

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В КЛЕТКАХ ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ЭЛЕКТРО- И ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛАХ ДЕЙСТВИЯ

Крупенина Н. А., Пикуленко М. М., Булычев А. А.

*С помощью метода импульсно-модулированной флуориметрии изучено влияние возбуждения, вызванного электро- и фотоиндуцированными стимулами, на возникновение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (NPQ) в клетках водоросли *Chara corallina* и печеночного мха *Anthoceros* sp. Показано, что механизмы образования NPQ при возбуждении электрическим стимулом и яркой вспышкой света различаются.*

Введение. Возбудимость является одним из фундаментальных свойств живой клетки. Изучение возбудимости представляется важным для понимания особенностей взаимодействия растений с внешней средой; этой проблеме посвящено много работ (Pyatygin et al., 1992; Shepherd et al., 2002; Koziolok et al., 2003; Lautner et al., 2005; Fromm and Lautner, 2007). В клетках растений потенциалы действия (ПД) возникают в ответ на различные изменения внешней или внутренней среды. Клетки некоторых мхов, водорослей и высших растений генерируют ПД в ответ на освещение (Bulychev and Turovetsky, 1983; Trebacz et al., 1989), охлаждение (Pyatygin et al., 1992), ожог (Koziolok et al., 2003), механические, химические и электрические воздействия (Shepherd et al., 2002). Потенциалы действия играют важную роль во многих процессах жизнедеятельности растений, включая дыхание (Dziubinska et al., 1989), поглощение воды (Davies, 2006), размножение (Fromm, 2006), а также в процессах осмотической регуляции (Shepherd et al., 2002). Кроме того, распространяющиеся ПД вызывают экспрессию некоторых генов (Vian et al., 1999), запускают тургорные движения у листьев *Mimosa* и насекомоядных растений (Koziolok et al., 2003) и приводят к временной остановке внутриклеточного движения цитоплазмы харовых водорослей (Kikuyama and Tazawa, 1983). У фотосинтезирующих объектов генерация ПД сказывается также на функционировании хлоропластов. Известно, что рас-

пространяющиеся электрические сигналы приводят к снижению квантовой эффективности фотореакций фотосистемы II (ФСII) и максимальной флуоресценции хлорофилла F_m' (Koziolok et al., 2003; Lautner et al., 2005). Этот факт указывает на возникновение нефотохимического тушения (NPQ) в фотосинтетическом аппарате, которое является одним из механизмов защиты фотосинтетического аппарата от фотоповреждения (Crofts and Yerkes, 1994; Dau, 1994; Müller et al., 2001).

Временное снижение F_m' после генерации ПД подробно изучено на клетках харовой водоросли при стимуляции одиночными импульсами электрического тока (Bulychev et al., 2004; Bulychev and Kamzolkina, 2006; Krupenina and Bulychev, 2007; Krupenina et al., 2008). На клетках *Chara* было показано, что нефотохимическое тушение флуоресценции при электростимуляции плазмалеммы является энергозависимым и обусловлено возрастанием ΔpH на мембране тилакоидов (Bulychev and Kamzolkina, 2006). Было также получено косвенное подтверждение того, что ПД-индуцированное подавление фотосинтеза и возрастание NPQ опосредовано повышением уровня Ca^{2+} в цитоплазме (Krupenina and Bulychev, 2007). Представляется важным изучить влияние ПД на фотосинтетический ответ растения, если возбуждение было вызвано другим способом. Для этой цели хорошо подходит печеночный мох *Anthoceros sp.*, который интересен тем, что генерирует ответ типа ПД в ответ на яркую вспышку света (Bulychev and Turovetsky, 1983; Булычев, 1989; Ниязова и Булычев, 1989). Фотостимуляция слоевища мха вызывает изменения мембранного потенциала плазмалеммы амплитудой порядка 40 мВ (Bulychev and Turovetsky, 1983; Булычев и др., 1986), а также приводит к развитию тушения флуоресценции, кинетически подобному изменениям МП (Булычев, 1989; Pikulenko and Bulychev, 2005).

