

На правах рукописи

Креслав

КРЕСЛАВСКИЙ ВЛАДИМИР ДАНИЛОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО
АППАРАТА ИНДУКТОРАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Москва – 2010

**Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институте фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино**

Научный консультант:

Доктор биологических наук

**Аллахвердиев Сулейман
Ифхан оглы**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,
профессор

Пронина Наталия Александровна

Доктор биологических наук,
профессор

Кошкин Евгений Иванович

Доктор биологических наук

Мамедов Махир Джафар оглы

Ведущая организация: Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

Защита диссертации состоится « 19 » октября 2010 г. в 11 часов на
заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д
002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии
растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул.
Ботаническая 35.

Факс: (495) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь

Совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций, к.б.н.



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На всем протяжении процесса вегетации растения подвержены негативному воздействию стрессовых факторов различной природы, что приводит к снижению продуктивности за счет ингибирования роста и фотосинтеза. Изучение путей повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды относится к числу приоритетных направлений современной физиологии растений. Оно связано с именами ряда известных ученых, в частности, В.Я. Александрова, А.Ф. Титова, Вл.В. Кузнецова, J.A. Berry, O. Björkman, N. Murata.

Фотосинтетический аппарат (ФА) растений – одна из наиболее чувствительных к абиотическому стрессу клеточных систем. Хотя физиологические, биофизические и биохимические аспекты фотосинтеза и функционирования фотосистем подробно изучены благодаря исследованиям известных Российских и зарубежных ученых: А.А. Красновского, В.А. Шувалова, А.Б. Рубина, Н.В. Карапетяна, В.В. Климова, Ю.С. Карпилова, Дж. Барбера, Говинджи и др., - закономерности формирования устойчивости ФА к неблагоприятным внешним факторам и механизм действия физиолого-биохимических защитных реакций исследованы недостаточно. Между тем, понимание основных закономерностей формирования стресс-устойчивости ФА позволяет выявить наиболее эффективные пути повышения устойчивости растений к стрессовым факторам, и, следовательно, снизить их негативное действие на продукционный процесс.

Одним из ключевых путей повышения стресс-устойчивости ФА является, по-нашему мнению, использование индукторов защитных систем растений, то есть факторов, активизирующих естественные стресс-защитные механизмы растений (Шакирова, 2001).

Индуктором может быть слабый предшествующий стресс, который индуцирует устойчивость к стрессу другого типа (кросс-адаптация). Слабый стресс может быть вызван неблагоприятными факторами внешней среды, в частности, повышенной температурой, различными факторами химической природы, такими как некоторые ретарданты, например, холинхлорид (ХХ) (Sheng et al., 2006) и фитогормоны (Шакирова, 2001; Титов и др., 2006), а также физической природы, например, узкополосным красным светом (Будаговский, 2008). ФА часто играет ключевую роль в устойчивости растений к неблагоприятным внешним факторам, однако механизм повышения устойчивости ФА индукторами защитных систем растений во многом остается невыясненным. Имеются только единичные работы по сравнительному исследованию влияния индукторов различной природы на стресс-устойчивость ФА и целого растения (Dat et al., 1998). Можно предположить, что одним из наиболее общих механизмов действия таких индукторов является кратковременное накопление активных форм кислорода (АФК), играющих регуляторно-сигнальную роль, а также,

в ряде случаев, - абсцизовой кислоты (АБК) и активной формы фитохрома (Фх). Такого рода исследования могли бы быть полезны для целенаправленного отбора эффективных индукторов, повышающих стресс-устойчивость растений.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование регуляции стресс-устойчивости фотосинтетического аппарата высших растений с помощью индукторов защитных систем растений.

На основе литературных данных (Lingakumar, Kulandaivelu, 1993; Gilley, Fletcher, 1997) мы предположили, что эффективными индукторами защитных систем являются ретарданты хлорхолинхлорид (XXX) и XX, а также красный свет (КС) в спектральной области 620-660 нм. Представляло интерес сравнить действие этих разных по природе факторов между собой и с традиционным фактором, который увеличивает стресс-устойчивость растений – закаливающей температурой. Были изучены условия, при которых данные факторы индуцируют повышенную (пониженную) стресс-устойчивость ФА и некоторые пути ее регуляции.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние индукторов защитных систем растений (хлорхолинхлорид, холинхлорид, а также КС и закаливающие повышенные температуры) на устойчивость ФА к высоким температурам, УФ-облучению и свету высокой интенсивности.
2. Исследовать роль антиоксидантной и фитогормональной систем в повышении стресс-устойчивости ФА при действии индукторов защитных систем растений.
3. Изучить роль H_2O_2 в первичных ответных реакциях ФА на действие индукторов защитных систем.
4. Исследовать роль фитохромной системы в повышении стресс-устойчивости ФА растений к УФ-радиации.
5. Изучить влияние кратковременной тепловой предобработки растений пшеницы на устойчивость ФА к повторному тепловому стрессу и свету высокой интенсивности, а также на скорость пост-стрессового восстановления фотосинтетической активности.

Научная новизна. Проведенные исследования позволили выявить ряд общих и специфических закономерностей по регуляции устойчивости ФА к стрессам абиотической природы при действии различных доз разных по природе индукторов защитных систем растений.

