПТО может окислять ПХ пул, обеспечивая необходимый окислительно-восстановительный статус ПХ пула для протекания циклического электронного транспорта.

При повышенной экспрессии, ПТО может приводить к образованию $O_2^{\bullet-}$ на свету (Heupel и др., 2009), что было также показано в экспериментах с изолированным ферментом (Feilke и др., 2014; Yu и др., 2014). Это может быть неизбежным свойством фермента, который осуществляет четырехэлектронное восстановление кислорода через образование пероксидных интермедиатов, и может образовывать АФК как побочные продукты с некоторой скоростью, зависящей от концентрации гидрохинонов и pH среды. Ещё предстоит выяснить, является ли неполный каталитический цикл свойством выделенного фермента, и проявляется ли этот процесс в нормальных условиях *in vivo*. В литературе был предложен механизм регуляции активности ПТО путём pH-зависимой ассоциации этого фермента с мембраной тилакоидов (Krieger-Liszkay, Feilke, 2015).

Электронный транспорт от НАД(Ф)Н, через NDH, ПХ и ПТО на кислород с образованием воды в темноте известен как хлордыхание, в то время как восстановление кислорода с образованием воды с участием ПТО, с использованием ПХН₂ образованного на свету за счёт электронов, полученных от воды в ФС II, можно назвать «коротким водно-водным циклом» (Burrows и др., 1998; Desplats и др., 2009). Рассматривая эти электронные пути, следует помнить, что количество NDH в тилакоидной мембране примерно в 3 раза меньше, чем количество ПТО (Lennon и др., 2003, Ifuku и др., 2011).

На свету в тилакоидной мембране может протекать ещё один процесс, который влияет на редокс состояние ПХ пула – реакция пластосемихинона (ПХ^{•-}) с молекулярным кислородом в триплетном состоянии (O₂) (Реакция 6).



Эта реакция является хорошо изученным процессом. Постоянное образование молекул ПХ^{•-} в пуле пластохинона как на свету, так и в темноте, происходит в результате реакции конпропорционирования между ПХ и ПХН₂ (реакция 4). Реакция 6 в водной среде становится преобладающей в этом направлении при рН выше 6.0 (значение рК молекулы ПХН[•]). Зная концентрацию пластохинона в тилакоидной мембране, около 20 молекул на 1000 молекул хлорофилла (McCauley, Melis, 1986), концентрацию ПХ^{•-} можно оценить на уровне, близком к 10⁻¹² моль (мг Хл)⁻¹ (Mubarakshina, Ivanov, 2010)

На свету к реакции конпропорционирования добавляется реакция окисления ПХН₂ в хинол-окисляющем центре цит. *b₆/f* комплекса (Baniulis и др., 2013), а также рассмотренная ранее Реакция 2, увеличивающие долю ПХ^{•-} в ПХ пуле. Сложно оценить, какой вклад вносит восстановление кислорода пластосемихиноном в общую скорость окисления пула пластохинона *in vivo* при функционировании полной ФЭТЦ. Можно только предположить, что утечка электронов через ПХ^{•-} на донорной стороне *b₆/f* комплекса может расти в стрессовых условиях.

Иногда рассматривается возможность окисления ПХ пула с участием цитохрома *b₅₅₉* (Kruk, Strzałka, 1999; Bondarava и др., 2010), однако скорость этой реакции на свету очень низкая (Khorobrykh, Tuustjärvi, 2018). Протекание этой реакции в неповрежденных тилакоидах вряд ли возможно, учитывая расположение цитохрома *b₅₅₉* глубоко внутри мембраны, где редокс потенциал пары O₂/O₂^{•-} очень низкий (~ -0.55 В). С другой стороны, можно предположить, что в некоторых условиях ПХН₂ может восстанавливать цитохром *b₅₅₉* (например, при нарушении работы водоокисляющего комплекса, когда цитохром *b₅₅₉* может передать электрон на Р680⁺), а образующийся при этом ПХ^{•-} – восстанавливать молекулярный кислород, согласно Реакции 6.

1.3. Влияние факторов среды на функционирование высших растений и механизмы приспособления растений к условиям окружающей среды

1.3.1. Условия освещения и регуляторная роль окислительно-восстановительного состояния пула пластохинона

Эффективное приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды является необходимым условием для выживания и конкурентоспособности растений. Акклимация растений к различным условиям освещенности – предмет интереса многих ученых в течение долгого времени (Иванов и др., 1974; Кренделева и др., 1975; Boardman 1997; Anderson 1986; Bailey и др., 2001). В изменяющихся условиях освещения, растениям для нормального метаболизма требуется разное количество продуктов фотосинтеза, таких как АТФ и НАДФН. Регулирование синтеза АТФ и НАДФН осуществляется изменениями функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи хлоропластов растений. Интенсивность света является наиболее быстро и часто меняющимся абиотическим фактором, но также является наиболее важным, учитывая, что именно энергия квантов света необходима для активации фотосинтеза. «Правильное» приспособление растений к условиям освещения имеет важное значение для обеспечения эффективного использования света в условиях пониженной освещенности и для предотвращения фотоокислительного повреждения в условиях избыточного освещения. Приспособление высших растений к изменению освещенности достигается путем изменения функционирования растений как на уровне листа, так и на уровне корней. Долгосрочная акклимация к условиям низкой или высокой интенсивности света происходит во временном интервале от нескольких дней до нескольких месяцев и включает, среди прочего, корректировки структуры листа, структуры хлоропластов, состава фотосинтетической цепи переноса электронов и регулирование использования фотосинтетического света (Boardman, 1977; Anderson, 1986; Schoettler, Toth, 2014), в то время как краткосрочная акклимация начинает происходить в первые минуты освещения (Rochaix и др., 2012).

Выделяют следующие типичные характеристики растений, приспособившихся к высокой интенсивности света, по сравнению с растениями, произрастающими при низкой интенсивности света:

- 1) листья более толстые и с большим количеством клеточных слоев, более крупные клетки (Björkman, Holmgren, 1963; Ludlow, Wilson, 1971; Wild, Wolf, 1980; Weston и др., 2000; Boardman, 1977; Walters, Horton, 1994)

- 2) более высокое соотношение Хл *a* к Хл *b* (Boardman, 1977; Wild, 1980; Lichtenthaler и др., 1981; Bailey и др., 2004);
- 3) увеличение количества хлоропластов в клетке (Anderson, 1986);
- 4) уменьшение гранальной структуры (Anderson и др., 1973; Lichtenthaler и др., 1981);
- 5) высокое содержание β -каротина и пигментов ксантофиллового цикла (Anderson, 1986; Bailey и др., 2004);
- 6) более высокое отношение ФС II/ФС I (Schoettler, Toth, 2014; Albanese и др., 2016).
- 7) более высокие скорости переноса электронов, более высокие скорости ассимиляции CO₂ и более высокое содержание крахмала (Björkman, Holmgren, 1963; Ludlow, Wilson, 1971; Boardman, 1977; Wild, 1980);
- 8) нарушение баланса между фотосинтетическим переносом электронов и фиксацией CO₂ из-за инактивации Рубиско и/или закрытия устьиц; переход фотосинтетической цепи переноса электронов в восстановленное состояние (Antal и др., 2010);
- 9) более высокая способность к диссипации энергии (Brugnoli и др., 1994; Demmig-Adams, Adams, 1996; Park и др., 1996; Ballottari и др., 2007; Mishra и др., 2012);
- 10) изменение активности карбоангидраз – ферментов, катализирующих обратимую реакцию образования угольной кислоты из диоксида углерода и воды (Rudenko и др., 2020);
- 11) изменение соотношения альтернативных путей транспорта электронов, накопление АФК и индукция соответствующих сигнальных путей (Antal и др., 2010).

Самый быстрый фотозащитный ответ растений и водорослей на быстро увеличивающуюся интенсивность света – это нефотохимическое тушение (НФТ) избыточной световой энергии в антенне ФС II (Müller и др., 2001; Jahns, Holzwarth, 2012; Ruban и др., 2012; Derks и др., 2015; Goss, Lepetit, 2015). Среди различных компонентов, которые вносят вклад в общее НФТ (Quick, Stitt, 1989; Walters, Horton, 1991; Nilkens и др., 2010), рН-регулируемый компонент qE представляет собой основной компонент НФТ, величина которого увеличивается при высокой интенсивности света. Компонент qE является самым быстрым (первые минуты освещения) по активации, а также самым первым по релаксации в темноте после освещения (Nilkens и др., 2010). У наземных растений qE строго

регулируется рН люмена (Krause и др., 1982) и требует быстрой активации белка PsbS (Li и др., 2000). При этом белок ФС II PsbS действует как датчик рН люмена (Li и др., 2004) и, как предполагается, активирует qE путем конформационных изменений в белках антенны ФС II (Horton и др., 2005), взаимодействуя с определенными комплексами ССК II (Correa-Galvis и др., 2016; Sacharz и др., 2017). Считается, что qE также регулируется ксантофиллом зеаксантином (Demmig и др., 1987; Horton и др., 1996, 2005; Nilkens и др., 2010), который образуется при повышенной освещенности в реакциях деэпоксирирования виолаксантина (Jahns и др., 2009). Функция зеаксантина в НФТ, однако, не ограничена участием в рН-регулируемом механизмом qE; было показано, что зеаксантин также участвует в более медленно релаксирующих состояниях НФТ, таких как qZ, обратная трансформация зеаксантина в виолоксантин, (Dall'Osto и др., 2005; Nilkens и др., 2010) и qI, фотоингибирование, (Adams и др., 2002; Demmig-Adams и др., 2006; Nilkens и др., 2010). Однако конкретная функция зеаксантина в НФТ все еще обсуждается (Jahns, Holzwarth, 2012).

Кроме того, установлено, что при изменении освещенности растений оптимизация фотосинтетической активности на стадии поглощения энергии квантов света происходит за счет активации механизмов, приводящих к изменению размеров ССК фотосистем, так и путем регулирования биосинтеза белков РЦ фотосистем. При изменениях спектрального состава света ССК тилакоидных мембран могут быть реорганизованы за счет обратимой миграции наружной части ССК ФСII между ФСII и ФСI, что приводит к изменению размеров ССК обеих фотосистем. Этот процесс называется переходами состояний (state transitions). Было показано, что только слабосвязанные тримеры ССК II, которые состоят из продуктов генов *lhcb1* и *lhcb2*, мигрируют между фотосистемами, в то время как сильно и умеренно связанные тримеры остаются связанными с ФС II (Galka и др., 2012, Wientjes и др., 2013).

Миграция ССК II между фотосистемами тилакоидных мембран под действием света – процесс пространственного перемещения пигмент-белковых комплексов. Избыток света, который превышает возможности электронного транспорта, может приводить к фотоингибированию, т.е. повреждению фотосинтетических компонентов под действием света. Для оптимизации процесса фотосинтеза в этих условиях необходимы адаптационные механизмы, позволяющие перераспределить энергию возбуждения между фотосистемами. ССК II высших растений, а также водорослей, обладая функциональной

гибкостью и динамичностью, способен мигрировать от ФС2 II к ФС I и обратно, что позволяет фотосинтетическому аппарату растений адаптироваться к краткосрочным изменениям в условиях освещения (Aro и Ohad 2003). Так, фосфорилирование белков ССК II с помощью фермента киназы STN7 (Rochaix и др., 2012) приводит к миграции ССК II от ФС II к ФС I при освещении ближним красным светом, возбуждающим преимущественно реакционные центры фотосистемы 2. Дефосфорилирование с помощью фермента фосфатазы PPH1 (Shariguzov и др., 2010) обеспечивает возвращение ССК II от ФС I к ФС II при освещении дальним красным светом, возбуждающим преимущественно реакционные центры ФС I, или в темноте. Киназа STN7, осуществляющая фосфорилирование белков ССК II, представляет собой трансмембранный белок (Derege и др., 2003). N-терминальный конец STN7 киназы экспонирован в люмен тилакоидов и содержит 2 цистеиновых остатка, которые, возможно, ответственны за активность данного фермента (Lemeille и др., 2009). Роль ПХ пула в переходах состояний неоспорима; однако это, по-видимому, связано не непосредственно с окислительно-восстановительным состоянием пула, а скорее с появлением молекул ПХН₂ на свету. Связывание молекул ПХН₂ с сайтом окисления в цит. *b₆/f* комплексе приводит к взаимодействию киназы с комплексом в стромальной петле субъединицы, в результате чего происходит активация STN7 киназы (Vener и др., 1997; Shariguzov и др., 2016, Dumas и др., 2017).

В высших растениях лишь небольшая часть внешнего пула ССК II участвует в state transitions, тогда как в водорослях практически вся светособирающая антенна мигрирует от ФС II к ФС I и обратно. Принято считать, что state transitions происходит при низкой интенсивности света (100–200 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) (Mekala и др., 2015; Vetoshkina и др., 2019). Существуют свидетельства в пользу того, что при высокой интенсивности света state transitions не протекает (Rintamäki и др., 2000, Wunder и др., 2013, Trotta и др., 2016), поскольку может происходить ингибирование фермента киназы восстановленным на свету тиоредоксином (Lemeille, Roshaiex, 2010). После потери активности STN7 киназы происходит последующая деградация фермента, которая является результатом почти полного дефосфорилирования как сериновых, так и треониновых остатков киназы, происходит уже через 2 часа освещения при высокой интенсивности света 1000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ (Trotta и др., 2016).

За последние несколько лет были достигнуты значительные успехи в понимании краткосрочного ответа, т.е. state transitions. В настоящее время

миграция антенных комплексов ФС II к ФС I при ФС II-специфическом красном свете и возврат антенных комплексов ФС II обратно к ФС II при ФС I-специфическом дальнем красном свете называются классическими переходами состояний (Rantala и др., 2017). Классическая теория предполагает, что почти все фосфорилированные белки ССК II связаны с ФС I при ФС II-специфическом свете (Wollman, 2001). Однако было показано, что в условиях освещения белым светом ($120 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) только небольшая часть фосфорилированного ССК II взаимодействует с ФС I, а также было обнаружено значительное количество фосфорилированных белков, особенно *Lhcb1*, связанных с ФС II (Rantala и др., 2017).

В обратимом фосфорилировании участвуют не только белки ССК II, но и коровые белки ССК II (Bonardi и др., 2005, Tikkanen и др., 2010). Фосфорилирование коровых белков регулируется активностью киназы STN8, тогда как дефосфорилирование регулируется фосфатазой РВСП. При ярком освещении, как написано выше, активность киназы STN7 ингибируется, в то время как киназа STN8 становится активной, что приводит к фосфорилированию только основных белков ФС II (Pursiheimo и др., 1998, Mekala и др., 2015). По-видимому, описанное обратимое фосфорилирование белков ФС II и ССК II играет основную роль в распределении энергии между фотосистемами, когда изменяется интенсивность света (Mekala и др., 2015). Фосфорилирование корового белка ФС II в условиях высокой освещенности облегчает «распаковку» комплексов ФС II-ССК II, которая необходима для восстановления поврежденных центров ФС II (Tikkanen и др., 2008, Fristedt и др., 2009, Goral и др., 2010, Kirchhoff и др., 2011). Обратимое фосфорилирование белков РЦ ФС II влияет на ультраструктуру тилакоидной мембраны и, таким образом, регулирует цикл репарации ФС II (Baena-Gonzalez и др., 1999; Baena-González, Aro 2002; Tikkanen и др., 2006; Goral и др., 2010; Herbstova и др., 2012).

Другим механизмом акклимации растений к действию света является изменение экспрессии генов хлоропластов, таких как *psbA*, *psaA* и *psaB*, кодирующих белки реакционных центров ФС II и ФС I (Allen 2015). Было показано, что этот процесс медленнее процесса переходов состояний, но быстрее, чем долгосрочный ответ (см. далее) (Allen, Pfannschmidt 2000). Этот ответ необходим для быстрого изменения в биосинтезе белков фотосинтетической цепи переноса электронов, которые кодируются генами хлоропластного генома, в частности, как написано выше, субъединиц РЦ, что позволяет регулировать

стехиометрию фотосистем (Allen, 2015). Эта стехиометрия может быть различной в различных условиях окружающей среды, обеспечивая оптимальное равновесие в фотосинтетической цепи переноса электронов. Было показано, что хлоропластная сенсорная киназа, CSK, играет важную роль в корректировке стехиометрии ФС II (Puthiyaveetil et al. 2008). Однако сигнал, который влияет на сенсорную киназу хлоропластов, все еще не известен.

Как указано в Allen и Pfannschmidt (2000), ПХ пул является местом фотосинтетического окислительно-восстановительного контроля экспрессии генов хлоропласта, поскольку никаких изменений в экспрессии не наблюдалось в условиях ФСII-специфического освещения в присутствии DCMU (диурона – ингибитора электронного транспорта между Q_A и Q_B) или при ФС I-специфичном освещении, в то время как изменения наблюдали в присутствии DBMIB (ингибитора окисления ПХН₂ сyt *b₆/f* комплексом) или при ФС II-предпочтительном свете. Поэтому было высказано предположение, что окислительно-восстановительное состояние ПХ пула регулирует изменения в экспрессии гена хлоропласта. Однако лежащие в основе молекулярные механизмы и сигнальные пути не понятны (Pfannschmidt и др., 2008).

Действующий на растения избыточный свет может повредить комплекс ФС II (Takahashi и Badger 2011). Фотоповреждение грозит в основном белку D1 в РЦ ФС II, но также может затрагивать и D2 белок. Kale и др. (2017) показали, что активные формы кислорода, в частности, супероксидный анион радикал, образующийся в условиях фотоингибирования, окисляет определенные аминокислотные остатки D1 и D2 белков. Наибольшую опасность для ФС II представляет синглетный кислород, который, если образуется в значительных количествах (например, при обработке фотогербицидами), зачастую приводит к необратимому фотоповреждению ФС II. После «обратимого» фотоповреждения ФС II восстанавливается путем активации цикла репарации ФС II, состоящего из несколько этапов: 1) фосфорилирование субъединиц ядра ФС II киназой STN8, разрушение и диссоциация суперкомплекса ФС II-ССК II и мономеризация димеров ФС II в гранах; 2) латеральная миграция фотоповрежденного мономера ФС II из гран в ламеллы, 3) дефосфорилирование белков ядра ФС II фосфатазой РВСП и протеолитическая деградация фотоповрежденного D1, 4) замена фотоповрежденного D1 заново синтезированным белком D1 и сборка мономера РЦ ФС II, 5) миграция новообразованного мономера ядра ФС II из ламеллы обратно в гранальную часть с последующей димеризацией и окончательной

сборкой суперкомплекса ФС II-ССК II (Zhang и др., 1999; Aro и др., 2005; Tikkanen и др., 2008; Järvi и др., 2015).

Еще один механизм акклимации растений к свету – это регуляция размера антенны ФС II. Высшие растения и морские водоросли могут увеличивать размер ССК II в тени и, наоборот, уменьшать размер ССК II при повышенной освещенности (Anderson, 1986), таким образом, оптимизируя фотосинтетическую активность и защищая фотосинтетическую электрон-транспортную цепь от фотоингибирования. Поскольку ФС II является самой нестабильной в условиях повышенной освещенности, изменение размеров антенны ФС II – один из важнейших механизмов растений для акклимации к изменениям условий окружающей среды. При повышенной освещенности, наблюдаемой в течение более трех дней, уменьшение размера ССК II происходит путем подавления биосинтеза внешних белков Lhcb, которые кодируются ядерными генами. Было показано, что протеолиз белков Lhcb запускается после первых 24 часов при ярком освещении (Želisko и др., 2005; Wagner и др., 2011). Среди белков Lhcb наблюдается значительное снижение уровней полипептидов Lhcb1, Lhcb2 и Lhcb3, которые в основном включены в тримеры L-типа и M-типа ССК II; и уровня минорного полипептида Lhcb6 (Bailey и др., 2001, Ballottari и др., 2007). Минимальная антенная единица в адаптированных к высокой освещенности высших растениях содержит Lhcb4, Lhcb5 и тримеры S-типа ССК II в дополнение к базовым антенным субъединицам ФС II (Morosinotto и др., 2006; Ballottari и др., 2007) (Рис. 10).

Было найдено, что размер антенны ФС II регулируется окислительно-восстановительным состоянием ПХ пула (Lindahl и др., 1995; Escoubas и др., 1995; Pfannschmidt и др., 1999; Yang и др., 2001). Подробный анализ был проведен с использованием *viridis zb63*, мутанта ячменя, лишённого ФС I, но с активно функционирующей ФС II (Frigerio и др., 2007). Было обнаружено, что уже при низкой интенсивности света ПХ пул был максимально восстановлен, а размер антенны ФС II уменьшен в мутантах, но не в диком типе. Таким образом, роль ПХ пула тилакоидной мембраны ограничивается не только регулированием распределения энергии между фотосистемами, т.е. процесса state transitions, но и расширяется до центральной роли в регуляции уровней экспрессии как генов, кодируемых хлоропластом, так и ядерно-кодируемых генов (Pfannschmidt и др.,

2008, Dietzel и др., 2015). Однако вопрос о природе сигнала, свидетельствующего об окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула, остается открытым.

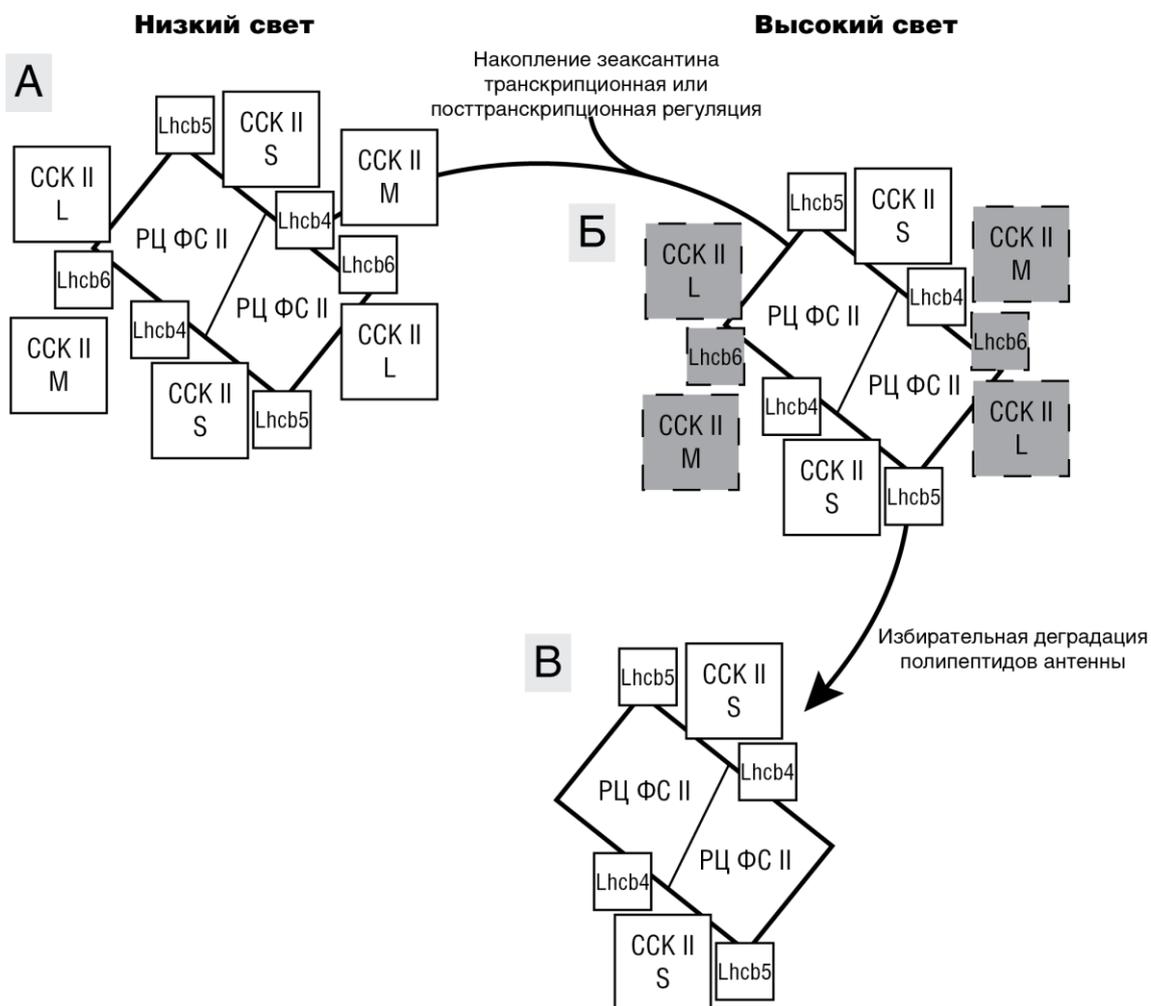


Рис. 10. Схематическая модель регуляции размера антенны фотосистемы II при повышении освещенности высших растений (рисунок из статьи Morosinotto, Bassi, 2012, модифицирован).

А – при низкой интенсивности света три основных белка ССК II Lhcb1, Lhcb2 и Lhcb3, кодируемых генами: *lhcb1*, *lhcb2* и *lhcb3*, из которых формируются гомо- и гетеротримеры S-типа (прочны связанные с РЦ), М-типа (умеренно связанные) и L-типа (слабо связанные), а также три малых мономерных белка Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) и Lhcb6 (CP24), кодируемых генами *lhcb4*, *lhcb5* и *lhcb6*, соответственно, связаны с реакционным центром фотосистемы II (РЦ ФСII). При повышении уровня освещенности запускается транскрипционная/посттранскрипционная регуляция биосинтеза белков внешней антенны ФС II (Б). Минимальная антенна ФС II в адаптированных к высокой освещенности растениях содержит Lhcb4, Lhcb5 и тримеры S-типа ССК II в дополнение к базовым антенным субъединицам ФС II (В).

1.3.2. Условия засухи

Абиотические и биотические стрессовые факторы влияют на многие физиологические параметры растений, особенно на фотосинтетическую

активность. Фотосинтетический аппарат растений представляет собой систему, функционирование которой в значительной степени подвержено воздействию таких факторов, как высокая интенсивность света, ультрафиолетовое излучение, высокая и низкая температура, засоление, засуха и др. Условия засухи – один из главных факторов, ограничивающих рост и продуктивность растений, приводя к существенным изменениям в метаболизме клеток растений (Lawlor, 2002; Zandalinas и др., 2018). В условиях засухи фотосинтез замедляется по причине как сокращения площади листа, так и уменьшения скорости фотосинтеза в расчете на площадь листа. Замедление метаболизма происходит в результате сужения устьиц, уменьшения доступности CO_2 и углеродного обмена, а также ухудшения обмена веществ в целом (Flexas и др., 2006; Chaves и др., 2009). Протекание световых фотосинтетических реакций в условиях засухи и, таким образом, снижения концентрации CO_2 в межклетниках приводит к «перевосстановлению» фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Для уменьшения негативных последствий для фотосинтеза от засухи в фотосинтетическом аппарате растений происходит увеличение теплового рассеивания поглощенной энергии и изменение активности ксантофилового и водно-водного циклов. Биохимическая эффективность фотосинтеза в условиях засухи зависит от регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата и активности рибулозобисфаткарбоксилазы/оксигеназы (Lawlor, 2002; Medrano и др., 1997). С4-фотосинтез считался главной адаптацией С3-фотосинтеза, необходимой для ограничения потери воды, сокращения фотодыхания и повышения эффективности фотосинтеза в условиях засухи (Edwards, Walker, 1983). Однако многие сельскохозяйственные растения, включая рис, гречу, соевые бобы и картофель, используют С3-фотосинтез.

Известно, что водный стресс влияет на перенос электронов по фотосинтетической электрон транспортной цепи (Zhou и др., 2007; Dalal, Tripathy, 2018). Водный стресс, как было показано, повреждает кислород-выделяющий комплекс ФС II (Toivonen, Vidaver, 1998), а также РЦ ФСII и ФСI (Ford и др., 2011; Alberte и др., 1975; He и др., 1995; Giardi и др., 1996). При повреждении РЦ ФС II образующийся P680^* (триплетное состояние хлорофилла), а также антенный хлорофилл в триплетном состоянии, генерируют синглетный кислород путем передачи энергии на молекулярный кислород, что приводит к перекисному окислению липидов тилакоидных мембран и, следовательно, повреждению

мембран (Miller и др., 2010; Chakraborty, Tripathy, 1992; Murata и др., 2012; Schmitt и др., 2014; Tripathy и др., 2007).

Условия засухи влияют на фотохимию ФС II (Lu и Zhang, 1999, Sperdoui и Moustakas, 2012) и фосфорилирование белков ФС II (Liu и др., 2009, Chen и др., 2013). При кратковременном действии засухи на растения происходят изменения в структуре ССК II, при этом димеры ФС II остаются стабильными, а их количество значительно снижается только после длительного нахождения растений в условиях засухи, при этом происходит существенное уменьшение максимального квантового выхода ФС II (Chen и др., 2016). Количество белка PsbS значительно увеличивается после длительного стресса, вызванного засухой, что согласуется со значительно увеличенным нефотохимическим тушением (Chen и др., 2016). Суперкомплексы ФС II-ССК II и сборка ССК II играют важную роль в предотвращении фотоповреждений ФС II в условиях стресса от засухи (Chen и др., 2016). Однако все еще остается много вопросов о детальных механизмах вовлечения антенны ФС II в защиту фотосинтетического аппарата ФС II в условиях засухи.

Приспособление растений к засухе включает комплексное взаимодействие гормонов, АФК, сахаров и привлечение других метаболических путей. Вычислительные модели, интегрирующие данные об экспрессии генов, физиологических и метаболических процессах, а также современные трансгенные технологии скрещивания позволяют улучшить фотосинтез, а с ним и урожайность, не только в нормальных условиях, но и в условиях засухи (Basu и др., 2016). Основные фитогормоны, такие как абсцизовая кислота (АБК), цитокинины, гибберелловая кислота (ГК), ауксин и этилен управляют процессами адаптации к засухе (Wilkinson и др., 2012). Если растение подвергается засухе, АБК синтезируется в корнях и транспортируется в листья, чтобы повысить устойчивость растения к этому стрессу через закрывание устьиц и замедление роста (Wilkinson, Davies, 2010). Однако механизмы регулирования адаптационных путей, запускаемых АБК, все еще не до конца расшифрованы (Ji и др., 2011).

Существуют АБК-сигнальные гены, которые обеспечивают высокий урожай в засуху в репродуктивной стадии (Sperotto и др., 2009; Liang и др., 2014; Chen и др., 2014; Du и др., 2010). Повышение эндогенного уровня цитокининов через экспрессию изопентенилтрансферазы необходимо для замедления старения листьев в условиях засухи и ведет к увеличению продуктивности растений (Peleg, 2011; Peleg, Blumwald, 2011). Уменьшение гетероауксина приводит к повышению

экспрессии генов, кодирующих белки позднего эмбриогенеза, что помогает растениям приспосабливаться к засухе (Xie и др., 2003; Zhang и др., 2009).

Считается, что ГК положительно влияет на адаптацию растений к засухе (Wang и др., 2008). В ответ на стресс, вызванный засухой, значительно повышается уровень экспрессии генов, кодирующих несколько мембраносвязанных белков, например, COR414-TM1 (*At1g29395*), который может служить индикатором условий засухи (Wang и др., 2011).

Этилен негативно влияет на приспособление растений: ускоряет биологическое старение, замедляет рост корней, рост листьев и побегов, подавляет фотосинтез и продуктивность (Munné-Bosch и др., 2004; Fukao и др., 2006; Perata и др., 2007; Rajala и др., 2001; Sharp и др., 2002; Yang и др., 2004). Такие гормоны, как брассиностероиды, жасмоновая кислота, салициловая кислота и стриголактон также влияют на развитие и рост растений, хотя их роль менее выражена в условиях засухи (Basu и др., 2016).

Растения в засушливых областях развили ксероморфные черты, чтобы уменьшить транспирацию. Для этого растения могут сбрасывать листья, уменьшать количество листьев, размер и количество побегов (Basu и др., 2016). Еще один адаптационный ответ – склерофиллия (жестколистность): жесткие листья менее подвержены действию засухи и легко восстанавливают функциональность в нормальных условиях (Micco, Aronne, 2002).

Некоторые другие факторы, включая стадию развития листа и доступность света, влияют на изменения в тканях мезофилла и дифференциацию хлоропласта, то есть, в итоге, на способность к фотосинтезу в условиях засухи (Tosens и др., 2012). Уменьшение размеров и количества устьиц – еще один адаптационный ответ на засуху (Xu, Zhou, 2012). Последние исследования доказали, что закрытие устьиц связано не только с изменением экспрессии аквапориновых генов, но и с изменением анатомических черт (Miyazawa и др., 2008; Tosens и др., 2012).

Во многих растениях засуха влияет прежде всего на корневую систему (Spollen, Sharp, 1991). Рост стержневых корней обычно не затрагивается засухой, однако латеральные корни растут значительно медленнее за счет подавления активности меристем латеральных корней (Deak, Malamy, 2005). Маленькие боковые корни обеспечивают впитывающую поверхность для воды, что тоже может считаться адаптивной стратегией. Специальные ткани, например, ризодерма, с утолщенными стенками или опробковевшей экзодермой, или

уменьшение количества кортикальных слоев тоже считаются адаптивной стратегией (Basu и др., 2016). Гидротропизм также помогает растениям справиться со стрессом (Chen и др., 2012; Jaffe и др., 1985). Взаимодействие ауксина, цитокининов, ГК и АБК может стать потенциальным химическим сигналом к изменению архитектурной системы корней в ответ на водный стресс (Blilou и др., 2005). Было доказано, что засуха провоцирует развитие многих анатомических черт, выраженных на разных уровнях (Henry и др., 2013; Huang, Fry, 1998; Steudle, 2000).

Увеличение клеток и рост растения зависят от доступности воды, они же помогают поддерживать тургор (Chaves, Oliveira, 2004). В условиях засухи осмотическое регулирование отвечает за устьичную проходимость, фотосинтез, объем воды в листьях и рост растений (Chaves, Oliveira, 2004; Oosterhuis, Wullschleger, 1987); при этом меняются и содержание солей в организме растений, и механическое сопротивление (Sauter и др., 2001). Известно, что сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза, трегалоза) – главные осмолитики, влияющие на осмотическое регулирование (He и др., 2015; Ge и др., 2008). Такие вещества, как пролин, глицин и бетаин помогают защитить растение от разрушающего воздействия засухи не только путем осмотического регулирования, но и детоксификацией АФК, сохранением целостности мембраны, стабилизацией ферментов и белков (Ashraf, Foolad, 2007).

1.3.3. Засоление почвы

Засоление почвы является еще одной из важнейших проблем, которая негативно влияет на продуктивность сельскохозяйственных культур. Физиологический ответ растений на засоленность почвы включает множество компонентов, которые до сих пор не до конца охарактеризованы (Isayenkov, Maathuis, 2019). В условиях засоления ухудшается рост и развитие растений из-за нехватки воды, повышается цитотоксичность из-за чрезмерного поглощения ионов и, как следствие, происходит дисбаланс в метаболизме растений. Кроме того, засоление сопровождается окислительным стрессом в результате повышенного образования АФК в клетках растений (Tsugane и др., 1999; Hernandez и др., 2001; Isayenkov, 2012).

Реакции растений на засоление были разделены на два основных этапа (Gilroy и др., 2014 ; Roy и др., 2014). Первый: ионно-независимый, происходит в

течение нескольких минут или дней, вызывает закрытие устьиц и ингибирование роста клеток, главным образом, в побеге, а также приводит к лимитированию роста растений (Munns, Passioura, 1984; Munns, Termaat, 1986; Rajendran и др., 2009). Второй этап происходит в течение нескольких дней или даже недель и связан с повышением уровня цитотоксических ионов, что замедляет метаболические процессы, вызывает преждевременное старение и, в конечном итоге, гибель клеток (Munns, Tester, 2008; Roy и др., 2014). Солевой стресс вызывает отток воды через аквапорины, что повышает внутриклеточную концентрацию ионов, инактивируя фотосинтетический аппарат (Allakhverdiev и др., 2000). Толерантность к обоим типам солевого стресса регулируется множеством физиологических и молекулярных механизмов, таких как осмотическая толерантность, ионная толерантность, тканевая толерантность и т.д. (Rajendran и др., 2009; Roy и др., 2014).

У цианобактерий различные условия солевого стресса стимулируют интенсивность дыхания (Jeanjean и др., 1993; Lu, Vonshak, 1999), при этом ухудшают скорость фотосинтеза (Vonshak и др., 1988, 1995; Zeng, Vonshak, 1998). При работе с *Synechocystis* sp. PCC 6803 было показано, что в условиях солевого стресса подавляется активность водоокисляющего комплекса ФСII (Schubert, Nagemann, 1990, Schubert и др., 1993). Тем не менее, в некоторых цианобактериях РЦ ФСII является мишенью для солевого стресса, в результате чего происходит увеличение числа Q_B-невосстанавливающих центров (Lu и др., 1999; Lu, Vonshak, 2002). Таким образом, можно заключить, что в условиях засоления происходит инактивация и водоокисляющего комплекса ФС II, и РЦ ФС II. Аллахвердиев и др. (Allakhverdiev и др., 2000) показали, что изменение соотношения K⁺/N⁺ приводит к ингибированию как ФС II, так и ФС I в клетках *Synechococcus*. Аллахвердиев и соавт. (2002) показали, что при солевом стрессе ингибируется синтез белков *de novo*, в частности синтез белка D1 ФС II.

Было показано, что при засолении изменяется ультраструктура хлоропластов высших растений: тилакоиды набухают, повреждается оболочка хлоропластов (Yamane и др., 2003), изменяется структура хлоропластов (Yamane и др., 2018), увеличивается количество и размер пластоглобул (Locu и др., 1996). Предстоит выяснить, какую роль в изменении ультраструктуры хлоропластов играют структурные изменения в антенных светособирающих комплексах ФС II.

Взаимодействие органелл, особенно хлоропластов, митохондрий и пероксисом, важно для приспособления растений к условиям стресса, в частности,

к засолению (Foyer, 2003). Так, митохондрии, пероксисомы и другие органеллы локализируются вблизи хлоропластов для более эффективного обмена метаболитами между этими органеллами (Yamane и др., 2018).

При изучении действия повышенного содержания солей на метаболизм растений обычно применяют NaCl, KCl или полиэтиленгликоль (Yeo и др., 1991; Chazen и др., 1995). Одним из признаков негативного эффекта засоления на тканевом уровне является отток K^+ из корней растений (Shabala, Cuin, 2008; Cuin и др., 2012; Wu и др., 2013). Этот отток нарушает цитозольный гомеостаз K^+ (Cuin и др., 2003), что имеет серьезные последствия для метаболизма клеток и растения в целом (например, переход к запрограммированной гибели клеток (Shabala и др., 2007, Shabala, Pottosin, 2014). Этим обуславливается корреляция между способностью растения удерживать K^+ и «солеустойчивостью» (Chen и др., 2007; Cuin и др., 2008; Smethurst и др., 2008; Wu и др., 2013). Другим ключевым фактором, определяющим толерантность к условиям засоления, является исключение Na^+ из цитозоля. Предполагается, что антипорты Na^+/H^+ стимулируют активный транспорт Na^+ из компартментов клеток (Arpe, Blumwald, 2007) либо обратно во внешнюю среду, либо в вакуоль. В последнем случае, помимо избегания накопления токсичного Na^+ в цитозоле, вакуолярная секвестрация Na^+ также способствует поддержанию тургора (Zhang и др., 2001, Yokoи и др., 2002).

1.3.4. Колонизация ризосферными бактериями

Климатические колебания и низкое плодородие почв определяют низкую урожайность и, соответственно, низкую рентабельность аграрного сектора экономики. Избежать зависимости агропроизводства от внешних условий можно путем увеличения сопротивляемости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам среды.

Одним из подходов для повышения урожайности является колонизация растений ризосферными бактериями – почвенными микроорганизмами. На сегодняшний день изменения, протекающие в фотосинтетическом аппарате при колонизации ризосферными бактериями, мало изучены. К числу наиболее значительных неспецифических изменений при биотическом стрессе, согласно Тарчевскому (2002), можно отнести следующие: 1) падение мембранного потенциала на плазмалемме; 2) усиление катаболизма липидов и биополимеров;

3) увеличение уровня содержания АФК; 4) подкисление цитозоля и активация протонных помп; 5) повышение в цитозоле содержания ионов кальция с последующей активацией кальциевых АТФаз; 6) выход из клеток ионов калия и хлора; 7) подавление биосинтеза некоторых белков; 8) усиление синтеза или синтез отсутствовавших т.н. защитных белков (хитиназ, (3-1,3-глюканаз, ингибиторов протеиназ и др.); 9) интенсификация синтеза укрепляющих клеточные стенки компонентов – лигнина, суберина, кутина и др.; 10) синтез антипатогенных (в случае атаки патогенами) нелетучих соединений – фитоалексинов, а также летучих бактерицидных и фунгицидных соединений (гексеналей, ноненалей и терпенов); 11) усиление синтеза стрессовых фитогормонов – абсцизовой, жасмоновой, салициловой кислот, этилена, а также многое другое.

В англоязычной литературе для микроорганизмов, в частности, ризосферных бактерий, способных стимулировать рост растений, увеличивать их продуктивность, устойчивость к фитопатогенам, биотическим и абиотическим факторам, принято название - «plant growth-promoting rhizobacteria» (PGRP) (Kloepper, Schroth, 1978). PGRP способны активировать механизм устойчивости растений, называемый «индуцированная системная устойчивость» (ИСУ). Индуцированная устойчивость обусловлена генотипически и активизируется под влиянием различных биотических и абиотических факторов (Van Loon et al., 1998). Активация ИСУ ризосферными бактериями схожа с индуцированной патогенными микроорганизмами системной приобретенной устойчивостью (СПУ) в том смысле, что оба типа индуцированной резистентности приводят к возникновению устойчивости даже не подвергнутых стрессу частей растения. Устойчивость развивается, в том числе, на грибковые, бактериальные и вирусные патогены, а также на нематод и насекомых (Zehnder и др., 1997; Van Loon и др., 1998; Bent, 2006; Pozo, AzconAguilar, 2007). Ризосферные бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus* являются наиболее изученными ризосферными микроорганизмами, которые запускают ИСУ (Kloepper и др., 2004; Van Wees и др., 2008).

Механизмы, с помощью которых PGRP способствуют росту и развитию растений, до сих пор широко обсуждаются, однако известно, что они отличаются для различных бактерий (Dimkra и др., 2009). В литературе показано, что ИСУ и СПУ действуют посредством отличных друг от друга сигнальных путей. Индукция СПУ осуществляется через салициловую кислоту, а для ИСУ требуется

жасмоновая кислота и этилен. Салициловую кислоту относят к обычным растительным метаболитам (Raskin, 1990), при этом накопление салициловой кислоты вне растительной клетки, в окружающей среде, способно подавлять рост микроорганизмов. Важно отметить, что развитие PGPR в прикорневой зоне растений будет напрямую зависеть от их способности частично деградировать салициловую кислоту. Выделение и накопление салициловой кислоты в прикорневой зоне будет приводить к активации в фитосимбионтах генов биосинтеза феназиновых антибиотиков (подавляют рост патогенных организмов), биосинтеза сидерофоров (конкуренция с патогенными микроорганизмами за ионы железа) и ряда других. В литературе описана способность PGRP продуцировать растительные гормоны, такие как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовую кислоту и этилен (Patten, Glick, 1996; Arkhipova и др., 2007; Perrig и др., 2007).

На данный момент в литературе имеются данные о влиянии колонизации PGRP на устойчивость растений к засухе, засолению почвы, повышению температуры, изменению содержания углекислого газа в атмосфере, присутствию в почве тяжелых металлов (для обзора см. Dimkra и др., 2009). Известно также, что при любых изменениях условий окружающей среды, таких, как уровень освещенности, температура, засуха или атака патогенами, даже когда эти изменения еще не настолько велики, чтобы вызвать у растений значительный стрессовый ответ, происходит возрастание продукции АФК (Ivanov и др., 2012). Однако до сих пор не установлено, посредством каких молекулярных механизмов активизируются генетически-запрограммированные резервы собственного организма растений при их колонизации почвенными микроорганизмами, в частности, рода *Pseudomonas*, и как эти механизмы приводят к повышенной устойчивости фотосинтетического аппарата к действию стрессовых факторов.

1.4. Сигнальная функция АФК

АФК рассматриваются в настоящее время как участники внутриклеточной и межклеточной сигнализации, играющие роль первичных и вторичных мессенджеров. Стрессовые условия, и биотические, и абиотические, приводят к увеличению продукции АФК, так называемому окислительному взрыву (Allan, Fluhr, 1997; Tenhaken, Rubel, 1998; Scheel, 2002; Huang и др., 2019).

Баланс между образованием и нейтрализацией АФК является основой для осуществления ими сигнальной функции.

Считается, что предшественниками хлоропластов были подобные цианобактериям прокариоты, которые сформировались за счет эндосимбиоза с протоэукариотами, в результате чего произошло крупномасштабное перераспределение генов от эндосимбиотического генома к ядерному геному хозяина (Bonen, Doolittle, 1975). Ядерный геном *Arabidopsis thaliana* кодирует около 90% хлоропластных генов (Abdallah и др., 2000; Martin и др., 2002). Только 10% генов, кодирующих хлоропластные белки, осталось в геноме хлоропласта (Sugiura, 1992), что составляет примерно 110–120 генов. Предложена гипотеза, что хлоропластный геном сохранил контроль над теми компонентами фотосинтетического аппарата, от которых зависит скорость фотосинтетического электронного транспорта и количество которых должно максимально быстро изменяться в ответ на изменение условий среды (Allen и др., 2011). Однако хлоропласты сохранили контроль над экспрессией ядерных генов, кодирующих хлоропластные белки, за счет так называемой ретроградной передачи сигналов от хлоропласта к ядру (Beck, 2005; Chan и др., 2010; Mullineaux, Karpinski, 2002; Taylor, 1989). Ретроградные сигналы подразделяют на две группы в зависимости от стадии биогенеза хлоропластов (для обзора см. Юрина, Одинцова, 2019). Первая группа – биогенные сигналы – регулирует ранние стадии биогенеза хлоропластов и сборки фотосистем, когда проростки переходят от гетеротрофного роста к фотоавтотрофному. Примером биогенных сигналов может служить GUN1 белок. Для таких исследований используют «genome uncoupled» (gun) мутантные растения *Arabidopsis thaliana* с нарушенной передачей пластидных сигналов (для обзора см. Юрина, Одинцова, 2007). Существуют данные о том, что GUN1 может участвовать как в возникновении многочисленных пластидных сигналов, так и в их интеграции, включая сигналы, связанные с тетрапирролами, сахарами, экспрессией генов пластид, фотосинтетической ЭТЦ и редокс-состоянием пластид. Мутант *gun1* более чувствителен к абсцизовой кислоте, чем растения дикого типа, и предположительно участвует в АВА-сигналинге (Zhang и др., 2015). Вторая группа – операционные сигналы – функционирует в зрелых растениях, в полностью развитых хлоропластах и вовлечены в регуляцию экспрессии ядерных генов, ответственных за индукцию ответных реакций на стресс. Метаболиты хлоропластов, такие как метилэритрол-циклодифосфат, являются примером операционных сигналов. В отдельную группу иногда

выделяют деградиционные сигналы, которые “управляют” распадом пластид в процессе их старения и индуцируют гибель клеток.