В данной работе в сравнительном аспекте рассмотрено влияние фото- и электроиндуцированного возбуждения на нефотохимическое тушение флуоресценции в клетках *Chara* и *Anthoceros sp.*

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали изолированные клетки водоросли *Chara corallina* Klein ex Willd, а также клетки слоевища печеночного мха *Anthoceros sp.* Перед экспериментом клетку *Chara* помещали в двухсекционную камеру с изолированными отсеками, заполненную искусственной прудовой водой (ИПВ), содержащей 0.1 mM KCl, 1.0 mM NaCl и 0.1 mM CaCl₂. При работе с *Anthoceros*, часть слоевища помещали на предметное стекло в каплю ИПВ.

Объекты помещали на столик инвертированного микроскопа Axiovert 25 (Carl Zeiss) со встроенным флуориметром Microscopy PAM (Walz).

Флуоресценцию хлорофилла на клетках *Chara* и *Anthoceros sp.* измеряли на небольших участках объектов (круговая область диаметром 100 мкм) методом насыщающих световых импульсов с помощью флуориметра с импульсно-модулированным освещением Microscopy PAM (Walz). Особенности методики и характеристики прибора более подробно описаны в работах (Bulychev and Kamzolkina, 2006; Krupenina and Bulychev, 2007). Эффективный квантовый выход фотохимической активности ФСII у адаптированных к темноте клеток и клеток, освещаемых действующим светом, определяли по формулам:

$$\frac{\Delta F}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \text{ и } \frac{\Delta F}{F'_m} = \frac{F'_m - F}{F'_m},$$

где F_m и F'_m — максимальный выход флуоресценции, вызываемый насыщающим световым импульсом в темноте и на фоне постоянного действующего света соответственно. F_0 и F — темновой уровень флуоресценции и выход флуоресценции на действующем свете. Показатель нефотохимического тушения флуоресценции, коэффициент NPQ рассчитывали по формуле:

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}.$$

Параметры флуоресценции и квантовую эффективность ФСII регистрировали с помощью программы WinControl.

Для измерения pH у поверхности клетки *Chara* использовали сурьмяные pH-микроэлектроды в стеклянной изоляции с диаметром кончика 10–20 мкм. Термины «щелочные» и «кислые» зоны клетки обозначают участки междуузлия, примыкающие к щелочным и кислым зонам наружной среды соответственно. Сигналы pH измеряли с помощью электрометрического усилителя VAJ-51 (RFT) и записывали на компьютер с помощью аналого-цифрового преобразователя CED 1401 и программы WinControl.

Для электростимуляции клетки *Chara* применяли внеклеточные платиновые электроды, независимые от измерительной цепи. Электроды помещали в изолированные отсеки камеры и возбуждали клетку одиночными импульсами тока силой около 10 мкА и длительностью 150 мсек.

Фотостимуляцию слоевища *Anthoceros sp.* проводили, освещая объект яркими 3-х секундными импульсами белого света ($1000 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$).

На рисунках представлены результаты типичных опытов.

Результаты и обсуждение. Генерация ПД в щелочных участках клеток *Chara corallina* приводит к уменьшению эффективного квантового выхода переноса электронов в ФСII, возрастанию нефотохимического тушения флуоресценции *NPQ* (снижение максимального уровня флуоресценции F_m'), а также вызывает снижение pH у поверхности клетки (Bulychev et al., 2004; Eremin et al., 2007; Krupenina and Bulychev, 2007; Krupenina et al., 2008). На рис. 1а приведены вызванные потенциалом действия изменения *NPQ* при двух интенсивностях света и pH у поверхности клетки. Из рисунка видно, что амплитуда изменений нефотохимического тушения после ПД, как и исходный уровень нефотохимического тушения зависят от интенсивности действующего света. ПД-индуцированные изменения *NPQ* не проявляются в отсутствие света (данные не приведены) и при высоких интенсивностях фотосинтетически активной радиации (ФАР, $40\text{--}100 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), но имеют максимальную амплитуду в области низких ФАР.