1. Впервые обнаружено защитное действие индукторов защитных систем растений: КС низкой интенсивности и ретардантов XXX и XX на ФА высших растений при действии УФ-радиации и повышенной температуры.

2. Установлено участие активной формы фитохрома в формировании УФ-защитных систем ФА при предоблучении растений КС. Обнаружена связь между защитным действием КС против УФ-радиации и КС-индуцированным повышением пероксидазной активности, а также увеличением содержания каротиноидов и флавоноидов.
3. Впервые установлено, что повышение пула H_2O_2 в листьях растений, обработанных ретардантными дозами ХХХ, а также облученных КС с $\lambda_m=660$ нм предшествует увеличению стресс-устойчивости ФА, что предполагает участие АФК в повышении устойчивости.
4. Впервые выявлена связь между кратковременной генерацией H_2O_2 при тепловом закаливании, повышением уровня антиоксидантной активности и скоростей темнового дыхания в листьях, а также циклического фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах с одной стороны и повышением стресс-устойчивости ФА в закаленных растениях с другой стороны.
5. Установлено, что разные по природе индукторы защитных систем: КС низкой интенсивности, ретарданты ХХХ и ХХ, а также закаливающие повышенные температуры, - участвуют в формировании повышенной стресс-устойчивости ФА аналогичным образом – через транзитное повышение пула H_2O_2 , которое наблюдается при достаточно высоких дозах индуктора и предшествует повышению активности антиоксидантных ферментов и увеличению содержания низкомолекулярных антиоксидантов.

Научно-практическая значимость. Проведенные исследования позволяют понять основные закономерности формирования повышенной стресс-устойчивости ФА под действием различных индукторов защитных систем химической и физической природы: ретарданты ХХХ и ХХ, закаливающие температуры и красный свет низкой интенсивности. Предложена концепция - повышение стресс-устойчивости ФА при действии этих индукторов происходит путем увеличения активности антиоксидантных ферментов и уровня низкомолекулярных антиоксидантов, вероятно, за счет транзитного повышения пулов сигнальных интермедиатов, участвующих в формировании устойчивости: АФК, ионов Ca^{2+} и АБК.

Результаты наших исследований были использованы для создания новых типов светообразующих пленок на основе наноразмерных фотолюминофоров (Воробьев и др., 2008). Было изучено влияние дополнительного КС, получаемого от светотрансформирующих пленок (Полисветан, РэдЛайт) с разными типами фотолюминофоров, на основе неорганических комплексов редкоземельных элементов, и светодиодов на фотосинтез и рост растений (Кособрюхов и др., 2000; Мартиросян и др., 2008). Использование таких пленок и светодиодов приводит к снижению фотоингибирования при высокой интенсивности света и к увеличению

содержания в листьях каротиноидов. Наши концепции о трансдукции светового и теплового сигналов в растительной клетке и механизмах стресс-устойчивости ФА представлены в обзорах (Биологические мембраны 2006, 2007; Photosynthesis Research 2008; Photochemistry Photobiology (C) 2009) и могут быть использованы при чтении базового курса и спецкурсов по физиологии растений в вузах.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Хлорхолинхлорид и холинхлорид повышают устойчивость ФА к УФ-радиации и тепловому стрессу. Защитное действие ХХХ связано с увеличением активности антиоксидантных ферментов и содержания низкомолекулярных антиоксидантов в листьях и хлоропластах. Увеличение уровня АБК в листьях также может дать вклад в повышение стресс-устойчивости ФА. Повышение содержания H_2O_2 в листьях растений, обработанных ХХХ, предшествует росту стресс-устойчивости ФА, что свидетельствует об участии АФК в ее увеличении.
2. Предоблучение растений КС низкой интенсивности повышает устойчивость их ФА к УФ-радиации. Защитное действие КС связано с повышением пероксидазной активности и увеличением содержания УФ-поглощающих соединений в листьях растений. Ключевыми сигнальными интермедиатами в трансдукции сигнала КС являются активная форма фитохрома, а при относительно высоких дозах красного света ($\sim 0.3-2$ Дж $см^{-2}$) - АФК.
3. Кратковременное тепловое закаливание растений повышает устойчивость ФА к вторичному тепловому стрессу и к фотоингибированию. Закаливание приводит к кратковременному повышению пула АФК, с последующим повышением активности антиоксидантных ферментов и скорости темнового дыхания в листьях, а также скорости циклического фотофосфорилирования, что обуславливает повышение стресс-устойчивости ФА.
4. Один из ключевых путей повышения стресс-устойчивости ФА является увеличение уровня антиоксидантной активности и содержания низкомолекулярных антиоксидантов, регулируемых пулом АФК и других сигнальных интермедиатов, образующихся при обработке растений индукторами защитных систем.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены на Всесоюз. конф. «Преобразование энергии в фотосинтетических системах и их моделях» (Пушино, 1989); межд. конф. «Фотосинтез и фотобиология» (Пушино, 1991); III и V межд. конф. «Регуляторы роста и развития растений» (Москва, 1995, 1999); X конгр. федерации Европейских обществ физиологов растений (Florence, 1996); XIII межд. конгр. по фотобиологии (San-Francisco, USA, 2000); XIII Western Photosynthesis Conf. (Asilomar, California, USA, 2004); межд. конф. «Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of the Photosystems» (Пушино, 2006), II

межд. симп. «Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture» (Киев, Украина, 2007); VI съезде общества физиологов растений России «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007); межд. конф. РГАУ-МСХА (Москва, 2009); межд. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования (Москва, Пущино, 2003-2009), конф. и съездах фотобиологов России (1996-2008).