Прежде всего, хлоропласты «информируют» ядро и цитоплазматические системы об окислительно-восстановительном состоянии ФЭТЦ, которое отражает все процессы сопряжения ее функционирования с метаболизмом хлоропластов. В последнее время обнаружено, что кроме вышеперечисленных пластидных сигналов, в регуляции экспрессии генов в ретроградном сигналинге участвуют оксид азота, жирные кислоты, Ca^{2+} -зависимые пути, гормоны, транскрипционные факторы, а также метаболиты хлоропластов, такие как фосфоаденозин-5-фосфат и β -циклоцитраль (Юрина, Одинцова, 2019). При этом АФК, как предполагается, играют важную роль в осуществлении такой передачи сигналов в стрессовых условиях (Desikan и др., 2001; Vandenabeele и др., 2003; Apel, Hirt, 2004).

Уровень продукции АФК влияет на экспрессию генов, кодирующих многие антиоксидантные ферменты и ферменты биосинтеза низкомолекулярных антиоксидантов (Mittler и др., 2004; Gadjev и др., 2006; Galvez-Valdivieso, Mullineaux, 2010). Имеются данные о том, что АФК, образующиеся в хлоропластах, – и синглетный кислород, и супероксидный радикал, и пероксид водорода – играют роль внутриклеточных сигнальных молекул (Apel, Hirt, 2004). Обнаружены гены, экспрессия которых изменяется при возрастании продукции тех или иных АФК, однако до сих пор ведутся дискуссии об их специфичности. Обнаружено, что гены, экспрессия которых изменяется в ответ на повышение продукции $^1\text{O}_2$, отличаются от генов, чувствительных к $\text{O}_2^{\cdot-}$ или H_2O_2 , что может указывать на существование разных путей передачи сигналов разными АФК (Laloi и др., 2006; op den Camp и др., 2003).

Специфичность в сигнальных путях достигается за счет нековалентного связывания лиганда с узнающим его рецептором через комплементарность взаимодействующих поверхностей макромолекул. АФК проводят сигналы за счет химических реакций со специфичными атомами белков-мишеней, такими как железо или сера, которые могут вести к модификациям белков (Nathan, 2003). АФК также могут реагировать с различными белками-мишенями в любых случаях, когда реакция возможна. Остается вопрос, насколько специфична передача сигналов от АФК? Ответ может быть получен, если посмотреть на химические характеристики и биологическую активность каждой из АФК, включая $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , гидроксильный радикал (HO^{\cdot}) и синглетный кислород ($^1\text{O}_2$).

$O_2^{\bullet -}$ – продукт одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода компонентами фотосинтетической и дыхательной ЭТЦ, НАДФН оксидазами и пероксидазами клеточной стенки. Супероксидный анион радикал очень быстро трансформируется в пероксид водорода, поэтому данных о сигнальной роли $O_2^{\bullet -}$ к настоящему времени накоплено мало. В *Escherichia coli* равновесная концентрация $O_2^{\bullet -}$ очень низка $\sim 10^{-11}$ М (Halliwell, Gutteridge, 1999), что отражает его нестабильность; это происходит прежде всего за счет спонтанного и СОД-зависимого диспропорционирования $O_2^{\bullet -}$ в H_2O_2 . Данные о сигнальной роли $O_2^{\bullet -}$ были получены путем анализа генной экспрессии с помощью ДНК-микрочипов, и было обнаружено, что некоторые гены активировались только $O_2^{\bullet -}$, но не другими АФК (Scarpeci и др., 2008). В мутантах по CuZn-супероксиддисмутазе накопление $O_2^{\bullet -}$ приводило к активации нескольких хлоропластных генов, которые не активировались под воздействием других АФК (Rizhsky и др., 2003). Специфическая генерация $O_2^{\bullet -}$ без накопления H_2O_2 также позволила выявить набор ядерных генов, которые связаны только с путем регуляции, включающим $O_2^{\bullet -}$ (Scarpeci и др., 2008). Нестабильность $O_2^{\bullet -}$ делает эту АФК довольно слабой сигнальной молекулой, однако $O_2^{\bullet -}$ способен окислять Fe–S кластеры со скоростью, которая практически лимитируется диффузией (Storz и др., 1990; Storz, Imlay, 1999).

1O_2 – молекула кислорода в возбужденном состоянии. Время полужизни 1O_2 в биологических объектах очень короткое, и молекула может перемещаться только на очень незначительные дистанции, менее 100 нм (Moan, 1990; Niedre и др., 2002) вследствие того, что она реагирует мгновенно с аминокислотами, ненасыщенными липидами и другими клеточными компонентами. Известны две формы синглетного кислорода: $^1Zg^+O_2$ с энергией 37 ккал/моль и $^1\Delta gO_2$ с энергией 23 ккал/моль; в первом случае два электрона с противоположными спинами расположены на разных орбиталях, а во втором – на одной. Форма $^1Zg^+O_2$ нестабильна и быстро (10^{11} с $^{-1}$) превращается в форму $^1\Delta gO_2$. Таким образом, даже если форма $^1Zg^+O_2$ и образуется, в реакциях, протекающих в биологических системах, участвует форма $^1\Delta gO_2$. Оценки времени полужизни 1O_2 в клетке варьируют от 0,1 мкс (Matheson и др., 1975) до 3 мкс (Hatz и др., 2007). В различных компартментах клетки время жизни может быть различно; в липидной фазе мембраны может достигать 7 мкс (Matheson и др., 1975). Таким образом, 1O_2 может реагировать только с молекулами, находящимися на близкой дистанции от места его образования (Kochevar, 2004; Triantaphylidès, Navaux, 2009). При

исследовании *flu* мутанта с нарушенным биосинтезом Хл было показано, что $^1\text{O}_2$ является необходимым участником сигнальных путей, которые важны не только для запуска ответных реакций на стрессовые условия, но и для роста и развития растений (Вагуах и др., 2009). В связи с тем, что $^1\text{O}_2$ отличается коротким временем жизни и высокой реакционной способностью, сигнальный путь, инициированный им, требует вовлечения других сигнальных компонентов, таких как, например, белки Executer 1 and Executer 2 (Lee и др., 2007). Роль Executer 2 заключается в регуляции активности Executer 1, который, в свою очередь, вовлечен в процессы перекисного окисления липидов (Przybyla и др., 2008). Скорее всего липидные пероксиды, образовавшиеся под действием $^1\text{O}_2$, а также их производные, могут представлять собой сигнальные агенты, которые посредством белков Executors участвуют в ретроградной передаче сигнала, инициированного $^1\text{O}_2$ (Galvez-Valdivieso, Mullineaux, 2010) (Рис. 11). Синглетный кислород запускает сигнальные пути уже при очень низкой концентрации, в то время как высокая концентрация $^1\text{O}_2$ приводит к программируемой гибели клетки (Laloi, Navaux 2015). Существуют предположения, что жасмонат и другие оксипирины могут участвовать в механизмах регуляции, определяющих выбор между акклимацией и гибелью клетки в ответ на сигнал $^1\text{O}_2$ (Dapon и др., 2005, Ramel и др., 2013; Cuadrado, Nebreda, 2010; Raman и др., 2007).

HO^\bullet – самая токсичная из АФК. HO^\bullet образуется в клетках, в основном, из молекул H_2O_2 при их распаде, катализируемом ионами металлов в восстановленном состоянии. Реакция, в которой восстановителем выступают ионы двухвалентного железа, носит название реакции Фентона. Распад H_2O_2 также катализируют ионы Cu^{+1} , которые окисляются до Cu^{+2} . HO^\bullet обладает неспецифической химической активностью, которая лимитируется лишь диффузией из сайтов образования (время полужизни равно 10^{-9} с; Halliwell, Gutteridge, 1999). Данные о сигнальной роли HO^\bullet практически отсутствуют, скорее всего накопление HO^\bullet связано с деструктивными процессами.

H_2O_2 – слабый оксидант и слабо реагирует с Fe-S кластерами (константа скорости 10^2 – $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). H_2O_2 относительно стабилен (время полужизни в клетках составляет приблизительно 1 мс, равновесный уровень приблизительно равен 10^{-7} M (D'Autreaux, Toledano, 2007) и может диффундировать через биологические мембраны, поскольку не заряжен. Селективная химическая активность, стабильность и способность к диффузии делают H_2O_2 наиболее подходящей сигнальной молекулой. Как вторичный мессенджер H_2O_2 может

опосредовать внутриклеточную передачу сигналов через селективное окисление цистеиновых остатков сигнальных белков, таких как глутатион, тиоредоксины, пероксиредоксины (Paulsen, Carroll, 2010). H_2O_2 может окислять тиоредоксин (Tr) в строме хлоропласта (Рис. 11), приводя к изменению Tr-опосредованного сигнального пути. Известно, что Tr необходим для развития хлоропластов, и тиоредоксины участвуют в регуляции экспрессии генов пластид (Hofmann, 2010; Yoshida, Hisabori, 2016). Передача сигнала в этом случае, как показано, инициируется окислением цистеиновых остатков Tr молекулами H_2O_2 (Netto, Antunes, 2016).

H_2O_2 является наиболее важной сигнальной молекулой среди АФК (Foyer, Noctor, 2009; Li и др., 2009; Mullineaux, 2009; Suzuki и др., 2011; Shigeoka, Maruta, 2014; Farooq и др., 2019; Shao и др., 2008; De Pinto и др., 2012). Существенным фактором для передачи ретроградного сигнала с участием H_2O_2 является, возможно, то, что молекула H_2O_2 реагирует только с ограниченным классом соединений. Молекула H_2O_2 вследствие высокой величины рК ионизации, не несет при нейтральных значениях рН электрического заряда и, таким образом, при диффузии через биологические мембраны не претерпевает влияния трансмембранных ионных и электрических градиентов, что обеспечивает вероятность диффузии H_2O_2 на относительно большое расстояние от места образования.

Было показано, что H_2O_2 , образуемый в различных внутриклеточных сайтах, вызывает различные ответы. H_2O_2 , образованный в хлоропластах, как было обнаружено, активирует ранние ответы, включая транскрипционные факторы и биосинтетические гены, вовлеченные в образование вторичных сигнальных мессенджеров; в то время как H_2O_2 , образованный в пероксисомах, индуцирует транскрипты, участвующие в белковой репарации (Sewelam и др., 2014). Диффузия H_2O_2 через мембраны осуществляется, предположительно, с помощью аквапоринов – интегральных мембранных белков, формирующих каналы для небольших по размеру нейтральных молекул (Henzler, Steudle, 2000; Bienert и др., 2007), что позволяет объяснить способность хлоропластной H_2O_2 инициировать киназный сигнальный путь в цитоплазме (для обзора см. Полесская, 2007).

Один из основных механизмов участия H_2O_2 в передаче сигнала – инициирование МАПК (Mitogen Activated Protein Kinase) сигнального пути (Pitzchke и др., 2006; Sewelam и др., 2016). МАП-киназы (митоген-активируемые

протеинкиназы; митогены – вещества, стимулирующие митоз) – эволюционно консервативные ферменты. В эукариотах сигнальные пути, регулируемые МАП-киназами, считаются общими механизмами передачи сигналов, которые соединяют разные рецепторы с их клеточными и ядерными мишенями (Тена, 2001). МАП-киназы включают в себя три функционально связанные протеинкиназы: МАПККК, МАПКК и МАПК (Rodriguez и др., 2010; Sinha и др., 2011). МАПККК фосфорилирует и активирует МАПКК, которая, в свою очередь, фосфорилирует и активирует МАПК за счет фосфорилирования остатков тирозина и треонина (Qi, Elion, 2005). В геноме *Arabidopsis thaliana* были идентифицированы 20 генов, кодирующих МАПК, 10 – МАПКК и 60 МАПККК (Ichimura, 2002). Функциональный анализ МАП-киназных каскадов, прежде всего в *Arabidopsis thaliana*, показал, что у растений всего 24 МАПК-зависимых путей, лишь малая часть которых исследована в настоящий момент (Wrzaczek, Hirt, 2001; Ray и др., 2012;).

Некоторые компоненты МАП-киназных каскадов активируются холодом, засухой, пероксидом водорода, ранением, патогенами, повреждениями, абсцизовой и салициловой кислотами и этиленом (см. обзор Bowler, Fluhr, 2000). С одной стороны, МАП-киназы могут активироваться при накоплении H_2O_2 , с другой стороны, они могут запускать H_2O_2 -индуцированный окислительный взрыв (Pitzschke и др., 2009; Petrov, Van Breusegem, 2012). Фосфорилирование белков через МАП-киназные каскады, как было предложено, служат триггерами положительной обратной регуляции Ca^{2+} и АФК в *Arabidopsis thaliana* (Kimura и др., 2012). МАПК кукурузы, MAP65-1a, увеличивает активность антиоксидантных ферментов СОД и аскорбатпероксидазы через brassinosteroidный сигнальный путь (Zhu и др., 2013).

Воздействие таких сигнальных агентов, как H_2O_2 , МАПК и Тр, на некоторые факторы транскрипции, вероятно, может происходить и в цитоплазме, т.е. до того, как эти факторы транспортируются в ядро (Рис. 11). Изменение активности факторов транскрипции в этом случае происходит также через цистеиновые остатки в ДНК-связывающих доменах этих факторов (Тарчевский, 2002). Было показано, что молекулы H_2O_2 способны окислять фактор элонгации трансляции, блокируя, таким образом, трансляцию новых белков (Nishiyama и др., 2011).

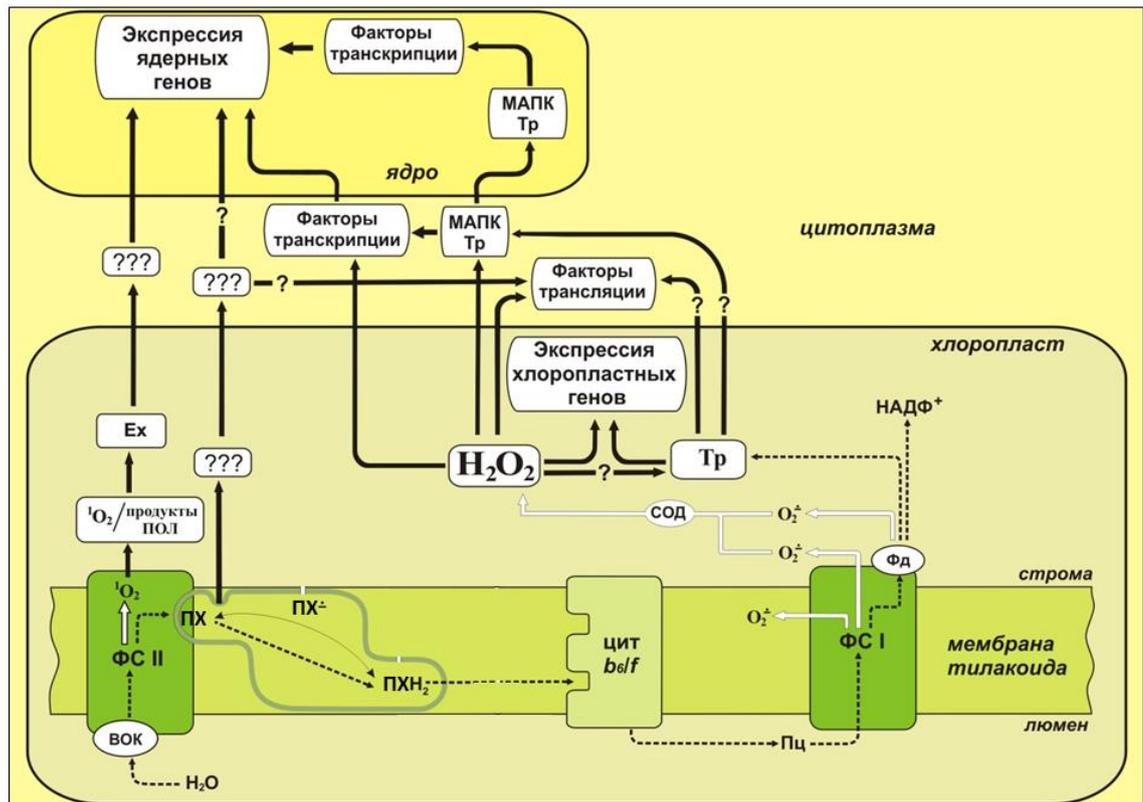


Рис. 11. Схема путей образования АФК в хлоропластах и путей передачи сигналов с участием АФК.

ВОК – водоокисляющий комплекс; ФС II и ФС I – фотосистема II и фотосистема I, соответственно; цит b_6/f – цитохромный b_6/f комплекс; ПХ, ПХ $^{\bullet-}$ и ПХН $_2$ – пластохинон, пластосемихинон и пластогидрохинон, соответственно; Пц – пластоцианин; Фд – ферредоксин; СОД – супероксиддисмутаза; продукты ПОЛ – продукты перекисного окисления липидов; Ех – Executor; Тр – тиоредоксин; МАПК – протеинкиназы, активированные митогеном. Штриховыми стрелками показан линейный перенос электронов по ФЭТЦ; белыми стрелками – образование АФК в ФЭТЦ; черными стрелками – пути передачи ретроградного сигнала; двусторонняя стрелка в виде дуги между ПХ и ПХН $_2$ означает реакцию конпропорционирования между этими компонентами с образованием ПХ $^{\bullet-}$.

Согласно общепринятой точке зрения, при вызываемом стрессовыми условиями окислительном стрессе образование АФК увеличивается за счет изменений окислительно-восстановительных процессов, связанных с фотосинтезом. Даже в оптимальных условиях АФК могут образовываться на значительном уровне внутри клетки (Foyer, Noctor, 2003). В условиях стресса продукция H_2O_2 , наиболее стабильной из основных АФК, увеличивается не только в хлоропластах, но и в пероксисомах (Noctor и др., 2002), и в митохондриях (Noctor и др., 2014). Продукция H_2O_2 в пероксисомах в зеленых тканях С3-растений происходит в результате активности гликолатоксидазы. Этот

фермент является важным компонентом циклического пути фотодыхания, которое начинается с окисления рибулозо-1,5-бисфосфата (RuBP) в хлоропластах (Foyer и др., 2009). Считается, что образование гликолата усиливается во время засухи и засоления, поскольку внутриклеточная концентрация углекислоты падает в результате закрытия устьиц, вызываемого этими условиями. Это говорит в пользу окисления RuBP (Cornic, Briantais, 1991) и последующего увеличения продукции H_2O_2 в пероксисомах.

В хлоропластах ограничение на потребление АТФ во время стрессовых условий может также усиливать продукцию АФК в двух различных сайтах. Во-первых, сниженная доступность акцепторов для цепи может способствовать оттоку электронов к кислороду в реакции Мелера, стимулируя продукцию $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 и усиливая водно-водный цикл (Asada, 2006; Иванов и др., 2012). Во-вторых, любое перевосстановление ФЭТЦ увеличит вероятность образования синглетного кислорода в ФС II (Fischer и др., 2013; Hossain и др., 2017). Усиленный водно-водный цикл, также, как и повышенное фотодыхание, несут функцию диссипации энергии, поскольку «поглощает» электроны и, таким образом, окисляет ФЭТЦ (Osmond, Grace, 1995; Foyer и др., 2012), уменьшая продукцию $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в ФЭТЦ и в пероксисомах, а также снижает вероятность образования синглетного кислорода в ФС II.

Рост фотодыхания может усиливать нагрузку на ЭТЦ митохондрий, связанную с повышенным образованием глицина, что стимулирует рост митохондриальных АФК на свету. Интересно, что глицин-декарбоксилазный комплекс может подвергаться окислительной инактивации и является мишенью для редокс-зависимых посттрансляционных модификаций, включая S-глутатионилирование и S-нитрозилирование нескольких цистеиновых остатков (Taylor и др., 2002; Palmieri и др., 2010), хотя физиологический вклад этих модификаций до сих пор неясен.

Специфические НАДФН-оксидазы могут играть исключительную сигнальную роль в регуляции устьиц в ответ на стресс-индуцированные гормоны, например, АБК (Kwak и др., 2003). Повышенное внимание сейчас уделяется центральной роли НАДФН-оксидаз в стресс-индуцированном системном сигналинге, включающем быстрые волны образования АФК на поверхности клеток (Miller и др., 2009; Steinhorst, Kudla, 2013). Однако пока неясно, взаимодействует ли системный межклеточный сигналинг с АФК-зависимыми процессами на локальном внутриклеточном уровне, и если да, то как?

Повышенная концентрация H_2O_2 в стрессовых условиях в пространстве апопласта и эндомембранных везикулах также стимулирует АБК-зависимый устьичный ответ (Leshem и др., 2007). АФК, инициируемые *AtRBOHC* (respiratory burst oxidase homologue: RBOH), стабилизируют мРНК Salt Overly Sensitive 1 (SOS1), Na^+/H^+ -антипортер плазматической мембраны, при NaCl-стрессе. Действительно SOS1 значительно реагирует на солевой стресс, но не на индуцированный метилвиологеном окислительный стресс. RBOHC связывает гомеостаз Na^+ , АФК и сигналинг, опосредованный Ca^{2+} (Chung и др., 2008). Структура белка RBOH характеризуется наличием мотива EF-ладони (EF-hand) для связывания Ca^{2+} , который представляет собой мишень для фосфорилирования, регулируемого МАПК-киназами, АФК и Ca^{2+} (Kurusu и др., 2015). Ca^{2+} и H_2O_2 практически всегда функционируют совместно в качестве вторичных мессенджеров в сигнальных путях (Hu и др., 2016). Существуют свидетельства в пользу того, что метаболизм Ca^{2+} регулируется как интенсивностью света, «соленостью» и водным снабжением, так и тепловым и холодным стрессами.

В стрессовых условиях происходит увеличение активности антиоксидантных ферментов, в т.ч. СОД, каталазы и аскорбатпероксидазы, подавляющих избыточное накопление АФК и поддерживающих гомеостаз АФК. Это подтверждается увеличением количества мРНК различных аскорбатпероксидаз (*tAPX*, *APX1*, *APX2*, *APX4-like*, *APX6-like*, *SIAPX3*) в стрессочувствительных растениях, по сравнению с сохранением стабильного уровня этих транскриптов в устойчивых растениях. Регуляторные механизмы передачи сигнала, включающие Ca^{2+} , H_2O_2 и антиоксидантные ферменты, до сих пор полностью не охарактеризованы, ряд данных указывает на взаимодействие множественных путей передачи сигнала.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Растительный материал

10–14 дневные растения гороха посевного (*Pisum sativum*), выращенные в оранжерее, t 19–24°C, интенсивность света выращивания растений – 90 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$.

10–14 дневные растения ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*), выращенные в климатической камере, t 19–21°C, интенсивность света выращивания – 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, светопериод 8/16 часов (день/ночь) или постоянное освещение.

1.5–2 месячные растения резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) экотип Columbia, выращенные в климатической камере, t 19–21°C, интенсивность света выращивания – 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, светопериод 8/16 часов (день/ночь).

Листья шпината огородного (*Spinacia oleracea L.*) были куплены в магазине.

2.2. Выделение тилакоидов из листьев гороха и шпината

Тилакоиды выделяли из 10–14 дневных проростков гороха из листьев двух верхних ярусов. При работе с листьями шпината удаляли центральную жилку листовой пластинки. Листья гомогенизировали 7–9 сек в 100 мл среды выделения. Состав среды выделения: 0.4 М сахараза, 25 мМ Нерес-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Перед выделением добавляли в среду 5 мМ аскорбат натрия и 0.1 % бычий сывороточный альбумин. Гомогенат фильтровали через 2 слоя нейлоновой ткани и центрифугировали 1 минуту 6000 об. мин⁻¹ при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в среде шокирования (среда без сахаразы), выдерживали 2 минуты для разрушения оболочек хлоропластов. Затем добавляли среду, содержащую 0.2 М сахаразу, 25 мМ Нерес-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и центрифугировали 3.5 минуты при 3500 об. мин⁻¹. Осадок промывали в среде промывки (0.4 М сахараза, 25 мМ Нерес-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂) и центрифугировали 3 минуты при 3000 об. мин⁻¹. Данную процедуру повторяли дважды. Осадок ресуспендировали в среде промывки. Тилакоиды хранили в темноте при 2–4°C.

2.3. Выделение тилакоидов из листьев ячменя

Выделение тилакоидов проводили согласно Bassi и др. (1985). Листья гомогенизировали в среде T1, содержащей 0.1 М Трицин/КОН pH 7.8, 0.4 М сорбитол, 0.5% сухое молоко, 0.2 мМ бензамидин, 1мМ аминокaproновую кислоту, 0.2 мМ PMSF. Гомогенат фильтровали через два слоя нейлоновой ткани и затем центрифугировали 15 минут при 1500 g при 4°C. Супернатант отбрасывали, осадок, содержащий хлоропласты, ресуспендировали в среде T2. Состав среды T2: 25 мМ Hepes/КОН pH 7.5, 10 мМ ЭДТА. В среде T2 происходило разрушение мембран хлоропластов. Полученную смесь, содержащую тилакоиды, центрифугировали 10 минут при 10000 g. Осадки ресуспендировали в T3 среде, содержащей 50% глицерин, 10 мМ Hepes/КОН pH 7.5, 1 мМ ЭДТА. В среде T3 тилакоиды хранили с добавлением 10% глицерина при температуре –80°C до проведения анализа.

2.4. Выделение тилакоидов из листьев арабидопсиса

Тилакоиды выделяли из листьев арабидопсиса согласно Ignatova и др. (2011). Листья гомогенизировали в среде выделения: 35 мМ K₂HPO₄, 15 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ MgSO₄, 10 мМ KCl, 0.4 М сахароза, 20 мМ аскорбат натрия, 2мМ ЭДТА. Полученный гомогенат фильтровали через 2 слоя нейлоновой ткани и осаждали при 3400g 6 минут. Осадок ресуспендировали в среде шокирования (без сахарозы), инкубировали 20 минут при температуре 0°C и центрифугировали 1.5 минут при 120 g, полученный осадок отбрасывали. Из супернатанта осаждали тилакоиды путем центрифугирования при 3400 g 6 минут, осадки ресуспендировали в среде суспендирования: 0.4 М сахароза, 2 мМ аскорбат натрия, 0,5 мМ ЭДТА. Добавляли 10% глицерин и хранили при температуре – 80°C до проведения анализа.

2.5. Выделение хлоропластов из листьев шпината

Хлоропласты выделяли из листьев шпината согласно Laasch (1987) с последующим центрифугированием в ступенчатом градиенте Перколла (Градиент 40–80%), как описано Mullet, Chua (1983) с некоторыми модификациями. Среда для 40% перколла содержала 3.33 мМ ЭДТА, 1.66 мМ MgCl₂, 83.3 мМ HEPES (pH 7.6) и 0.55 М сорбитол. Среда для 80% перколла содержала 10 мМ ЭДТА, 5 мМ

MgCl₂, 250 мМ HEPES (pH 7.6) и 1.65 М сорбитол. Две зеленые полосы были отделены после центрифугирования в градиенте перколла. Только средняя часть нижней полосы, которая соответствует неповрежденным хлоропластам, была использована. Хлоропласты были промыты в среде суспендирования без перколла.

2.6. Определение концентрации хлорофилла

Содержание хлорофилла определяли в 96% этаноле (Lichtenthaler, 1987). Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре при длинах волн 664.2 и 648.6 нм. Концентрацию хлорофилла определяли согласно уравнениям, представленным в Lichtenthaler (1987):

$$C_{a+b} = (5.24 \times A_{664.2} + 22.24 \times A_{648.6})$$

$$C_a = 13.36 \times A_{664.2} - 5.19 \times A_{648.6}$$

$$C_b = 27.43 \times A_{648.6} - 8.12 \times A_{664.2}$$

где C_{a+b} – общее содержание хлорофилла a и b , A – оптическая плотность при соответствующей длине волны, l – длина оптического пути.

2.7. Выделение протопластов из листьев арабидопсиса

Листья арабидопсиса 8–10-недельных растений промывали водой и помещали в раствор, содержащий 0.7 М сорбитол, 5 мМ CaCl₂, 5 мМ MES (pH 5.5) и поливинилпирролидон (PVP) 5 мг мл⁻¹. Листья (погруженные в среду) нарезали лезвием на кусочки шириной 1 мм, промывали, убирали остатки среды фильтровальной бумагой и помещали в среду мацерации (5 мл), содержащую дополнительно 1% целлюлазу и 0.1% Мацерозим R10 на 2 часа при освещении светом низкой интенсивности (65 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹). Затем среда мацерации была аккуратно удалена и замещена средой, содержащей 0.7 М сорбитол, 5 мМ CaCl₂ и 5 мМ MES (pH 5.5). Кусочки листьев аккуратно трясли, чтобы освободить протопласты в среду. Суспензию фильтровали через нейлоновую ткань и центрифугировали при 30 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в небольшом количестве среды (0.5–1 мл). Все манипуляции проводили при комнатной температуре.

2.8. Определение фотосинтетической активности хлоропластов и тилакоидов

Скорость фотосинтетического выделения/поглощения кислорода измеряли в термостатируемой стеклянной ячейке объемом 0.25 мл при 21°C с помощью рО₂-электрода кларковского типа, соединенного с компьютером через аналого-цифровой интерфейс. Для расчетов использовали программу Power Graph. При работе с тилакоидами среда реакции содержала 0.4 М сахарозу, 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ HEPES-KOH (для pH 7.6), 50 мМ MES-KOH (для pH 6.5), 50 мМ Mes-KOH/Glycine (для pH 5.0). Реакционную смесь освещали красным светодиодом ($\lambda > 660$ нм) или белым светом, интенсивность света регулировали с помощью нейтральных светофильтров. Измерение интенсивности света проводили с помощью прибора LI - 250 Quantum Sensor.

Для оценки степени интактности хлоропласты были шокированы в течение 45 сек помещением в среду шокирования: 5 мМ MgCl₂ и 25 мМ HEPES (pH 7.6). 10 мМ NH₄Cl был добавлен в качестве разбавителя. 1 мМ K₃[Fe(CN)₆] добавляли в качестве акцептора электронов. Процент интактности хлоропластов составил 100% в соответствии с тестом восстановления феррицианида (Heber, Сантариус, 1970), основанный на соотношении выделения O₂ суспензией хлоропластов при освещении неповрежденных или осмотически шокированных хлоропластов. При работе с неповрежденными хлоропластами не было зарегистрировано выделения кислорода в присутствии 1 мМ K₃[Fe(CN)₆], наоборот, наблюдали очень незначительное поглощение кислорода, что свидетельствовало об отсутствии разрушенных хлоропластов в суспензии. Скорость фотосинтетического выделения кислорода в шокированных хлоропластах в присутствии 1 мМ K₃[Fe(CN)₆] составляла 263±32 мкмоль O₂ (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹. Скорость выделения кислорода в неповрежденных интактных хлоропластах в присутствии 0.5 мМ 3-фосфоглицерат и 4 мМ NaHCO₃ составляла 67±12 O₂ (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹. Реакционную смесь освещали белым светом.

2.9. Измерение флуоресценции хлорофилла *a* листьев

Флуоресценцию хлорофилла *a* листьев или суспензий тилакоидов измеряли, используя ПАМ-флуориметр PAM-101 (Walz, Германия), анализ данных проводили с помощью программы WinControl. Для работы с суспензией использовали специальную Walz-ячейку. Относительный уровень восстановления ПХ пула на свету оценивали по формуле $1 - qP$, где $qP = (F_M' - F_S) / (F_M' - F_0')$

(Tullberg и др., 2000) и $1 - qL$, где $qL = qP \times (F_0' / F_S)$ (Kramer и др., 2004); F_M – максимальный выход флуоресценции в ответ на подачу вспышки насыщающего света (8000 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, 0.8 сек) адаптированного к темноте объекта; F_S – стационарный выход флуоресценции при освещении; F_M' – максимальный выход флуоресценции в ответ на подачу вспышки насыщающего света во время освещения; F_0' – минимальный выход флуоресценции после прекращения освещения.

2.10. Измерение индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II высокого разрешения, JIP-тест

Оценку окислительно-восстановительного состояния ПХ пула осуществляли также с помощью измерения индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II высокого разрешения (ОJIP) при освещении листьев или суспензий тилакоидов в течение 1 секунды светом интенсивностью 3000 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (Tóth и др., 2017; Kalaji и др., 2014), используя флуориметр Handy PEA («Hansatech Instruments», Великобритания), путем оценки параметра $S_M = area / (F_M - F_0)$ – нормированная площадь над индукционной кривой, отражающая емкость пула электронных акцепторов до полного восстановления Q_A , где $area$ – площадь над индукционной кривой флуоресценции. Кроме того, с помощью измерения ОJIP индукционных кривых в листьях оценивали следующие параметры JIP-теста (Strasser 2004): F_M – максимальный выход флуоресценции в ответ на подачу вспышки насыщающего света (3000 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, 1 сек); F_0 – минимальный выход флуоресценции; $ABS/RC = (M_0/V_J)(F_V / F_M)$ – поток энергии, поглощаемой одним активным реакционным центром, отражает соотношение между количеством молекул хлорофилла *a*, излучающих флуоресценцию в антенных комплексах (ABS) и в активных реакционных центрах (RC), т.е. эффективный размер антенны ФС II, где M_0 – начальный наклон фазы O-J роста флуоресценции (отражает скорость закрывания реакционных центров ФС II); $V_J = (F_J - F_0)/F_V$ – относительная амплитуда O-J фазы (отражает количество реакционных центров, которые закрываются при подаче вспышки насыщающего света, по отношению к общему числу реакционных центров), $F_V = F_T - F_0$ – переменная флуоресценция в момент времени t ; $PI_{ABS} = (RC/ABS)(\varphi_{P_0}/(1-\varphi_{P_0}))(\psi_0/(1-\psi_0))$ – показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощенной энергии, где φ_{P_0} – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакций (при $t = 0$), который

указывает на вероятность захвата энергии реакционными центрами ФС II, ψ_0 – вероятность транспорта электронов за пределы Q_A^- (при $t = 0$).

2.11. Измерение скорости восстановления цитохрома *c* в суспензии тилакоидов

Восстановление цитохрома *c* в суспензии тилакоидов измеряли по увеличению поглощения при длине волны 550 нм по сравнению с 540 нм. Использовали двухволновой спектрофотометр (Hitachi 557, Япония). Фотоумножитель от действующего света экранировали с помощью светофильтра СЗС-22. Коэффициент молярной экстинкции цитохрома *c* $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Davis, San Pietro, 1977). $O_2^{\bullet-}$ -зависимая скорость восстановления цитохрома *c* была рассчитана как разница между скоростью восстановления цитохрома *c* в отсутствие и присутствии СОД, поскольку цитохром *c* восстанавливается не только $O_2^{\bullet-}$, но и компонентами ФЭТЦ. Освещали тилакоиды с помощью галогеновой лампы, используя красный светофильтр ($\lambda > 620 \text{ nm}$). Среда реакции содержала: 0.4 М сахарозу, 25 мМ Нерес-КОН (рН 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$ и тилакоиды (концентрация Хл 10 мкг мл^{-1}).

2.12. Измерение содержания H_2O_2 в листьях

Измерение количества H_2O_2 , основанное на перекисном окислении люминола, проводили согласно (Cormier, Prichard, 1968), используя хемилюминометр Lum-100. Каждый лист замораживали в жидком азоте, помещали в 0.4 мкл 2 М трихлоруксусной кислоты и гомогенизировали. Экстракцию H_2O_2 проводили с помощью 3 мл 0.05 М К-фосфатного буфера (рН 8.5). Для удаления пигментов суспензию инкубировали в течение 1 часа с активированным углем (250 мг). Полученную смесь центрифугировали 20 минут $10\,000 \text{ g}$. Супернатант отбирали и титровали с помощью 2 М КОН до рН 8.5. Для определения содержания H_2O_2 использовали 50 мкл полученного экстракта, к которому с помощью дозатора вносили 1 мл смеси люминола ($2.26 \times 10^{-4} \text{ M}$) и пероксидазы ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$). Для построения калибровочной кривой использовали растворы H_2O_2 с известной концентрацией.

2.13. Измерение карбоангидразной активности

Карбоангидразную активность препаратов измеряли с помощью регистрации изменения рН стеклянным рН-электродом при 2°C в 14 мМ вероналовом буфере (рН 8.4). Реакцию инициировали добавлением воды, насыщенной CO₂, при 0°C и измеряли время изменения рН от 8.3 до 7.8. Контролем служило время спонтанной гидратации в тех же условиях с добавлением соответствующей среды вместо образца.

2.14. Измерение содержания белка

Содержание белка определяли согласно Лоури и соавт. (1951).

2.15. Выделение мембранной оболочки хлоропластов

Выделение хлоропластной оболочки из шпината проводили согласно Douce и Joyard (1982) с использованием градиента сахарозы. Растворы сахарозы содержали 20.5 и 31.8% сахарозы, соответствующие 0.6 М и 0.93 М, 10 мМ трицин, 4 мМ MgCl₂, рН 7.8 (при 2°C). 15 мл набухших хлоропластов наслаивали на градиент и центрифугировали при 72000 g в течение 1 часа при 3°C. Отбирали желтую полосу на границе раздела двух слоев сахарозы (фракция оболочки хлоропласта).

2.16. Проведение денатурирующего электрофореза

Денатурирующий электрофорез проводили согласно Schagger, von Jagow (1987) в 12–18% градиентном полиакриламидном геле, используя трис-трициновый буфер. Электрофорез проводили при комнатной температуре, подавая 100 мА на гель. В каждую лунку геля вносили тилакоиды с содержанием хлорофилла 8 мкг. Разделение проводили в камере PROTEAN II xi Cell, Bio-Rad (США). Для визуализации белковых полос гели инкубировали 2–3 часа в 0.25% растворе кумасси G-250, который диффундировал в гель и прочно связывался с белками. Отмывку фонового окрашивания проводили в среде, содержащей 96% этанол и 10% уксусную кислоту в течение 24–48 часов.

2.17. Проведение вестерн-блот анализа

Для оценки количества белков с помощью вестерн-блот анализа тилакоиды разделяли, как описано ранее (Ballottari и др., 2004). Результаты реакции с антителами оценивали с помощью денситометрии. Gel-Pro Analyser 3.1. Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit был использован для визуализации белковых полос. 5 мкл Precision Plus Protein Kaleidoscope (10–250 кДа) (Bio-Rad, США) использовали в качестве маркера молекулярных весов.

2.18. Измерение количества крахмала в листьях

Для анализа брали свежесыведенные тилакоиды ячменя, объемы проб для анализа нормировали по количеству хлорофилла. К пробам добавляли до 1 мл 96% этанола и центрифугировали 5 минут при 3400 g. Полученные осадки высушивали. Крахмал растворяли в 200 мкл кипящей воды в течение 30 мин и затем центрифугировали (Karlan и др., 2012). 25 мкл полученного супернатанта использовали для реакции с 0.12% иодидом калия. Интенсивность окрашивания измеряли при 620 нм (спектрофотометр Hitachi 557, Япония). Картофельный крахмал был использован для построения калибровочной кривой.

2.19. ЭПР измерения спиновой пробы SASL-16

Измерения ЭПР спектров проводили с помощью спектрометра EMX-6 (Bruker, Германия) при постоянной температуре 22°C. 10 мкл 10^{-2} М раствор спиновой пробы SASL-16 (Sigma) в хлороформе вносили на стенки эппендорфа и высушивали, после чего к метке добавляли 50 мкл суспензии тилакоидов (концентрация Хл 100 мкг мл⁻¹). Тилакоиды инкубировали с меткой в течение 10 минут в темноте во льду. После инкубации образцы переносили в калиброванные стеклянные капилляры и записывали спектры без освещения при мощности 20 мВт. Три спектра для каждого измерения усредняли для получения сигнала. Сигнал тилакоидов без метки вычитали из полученных спектров.

2.20. ЭПР измерения спиновой пробы 4-POBN

Измерения проводили с помощью спектрометра ESR-300 X-band (Bruker, Rheinstetten, Германия), используя гидрофильную спиновую ловушку N-терт-

бутил-альфа-(4-пиридил-1-оксид) нитрон (4-POBN) для регистрации гидроксильного радикала, генерируемого в H_2O_2 -зависимой реакции при добавлении металлов переменной валентности, в частности железа Fe^{2+} . В качестве поставщика Fe^{2+} использовали 50 мкМ FeEDTA. Реакционная среда содержала 0.4 М сорбитол, 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl_2 , 25 мМ HEPES (pH 7.6), тилакоиды или хлоропласты (концентрация Хл 50 мкг мл^{-1}), 50 мМ 4-POBN. 4% этанол был добавлен для инициации реакции между спиновой ловушкой и гидроксильным радикалом. Спектры записывали с использованием плоской ячейки при комнатной температуре до и после освещения суспензии тилакоидов. Частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 1.005 G, мощность 62 мВт. Три спектра для каждого измерения усредняли для получения сигнала.

2.21. Измерение образования H_2O_2 в суспензии хлоропластов с помощью спектрофлуориметра

Продукцию H_2O_2 хлоропластами измеряли с помощью флуоресцентного анализа и флуоресцентного красителя 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (Amplex Red). Реагент Amplex Red реагирует с H_2O_2 в присутствии пероксидазы и образует резорурфин, флуоресцентный продукт, который имеет максимум флуоресцентного излучения при 587 нм. Стандартная смесь для анализа содержала 5 мкМ AmplexRed (10 мМ исходный раствор в ДМСО), 10 ед. мл^{-1} пероксидазы хрена, хлоропласты (концентрация Хл 3 мкг мл^{-1}) и 4 мМ NaHCO_3 в среде реакции 0.4 М сорбитол, 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl_2 , 25 мМ HEPES (pH 7.6) при комнатной температуре. Длина волны возбуждения 518 нм, спектры записывали в диапазоне 550–600 нм. Образец освещали внутри флуориметра (Shimadzu, Япония), используя интерференционный фильтр с пропусканием от 245 нм до 490 нм. Калибровочная кривая была записана с известными концентрациями H_2O_2 . Интенсивность действующего света составляла 200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

2.22. Масс-спектрометрические измерения

Масс-спектрометрические измерения проводили на листовых дисках 1.3 см^2 , полученные из 4–5-недельных растений арабидопсиса. Диски были помещены в герметичную закрытую камеру объемом 1.6 мл и измерения проводили с помощью мембранной масс-спектрометрии (мембранный ввод, а

membrane inlet mass spectrometry) (MIMS) (Максвелл и др., 1998; Бекман и др., 2009). Листовой диск, помещенный в закрытую листовую камеру, продували N_2 до полного исчезновения всех газов в системе. Изотопы $^{18}O_2$ и CO_2 добавляли в известных объемах для достижения концентрации 21% O_2 и 3% CO_2 . Используя MIMS, сигналы образцов записывали одновременно при «масса/заряд» = 32, 36 и 44. Поглощение CO_2 было рассчитано как уменьшение «масса/заряд» = 44, выделение кислорода – увеличение «масса/заряд» = 32, поглощение O_2 – уменьшение «масса/заряд» = 36. Поглощение кислорода в темноте, происходящее за счет дыхания растений, было вычтено из поглощения кислорода, измеренного при освещении.

2.23. Конфокальная микроскопия

Использовали конфокальный микроскоп Leica TCS SPE (Германия). При работе с протопластами использовали флуоресцентный краситель H_2DCFDA (при взаимодействии с H_2O_2 происходит образование флуоресцентного продукта DCF), с хлоропластами – Amplex Red (при взаимодействии с H_2O_2 происходит образование флуоресцентного продукта резорурфина). Параметры для наблюдения флуоресценции хлорофилла: возбуждение 635 нм, регистрация в диапазоне 640–750 нм; флуоресценции DCF и резорурфина: возбуждение 488 нм, регистрация в диапазоне 504–543 нм и 540–600 нм, соответственно. Время наблюдения в опытах с протопластами при отсутствии их сдавливания достигало 5–10 минут. Для каждой серии изображений был предоставлен свежий образец. Образец был приготовлен на предметном стекле и содержал: 4 мкл суспензии протопласта и 4 мкл H_2DCFDA (конечная концентрация H_2DCFDA , 50 мкМ). Образец накрывали покровным стеклом и помещали под микроскоп. Мощность лазера была установлена на 10% (лазер 488 нм) и 20% (лазер 635 нм). Лазерный источник действовал как фотосинтетически активный свет, во время эксперимента не использовали дополнительный источник света. 10% лазерного света 488 нм соответствовали приблизительно $1500 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

При работе с интактными хлоропластами образец содержал 5 мкМ Amplex Red (10 мМ маточный раствор в ДМСО), суспензию хлоропластов (концентрация Хл 3 мкг мл^{-1}), 10 ед. мл^{-1} пероксидазы хрена, 4 мМ $NaHCO_3$. Мощность лазеров микроскопа была установлена на 5% (лазер 488 нм) и 10% (лазер 635 нм), чтобы избежать фотообесцвечивания и деградации хлорофилла.

Лазерный источник действовал как фотосинтетически активный свет, во время эксперимента не использовали дополнительный источник света. 5% лазерного света 488 нм соответствовали примерно 700–800 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. В работе применяли объективы с масляной иммерсией, при использовании которых четкую картину распределения флуоресценции можно наблюдать в участках, расположенных близко к объективу.

2.24. Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Листья замораживали в жидком азоте и экстрагировали тотальную РНК, используя Aurum total RNA mini Kit (Bio Rad, США), и обрабатывали ДНКазами для предотвращения контаминации геномной ДНК. 400 нг каждого РНК-образца использовали для обратной транскрипции с помощью BioRad iScript reverse transcription supermix reagents. Количественная ОТ-ПЦР с обратной транскрипцией была проведена в трех независимых повторностях. Данные были нормализованы по экспрессии гена актина, который экспрессируется на постоянном уровне. ПЦР реакцию проводили с помощью IQ5 cyclor (Bio Rad, США). Для арабидопсиса были использованы праймеры к генам *lhcb2.2*, *lhcb3* и *lhcb6* (Ху и др., 2012). Для ячменя были использованы праймеры к генам *lhcb1*, *lhcb3* и *lhcb6* (Frigerio и др., 2007), последовательности олигонуклеотидов, использованные для *lhcb4*: прямой СТСТТААГТGGTCCGGTGGT, обратный ТССТАТGTGATCCGACCAGC; *lhcb5*: прямой GATCTACTTGCCCAACGG, обратный CATGGATGAGCTCAAAGGCC.

2.25. Условия культивирования микроорганизмов

Для колонизации растений арабидопсиса использовали культуру *Pseudomonas putida* (*P. Putida*) BS3701 (штамм предоставлен сотрудниками ИБФМ РАН, Пушкино), выращенную в течение 16 часов на богатой питательной среде LB, содержащей (г л^{-1}): бактотриптон – 10, дрожжевой экстракт – 5 и NaCl – 10. Для определения выживаемости *P. putida* BS3701 в ризосфере растений арабидопсиса использовали селективную питательную среду King B, следующего состава (г л^{-1}): протеазный пептон – 20, гидрофосфат калия – 1.5, сульфат магния (6-водный) – 1.5 и агар-агар – 20.

2.26. Определение колонизирующей способности ризосферных бактерий

Для определения способности бактерий колонизировать ризосферу растений проводили смыв с корней через 7 и 14 дней после начала колонизации. Корни освобождали от крупных комков земли, помещали в физраствор (1 г влажной биомассы на 100 мл раствора) и перемешивали на мульти-ротаторе Multi Bio RS-24 (“Biosan”, Латвия) при скорости 30 об. мин⁻¹ в течение 30 минут. После стандартных серийных разведений высевали на селективную среду King B для идентификации микроорганизмов рода *Pseudomonas*. *P. putida* BS3701 сохранялись в ризосфере в течение всего эксперимента, концентрация бактериальной культуры составляла $\sim 6 \times 10^6$ КОЕ г⁻¹ влажной биомассы. Общая микробная обсемененность колонизированных растений (оценивали все культивируемые формы) составила $\sim 10^8$ КОЕ г⁻¹ влажной биомассы. Штамм *P. putida* BS3701 не обнаруживали при смыве с корней неколонизированных растений, их общая микробная обсемененность составляла $\sim 7 \times 10^7$ КОЕ г⁻¹ влажной биомассы.