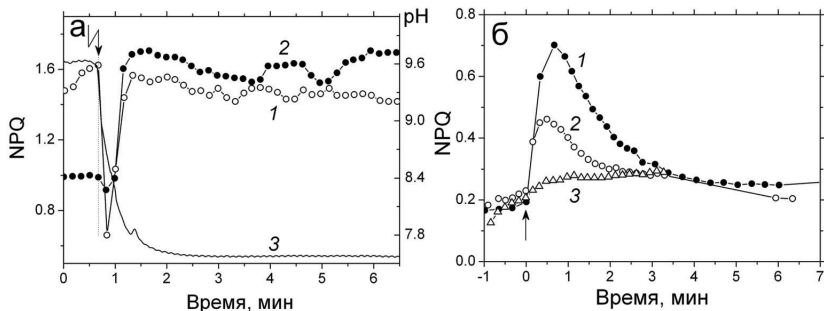


Рис. 1. Изменения нефотохимического тушения *NPQ* у клетки *Chara corallina* и *Anthoceros*. (а) ПД-индуцированные изменения *NPQ* в клетке *Chara* при плотности потока квантов 40 (кривая 1) и $26 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (кривая 2), сопровождающиеся параллельным снижением pH у поверхности клетки (кривая 3). (б) Вызванные яркой вспышкой света изменения *NPQ* у *Anthoceros sp.* в темноте (кривая 1) и на фоновом свете с интенсивностями 3 и $9 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (кривые 2 и 3). Зигзагообразной стрелкой на этом рисунке и рис. 3 отмечен момент приложения эл. стимула к клетке *Chara*; простой стрелкой — освещение таллома мха *Anthoceros sp.* 3-х секундным импульсом яркого света ($1000 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$).

Интересно отметить, что в ряде опытов возрастанию нефотохимического тушения после ПД предшествовало кратковременное снятие тушения, природа которого пока не ясна. Это начальное снижение NPQ хорошо видно на ярком свете (рис. 1а, кривая 1). Освещение таллома печеночного мха *Anthoceros sp.* световыми импульсами секундной длительности вызывает изменения мембранного потенциала, аналогичные ПД, которые развиваются сходным образом на свету и в темноте (Bulychev and Turovetsky, 1983; Булычев и др., 1986). В отличие от ПД-индуцированных изменений NPQ в клетках *Chara*, наибольшая амплитуда изменений NPQ у *Anthoceros sp.* отмечена при фотостимуляции объекта, находящегося в темноте (рис. 1б, кривая 1). Повышение фонового уровня ФАР сопровождалось ослаблением запускаемых световым стимулом изменений NPQ и ускорением релаксации NPQ к исходному состоянию (рис. 1б, кривая 2).

Отсутствие вызванных потенциалом действия изменений квантового выхода ФСII и NPQ в темноте (Krupenina and Bulychev, 2007) и в присутствии диурона (Булычев и Крупенина, 2008) позволяет заключить, что формирование ΔpH и NPQ в тилакоидах *Chara* после импульсной деполяризации зависит от фотосинтетического потока электронов. Предложенный в работах (Bulychev and Kamzolkina, 2006; Krupenina and Bulychev, 2007) механизм образования тушения флуоресценции при возбуждении учитывает повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и строме хлоропласта, а также опосредованное Ca^{2+} ингибирование цикла Кальвина и возрастание градиента H^+ на мембранах тилакоидов.

В отличие от тушения NPQ у клеток *Chara*, которое проявляется только на свету, у *Anthoceros sp.* возбуждающая короткая вспышка света служит лишь триггером, инициирующим возникновение тушения флуоресценции. Последующее формирование ΔpH и NPQ у *Anthoceros sp.*, вероятно происходит за счет долгоживущих темновых процессов, запускаемых в хлоропластах после светового стимула. Такими свойствами обладает инициируемый светом темновой гидролиз АТФ в хлоропластах, сопровождаемый генерацией ΔpH (Gilmore and Yamamoto, 1992). Рассматривая причины темнового возрастания NPQ и его восстановления в клетках *Anthoceros sp.* необходимо учесть, что в поддержании ΔpH может участвовать активируемая светом H^+ -АТФаза хлоропластов (Bulychev et al., 1985; Shahak, 1986). Темновая накачка протонов, осуществляемая этим ферментом, поддерживается в течение нескольких

минут после выключения света, ослабляясь по мере инактивации H^+ -АТФазы (Shahak, 1986). На участие H^+ -АТФазы указывает также тот факт, что ингибитор фотоактивируемой АТФазы хлоропластов тентоксин ослабляет запускаемое светом уменьшение выхода флуоресценции и ускоряет процесс темнового восстановления выхода флуоресценции (Булычев, 1989).