Личный вклад соискателя. Диссертация выполнена самостоятельно. Основные теоретические концепции предложены соискателем. В обсуждении данных участвовали: Климов В.В., Ерохин Ю.Е., Аллахвердиев С.И., Ладыгин В.Г., Музафаров Е.Н., Христин М.С. (ИФПБ РАН, Пущино), Кузнецов Е.Д. (ИОФАН, Москва), Бухов Н.Г. (ИФР, Москва), Murata N. (Национальный институт общей биологии, Япония), Carpentier R. (Квебекский университет, Канада) и др. Автор выражает им всем глубокую благодарность.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 75 научных работ, из них 22 статьи в отечественных научных журналах, рекомендованных в списке ВАК, и 11 в ведущих международных журналах, а также монография (Музафаров и др., 1995), получено авторское свидетельство на изобретение.

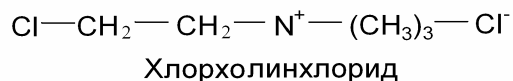
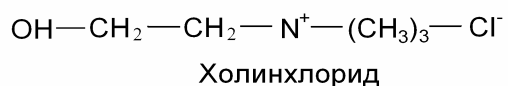
Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, 4 экспериментальных глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 460 источников, в том числе 309 на английском языке. Работа изложена на 330 страницах, включает 78 рисунков и 15 таблиц.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из 5 разделов. В первом разделе дано развернутое определение стресса, окислительного стресса, индукторов стресс-защитных механизмов. Во втором разделе рассмотрены мишени окислительного стресса, образование и роль АФК при действии окислительного стресса на ФА, проанализированы основные защитные механизмы против развития окислительного стресса, роль света, энергетического обеспечения и баланса про/антиоксидантов в стресс-защитных механизмах. С одной стороны АФК обладают повреждающим действием, с другой стороны, АФК, участвуют в передаче стрессового сигнала, запуская адаптивные механизмы клетки (Барабой, 1991; Demmig-Adams, Adams, 2002), в частности, на уровне ФА (El-Shintinawy et al., 2004). Другими общими вторичными мессенджерами в цепи трансдукции стрессового сигнала могут быть Ca^{2+} и АБК (Larkindale, Knight, 2002; Титов и др., 2006; Колупаев, Карпец, 2009).

Рассмотрено стресс-защитное действие ряда регуляторов роста, в том числе холинсодержащих соединений (ХСС), ретардантов XX и XXX. Изменение гормонально-ингибиторного статуса и уровня антиоксидантной активности в листьях

растений являются одним из путей регуляции стресс-устойчивости ФА при действии этих соединений.



В третьем разделе рассмотрены механизмы действия УФ-облучения на ФА растений и защитное действие оранжево-красного света в области 600-730 нм при УФ-облучении, роль активной формы фитохрома (Фх_{ДК}) в механизме защитного действия света. В четвертом разделе проанализировано влияние кратковременной тепловой предобработки растений на теплоустойчивость и устойчивость ФА к свету высокой интенсивности. В пятом разделе дан анализ особенностей фотоингибирования в цианобактериях, роль каталазы-пероксидазы в защитном действии против фотоингибирования и NaCl-индуцированного фотоингибирования.

Высказана гипотеза о том, что при действии индукторов различной природы на ФА растений общим звеном формирования повышенной стресс-устойчивости ФА является транзитное повышение содержания АФК, цитозольного Ca²⁺ и АБК в листьях и хлоропластах, вследствие чего возрастает активность антиоксидантных ферментов и содержание низкомолекулярных защитных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В материалах и методах описаны объекты, схемы экспериментов и измерительные методики. В экспериментах использованы листья высших растений (пшеница, фасоль, шпинат и салат), зеленые микроводоросли и цианобактерии. Для оценки стресс-устойчивости использованы несколько стресс-индуцирующих факторов: 1) – кратковременное (обычно 20 мин) воздействие высокой температуры; 2) – свет высокой интенсивности ± прогрев, ± NaCl; 3) – УФ-облучение.

Действие стресс-факторов и индукторов устойчивости на растения было изучено по следующим схемам:

1. Высшие растения: кратковременный прогрев; кратковременный прогрев → свет различной интенсивности; свет высокой интенсивности; обработка растений холинсодержащими соединениями или низкоинтенсивным светом в видимой области →УФ или кратковременный тепловой стресс; УФ→КС. Стрессовые факторы: прогрев при 39-44°C (20 мин); УФ-А (365 нм, 20 Вт м⁻², 0.5-1 ч); УФ-В (300 нм, 0.45-5 Вт м⁻²); УФ-С (254 нм, 6 Вт м⁻²); белый свет (100-400 Вт м⁻²).

2. Цианобактерии: свет высокой интенсивности (100-600 Вт м⁻²) ± солевой стресс (0.5 М NaCl).