Глава 3. Результаты

3.1. Образование пероксида водорода компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи

Для исследования образования H_2O_2 компонентами ФЭТЦ в различных условиях освещенности использовали выделенные тилакоиды гороха с применением метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и гидрофильной спиновой ловушки N-терт-бутил-альфа-(4-пиридил-1-оксид) нитрон (4-POBN) для регистрации гидроксильного радикала, генерируемого в H_2O_2 -зависимой реакции при добавлении металлов переменной валентности, в частности железа Fe^{2+} . В наших экспериментах в качестве поставщика Fe^{2+} использовали FeEDTA – координационный комплекс, образованный из ионов железа и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Спиновая ловушка 4-POBN реагирует с гидроксильными радикалами в присутствии этанола, приводя к образованию стабильного нитроксидного радикала, который может быть обнаружен методом ЭПР-спектроскопии. На Рис. 12б показан сигнал ЭПР нитроксильного радикала, измеренный после освещения изолированных тилакоидов белым светом интенсивностью $1200 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, до освещения этот сигнал был практически нулевым (Рис. 12а). Этанол и FeEDTA были добавлены сразу после освещения, чтобы избежать возможного негативного влияния на компоненты ФЭТЦ этих добавок во время освещения. Добавление каталазы после освещения, но до добавления этанола и FeEDTA, подавляло измеряемый на свету сигнал полностью (Рис. 12в). В отсутствие FeEDTA также никакого сигнала не было зарегистрировано (Рис. 12г). Полученные данные свидетельствует о том, что в подобранных условиях нами измеряется только тот сигнал, который опосредован образованием именно H_2O_2 во время освещения. Лишь небольшой сигнал был измерен в присутствии диурона (Рис. 12д), демонстрируя, что измеряемый H_2O_2 на Рис. 12б являлся продуктом функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

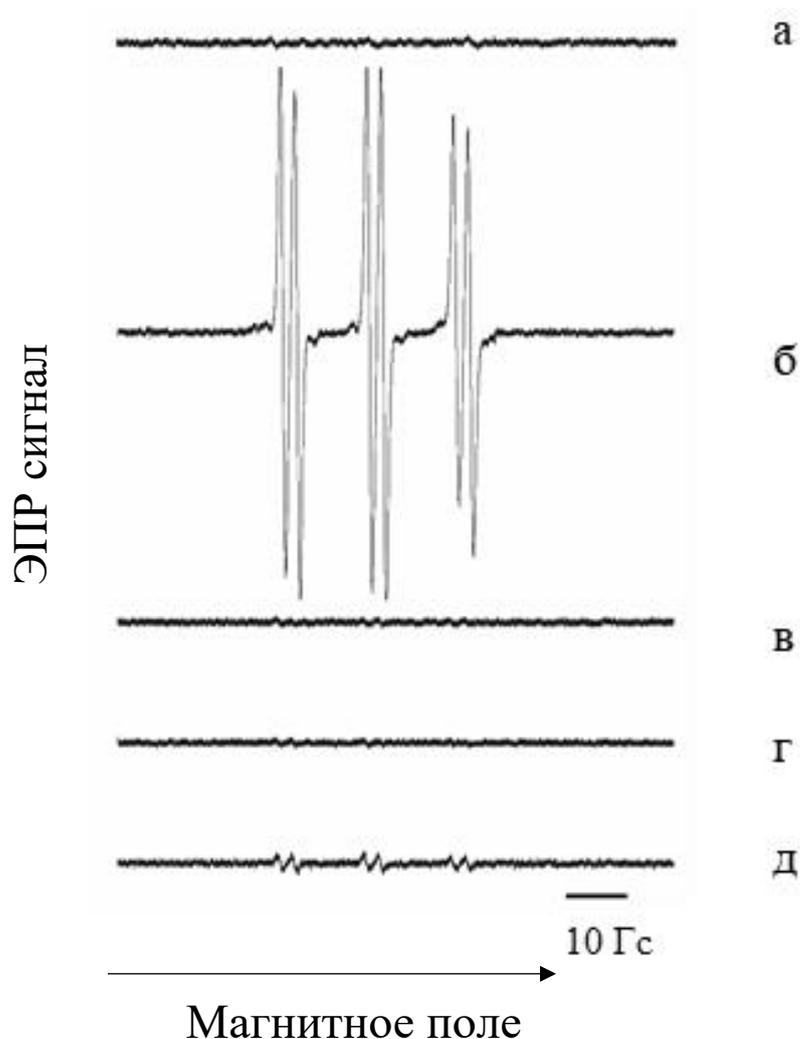


Рис. 12. ЭПР сигнал нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-РОВН с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, в тилакоидной суспензии в темноте (а), после освещения (б), после освещения в присутствии каталазы (300 ед. мл^{-1}) (в); после освещения без добавки FeEDTA (г); после освещения в присутствии диурона (10 мкМ) (д). Интенсивность белого света $1200 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Концентрация хлорофилла $50 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$. pH 7.6. Во всех случаях был добавлен NH_4Cl (10 мМ). Освещение в течение 3-х минут. Спектры показаны в одном масштабе.

Рис. 13 показывает ЭПР сигнал нитроксильных радикалов через 3 минуты освещения тилакоидов в отсутствие и в присутствии экзогенно добавленного 40 мкМ цитохрома *c*, который является эффективной ловушкой $\text{O}_2^{\bullet-}$, окисляя эти радикалы до молекулярного кислорода. Будучи водорастворимым веществом, цитохром *c* не способен проникать внутрь мембран и взаимодействует с $\text{O}_2^{\bullet-}$ только вне мембраны, предотвращая образование H_2O_2 в водной фазе тилакоидной суспензии. Для того, чтобы цитохром *c* улавливал все $\text{O}_2^{\bullet-}$, образованные вне мембраны, необходимо использовать его в насыщающей

концентрации. При оценке насыщающей концентрации цитохрома *c* важно учитывать, что он восстанавливается не только $O_2^{\bullet -}$, но и компонентами ФЭТЦ (Kruk и др., 2003). Поэтому необходимо было определить и использовать именно насыщающую концентрацию для супероксид-зависимого восстановления цитохрома *c*. Ранее нами было показано, что при рН 7.8 супероксид-зависимая скорость восстановления цитохрома *c* (рассчитывается как разница между скоростями восстановления цитохрома *c* в отсутствие и в присутствии СОД) достигает максимальных значений при 30 мкМ концентрации цитохрома *c* при высокой интенсивности света (Мубаракшина и др., 2006; Mubarakshina и др., 2006).

Сигнал нитроксильных радикалов в отсутствие цитохрома *c* (показывающий общее образование H_2O_2 в ФЭТЦ) после освещения тилакоидов светом интенсивностью 500 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (Рис. 13Б, а) был почти вдвое больше сигнала, полученного после освещения светом интенсивностью 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (Рис. 13А, а). В темноте этот сигнал был практически нулевым как в отсутствие, так и в присутствии цитохрома *c* (не показано). В присутствии цитохрома *c* очень незначительный сигнал был измерен после освещения светом низкой интенсивности 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (Рис. 13А, б). Это свидетельствует о том, что практически все образование H_2O_2 при низкой интенсивности света происходит преимущественно при генерации $O_2^{\bullet -}$ компонентами ФЭТЦ вне тилакоидной мембраны. Однако после освещения светом высокой интенсивности 500 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ был зарегистрирован значительный ЭПР сигнал даже в присутствии цитохрома *c* (Рис. 13Б, б). Это означает, что образование H_2O_2 в пределах тилакоидной мембраны увеличивается значительно с увеличением интенсивности света. При этом увеличение суммарной продукции H_2O_2 компонентами ФЭТЦ при высокой интенсивности света происходит, в основном, за счет увеличения генерации H_2O_2 , измеренного в присутствии цитохрома *c*, который был нами назван «мембранным». Расчет показал, что образование «мембранного» H_2O_2 при высокой интенсивности света составляет около 50% от общего образования H_2O_2 в ФЭТЦ.

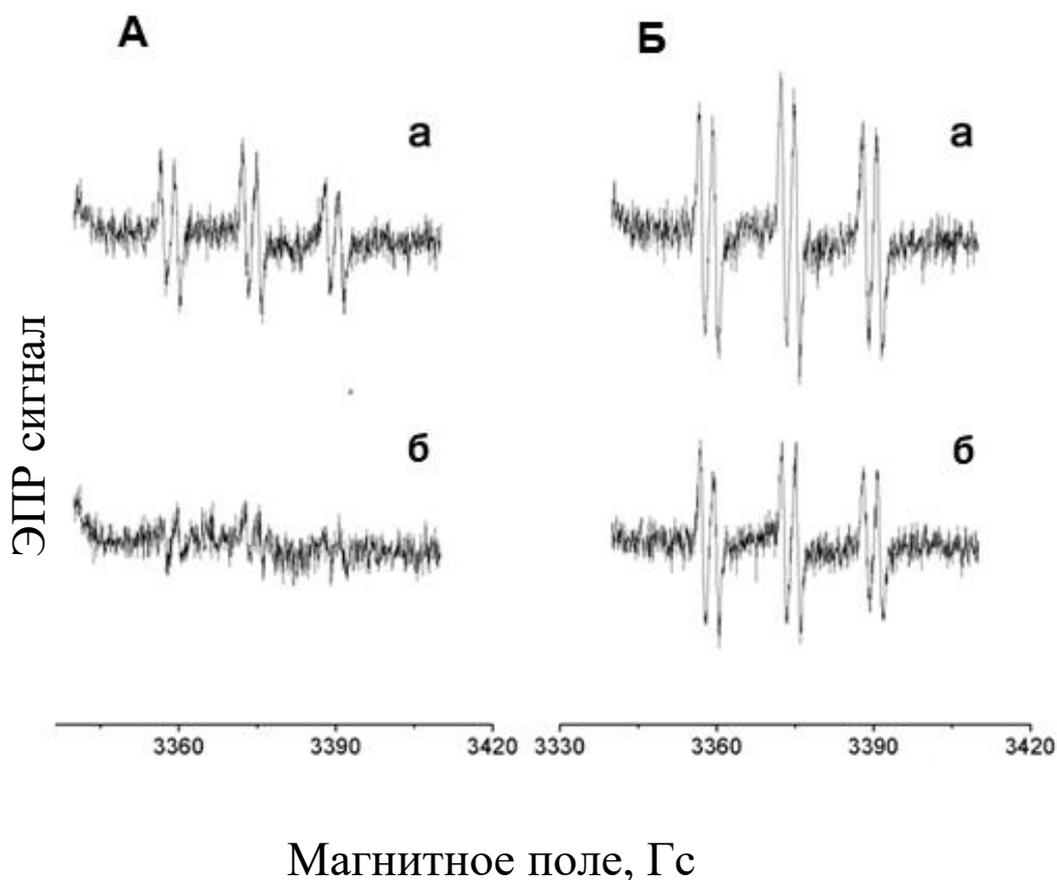


Рис. 13. Влияние интенсивности света на величину сигнала нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, в тилакоидной суспензии в отсутствие (а) и в присутствии (б) 40 мкМ цитохрома *c*. Количество тилакоидов соответствовало концентрации 15 мкг Хл мл⁻¹. Интенсивность красного света ($\lambda > 600$ нм) 50 (А) и 500 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ (Б). рН 7.6. Во всех случаях был добавлен 1 мкМ грамицидин Д. Освещение в течение 3-х минут. Спектры показаны в одном масштабе.

Используя представленные спектры, можно оценить, что «мембранное» образование H_2O_2 (в присутствии цитохрома *c*) увеличивается существенно, чем образование H_2O_2 вне тилакоидов (рассчитано как разница между сигналами в отсутствие и в присутствии цитохрома *c*) с увеличением интенсивности света [*1].

Таким образом, увеличение суммарной продукции H_2O_2 компонентами ФЭТЦ при повышении интенсивности света происходит, в основном, за счет увеличения образования «мембранного» H_2O_2 . Этот вывод согласуется с предположением, сделанным в нашей более ранней работе (Mubarakshina и др., 2006).

Дополнительно оценивали образование «мембранного» H_2O_2 путем добавки каталазы после освещения изолированных тилакоидов в присутствии и в

отсутствие цитохрома *c*, измеряя скорость изменения концентрации кислорода в ячейке. В работе был использован метилвиологен (Мв), акцептор электронов от кофакторов F_A/F_B ФС I, который, будучи восстановленным, восстанавливает с высокой скоростью O₂ до O₂^{•-} ($k = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Использование Фд, естественного акцептора электронов, было невозможно, поскольку Фд эффективно восстанавливает цитохром *c*, который был необходим, чтобы предотвратить образование H₂O₂ за счет спонтанного диспропорционирования в водной среде (см. выше). Мв был использован вместо системы Фд и НАДФ⁺, чтобы приблизить скорость транспорта электронов по ФЭТЦ к физиологическим скоростям. Для того, чтобы ответить на вопрос, образуется ли «мембранный» H₂O₂ в присутствии Мв, измеряли изменение концентрации кислорода в ячейке в отсутствие и в присутствии каталазы (фермента, разлагающего H₂O₂), согласно (Mubarakshina и др., 2006; Мубаракшина и др., 2006).

Учитывая коэффициент распределения H₂O₂ в среде «гидрофобная фаза (бензол)/вода», равный 0.005 (Leo и др., 1971), H₂O₂, образованный в мембране или в примембранном слое, быстро диффундирует в водную фазу и оказывается доступным каталазе, как и H₂O₂, образованный вне тилакоидной мембраны. Соответственно, если происходит выделение кислорода при добавке каталазы после освещения, то это указывает на образование H₂O₂ в присутствии цитохрома *c*. Действительно, мы наблюдали значительное выделение кислорода в ответ на введение каталазы в суспензию тилакоидов после освещения светом 200 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ (Рис. 14), в то время как выделение кислорода было незначительным после освещения светом 50 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ (не показано).

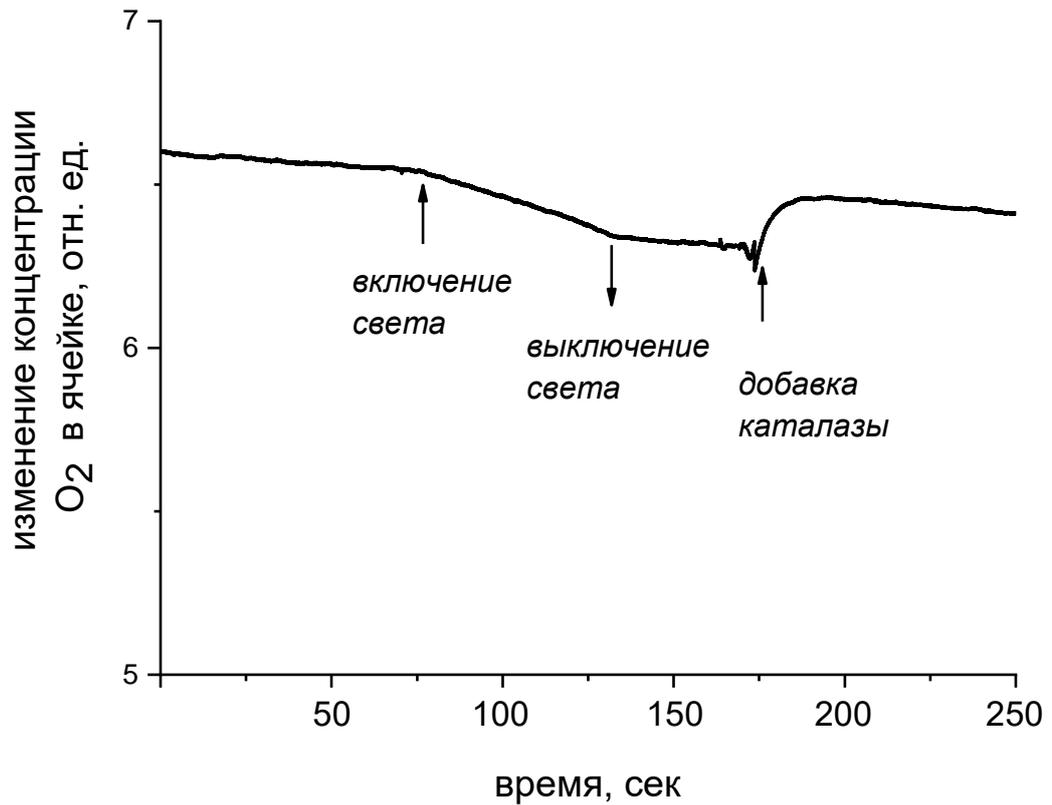


Рис. 14. Типичная экспериментальная кривая изменения концентрации O₂, измеренная в суспензии тилакоидов в присутствии 60 мкМ цитохрома *c* и 1 мкМ Мв, рН 7.6.

Количество тилакоидов соответствовало концентрации 15 мкг Хл мл⁻¹. Интенсивность красного света ($\lambda > 600$ нм) 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Стрелки указывают моменты, когда свет был включен или выключен, а также момент добавки каталазы (100 ед. мл⁻¹).

Измеренные количества выделившегося кислорода с учетом стехиометрии относительно образовавшегося H₂O₂ и времени освещения были пересчитаны в скорости образования H₂O₂ и представлены на Рис. 15. Показано, что увеличение интенсивности света приводит к увеличению как общей продукции H₂O₂ [*2, *3], так и продукции «мембранного» H₂O₂ [*4, *5]. Можно отметить, что общее образование H₂O₂ при интенсивности света 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ практически соответствует сумме общего образования H₂O₂ при интенсивности света 50 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ и продукции «мембранного» H₂O₂ при интенсивности света 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Эти результаты показали, что увеличение интенсивности света приводит к увеличению образования «мембранного» H₂O₂ и что увеличение общего образования пероксида водорода в ФЭТЦ при увеличении интенсивности света происходит преимущественно за счет увеличения «мембранной» фракции пероксида водорода.

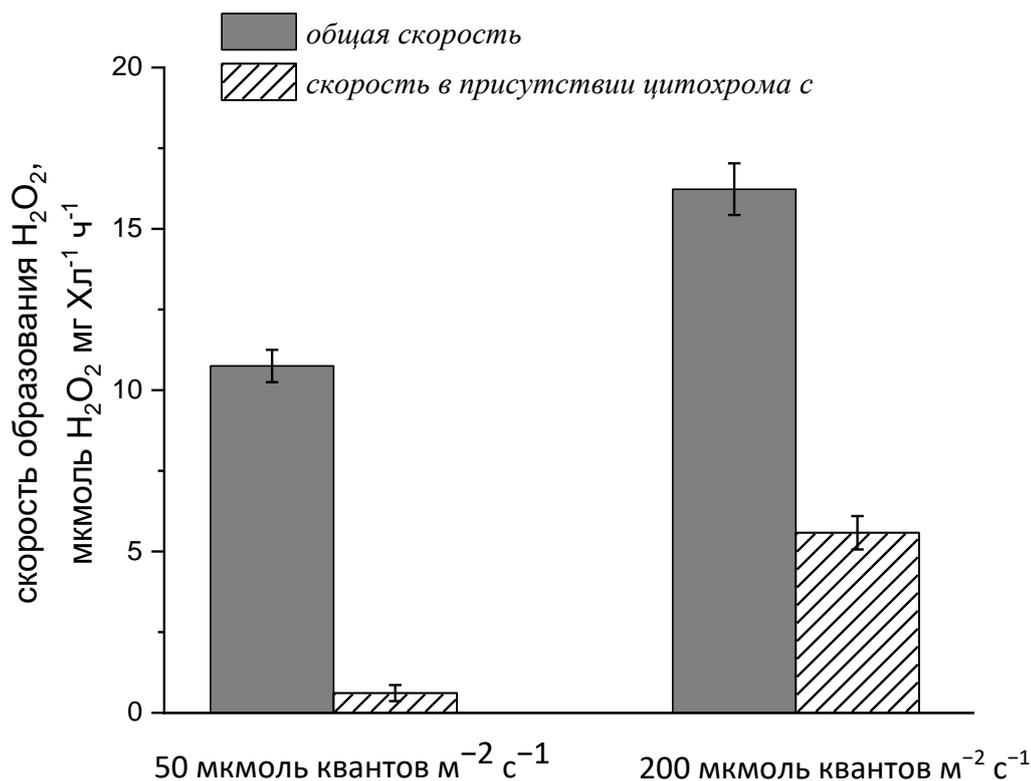


Рис. 15. Скорость образования H_2O_2 в суспензии изолированных тилакоидов в присутствии (заштрихованные столбцы) и в отсутствие 60 мкМ цитохрома *c* (серые столбцы). Количество тилакоидов соответствовало концентрации 15 мкг Хл мл⁻¹. Интенсивность красного света ($\lambda > 600$ нм) 50 и 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Оценку содержания H_2O_2 проводили путем добавки каталазы (100 ед. мл⁻¹), как показано на Рис. 14. рН 7.6. Измерения проводили в присутствии 1 мкМ Мв.

3.2. Реакция ПХН₂ с $\text{O}_2^{\cdot-}$ в тилакоидной мембране

Чтобы объяснить установленный факт образования на свету «мембранного» H_2O_2 , нами была выдвинута гипотеза об его образовании в результате реакции $\text{O}_2^{\cdot-}$ с восстановленным пластохиноном, молекулой пластогидрохинона ПХН₂ (Реакция 2, см. Обзор литературы) [*4, *5, *6, *7]. Реакция ПХН₂ с $\text{O}_2^{\cdot-}$ должна приводить к окислению ПХ пула, и для выявления возможности ее протекания в мембране проводили оценку окислительно-восстановительного состояния ПХ пула при подаче $\text{O}_2^{\cdot-}$ в мембрану от внешнего источника. Эту оценку проводили несколькими способами:

А) определяя величину $1 - qP$, где $qP = (F_M' - F_S)/(F_M' - F_0')$ (Tullberg и др., 2000) и $1 - qL$, где $qL = qP \times (F_0/F_S)$ (Kramer и др., 2004) путем измерения флуоресценции хлорофилла *a* при освещении;

Б) с помощью измерения ОЛР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II, регистрируемых в течение секундного освещения тилакоидов сильным, 3000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, светом (Kalaji и др., 2014);

В) путем измерения характеристик индукции флуоресценции хлорофилла *a* при низкой, 8 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, интенсивности света.

А) Были проведены попытки ввести $\text{O}_2^{\cdot-}$ в тилакоидную мембрану в виде KO_2 , соли супероксидного анион радикала, однако, применение KO_2 не привело к успеху, поскольку даже наличие небольшой водной фазы приводит к быстрой реакции дисмутации и исчезновению $\text{O}_2^{\cdot-}$. Продуцирование $\text{O}_2^{\cdot-}$ в реакции ксантина (КС) с молекулами O_2 , катализируемой ксантиноксидазой (КСО), при условии контакта последней с поверхностью тилакоидной мембраны, позволяло предполагать, что, по крайней мере, часть $\text{O}_2^{\cdot-}$ попадет в мембрану, избежав дисмутации в водных слоях на мембранной поверхности. Использовали КСО, выделенную из молока [*8]. Нами были исследованы характеристики образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 ксантиноксидазами, выделенными из микроорганизмов и из коровьего молока. Для обеих ксантиноксидаз повышение рН от 7.2 до 8.9 в области оптимальных значений для ксантиноксидазных активностей приводило к увеличению скорости окисления ксантина молекулами O_2 . Наряду с двухэлектронным восстановлением O_2 до H_2O_2 ксантиноксидазой молока происходило образование $\text{O}_2^{\cdot-}$, продукта одноэлектронного восстановления молекул O_2 , при этом скорость и доля генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$ увеличивались с увеличением рН. При функционировании микробной ксантиноксидазы этот радикал не регистрировался в среде при обоих значениях рН.

Для достижения «посадки» КСО на поверхность тилакоидной мембраны был применен такой прием, как «старение» тилакоидов после выделения. Введение солей, обработка детергентами, повышенными температурами не показали стабильного эффекта ксантин-ксантиноксидазной системы (КС+КСО) на окислительно-восстановительное состояние ПХ пула. Стабильные данные, свидетельствующие о том, что $\text{O}_2^{\cdot-}$, продуцируемый КС+КСО, приводит к окислению ПХ пула [*5], были получены в экспериментах с изолированными тилакоидами, выдерживавшимися в холодильнике во льду в течение 24–48 часов, т.е. в экспериментах с «состарившимися» тилакоидами. Такие тилакоиды только в

незначительной степени теряли фотохимическую активность по сравнению со свежеевыделенными, однако «старение» должно было привести к изменению свойств поверхности тилакоидных мембран. Это предположение было проверено с помощью анализа ЭПР сигнала проникающей в мембрану метки SASL-16, и, таким образом, отражающего свойства мембранной поверхности. Рис. 16 показывает спектры ЭПР метки SASL-16, которые были зарегистрированы для свежееизолированных тилакоидов и тилакоидов через 48 часов после выделения. Наблюдаемое увеличение сигнала ЭПР после инкубации тилакоидов во льду в течение 48 часов может быть объяснено более эффективным встраиванием метки SASL-16 в мембрану. Этот результат продемонстрировал изменение свойств тилакоидной мембраны при «старении».

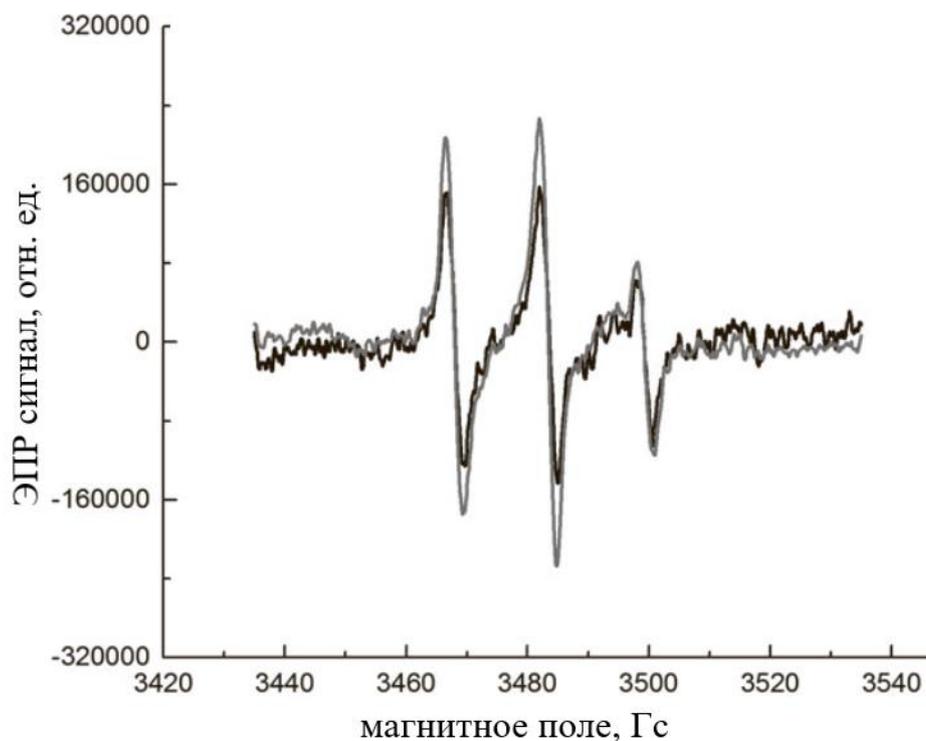


Рис. 16. Спектры ЭПР спиновой метки SASL-16, записанные со свежееизолированными тилакоидами (черный цвет) и с тилакоидами через 48 часов после выделения (серый цвет). pH7.6. Тилакоиды содержали 100 мкг Хл мл⁻¹.

Относительный уровень восстановления ПХ пула, измеренный как $1 - qP$, в отсутствие и в присутствии КС+КСО при освещении светом интенсивностью 100 или 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, при добавке КС+КСО к свежееизолированным тилакоидам почти не изменялся (Табл. 1). Уменьшение уровня восстановления ПХ пула в «состарившихся» тилакоидах в присутствии КС+КСО составляло 8% при 100 и 17% при 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Схожий по величине квантовый

выход ФС II, наблюдаемый после освещения в присутствии и в отсутствие КС+КСО, свидетельствовал об отсутствии отрицательного эффекта КС+КСО на функцию ФС II при обеих интенсивностях света. Более того, добавление КС+КСО к тилакоидам привело к снижению уровня F_s , в то время как никакого эффекта на уровень F_0 не наблюдали.

Полученные данные были также рассчитаны по формуле $qL = qP \times (F_0'/F_s)$ (Kramer и др., 2004). Считается, что qL может являться более достоверным (или, по крайней мере, дополнительным) параметром для оценки окислительно-восстановительного состояния ПХ пула. Значения $1 - qL$ после 48 часов «старения» тилакоидов соответствовали 0.560 ± 0.007 и 0.520 ± 0.007 при 100 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$; 0.710 ± 0.001 и 0.620 ± 0.004 при 200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ в присутствии одного КС и КС+КСО, соответственно. Таким образом, данные, полученные при расчете $1 - qL$, подтверждают данные, полученные при расчете $1 - qP$.

Табл. 1. Влияние введения в тилакоидную суспензию ксантина (КС, 1 мМ) и ксантиноксидазы (КСО, 0.12 ед. мл⁻¹), продуцирующих $O_2^{\cdot-}$, на относительный уровень восстановления ПХ пула, $1 - qP$, и максимальный квантовый выход ФС II, F_V/F_M , при освещении светом интенсивностью 100 или 200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ в течение 100 сек. Феррицианид (2 мМ) и грамицидин Д (5 мкМ) были добавлены. рН 7.8. Тилакоиды содержали 100 мкг Хл мл⁻¹. Результаты представлены как средние значения из трех независимых измерений \pm стандартная ошибка. * P (t -тест) < 0.05 .

Тилакоиды	Интенсивность актиничного света, мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$	Добавки к тилакоидам	F_V/F_M до освещения	$1 - qP$	F_V/F_M после освещения
Свежеизолированные	100	КС	0.730 ± 0.002	0.29 ± 0.006	0.692 ± 0.007
		КС + КСО	0.730 ± 0.001	0.29 ± 0.007	0.687 ± 0.001
	200	КС	0.705 ± 0.007	0.429 ± 0.004	0.676 ± 0.008
		КС + КСО	0.705 ± 0.005	0.445 ± 0.008	0.678 ± 0.008
После 48 часов «старения»	100	КС	0.654 ± 0.016	$0.346 \pm 0.004^*$	0.608 ± 0.004
		КС + КСО	0.661 ± 0.007	$0.317 \pm 0.001^*$	0.610 ± 0.005
	200	КС	0.634 ± 0.002	$0.493 \pm 0.006^*$	0.604 ± 0.002
		КС + КСО	0.620 ± 0.001	$0.407 \pm 0.004^*$	0.592 ± 0.002

Б) Измерения ОЖР кривых проводили с помощью прибора Hansatech Instruments HandyPEA. Специальное приспособление было изготовлено для освещения суспензий в прямоугольной кювете. В работе использовали изолированные тилакоиды гороха после двукратной отмывки от возможного загрязнения стромальными ферментами, в частности, СОД, для улучшения «посадки» КСО на тилакоидную мембрану. Среда реакции не содержала сахаразу, что также улучшало «посадку» КСО (20 мМ NaCl, 3 мМ CaCl₂, 5 мкМ ДНФ-ИНТ, 50 мМ Нерес-КОН (рН 7.8), тилакоиды (концентрация хлорофилла 100 мкг Хл мл⁻¹).

Эксперименты проводили на выдержанных в течение 48 часов во льду тилакоидах в присутствии ДНФ-ИНТ, ингибитора окисления пластогидрохинона цит. *b₆f* комплексом, для исключения возможной роли ФС I в изучаемых процессах. При добавке КС или КСО по отдельности не было достоверных изменений характера ОЖР кинетик. Совместная их добавка, т.е. введение КС+КСО, приводила к достоверному изменению ОЖР кинетики, причем именно в той части, которая соответствует заполнению электронами ПХ пула (Рис. 17). Величиной, количественно характеризующей размер окисленной доли ПХ пула, служит величина S_M , площадь над кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*. На Рис. 17А, Рис. 18 и в Табл. 2 показано, что увеличение S_M при добавке КС+КСО к тилакоидам через 2 минуты выдерживания в темноте (первая вспышка) составляло 35% по сравнению с величиной S_M при добавке одного ксантина в качестве контроля. Это свидетельствовало о том, что введение КС+КСО в суспензию тилакоидов приводило к окислению ПХ пула. Грамицидин Д не влиял на эффект добавки КС+КСО. При второй вспышке, через 1 минуту после первой вспышки, величина S_M в присутствии КС+КСО увеличивалась существенно, чем при первой вспышке, почти в 2 раза по сравнению с величиной S_M при добавке одного ксантина в этом случае (Рис. 17Б и Рис. 18 и Табл. 2). Схожие данные были получены в отсутствие ДНФ-ИНТ.

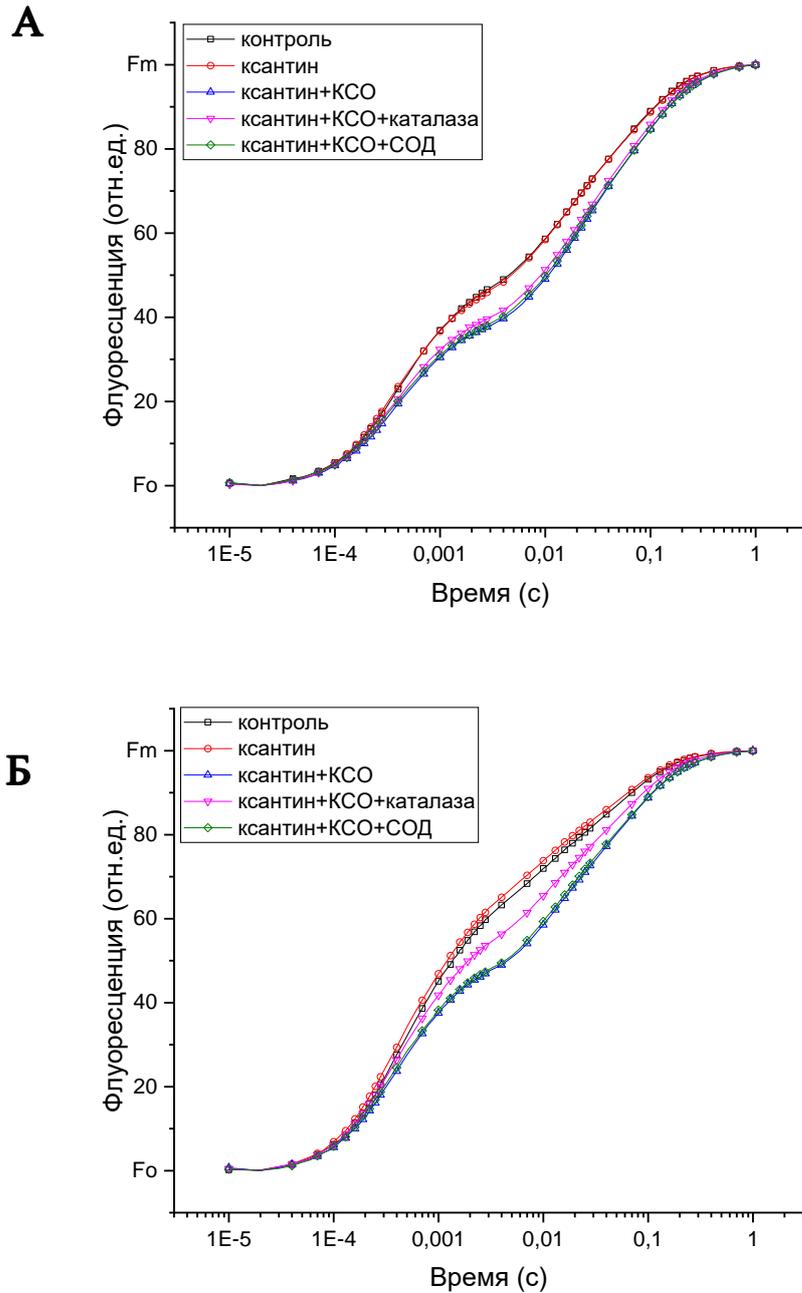


Рис. 17. Влияние добавок в суспензию тилакоидов 1) ксантина (КС, 1 мМ), 2) ксантина (КС) вместе с ксантинооксидазой (КСО, 0.1 ед. мл⁻¹), 3) ксантина (КС), ксантинооксидазы (КСО) и супероксиддисмутазы (СОД), 4) ксантина (КС), ксантинооксидазы (КСО) и каталазы (100 ед. мл⁻¹) на ход ОЖР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II. А – первое освещение (первая вспышка) смесей указанных составов; Б – второе освещение (вторая вспышка) смесей указанных составов. Чтобы компенсировать случайные вариации концентрации хлорофилла в зоне изменения, кривые нормализованы по F_M . Количество тилакоидов соответствовало концентрации 100 мкг Хл мл⁻¹.

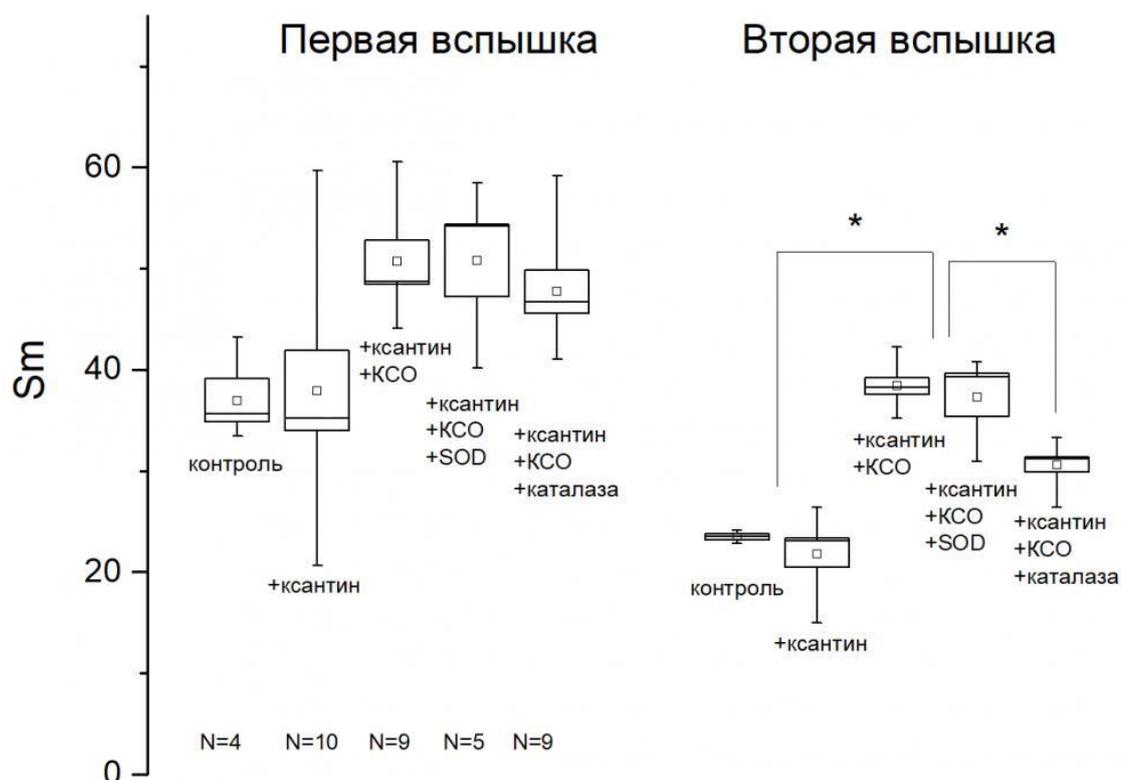


Рис. 18. Величины параметра S_m , характеризующего относительный уровень восстановления ПХ пула, полученные в суспензиях тилакоидов в присутствии указанных добавок. KCO – ксантиноксидаза, SOD – супероксиддисмутаза, N – число обработанных измерений. Маленькие квадратики внутри боксов показывают средние значения.

Табл. 2. Величины параметра S_m , характеризующего относительный уровень восстановления ПХ пула, полученные в суспензиях тилакоидов в присутствии указанных добавок. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка.

Вариант	S_m
Первая вспышка (без добавок)	37.9 ± 4.0
Первая вспышка (+ КС)	37.0 ± 2.1
Первая вспышка (+ КС, + КСО)	50.8 ± 2.0
Первая вспышка (+ КС, + КСО, + каталаза)	47.7 ± 2.2
Вторая вспышка (без добавок)	21.8 ± 1.3
Вторая вспышка (+ КС)	18.8 ± 0.3
Вторая вспышка (+ КС, + КСО)	38.4 ± 0.8
Вторая вспышка (+ КС, + КСО, + каталаза)	30.6 ± 0.7

Введение в суспензию тилакоидов вместе с КС+КСО СОД (100 ед. мл^{-1}) не влияло на эффект добавки КС+КСО (Рис. 17 и Рис. 18). Отсутствие влияния СОД подтверждало, что $\text{O}_2^{\cdot-}$, продуцируемые КС+КСО и вызывающие окисление ПХ пула, поступают в мембрану, минуя среду [*9]. При второй вспышке СОД также не влияла на эффект КС+КСО, но было обнаружено, что каталаза, присутствующая в суспензии тилакоидов, уменьшала это различие до 42%, что свидетельствовало о влиянии H_2O_2 на окисление пула ПХ (Рис. 17Б, Рис. 18 и Табл. 2). Неожиданным оказался эффект наблюдаемого окисления ПХ пула H_2O_2 , поскольку в литературе не было прямых данных о том, что пероксид водорода способен окислять ПХ пул. Для исследования влияния H_2O_2 на окислительно-восстановительное состояние ПХ пула использовали раствор H_2O_2 . Действительно, добавка раствора H_2O_2 в суспензию в отсутствие и в присутствии КС уменьшала S_M (Рис. 19). Было установлено, что добавка в суспензию тилакоидов десферала, удалявшего следы тяжелых металлов для предотвращения реакции Фентона, не влияла на эффект добавки H_2O_2 . Это свидетельствовало о том, что окисление ПХ пула в присутствии H_2O_2 в небольших концентрациях (100 мкМ) не является следствием появления гидроксильных радикалов.

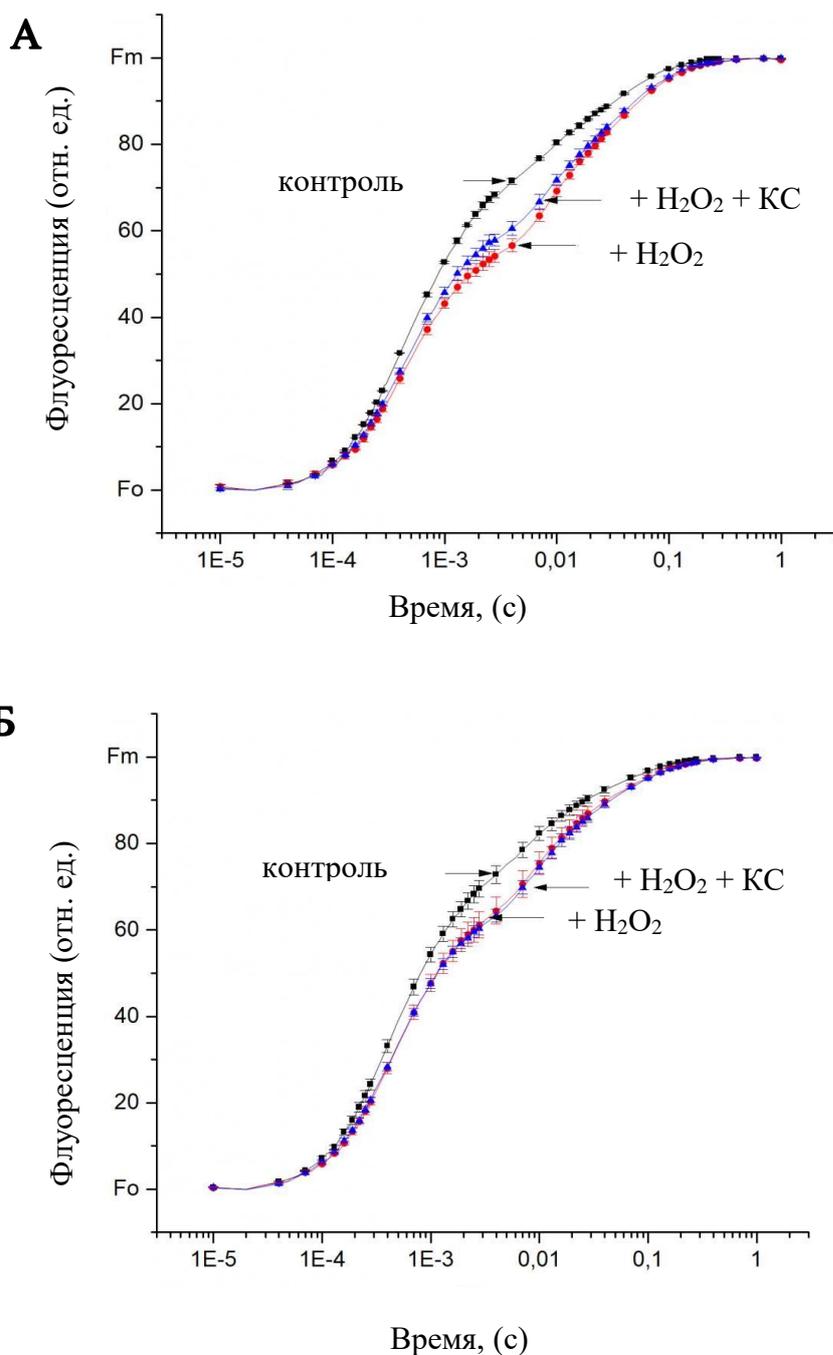


Рис. 19. Влияние добавки 100 мкМ пероксида водорода (H₂O₂) в суспензию тилакоидов на форму ОЛР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II. А – без дополнительных добавок; Б – с добавкой ДНФ-ИНТ (5 мкМ). Эксперимент с добавкой ксантина (КС) приведен для контроля. Чтобы компенсировать случайные вариации концентрации хлорофилла в зоне изменения, кривые были нормализованы по F_m . Количество тилакоидов соответствовало концентрации 100 мкг Хл мл⁻¹.

То, что H₂O₂ окисляет именно ПХ пул, а не выступает в качестве акцептора электронов от ФС I, было подтверждено тем, что эффект H₂O₂ наблюдался также в присутствии ДНФ-ИНТ, ингибитора окисления

пластогидрохинона цит. b_6/f комплексом (Рис. 19). Эти данные согласуются с данными Sanchez-Cruz и др., (2014) (см. Обзор литературы, глава 5).

В) Для проведения экспериментов по измерению индукции флуоресценции хлорофилла a при освещении светом низкой интенсивности использовали прибор РАМ-101 и стандартную ячейку производства WALZ. Была подобрана такая низкая интенсивность света, при которой скорость притока электронов в ПХ пул из ФС II можно сравнить со скоростью оттока электронов из ПХ пула, следовательно, дополнительный отток электронов из ПХ пула при наличии экзогенно-продуцируемых $O_2^{\bullet-}$ (реакция между ПХН₂ и $O_2^{\bullet-}$) должен приводить к заметному окислению ПХ пула, т.е. видимые изменения в кинетике флуоресценции должны быть следствием увеличения оттока.