Для сравнения механизмов образования NPQ при электро- и фото-стимулируемом возбуждении клетки мы исследовали влияние искусственного акцептора электронов метилвиологена (параquat) на световые кривые NPQ (рис. 2) и ПД-индуцированное тушение флуоресценции (рис. 3) в клетках *Chara* и *Anthoceros sp.*

На рис. 2. показано влияние МВ на зависимости NPQ от интенсивности света, измеренные на клетках *Chara* и *Anthoceros sp.* У *Chara* световые кривые, измеренные в контроле, не отличались от световых кривых в присутствии МВ до приложения возбуждающего стимула (рис. 2а). Однако генерация ПД приводила к возникновению тушения в широком диапазоне интенсивностей света и сдвигу световой кривой в сторону низких ФАР. Сходное влияние МВ на световую кривую NPQ наблюдалось и у *Anthoceros sp.* (рис. 2б).

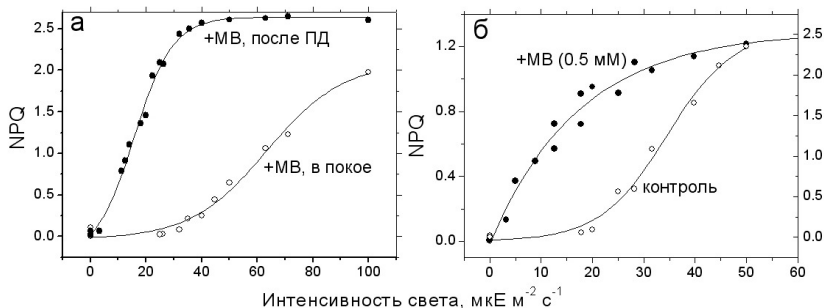


Рис. 2. Изменения световых кривых нефотохимического тушения NPQ после генерации ПД в присутствии МВ у *Chara* (а) и *Anthoceros sp.* (б). (а) Открытые символы — после добавления в среду МВ, до генерации ПД; закрытые символы — в присутствии МВ после однократной стимуляции. (б) Открытые символы — световая кривая, измеренная до внесения в среду МВ, закрытые — после.

Несмотря на сходное влияние МВ на световые кривые нефотохимического тушения у *Chara* и *Anthoceros sp.*, исследование кинетик изменения NPQ после стимуляции импульсом тока и вспышкой света вы-

явило различия в ответах этих объектов на возбуждение в присутствии МВ (рис. 3).

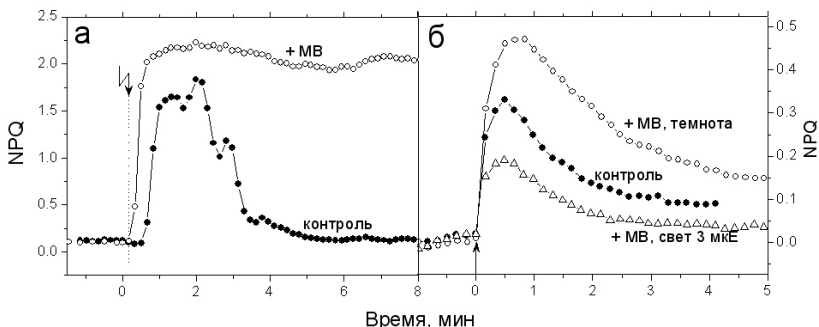


Рис. 3. Развитие нефотохимического у *Chara* (а) и *Anthoceros sp.* (б) в среде без добавок и в присутствии в среде метилвиологена. Концентрации МВ для опытов а и б — 0.83 мМ и 0.5 мМ, соответственно.

На рис. 3а показаны изменения NPQ в клетке *Chara*, вызываемые потенциалом действия до и после добавления МВ. В контрольных условиях (без МВ) ПД-индуцированное возрастание NPQ в клетках *Chara* было обратимым (рис. 3а, закрытые символы): после возрастания уровня NPQ до максимума наблюдалось восстановление NPQ до исходного уровня. После добавления в среду МВ до концентрации 0.83 мМ, генерация ПД вызывала в той же клетке быстрое и необратимое увеличение NPQ (открытые символы). При этом повторный стимул не приводил к дополнительному возрастанию тушения. Кроме того, в присутствии 0.83 мМ МВ возрастание NPQ после ПД развивалось быстрее, чем в среде без добавок. Эти данные свидетельствуют о том, что ПД вызывает проникновение МВ к хлоропластам.