Влияние XX и XXX изучали на проростках фасоли и пшеницы. В экспериментах на фасоли XX и XXX (0.002-0.6%) вводили с питательным раствором или проводили обработку листьев раствором этих ретардантов (0.01-5%). В опытах на пшенице использовали семена, замоченные в растворах ретардантов. УФ-защитное действие предоблучения разных длин волн изучали на 8-10-дн. проростках салата и на полностью развитых листьях шпината. Использовали КС с $\lambda_m=625, 660$ и 690 нм, а также дальний красный свет (ДКС) с $\lambda_m=730$ нм и свет с $\lambda_m=570, 470$ и 400 нм, который получали с помощью светодиодов, либо от ламп накаливания, используя интерференционные светофильтры. Продолжительность облучения от 5 мин до 4 ч при интенсивности света $1-10 \text{ Вт м}^{-2}$. Использовали как относительно высокие дозы КС ($0.3-2 \text{ Дж см}^{-2}$), облучая отделенные листья, так и низкие дозы КС (0.05 Дж см^{-2}), облучая сами растения.

Для оценки состояния ФА в стрессовых и нормальных физиологических условиях использовали методы переменной и замедленной флуоресценции (ЗФл) хлорофилла (Хл) *a*, а также измеряли скорость газообмена CO_2 (Biel et al., 2009). Активность ФС2 оценивали по отношению F_v/F_m , где F_v – фотоиндуцированное изменение флуоресценции Хл *a*, а F_m – максимальная интенсивность флуоресценции. Кроме того, определяли отношение $(I_m-D)/D$, где I_m – максимальная амплитуда быстрой или медленной компоненты ЗФл Хл *a*, а D – минимальная амплитуда ЗФл. Содержание фотосинтетических (Хл *a* и *b*, каротиноиды) и УФ-поглощающих (преимущественно флавоноиды; Mirecki, Teramura, 1984) пигментов определяли, используя спектрофотометрический метод. Антиоксидантную активность оценивали по изменению активности супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы, аскорбатпероксидазы (АсП), глутатионредуктазы (ГР), каталазы (Балахнина и др., 2005), а также по содержанию каротиноидов и УФ-поглощающих пигментов. Уровень окислительного стресса оценивали по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), а также по образованию H_2O_2 с помощью метода биолюминесценции. Выделение этилена изучали в экспериментах с хлореллой *Chlorella pyrenoidosa* Pringh 82Т. Содержание свободных фитогормонов цитокининов, гиббереллинов и АБК определяли с помощью иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. XXX и XX повышают устойчивость ФА к УФ-радиации и тепловому стрессу

XXX является ретардантом, который используется в растениеводстве. Вместе со своим аналогом XX он защищает растения от негативного действия абиотических стрессов (Grossmann, 1992; Пруссакова и др., 1993; Fletcher et al., 2000; Sheng et al., 2006; Zhao et al., 2007). Однако, мало известно о том, как предобработка этими соединениями влияет на стресс-устойчивость ФА.

Влияние XX и XXX на рост, активность ФА и содержание пигментов на уровне клетки (микроводоросли) и целого растения. Механизмы развития стресс-устойчивости и адаптации фотосинтезирующих организмов во многом определяются влиянием регуляторов роста на ФА, состав фотосинтетических пигментов, гормонально-ингибиторный баланс и, в конечном итоге, на рост этих организмов. Нами было изучено влияние XX на рост, активность ФА и пигментный состав клеток *Chlamydomonas reinhardtii* в 5 и 10-дн. культурах. При [XX]>1 мМ обнаружено уменьшение фотосинтетического выделения O₂, активности ФС2, содержания хлорофилла и скорости деления клеток, что, вероятно, связано с деструкцией мембран хлоропластов, индуцированной присутствием XX (рис. 1). Отсюда был сделан вывод, что ретардантное действие XX на клетки *Chlamydomonas* сопровождается развитием в них слабого окислительного стресса.

В высших растениях обработка XXX и XX также вызывала развитие слабого окислительного стресса и ретардантные эффекты. В результате обработки наблюдалось заметное уменьшение высоты растений фасоли, а также площади и сырого веса листьев, тогда как сухой вес листьев возрастал (табл. 1). При низкой концентрации XXX (0.08 мМ) ретардантные эффекты практически не наблюдали.

Обработка растений фасоли и пшеницы XXX и XX приводила к увеличению содержания в листьях фотосинтетических и УФ-поглощающих пигментов (табл. 1 и 2). По-видимому, рост этих показателей является следствием усиленного синтеза хлорофилла (Sankhla et al., 1985; Kobzar et al., 1999) и более высокой плотности хлоропластов на единицу площади листа (Khalil, 1995).

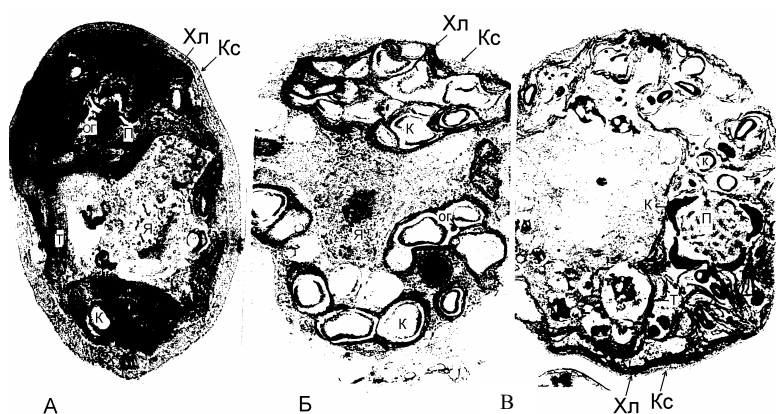


Рис. 1. Влияние обработки XX на структуру клеток *Chlamydomonas reinhardtii*. Электронные микрофотографии клеток, выращенных без (А) и в присутствии 1.7 и 17 мМ XX (Б и В, соответственно) в течение 10 сут. Кс – клеточная стенка, Хл – хлоропласт, К – крахмал, П – пиреноид, ОГ – осмиофильная глобула, Е – тилакоиды, Я – ядро (Ладыгин и др., 2001).