Для того, чтобы проследить влияние экзогенно-генерируемых $O_2^{\bullet-}$ именно на состояние ПХ пула, измерения проводили в присутствии ДНФ-ИНТ. На Рис. 20А показано, что индукция флуоресценции хлорофилла a при интенсивности света 8 мкмоль квантов $m^{-2} s^{-1}$ изменялась в присутствии КС+КСО. Форма кривых индукции флуоресценции после вычитания быстрой фазы представляла собой сигмоиду, которая может быть описана уравнением:

$$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (X/X_0)^p),$$

где p – это угловой коэффициент касательной, который служит характеристикой кривой.

Добавка КС+КСО к тилакоидам существенно снизила параметр « p » по сравнению с контролем, в среднем с 3.62 до 0.63 (более, чем на 80%). Добавка одной КСО к тилакоидам (в отсутствие ксантина) не влияла на параметр « p » (не показано). При добавке каталазы к тилакоидам в присутствии КС+КСО угловой коэффициент касательной был примерно такой же, как в присутствии КС+КСО. При добавке СОД к КС+КСО параметр « p » становился равным 1.43, что, возможно, было следствием частичного уменьшения концентрации $O_2^{\bullet-}$, однако важно, что эффект КС+КСО полностью не исчезал.

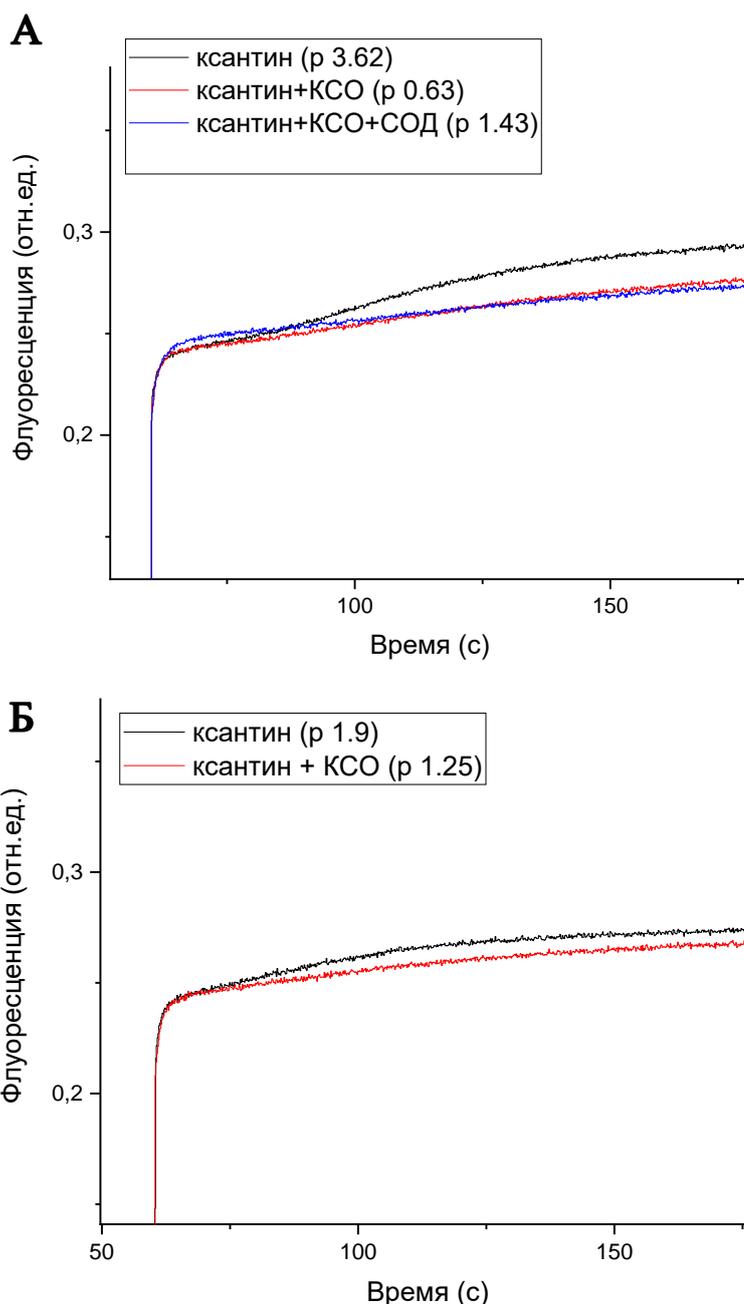


Рис. 20. Индукция флуоресценции хлорофилла *a* при освещении изолированных тилакоидов гороха (через 48 часов после выделения) светом интенсивностью $8 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Количество тилакоидов соответствовало концентрации $100 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$, среда не содержит сахарозу, рН 7.2; 5 мкМ ДНФ-ИНТ . Где указано: каталаза, 20 ед. мл^{-1} ; супероксиддисмутаза (СОД), 100 ед. мл^{-1} . А – тилакоиды дважды промытые после выделения; Б – тилакоиды без промывки после выделения.

В дальнейшем эксперименты проводили, используя неотмытые тилакоиды, т.е. тилакоиды, у которых некоторые из стромальных белков остались на поверхности изолированных тилакоидов (Рис. 20Б). Угловой коэффициент касательной и уровень F_M у таких тилакоидов были ниже, чем у контрольных

отмытых тилакоидов: параметр «р» был 1.9 по сравнению с 3.62. Добавка КС+КСО снизила параметр «р» по сравнению с контролем в среднем с 1.9 до 1.3, т.е. примерно на 30%. Более слабое влияние КС+КСО на неотмытые тилакоиды может являться следствием того, что налипшие белки препятствуют «посадке» КС+КСО на поверхность тилакоидной мембраны и/или что среди «налипших» белков присутствует СОД. Следовые количества «налипшей» на мембрану СОД не только препятствуют «посадке» КСО, но и конвертируют $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 .

Полученные в ходе данного этапа работы данные свидетельствуют в пользу окисления ПХ пула, а именно PXH_2 , $O_2^{\cdot-}$, продуцируемыми КС+КСО.

3.3. Влияние интенсивности света на образование супероксидного анион-радикала в фотосинтетической электрон-транспортной цепи

Восстановление молекулярного кислорода в ФЭТЦ при освещении, приводящее к образованию супероксидного анион-радикала, было изучено с использованием изолированных тилакоидов гороха. Для оценки роли ПХ пула скорость поглощения кислорода, которая отражает уменьшение концентрации молекулярного кислорода в ячейке за счет восстановления молекул O_2 , была измерена в присутствии и в отсутствие 5 мкМ динитрофенилового эфира 2-йод-4-нитротимола, ДНФ-ИНТ, или 10 мкМ диурона (DCMU), гербицида, который связывается с Q_B -сайтом ФС II и ингибирует перенос электронов по ФЭТЦ.

Было показано, что ДНФ-ИНТ не участвует в переносе электронов на молекулярный O_2 (Trebst и др., 1978; Khorobrykh, Ivanov, 2002). На основе ранее полученных экспериментальных данных (Khorobrykh, Ivanov, 2002) о восстановлении кислорода в ПХ пуле в присутствии ДНФ-ИНТ, для исследования были выбраны три значения рН: 5.0 (при котором восстановление кислорода в ПХ пуле практически не происходит), а также при рН 6.5 и 7.8, при которых восстановление кислорода должно наблюдаться (см. Обзор литературы). На Рис. 21 показано, что увеличение интенсивности света приводило к росту скорости поглощения кислорода в контрольных условиях при всех значениях рН, в то время как скорость поглощения кислорода в присутствии 5 мкМ ДНФ-ИНТ была ниже, и насыщение этой скорости наблюдали уже при низкой интенсивности света (Рис. 21А, Б, В).

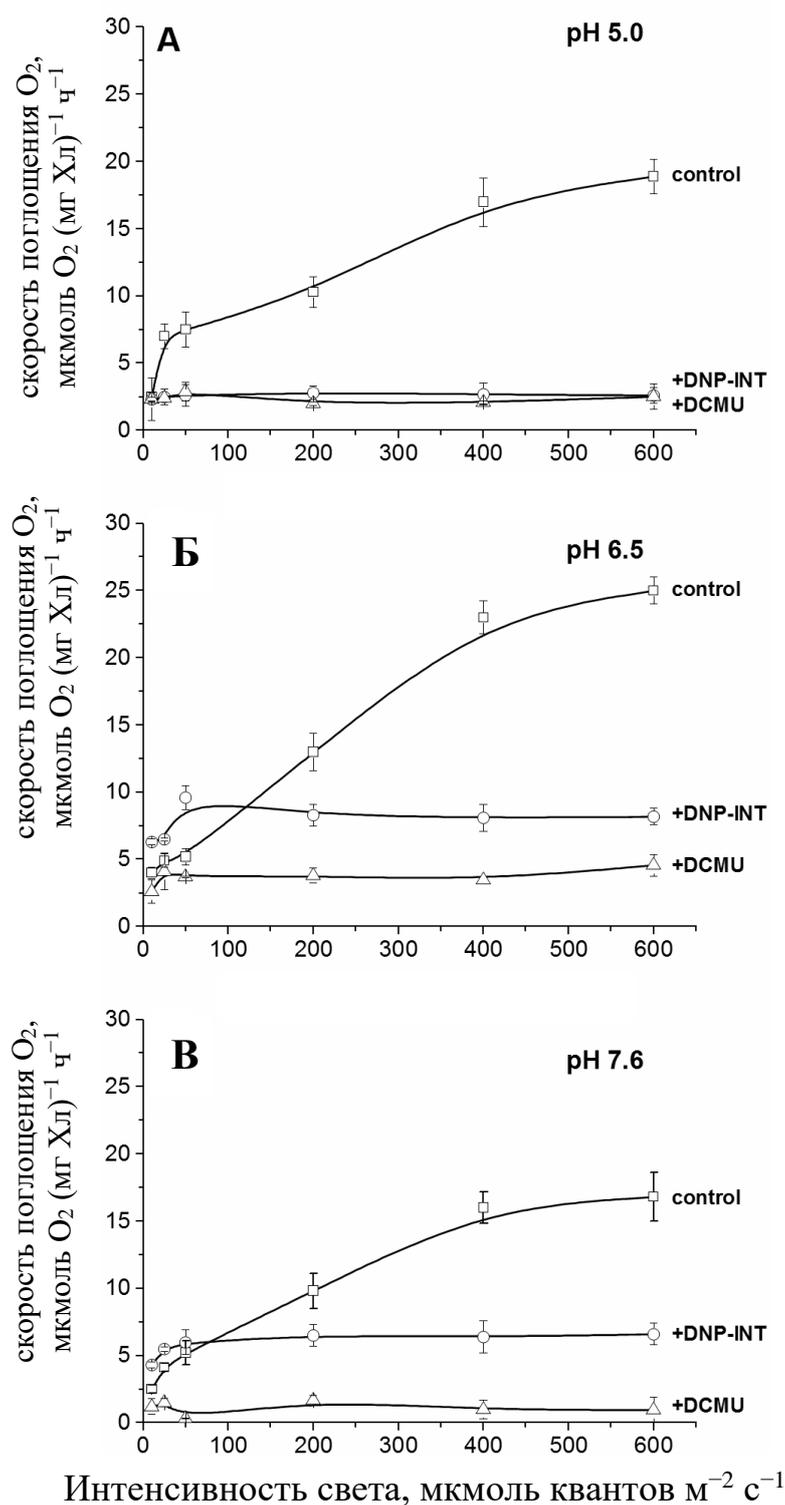


Рис. 21. Влияние интенсивности света на скорость поглощения кислорода в отсутствие (control) и присутствии 5 мкМ ДНФ-ИНТ (DNP-INT) или 10 мкМ диурона (DCMU) в изолированных тилакоидах гороха. Грамицидин Д (1 мкМ) был добавлен во всех случаях. (А) pH 5.0; (Б) pH 6.5; (В) pH 7.6. Количество тилакоидов соответствовало концентрации 15 мкг Хл мл⁻¹.

Добавление метилвиологена (Мв), акцептора электронов от ФСІ, к суспензии тилакоидов в присутствии 5 мкМ ДНФ-ИНТ не оказывало никакого влияния на скорость поглощения кислорода (не показано), что свидетельствует о

том, что ДНФ-ИНТ при этой концентрации полностью блокировал перенос электронов к ФС I, что соответствовало ранее полученным результатам (Khorobrykh, Ivanov, 2002). Необходимо отметить, что в присутствии DCMU поглощение кислорода практически не наблюдали (Рис. 21). Поскольку скорость поглощения кислорода в присутствии ДНФ-ИНТ выше, чем в присутствии диурона, разница между этими скоростями может объясняться, главным образом, восстановлением кислорода компонентами ПХ пула.

Эксперименты, оценивающие влияние добавки ДНФ-ИНТ к суспензии тилакоидов, показали, что скорость восстановления O_2 при pH 6.5 и 7.6 в присутствии ДНФ-ИНТ была выше, чем при pH 5.0 при всех интенсивностях света. Скорость восстановления O_2 в присутствии ДНФ-ИНТ при pH 5.0 была равна скорости в присутствии диурона, т.е. восстановление O_2 в ПХ пуле не происходило в этом случае. В связи с тем, что в диапазоне pH от 5.0 до 6.5 разница в окислительно-восстановительных потенциалах пары ПХ/ПХ^{•-} (рК = 6.0; $E_{m7} = -170$ мВ) и $O_2/O_2^{•-}$ (рК = 4,8; $E_{m7} = -160$ мВ) сдвигается от + 50 мВ, что неблагоприятно для восстановления O_2 , до -10 мВ, что благоприятно для восстановления O_2 , можно предположить, что при pH 6.5 и 7.6 в присутствии ДНФ-ИНТ именно молекулы ПХ^{•-} восстанавливают O_2 до $O_2^{•-}$.

В отсутствие ДНФ-ИНТ восстановление O_2 при низкой интенсивности света осуществляется в основном за счет терминальных электронных кофакторов ФС I, F_A/F_B. Известно, что низкая скорость восстановления молекулярного кислорода изолированными тилакоидами (Asada и др., 1974, Хоробрых и др. 2004) или изолированными комплексами ФС I (Kozuleva и др., 2014) является результатом низкой константы скорости восстановления O_2 этими железосерными кофакторами. Например, Фд, который также является железосерным белком, является слабым восстановителем молекулярного кислорода (Asada и др., 1974); константа скорости реакции восстановленного Фд с O_2 составляет $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Golbeck, Radmer 1984; Hosein, Palmer, 1983; Kozuleva и др., 2007). Благодаря низкому значению константы скорости второго порядка этой реакции ощутимая скорость поглощения кислорода, опосредованная Фд, может быть достигнута только тогда, когда восстановленный Фд накапливается в большом количестве (Telfer и др., 1970; Allen, 1975; Kozuleva, Ivanov, 2016). Добавление ДНФ-ИНТ должно приводить к более высокому уровню восстановления ПХ пула при низкой интенсивности света по сравнению с ситуацией в отсутствие ДНФ-ИНТ. Поэтому концентрация свободных молекул ПХ^{•-} должна быть выше в присутствии ДНФ-

ИНТ. Хотя эта концентрация и низкая, $\approx 10^{-12}$ моль (мг Хл) $^{-1}$ (Mubarakshina, Ivanov, 2010), по сравнению с количеством реакционных центров ФС I в тилакоидах, $\approx 2.5 \times 10^{-9}$ моль (мг Хл) $^{-1}$, высокая константа скорости второго порядка реакции $\text{ПХ}^{\bullet-} + \text{O}_2$, $\approx 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Wardman, 1990), обеспечивает значительную скорость восстановления кислорода при pH 6.5 и 7.6 и низкой интенсивности света в присутствии ДНФ-ИНТ. Следовательно, скорость восстановления O_2 оказывается выше, чем восстановление O_2 при работе всей ФЭТЦ в отсутствие ингибиторов.

В условиях повышенной освещенности восстановление O_2 в ФС I осуществляется не только F_A/F_B , но и в большей степени филлосемихиноном ($\text{ФХ}^{\bullet-}$) (Kozuleva, Ivanov, 2016). Скорость восстановления O_2 $\text{ФХ}^{\bullet-}$ заметно возрастает при высокой интенсивности света (Козулева и др., 2014). Таким образом, скорость восстановления O_2 при работе полной цепи оказывается выше при высокой интенсивности света, чем в присутствии ДНФ-ИНТ. На основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что при высокой интенсивности света именно ФС I является главным генератором $\text{O}_2^{\bullet-}$ в ФЭТЦ и, таким образом, «поставщиком» этих радикалов для реакции $\text{ПХН}_2 + \text{O}_2^{\bullet-}$ в данных условиях, при которых наблюдается образование «мембранного» пероксида водорода [*10, *4, *5, *11, *12].

3.4. Обнаружение выхода пероксида водорода, образованного компонентами ФЭТЦ внутри хлоропласта, за пределы хлоропласта

H_2O_2 – одна из наиболее важных сигнальных молекул среди АФК. Важным фактором для осуществления ретроградной сигнализации (сигнала от органелл к ядру) является способность АФК диффундировать на значительные расстояния от места образования до места передачи сигнала. Нами была изучена возможность диффузии H_2O_2 через мембраны оболочки хлоропласта. Методом ЭПР с применением гидрофильной спиновой ловушки 4-POBN, взаимодействующей с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, было исследовано образование H_2O_2 при освещении интактных хлоропластов, выделенных из листьев шпината. В экспериментах, проведенных ранее с изолированными тилакоидами и спиновой ловушкой 4-POBN (Рис. 13), было показано, что при увеличении интенсивности света увеличение суммарной продукции H_2O_2 компонентами ФЭТЦ происходит, в основном, за счет увеличения образования «мембранного» H_2O_2 . Как показано в

предыдущих разделах, мембранная фракция H_2O_2 является результатом реакции (2) $\text{PXH}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{PX}^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2$. Таким образом, можно констатировать, что именно ПХ пул вносит наибольший вклад в образование H_2O_2 при высокой интенсивности света.

В экспериментах с интактными фотосинтетически активными хлоропластами, выделенными из листьев шпината, был зарегистрирован ЭПР сигнал нитроксидных радикалов, образующихся в результате реакции 4-РОВН с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, при освещении суспензии хлоропластов белым светом интенсивностью 1200 мкмоль квантов $\text{m}^{-2} \text{c}^{-1}$ в течение 3-х минут (Рис. 22б). В темноте, как и в случае с тилакоидами, этот сигнал был практически нулевым (Рис. 22а). При освещении суспензии хлоропластов в присутствии KCN, ингибитора аскорбатпероксидазы, ЭПР-сигнал был примерно в пять раз выше (Рис. 22в), чем в его отсутствие. Добавление разобщителя электронного транспорта NH_4Cl в присутствии KCN еще больше увеличивало амплитуду регистрируемого сигнала (Рис. 22г), который в этом случае практически соответствовал амплитуде сигнала, измеренного после освещения тилакоидов. Увеличение сигнала в этом случае, вероятно, происходило вследствие прекращения синтеза АТФ и восстановления CO_2 , что приводило к увеличению потока электронов на молекулярный кислород.

Используемая спиновая ловушка является гидрофильной, коэффициент распределения октанол/вода составляет 0.15 (Janzen и др., 1996; Hirano и др., 2005). Чтобы продемонстрировать, что с помощью этой ловушки был измерен пероксид водорода, оказавшийся за пределами хлоропласта, ЭПР-сигнал нитроксильного радикала был измерен в отдельных экспериментах в супернатанте после центрифугирования освещенной суспензии хлоропластов. Величина сигнала, измеренного при работе с супернатантом (Рис. 22д), и величина сигнала, измеренного при работе с суспензией хлоропластов (Рис. 22б), сопоставимы. Таким образом, было найдено, что часть молекул H_2O_2 , образующихся внутри хлоропластов, способны диффундировать через мембрану хлоропластов, несмотря на работу антиоксидантных систем в строме. При этом, количество H_2O_2 , способного диффундировать из хлоропластов, увеличивалось значительно при ингибировании аскорбатпероксидазы, основного фермента антиоксидантной системы, утилизирующей H_2O_2 в хлоропластах.

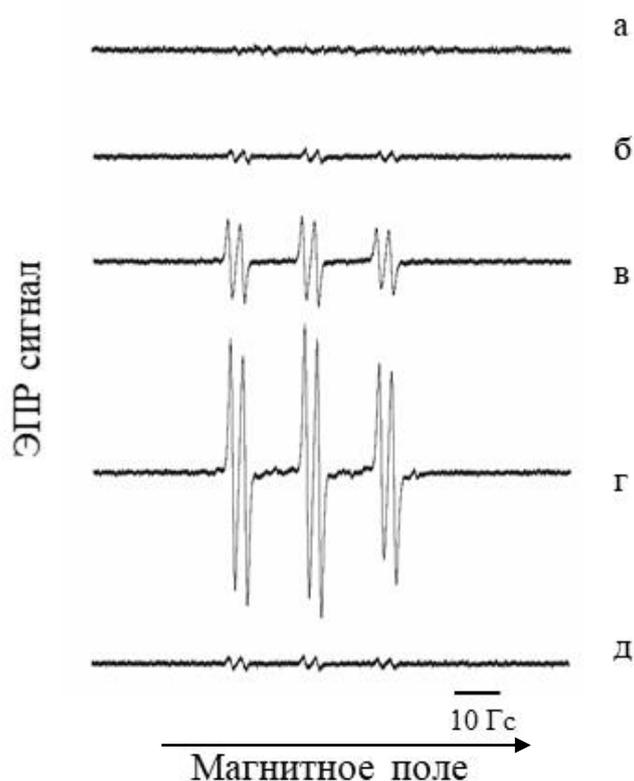


Рис. 22. ЭПР сигнал нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-РОВН с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, в суспензии интактных хлоропластов в темноте (а), при освещении (б), при освещении в присутствии KCN (1 мМ) (в), присутствии KCN (1 мМ) и NH_4Cl (10 мМ) (г), в супернатанте после центрифугирования освещенной суспензии хлоропластов (д). Интенсивность белого света $1200 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Количество хлоропластов соответствовало концентрации $50 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$, рН 7.6. Освещение в течение 3 минут. Спектры показаны в одном масштабе. 0.5 мМ 3-фосфоглицерат и 4 мМ NaHCO_3 были добавлены.

Возникает вопрос не только о количестве H_2O_2 , образуемого компонентами ФЭТЦ хлоропластов, но и о том, какое количество от этого образовавшегося H_2O_2 диффундирует из хлоропласта за его пределы. Для количественной оценки была построена калибровочная кривая ЭПР сигнала, показывающая зависимость ЭПР сигнала от концентрации раствора H_2O_2 (Рис. 23).

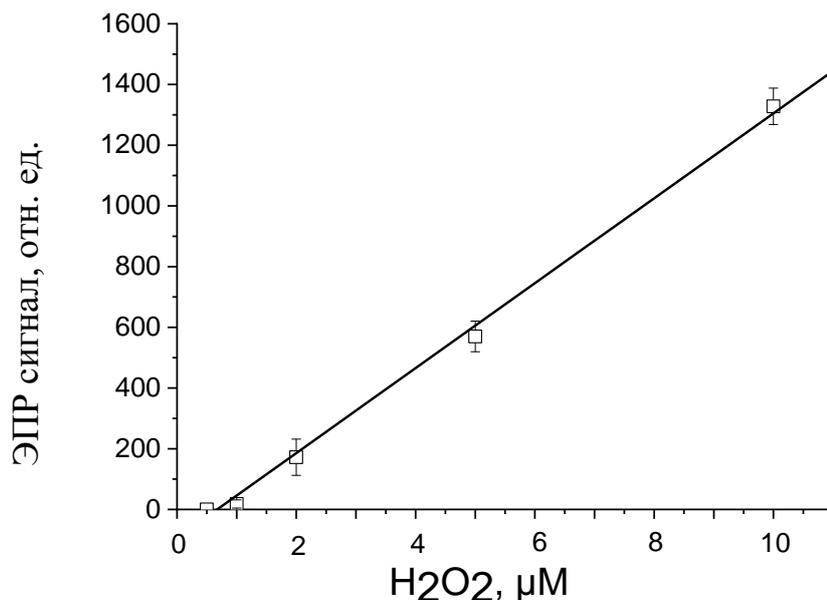


Рис. 23. Зависимость ЭПР сигнала нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H₂O₂-зависимой реакции, от концентрации H₂O₂. Время инкубации H₂O₂ с FeEDTA, 4-POBN и этанолом, как и в случае измерений с тилакоидами или хлоропластами, составляло 3 минуты. pH 7.6. Показаны средние значения и стандартное отклонение для четырех измерений.

Как показано на Рис. 23, величина сигнала ЭПР линейно возрастает с увеличением концентрации H₂O₂. Чувствительность метода/спиновой ловушки в наших экспериментах составила ≥ 1 мкМ H₂O₂.

Как представлено на Рис. 24, ЭПР сигнал нитроксильных радикалов, измеренный при работе с интактными хлоропластами, увеличивается с увеличением как интенсивности света (Рис. 24А), так и времени освещения (Рис. 24Б). Максимальная величина ЭПР сигнала была достигнута в диапазоне интенсивностей света 1000–1500 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ (Рис. 24А), при которой фотосинтетическая фиксация CO₂ в интактных хлоропластах и скорость транспорта электронов в тилакоидах также достигают максимальных значений (Walker, Osmond, 1986; Zhi-Fang и др., 1999; Khorobrykh и др., 2004). Величины ЭПР сигналов, полученных при освещении хлоропластов в течение 3-х минут при 400–1200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, соответствуют концентрации H₂O₂ 5–9 мкМ. Расчеты показали, что скорость появления H₂O₂ за пределами хлоропластов составляет 2 мкМ H₂O₂ мг⁻¹ Хл ч⁻¹ при 400 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, когда использовали хлоропласты с концентрацией хлорофилла 50 мкг Хл мл⁻¹. Если сравнить величину ЭПР сигнала, полученную при работе с изолированными

тилакоидами (Рис. 12б), и с изолированными хлоропластами (Рис. 22б), то можно рассчитать, что «хлоропластный» сигнал представляет собой в среднем 5% от «тилакоидного» сигнала (Табл. 3). Если 5% соответствует $2 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2 (\text{мг Хл})^{-1} \text{ ч}^{-1}$, то 100% будет соответствовать скорости образования H_2O_2 , равной $40 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл ч}^{-1}$, что соотносится с данными ранее опубликованных работ с использованием кислородного электрода (Мапо и др., 2001; Хоробрых и др., 2004; Мубаракшина и др., 2006).

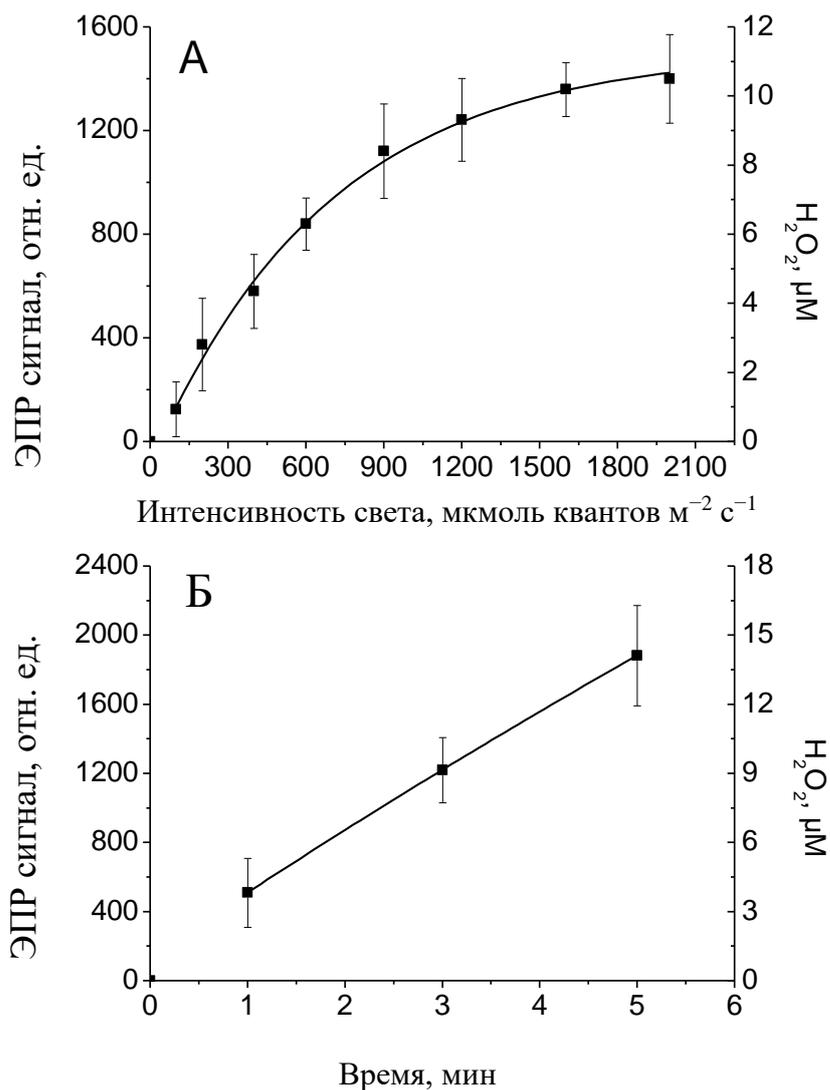


Рис. 24. Влияние интенсивности света (А) и времени освещения (Б) на величину ЭПР сигнала нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-РОВН с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции. 0.5 мМ 3-фосфоглицерат и 4 мМ NaHCO_3 добавляли к суспензии хлоропластов до освещения. Концентрация хлорофилла $50 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$. рН 7.6. Освещение в течение 3-х минут. Представлены средние значения и стандартное отклонение четырех измерений. Б – интенсивность белого света $1200 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Табл. 3. Величина ЭПР сигнала (%) нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции. Образцы ($50 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$) освещали в течение 3-х минут при $1200 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, в присутствии спиновой ловушки 4-POBN (50 мМ). Сразу после освещения добавляли 50 мкМ FeEDTA и 4% этанол. 100% – сигнал, полученный после освещения тилакоидов.

	ЭПР сигнал, %
Тилакоиды, темнота	0
Тилакоиды, освещение	100
Хлоропласты, темнота	0
Хлоропласты, освещение	5 ± 1.4

Диффузия H_2O_2 была визуально подтверждена с помощью конфокальной микроскопии с применением флуоресцентного 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина (Amplex Red). В присутствии фермента пероксидазы Amplex Red реагирует с H_2O_2 в стехиометрии 1:1, в результате чего образуется флуоресцентный продукт окисления реагента Amplex Red, резорурфин. Amplex Red не способен проникнуть через оболочку хлоропласта внутрь хлоропласта, поэтому может взаимодействовать с пероксидом водорода только вне хлоропластов. Была зарегистрирована динамика появления флуоресценции резорфурина вокруг хлоропластов в ответ на освещение (Рис. 25А). Рост флуоресценции резорфурина вокруг хлоропластов в ответ на освещение полностью ингибировался в присутствии диурана, ингибитора фотосинтетического электронного транспорта (Рис. 25Б) и в присутствии каталазы – фермента, разлагающего пероксид водорода (Рис. 25В).

С применением флуоресцентного красителя Amplex Red при работе на спектрофлуориметре дополнительно проводили оценку количества H_2O_2 вне хлоропластов с помощью измерений окисления флуоресцентного красителя. После построения калибровочной кривой с известными концентрациями пероксида водорода было рассчитано, что приблизительно $150 \text{ нМ } H_2O_2$ регистрируется вне хлоропластов при интенсивности света $200 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ через 3 минуты освещения суспензии хлоропластов (концентрация хлорофилла 3 мкг Хл мл^{-1}) (Рис. 26). Это хорошо согласуется с данными, полученными в экспериментах с использованием 4-POBN: расчетные данные показывают, что приблизительно $125 \text{ нМ } H_2O_2$ при такой же интенсивности света и времени освещения регистрируется, если использовать концентрацию

хлорофилла 3 мкг Хл мл^{-1} вместо $50 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$ в экспериментах с применением спиновой ловушки 4-POBN и метода ЭПР.

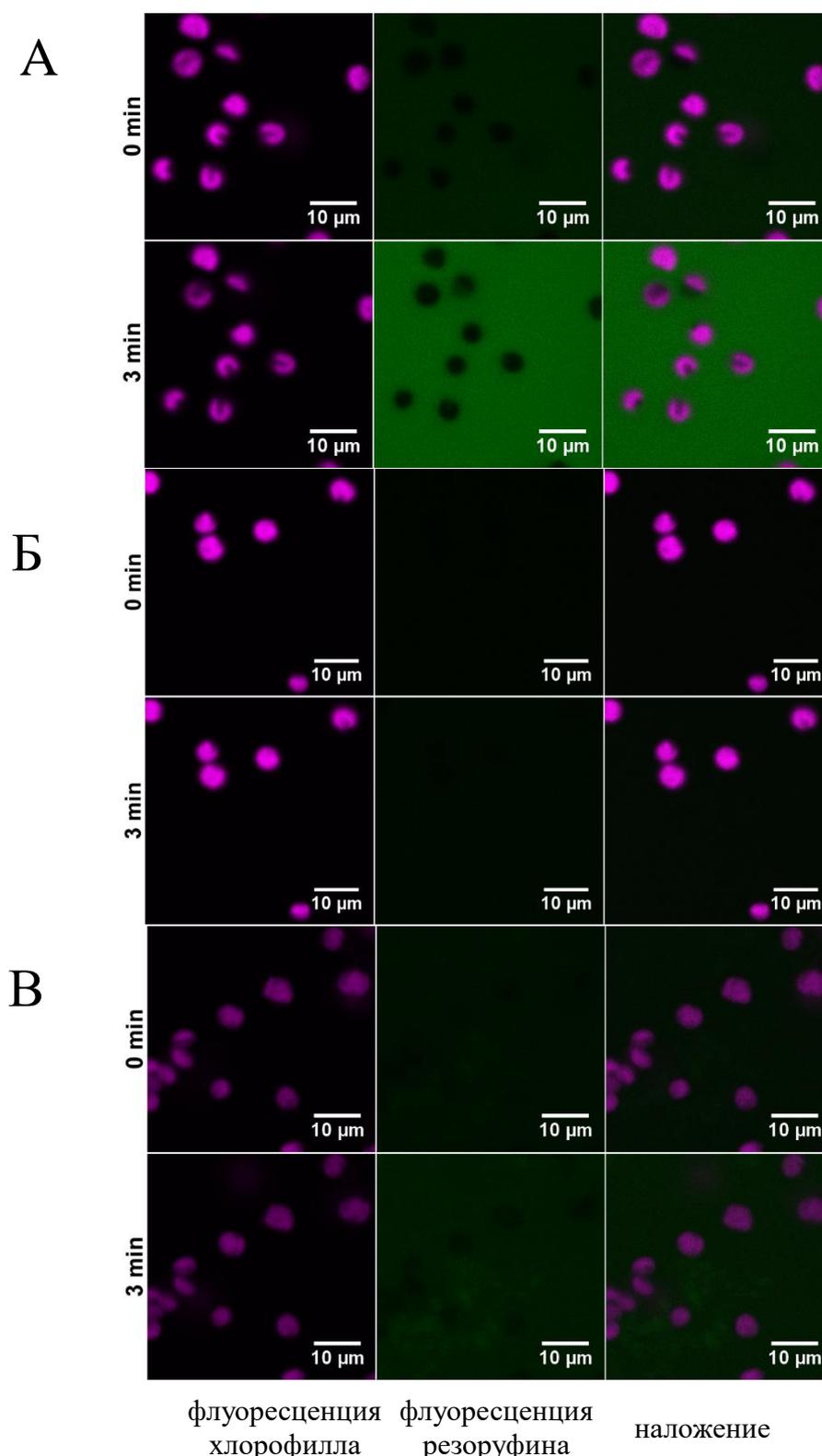


Рис. 25. Конфокальная визуализация флуоресценции резорурфина в суспензии хлоропластов в присутствии пероксидазы хрена (10 ед. мл^{-1}) и NaHCO_3 (4 мМ). Фиолетовый цвет – флуоресценция хлорофилла; зеленый – резорурфина; и наложение. Лазер с длиной волны 488 нм использовали для возбуждения резорурфина и в качестве актиночного света $700\text{--}800 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. 0 min – до освещения, 3 min – освещение в течение 3-х минут. А – без добавок; Б – в присутствии диурона (10 мкМ); В – в присутствии каталазы (1000 ед. мл^{-1}).

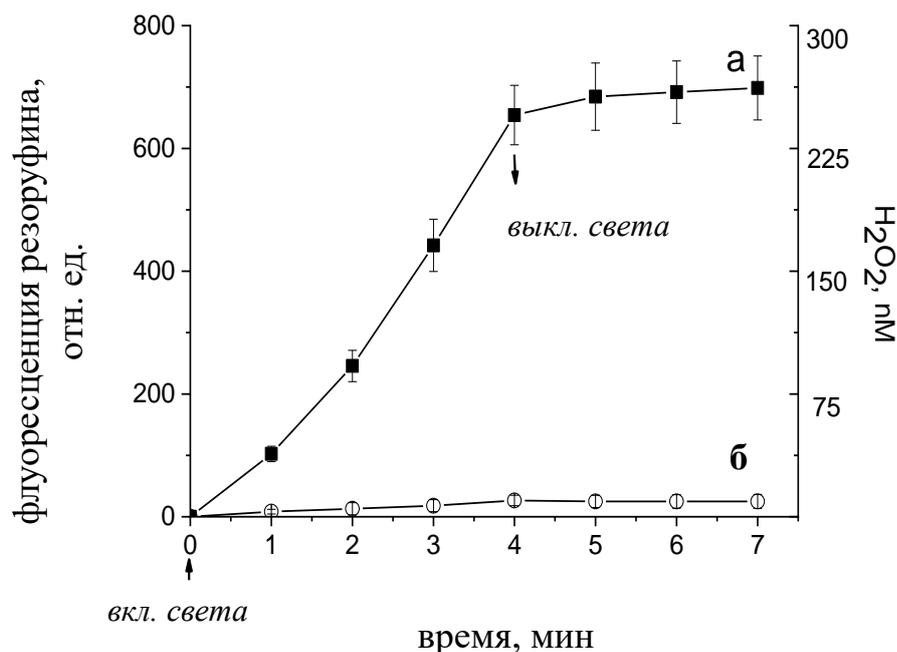


Рис. 26. Регистрация H_2O_2 вне хлоропластов с применением флуоресцентного красителя Amplex Red (а). 0.5 мМ 3-фосфоглицерат и 4 мМ $NaHCO_3$ добавляли к суспензии хлоропластов до освещения. Концентрация хлорофилла 3 мкг Хл мл⁻¹. рН 7.6. Представлены средние значения и стандартное отклонение четырех измерений для каждой точки. Интенсивность синего света 200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. В качестве контроля был измерен образец, не содержащий хлоропласты (б).

Кроме того, диффузия H_2O_2 была исследована в работе с протопластами – изолированными клетками растений – с помощью конфокальной микроскопии с применением флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H_2DCF -DA), образующего при реакции с H_2O_2 флуоресцирующий продукт дихлорфлуоресцеин (DCF) (Рис. 27).

Преимуществом H_2DCFDA , по сравнению с Amplex Red, является его способность проникать внутрь клетки и хлоропласта. После диффузии через мембраны, он деэстерифицируется и затем реагирует с АФК, в основном с H_2O_2 , с образованием флуоресцентного продукта DCF.

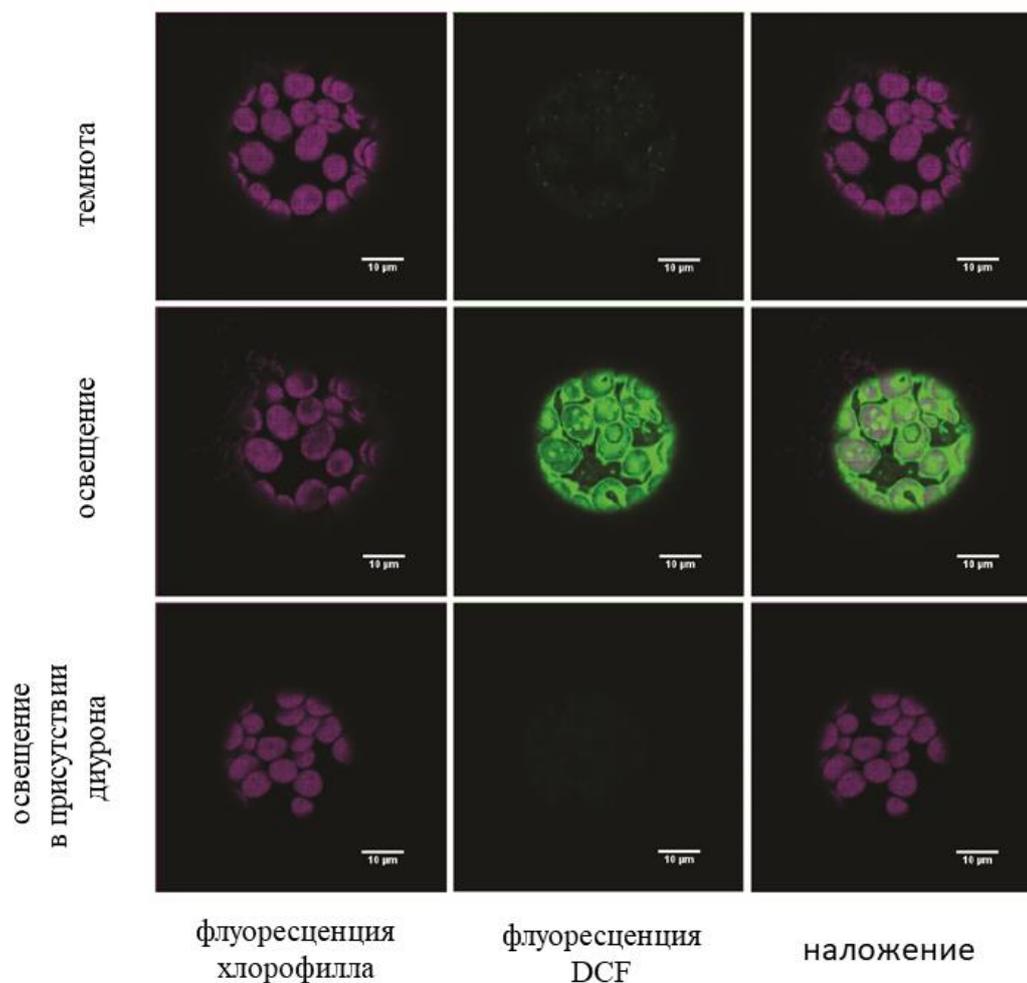


Рис. 27. Конфокальная визуализация флуоресценции дихлорфлуоресцеина (DCF) в суспензии протопластов. Фиолетовый цвет – флуоресценция хлорофилла; зеленый цвет – флуоресценция дихлорфлуоресцеина; и наложение. Лазер с длиной волны 488 нм использовали для возбуждения дихлорфлуоресцеина и в качестве актиничного света ($1500 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). Где указано, был добавлен диурон (10 мкМ).

При освещении (5 мин) протопластов наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции DCF как внутри хлоропластов, так и в непосредственной близости от хлоропластов (Рис. 27). Стоит отметить, что внутри протопластов H_2O_2 образуется и другими органеллами, такими как пероксисомы, митохондрии, а также компонентами плазматической мембраны. Однако в присутствии диурона флуоресценция DCF практически не обнаруживалась, что указывает на то, что детектируемая в отсутствие диурона флуоресценция DCF была вызвана образованием пероксида водорода в ФЭТЦ хлоропластов.

Для оценки скорости поглощения O_2 в реакции Мелера *in vivo*, приводящего к образованию H_2O_2 в хлоропластах, в зависимости от

интенсивности света, проводили масс-спектрометрические измерения на листовых дисках 4–5-недельных растений арабидопсиса с применением CO_2 и изотопов $^{18}\text{O}_2$. Диски помещали в герметичную закрытую камеру и продували азотом (N_2) до начала измерений. Измерения проводили с помощью мембранной масс-спектрометрии (мембранный ввод, a membrane inlet mass spectrometry) (MIMS) (Максвелл и др., 1998; Бекман и др., 2009). Для подавления оксигеназной активности Рубиско измерения проводили при насыщающей концентрации CO_2 (Canvin и др., 1980). Скорость поглощения O_2 в результате дыхания листьев в темноте, измеренное как поглощение $^{18}\text{O}_2$ в темноте, была вычтена из скорости поглощения $^{18}\text{O}_2$ при освещении; разница была приписана поглощению O_2 в реакции Мелера. Результаты показали, что светозависимая скорость поглощения O_2 в этом случае составляла 0.36, 1.1 и 2.2 мкмоль $\text{O}_2 \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при 100, 650 и 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ белого света, соответственно. Эти значения составляли в среднем 4% от общего потока переноса электронов (измерено по скорости выделения $^{16}\text{O}_2$) при 100 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, 7% – при 650 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и 11% – при 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (Рис. 28).

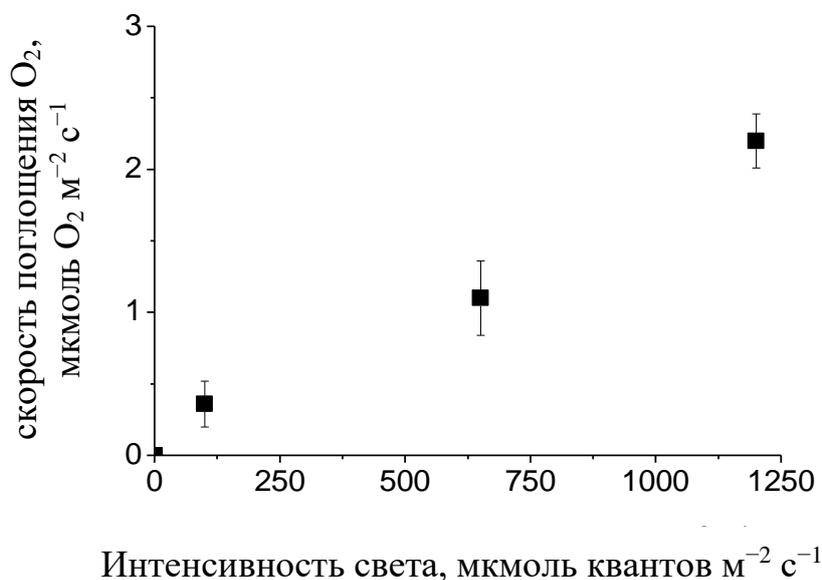


Рис. 28. Масс-спектрометрические измерения поглощения кислорода (поглощение $^{18}\text{O}_2$) *in vivo*. Используются листовые диски растений арабидопсиса. Представлены средние значения и стандартное отклонение трех измерений для каждой точки.

Содержание хлорофилла в СЗ растениях в среднем составляет 0.5 г м^{-2} , в растениях арабидопсиса 0.26 г м^{-2} (Lawlor, 1987). С учетом этих значений, данные масс-спектрометрии для сопоставления с предыдущими данными были пересчитаны в скорости поглощения O_2 ($\text{мг Хл}^{-1} \text{ ч}^{-1}$), что соответствует 4.9, 15.2 и

30.4 мкмоль O_2 (мг Хл) $^{-1}$ ч $^{-1}$ при 100, 650 и 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ света, соответственно. Принимая во внимание стехиометрию поглощения $^{18}O_2$ и образования H_2O_2 как 1: 1, полученные данные масс-спектрометрических измерений будут соответствовать скорости образования H_2O_2 в хлоропластах при освещении. Если 5% – это минимальная фракция H_2O_2 , детектируемая за пределами хлоропластов, то это количество будет соответствовать дапапазону наномолярных концентраций в условиях *in vivo*.