В опытах с *Anthoceros sp.* метилвиологен подавлял запускаемые светом изменения мембранного потенциала плазмалеммы (данные не приведены), не оказывая ощутимого влияния на запускаемые светом изменения нефотохимического тушения флуоресценции (рис. 3б). Освещение темноадаптированного таллома мха *Anthoceros sp.*, выдержанного в растворе МВ, яркой вспышкой света приводило к увеличению амплитуды изменений NPQ по сравнению с контролем (рис. 3б), однако необратимости, как в случае с клеткой *Chara*, не наблюдалось. В условиях общего слабого освещения изменения NPQ , вызванные фотости-

муляцией участка мха в присутствии МВ, не отличались от контрольного опыта: освещение образца ярким световым импульсом приводило к уменьшению изменений *NPQ* независимо от присутствия в среде экзогенного акцептора.

Результаты, представленные на рис. 3, указывают на то, что механизмы образования нефотохимического тушения флуоресценции при возбуждении неодинаковы у исследуемых объектов. По-видимому, это связано с разными механизмами возникновения ПД-индуцированного тушения флуоресценции у *Chara* и *Anthoceros sp.* в физиологических условиях (в отсутствие МВ). В работе (Булычев и Крупенина, 2008) было сделано предположение, что МВ может поступать в клетку *Chara* по Ca^{2+} -каналам плазмалеммы, которые открываются при возбуждении, и проникает в хлоропласты, где вызывает необратимое тушение флуоресценции. Влияние метилвиологена на фотосинтетический аппарат мха *Anthoceros sp.* требует дальнейших исследований, однако очевидно, что запускаемые светом долгоживущие темновые процессы, лежащие в основе изменений флуоресценции, нечувствительны к действию искусственного акцептора электронов.

Заключение. В работе проведено сравнение влияния возбуждения, вызванного электрическим стимулом и фотовспышкой, на нефотохимическое тушение флуоресценции клеток водоросли *Chara* и печеночного мха *Anthoceros sp.* В клетках *Chara* тушение флуоресценции возникает как результат изменений ионного состава цитоплазмы во время ПД, а в клетках мха изменения мембранного потенциала и флуоресценции развиваются как параллельные процессы, вызванные фотореакциями в хлоропластах. О различиях в механизмах образования *NPQ* при электро- и фотостимулируемом возбуждении клетки говорит также неодинаковое действие метилвиологена на формирование *NPQ* при возбуждении исследованных объектов. В опытах с *Anthoceros sp.* метилвиологен подавлял запускаемые светом изменения мембранного потенциала, не оказывая влияния на запускаемые светом изменения флуоресценции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Булычев А.А. Индукционные изменения мембранного потенциала и флуоресценции клеток *Anthoceros* после вспышек секундной длительности // *Физиология растений*. — 1989. — Т. 36, №5. — С. 939–946.

- Булычев А.А., Крупенина Н.А. Потенциал действия открывает доступ для проникновения заряженного кофактора в хлоропласты *Chara corallina* // *Физиология растений*. — 2008. — Т. 55, №2. — С. 192–201.
- Булычев А.А., Ниязова М.М., Рубин А.Б., Туровецкий В.Б. Индукция флуоресценции хлорофилла и изменения электрического потенциала на мембранах хлоропласта // *Доклады Академии Наук СССР*. — 1986. — Т. 286, №1. — С. 253–256.
- Ниязова М.М., Булычев А.А. Обратимое снижение выхода флуоресценции хлорофилла *a* при генерации потенциала действия в клетках мха *Anthoceros* // *Биофизика*. — 1989. — Т. 34, №2. — С. 272–274.
- Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells // *Bioelectrochemistry*. — 2006. — Vol. 69. — P. 209–215.
- Bulychev A.A., Kamzolkina N.A., Luengviriya J., Rubin A.B., Müller S.C. Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells // *J. Membrane Biol.* — 2004. — Vol. 202, no. 1. — P. 11–19.
- Bulychev A.A., Niyazova M.M., Turovetsky V.B. Evidence for delayed photoactivation of electrogenic transport in chloroplast membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1985. — Vol. 808, no. 1. — P. 186–191.
- Bulychev A.A., Turovetsky V.B. Light-triggered changes of membrane potential in cells of *Anthoceros punctatus* and their relation to activation of chloroplast ATPase // *J. Exp. Botany*. — 1983. — Vol. 34, no. 146. — P. 1181–1188.
- Crofts A.R., Yerkes C.T. A Molecular Mechanism for Qe-quenching // *FEBS Letters*. — 1994. — Vol. 352. — P. 265–270.
- Dau H. Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to Photosystem II photochemistry and fluorescence emission // *J. Photochem. Photobiol. (B: Biology)*. — 1994. — Vol. 26, no. 1. — P. 3–27.
- Davies E. Electrical signals in plants: Facts and hypotheses // *Plant Electrophysiology. Theory and Methods* / A. Volkov (Ed.). — 2006. — Berlin: Springer. — P. 407–422.
- Dziubinska H., Trebacz K., Zawadski T. The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum* // *Physiol. Plant.* — 1989. — Vol. 75. — P. 417–423.
- Eremín A., Bulychev A., Krupenina N.A., Mair T., Hauser M.J.B., Stannarius R., Müller S., Rubin A.B. Excitation-induced dynamics of external pH pattern in *Chara corallina* cells and its dependence on external calcium concentration // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2007. — Vol. 6. — P. 103–109.
- Fromm J. Long-distance electrical signaling and physiological functions in higher plants // *Plant Electrophysiology. Theory and Methods* / A. Volkov (Ed.). — 2006. — Berlin: Springer. — P. 269–285.