Ретардантное действие XXX также обнаружено при листовой обработке растений фасоли (0.1-1% XXX) и обработки семян пшеницы (0.5-1% XXX).

Было исследовано влияние предобработки растений XXX и XX на устойчивость ФА настоящих листьев растений фасоли к УФ-В-облучению и кратковременному нагреванию (Kreslavski et al., 2001), а также на устойчивость к УФ-С препаратов тилакоидных мембран (ПТМ), выделенных из листьев предобработанных растений

(рис. 2). После тепловой обработки растений (43°C, 6 мин) активность ФС2 падала, затем постепенно восстанавливалась в течение 2-3 суток. В то же время в ХХХ-обработанных растениях, как первичная теплоустойчивость, так и скорость восстановления активности ФС2 были выше. Аналогичные данные о защитном действии ХХ на ФА растений огурца, подвергнутых действию низких температур,

Таблица 1. Влияние обработки ХХ и ХХХ, а также УФ-В (УФ) на содержание Хл ($a+b$), каротиноидов (Кар), пигментов, поглощающих УФ (ППУ), площадь (Пл.) и относительное содержание сухого вещества настоящих листьев (СВЛ) 11-дн. растений фасоли. ХХХ или ХХ в конечных концентрациях 1.6 мМ и 19 мМ, соответственно, вносили с питательным раствором. Отделенные листья подвергали УФ-облучению, затем определяли СВЛ и площадь листьев, а через 48 ч выдерживания в темноте анализировали на содержание пигментов ($\pm SE$; $n=3$). ЕОП – единицы оптич. плотн. при $\lambda_m=327$ нм (Kreslavski et al., 2001).

Параметр	Варианты обработки фасоли					
	Контроль	УФ	ХХХ	ХХХ+УФ	ХХ	ХХ+УФ
Хл ($a+b$), мг г ⁻¹ с.в.	1.10 (0.04)	0.89 (0.05)	1.27 (0.04)	1.05 (0.035)*	0.98 (0.04)*	0.83 (0.03)
Кар, мкг г ⁻¹ с.в.	156 (11)	124 (10)*	184 (19)*	161 (12)**	143 (8)*	111(7)
ППУ, ЕОП г ⁻¹	0.86 (0.06)	1.06 (0.08)	1.26 (0.10)	1.27 (0.10)	1.10 (0.08)	1.14 (0.07)
Пл., см ²	23.0 (4.0)	22.0 (3.0)*	9.5 (1.4)	10.0 (1.6)	15.5 (3)	-
СВЛ, %	8.8 (0.5)	8.9 (0.5)*	10.0 (0.6)	9.6 (0.7)	9.2 (0.6)*	-

*- незначительная разница между контролем и опытом ($p>0.05$).

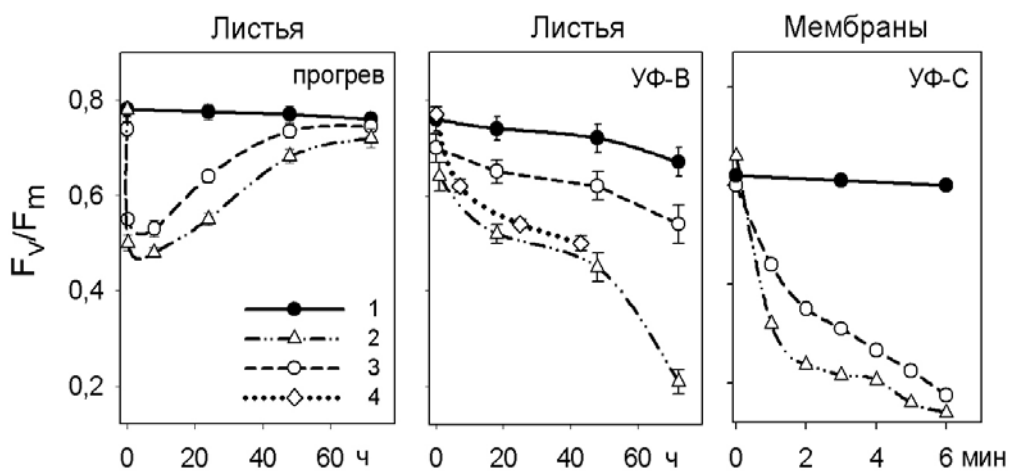


Рис. 2. Влияние ХХХ, ХХ и разных стрессоров на активность ФС2.

Проростки фасоли нагревали при 40°C (20 мин) или облучали УФ-В. ПТМ из листьев проростков облучали УФ-С.