3.5. Изучение механизма диффузии H_2O_2 из хлоропластов

В предыдущем разделе было установлено, что даже при низкой интенсивности света часть H_2O_2 , образовавшегося внутри хлоропластов, выходит в цитоплазму, минуя внутрихлоропластные системы детоксикации. Далее предстояло выяснить, каким образом происходит диффузия H_2O_2 через хлоропластную мембрану. Для выяснения механизма диффузии H_2O_2 из хлоропластов была исследована роль аквапоринов – белков, формирующих поры в хлоропластной мембране, через которые проходят молекулы воды и другие нейтральные молекулы небольшого размера. Этот вопрос является важным, поскольку, если H_2O_2 диффундирует через мембраны с участием аквапоринов, то это регулируемый процесс, который, возможно, вовлечен в «настройку» сигнальных путей, инициируемых H_2O_2 , в то время как нерегулируемый поток H_2O_2 в цитоплазму может привести к деструкции внутриклеточных компонентов.

Аквапорины, как было продемонстрировано Uehlein и др. (2008), расположены на внутренней хлоропластной мембране. Для установления роли аквапоринов в диффузии H_2O_2 в работе с интактными хлоропластами шпината были применены ингибиторы аквапоринов. В основном, действие известных ингибиторов аквапоринов основано на взаимодействии с сульфгидрильными группами консервативных доменов белков, входящих в состав аквапоринов, что приводит к закрытию водных каналов. Такими ингибиторами являются компоненты, в состав которых входят серебро, ртуть или золото, однако многие из них являются токсичными для фотосинтезирующей клетки. Известно, что серебро в виде $AgNO_3$ ингибирует водопроницаемость плазматической мембраны корней (содержащей интегральные белки плазматической мембраны) с высокой активностью (EC_{50} 1–10 мкМ) (Niemietz, Tyerman, 2002). Было изучено влияние $AgNO_3$ в разных концентрациях на скорость транспорта электронов в ФЭТЦ с

использованием изолированных тилакоидов шпината (Табл. 4). Активность тилакоидов оценивали по скорости выделения O_2 в суспензии тилакоидов в присутствии 1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ (феррицианида, Фц) в качестве акцептора электронов. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что $AgNO_3$ может быть использован в концентрациях, не превышающих 20 мкМ, поскольку увеличение концентрации $AgNO_3$ выше 20 мкМ приводит к снижению скорости электронного транспорта в ФЭТЦ.

Табл. 4. Влияние $AgNO_3$ на фотосинтетическую активность изолированных тилакоидов в присутствии 1 мМ феррицианида (Фц). Концентрация тилакоидов соответствовала 20 мкг Хл мл⁻¹. рН 7.6. Освещение в течение 3-х минут. Представлены средние значения и стандартное отклонение четырех измерений для каждой точки. Интенсивность красного света 500 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹.

Добавки	Скорость выделения O_2 в суспензии тилакоидов, мкмоль O_2 (мг Хл) ⁻¹ ч ⁻¹ (в присутствии Фц)
Контроль	92 ± 3.1
2 мкМ $AgNO_3$	89 ± 2.0
10 мкМ $AgNO_3$	87 ± 2.3
20 мкМ $AgNO_3$	84 ± 2.5
100 мкМ $AgNO_3$	80 ± 2.6

Однако, если при работе с изолированными тилакоидами $AgNO_3$ в концентрации 20 мкМ практически не оказывал влияния на ФЭТЦ, то при работе с интактными хлоропластами было показано, что фотосинтетическая активность хлоропластов ингибировалась полностью при добавке 20 мкМ $AgNO_3$ (Табл. 5). Полученный результат может быть объяснен двумя причинами: $AgNO_3$ уменьшает доступность CO_2 в цикл Кальвина-Бенсона, поскольку молекулы CO_2 также проникают внутрь хлоропласта с помощью аквапоринов, или $AgNO_3$ ингибирует ферменты цикла Кальвина-Бенсона. Для того, чтобы избежать возможного влияния $AgNO_3$ на фиксацию CO_2 хлоропластами, последующие

эксперименты проводили в присутствии Мв в качестве акцептора электронов от ФС I, что предотвращает фиксацию CO_2 .

Табл. 5. Влияние AgNO_3 на фотосинтетическую активность изолированных хлоропластов. 4 мМ NaHCO_3 добавляли к суспензии хлоропластов до освещения. Концентрация тилакоидов соответствовала $50 \text{ мкг Хл мл}^{-1}$. рН 7.6. Освещение в течение 3-х минут. Представлены средние значения и стандартное отклонение трех измерений для каждой точки. Интенсивность красного света $500 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Добавки	Изменение концентрации O_2 в суспензии хлоропластов, $\text{мкмоль O}_2 (\text{мг Хл})^{-1} \text{ ч}^{-1}$ (в присутствии CO_2)	
	$\text{O}_2 \uparrow$	$\text{O}_2 \downarrow$
Контроль	58.7 ± 5.9	-
2 мкМ AgNO_3	45.7 ± 6.2	-
10 мкМ AgNO_3	3.8 ± 0.7	-
20 мкМ AgNO_3	-	3.4 ± 1.3

Для исследования диффузии H_2O_2 был использован метод конфокальной микроскопии с применением флуоресцентного красителя Amplex Red, в результате взаимодействия которого с H_2O_2 образуется флуоресцентный продукт резорурфин. Как показано на Рис. 29, флуоресценция резорурфина не была обнаружена в темноте, в то время как существенный уровень флуоресценции резорурфина был зарегистрирован после освещения суспензии хлоропластов в течение 3-х минут, свидетельствуя о том, что H_2O_2 в значительном количестве диффундировал из хлоропластов в среду. В присутствии 20 мкМ AgNO_3 после

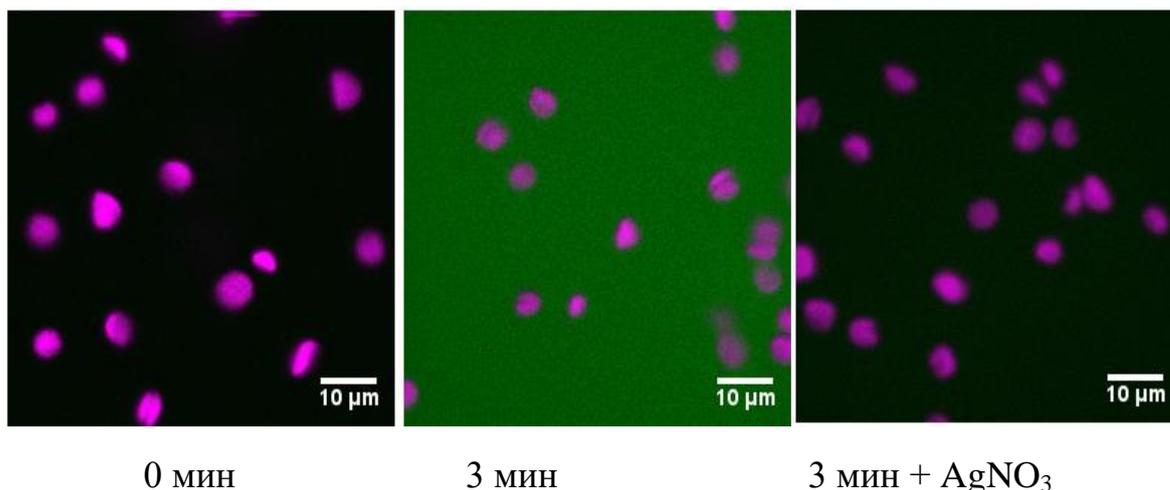


Рис. 29. Конфокальная визуализация флуоресценции резорурфина в суспензии хлоропластов в присутствии пероксидазы хрена (10 ед. мл⁻¹) и Мв (25 мкМ). 20 мкМ AgNO₃. Фиолетовый цвет – флуоресценция хлорофилла; зеленый – резорурфина. Лазер с длиной волны 488 нм использовали для возбуждения резорурфина и в качестве актиничного света (700–800 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹). 0 мин – до освещения, 3 мин – освещение в течение 3-х минут.

освещения хлоропластов свечение резорурфина вокруг хлоропластов практически отсутствовало (Рис. 29).

В дальнейшем в качестве ингибитора аквапоринов нами был использован ацетазоламид (AZA). AZA – это известный ингибитор карбоангидраз, однако по данным литературы известно, что AZA, взаимодействуя с определенными аминокислотными остатками белков (таких, как Arg, Gly, Asp, Ser, His, Ile, Asn), входящих в состав аквапоринов, приводит к блокированию транспорта воды через аквапорины (Gao и др., 2006; Haddoub и др., 2009; Huber и др., 2007). Поэтому в настоящее время AZA используется не только как ингибитор карбоангидраз, но также и как эффективный ингибитор аквапоринов. Более того, и этоксизоламид (EZA), который также является специфическим ингибитором карбоангидраз, способен ингибировать аквапорины. Однако нами был выбран AZA, поскольку известно, что он, в отличие от EZA, плохо проникает через мембраны. Для того, чтобы избежать возможного влияния AZA на фиксацию CO₂ хлоропластами, также, как и в случае экспериментов с AgNO₃, в качестве акцептора электронов использовали Мв. В дополнительных экспериментах было найдено, что AZA влияет на скорость электронного транспорта в изолированных тилакоидах при добавке Мв в отсутствие разобщителя электронного транспорта грамицидина Д незначительно, но в присутствии разобщителя существеннее (Табл. 6).

Табл. 6. Влияние AZA на фотосинтетическую активность изолированных тилакоидов в присутствии 25 мкМ Мв. Концентрация хлорофилла 20 мкг Хл мл⁻¹. рН 7.6. Освещение в течение 3-х минут. Представлены средние значения и стандартное отклонение трех измерений для каждой точки. Интенсивность красного света 500 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Где указано, 1 мМ AZA и 1 мкМ грамицидин Д (ГрД) были добавлены.

Добавки	Поглощение O ₂ в суспензии тилакоидов, мкмоль O ₂ (мг Хл) ⁻¹ ч ⁻¹
Тилакоиды + Мв	37.9 ± 4.1
Тилакоиды + Мв + ГрД	191.2 ± 8.4
Тилакоиды + Мв + AZA	35.4 ± 2.7
Тилакоиды + Мв + ГрД + AZA	131.4 ± 2.2

Используя интактные хлоропласты, выделенные из листьев шпината, мы показали, что после освещения хлоропластов уровень флуоресценции резорурфина вокруг хлоропластов в присутствии AZA было гораздо ниже, чем в отсутствие AZA (Рис. 30). Через 3 минуты освещения хлоропластов уровень флуоресценции резорурфина вокруг хлоропластов в присутствии AZA был на 60% ниже, чем в отсутствие AZA.

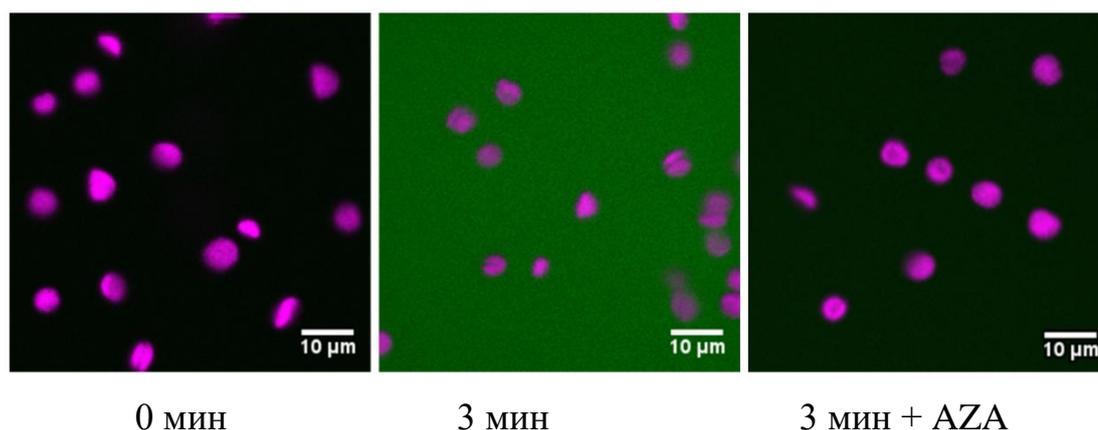


Рис. 30. Влияние добавки 1 мМ AZA на флуоресценцию резорурфина в суспензии хлоропластов в присутствии пероксидазы хрена (10 ед. мл⁻¹) и Мв (25 мкМ). Фиолетовый цвет – флуоресценция хлорофилла; зеленый – резорурфина. Лазер с длиной волны 488 нм использовали для возбуждения резорурфина и в качестве актиничного света (700–800 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹). 0 мин – до освещения, 3 мин – освещение в течение 3-х минут.

Таким образом, было продемонстрировано, что флуоресценция резорурфина вокруг хлоропластов снижалась в присутствии AZA, в то время как существенного ингибирования фотосинтетического электронного транспорта в присутствии AZA не наблюдалось. Полученные данные свидетельствуют о том, что добавка AZA ингибирует появление H_2O_2 вне хлоропластов за счет блокирования аквапоринов, а не за счет ингибирования электронного транспорта в случае возможного частичного проникновения AZA внутрь хлоропластов. Для проверки связывания AZA с мембранной оболочкой хлоропласта изучали влияние инкубации AZA с оболочкой, выделенной из хлоропластов шпината, на активность экзогенно добавленный бычьей карбоангидразы (КА). AZA связывается с КА слабыми нековалентными связями и может легко покинуть сайт связывания после разбавления. Бычья КА является ферментом, который относится к так называемому альфа семейству КА и обладает высокой чувствительностью к ингибитору. Лишь небольшое снижение активности бычьей КА наблюдали при добавлении необработанной мембранной оболочки хлоропластов (Табл. 7), и это, вероятно, результат пересчета активности КА на белок, так как суммарное количество белков увеличивается в присутствии препаратов оболочки. Активность бычьей КА была почти полностью подавлена при добавлении оболочки хлоропластов, обработанной AZA (Табл. 7), что свидетельствует в пользу связывания AZA с оболочкой хлоропласта. Кроме того, было обнаружено, что сама оболочка хлоропласта обладает КА-активностью (Табл. 7). Эти данные могут указывать на наличие КА, связанной(ых) с оболочкой хлоропласта. После инкубации с AZA КА-активность оболочки хлоропласта ингибировалась не полностью, лишь на 57%. Возможно, что КА, связанная с оболочкой хлоропласта высших растений, принадлежит не к альфа семейству КА, а к бета семейству. Подтверждением такого предположения являются данные Perez-Martin и др. (2014), показывающие функционирование бета КА в оболочке хлоропласта в оливковых деревьях. Принимая во внимание, что AZA также ингибирует активность КА, нельзя исключить, что ингибирование диффузии H_2O_2 через мембранную оболочку хлоропласта в присутствии AZA является результатом блокирования непосредственно аквапоринов. В литературе представлены данные о локализации КА вблизи аквапоринов (Xiang и др., 2004). В таком случае можно предположить, что ингибирующее влияние AZA на диффузию H_2O_2 может быть следствием не только связывания AZA с аминокислотными остатками белков-аквапоринов, но и связывания AZA с КА

мембранной оболочки, приводя к конформационным изменениям КА и последующим конформационным изменениям белков-аквапоринов и, следовательно, к изменению активности аквапоринов. Если КА мембранной оболочки хлоропластов связана с аквапоринами, то функционирование этого фермента может оказывать непосредственное влияние на степень открытия аквапоринов [*1, *13, *14].

На основе полученных данных можно заключить, что, используя ингибиторы аквапоринов, AgNO₃ и AZA, мы показали, что молекулы H₂O₂ диффундируют через мембранную оболочку хлоропласта с участием аквапоринов. Эти данные позволяют понять, как H₂O₂, образующийся внутри хлоропластов, может выполнять сигнальную функцию для осуществления ретроградного сигнала.

Табл. 7. Влияние добавки ацетазоламида (AZA) на активность бычьей КА и КА оболочки хлоропласта. Где указано, использовали 0.0011 мг белков изолированной мембранной оболочки хлоропласта и 0.004 мг бычьей КА. Результаты представлены как среднее из двух независимых измерений ± стандартная ошибка.

Добавки	КА-активность, мкмоль Н ⁺ мин ⁻¹ (мг белка) ⁻¹
Бычья КА	7963 ± 294
Бычья КА + мембранная оболочка хлоропласта	6127 ± 70
Бычья КА + мембранная оболочка хлоропласта, обработанная AZA	248 ± 5
Мембранная оболочка хлоропласта	1216 ± 252
Мембранная оболочка хлоропласта, обработанная AZA	523 ± 288

3.6. Установление сигнальной роли H₂O₂ в регуляции размера светособирающего «антенного» комплекса фотосистемы II

Как представлено в главах 3 и 5 литературного обзора, окислительно-восстановительное состояние ПХ пула играет важную роль в запуске сигнальных путей, направленных на регуляцию экспрессии пластидных генов (Pfannschmidt и др., 2008). Более того, редокс-состояние ПХ пула также играет роль сигнала в ретроградном пути сигнализации, от хлоропластов к ядру, где расположено большинство генов хлоропластных белков. Известно, что кратковременное

изменение распределения энергии квантов света между ФС II и ФС I осуществляется за счет обратимого перемещения между фотосистемами внешней части периферических светособирающих пигмент-белковых комплексов ФС II, содержащих белки Lhcb1 и Lhcb2 (state transitions) [*15]. При долговременной повышенной освещенности растений происходит уменьшение размера ФС II за счет подавления биосинтеза этих белков Lhcb1 и Lhcb2, а также белков Lhcb3 и Lhcb6 и их последующего протеолиза. Регуляция размера ССК II – один из механизмов приспособления растений к изменению уровня освещенности. При повышении уровня освещенности уменьшение размера антенны ФС II происходит посредством подавления биосинтеза периферических белков ССК II путем транскрипционной/посттранскрипционной регуляции, разборки светособирающих пигмент-белковых комплексов ФС II, в состав которых входят данные белки, и последующего протеолиза этих белков. При этом значительное снижение наблюдают в уровне содержания таких белков, как Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 (Bailey и др., 2001, Ballottari и др., 2007). Такие изменения необходимы для уменьшения количества поглощаемой энергии квантов света, и как следствие, приспособления растений к действию повышенной освещенности. Принято считать, что высокий уровень восстановления ПХ пула является хлоропластным сигналом для уменьшения размера антенны фотосистемы ФС II. Однако хлоропластный сигнал должен быть вовлечен в систему ретроградной сигнализации, так как гены белков антенны ФС II кодируются ядром. Очевидно, должен существовать носитель информации об окислительно-восстановительном состоянии пула. Однако до сих пор остается невыясненной молекулярная природа сигнала, поступающего из ПХ пула и инициирующего эти адаптационные изменения.

Поскольку в ходе предыдущей работы нами было установлено образование H_2O_2 в ПХ пуле, было предположено, что именно H_2O_2 , генерируемый в реакции $\text{ПХН}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{ПХ}^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2$, может представлять собой сигнал об окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула.

Для исследования роли H_2O_2 в регуляции размера антенны ФС II при освещении были применены 2 подхода:

1. Уменьшение содержания H_2O_2 в листьях растений ячменя при высокой интенсивности света путем инкубации листьев в течение 5-ти дней в растворе, содержащем каталазу.
2. Увеличение содержания H_2O_2 в листьях растений ячменя при низкой интенсивности света путем инкубации листьев в течение 5-ти дней в растворе, содержащем H_2O_2 .

Для экспериментов были использованы 6–10 дневные проростки ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*). Инкубация листьев ячменя при высокой интенсивности света в отсутствие каталазы приводила к значительному увеличению в содержании H_2O_2 в листьях: на 3-ий день – на 40%, на 5-ый день – на 60% (Рис. 31А). Однако в присутствии каталазы в среде инкубации (1200 ед. $мл^{-1}$) содержание H_2O_2 было ниже, и на 5-ый день инкубации при высокой интенсивности света уровень содержания H_2O_2 в присутствии каталазы был сопоставим с уровнем, наблюдаемым в листьях, инкубируемых при низкой интенсивности света (Рис. 31А). Содержание H_2O_2 при инкубации листьев ячменя при низкой интенсивности света не изменялось во время всего периода инкубации.

При инкубации листьев ячменя при низкой интенсивности света в среде инкубации в отсутствие и в присутствии H_2O_2 количество H_2O_2 незначительно повышалось в листьях, инкубированных в присутствии 50 мМ H_2O_2 , по сравнению с контрольными листьями. Инкубация листьев в растворе, содержащем 100 мМ H_2O_2 , приводила к повышению уровня H_2O_2 в листьях на 25% по сравнению с контрольными листьями на 3-ий день и к двукратному увеличению этого уровня на 5-ый день инкубации (Рис. 31Б). На 5-ый день инкубации содержание H_2O_2 в листьях, инкубированных в присутствии 100 мМ H_2O_2 , было схоже с таковым, измеренным в листьях, инкубированных при высокой интенсивности света. Это дает обоснование применения данного подхода для исследования роли H_2O_2 в регуляции размера антенны ФС II.

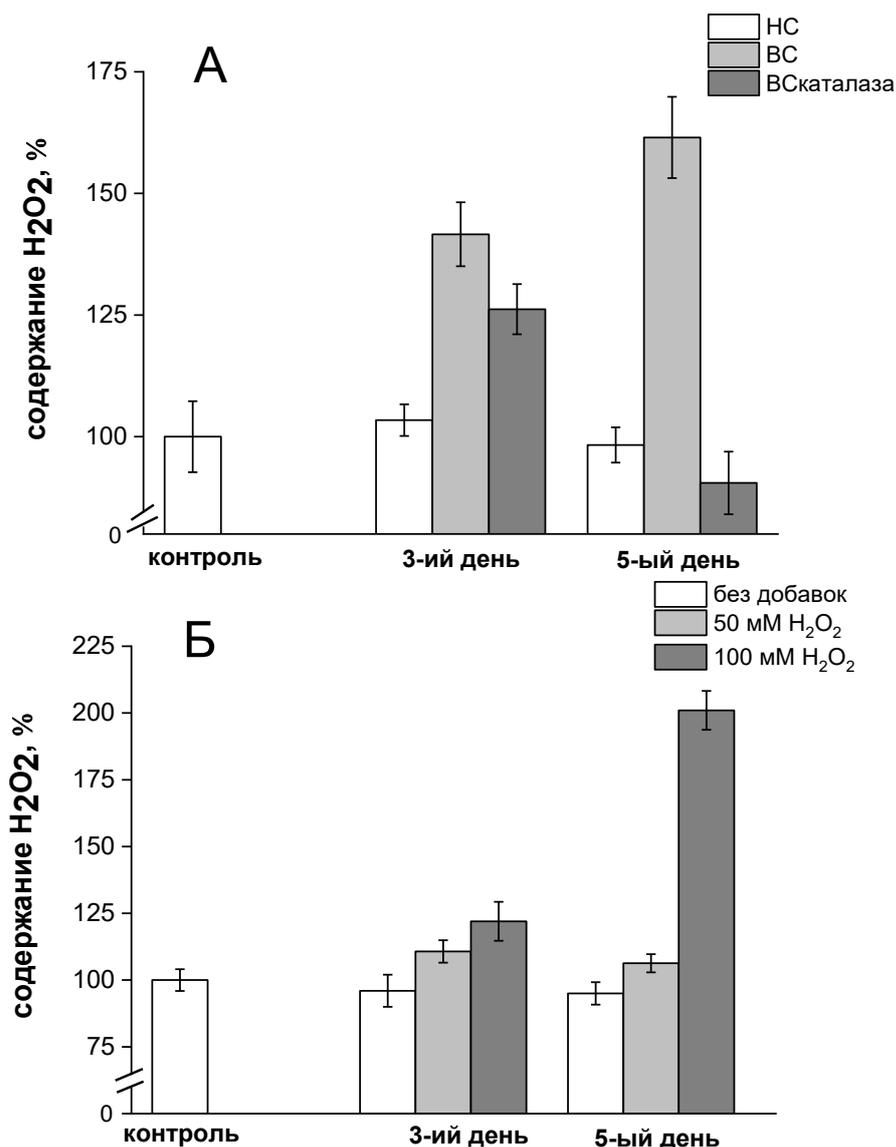


Рис. 31. А – относительное содержание H_2O_2 в листьях ячменя при низкой интенсивности (НС, $100 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) или при высокой интенсивности (ВС, $1000 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) света в отсутствие и в присутствии каталазы (ВС каталаза), 1200 ед. мл^{-1} , в среде инкубации в течение 3-х и 5 дней; Б – относительное содержание H_2O_2 в листьях ячменя при низкой интенсивности света ($100 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в отсутствие и в присутствии H_2O_2 (50 мМ H_2O_2 и 100 мМ H_2O_2) в среде инкубации в течение 3-х и 5 дней. За 100% (контроль) принята величина, измеренная в листьях при низкой интенсивности света, $0.346 \text{ мкмоль H}_2\text{O}_2 \text{ г}^{-1}$ сырого веса. Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Важно, что оба подхода не приводили к существенным изменениям в уровне восстановления ПХ пула (Рис. 32). Инкубация листьев ячменя при высокой интенсивности света приводила к повышению уровня восстановления ПХ пула (измеренный как $1 - qP$, см. методы) и в отсутствие, и в присутствии каталазы. Инкубация листьев в условиях низкой интенсивности света не

оказывала значительного влияния на окислительно-восстановительное состояние ПХ пула как без добавок, так и при добавке H_2O_2 .

Таким образом, разработанные подходы позволили изменить содержание H_2O_2 в листьях и при низкой, и при высокой интенсивностях света, не оказывая при этом влияния на окислительно-восстановительное состояние ПХ пула.

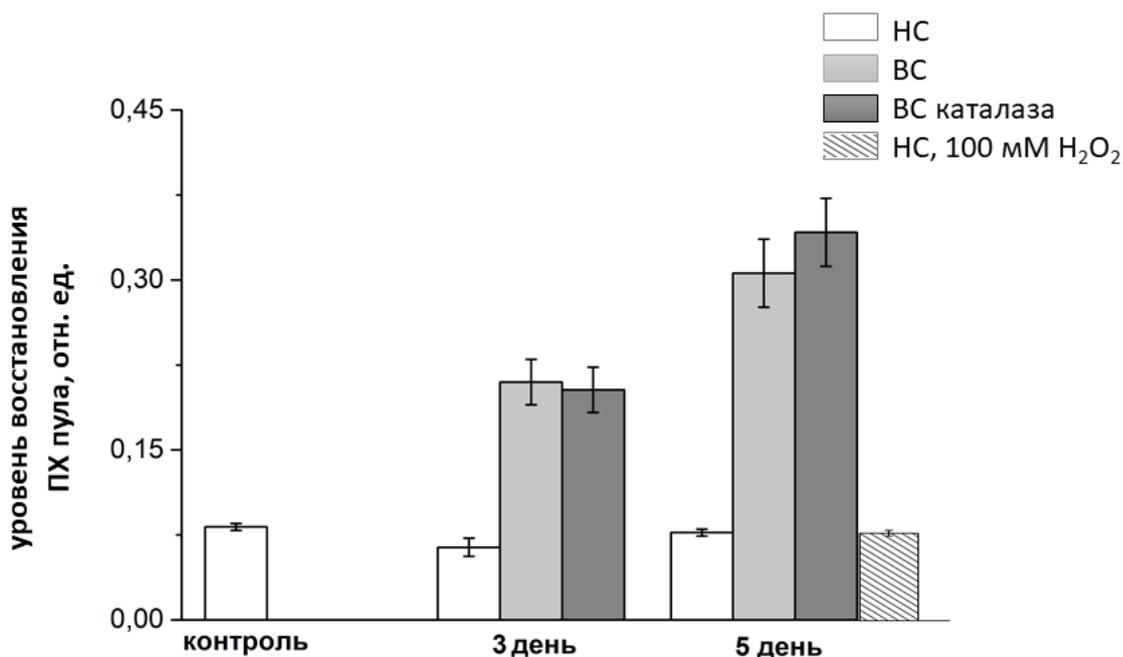


Рис. 32. Уровень восстановления ПХ пула ($1 - qP$), в листьях ячменя, измеренный после инкубации при низкой интенсивности (НС, $100 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) или при высокой интенсивности (ВС, $1000 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) света в отсутствие и в присутствии каталазы (ВС каталаза), 1200 ед. мл^{-1} , в среде инкубации в течение 3-х и 5 дней, а также при низкой интенсивности света ($100 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в присутствии H_2O_2 ($100 \text{ мМ } H_2O_2$) в среде инкубации в течение 5 дней. Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Изменение размера антенны ФС II оценивали по изменению отношения $Xл a$ к $Xл b$ (Табл. 8). Известно, что основные антенные субъединицы ФС II CP47 и CP43 связывают только $Xл a$, в то время как минорные антенные комплексы CP29 и CP26, кроме $Xл a$, также связывают $Xл b$, содержание которого по отношению к $Xл a$ увеличивается во внешней антенне ФС II. У высших растений уменьшение размера антенны ФС II в основном происходит за счет уменьшения количества таких белков внешней антенны, как Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 (см. главу 3.1 литературного обзора), что приводит к уменьшению относительного

содержания Хл *b* (Lindahl и др., 1995; Ballottari и др., 2007; Frigerio и др., 2007). Следовательно, увеличение отношения Хл *a* к Хл *b* в листьях отражает уменьшение размера антенны ФС II (Lindahl и др., 1995).

Как представлено в Табл. 8, отношение Хл *a* к Хл *b* существенно увеличивалось при высокой интенсивности света в отсутствие каталазы, по сравнению с низкой интенсивностью света, однако в присутствии каталазы такого увеличения не наблюдали. Инкубация листьев ячменя в растворе, содержащем 100 мМ H₂O₂, при низкой интенсивности света приводила, как и при высокой интенсивности света в отсутствие каталазы, к значительному росту отношения Хл *a* к Хл *b* в листьях растений, свидетельствуя об уменьшении размера антенны ФС II в этих условиях.

Табл. 8. Отношение Хл *a*/Хл *b* (%) в листьях ячменя, измеренное после инкубации при низкой интенсивности (НС, 100 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) или при высокой интенсивности (ВС, 1000 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) света в отсутствие и присутствии каталазы (ВС каталаза), 1200 ед. мл⁻¹, в среде инкубации в течение 5 дней, а также при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) в присутствии H₂O₂ (100 мМ H₂O₂) в среде инкубации в течение 5 дней. Результаты представлены как среднее из трех независимых измерений ± стандартная ошибка. **P* < 0.05.

Отношение Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i> , %				
НС	ВС	ВС каталаза	НС 50 мМ H ₂ O ₂	НС 100 мМ H ₂ O ₂
100	120 ± 3.2*	106 ± 2.9*	104 ± 2.7	114 ± 1.4*

С помощью денатурирующего электрофореза были исследованы изменения в уровне содержания белков тилакоидных мембран в изучаемых условиях (Рис. 33А, Б).

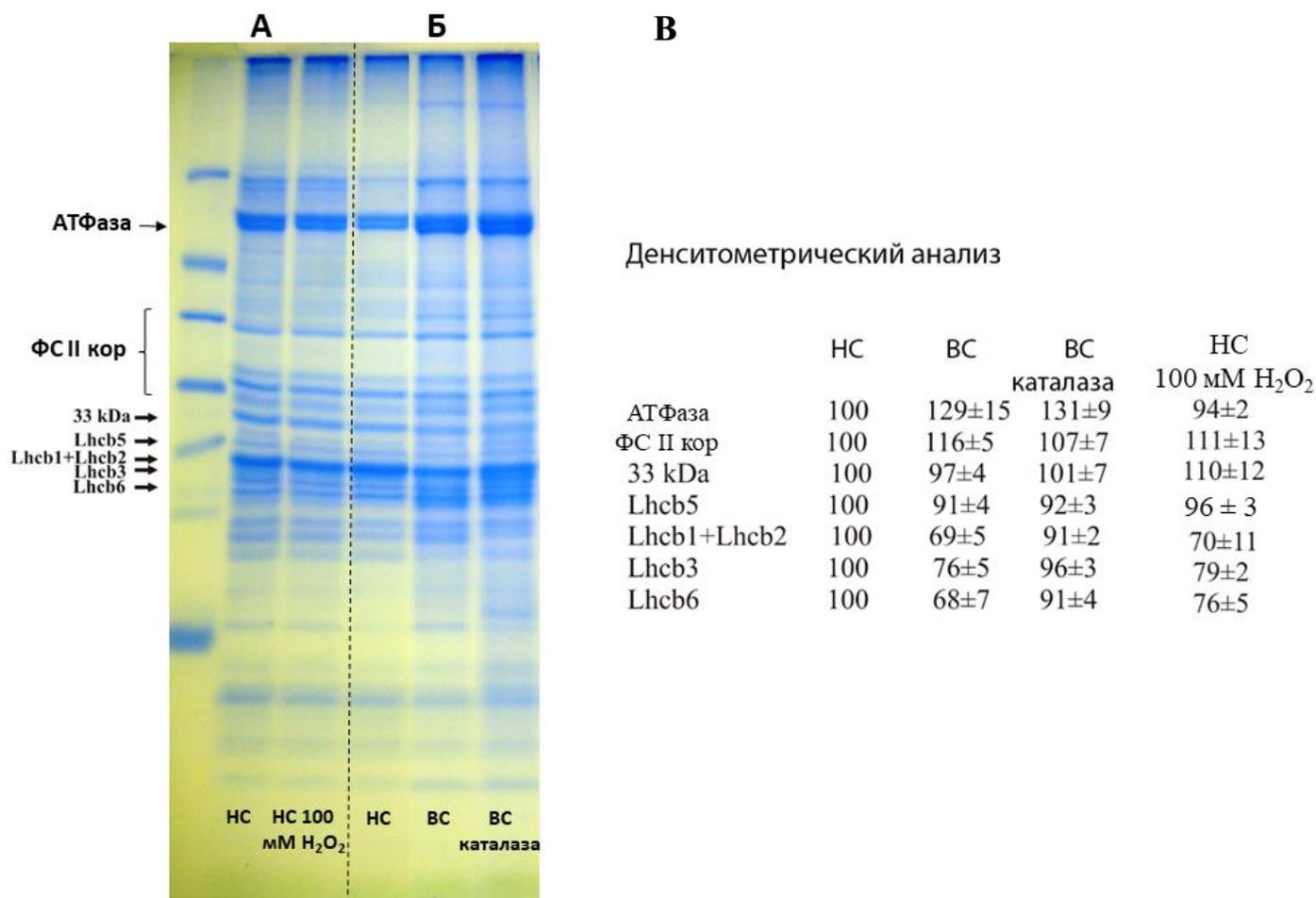


Рис. 33. Денатурирующий электрофорез белков тилакоидов, изолированных из листьев ячменя: А – после инкубации в течение 5 дней при низкой интенсивности света, 100 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, в отсутствие (НС) и в присутствии H_2O_2 (НС, 100 мМ H_2O_2) в среде инкубации; Б – после инкубации в течение 5 дней при низкой интенсивности (НС) и при высокой интенсивности света, 1000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, в отсутствие (ВС) и присутствии каталазы, 1200 ед. мл^{-1} , (ВС катализа). В – результаты денситометрического анализа, 100% – количество соответствующего белка в контрольном варианте при НС.

Денситометрический анализ гелей, представленных на Рис. 33В, показал уменьшение интенсивности полос, соответствующих белкам Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6, при высокой интенсивности света в отсутствие каталазы в среде инкубации, однако снижения интенсивности данных полос не происходило при высокой интенсивности света в присутствии каталазы. Проведенный денситометрический анализ гелей также показал уменьшение интенсивности полос, соответствующих белкам Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 в листьях, инкубированных при низкой интенсивности света в присутствии 100 мМ H_2O_2 в среде инкубации. Таких существенных различий не наблюдали в количестве белка Lhcb5 при всех исследуемых условиях. Как упомянуто выше, уменьшение

размера антенны ФС II является результатом уменьшения количества Lhcb1, Lhcb2, Lhcb 3 и Lhcb6 белков, но не Lhcb5 (Morosinotto и др., 2006). Кроме того, были проанализированы интенсивности полос, соответствующих белкам ФС кор-комплекса (ФС II кор), а также белку 33 кДа (PsbO белок), который является субъединицей водоокисляющего комплекса. Лишь незначительные изменения в интенсивности этих полос были обнаружены во всех условиях.

Полученные в работе данные свидетельствуют, что именно содержание H_2O_2 определяет размер антенны ФС II.

Известно, что высшие растения в условиях повышенной освещенности в дополнение к уменьшенной антенне ФС II характеризуются более высоким соотношением ФС II/ФС I, Рубиско и АТФазы (Anderson, 1986). Из Рис. 33 видно, что уровень содержания АТФазы был значительно выше при высокой интенсивности света по сравнению с низкой интенсивностью света. Уменьшение содержания H_2O_2 в листьях в экспериментах с каталазой не влияло на содержание АТФазы при высокой интенсивности света, что свидетельствует в пользу того, что количество АТФазы регулируется с помощью сигнала, отличного от H_2O_2 . Примечательно, что после 5-ти дней инкубации листьев в присутствии H_2O_2 накапливалось большее количество крахмала по сравнению контрольными листьями, особенно при использовании 100 мМ H_2O_2 : контроль 15 ± 6 нг крахмала мл⁻¹, 50 мМ H_2O_2 – 60 ± 12 нг крахмала мл⁻¹, 100 мМ H_2O_2 – 550 ± 29 нг крахмала мл⁻¹. Большее количество крахмала, как известно, накапливается также в условиях повышенной освещенности (Forde и др., 1975, Lichtenthaler и др., 1981).

На данном этапе остается не выясненным, происходит ли регуляция биосинтеза белков ССК II при акклимации к высокой интенсивности света на этапе трансляции или на транскрипционном/посттранскрипционном этапе. Известно, что изменения могут происходить на обоих этапах. Так, например, в работе Vandembroucke и др. (2008) было показано, что при окислительном стрессе происходят изменения в количестве антиоксидантных ферментов, таких как каталазы, супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, пероксиредоксина, однако изменений в уровнях мРНК генов исследуемых белков обнаружено не было. Авторы предположили, что изменения в данном случае происходят только на этапе трансляции биосинтеза белков.

Для установления этапа биосинтеза белков антенны ФС II, на который влияет H_2O_2 , были измерены уровни экспрессии генов, кодирующих белки

антенны ФС II, и вовлеченные в модуляцию размера антенны, и не вовлеченные. Результаты количественного ПЦР анализа показали, что увеличение содержания H_2O_2 в листьях при низкой интенсивности света приводило к уменьшению в уровне мРНК *lhcb1*, *lhcb3* и *lhcb6* генов, в то время как изменений в уровнях экспрессии генов *lhcb4* и *lhcb5* не наблюдали (Рис. 34).

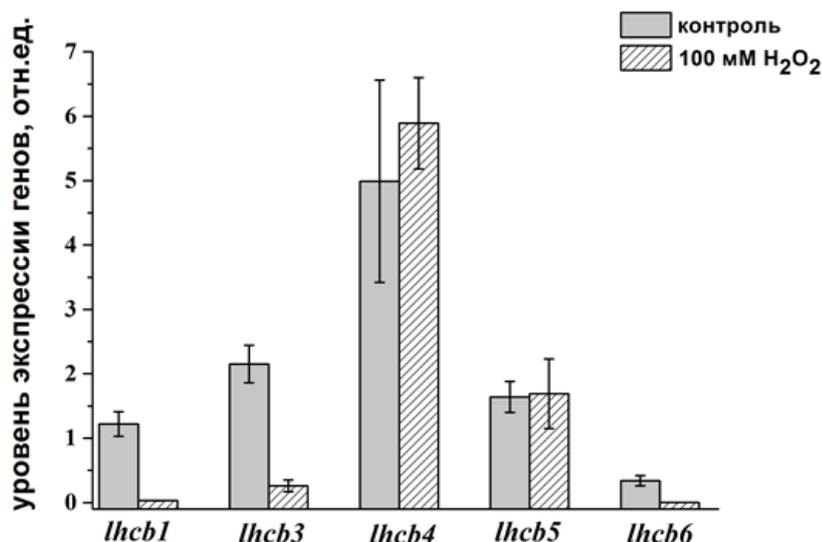


Рис. 34. Количественный ПЦР анализ уровней экспрессии *lhcb1*, *lhcb3*, *lhcb4*, *lhcb5* и *lhcb6* генов в листьях ячменя после 5-ти дней инкубации при низкой интенсивности света ($100 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в отсутствие (контроль) и в присутствии $100 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$ в среде инкубации. Значения представлены как среднее для трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

При инкубации листьев ячменя в присутствии $100 \text{ мМ H}_2\text{O}_2$ происходило уменьшение уровней экспрессии генов, кодирующих именно эти белки, что подтверждает участие H_2O_2 в сигнальном пути, приводящем к уменьшению размера антенны ФС II.

Полученные данные демонстрируют, что регуляция биосинтеза внешних белков ССК II в этом случае происходит на этапе транскрипции или на пост-транскрипционном этапе, но не на этапе трансляции [*16, *17], как предполагалось ранее.

3.7. Уменьшение размера антенны ФС II в условиях засухи и засоления почвы при увеличении содержания пероксида водорода в листьях

Уменьшение размера антенны ФС II при изменении освещенности растений с низкого уровня на высокий – один из важнейших механизмов регулирования функциональной активности фотосинтетического аппарата при

изменении уровня освещенности. Уменьшение размера антенны ФС II происходит вследствие прекращения биосинтеза периферических белков антенны, что, как считалось, обусловлено возрастанием степени восстановления пула пластохинона в тилакоидных мембранах. Установлено (см. Результаты и обсуждение, глава 3.7), что сигналом к данной акклимационной перестройке является повышенное содержание H_2O_2 , образующегося в реакции пластогидрохинона с супероксидным анион-радикалом; при этом количество образованного H_2O_2 коррелирует со степенью восстановления ПХ пула.

Поскольку известно, что содержание H_2O_2 увеличивается при действии многих стрессовых факторов, было предположено, что уменьшение размера антенны ФС II может происходить и при действии других факторов, как, например, при засолении почвы или при уменьшении содержания влаги в почве, т.е. при факторах, являющихся актуальными в условиях современного климата. Для экспериментов использовали растения арабидопсиса. Часть растений после достижения 6-ти недельного возраста переставали поливать, вторую часть поливали 2 раза в неделю 200 мМ раствором NaCl, а третью (контроль) – водой.

Для изучения возможного акклимационного уменьшения размера антенны ФС II в условиях засухи и засоления почвы, не связанного с возможным деструктивным разрушением фотосистем, вызванным этими факторами, были измерены ОЖР индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* ФС II в листьях. На основании полученных кривых был вычислен ряд параметров, характеризующих функционирование фотосинтетического аппарата (Kalaji и др., 2016). На протяжении всего эксперимента (10–14 дней) не происходило изменений максимального квантового выхода ФС II (F_v/F_m) и функциональной активности ФС II (PI_{ABS}), что указывает на отсутствие повреждений реакционных центров ФС II в наших условиях (Рис. 35А, Г). При более длительном времени воздействия стрессовых факторов можно было наблюдать уменьшение параметров F_v/F_m и PI_{ABS} , что указывало на разрушение ФС II в этих условиях (не показано).

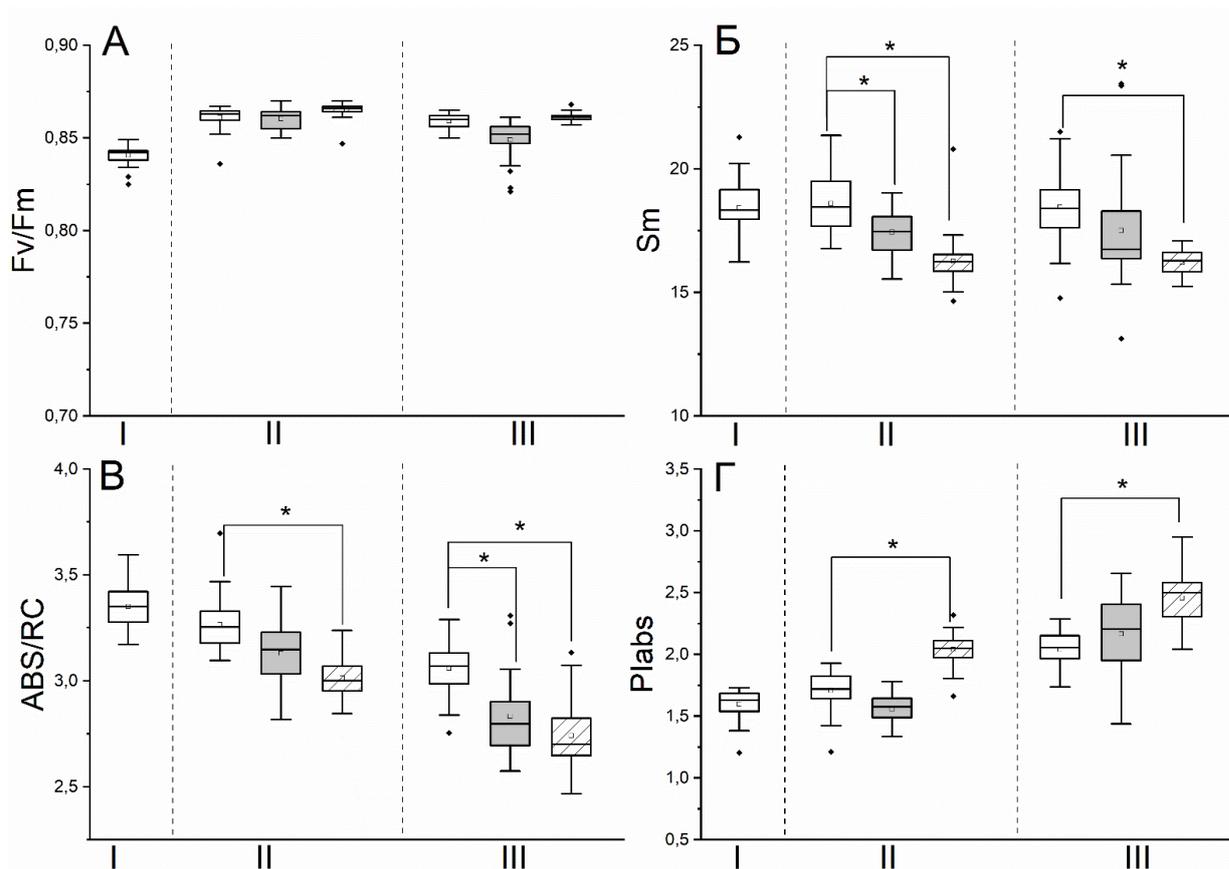


Рис. 35. Влияние засухи и засоления почвы на фотосинтетические характеристики, рассчитанные на основе измерения ОЛР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II листьев арабидопсиса.

Белые боксы показывают значения для контрольных растений; серые – для растений в условиях засухи; заштрихованные – для растений в условиях засоления. I – до начала действия стрессовых факторов (возраст растений 6 недель); II – через 5–7 дней от начала действия стрессовых факторов; III – через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов. Интенсивность света 70 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Значения представлены для трех независимых экспериментов. Параметры для 30-ти листьев были измерены в каждой популяции. F_v/F_m (A) – максимальный квантовый выход ФС II; S_m (Б) – нормализованная площадь над кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*; ABS/RC (В) – эффективный размер антенны ФС II; PI_{ABS} (Г) – показатель функциональной активности ФС II. * $P < 0.05$. Статистическая обработка: боксы представляют собой диапазон 50% значений; среднее значение обозначено точкой внутри боксов; горизонтальная линия внутри боксов – медиана.

Через 5–7 и 10–14 дней после начала действия стрессовых факторов наблюдали изменения величины S_m (Рис. 35Б). Параметр S_m рассчитывается как нормализованная на F_v площадь над кривой быстрой фазы роста индуцированной флуоресценции хлорофилла *a* и косвенно отражает окислительно-восстановительное состояние ПХ пула.