- Fromm J., Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants // *Plant, Cell Environ.* — 2007. — Vol. 30. — P. 249–257.
- Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 1899–1903.
- Kikuyama M., Tazawa M. Transient increase of intracellular Ca^{2+} during excitation of tonoplast-free *Chara* cells // *Protoplasma.* — 1983. — Vol. 117. — P. 62–67.
- Koziolek C., Grams T.E.E., Schreiber U., Matyssek R., Fromm J. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals // *New Phytologist.* — 2003. — Vol. 161. — P. 715–722.
- Krupenina N.A., Bulychev A.A. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta* — 2007. — Vol. 1767. — P. 781–788.
- Krupenina N.A., Bulychev A.A., Roelfsema M.R.G., Schreiber U. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2008. — Vol. 7. — P. 681–688.
- Lautner S., Grams T.E.E., Matyssek R., Fromm J. Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis // *Plant Physiol.* — 2005. — Vol. 138. — P. 2200–2209.
- Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiol.* — 2001. — Vol. 125. — P. 1558–1566.
- Pikulenko M.M., Bulychev A.A. Light-triggered action potentials and changes in quantum efficiency of photosystem II in *Anthoceros* cells // *Russian Journal of Plant Physiology.* — 2005. — Vol. 52, no. 5. — P. 584–590.
- Pyatygin S.S., Opritov V.A., Khudyakov V.A. Subthreshold changes in excitable membranes of *Cucurbita pepo* L. stem cells during cooling-induced action potential generation // *Planta.* — 1992. — Vol. 186. — P. 161–165.
- Shahak T. Regulation of the chloroplast H^+ -ATPase by light // *Europ. J. Biochem.* — 1986. — Vol. 154, no. 1. — P. 179–185.
- Shepherd V.A., Beilby M.J., Shimmen T. Mechanosensory ion channels in charophyte cells: the response to touch and salinity stress // *Eur. Biophys. J.* — 2002. — Vol. 31. — P. 341–355.
- Trebacz K., Tarnecki R., Zawadski T. The effects of ionic channel inhibitors and factors modifying metabolism on the excitability of the liverwort *Conocephalum conicum* // *Physiol. Plant.* — 1989. — Vol. 75. — P. 24–30.
- Vian A., Henry-Vian C.E.D. Rapid and systemic accumulation of chloroplast mRNA binding protein transcripts after flame stimulus in tomato // *Plant Physiology.* — 1999. — Vol. 121. — P. 517–524.

FLUORESCENCE QUENCHING IN GREEN PLANT CELLS AFTER ELECTRICALLY AND PHOTO-INDUCED ACTION POTENTIALS

Krupenina N. A., Pikulenko M. M., Bulychev A. A.

Pulse amplitude-modulated microfluorometry was used to study the effects of electrically and photo-induced action potentials (AP) on the formation of non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) in cells of alga Chara corallina and hornwort Anthoceros sp. It was shown that the mechanisms of NPQ formation differ in the cases of electro- and photo-induced excitation.