1-без обработок, 2-без предобработки ХСС, 3 и 4- предобработка ХСС. Варианты: 0.6%ХХХ→прогрев; 0.04%ХХХ (3) или 0.002%ХХХ(4)→УФ-В; 0.6%ХХ→УФ-С.

были получены в работе (Sheng et al., 2006). УФ-облучение листьев фасоли также приводило к снижению активности ФС2, которое заметно усиливалось в процессе выдерживания отделенных листьев в темноте, тогда как в предобработанных ХХХ растениях снижение активности ФС2 было значительно меньше (рис. 2).

Таблица 2. Влияние обработки ХХХ (0.75%) на содержание хлорофилла, каротиноидов и ППУ (преимущественно флавоноиды) в листьях 10-дн. растений пшеницы. Разница между опытом и контролем во всех вариантах достоверна ($p < 0.05$) (Креславский и др., 2010б).

Параметр	Контроль	ХХХ	
	абс. единицы	абс. единицы	% к контролю
Хл ($a+b$), мг г ⁻¹ с.в.	1.9 (0.1)	2.5 (0.1)	132
Кар, мг г ⁻¹ с.в.	0.45 (0.02)	0.58 (0.03)	129
ППУ, ЕОП г ⁻¹	0.58 (0.014)	0.65 (0.013)	112

Мы предположили, что одной из ключевых причин защитного действия ХХ и ХХХ является стабилизация тилакоидных мембран и сохранение их целостности в условиях окислительного стресса. Действительно, устойчивость ПТМ, выделенных из листьев обработанных ХХ растений фасоли, к облучению УФ-С была выше устойчивости ПТМ из контрольных растений (рис. 2).

Относительная максимальная амплитуда медленной компоненты ЗФл также падала после термообработки, а на свету вновь восстанавливалась, причем у ХХХ-обработанных растений фасоли восстановление шло быстрее, чем у необработанных (рис. 3). ЗФл связана с обратной рекомбинацией зарядов в ФС2, а ее медленная компонента в основном отражает изменения ΔpH на тилакоидных мембранах (Bigler, Schreiber, 1990). Таким образом, обработка растений ХСС приводит к меньшему снижению и более быстрому восстановлению фотохимической активности ФС2, как ее квантовой эффективности, так и свето-индуцированной величины ΔpH .

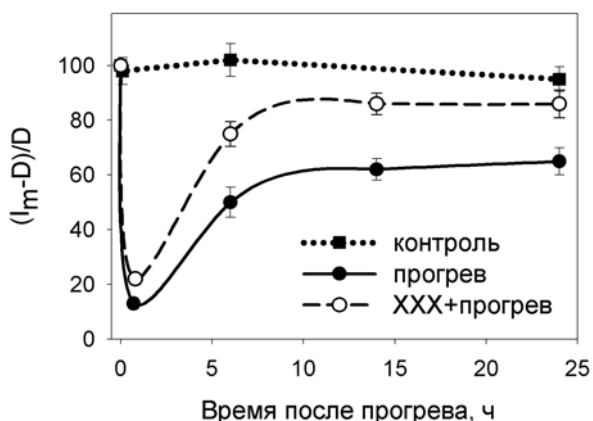


Рис. 3. Влияние листовой предобработки ХХХ (0.6%) на медленную компоненту ЗФл проростков фасоли, подвергнутых тепловому стрессу при 43°C (6 мин). Через 2 сут. после обработки проростки прогревали и экспонировали на свету (30 $\mu E m^{-2} c^{-1}$) в течение 24 ч.

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния замачивания семян пшеницы в 0.5-1% ХХХ или 5% ХХ на первичную теплоустойчивость ФС2 и на скорость пост-стрессового свето-индуцированного восстановления активности фотосинтеза в первых листьях пшеницы (Креславский и др., 2010б). В обработанных таким образом проростках пшеницы наблюдали повышение первичной теплоустойчивости препаратов мембран тилакоидов, выделенных из листьев обработанных растений (табл. 3). Снижение активности ЭТЦ было значительно ниже в препаратах из растений, обработанных ХХХ.

В литературе (Bode, Wild, 1984) высказано предположение о том, что в листьях растений пшеницы, обработанных ХХХ, развивается окислительный стресс, подобный стрессу при засухе. Эта идея нашла подтверждение в опытах с нативными листьями фасоли, обработанными ХХХ. Согласно нашим данным при концентрации ХХХ, вызывающей заметный ретардантный эффект (0.75%), наблюдали снижение активности ФС2, увеличение темнового дыхания и содержания H_2O_2 (рис. 4). При этом теплоустойчивость ФА листьев через 1.5-4 суток была заметно повышена, а транзитное повышение уровня H_2O_2 , предшествовало снижению активности ФС 2 и увеличению теплоустойчивости ФА.