Уменьшение величины S_M указывает на более восстановленное состояние ПХ пула (Tóth и др., 2007). Однако на величину S_M влияет не только окислительно-восстановительное состояние ПХ пула, но и количество неактивных центров ФС II (не восстанавливающих Q_B), поэтому параметр S_M можно использовать для оценки состояния ПХ пула только в том случае, если величина F_V/F_M в стрессовых и контрольных условиях отличается незначительно, что и наблюдалось в наших экспериментах.

Дополнительно окислительно-восстановительное состояние ПХ пула оценивали при освещении листьев (после 5-ти минут освещения) с помощью РАМ-флуориметрии. Было измерено значение параметра $(1 - qL)$, который коррелирует с окислительно-восстановительным состоянием пула пластохинона (Kramer и др., 2004). Через 5–7 дней после начала воздействия стрессовых факторов величина $(1 - qL)$ была выше в условиях засухи (0.714 ± 0.004) и засоления (0.698 ± 0.005), по сравнению с контрольными растениями (0.686 ± 0.006). После 10–14 дней воздействия стрессовых факторов разница по параметру $(1 - qL)$ между контролем и засухой практически исчезала (0.602 ± 0.006 при засухе и 0.633 ± 0.015 в контроле), в то время как в условиях засоления сохранялась (0.688 ± 0.012). Эти данные хорошо коррелируют с данными, представленными на Рис. 35Б (S_M). Имеющиеся в литературе данные показывают, что ПХ пул пластохинона, как и в наших экспериментах, может быть более восстановленным в стрессовых условиях (Rosso и др., 2009), однако в одной из работ было показано, что в условиях засоления происходило значительное окисление ПХ пула, в то время как общее количество пластохинона, в расчете на хлорофилл, значительно не изменялось (Wicciarz и др., 2018). Это несоответствие можно объяснить трудностью определения окислительно-восстановительного состояния ПХ пула, поскольку в клетках присутствует не только фотосинтетически активный пластохинон, но и фотосинтетически неактивный. Более того, в статье (Abogadallah, 2010) было предположено, что в процессе протекания state-transitions окислительно-восстановительное состояние ПХ пула может быть разным в зависимости от того, в каком состоянии (состояние 1 или состояние 2) находится фотосинтетический аппарат во время измерения. В нашей работе мы оценивали изменение окислительно-восстановительного состояния пула пластохинона косвенно путем анализа ОЛР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла a ФС II листьев в ответ на вспышку света интенсивностью $3000 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ длительностью 1 сек. В таких

условиях индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* отражают изменения окислительно-восстановительного состояния только в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, а не во всей клетке или хлоропласте в целом. Перед измерениями растения выдерживали 2 часа в темноте, чтобы перевести фотосинтетический аппарат в состояние 1 и перевести весь пластохинон в окисленное состояние. Характеристики ОЖР индукционных кривых показывают, что в условиях выращивания при действии засухи и засоления пул пластохинона находится в более восстановленном состоянии, чем в контрольных растениях (Рис. 35Б). Вычисленные значения $(1 - qL)$ в экспериментах с РАМ-флуориметрией также подтверждают эти данные.

Через 10–14 дней действия стрессовых факторов, одновременно с более высоким уровнем восстановления ПХ пула, наблюдалось уменьшение величины параметра ABS/RC, что свидетельствовало об уменьшении размера антенны ФС II как в условиях засухи, так и в условиях засоления (Рис. 35В). При этом индекс фотосинтетической производительности (PI_{ABS}) не менялся, либо незначительно увеличивался через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов (Рис. 35Г). Этот результат является очень важным, так как целью исследования было охарактеризовать возможные изменения размера антенны ФС II, которые являются следствием адаптации растений к стрессу, а не следствием разрушения фотосинтетического аппарата под действием стрессовых факторов. При более длительном времени воздействия стрессовых факторов также, как и в случае с F_V/F_M , наблюдали уменьшение параметров PI_{ABS} , что указывало на разрушение ФС II в этих условиях (не показано).

Уменьшение размера светособирающей антенны ФС II в условиях засухи и засоления было дополнительно подтверждено данными вестерн-блот анализа. Количественную оценку размера антенны ФС II проводили путём измерения количества белков Lhcb1 и Lhcb2, являющихся частью тримера ЛНСII, а также мономерного белка Lhcb6 (Рис. 36). Количество полипептидов в тилакоидной мембране было оценено путём иммуноцитирования со специфическими антителами. Вестерн-блот анализ с антителами против Lhcb1, Lhcb2 и Lhcb6 белков тилакоидов (Рис. 36А), выделенных из растений, выращенных в контрольных условиях, в условиях засухи и условиях засоления, и последующая денситометрия полученных блотов (Рис. 36Б) показали снижение количества всех трех белков в обоих стрессовых условиях.

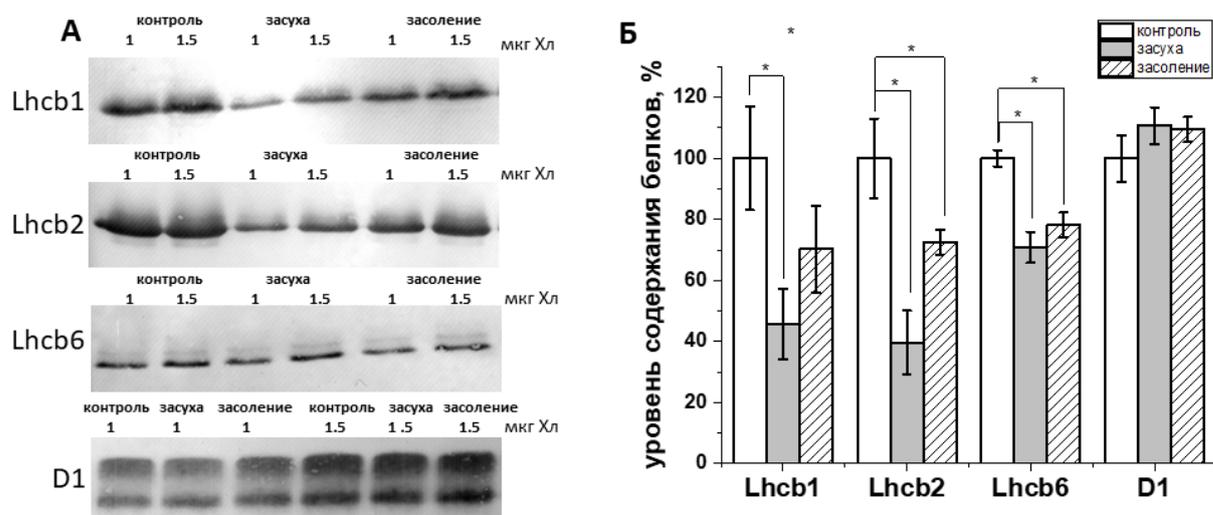


Рис. 36. А – типичные иммуноблоты белков Lhcb1, Lhcb2, Lhcb6 и D1 после денатурирующего электрофореза тилакоидов, выделенных из контрольных растений (контроль), растений в условиях засухи и растений в условиях засоления. Тилакоиды были выделены через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов. Образцы загружали в гели в количестве, эквивалентом 1 и 1.5 мкг хлорофилла. Б – оптическая плотность полос, соответствующих белкам Lhcb1, Lhcb2, Lhcb6 и D1. Оптическая плотность полос в контрольных условиях была принята за 100%. Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка для трех независимых экспериментов в двух повторностях. * $P < 0.05$.

Достоверные отличия наблюдались при нанесении менее чем 1.5 мкг (по хлорофиллу) образца на гель. В работе (Chen и др., 2016), когда наносили большее количество образца (2 мкг по хлорофиллу), явных отличий в содержании белков Lhcb1 и Lhcb2 в условиях засухи по сравнению с контрольными условиями также обнаружено не было. Стоит также отметить, что уменьшение размера антенны ФС II в условиях засухи и засоления было менее выражено в старых растениях (не показано).

Для доказательства отсутствия повреждения фотосинтетического аппарата, в частности ФС II, в условиях стресса было измерено содержание белка D1, который является одним из главных белков РЦ ФС II. Во всех изученных условиях не наблюдали уменьшения количества белка D1, напротив, в условиях засухи и засоления его удельное количество немного увеличивалось (Рис. 36А, Б). Отсутствие уменьшения количества белка D1 в наших экспериментах в условиях засухи и засоления по сравнению с контрольными условиями позволяет нам утверждать, что уменьшение количества Lhcb белков и уменьшение параметра ABS/RC не связано с повреждением фотосистем в условиях засухи и засоления.

Далее были изучены эффекты засухи и засоления на экспрессию генов *lhcb1*, *lhcb2* и *lhcb6*. Количественный ОТ-ПЦР анализ выбранных генов в образцах РНК, выделенных из листьев растений через 10–14 дней действия стрессовых факторов, показал уменьшение количества транскриптов этих генов в условиях засухи и засоления (Рис. 37А).

Дополнительно был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии маркерных генов стрессового ответа, *At1g29395* и *At1g52890*, первый из которых индуцируется только в условиях засухи, а второй – как в условиях засухи, так и в условиях засоления. Как и ожидалось, в исследуемых нами растениях экспрессия *At1g29395* возрастала в условиях засухи, а увеличение экспрессии *At1g52890* наблюдалось при воздействии обоих стрессовых факторов (Рис. 37Б), что подтверждает, что в используемых в данных исследованиях условиях в растениях наблюдался характерный стрессовый физиологический ответ на изучаемые факторы.

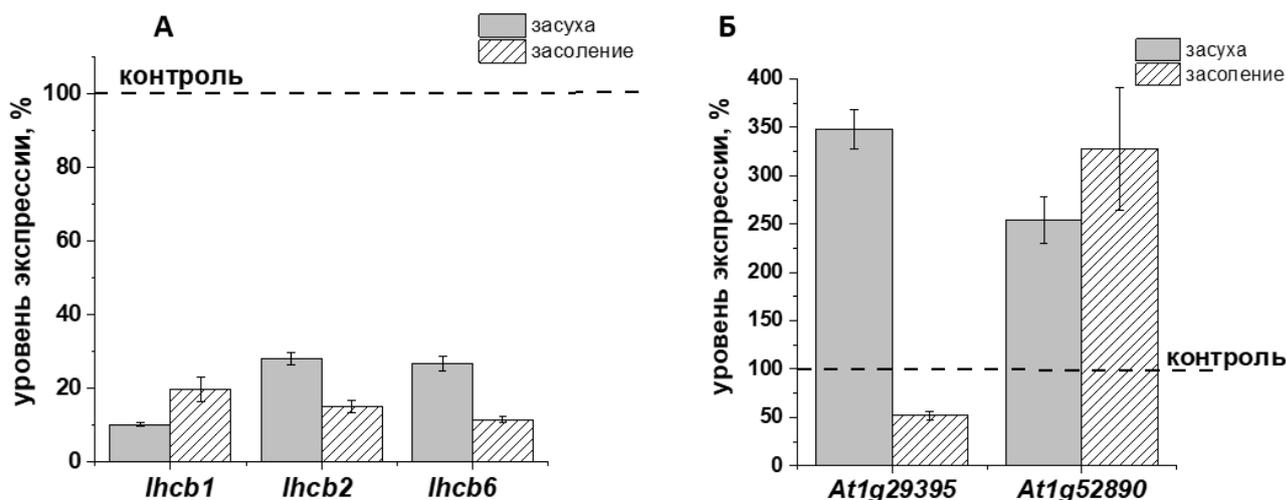


Рис. 37. Влияние условий засухи и засоления на уровни экспрессии генов *lhcb1*, *lhcb2* и *lhcb6* (А); и уровни экспрессии генов маркеров стресса: ген *At1g29395*, экспрессия которого повышается в условиях засухи; и ген *At1g52890*, экспрессия которого повышается как в условиях засухи, так и в условиях засоления (Б). 100% (штриховая горизонтальная линия) – уровень экспрессии генов в контрольных растениях. Листья срезали через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов. Серые столбцы – в условиях засухи; заштрихованные – в условиях засоления. Данные были нормализованы по экспрессии гена актина. Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в четырех повторностях.

Известно, что каротиноиды и крахмал играют большую роль в физиологических ответах растений на стрессовые факторы. На примере большого количества видов растений было показано, что в условиях засухи и засоления

наблюдается более интенсивное преобразование крахмала в сахарозу, которая играет роль осмопротектора и помогает бороться с негативными эффектами этих стрессовых факторов (Mongoe и др., 2014; Zanella и др., 2016; Thalmann, Santelia, 2017). На следующем этапе работы было измерено содержание крахмала и каротиноидов в листьях контрольных растений и растений, находившихся 10–14 дней в условиях засухи или засоления (Табл. 9). В условиях засоления наблюдалось небольшое (на 20%) увеличение количества накопленного крахмала, в то время как в условиях засухи количество крахмала было в 2 раза больше, чем в контроле. Содержание каротиноидов в растениях в условиях засухи и засоления было также существенно выше, чем в контроле, что, по-видимому, было необходимо для повышения устойчивости растений к этим стрессовым факторам (Krauss и др., 2006; Kim и др., 2008).

Растения при действии обоих стрессовых факторов отставали в росте, но при этом не наблюдалось выцветания хлорофилла в листьях. Общее содержание хлорофилла в листьях в условиях стресса увеличивалось в среднем на 20-30% по сравнению с контролем. Отношение Хл *a* к Хл *b* также увеличивалось в условиях засухи и в условиях засоления (Табл. 9).

Табл. 9. Содержание крахмала и каротиноидов в листьях растений арабидопсиса и отношение Хл *a* к Хл *b* в тилакоидах в контрольных условиях, в условиях засухи и засоления через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов. Значения представлены как среднее \pm SE для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в трех повторностях.

Условия	Содержание, мг г ⁻¹ сырого веса		Отношение Хл <i>a</i> к Хл <i>b</i>
	Крахмал	Каротиноиды	
Контроль	1.23 \pm 0.05	0.180 \pm 0.002	2.20 \pm 0.002
Засуха	2.96 \pm 0.12	0.214 \pm 0.014	2.25 \pm 0.003
Засоление	1.48 \pm 0.03	0.227 \pm 0.010	2.32 \pm 0.003

H₂O₂ является ключевой сигнальной молекулой, участвующей в процессах адаптационного уменьшения размера антенны ФС II при высокой интенсивности света (см. Результаты и обсуждение, глава 3.7). В настоящей работе эксперименты показали более высокое содержание H₂O₂ в листьях растений, находящихся в условиях засухи и засоления (Рис. 37). Достоверно известно, что условия засухи приводят к закрытию устьиц (Lawlor, 2002). Также

есть свидетельства, что устьица частично закрыты в условиях засоления (Kerstiens и др., 2002). Этот фактор ограничивает доступ CO_2 в строму хлоропластов. В условиях низкой концентрации CO_2 в строме больше электронов переносится от фотосинтетической электрон-транспортной цепи на кислород (Ivanov и др., 2018), что приводит к более высоким скоростям образования H_2O_2 . В наших экспериментах наблюдали схожий уровень H_2O_2 в условиях засухи и засоления, но более высокий, почти в 2 раза, чем в контрольных условиях (Рис. 38). Было показано, что закрытие устьиц опосредовано избирательным накоплением абсцизовой кислоты в апопласте клеток устьиц (Wilkinson, Davies 2010). Закрытие устьиц также может быть вызвано этиленом, синтез которого усиливается под воздействием многих форм стресса. Цитокинины играют важную роль в поддержании устьиц открытыми в условиях недостатка воды. Участие фитогормонов в сигнальных путях, связанных с засухой и засолением, а также с другими стрессовыми факторами, было хорошо рассмотрено в статье (Pavlů и др., 2018). Все они, включая H_2O_2 , могут быть вовлечены в процессы адаптации растений к условиям засухи и засоления.

Поскольку в ходе работы не наблюдали уменьшения параметров F_V/F_M и PI_{ABS} , то повышенная концентрация H_2O_2 , скорее всего, не оказывала разрушающего действия, а выполняла преимущественно сигнальную функцию. На ранних этапах воздействия стрессовых факторов иногда наблюдали небольшое увеличение параметра ABS/RC , вместо ожидаемого уменьшения, даже при более высокой концентрации H_2O_2 (не показано). Можно объяснить это тем, что под воздействием обоих стрессовых факторов наибольшую роль сначала играет осмотический стресс, который впоследствии нормализуется (Allakhverdiev и др., 2010). Осмотическое давление приводит к сокращению объёма клеток и закрытию аквапоринов хлоропластов, что вероятно блокирует ретроградную передачу сигналов от хлоропластов к ядру на ранних этапах воздействия стресса.

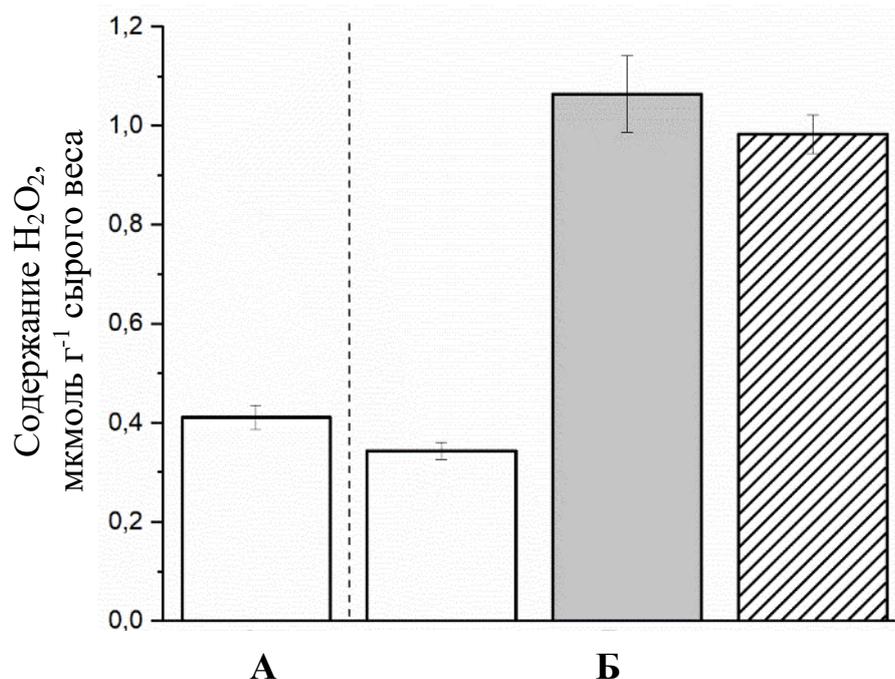


Рис. 38. Содержание H₂O₂ в листьях растений арабидопсиса в контрольных условиях, в условиях засухи и засоления почвы. Белые столбцы показывают значения для контрольных растений; серые – для растений в условиях засухи; заштрихованные – для растений в условиях засоления. А – до начала действия стрессовых факторов (возраст растений 6 недель); Б – через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов. Значения представлены как среднее ± стандартная ошибка для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в четырех повторностях.

Уменьшение размера ССК II в условиях засухи и засоления почвы наблюдали также и в работе, проведенной с использованием растений ячменя (*Hordeum vulgare*). Для экспериментов использовали 7–10 дневные проростки. Растения были разделены на три группы. Первую группу поливали один раз в три дня 500 мМ раствором NaCl, вторую не поливали в течение эксперимента и контрольную группу поливали один раз в три дня дистиллированной водой. Измерения ОЛР кривых проводили каждые три дня. Уже через 7–10 дней от начала действия стрессовых факторов наблюдали достоверное уменьшение параметра ABS/RC в условиях стресса, отражающее уменьшение размера антенны ФС II (Рис. 39А). При этом отношение $X_l a$ к $X_l b$ увеличивалось в стрессовых условиях, что также свидетельствовало об уменьшении размера антенны ФС II в этих условиях (Рис. 39Б).

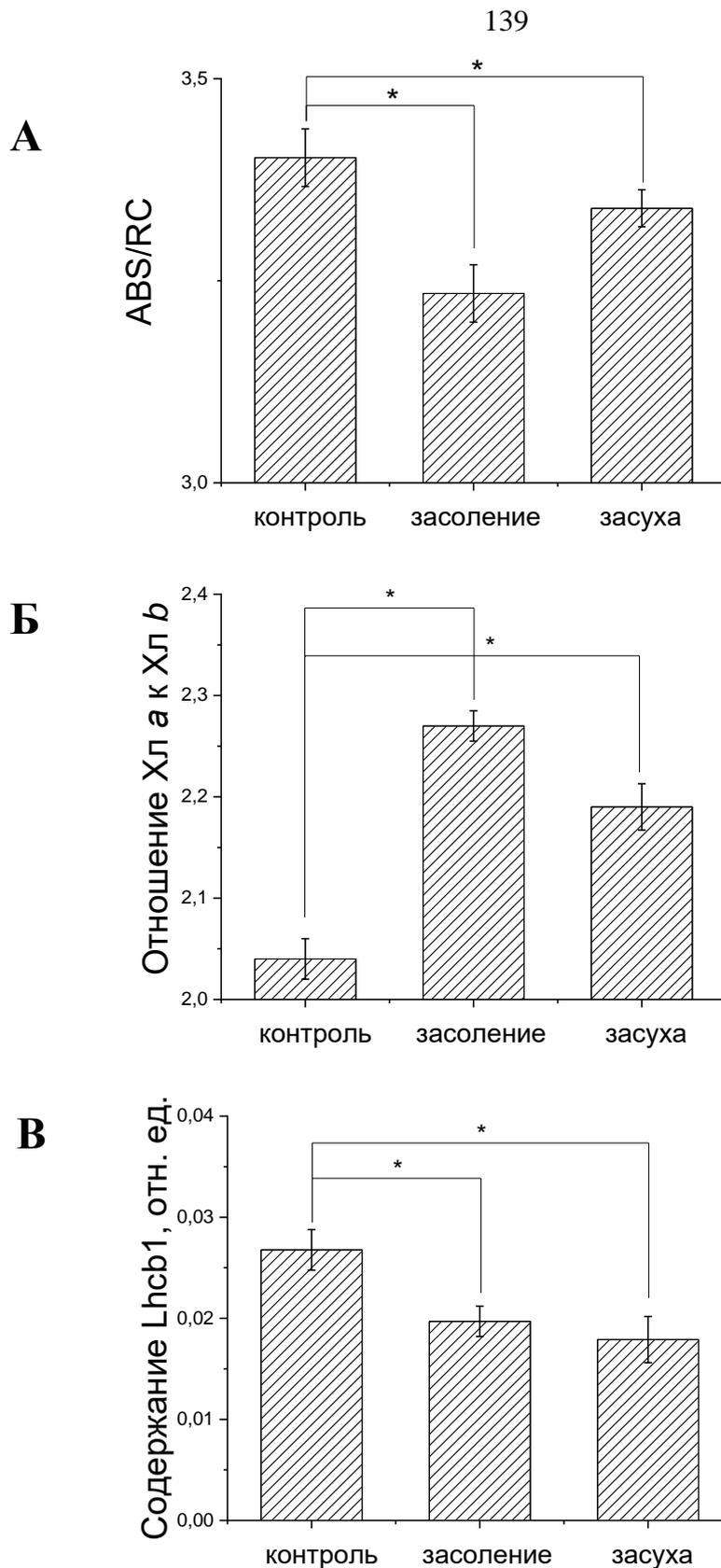


Рис. 39. Величина параметра ABS/RC (эффективный размер антенны ФС II), отношение Хл *a* к Хл *b* и содержание Lhcb1 белка в листьях растений ячменя в контрольных условиях, в условиях засухи и засоления почвы через 7–10 дней от начала действия стрессовых факторов. Интенсивность света 70 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Значения представлены как среднее ± SE для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в трех повторностях. **P* < 0.05

Дополнительно был проведен вестерн-блот анализ с антителами против одного из основных внешних белков антенны ФС II – Lhcb1 белка. Было показано снижение уровня Lhcb1 белка в обоих стрессовых условиях (Рис. 39В), в то время как изменений в количестве D1 белка не наблюдали (не показано).

Таким образом, в результате проведенной работы было показано, что акклимационное уменьшение размера светособирающей антенны ФС II происходило как при действии засухи, так и при засолении; при этом наблюдали повышенное содержание H_2O_2 в листьях растений в обоих стрессовых условиях [*18]. Уменьшение размера антенны ФС II является следствием пониженного содержания белков внешней светособирающей антенны, биосинтез которых был подавлен на транскрипционном/посттранскрипционном этапе, а не на этапе трансляции, на что указывает значительное уменьшение уровня экспрессии генов, кодирующих эти белки в ядре. Уменьшение уровня экспрессии гена *lhcb1* также было показано в работе с проростками томата (Tamburino и др., 2017). При исследовании эффектов повышенного содержания соли на метаболизм растений обычно используют NaCl, KCl, маннитол или полиэтиленгликоль, при этом последний часто используют для имитации условий осмотического стресса, т.е. засухи. В работе (Dalal, Tripathy, 2018) в присутствии полиэтиленгликоля также наблюдалось уменьшение размера антенны ФС II, но в то же время в этой работе наблюдалось разрушение самих фотосистем, в то время как разрушения РЦ ФС II в наших экспериментах не происходило.

3.8. Увеличение размера антенны ФС II при колонизации растений ризосферными бактериями

Для исследования влияния колонизации растений на структурные изменения ССК II сравнивали контрольные растения ячменя и растения, колонизированные штаммом *Pseudomonas putida* (*P. putida*) BS3701, который входит в состав консорциума, эффективно деградирующего нефтепродукты, а также, как было показано, способен защищать растения от действия негативных факторов (Овчинникова и др., 2008; Ovchinnikova и др., 2009). Данный штамм описан как эффективный нефтеструктор, однако его влиянию на фотосинтетические параметры растений уделено меньше внимания в литературе. Контрольные и колонизированные семена ячменя проращивали в темноте в течение 24 ч, затем переносили в термостатируемую камеру (21°С) и выращивали в течение 7-ми дней на нестерильной почве в условиях умеренной интенсивности

света, 70 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, со светопериодом 8 ч день/16 ч ночь. Через 7 дней проводили сравнение ряда фотосинтетических характеристик для контрольных растений и растений, колонизированных выбранным штаммом. Фотосинтетические характеристики рассчитывали на основе ОЖР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II листьев арабидопсиса, т.е. JIP теста, при подаче вспышки насыщающего света 3000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Параметр ABS/RC, характеризующий эффективный размер антенны ФС II, оказывался выше в растениях, колонизированных *P. putida* BS3701, что свидетельствовало о большем размере антенны ФС II в колонизированных растениях в данных условиях выращивания (Рис. 40). Кроме того, растения, колонизированные бактериями штамма *P. putida* BS3701, характеризовались более низким отношением $X_l a$ к $X_l b$ (2.12 ± 0.08 по сравнению с 2.33 ± 0.05 у контрольных растений). Более низкое отношение $X_l a$ к $X_l b$ соответствует большему размеру антенны ФС II в колонизированных растениях и согласуется с данными ABS/RC (Рис. 40). При этом показатель функциональной активности ФС II (PI_{ABS}) и максимальный квантовый выход ФС II (F_v/F_m) не отличались у контрольных и колонизированных растений. Параметр S_m оказывался выше у колонизированных растений, что указывает на менее восстановленное состояние ПХ пула в них (Рис. 40), а уровень содержания H_2O_2 – ниже (Рис. 41).

Увеличение размера светособирающей антенны ФС II в колонизированных растениях было дополнительно подтверждено данными вестерн-блот анализа. Количественную оценку размера антенны ФС II проводили путём измерения количества белков Lhcb1 и Lhcb2, являющихся частью тримера ССК II, мономерного белка Lhcb6 и мономерного белка Lhcb5, количество которого, согласно литературным данным, не должно меняться при изменении размера антенны ФС II. Денситометрия полученных блотов с антителами против Lhcb1, Lhcb2 и Lhcb6 показала повышенное содержание всех трех белков в тилакоидах колонизированных растений по сравнению с контрольными (Рис. 42). Различий в количестве белка РЦ ФС II – D1, а также в количестве Lhcb5 белка между изучаемыми вариантами не наблюдали (Рис. 42).

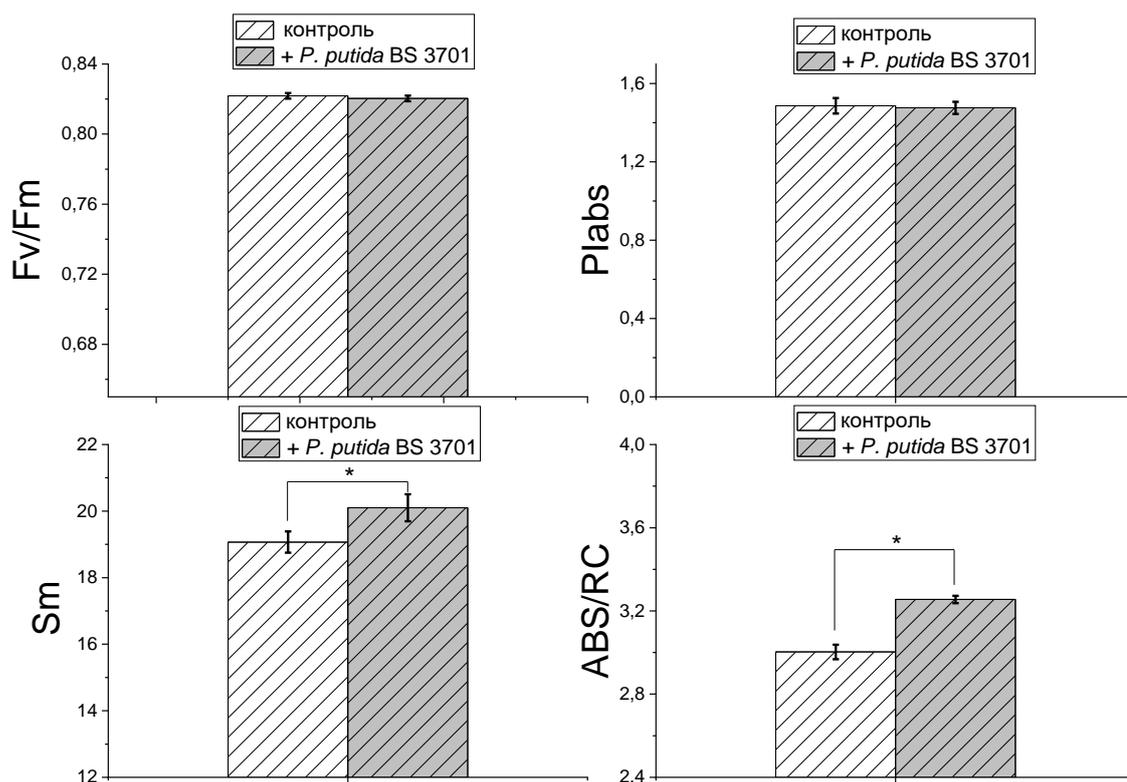


Рис. 40. Влияние колонизации растений ячменя бактериями *P. putida* BS3701 на фотосинтетические характеристики, рассчитанные на основе измерения ОЖР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* ФС II в листьях. Белые столбики – контрольные растения; серые – колонизированные растения. Интенсивность света $70 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Значения представлены для трех независимых экспериментов. Параметры 20-ти листьев были измерены в каждой популяции. F_v/F_m – максимальный квантовый выход ФС II; ABS/RC – эффективный размер антенны ФС II; S_m – нормализованная площадь над кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*; PI_{ABS} – показатель функциональной активности ФС II. * $P < 0.05$.

Уровень содержания H_2O_2 в листьях является результатом двух параллельно протекающих процессов: его образования и разложения антиоксидантными ферментами. Можно предположить, что причиной более низкого содержания H_2O_2 в колонизированных *P. putida* BS3701 растениях может быть повышенная активность и/или содержание антиоксидантных систем, согласно Chiappero и др., 2019.

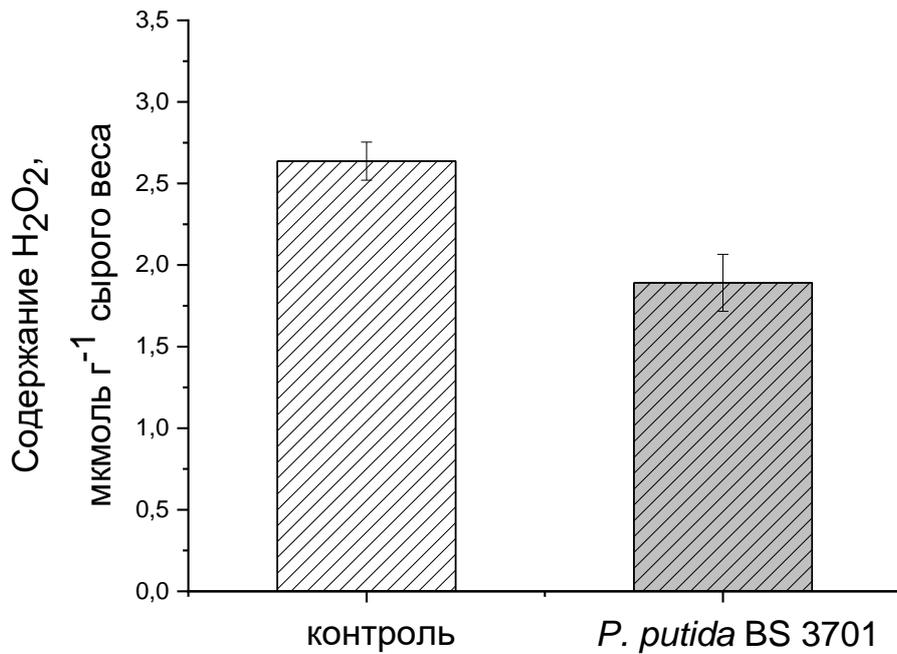


Рис. 41. Содержание H₂O₂ в листьях контрольных растений и колонизированных растений ячменя штаммом *P. putida* BS3701. Белые заштрихованные столбики показывают значения для контрольных растений; серые – для колонизированных растений. Интенсивность света 70 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Значения представлены как среднее ± стандартная ошибка для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в трех повторностях.

Для проверки этого предположения были проанализированы изменения в количестве мРНК генов стромальной аскорбатпероксидазы, локализованной в хлоропластах, а также каталазы и глутатионпероксидазы, расположенных в пероксисомах и цитоплазме, соответственно (Рис. 43).

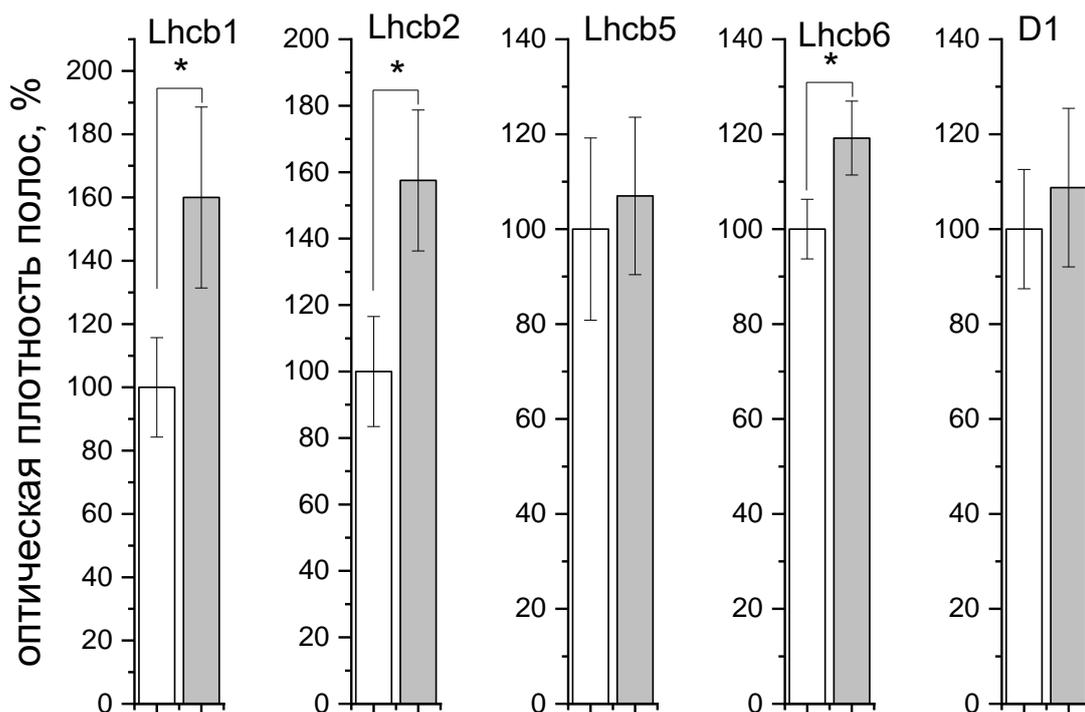


Рис. 42. Оптическая плотность полос, соответствующих белкам Lhcb1, Lhcb2, Lhcb5, Lhcb6 и D1. Белые столбики показывают значения для контрольных растений; серые – для колонизированных штаммом *P. putida* BS3701 растений. Интенсивность света $70 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Оптическая плотность полос в контрольных условиях была принята за 100%. Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в двух повторностях. * $P < 0.05$.

Полученные данные показали, что растения, колонизированные *P. putida* BS3701, характеризовались достоверно более высоким уровнем экспрессии генов, кодирующих изучаемые антиоксидантные ферменты, что, по-видимому, и приводило к более низкому содержанию H_2O_2 в них (Рис. 41). Таким образом, в ходе проведенной работы было показано, что при колонизации растений ризосферными бактериями *P. putida* BS3701, приводящей к уменьшению содержания H_2O_2 в листьях, происходит увеличение размера антенны ФС II по сравнению с контрольными растениями [*19]

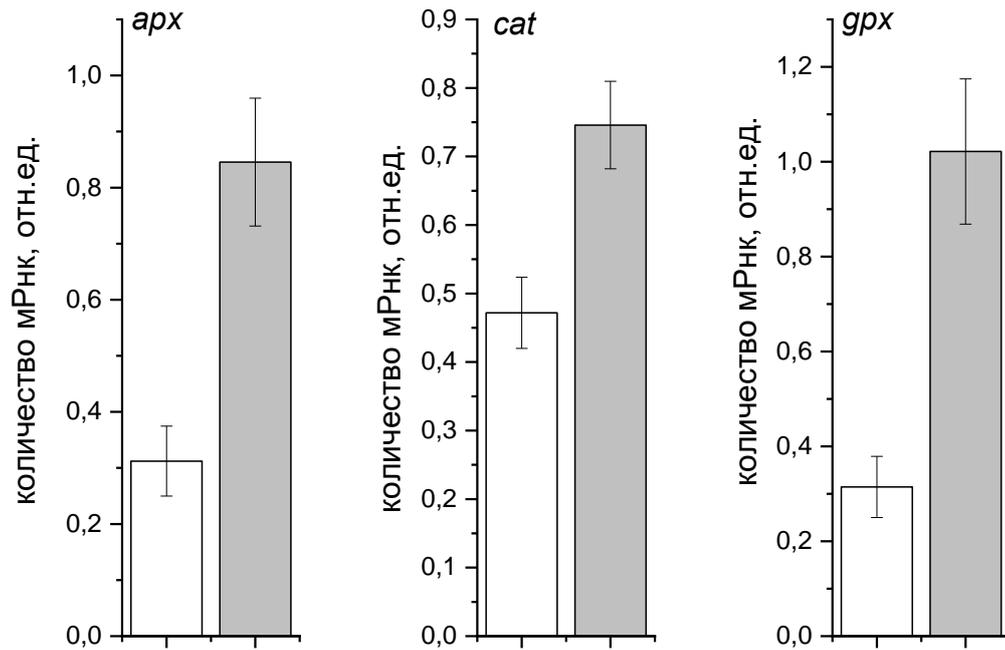


Рис. 43. Количество мРНК генов стромальной аскорбатпероксидазы (*apx*), каталазы (*cat*) и глутатионпероксидазы (*gpx*) в листьях контрольных (белые столбики) и колонизированных *P. putida* BS3701 (серые столбики) растений. Интенсивность света $70 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка для трех независимых экспериментов, каждый из которых был выполнен в двух повторностях. Данные были нормализованы по экспрессии гена актина.

Глава 4. Обсуждение результатов

Изменения условий окружающей среды, таких как уровень освещения растений, водное снабжение, температурный режим, концентрация солей, приводят к изменению состояния и структуры электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата. В стрессовых условиях, как абиотической природы, так и биотической, редокс сигналы хлоропластов, к которым относятся и окислительно-восстановительное состояние ПХ пула, а также окислительно-восстановительное состояние пула тиоредоксинов и другие специфические сигналы, влияют на экспрессию не только хлоропластных и ядерных генов, кодирующих связанные с фотосинтезом белки (Fey и др., 2005, Pfannschmidt и др., 2003, Pfannschmidt и др., 2008, Pfalz и др., 2012, Kreslavski и др., 2012, Singh и др., 2016, Schmitt, Allakhverdiev, 2017), но и на экспрессию ядерных генов, кодирующих белки электрон-транспортной цепи митохондрий (Dietzel и др., 2015).

Известно, что изменение размера светособирающего пигмент-белкового комплекса ФС II, которое представляет собой долгосрочный акклимационный ответ высших растений на изменение интенсивности света (Рис. 10 в главе Обзор литературы), регулируется окислительно-восстановительным состоянием ПХ пула (Lindahl и др., 1995; Escoubas и др., 1995; Pfannschmidt и др., 1999; Yang и др., 2001). Высшие растения и морские водоросли увеличивают размер антенны ФС II при затенении и, наоборот, уменьшают размер антенны ФС II при повышенной освещенности (Anderson, 1986), таким образом, оптимизируя фотосинтетическую активность. Однако вопрос о природе сигнала об окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула оставался долгое время открытым. В диссертационной работе было экспериментально доказано, что не окислительно-восстановительное состояние ПХ пула само по себе, а количество H_2O_2 в фотосинтезирующих клетках играет определяющую роль в регуляции размера антенны ФС II. Повышение уровня освещения растений в условиях снижения уровня H_2O_2 в листьях путем их инкубации в среде, содержащей каталазу (фермент, разлагающий H_2O_2), не приводило к уменьшению размера антенны ФС II, наблюдаемого в отсутствие каталазы (Рис. 33, Табл. 8 в главе Результаты). При этом искусственное увеличение количества H_2O_2 в листьях приводило к уменьшению размера пигмент-белкового антенного комплекса ФС II при низкой интенсивности света (Рис. 33, Рис. 34, Табл. 8 в главе Результаты);

размер антенны ФС II в этом случае был сопоставим с таковым в листьях растений при высокой интенсивности света. Важно отметить, что искусственное изменение количества H_2O_2 в клетках не влияло на изменения окислительно-восстановительного состояния ПХ пула (Рис. 32 в главе Результаты). Таким образом, были получены свидетельства о природе молекулярного носителя сигнала системам экспрессии ядерных генов, что являлось предметом изучения ученых разных стран мира, начиная с 60-х годов прошлого века.

Считается, что основной механизм образования H_2O_2 в хлоропластах – реакция диспропорционирования $O_2^{\cdot-}$, катализируемая ферментом СОД в стромах хлоропластов. В ходе диссертационной работы было показано, что существует другой, отличный от диспропорционирования, путь образования H_2O_2 в тилакоидной мембране. В мембране отсутствует СОД, кроме того, реакция диспропорционирования $O_2^{\cdot-}$ в апротонной среде мембраны затруднена (Takahashi, Asada, 1988). Нами установлено, что образование «мембранного» H_2O_2 происходит в результате реакции $O_2^{\cdot-}$ с восстановленным пластохиноном, молекулой пластогидрохинона, PXH_2 (реакция 2; Рис. 17, Рис. 20, Табл. 2 в главе Результаты), $PXH_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow PXH^{\cdot-} + H_2O_2$. Реакция $PXH_2 + O_2^{\cdot-}$ является термодинамически выгодной вследствие большой разницы между величинами окислительно-восстановительных потенциалов пар $PXH^{\cdot-}/PXH_2$ (E_{m7} 370 мВ) (Hauska и др., 1983) и $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ (E_{m7} 940 мВ) (Asada, 1999)). Согласно окислительно-восстановительным потенциалам этих пар, реакция $PXH_2 + O_2^{\cdot-}$ должна протекать на границе фаз тилакоидная мембрана/строма. При освещении PXH_2 распространяется практически равномерно по всей мембране и оказывается вблизи не только ФС II, но и вблизи ФС I (Kirchhoff, 2014).

При увеличении интенсивности света увеличение суммарной продукции H_2O_2 в хлоропластах происходит за счет увеличения образования именно «мембранного» H_2O_2 (Рис. 13 и Рис. 15 в главе Результаты). Вероятно, ключевым фактором, приводящим к увеличению скорости образования «мембранного» H_2O_2 в результате реакции $O_2^{\cdot-}$ с PXH_2 , является увеличение скорости образования $O_2^{\cdot-}$ внутри тилакоидной мембраны филлосемихиноном (Kozuleva и др., 2020). При этом степень восстановления ПХ пула, т.е. количество молекул пластогидрохинона в мембране, играет определяющую роль в судьбе образующихся супероксидных анион-радикалов.

Поскольку H_2O_2 является одной из основных АФК, участвующих в сигнальных процессах (см. Обзор литературы), полученные данные позволяют по-

новому взглянуть на функционирование ПХ пула в тилакоидах и объяснить, каким образом восстановленный пластохинон может быть вовлечен в иницирование каскада сигнальных путей, необходимых для запуска акклимационных изменений.

Необходимо отметить, что не только доказанная в ходе проведения данной диссертационной работы реакция $O_2^{\cdot-}$ с ПХН₂, но и реакция 1O_2 с ПХН₂ приводит к образованию «мембранного» H₂O₂ при условии значительной генерации 1O_2 в тилакоидных мембранах. Однако протекание реакции 1O_2 с ПХН₂ не может объяснить сигнальную функцию ПХ пула. В мутантных растениях табака с пониженным содержанием цит. *b₆/f* комплекса не было обнаружено предполагаемых изменений в долговременной акклимации растений к условиям освещения, связанных с редокс состоянием ПХ пула (Anderson и др., 1997; Montané и др., 1998). В этих мутантных растениях ПХ пул был перевосстановлен, но активность ФС II оставалась такой же, как в растениях дикого типа, из чего можно предположить, что скорость образования 1O_2 в ФС II и общее количество молекул ПХН₂ были такими же или более высокими, по сравнению с растениями дикого типа. В то же время в этом мутанте скорость образования $O_2^{\cdot-}$ путем восстановления молекул O₂ филлосемихиноном в ФС I, скорее всего, была понижена вследствие сниженного переноса электронов от ФС II к ФС I, что уменьшает вероятность протекания реакции $O_2^{\cdot-}$ с ПХН₂. Очевидно, это является причиной отсутствия изменений в процессах акклимации растений с пониженным содержанием цит. *b₆/f* комплексов.

Практически все экспериментальные свидетельства образования 1O_2 в ФС II, представленные в литературе, были получены на фрагментах тилакоидных мембран, обогащённых комплексами ФС II, т.е. не в нативных условиях. Образование 1O_2 в полной ФЭТЦ должно быть пренебрежимо мало (Rutherford и др., 2012). В условиях высокой интенсивности света, 400–700 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, когда в растениях арабидопсиса наблюдаются процессы акклимации без значительного фотоингибирования, образование $O_2^{\cdot-}$ в ФС I значительно превышает образование 1O_2 в ФС II. При сильном световом стрессе, более 1000 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, может происходить значительное образование 1O_2 в ФС II, что может приводить к выцветанию листьев, перекисному окислению липидов и фотоингибированию ФС II (Ksas и др., 2015).