Действие ХХХ и ХХ на активность антиоксидантных ферментов и уровень низкомолекулярных антиоксидантов. Известно, что развитие умеренного окислительного стресса в растениях обычно сопровождается повышением активности ключевых антиоксидантных ферментов (Mittler, 2002). Действительно, активности

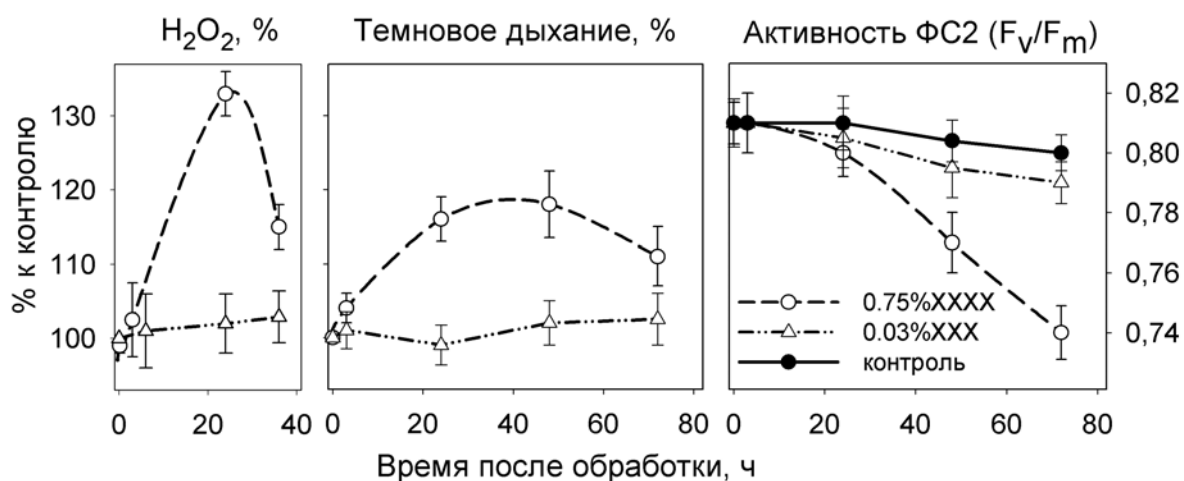


Рис. 4. Динамика изменения пула H_2O_2 , темнового дыхания и фотохимической активности ФС2 в листьях 10-дн. фасоли после листовой обработки ХХХ (0.03% и 0.75%).

СОД, АсП и ГР, определенные в листьях, СОД и пероксидазы - в препаратах тилакоидных мембран, были выше в предобработанных ХХ или ХХХ растениях, по сравнению с контрольными (табл. 4 и 5). Более того, повышенная активность ферментов сохранялась и после развития окислительного стресса, вызванного УФ-радиацией (Kreslavski et al., 2001).

На основе полученных данных можно заключить, что антиоксидантная активность в хлоропластах из листьев обработанных растений выше, чем в контрольных. Это происходит за счет повышенной активности пероксидаз, СОД и других антиоксидантных ферментов, а также вследствие увеличения содержания каротиноидов и УФ-поглощающих пигментов, которые с одной стороны играют роль внутреннего фильтра при УФ-облучении, с другой стороны являются антиоксидантами (Cuttriss, Pogson, 2004). Защитное действие этих пигментов и

повышение уровня антиоксидантной активности объясняют также повышенную стресс-устойчивость ФС2 в препаратах тилакоидных мембран, выделенных из листьев растений, обработанных ХСС по сравнению с необработанными.

Таблица 3. Влияние обработки растений ХХХ (0.75%) на теплоустойчивость препаратов тилакоидных мембран, выделенных из листьев 11-дн. растений пшеницы. Активность ЭТЦ определяли путем восстановления дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). Устойчивость оценивали как отношение активностей после прогрева при 40°C в течение 5 мин и до прогрева (%) (n=3) (Креславский и др., 2010б).

Вариант	+20°C	+41°C, 5 мин.	Отношение активностей
Контроль	100	70±4	0.70±4
ХХХ	75±5	69±6	0.92±5

Таблица 4. Влияние обработки ХХХ (1.6 мМ) и УФ-В на активность антиоксидантных ферментов (СОД, АсП и ГР), а также на содержание абсцизовой кислоты (АБК), гиббереллинов (ГК₁-подобных веществ) и цитокининов (З+ЗР), (пмоль/г сырого веса) в листьях 11-дн. растений фасоли. Активности ферментов даны на 1 г белка. Условия выращивания и обработки как в табл. 1 (n=2) (Kreslavski et al., 2001).

Параметр	Контроль	УФ-В	ХХХ	ХХХ+УФ
СОД, % к контролю	100 (5)	237 (14)	130 (9)	254 (20)
АсП, % к контролю	100 (9)	126 (7)*	122 (8)*	140 (7)
ГР, % к контролю	100 (8)	130 (7)	135 (7)	178 (7)
АБК, пмоль г ⁻¹	72 (7)	50 (4)	154 (20)	60 (5)
Гибб., пмоль г ⁻¹	0.91 (0.02)	0.57 (0.03)	0.34 (0.05)	0.23 (0.01)
Цит., пмоль г ⁻¹	0.33 (0.01)	0.32 (0.02)	0.46 (0.01)	0.43 (0.02)

* незначительная разница между контролем и вариантами ХХХ и УФ-В (p>0.05).

Таблица 5. Влияние обработки ХХ (0.6%) на активность СОД и пероксидазы в препаратах тилакоидных мембран, выделенных из листьев 11-дн. растений фасоли. Активность рассчитывали на 1 г белка. Условия выращивания и обработки, как в табл. 1.