Известно, что 1O_2 может запускать сигнальные пути регуляции, например, основанные на работе сигнальных белков Executer 1 и Executer 2, тесно

связанных с ФС II (Lee и др., 2007) (см. Обзор литературы). Предположительно, сигнал, передаваемый через $^1\text{O}_2$, должен инициироваться непосредственно внутри ФС II. O_2^- также может рассматриваться как участник ретроградной сигнализации, что было продемонстрировано в работах по изучению изменения экспрессии генов в ответ на изменения внешней среды (Scarpesi и др., 2008), и при изучении мутантов по CuZn-супероксиддисмутазе хлоропластов (Rizhsky и др., 2003) (см. Обзор литературы). Регулируемые гены могут быть разделены на «связанные с фотосинтезом ядерные гены», «гены ответа на синглетный кислород» и «ядерные гены, связанные с пластидным редокс статусом», в частности, связанные с высоким уровнем восстановления ПХ пула и высоким содержанием O_2^- и H_2O_2 в хлоропластах (Chen и др., 2015). Однако в присутствии СОД практически все O_2^- , вышедшие из мембраны, диспропорционируют с образованием «стромального» H_2O_2 , который эффективно утилизируется системами детоксикации в строме хлоропласта. Из этого следует, что сигнал, передаваемый ПХ пулом, должен быть непосредственно связан именно с изменением количества «мембранного» H_2O_2 в хлоропластах. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные подтверждают данное предположение.

Очевидно, что для осуществления ретроградного сигнала (от органеллы к ядру) H_2O_2 должен иметь способность диффундировать от места образования к месту сигнализации на значительные расстояния. Задачей было выяснить, может ли образовавшийся H_2O_2 внутри хлоропластов, органелл фотосинтеза, диффундировать внутри хлоропласта до мембранной оболочки хлоропласта и выходить через нее в цитоплазму. Было показано, что даже при низкой интенсивности света часть молекул H_2O_2 , образовавшихся внутри хлоропластов, выходит в цитоплазму, минуя внутривнутрихлоропластные системы детоксикации (Рис. 24–Рис. 27 в главе Результаты). Количество вышедшего в цитоплазму H_2O_2 зависело от интенсивности освещения, времени освещения [*2] и активности антиоксидантной системы хлоропласта (Рис. 24 в главе Результаты). В диссертационной работе была установлена роль аквапоринов – белков, формирующих поры в мембране, – в диффузии H_2O_2 из хлоропласта в цитоплазму, а также возможное вовлечение карбоангидраз в регуляцию этого процесса (Рис. 29 и Рис. 30, Табл. 6 и Табл. 7 в главе Результаты). Учитывая, что молекулы H_2O_2 очень плохо проходят через мембраны (коэффициент распределения гидрофобная фаза (бензол)/вода 0.005 (Leo и др., 1971)), участие

аквапоринов в транспорте H_2O_2 через оболочку хлоропластов позволяет рассматривать эти белки как важный элемент внутриклеточной сигнализации.

Поскольку накопление H_2O_2 происходит при действии на растение разных стрессовых факторов, было проверено, происходит ли регуляция размера ФС II не только при повышенной освещенности растений, но и при других факторах стресса. В качестве стрессовых условий были выбраны условия повышенного содержания соли в почве и условия недостаточного увлажнения почвы, т.е. условия засухи. В ходе работы при действии обоих стрессовых факторов действительно наблюдали уменьшение размера антенны ФС II, при этом значения параметров F_V/F_M и PI_{ABS} растений были схожими с таковыми, измеренными в контрольных растениях (Рис. 35–Рис. 37, Рис. 39, Табл. 9 в главе Результаты). Полученные данные свидетельствуют о наступлении этапа акклимационной перестройки фотосинтетического аппарата в условиях засухи и повышенного содержания соли в почве, отражающегося в изменении размера светособирающего комплекса ФС II, до проявления деструкции компонентов аппарата, которую наблюдали в более поздние сроки.

Полученные данные показывают, что инкубация листьев при низкой интенсивности света в присутствии H_2O_2 приводит к увеличению содержания крахмала в листьях. Известно, что накопление крахмала в листьях происходит и при высокой интенсивности света (Forde и др., 1975, Lichtenthaler и др., 1981). Таким образом, повышенное содержание H_2O_2 в листьях отчасти имитирует условия высокой интенсивности света. В условиях засоления почвы и засухи также наблюдали увеличение количества крахмала на 20% и в 2 раза, соответственно, по сравнению с контролем (Табл. 9 в главе Результаты). В литературе нет однозначных данных по поводу содержания крахмала в стрессовых условиях. На примере некоторых видов растений, включая арабидопсис, было показано уменьшение количества крахмала в условиях засухи (Harb и др., 2010; Thalmann, Santelia, 2017), в то время как количество крахмала увеличивалось при высокой и низкой температуре (Kaplan, Guy, 2004; Hoermiller и др., 2017), а также под воздействием осмотического стресса (Skiryucz и др., 2010; Monge и др., 2014). В других исследованиях при работе с арабидопсисом было обнаружено уменьшение содержания крахмала при высокой температуре (Vasseur и др., 2011) и при действии осмотического стресса (Valerio и др., 2011). Такое несоответствие может быть связано с различиями экспериментальных подходов к созданию стрессовых условий, что может приводить к разным метаболическим

ответам. Поскольку в ходе диссертационной работы следили за акклимационным ответом растений по физиологическим параметрам до проявления очевидных признаков повреждающего действия стресса, это позволило уловить состояние, в котором наблюдается более высокий уровень содержания крахмала при действии обоих видов стресса.

Наблюдаемые изменения окислительно-восстановительного состояния ПХ пула в условиях засухи и засоления могут указывать на то, что более восстановленный пул является одним из первичных изменений в функционировании ФЭТЦ, приводящих к наблюдаемым перестройкам фотосинтетического аппарата (Рис. 35, Рис. 38 в главе Результаты). По-видимому, как и при повышенной освещенности, в условиях засоления и засухи уменьшение размера антенны ФС II – способ защиты компонентов ФЭТЦ от фотоингибирования.

Изменение размера антенны ФС II в сторону увеличения при колонизации растений, приводящей к уменьшению уровня содержания H_2O_2 в листьях, подтверждает тот факт, что именно от количества H_2O_2 зависит размер антенны ФС II (Рис. 40–Рис. 42 в главе Результаты). При этом наблюдаемый более окисленный уровень ПХ пула (Рис. 40 в главе Результаты) может говорить о том, что пониженное содержание H_2O_2 в этом случае связано с меньшим «напряжением» в ФЭТЦ.

Lhcb белки светособирающего антенного комплекса ФС II кодируются в ядерном геноме (Jansson, 1999), поэтому регуляция экспрессии этих генов в стрессовых условиях, по-видимому, осуществляется через ретроградный путь передачи сигнала хлоропласт-ядро. Предполагают, что основными участниками ретроградных сигналов являются транскрипционные факторы. Например, транскрипционный фактор ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4) представляет собой ключевой фактор многочисленных ретроградных сигнальных путей, генерируемых GUN1 (genome uncoupled; тетрапиррол-зависимая передача сигналов из пластиды в ядро) (Sun и др., 2011). Известно, что GUN1 передает сигнал, индуцирующий связывание ABI4 с промоторными последовательностями *lhcb* генов, в ядро, что блокирует экспрессию *lhcb* генов (для обзора см. Юрина, Одинцова, 2019), приводя в таком случае к уменьшению размера антенны ФС II. Еще один транскрипционный фактор – PTM, фактор связанного с оболочкой хлоропластов гомеодомена (PHD), также функционирует во множественных ретроградных сигнальных путях. PTM соединяет GUN1-путь в пластидах с ABI4-

путем в ядре (Zhang и др., 2015; Sun и др., 2011); для этого растворимая укороченная форма РТМ освобождается из оболочки хлоропласта в цитоплазму, перемещается в ядро и активирует экспрессию АВІ4. Растворимая форма РТМ образуется в результате протеолиза этого транскрипционного фактора сериновой протеазой, что приводит к отщеплению трансмембранных доменов (Adam, 2015). Что именно влияет на активность сериновой протеазы – пока неясно. Было показано, что активность SBcas3.3 сериновой протеазы в *Escherichia coli*, которая относится к подсемейству S8А сериновых протеаз, увеличивается при добавлении H_2O_2 в концентрации до 10 г л^{-1} , но уменьшается при добавлении H_2O_2 в концентрации 50 г л^{-1} (Viver и др., 2013). Можно предположить, что H_2O_2 , образованный в хлоропластах, при диффузии через мембрану хлоропласта оказывается в непосредственной близости к сериновой протеазе и, изменяя активность протеазы, влияет на перевод РТМ в растворимую форму. При невысокой концентрации H_2O_2 (в условиях высокой интенсивности света при активно функционирующей аскорбатпероксидазе) усиление активности сериновой протеазы приводит к подавлению экспрессии *lhcb* генов и уменьшению размера антенны ФС II. При высокой концентрации H_2O_2 (при ингибировании аскорбатпероксидазы в экстремальных стрессовых условиях) наоборот, может происходить инактивация сериновой протеазы, и, как следствие, акклимационное изменение размера антенного комплекса ФС II не должно наблюдаться. Гипотетический механизм участия «мембранного» H_2O_2 в изменении размера антенны ФС II представлена на Рис. 44.

В ходе диссертационной работы обнаружено, что изменение размера антенного пигмент-белкового комплекса ФС II происходит не только при изменении освещенности растений, но и при действии других абиотических факторов (засуха, засоление почвы), а также и при действии биотического фактора (колонизация ризосферными бактериями *P. putida* BS3701). Таким образом, можно утверждать, что регуляция размера антенны ФС II является одним из универсальных механизмов регуляции структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата, необходимых для приспособления высших растений к стрессовым условиям. На основе данных диссертационной работы предположено, что реакция $\text{O}_2^{\cdot -}$ с ПХН₂, приводящая к образованию «мембранного» H_2O_2 , играет определяющую роль в этом процессе.

Заключение

Наиболее значимой функцией современных пластид, хлоропластов, является кислородный фотосинтез. Однако хлоропласты выполняют многие другие функции, которые имеют решающее значение для правильного роста и развития растений, включая синтез аминокислот, нуклеотидов и жирных кислот, выработку фитогормонов, некоторых витаминов и множества вторичных метаболитов, а также усвоение азота и серы. Акклимационные процессы, протекающие в хлоропластах при действии абиотических и биотических факторов, важны для взаимодействия растений с окружающей средой, что способствует приспособлению растений к стрессовым факторам, включая засуху, засоление, повышенную освещенность, колонизацию микроорганизмами и многое другое.

В ходе фотосинтеза происходит не только выделение молекулярного кислорода (O_2), но и поглощение O_2 за счет восстановления молекул O_2 (реакция Мелера) некоторыми переносчиками фотосинтетической электрон-транспортной цепи, расположенной в тилакоидных мембранах хлоропластов. В результате реакции Мелера происходит образование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . В диссертационной работе установлено, что ПХ пул тилакоидных мембран вовлечен в систему ретроградного сигналинга за счет реакции другого компонента пула – пластогидрохинона, PQH_2 , с супероксидным анион-радикалом, $O_2^{\cdot-}$, генерируемым в тилакоидной мембране. Результатом данной реакции является образование стабильной АФК, молекулы H_2O_2 , способной выполнять сигнальную функцию. Образование H_2O_2 увеличивается при высокой интенсивности света за счет увеличения «мембранного» H_2O_2 при увеличении количества образованного $O_2^{\cdot-}$ компонентами ФСII, предположительно, филлосемихиноном [*12]. Полученные данные расширяют фундаментальные представления о функциональной роли ПХ пула в тилакоидных мембранах высших растений, показывая, что ПХ пул вовлечен в реакцию Мелера в хлоропластах высших растений и, таким образом, в генерацию сигнальных молекул в растительной клетке.

Высокий уровень восстановления ПХ пула при высокой интенсивности света является сигналом для уменьшения размера светособирающего пигмент-белкового комплекса ФСII. В ходе диссертационной работы показано, что молекулы H_2O_2 , предположительно «мембранной» фракции, количество которых

увеличивается при увеличении интенсивности света, представляют собой сигнал, свидетельствующий об окислительно-восстановительном состоянии ПХ пула. Изменение размера светособирающей антенны ФС II при изменении содержания H_2O_2 является принципиально новым результатом, доказывающим непосредственную роль H_2O_2 в ретроградной сигнализации. Установлено, что регуляция размера антенны ФС II является одним из универсальных механизмов регуляции структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата, необходимых для приспособления высших растений к стрессовым условиям.

Многие экспериментальные данные о сигнальной роли H_2O_2 , представленные в литературе, получены с использованием трансгенных растений, в которых нельзя исключить плейотропных эффектов. Разработанные в ходе работы экспериментальные подходы при работе с растениями дикого типа, позволяющие целенаправленно изменять количество H_2O_2 в листьях, являются ключевыми в достижении полученных результатов. Такие подходы могут быть использованы в дальнейшем для изучения детальных механизмов действия H_2O_2 на сигнальные каскадные пути в растениях.

Доказательство диффузии сигнальной молекулы H_2O_2 через аквапорины позволяет рассматривать эти интегральные мембранные белки как важный элемент ретроградного сигналинга. От степени закрытия аквапоринов в стрессовых условиях может зависеть диффузия H_2O_2 через мембранную оболочку хлоропластов. Полное закрытие аквапоринов в стрессовых условиях может запустить регулируемый процесс программируемой гибели даже внутри одного хлоропласта, если по каким-то причинам этот хлоропласт не смог приспособиться к новым условиям. Такое предположение высказывается впервые, поскольку обычно программируемую гибель рассматривают в пределах целой клетки. При этом считается, что митохондрии играют ключевую роль в активации этого процесса не только в клетках млекопитающих, но и в клетках высших растений.

Возможность регулирования размера антенны у растений путем изменения количества H_2O_2 в дальнейшем может быть использована в практических целях, например, с целью выращивания растений в более северных широтах. Увеличения размера светособирающей антенны ФС II можно достичь путем гиперэкспрессии генов белков антиоксидантной системы, в результате чего будет происходить уменьшение количества H_2O_2 . Это приведет к более эффективному использованию световой энергии для фотохимических процессов и

в перспективе к продуктивному приросту биомассы. Влияние колонизации растений ризобактериями на изменение размера антенны ФС II раскрывает потенциал применения таких микроорганизмов в сельском хозяйстве без применения генетических модификаций растений.

Выводы

1. Светоиндуцированная генерация супероксидных анион-радикалов, $O_2^{\bullet-}$, преимущественно компонентами ФС I тилакоидной мембраны, приводит к окислению ПХ пула и образованию «мембранного» H_2O_2 в реакции $PXH_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow PX^{\bullet-} + H_2O_2$. Общая продукция H_2O_2 в хлоропластах высших растений при увеличении интенсивности света возрастает за счет образования «мембранного» H_2O_2 .
2. Молекулы H_2O_2 , образующиеся внутри хлоропласта, диффундируют за пределы хлоропласта. Количество H_2O_2 , вышедшего из хлоропластов, зависит от интенсивности света и времени освещения, а также активности антиоксидантной системы хлоропластов. Диффузия H_2O_2 из хлоропластов осуществляется через аквапорины, расположенные во внутренней хлоропластной мембране. На открытие/закрытие аквапоринов может оказывать влияние активность карбоангидраз(ы) мембранной оболочки хлоропластов.
3. Экспериментальное снижение уровня H_2O_2 в листьях при повышенной освещенности препятствует уменьшению содержания белков периферической антенны Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6, и таким образом, уменьшению размера антенны ФС II, что происходит при повышенной освещенности при высоком содержании H_2O_2 .
4. Экспериментальное увеличение количества H_2O_2 в листьях при низкой интенсивности света приводит к уменьшению размера светособирающей антенны ФС II по сравнению с размером антенны при обычном низком содержании H_2O_2 в этих условиях освещения *in vivo*.
5. Подавление экспрессии ядерных генов, кодирующих белки Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 антенны ФС II, при повышенной освещенности зависит от количества «мембранного» H_2O_2 , поскольку с увеличением интенсивности света увеличивается образование именно «мембранного» H_2O_2 .

6. Регуляция размера светособирающей антенны ФС II представляет собой один из универсальных механизмов изменения структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений при изменении условий окружающей среды. Абиотические факторы, такие как засуха и засоление почвы, повышая уровень восстановления ПХ пула, увеличивают содержание H_2O_2 в листьях, что приводит к уменьшению размера антенны ФС II. Колонизация растений ризосферными бактериями *Pseudomonas putida* BS3701, уменьшая уровень восстановления ПХ пула и уровень содержания H_2O_2 , приводит к увеличению размера антенны ФС II.

Библиографический список

1. Abdallah F., Salamini F., Leister D. (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends in Plant Sciences*, Vol. 5, pp. 141–142. DOI: 10.1016/s1360-1385(00)01574-0
2. Adam Z. (2015) Plastid intramembrane proteolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1847: 910–914. DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.12.006
3. Adams, W. W. III., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A. S., and Barker, D. H. (1995b). ‘Photoinhibition’ during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 261–276. DOI: 10.1071/PP9950261
4. Adams, W. W. III., Hoehn, A., and Demmig-Adams, B. (1995a). Chilling temperatures and the xanthophyll cycle. A comparison of warm-grown and overwintering spinach. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 75–85. DOI: 10.1071/PP9950075
5. Afanas’ev IB (1989) *Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida
6. Aikens J, Dix TA (1991) Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266: 15091–15098 PMID: 1869544
7. Albanese, P., Manfredi, M., Meneghesso, A., Marengo, E., Saracco, G., Barber, J., et al. (2016). Dynamic reorganization of photosystem II supercomplexes in response to variations in light intensities. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 1651–1660. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.06.011
8. Alberte, R.S., Fiscus, E.L., Naylor, A.W. (1975) The effects of water stress on the development of the photosynthetic apparatus in greening leaves. *Plant Physiol.* 55, 317–321. DOI: 10.1104/pp.55.2.317
9. Albertsson, P.A. (2001). A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends in Plant Science*, 6 (8), 349–354. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02021-0
10. Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanasaki, Y., Murata, N.: Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* 130: 1443-1453, 2002. DOI: 10.1104/pp.20.01546

11. Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N. (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. – *Plant Physiol.* 123: 1047-1056. DOI: 10.1104/pp.123.3.1047
12. Allan A.C., Fluhr R. (1997) Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *Plant Cell*, Vol. 9, pp. 1559–1572. DOI: 10.1105/tpc.9.9.1559
13. Allen, J.F. (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J. Theor. Biol.* 165: 609–631. DOI: 10.1006/jtbi.1993.1210
14. Allen J.F, de Paula W.B.M., Puthiyaveetil S., Nield J. (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends in Plant Science*, Vol. 16, 645–655. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.10.004
15. Allen, J.F. and Pfannschmidt, T. (2000) Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction center genes in chloroplasts, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 355, 1351–1359. DOI: 10.1098/rstb.2000.0697
16. Anderson JM, Price GD, Chow WS, Hope AB, Badger MR (1997) Reduced levels of cytochrome bf complex in transgenic tobacco leads to marked photochemical reduction of the plastoquinone pool, without significant change in acclimation to irradiance. *Photosynth Res* 53: 215–227 DOI: 10.1023/A:1005856615915
17. Anderson, J. M. (1986). Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 37, 93–136. DOI: 10.1146/annurev.pp.37.060186.000521
18. Anderson, J. M. (1989). The grana margins of plant thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 76, 243–248. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05640.x
19. Anderson, J. M., Goodchild, D. J., and Boardman, N. K. (1973). Composition of photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants. *Biochim. Biophys. Acta* 325, 573–585. DOI: 10.1016/0005-2728(73)90217-x
20. Anderson, J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 93–136.
21. Andersson, B., & Anderson, J. M. (1980). Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of

- spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 593(2), 427–440. DOI: 10.1016/0005-2728(80)90078-x
22. Antal TK, Mattila H, Hakala-Yatkin M, Tyystjärvi T, Tyystjärvi E (2010) Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 232, 887-898. DOI: 10.1007/s00425-010-1227-5.
23. Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
24. Apse, M.P., Blumwald, E., 2007. Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett.* 581, 2247–2254. DOI: 10.1093/aob/mcg058
25. Arkhipova T. N., Prinsen E., Veselov S. U., Martinenko E. V., Melentiev A. I., Kudoyarova G. R. (2007) Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil.* 292: 305-315. DOI: 10.1007/s11104-007-9233-5
26. Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamaki E. 2005 Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes *J. Exp. Bot.*, 56, pp. 347-356 DOI: 10.1093/jxb/eri041
27. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391–396 DOI: 10.1104/pp.106.082040
28. Ashraf M, Foolad MR: Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot.* 2007;59(2):206–16. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2005.12.006
29. Bailey S., Walters R. G., Jansson S., Horton P. (2001). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213 DOI: 10.1007/s004250100556
30. Bailey, S., Horton, P., and Walters, R. G. (2004). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta* 218, 793–802. DOI: 10.1007/s00425-003-1158-5
31. Ballottari M, Govoni C, Caffarri S, Morosinotto T. 2004. Stoichiometry of LHCI antenna polypeptides and characterization of gap and linker pigments in higher plants Photosystem I. *European Journal of Biochemistry* 271, 4659–4665. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04426.x

32. Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., and Bassi, R. (2007). Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J. Biol. Chem.* 282, 8947–8958. DOI: 10.1074/jbc.m606417200
33. Bassi R, Peruffo A dal B, Barbato R, Ghisi R (1985) Differences in chlorophyll-protein complexes and composition of polypeptides between thylakoids from bundle sheaths and mesophyll cells in maize. *European Journal of Biochemistry* 146, 589–595. DOI:10.1111/j.1432-1033.1985.tb08692.x.
34. Beck C.F. (2005) Signaling Pathways from the Chloroplast to the Nucleus. *Planta*, Vol. 222, pp. 743–75. DOI: 10.1007/s00425-005-0021-2
35. Bent E. (2006) Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). Multigenic and induced systemic resistance in plants. *Springer US*, 225-258. DOI: 10.1007/0-387-23266-4_10
36. Bienert GP, Moller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 282, pp. 1183–92.
37. Biver, S., Portetelle, D., Vandenbol, M. (2013) Characterization of a new oxidant-stable serine protease isolated by functional metagenomics. *SpringerPlus* 2, 410. DOI: 10.1186/2193-1801-2-410
38. Björkman, O., and Holmgren, P. (1963). Adaptability of photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats. *Physiol. Plant* 16, 889–914. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1963.tb08366.x
39. Blilou I, Xu J, Wildwater M, et al. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433 (7021):39–44. DOI: 10.1038/nature03184
40. Boardman N. K. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 28 355–377. DOI: 10.1146/annurev.pp.28.060177.002035
41. Boekema, E. J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R., and Dekker, J. P. (1999) Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes, *Biochemistry*, 38(8), 2233-2239. DOI: 10.1021/bi9827161
42. Bonen L., Doolittle F.W. (1975) On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. Vol. 72, pp. 2310–2314. DOI: 10.1073/pnas.72.6.2310

43. Bowler C., Fluhr R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5 241–246.
10.1016/S1360-1385(00)01628-9
44. Bray EA: Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 1997;2(2):48–54.
45. Brinkert, K., Causmaecker, S. D., Krieger-Liszkay, A., Fantuzzi, A., and Rutherford, A. W. (2016). Bicarbonate-induced redox tuning in Photosystem II for regulation and protection. *PNAS* 113, 12144–12149.
doi:10.1073/pnas.1608862113.
46. Brugnoli, E., Cona, A., and Lauteri, M. (1994). Xanthophyll cycle components and capacity for non-radiative energy dissipation in sun and shade leaves of *Ligustrum ovalifolium* exposed to conditions limiting photosynthesis. *Photosynth. Res.* 41, 451–463. doi: 10.1007/BF02183047
47. Busch A, Hippler M. (2011) The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807:864–877. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.09.009.
48. Busch A, Hippler M. (2011) The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochim Biophys Acta.* 1807(8):864-77. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.09.009.
49. Caffarri S, Kouril R, Kereiche S, Boekema EJ, Croce R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J* 28(19):3052–3063. DOI:10.1038/emboj.2009.232
50. Canvin DT, Berry JA, Badger MR, Fock H, Osmond CB. (1980) Oxygen exchange in leaves in the light. *Plant Physiology* 66, 302–307.
51. Chakraborty, N. & Tripathy, B. C. (1992) Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplasts. *Plant Physiol.* 98, 7–11. DOI: 10.1104/pp.98.1.7
52. Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot.* 103 (4):551–60. DOI: 10.1093/aob/mcn125
53. Chaves MM, Oliveira MM. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot.* 55(407): 2365–84. DOI: 10.1093/jxb/erh269
54. Chazen, O., Hartung, W., and Neumann, P. M. (1995). The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant Cell Environ.* 18, 727–735.

55. Chen H, Li Z, Xiong L. (2012) A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. *FEBS Lett.* 586 (12):1742–7. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.05.013
56. Chen S, Kim C, Lee JM, LEE HA, Fei Z, Wang L, Apel K (2015) Blocking the QB-binding site of photosystem II by tenuazonic acid, a non–host-specific toxin of *Alternaria alternata*, activates singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 38: 1069–1080
57. Chen X, Wang Y, Lv B, et al. (2014) The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. *Plant Cell Physiol.* 55(3): 604–19. DOI: 10.1093/pcp/pct204
58. Chen YE, Liu WJ, Su YQ, Cui JM, Zhang ZW, Yuan M, Zhang HY, Yuan S. (2016) Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 158(2): 225-35. DOI: 10.1111/ppl.12438
59. Chen YE, Zhao ZY, Zhang HY, Zeng XY, Yuan S (2013) Significance of CP29 reversible phosphorylation in thylakoids of higher plants under environmental stresses. *J Exp Bot* 64: 1167–1178 DOI: 10.1093/jxb/ert002
60. Chen YE, Liu WJ, Su YQ, Cui JM, Zhang ZW, Yuan M, Zhang HY, Yuan S. (2016) Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 158(2): 225-35. DOI: 10.1111/ppl.12438
61. Chen, Z., Pottosin, I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., Shabala, S. (2007) Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol.* 145, 1714–1725.
62. Cherepanov, D.A., Milanovsky, G.E., Petrova, A.A. et al. (2017) Electron transfer through the acceptor side of photosystem I: Interaction with exogenous acceptors and molecular oxygen. *Biochemistry Moscow* 82, 1249–1268.
63. Chiappero J., Cappellari L. del R., Sosa Alderete L.G., Palermo T.B., Banchio E., (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Ind. Crop. Prod.* 139, 111553.
64. Chung JS, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM, Shi H (2008) Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced SOS1 mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant J* 53(3): 554–565

65. Cormier MJ, Prichard PM (1968) An Investigation of the Mechanism of the Luminescent Peroxidation of Luminol by Stopped Flow Techniques. *Journal of Biological Chemistry* 243, 4706–4714. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)93176-5
66. Cornic G, Briantais J-M (1991) Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta* 183: 178–184
67. Correa-Galvis, V., Poschmann, G., Melzer, M., Stühler, K., and Jahns, P. (2016) PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 2:15225. doi: 10.1038/nplants.2015.225
68. Cuadrado A, Nebreda AR. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 429: 403-17. DOI: 10.1042/BJ20100323.
69. Cuin, T.A., Betts, S.A., Chalmandrier, R., Shabala, S. (2008) A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 59, 2697–2706.
70. Cuin, T.A., Miller, A., Laurie, S., Leigh, R. (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J. Exp. Bot.* 54, 657–661.
71. Cuin, T.A., Zhou, M., Parsons, D., Shabala, S. (2012) Genetic behaviour of physiological traits conferring cytosolic K⁺/Na⁺ homeostasis in wheat. *Plant Biol.* 14, 438–446 DOI: 10.1111/j.1438-8677.2011.00526.x
72. D'Autreaux B., Toledano M. B. (2007) ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 813–824. DOI: 10.1038/nrm2256
73. Dalal, V.K., Tripathy, B.C. (2018) Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. *Sci Rep* 8, 5955. DOI: 10.1038/s41598-017-14419-4
74. Dall'Osto, L., Caffarri, S., and Bassi, R. (2005) A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell* 17, 1217–1232. DOI: 10.1105/tpc.104.030601
75. Damkjær, J. T., Kereiche, S., Johnson, M. P., Kovacs, L., Kiss, A. Z., Boekema, E. J., and Jansson, S. (2009) The photosystem II light-harvesting protein Lhcb3 affects the macrostructure of photosystem II and the rate of state transitions in *Arabidopsis*, *PLANT CELL*, 21(10), 3245-3256. DOI: 10.1105/tpc.108.064006
76. Daum, B., & Kuhlbrandt, W. (2011) Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), 2393–2402. DOI: 10.1093/jxb/err034

77. Davis D.J., San Pietro A. (1977) Interaction between spinach ferredoxin and other electron carries. The involvement of a ferredoxin: cytochrome c complex in the ferredoxin-linked cytochrome c reductase activity of ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, p. 266-272.
78. De Pinto MC, Locato V, De Gara L. (2012) Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environ.* 35: 234-44. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02387.x.
79. Dekker, J. P., and Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706(1): 12-39.
80. Demmig, B., Winter, K., Krüger, A., and Czygan, F.-C. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light. *Plant Physiol.* 84, 218–224. DOI: 10.1104/pp.84.2.218
81. Demmig-Adams, B., and Adams, W. W. III. (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198, 460–470. DOI: 10.1007/BF00620064
82. Demmig-Adams, B., Ebbert, V., Mellman, D. L., Mueh, K. E., Schaffer, L., Funk, C., et al. (2006) Modulation of PsbS and flexible vs sustained energy dissipation by light environment in different species. *Physiol. Plant.* 127, 670–680. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00698.x
83. Demmig-Adams, B., Muller, O., Stewart, J. J., Cohu, C. M., and Adams, W. W. III. (2015). Chloroplast thylakoid structure in evergreen leaves employing strong thermal energy dissipation. *J. Photochem. Photobiol. B* 152, 357–366. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.03.014
84. Desikan R., Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J. (2001) Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiology*, Vol. 127, pp. 159–172.
85. Dietzel L, Gläßer C, Liebers M, Hiekel S, Courtois F, Czarnecki O, Schlicke H, Zubo Y, Börner T, Mayer K, Grimm B, Pfannschmidt T (2015) Identification of early nuclear target genes of plastidial redox signals that trigger the long-term response of Arabidopsis to light quality shifts. *Mol Plant* 8: 1237–1252
86. Dimkpa C., Weinand T., Asch F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment.* 32: 1682-1694.

87. Douce R., Joyard J. (1982) Purification of the chloroplast envelope, in: M. Edelman, R.B. Hallick, N.-H. Chua (Eds.), *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Elsevier Biomedical Press, New York, pp. 239–256.
88. Du H, Wang N, Cui F, et al. : Characterization of the beta-carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. *Plant Physiol.* 2010;154(3):1304–18. DOI: 10.1104/pp.110.163741
89. Edwards G, Walker D (1983) C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Univ of California Press,
90. Farooq MA, Niazi AK, Akhtar J, Saifullah, Farooq M, Souri Z, Karimi N, Rengel Z. (2019) Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiol Biochem.* Aug;141:353-369. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.04.039.
91. Ferretti U, Ciura J, Ksas B, Rác M, Sedlářová M, Kruk J, Havaux M, Pospíšil P (2018) Chemical quenching of singlet oxygen by plastoquinols and their oxidation products in Arabidopsis. *Plant J* 95: 848–861 DOI: 10.1111/tpj.13993
92. Fey V, Wagner R, Bräutigam K, Pfannschmidt T (2005) Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *J Exp Bot*, 56: 1491–1498 DOI: 10.1093/jxb/eri180
93. Fillingame R.H., Angevine C.M. , Dmitriev O.Y. (2003) Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. *FEBS Lett.*, 555 , pp. 29-34 DOI: 10.1016/s0014-5793(03)01101-3
94. Fischer BB, Hideg E, Krieger-Liszkay A (2013) Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal* 18: 2145–2162 DOI: 10.1089/ars.2012.5124
95. Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172, 73–82. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01794.x
96. Ford, K. L., Cassin, C. & Bacic, A. (2011) Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought tolerance. *Front. Plant Sci.* 2, 44 DOI: 10.3389/fpls.2011.00044

97. Forde, B. J., Whitehead, H. C. M., & Rowley, J. A. (1975). Effect of light intensity and temperature on photosynthetic rate, leaf starch content and ultrastructure of *Paspalum dilatatum*. *Functional Plant Biology*, 2(2), 185-195.
98. Foyer C.H., Noctor G. (2009) Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. 11, pp. 861–905. DOI: 10.1089/ars.2008.2177
99. Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60: 455–484
100. Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 63: 1637–1661
101. Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355–364
102. Foyer, C. H. (2003). The contribution of photosynthetic oxygen metabolism to oxidative stress in plants. In D. Inzé, & M. Van Montagu (Eds.), *Oxidative stress in plants* (pp. 51–83). San Diego: Taylor & Francis.
103. Frigerio S, Campoli C, Zorzan S, Fantoni LI, Crosatti C, Drepper F, Haehnel W, Cattivelli L, Morosinotto T, Bassi R. 2007. Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 29457–29469.
104. Fukao T, Xu K, Ronald PC, et al. : A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell*. 2006;18(8):2021–34.
105. Gajev I, Vanderauwera S., Gechev T.S., Laloi C., Minkov I.N., Shulaev V., Apel K., Inze D., Mittler R., van Breusegem F. (2006). Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*. Vol. 141, pp. 436–445.
106. Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M (2010) The Role of Reactive Oxygen Species in Signalling from Chloroplasts to the Nucleus. *Physiol. Plant*. Vol. 138, pp. 430–439.

107. Gao J., Wang X., Chang Y., Zhang J., Song Q., Yu H., Li X. (2006) Acetazolamide inhibits osmotic water permeability by interaction with aquaporin-1, *Anal. Biochem.* 350 165–170.
108. Ge L, Chao D, Shi M, et al.: Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta.* 2008;228(1):191–201.
109. Giardi, M. T. et al. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta* 199, 118–125 (1996)
110. Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, et al. : Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature.* 2008;455(7210):189–94.
111. Gowik U, Westhoff P: The path from C 3 to C 4 photosynthesis. *Plant Physiol.* 2011;155(1):56–63.
112. Grieco, M., Suorsa, M., Jajoo, A., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2015). Light-harvesting II antenna trimers connect energetically the entire photosynthetic machinery—Including both photosystems II and I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(6–7), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.03.004>
113. Gross, E.L. Plastocyanin: Structure and function. *Photosynth Res* 37, 103–116 (1993).
114. Gruszka J, Pawlak A, Kruk J (2008) Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers—determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radic Biol Med* 45: 920–928
115. Gupta, R., He, Z., and Luan, S. (2002) Functional relationship of cytochrome *c*₆ and plastocyanin in *Arabidopsis*. *Nature* 417, 567–571
116. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., & Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature structural & molecular biology*, 16(3), 334-342.
117. Haddoub R., Rutzler M., Robin A., Flitsch S.L. (2009) Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors, in: E. Beitz (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology: Aquaporins*, Springer, Berlin, Germany, pp. 385–402.
118. Haldrup A, Naver H, Scheller HV. 1999 The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant J.* Mar;17(6):689-98.

119. Haldrup A, Simpson DJ, Scheller HV. 2000 Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *J Biol Chem.* 275(40):31211-8.
120. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
121. Hatz S, Lambert JD, Ogilby PR. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem Photobiol Sci.* 2007;6(10):1106-1116. DOI: 10.1039/b707313e
122. Hauska G, Hurt E, Gabellini N, Lockau W (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome c/plastocyanin oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Bioenerg* 726: 97–133
123. He X, Chen Z, Wang J, et al. : A sucrose: Fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT) gene from *Psathyrostachys huashanica* confers abiotic stress tolerance in tobacco. *Gene.* 2015;570(2):239–47.
124. He, J. X., Wang, J. & Liang, H. G. Effects of water-stress on photochemical function and protein-metabolism of photosystem-II in wheat leaves. *Physiol. Plant.* 93, 771–777 (1995). DOI: 10.1111/j.1399-3054.1995.tb05130.x
125. Heber U, Heldt HW (1981) The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 32, 139–168.
126. Heber U, Santarius KA. 1970. Direct and indirect transfer of ATP and ADD across the chloroplast envelope. *Zeitschrift fur Naturforschung B* 25, 718–728. DOI: 10.1515/znb-1970-0714
127. Henry A, Cal AJ, Batoto TC, et al. : Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. *J Exp Bot.* 2012;63(13):4751–63. 10.1 DOI: 10.1093/jxb/ers150
128. Henzler T, Steudle E. 2000. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 51, pp. 2053–2066.
129. Hernandez, J. A., Ferrer, M. A., Jimenez, A., Barcelo, A. R., and Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127, 817–831.

130. Hofmann NR (2010). A New Thioredoxin Is Involved in Plastid Gene Expression. *Plant Cell*. 22(5): 1423.
131. Holzwarth, A. R., Miloslavina, Y., Nilkens, M., and Jahns, P. (2009). Identification of two quenching sites active in the regulation of photosynthetic light-harvesting studied by time-resolved fluorescence. *Chem. Phys. Lett.* 483, 262–267. DOI: 10.1016/j.cplett.2009.10.085
132. Horton, P. (2014). “Developments in research on non-photochemical fluorescence quenching: emergence of key ideas, theories and experimental approaches,” in *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, eds B. Demmig-Adams, W. W. Adams II, G. Garab, and Govindjee. (Dordrecht: Springer), 73–95.
133. Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655–684. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.655
134. Horton, P., Wentworth, M., and Ruban, A. (2005). Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett.* 579, 4201–4206. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.003
135. Hossain MS, ElSayed AI, Moore M, Dietz KJ. Redox and Reactive Oxygen Species Network in Acclimation for Salinity Tolerance in Sugar Beet. *J Exp Bot.* 2017;68(5):1283-1298. doi:10.1093/jxb/erx019
136. Hu T, Chen K, Hu L, Amombo E, Fu J. H₂O₂ and Ca²⁺-based signaling and associated ion accumulation, antioxidant systems and secondary metabolism orchestrate the response to NaCl stress in perennial ryegrass. *Sci Rep.* 2016;6:36396. Published 2016 Nov 2. doi:10.1038/srep36396
137. Huang B, Fry JD: Root Anatomical, Physiological, and Morphological Responses to Drought Stress for Tall Fescue Cultivars. *Crop Sci.* 1998;38(4):1017–1022.
138. Huang H, Ullah F, Zhou D-X, Yi M, Zhao Y (2019) Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front Plant Sci.*; 10: 800. Published online 2019 Jun 25. doi: 10.3389/fpls.2019.00800
139. Huber V.J., Tsujita M., Yamazaki M., Sakimura K., Nakada T. (2007) Identification of arylsulfonamides as Aquaporin 4 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 1270–1273.

140. Hundal T, Forsmark-Andrée P, Ernster L, Andersson B (1995) Antioxidant activity of reduced plastoquinone in chloroplast thylakoid membranes. *Arch Biochem Biophys* 324: 117–122 DOI: 10.1006/abbi.1995.9920
141. Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., et al. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7 301–308. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02302-6
142. Ifuku K, Noguchi T. Structural Coupling of Extrinsic Proteins with the Oxygen-Evolving Center in Photosystem II (2005) *Front Plant Sci.* 7:84.
143. Ignatova LK, Rudenko NN, Mudrik VA, Fedorchuk TP, Ivanov BN. (2011) Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynth Res.* 110: 89-98. DOI: 10.1007/s11120-011-9699-0
144. Imlay J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57 395–418. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
145. Isayenkov SV, Maathuis FJM. Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front Plant Sci.* 2019; 10:80. DOI: 10.3389/fpls.2019.00080
146. Isayenkov, S. V. (2012). Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytol. Genet.* 46, 302–318. DOI: 10.3103/S0095452712050040
147. Ivanov B, Mubarakshina M, Khorobrykh S (2007) Kinetics of the plastoquinone pool oxidation following illumination. *FEBS Lett* 581: 1342–1346 DOI: 10.1016/j.febslet.2007.02.044
148. Ivanov, B., and Khorobrykh, S. (2003). Participation of Photosynthetic Electron Transport in Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling* 5, 43–53. DOI: 10.1089/152308603321223531
149. Iwai, M., Yokono, M., & Nakano, A. (2014). Visualizing structural dynamics of thylakoid membranes. *Scientific Reports*, 4, 3768.
150. Jaffe MJ, Takahashi H, Biro RL: A pea mutant for the study of hydrotropism in roots. *Science.* 1985;230(4724):445–7. DOI: 10.1126/science.230.4724.445
151. Jahns, P., and Holzwarth, A. R. (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 182–193. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.04.012

152. Jahns, P., and Miede, B. (1996). Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198, 202–210. DOI: 10.1007/BF00206245
153. Jahns, P., Latowski, D., and Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 3–14. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.09.013
154. James AM, Cocheme HM, Smith RAJ, Murphy MP (2005) Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280: 21295–21312
155. Jansson S. 1994 The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1184(1):1-19. DOI: 10.1016/0005-2728(94)90148-1
156. Jansson, S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 4(6), 236-240.
157. Järvi S, Suorsa M, Aro E-M 2015 Photosystem II repair in plant chloroplasts — Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* Volume 1847: 900-909
158. Jeanjean, R., Matthijs, H.C.P., Onana, B., Havaux, M., Joset, F.: Exposure of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis. – *Plant Cell Physiol.* 34: 1073-1079, 1993. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078521
159. Ji X, Dong B, Shiran B, et al. (2011) Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiol.* 156: 647–62.
160. Kalaji H.M. et al. (2014) frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth. Res.* 122: 121-158.
161. Kale R, Hebert AE, Frankel LK, Sallans L, Bricker TM, Pospíšil P (2017) Photoinhibition of Photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 114: 2988-2993.
162. Kaplan F, Zhao W, Richards JT, Wheeler RM, Guy CL, Levine LH (2012) Transcriptional and metabolic insights into the differential physiological responses of *Arabidopsis* to optimal and supraoptimal atmospheric CO₂. *PloS One* 7, e43583. DOI:10.1371/journal.pone.0043583.

163. Karpinska B, Wingsle G, Karpinski S (2000) Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB Life* 50: 21–26
164. Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. 284: 654–657. DOI: 10.1126/science.284.5414.654
165. Kettunen, R., Tyystjärvi, E., & Aro, E. M. (1991). D1 protein degradation during photoinhibition of intact leaves. A modification of the D1 protein precedes degradation. *FEBS Letters*, 290(1–2), 153–156. DOI: 10.1016/0014-5793(91)81247-6
166. Khorobrykh S, Mubarakshina M, Ivanov B (2004) Photosystem I is not solely responsible for oxygen reduction in isolated thylakoids. *Biochim Biophys Acta* 1657: 164–167 DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.04.009
167. Khorobrykh S, Tyystjärvi E (2018) Plastoquinol generates and scavenges reactive oxygen species in organic solvent: Potential relevance for thylakoids. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1859: 1119–1131 DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.07.003
168. Khorobrykh SA, Ivanov BN (2002) Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids. *Photosynth Res* 71: 209–219 DOI: 10.1023/A:1015583502345
169. Khorobrykh SA, Karonen M, Tyystjärvi E (2015) Experimental evidence suggesting that H₂O₂ is produced within the thylakoid membrane in a reaction between plastoquinol and singlet oxygen. *FEBS Lett* 589: 779–786
170. Kimura S., Kaya H., Kawarazaki T., Hiraoka G., Senzaki E., Michikawa M., et al. (2012). Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*. 1823 398–405. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.011
171. Kirchhoff, H. (2014). Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 495–502. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.11.003

172. Kirchhoff, H., Li, M., & Puthiyaveetil, S. (2017). Sublocalization of cytochrome b6f complexes in photosynthetic membranes. *Trends in Plant Science*, 22(7), 574–582. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.04.004
173. Kirchhoff, H., Tremmel, I., Haase, W., & Kubitscheck, U. (2004). Supramolecular photosystem II organization in grana thylakoid membranes: Evidence for a structured arrangement. *Biochemistry*, 43(28), 9204–9213.
174. Kloepper J. W., Schroth M. N. (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*. 2:879-882.
175. Kochevar I. E. (2004). Singlet oxygen signaling: from intimate to global. *Sci STKE* 2004:e7. DOI: 10.1126/stke.2212004pe7
176. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J.B., Croce, R., and Boekema, E.J. (2013) High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*, *BBA*, 1827(3), 411-419.
177. Kouřil, R., Dekker, J.P. and Boekema, E.J. (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 2– 12. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.05.024
178. Kozuleva MA, Ivanov BN (2016) The Mechanisms of Oxygen Reduction in the Terminal Reducing Segment of the Chloroplast Photosynthetic Electron Transport Chain. *Plant Cell Physiol* 57: 1397–1404
179. Kozuleva MA, Ivanov BN, Vetoshkina DV, Borisova-Mubarakshina MM. (2020) Minimizing an Electron Flow to Molecular Oxygen in Photosynthetic Electron Transfer Chain: An Evolutionary View. *Front Plant Sci*. 11: 211. DOI: 10.3389/fpls.2020.00211
180. Kozuleva MA, Petrova AA, Mamedov MD, Semenov AY, Ivanov BN (2014) O₂ reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination. *FEBS Lett* 588: 4364–4368
181. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* 79: 209–218 DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d
182. Krause, G. H., Vernotte, C., and Briantais, J.-M. (1982). Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim. Biophys. Acta* 679, 116–124. DOI: 10.1016/0005-2728(82)90262-6

183. Kreslavski VD, Los DA, Allakhverdiev SI, Kuznetsov VV (2012) Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russ J Plant Physiol* 59: 141–154 DOI: 10.1134/S1021443712020057
184. Krieger-Liszkay A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56: 337–346 DOI: 10.1093/jxb/erh237
185. Kruk J, Jemioła-Rzemińska M, Burda K, Schmid GH, Strzałka K (2003) Scavenging of Superoxide Generated in Photosystem I by Plastoquinol and Other Prenylipids in Thylakoid Membranes. *Biochemistry* 42: 8501–8505 DOI: 10.1021/bi034036q
186. Kruk J, Karpinski S (2006) An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state in thylakoids of *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1669–1675 DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.08.004
187. Kruk J, Kubasik-Kladna K, Y Aboul-Enein H (2016) The role oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases: current status and a dual role of physical activity. *Mini Rev Med Chem* 16: 241–257 DOI: 10.2174/1389557516666151120114605
188. Kruk J, Trebst A (2008) Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1777: 154–162
189. Ksas B, Becuwe N, Chevalier A, Havaux M (2015) Plant tolerance to excess light energy and photooxidative damage relies on plastoquinone biosynthesis. *Sci Rep* 5: 10919 DOI: 10.1038/srep10919
190. Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302:1009–1014 DOI: 10.1126/science.1090165
191. Kurusu T, Kuchitsu K, Tada Y (2015) Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Front Plant Sci* 6:427 DOI: 10.3389/fpls.2015.00427
192. Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22: 2623–2633 DOI: 10.1093/emboj/cdg277

193. Laasch H. 1987. Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts under conditions of stressed photosynthesis. *Planta* 171, 220–226. DOI: 10.1007/BF00391097
194. Laloi C., Przybyla D., Apel K. (2006) A Genetic Approach Towards Elucidating the Biological Activity of Different Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, pp. 1719–1724.
195. Lawlor DW: Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann Bot.* 2002;89(Spec No):871–85. DOI: 10.1093/aob/mcf110
196. Lawrence RM, Varco-Merth B, Bley CJ, Chen J J-L, Fromme P. 2011 Recombinant production and purification of the subunit c of chloroplast ATP synthase. *Protein expression and purification*. Volume 76, 15-24 DOI: 10.1016/j.pep.2010.10.009
197. Lee K.P., Kim C., Landgraf F., Apel K. (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-Dependent Transfer of Stress-Related Signals from the Plastid to the Nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 104, pp. 10270–10275.
198. Leo A, Hansch C, Elkins D (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews* 71, 525–616. DOI: 10.1021/cr60274a001
199. Leshem Y, Seri L, Levine A (2007) Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J* 51(2):185–197 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03134.x
200. Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK. (2009) Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 60, pp. 239–260.
201. Li, X. P., Gilmore, A. M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., et al. (2004). Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J. Biol. Chem.* 279, 22866–22874. DOI: 10.1074/jbc.M402461200
202. Li, Z. R., Wakao, S., Fischer, B. B., and Niyogi, K. K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 239–260. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844
203. Liang C, Wang Y, Zhu Y, et al. : OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting

- senescence-associated genes in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):10013–8. DOI: 10.1073/pnas.1321568111
204. Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes / H. K. Lichtenthaler // *Methods in enzymology*. – 1987. – Vol. 148. – P. 350–382. – DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
205. Lichtenthaler HK (2013) Plastoglobuli, Thylakoids, Chloroplast Structure and Development of Plastids. In: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC (eds) *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 337–361
206. Lichtenthaler, H. (1968). Plastoglobuli and the fine structure of plastids. *Endeavour* 27, 144–149.
207. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Doll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., et al. (1981). Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth. Res.* 2, 115–141. DOI: 10.1007/BF00028752
208. Liu M, Lu S (2016) Plastoquinone and ubiquinone in plants: biosynthesis, physiological function and metabolic engineering. *Front Plant Sci* 7: 1898. DOI: 10.3389/fpls.2016.01898
209. Liu WJ, Chen YE, Tian WJ, Du BJ, Zhang ZW, Xu F, Zhang F, Yuan S, Lin HH (2009) Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1238–1245 DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.04.012
210. Lindquist, E., Aronsson, H. Chloroplast vesicle transport. *Photosynth Res* 138, 361–371 (2018). DOI: 10.1007/s11120-018-0566-0.
211. Locy, R. D., Chang, C. C., Nielsen, B. L., & Singh, N. K. (1996). Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants. *Plant Physiology*, 110, 321– 328. DOI: doi.org/10.1104/pp.110.1.321
212. Loll, B., Kern, J., Saenger, W. *et al.* Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438, 1040–1044 (2005) DOI: 10.1038/nature04224
213. Los, D. A., and Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 142–157. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.08.002

214. Los, D. A., Mironov, K. S., and Allakhverdiev, S. I. (2013). Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth. Res.* 116, 489–509. DOI: 10.1007/s11120-013-9823-4
215. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Fan A.L., Randall R.L. (1951) Protein measurement with Folinphenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 256–266.
216. Lu CM, Zhang JH (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J Exp Bot* 50: 1199–1206 DOI: 10.1093/jxb/50.336.1199
217. Lu, C., Torzilo, G., Vonshak, A. (1999) Kinetic response of photosystem II photochemistry in cyanobacterium *Spirulina platensis* to high salinity is characterized by two distinct phases. – *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 283-292.
218. Lu, C., Vonshak, A. (1999). Characterization of PS II photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. – *New Phytol.* 141: 231-239. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1999.00340.x
219. Lu, C., Vonshak, A. (2002) Effects of salinity on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. – *Physiol. Plant.* 114: 405-413,
220. Ludlow, M. M., and Wilson, G. L. (1971). Photosynthesis of tropical pasture plants. 2. Temperature and illuminance history. *Aust. J. Biol. Sci.* 24, 1065–1075. DOI: 10.1071/BI9711065
221. Lunde CP, Jensen PE, Haldrup A, Knoetzel J, Scheller HV. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature.* 408: 613–615.
222. Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K. (2001). Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504, 275–287. DOI: 10.1016/s0005-2728(00)00256-5
223. Maroz A, Anderson RF, Smith RAJ, Murphy MP (2009) Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 46: 105–109 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.033
224. Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D. (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and

- thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. Vol. 99, pp. 12246–12251.
225. Matheson I.B.C., Etheridge R.D., Kratowich N.R. and Lee J. (1975) The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. *Photochem. Photobiol.*, vol. 21, p. 165-171 DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06647.x
226. Mazor Y, Borovikova A, Nelson N. The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution. *Elife*. 2015;4:e07433. Published 2015 Jun 15. DOI: 10.7554/eLife.07433
227. McCauley SW, Melis A (1986) Quantitation of plastoquinone photoreduction in spinach chloroplasts. *Photosynth Res* 8: 3–16 DOI: 10.1007/BF00028472
228. Medrano H, Parry MAJ, Socias X, et al. : Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Ann Appl Biol*. 1997;131(3):491–501. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1997.tb05176.x
229. Mekala NR, Suorsa M, Rantala M, Aro EM, Tikkanen M. Plants Actively Avoid State Transitions upon Changes in Light Intensity: Role of Light-Harvesting Complex II Protein Dephosphorylation in High Light. *Plant Physiol*. 2015;168(2):721-734. DOI:10.1104/pp.15.00488
230. Merchant, S., and Bogorad, L. (1987) The Cu(II)-repressible plastidic cytochrome c. Cloning and sequence of a complementary DNA for the pre-apoprotein. *EMBO J*. 6, 2531–2535 PMID: 3036842
231. Micco VD, Aronne G: in *Plant Responses to Drought Stress*. (ed Aroca. Ricardo). Springer,2002.
232. Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* 2: ra45 DOI: 10.1126/scisignal.2000448
233. Milanovsky, G.E., Petrova, A.A., Cherepanov, D.A. et al. (2017) Kinetic modeling of electron transfer reactions in photosystem I complexes of various structures with substituted quinone acceptors. *Photosynth Res* 133, 185–199. DOI: 10.1007/s11120-017-0366-y
234. Miller, G., Suzuki, N., Cifci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*. 33, 453–467. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x

235. Minagawa J. (2013) Dynamic reorganization of photosynthetic supercomplexes during environmental acclimation of photosynthesis, *Front Plant Sci.*, 4, 513. DOI: 10.3389/fpls.2013.00513
236. Mishra, Y., Jankanpaa, H. J., Kiss, A. Z., Funk, C., Schroder, W. P., and Jansson, S. (2012). Arabidopsis plants grown in the field and climate chambers significantly differ in leaf morphology and photosystem components. *BMC Plant Biol.* 12:6. DOI: 10.1186/1471-2229-12-6
237. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004). The Reactive Oxygen Gene Network in Plants. *Trends in Plant Science*, Vol. 9, pp. 490–498. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
238. Miyazawa S, Yoshimura S, Shinzaki Y, et al. : Deactivation of aquaporins decreases internal conductance to CO₂ diffusion in tobacco leaves grown under long-term drought. *Funct Plant Biol.* 2008;35(7):553–564.
239. Moan J. (1990). On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol.* 6 343–344. DOI: 10.1016/1011-1344(90)85104-5
240. Montané M-H, Tardy F, Kloppstech K, Havaux M (1998) Differential control of xanthophylls and light-induced stress proteins, as opposed to light-harvesting chlorophyll a/bproteins, during photosynthetic acclimation of barley leaves to light irradiance. *Plant Physiol* 118: 227–235 DOI: 10.1104/pp.118.1.227
241. Mubarakshina MM, Ivanov BN (2010) The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes. *Physiol Plant* 140: 103–110 DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01391.x
242. Mühlenbock P, Szechyńska-Hebda M, Płaszczycza M, Baudo M, Mateo A, Mullineaux PM, Parker JE, Karpiński S (2008) Chloroplast Signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 Regulate Crosstalk between Light Acclimation and Immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2339–2356 DOI: 10.1105/tpc.108.059618
243. Müller, P., Li, X. P., and Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566. DOI: 10.1104/pp.125.4.1558

244. Mullet JE, Chua NH (1983) In vitro reconstitution of synthesis, uptake and assembly of cytoplasmically synthesised chloroplast proteins. *Methods in Enzymology* 97, 502–509. DOI: 10.1016/0076-6879(83)97158-6
245. Mullineaux P., Karpinski S. (2002) Signal Transduction in Response to Excess Light: Getting Out of the Chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 5, pp. 43–48. DOI: 10.1016/s1369-5266(01)00226-6
246. Mullineaux, P.M. (2009) ROS in Retrograde Signalling from the Chloroplast to the Nucleus, In: *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Signaling and Communication in Plants*, L.A. Rio & A. Puppo (Eds), pp. 221–240. ISBN 978-3-642-00390-5
247. Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa KI, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579–582 DOI: 10.1038/nature02598
248. Munekage YN, Genty B, Peltier G. (2008) Effect of PGR5 impairment on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49: 1688–1698 DOI: 10.1093/pcp/pcn140
249. Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C. *et al.* Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579–582 (2004) DOI:10.1038/nature02598
250. Munné-Bosch S, Alegre L: Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct Plant Biol.* 2004;31(3):203–216.
251. Munns, R., and Passioura, J. B. (1984). Hydraulic resistance of plants. Effects of NaCl in barley and lupin. *Aust. J. Plant Physiol.* 11, 351–359. DOI: 10.1071/PP9840351
252. Munns, R., and Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 143–160. DOI: 10.1071/PP9860143
253. Munns, R., and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
254. Murata, N., Allakhverdiev, S. I. & Nishiyama, Y. Te mechanism of photoinhibition in vivo: re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1127–1133 (2012). DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.020
255. Nakamoto R.K., Scanlon J.A.B. , Al-Shawi M.K. (2008) The rotary mechanism of the ATP synthase *Arch. Biochem. Biophys.*, 476 , pp. 43-50

256. Nathan C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest.* 111 769–778. DOI: 10.1172/JCI200318174
257. Nathan C. (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest.* 111 769–778. DOI: 10.1172/JCI200318174
258. Netto LE and Antunes F, (2016) The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells.* 39(1):65-71. DOI: 10.14348/molcells.2016.2349
259. Neverov KV, Krasnovsky Jr AA (2004) Phosphorescence analysis of the chlorophyll triplet states in preparations of photosystem II. *Biophysics* 49: 469–474
260. Nevo, R., Charuvi, D., Tsabari, O., & Reich, Z. (2012). Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. *The Plant Journal*, 70(1), 157–176. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04876.x
261. Nhan C. Dang, Valter Zazubovich, Mike Reppert, Bhanu Neupane, Rafael Picorel, Michael Seibert, and Ryszard Jankowiak. The CP43 Proximal Antenna Complex of Higher Plant Photosystem II Revisited: Modeling and Hole Burning Study. I *The Journal of Physical Chemistry B* 2008 112 (32), 9921-9933 DOI: 10.1021/jp801373c
262. Niedre M., Patterson M. S., Wilson B. C. (2002). Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem. Photobiol.* 75 382–391. DOI: 10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILDO2.0.CO2
263. Niemietz CM, Tyerman SD. 2002. New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Lett.* 531:443–47 DOI: 10.1016/s0014-5793(02)03581-0
264. Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P. H., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., et al. (2010). Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady state conditions in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 466–475. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.01.001
265. Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol Plant.* 2011;142(1):35-46. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x

266. Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH. (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol.* 2014;164(4):1636-1648. DOI:10.1104/pp.113.233478
267. Noctor G, Veljovic-Jovanovic SD, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Ann Bot (Lond)* 89: 841–850
268. Nosek L, Semchonok D, Boekema EJ, Ilík P, Kouřil R. (2017) Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *The Plant Journal*, 89, 104-111 DOI: 10.1111/tpj.13325
269. Nosek M, Kornaś A, Kuźniak E, Miszalski Z (2015) Plastoquinone redox state modifies plant response to pathogen. *Plant Physiol Biochem* 96: 163–170 DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.07.028
270. Nowicka B, Gruszka J, Kruk J (2013) Function of plastochromanol and other biological prenyllipids in the inhibition of lipid peroxidation—a comparative study in model systems. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr* 1828: 233–240 DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.018
271. Oosterhuis DM, Wullschleger SD (1987) Osmotic Adjustment in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Leaves and Roots in Response to Water Stress. *Plant Physiol.* 84(4):1154–7.
272. Op den Camp R.G.L., Przybyla D., Ochsenbein C., Laloi C., Kim C., Danon A., Wagner D., Hideg E., Göbel C., Feussner I., Nater M., Apel, K. (2003). Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in Arabidopsis. *The Plant Cell*. Vol. 15, pp. 2320–2332. DOI: 10.1105/tpc.014662
273. 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 DOI: 10.1093/jxb/46.special_issue.1351
274. Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol* 152: 1514–1528 DOI: 10.1104/pp.109.152579
275. Pan, X., Ma, J., Su, X., Cao, P., Chang, W., Liu, Z., ... & Li, M. (2018). Structure of the maize photosystem I supercomplex with light-harvesting complexes I and II. *Science*, 360(6393), 1109-1113 DOI: 10.1126/science.aat1156

276. Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., and Hurry, V. M. (1996). Differential susceptibility of Photosystem II to light stress in light-acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and non-radiative dissipation of light. *Plant Sci.* 115, 137–149. DOI: 10.1016/0168-9452(96)04339-7
277. Patten C. L., Glick B. R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid //Canadian journal of microbiology. 42: 207-220. DOI: 10.1139/m96-032
278. Paulsen C. E., Carroll K. S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem. Biol.* 5 47–62. DOI: 10.1021/cb900258z
279. Pegueropina, J. J., Sanchoknapik, D., Flexas, J., Galmés, J., Niinemets, Ü. & Gilpelegrín, E. Light acclimation of photosynthesis in two closely related firs (*Abies pinsapo* Boiss. and *Abies alba* Mill.): the role of leaf anatomy and mesophyll conductance to CO₂. *Tree Physiology* 36, 300–310 (2016).
280. Peleg Z, Blumwald E: Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2011;14(3):290–5. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.02.001
281. Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, et al. : Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnol J.* 2011;9(7):747–58. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x
282. Peltier G, Cournac L (2002) Chlororespiration *Annual Review of Plant Biology* 53:1, 523-550
283. Peng L, Yamamoto T, Shikanai T (2011) Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta* 1807, pp 945-953 DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.10.015
284. Perata P, Voesenek LA (2007) Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci.* 12:43–6. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.12.005
285. Perez-Martin A, Michelazzo C, Torres-Ruiz J, Flexas J, Fernández J, Sebastiani L, et al. (2014) Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: Correlation with gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins. *Journal of Experimental Botany.* 65: 3143-3156. DOI: 10.1093/jxb/eru160

286. Perrig D., Boiero M L, Masciarelli O A, Penna C, Ruiz O A, Cassán F D, Luna M V (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 1143-1150. DOI: 10.1007/s00253-007-0909-9
287. Petrov V. D., Van Breusegem F. (2012). Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* 2012:ls014 DOI: 10.1093/aobpla/pls014
288. Pfalz J, Liebers M, Hirth M, Grübler B, Holtzegel U, Schröter Y, Dietzel L, Pfannschmidt T (2012) Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Front Plant Sci*, 3: 257 DOI: 10.3389/fpls.2012.00257
289. Pfannschmidt T, Bräutigam K, Wagner R, Dietzel L, Schröter Y, Steiner S, Nykytenko A (2008) Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Ann Bot* 103: 599–607 DOI: 10.1093/aob/mcn081
290. Pfannschmidt, T., Nilsson, A. & Allen, J. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397, 625–628 (1999). DOI: 10.1038/17624
291. Pfannschmidt T, Schütze K, Fey V, Sherameti I, Oelmüller R (2003) Chloroplast redox control of nuclear gene expression—a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxid Redox Signal* 5: 95–101
292. Pitzchke A, Forzani C, Hirt H. (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*. Vol. 8, pp. 1757–1764 DOI: 10.1089/ars.2006.8.1757
293. Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009). MAPK cascade signaling networks in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 421–426. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.008
294. Pospíšil P (2016) Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front Plant Sci* 7: 1950 DOI: 10.3389/fpls.2016.01950
295. Pospíšil, P. (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 218–231. DOI:10.1016/j.bbabi.2011.05.017.
296. Pozo M. J., Azcón-Aguilar C. (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology*. 10: 393-398.

297. Przybyla D., Gobel C., Imboden A., Hamberg M., Feussner I., Apel K. (2008) Enzymatic, but not Non-Enzymatic, ¹O₂-Mediated Peroxidation of Polyunsaturated Fatty Acids Forms Part of the EXECUTER1-Dependent Stress Response Program in the flu Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. Vol. 54, pp. 236–248. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03409.x
298. Qi M., Elion E. A. (2005). MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118 3569–3572. DOI: 10.1242/jcs.02470
299. Quick, W. P., and Stitt, M. (1989). An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 977, 287–296. DOI: 10.1016/s0005-2728(89)80082-9
300. Rajala A, Peltonen-Sainio P: Plant Growth Regulator Effects on Spring Cereal Root and Shoot Growth. *Agron J.* 2001;93(4):936–943. DOI: 10.2134/agronj2001.934936x
301. Rajendran, K., Tester, M., and Roy, S. J. (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell Environ.* 32, 237–249. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01916.x
302. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100–3112. DOI: 10.1038/sj.onc.1210392
303. Rantala S, Tikkanen M (2018) Phosphorylation-induced lateral rearrangements of thylakoid protein complexes upon light acclimation. *Plant Direct*, 2(2), e00039 DOI: 10.1002/pld3.39
304. Rantala, M., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2017). Proteomic characterization of hierarchical megacomplex formation in *Arabidopsis* thylakoid membrane. *The Plant Journal*, 92(5), 951–962. DOI: 10.1111/tpj.13732
305. Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P. J., Diner, B. A., and Lavergne, J. (2002). Kinetics and Pathways of Charge Recombination in Photosystem II. *Biochemistry* 41, 8518–8527. DOI:10.1021/bi025725p.
306. Raskin I, Skubatz H, Tang W, Meeuse B (1990) Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany.* 66: 369-373.
307. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24:981-90. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

308. Rich PR, Harper R (1990) Partition coefficients of quinones and hydroquinones and their relation to biochemical reactivity. *FEBS Lett* 269: 139–144 DOI: 10.1016/0014-5793(90)81139-F
309. Richter M.L., Samra H.S., He F., Giessel A.J., Kuczera K.K. (2005) Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 37, pp. 467-473 DOI: 10.1007/s10863-005-9493-9
310. Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2003) The Water-Water Cycle Is Essential for Chloroplast Protection in the Absence of Stress. *J Biol Chem* 278: 38921–38925 DOI: 10.1074/jbc.M304987200
311. Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 61 621–649. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112252
312. Rokka A, Suorsa M, Saleem A, Battchikova N, Aro EM. Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem J.* 2005;388(Pt 1):159–168. DOI:10.1042/BJ20042098
313. Roy, S. J., Negrão, S., and Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 115–124. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.12.004
314. Rozendaal, D. M. A., Hurtado, V. H. & Poorter, L. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Functional Ecology* 20, 207–216 (2006). DOI: 10.1111/j.1365-2435.2006.01105.x
315. Ruban, A. V., Johnson, M. P., and Duffy, C. D. (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 167–181. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.007
316. Rudenko N.N., Borisova-Mubarakshina M.M., Ignatova L.K., Fedorchuk T.P., Nadeeva-Zhurikova E.M., Ivanov B.N. (2020) Role of Plant Carbonic Anhydrases under Stress Conditions. In book: *Plant Stress Physiology*. DOI: 10.5772/intechopen.91971
317. Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2001) Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem Sci* 26: 648–653 DOI: 10.1016/S0968-0004(01)01953-3
318. Rutherford AW, Osyczka A, Rappaport F (2012) Back-reactions, short-circuits, leaks and other energy wasteful reactions in biological electron transfer:

- Redox tuning to survive life in O₂. *FEBS Lett* 586: 603–616 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.12.039
319. Sacharz, J., Giovagnetti, V., Ungerer, P., Mastroianni, G., and Ruban, A. V. (2017). The xanthophyll cycle affects reversible interactions between PsbS and light-harvesting complex II to control non-photochemical quenching. *Nat. Plants* 3:16225 DOI: 10.1038/nplants.2016.225
320. Sanchez-Cruz P, Santos A, Diaz S, Alegria AE (2014) Metal-independent reduction of hydrogen peroxide by semiquinones. *Chem Res Toxicol* 27: 1380–1386
321. Sauter A, Davies WJ, Hartung W: The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot.* 2001;52(363):1991–7.
322. Scarpeci T.E., Zanon M.I., Carrillo N., Mueller-Roeber B., Valle E.M. (2008) Generation of Superoxide Anion in Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during Active Photosynthesis: A Focus on Rapidly Induced Genes // *Plant Mol. Biol.* Vol. 66. P. 361–378.
323. Scarpeci TE, Zanon MI, Carrillo N, Mueller-Roeber B, Valle EM (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Mol Biol* 66: 361–378 DOI: 10.1007/s11103-007-9274-4
324. Schägger H, von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368–379. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2
325. Scheel D. (2002) In: *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis, New York, pp. 137–153.
326. Schmitt FJ, Allakhverdiev SI (eds) (2017) *Reactive Oxygen Species: Signaling Between Hierarchical Levels in Plants*, John Wiley & Sons, New Jersey and Scrivener Publishing LLC, Massachusetts
327. Schmitt, F. J. et al. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochim Biophys Acta* 1837, 835–84 (2014).
328. Schoettler, M. A., and Toth, S. Z. (2014). Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and

- photosynthetic flux control. *Front. Plant Sci.* 5:188. DOI: 10.3389/fpls.2014.00188
329. Shigeoka S, Maruta T. Cellular redox regulation, signaling, and stress response in plants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(9):1457-70. DOI: 10.1080/09168451.2014.942254.
330. Schubert, H., Fulda, S., Hagemann, M.: Effects of adaptation to different salt concentrations on photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6083. – *J. Plant Physiol.* 142: 291-295, 1993.
331. Schubert, H., Hagemann, M.: Salt effects on 77K fluorescence and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. – *FEMS Microbiol. Lett.* 71: 169-172, 1990 DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb03817.x
332. Sengupta D, Reddy AR: Water deficit as a regulatory switch for legume root responses. *Plant Signal Behav.* 2011;6(6):914–7.
333. Sewelam N, Kazan K, Schenk PM. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Front Plant Sci.* 2016;7:187. Published 2016 Feb 23. DOI:10.3389/fpls.2016.00187
334. Sewelam N., Jaspert N., Kelen K. V. D., Schmitz J., Frerigmann H., Tognetti V. B., et al. (2014). Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes differentially modulates the plant transcriptome. *Mol. Plant* 7 1191–1210. DOI: 10.1093/mp/ssu070
335. Shabala, S., Cuin, T.A., 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plantarum* 133, 651–669. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x
336. Shabala, S., Cuin, T.A., Prismall, L., Nemchinov, L.G., 2007. Expression of animal CED-9 anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. *Planta* 227, 189–197
337. Shabala, S., Pottosin, I., 2014. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol. Plantarum* 151 (3), 257–279 DOI: 10.1111/ppl.12165
338. Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM. (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol.* 331: 433-41. DOI: 10.1016/j.crvl.2008.03.011.
339. Sharp RE (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 211–22. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x

340. Shi LX, Schroder WP 2004 The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*: 1608:75-96 DOI: 10.1016/j.bbabbio.2003.12.004
341. Shi, L. X., and Schröder, W. P. (2004) The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II, *BBA-Bioenergetics*, 1608(2), 75-96. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2003.12.004
342. Singh DK, Laremore TN, Smith PB, Maximova SN, McNellis TW (2012) Knockdown of FIBRILLIN4 gene expression in apple decreases plastoglobule plastoquinone content. *PloS One* 7: e47547 DOI: 10.1371/journal.pone.0047547
343. Singh R, Singh S, Parihar P, Mishra RK, Tripathi DK, Singh VP, Chauhan DK, Prasad SM (2016) Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Front Plant Sci* 7: 1299 DOI: 10.3389/fpls.2016.01299
344. Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 6 196–203. DOI: 10.4161/psb.6.2.14701
345. Slavov, C., Schrameyer, V., Reus, M., Ralph, P. J., Hill, R., Buechel, C., et al. (2016). “Super-quenching” state protects Symbiodinium from thermal stress - Implications for coral bleaching. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 840–847. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2016.02.002
346. Smethurst, C.F., Rix, K., Garnett, T., Auricht, G., Bayart, A., Lane, P., Wilson, S.J., Shabala, S., (2008). Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne: revealing the underlying cellular mechanisms. *Funct. Plant Biol.* 35, 640–650. DOI: 10.1071/FP08030
347. Sonoike K, Terashima I. (1994) Mechanism of photosystem-I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* 194: 287–293
348. Sonoike K. (1995) Selective photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach. *Plant Cell Physiol* 36: 825–830 DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078827
349. Sperdouli I, Moustakas M (2012) Differential response of photosystem II photochemistry in young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* to the onset of drought stress. *Acta Physiol Plant* 34: 1267–1276 DOI: 10.1007/s11738-011-0920-8

350. Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, et al. (2009) Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*. 230:985–1002. DOI: 10.1007/s00425-009-1000-9
351. Spollen WG, Sharp RE: Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. *Plant Physiol*. 1991;96(2):438–43. DOI: 10.1104/pp.96.2.438
352. Steinhorst L, Kudla J (2013) Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiol* 163: 471–485 DOI: 10.1104/pp.113.222950
353. Steudle E: Water uptake by roots: effects of water deficit. *J Exp Bot*. 2000;51(350):1531–42.
354. Storz G., Imlay J. A. (1999). Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 188–194. 10.1016/S1369-5274(99)80033-2
355. Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248 189–194. 10.1126/science.2183352
356. Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient //Chlorophyll a fluorescence. – Springer, Dordrech. – C. 321-362. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9_12
357. Strzalka K, Szymańska R, Świeżewska E, Skorupińska-Tudek K, Suwalsky M (2009) Tocochromanols, plastoquinone and polyprenols in selected plant species from Chilean Patagonia. *Acta Biol Cracoviensia Ser Bot* 51: 39–44
358. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., & Shen, J. R. (2015). Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 517(7532), 99-103. DOI: 10.1038/nature13991
359. Sugiura M. (1992) The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology*. Vol. 19, pp. 149–168. DOI: 10.1007/BF00015612
360. Suorsa, M., Rantala, M., Mamedov, F., Lespinasse, M., Trotta, A., Grieco, M., Aro, E. M. (2015). Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment-protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains. *The Plant Journal*, 84(2), 360–373. DOI: 10.1111/tpj.13004

361. Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2011) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*. Vol. 35, pp. 259–270. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x
362. Sun X., Feng P., Xu X., Guo H., Ma J., Chi W., Lin R., Lu C., Zhang L. (2011) A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat. Commun.* 2: 477. DOI: 10.1038/ncomms1486
363. Szymańska R, Kruk J (2010) Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant Cell Physiol* 51: 537–545 DOI: 10.1093/pcp/pcq017
364. Takagi D, Takumi S, Hashiguchi M, Sejima T, Miyake C. Superoxide and Singlet Oxygen Produced within the Thylakoid Membranes Both Cause Photosystem I Photoinhibition. *Plant Physiol.* 2016;171(3):1626–1634. DOI:10.1104/pp.16.00246
365. Takahashi S, Badger M.R. 2011 Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant science.* 16: 53-60 DOI: 10.1016/j.tplants.2010.10.001
366. Taylor NL, Day DA, Millar AH (2002) Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J Biol Chem* 277: 42663–42668 DOI: 10.1074/jbc.M204761200
367. Taylor W.C. (1989) Regulatory Interactions between Nuclear and Plastid Genomes. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*. Vol. 40, pp. 211–233. DOI: 10.1146/annurev.pp.40.060189.001235
368. Telfer A (2014) Singlet Oxygen Production by PSII Under Light Stress: Mechanism, Detection and the Protective role of β -Carotene. *Plant Cell Physiol* 55: 1216–1223 DOI: 10.1093/pcp/pcu040
369. Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 392–400. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)00191-6
370. Tenhaken R., Rubel C. (1998) Induction of alkalization and an oxidative burst by low doses of cycloheximide in soybean cells. *Planta*. Vol. 206, pp. 666–672. DOI: 10.1007/s004250050445
371. Tikkanen, M., Nurmi, M., Kangasjarvi, S., & Aro, E. M. (2008). Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at

- high light. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(11), 1432–1437. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.08.004
372. Tiwari, A., Mamedov, F., Grieco, M. *et al.* Photodamage of iron–sulphur clusters in photosystem I induces non-photochemical energy dissipation. *Nature Plants* 2, 16035 (2016) DOI:10.1038/nplants.2016.35
373. Toivonen, P. & Vidaver, W. Variable chlorophyll a fluorescence and CO₂ uptake in water stressed white spruce seedlings. *Plant Physiol.* 86, 744–748 (1988) DOI: 10.1104/pp.86.3.744
374. Tosens T, Niinemets U, Vislap V, et al. : Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in *Populus tremula*: how structure constrains function. *Plant Cell Environ.* 2012;35(5):839–56. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02457.x
375. Tóth SZ, Schansker G, Strasser RJ (2007) A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynthesis Research* 93(1–3), 193 DOI:10.1007/s11120-007-9179-8
376. Triantaphylidès C, Havaux M (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14: 219–228
377. Triantaphylidès C., Havaux M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.* 14 219–228. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.01.008
378. Tripathy, B. C., Mohapatra, A. & Gupta, I. (2007) Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 860–868. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.03.008
379. Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., and Kobayashi, H. (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11, 1195–1206. DOI: 10.1105/tpc.11.7.1195
380. Tullberg A, Alexciev K, Pfannschmidt T, Allen JF (2000) Photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psaB* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinone pool. *Plant Cell Physiol.* 41: 1045 – 1054. DOI: 10.1093/pcp/pcd031

381. Turina P, Samoray D., Graber (2003) P. H⁺/ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF₀F₁ liposomes EMBO J., 22, pp. 418-426 DOI: 10.1093/emboj/cdg073
382. Uehlein N., Otto B., Hanson D.T., Fischer M., McDowell N., Kaldenhoff R. (2008) Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell*. 20: 648–665.
383. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., & Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473(7345), 55-60. DOI: 10.1038/nature09913
384. Van Loon L. C., Bakker P., Pieterse C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*. 36: 453-483. DOI: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453
385. Van Wees S. C. M., Van der Ent S., Pieterse C. M. J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*. 11: 443-448. DOI: 10.1016/j.pbi.2008.05.005
386. Vandenameele S., van der Kelen K., Dat J., Gadjev I., Boonefaes T., Morsa S., Rottiers P., Slooten L., van Montagu M., Zabeau M., Inze D., van Breusegem F. (2003) A Comprehensive Analysis of Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression in Tobacco. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 100, pp. 16113–16118. DOI: 10.1073/pnas.2136610100
387. Vetoshkina DV, Ivanov BN, Proskuryakov II, Borisova-Mubarakshina MM (2017) Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction. *Physiol Plant* 161: 45–55 DOI: 10.1111/ppl.12560
388. Vonshak, A., Chanawongse, L., Bunnag, B., Tanticharoen, M. (1995) Physiological characterization of *Spirulina platensis* isolates: response to light and salinity. *Plant Physiol*. 14: 161-166
389. Vonshak, A., Guy, R., Guy, M. (1988) The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. – *Arch. Microbiol*. 150: 417-420. DOI: 10.1007/BF00422279
390. Walker DA, Osmond CB. 1986. Measurement of photosynthesis in vivo with a leaf disc electrode: correlations between light dependence of steady-state photosynthetic O₂ evolution and chlorophyll a fluorescence transients. *Proceedings of the Royal Society* 227, 267–280. DOI: 10.1098/rspb.1986.0023

391. Walters, R. G., and Horton, P. (1991). Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth. Res.* 27, 121–133. DOI: 10.1007/BF00033251
392. Wang C, Yang A, Yin H, et al. (2008) Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. *J Integr Plant Biol.* 50:427–34. DOI: 10.1111/j.1774-7909.2008.00638.x
393. Wang Z.Y., Xiong L., Li W., Zhu J.K., Zhu J. (2011) The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23:1971-84.
394. Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X., & Liu, Z. (2016). Structure of spinach photosystem II–LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature*, 534(7605), 69-74. DOI: 10.1038/nature18020
395. Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D (2003) Plastocyanin Is Indispensable for Photosynthetic Electron Flow in *Arabidopsis thaliana*. 278, pp. 31286–31289
396. Weston, E., Thorogood, K., Vinti, G., and Lopez-Juez, E. (2000). Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* 211, 807–815. doi: 10.1007/s004250000392
397. Wientjes, E., van Amerongen, H., & Croce, R. (2013). LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(3), 420–426. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.12.009
398. Wild, A. (1980). Physiology of photosynthesis in higher plants—adaptation to light-intensity and light quality. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 92, 341–364.
399. Wild, A., and Wolf, G. (1980). The effect of different light intensities on the frequency and size of stomata, the size of cells, the number size and chlorophyll content of chloroplasts in the mesophyll and the guard-cells during the ontogeny of primary leaves of *Sinapis alba*. *Z. Pflanzenphys.* 97, 325–342. DOI: 10.1016/s0044-328x(80)80006-7
400. Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ.* 33(4):510–25. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x
401. Wilkinson S, Kudoyarova GR, Veselov DS, et al. (2012) Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *J Exp Bot.* 63: 3499–509. DOI: 10.1093/jxb/ers148

402. Wrzaczek M., Hirt H. (2001). Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biol. Cell* 93 81–87. DOI: 10.1016/S0248-4900(01)01121-2
403. Wu, H.H., Shabala, L., Barry, K., Zhou, M.X., Shabala, S. (2013) Ability of leaf mesophyll to retain potassium correlates with salinity tolerance in wheat and barley. *Physiol. Plantarum* 149, 515–527. DOI: 10.1111/ppl.12056
404. Xiang Y., Ma B., Li T., Gao J.-w., Yu H.-m., Li X.-j. (2004) Acetazolamide inhibits aquaporin-1 protein expression and angiogenesis1, *Acta Pharmacol. Sin.* 25 812–816. PMID: 15169637
405. Xie Z, Jiang D, Cao W, et al. : Relationships of endogenous plant hormones to accumulation of grain protein and starch in winter wheat under different post-anthesis soil water statuses. *Plant Growth Regul.* 2003;41(2):117–27. DOI: 10.1023/A:1027371906349
406. Xing Y, Zhang Q: Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:421–42. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112209
407. Xu Y-H, Liu R, Yan L, Liu Z-Q, Jiang S-C, Shen Y-Y, Wang X-F, Zhang D-P (2012) Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 63, 1095–1106. DOI:10.1093/jxb/err315.
408. Xu Z, Zhou G: Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J Exp Bot.* 2008;59(12):3317–25.
409. Yadav DK, Prasad A, Kruk J, Pospíšil P (2014) Evidence for the involvement of loosely bound plastosemiquinones in superoxide anion radical production in photosystem II. *PloS One* 9: e115466 DOI: 10.1371/journal.pone.0115466
410. Yamane K, Oi T, Enomoto S, Nakao T, Arai S, Miyake H, Taniguchi M (2018) Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress. *Plant, Cell, Environmental* 41, pp 563-575 DOI: 10.1111/pce.13115
411. Yamane, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. (2003). Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 160, 573–575. DOI: 10.1078/0176-1617-00948
412. Yang JC, Zhang JH, Ye YX, et al. : Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling. *Plant Cell Environ.* 2004;27(8):1055–64. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01210.x

413. Yeo, A. R., Lee, K. -S., Izard, P., Boursier, P. J., and Flowers, T. J. (1991). Short and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42, 881–889. DOI: 10.1093/jxb/42.7.881
414. Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30, 529–539. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01309.x
415. Yoshida K. and Hisabori T. (2016). Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *PNAS*, vol. 113 no. 27 DOI: 10.1073/pnas.1604101113
416. Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez -Cadenas A (2018) Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 162, 2–12. DOI: 10.1111/ppl.12540
417. Zehnder G., Kloepper J., Yao C., Wei G. (1997) Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Economic Entomology.* 90: 391-396. DOI: 10.1093/jee/90.2.391
418. Zeng, M.T., Vonshak, A.: Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity stress. – *Comp. Biochem. Physiol. A* 120: 113-118, 1998
419. Zhang Z.W., Zhang G.C., Zhu F., Zhang D.W., Yuan S. (2015). The roles of tetrapyrroles in plastid retrograde signaling and tolerance to environmental stresses. *Planta.* 242: 1263-1276. DOI: 10.1007/s00425-015-2384-3
420. Zhang L, Paakkarinen V, van Wijk KJ, Aro E.M. 1999 Co-translational assembly of the D1 protein into photosystem II *J. Biol. Chem.*, 274, pp. 16062-16067 DOI: 10.1074/jbc.274.23.16062
421. Zhang S, Li C, Cao J, et al: (2009) Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by TLD1/OsGH3.13 activation. *Plant Physiol.* 151:1889–901. DOI: 10.1104/pp.109.146803
422. Zhang S, Scheller HV. Light-harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004;279:3180–3187. DOI: 10.1074/jbc.M311640200.
423. Zhang Z.W., Zhang G.C., Zhu F., Zhang D.W., Yuan S. The roles of tetrapyrroles in plastid retrograde signaling and tolerance to environmental stresses // *Planta.* 2015. V. 242. P. 12631276. DOI: 10.1007/s00425-015-2384-3

424. Zhang, H., Hodson, J., Williams, J., Blumwald, E., 2001. Engineering salt-tolerant brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 98, 12832.
425. Zhang, L., Pakrasi, H. B., and Whitmarsh, J. (1994) Photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the absence of cytochrome c553 and plastocyanin. *J. Biol. Chem.* 269, 5036–5042 DOI: 10.1016/S0021-9258(17)37650-0
426. Zhi-Fang X, Guand-Hua L, Ai-Guo W, Yi-Zhu C, Jun-Yan G. (1999). Effects of strong light and active oxygen on photosynthesis in soybean. *Acta Botanica Sinica* 41, 862–866.
427. Zhou, Y., Lam, H. M. & Zhang, J. (2007) Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *J. Exp. Bot.* 58, 1207–1217 DOI: 10.1093/jxb/erl291
428. Zhu Y., Zuo M., Liang Y., Jiang M., Zhang J., Scheller H. V., et al. (2013). MAP65-1a positively regulates H₂O₂ amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize. *J. Exp. Bot.* 64 3787–3802. DOI: 10.1093/jxb/ert215
429. Иванов, Б.Н., Шмелева, В.Л., Музафаров, Е.Н., Акулова, Е.А. (1974) Измерение отношений Р/2е и Н⁺/е⁻ у хлоропластов растений, выросших при различной интенсивности освещения, *Доклады АН СССР*, 217, 971–974.
430. Кренделева, Т.Е., Замазова, Л.П., Тулбу, Г.В. (1975) Фотосинтетическая активность хлоропластов гороха, выращенного при различной освещенности, *Биол. науки*, 9, 76 – 82.
431. Полесская О. Г. (2007) Растительная клетка и активные формы кислорода. Монография. ISBN 978-5-98227-252-2.
432. Тарчевский И.А. (2002) Сигнальные системы клеток растений. ISBN 5-02-006411-4.
433. Юрина Н. П., Одинцова М. С. (2007) Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов. *Физиология растений*. Т. 4, сс. 485–498. ISSN: 0015-3303
434. Юрина Н. П., Одинцова М. С. (2019) Ретроградная сигнальная система хлоропластов. *Физиология растений* 66:243-255 DOI: 10.1134/S0015330319040146

Список иллюстраций

Рис. 1. Организация фотосинтетического аппарата высших растений.	17
Рис. 2. Пути переноса электрона в фотосистеме II.....	20
Рис. 3. Строение комплекса ФС II-ССК II.....	21
Рис. 4. Пути переноса электрона в фотосистеме I.....	23
Рис. 5. Строение комплекса ФС I-ССК I.....	24
Рис. 6. Строение цитохромного <i>b₆/f</i> комплекса.....	25
Рис. 7. Пути переноса электрона в цитохромном <i>b₆/f</i> комплексе.....	26
Рис. 8. Структурная схема расположения субъединиц АТФ-синтазы F-типа	28
Рис. 9. Схема линейного переноса электронов в ФС I, ПХ пуле, цит. <i>b₆/f</i> комплексе и ФС II.....	35
Рис. 10. Схематическая модель регуляции размера антенны фотосистемы II при повышении освещенности высших растений	55
Рис. 11. Схема путей образования АФК в хлоропластах и путей передачи сигналов с участием АФК.	70
Рис. 12. ЭПР сигнал нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-РОВН с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H ₂ O ₂ -зависимой реакции, в тилакоидной суспензии	86
Рис. 13. Влияние интенсивности света на величину сигнала нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-РОВН с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H ₂ O ₂ -зависимой реакции, в тилакоидной суспензии в отсутствие и в присутствии 40 мкМ цитохрома <i>c</i>	88
Рис. 14. Типичная экспериментальная кривая изменения концентрации O ₂ , измеренная в суспензии тилакоидов	90
Рис. 15. Скорость образования H ₂ O ₂ в суспензии изолированных тилакоидов	91
Рис. 16. Спектры ЭПР спиновой метки SASL-16, записанные со свежеизолированными тилакоидами и с тилакоидами через 48 часов после выделения	93
Рис. 17. Влияние добавок в суспензию тилакоидов ксантина, ксантина вместе с ксантиноксидазой, ксантина, ксантиноксидазы и супероксиддисмутазы, ксантина, ксантиноксидазы и каталазы на ход ОЖР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла <i>a</i> ФС II.....	96
Рис. 18. Величины параметра S _M , характеризующего относительный уровень восстановления ПХ пула, полученные в суспензиях тилакоидов.....	97

Рис. 19. Влияние добавки 100 мкМ пероксида водорода (H_2O_2) в суспензию тилакоидов на форму ОЛР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла <i>a</i> ФС II	99
Рис. 20. Индукция флуоресценции хлорофилла <i>a</i> при освещении изолированных тилакоидов гороха (через 48 часов после выделения) светом интенсивностью 8 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$	101
Рис. 21. Влияние интенсивности света на скорость поглощения кислорода в отсутствие и присутствии 5 мкМ ДНФ-ИНТи или 10 мкМ диурона в изолированных тилакоидах гороха.....	103
Рис. 22. ЭПР сигнал нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, в суспензии интактных хлоропластов.....	107
Рис. 23. Зависимость ЭПР сигнала нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции, от концентрации H_2O_2	108
Рис. 24. Влияние интенсивности света и времени освещения на величину ЭПР сигнала нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции.....	109
Рис. 25. Конфокальная визуализация флуоресценции резорурфина в суспензии хлоропластов	111
Рис. 26. Регистрация H_2O_2 вне хлоропластов с применением флуоресцентного красителя Amplex Red	112
Рис. 27. Конфокальная визуализация флуоресценции дихлорфлуоресцеина (DCF) в суспензии протопластов.....	113
Рис. 28. Масс-спектрометрические измерения поглощения кислорода (поглощение $^{18}O_2$) <i>in vivo</i>	114
Рис. 29. Конфокальная визуализация флуоресценции резорурфина в суспензии хлоропластов	118
Рис. 30. Влияние добавки 1 мМ AZA на флуоресценцию резорурфина в суспензии хлоропластов	119
Рис. 31. А – относительное содержание H_2O_2 в листьях ячменя при низкой интенсивности или при высокой интенсивности света в отсутствие и в присутствии каталазы; Б – относительное содержание H_2O_2 в листьях ячменя при низкой интенсивности света в отсутствие и в присутствии H_2O_2	124

Рис. 32. Уровень восстановления ПХ пула ($1 - qP$), в листьях ячменя, измеренный после инкубации при низкой интенсивности или при высокой интенсивности света в отсутствие и в присутствии каталазы в среде инкубации, а также при низкой интенсивности света в присутствии H_2O_2 в среде инкубации.....	125
Рис. 33. Денатурирующий электрофорез белков тилакоидов, изолированных из листьев ячменя.	127
Рис. 34. Количественный ПЦР анализ уровней экспрессии <i>lhcb1</i> , <i>lhcb3</i> , <i>lhcb4</i> , <i>lhcb5</i> и <i>lhcb6</i> генов в листьях ячменя.	129
Рис. 35. Влияние засухи и засоления почвы на фотосинтетические характеристики, рассчитанные на основе измерения ОЖР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла <i>a</i> ФС II листьев арабидопсиса.....	131
Рис. 36. А – типичные иммуноблоты белков Lhcb1, Lhcb2, Lhcb6 и D1 после денатурирующего электрофореза тилакоидов, выделенных из контрольных растений (контроль), растений в условиях засухи и растений в условиях засоления. Б – оптическая плотность полос, соответствующих белкам Lhcb1, Lhcb2, Lhcb6 и D1.	134
Рис. 37. Влияние условий засухи и засоления на уровни экспрессии генов <i>lhcb1</i> , <i>lhcb2</i> и <i>lhcb6</i> (А); и уровни экспрессии генов маркеров стресса (Б).....	135
Рис. 38. Содержание H_2O_2 в листьях растений арабидопсиса в контрольных условиях, в условиях засухи и засоления почвы.	138
Рис. 39. Величина параметра ABS/RC (эффективный размер антенны ФС II), отношение $X_l a$ к $X_l b$ и содержание Lhcb1 белка в листьях растений ячменя в контрольных условиях, в условиях засухи и засоления почвы через 7–10 дней от начала действия стрессовых факторов.....	139
Рис. 40. Влияние колонизации растений ячменя бактериями <i>P. putida</i> BS3701 на фотосинтетические характеристики, рассчитанные на основе измерения ОЖР индукционных кривых флуоресценции хлорофилла <i>a</i> ФС II в листьях.	142
Рис. 41. Содержание H_2O_2 в листьях контрольных растений и колонизированных растений ячменя штаммом <i>P. putida</i> BS3701. Б.....	143
Рис. 42. Оптическая плотность полос, соответствующих белкам Lhcb1, Lhcb2, Lhcb5, Lhcb6 и D1, в контрольных и колонизированных растениях.....	144
Рис. 43. Количество мРНК генов стромальной аскорбатпероксидазы (<i>apx</i>), каталазы (<i>cat</i>) и глутатионпероксидазы (<i>gpx</i>) в листьях контрольных и колонизированных <i>P. putida</i> BS3701 растений.	145

Рис. 44. Гипотетический механизм участия «мембранного» H_2O_2 в изменении размера антенны ФС II (ССК II) в клетках высших растений..... 153

Список таблиц

Табл. 1. Влияние введения в тилакоидную суспензию ксантина и ксантиноксидазы, продуцирующих $O_2^{\cdot-}$, на относительный уровень восстановления ПХ пула и максимальный квантовый выход ФС II.....	94
Табл. 2. Величины параметра S_M , характеризующего относительный уровень восстановления ПХ пула	97
Табл. 3. Величина ЭПР сигнала (%) нитроксильных радикалов, образующихся в результате реакции 4-POBN с гидроксильными радикалами, генерируемыми в H_2O_2 -зависимой реакции..	110
Табл. 4. Влияние $AgNO_3$ на фотосинтетическую активность изолированных тилакоидов в присутствии 1 мМ феррицианида	116
Табл. 5. Влияние $AgNO_3$ на фотосинтетическую активность изолированных хлоропластов.	117
Табл. 6. Влияние ацетазоламида на фотосинтетическую активность изолированных тилакоидов в присутствии 25 мкМ Мв.....	119
Табл. 7. Влияние добавки ацетазоламида на активность бычьей КА и КА оболочки хлоропласта.....	121
Табл. 8. Отношение $X_l a/X_l b$ (%) в листьях ячменя, измеренное после инкубации при низкой интенсивности или при высокой интенсивности света в отсутствие и присутствии каталазы	126
Табл. 9. Содержание крахмала и каротиноидов в листьях растений арабидопсиса и отношение $X_l a$ к $X_l b$ в тилакоидах в контрольных условиях, в условиях засухи и засоления через 10–14 дней от начала действия стрессовых факторов.	136