Параметр	ХХ, % к контролю
СОД	120 (7)
Пероксидаза	234 (22)

Повышенная активность антиоксидантных ферментов в ХСС-обработанных растениях может проявляться в быстром и более существенном усилении антиоксидантной активности в ответ на действие стрессора. В этой связи было изучено влияние ХХХ и тепловой предобработки на активность ферментов гваякол-

зависимой (ГЗ) пероксидазы и АсП, определенных в первых листьях растений пшеницы после теплового стресса при 40°C (рис. 5). В результате нагревания обнаружен более быстрый рост активности АсП и ГЗ пероксидазы в листьях ХХХ-предобработанных, а также закаленных тепловой предобработкой растений по сравнению с контрольными, необработанными растениями. В обработанных вариантах впоследствии наблюдалось и более быстрое снижение активности ферментов, что свидетельствует о большей эффективности антиоксидантной системы в листьях обработанных растений, что в значительной степени определяет повышенную теплоустойчивость ФА (рис. 2, 3 и 5).

Известно, что в ряде случаев увеличение уровня цитокининов (Чернядьев, 1997, 2005) и АБК (Liu, Huang, 2002; Таланова, 2009) дает вклад в увеличение стресс-устойчивости растений, в частности засухоустойчивости

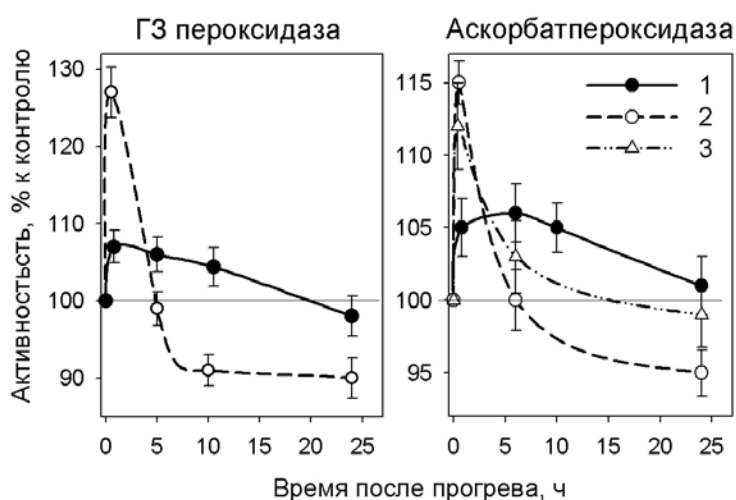


Рис. 5. Влияние предобработки ХХХ (0.75%) или закаливания при 40°C (20 мин) на изменение активности ГЗ пероксидазы и АсП в листьях 10-дн. проростков пшеницы, подвергнутых теплового стрессу (40°C, 20 мин): 1 – прогрев; 2 – ХХХ+прогрев; 3 – закаливание +прогрев. Для закаливания после первичного прогрева при 40°C растения выдерживали на свету 24 ч (Креславский и др., 2010б).

и термоустойчивости. Было изучено влияние ХХХ на содержание АБК, цитокининов и гиббереллинов в настоящих листьях фасоли, облученных УФ-В (табл. 4). Содержание АБК и цитокининов в листьях проростков, обработанных ХХХ, было выше, а уровень гиббереллинов ниже, чем в необработанных, эта тенденция сохранялась и во время УФ-облучения. При низкой концентрации ХХХ (0.08 мМ) увеличение содержания АБК и повышение устойчивости к УФ-В не наблюдали (рис. 2). Повышенное содержание АБК и цитокининов в листьях обработанных растений может отчасти объяснять повышенную устойчивость ФС2 этих растений к УФ-облучению и высокой температуре.

Предполагается, что накопление АБК является одним из триггерных механизмов формирования повышенной стресс-устойчивости растений, в частности теплоустойчивости (Титов и др., 2006), хотя конкретные механизмы функционирования АБК пока неясны (Larkindale, Huang, 2004). Возможно, что повышение содержания АБК приводит к индукции образования АФК (Hung et al., 2005; Nu et al., 2006) и специфических для АБК стрессовых белков (Шакирова, 2001).

Снижение фотосинтетической активности и повышение антиоксидантной активности в препаратах тилакоидных мембран – все это признаки окислительного стресса, развивающегося в хлоропластах. Эксперименты с обработкой листьев ХХХ (0.1-1%) и прямое определение уровня H_2O_2 в листьях (рис. 4) показали, что повышению стресс-устойчивости ФА через 1.5-4 суток после предобработки предшествует усиленное образование H_2O_2 (burst) и рост темнового дыхания. По-видимому, предобработка ХХХ или ХХ приводит к генерации АФК, которые активируют антиоксидантную систему, что приводит клетку в состояние с повышенной стресс-устойчивостью ФА. Мы предлагаем следующую схему повышения стресс-устойчивости ФА при действии ХСС на растения: ХХХ(ХХ) → АБК/ H_2O_2 (окислительный стресс) → сигнальные белки → повышенный синтез белков и низкомолекулярных соединений, участвующих в стресс-защитных реакциях → повышение стресс-устойчивости ФА (Kreslavski et al., 2001; Креславский и др., 2007а; Sheng et al., 2006; Креславский и др., 2010б).

Повышенная устойчивость ФА растений, обработанных ХХХ или ХХ, к нагреванию и УФ-облучению может объясняться увеличением активности антиоксидантных ферментов, а также пула низкомолекулярных антиоксидантов (Kreslavski et al., 2001; Sheng et al., 2006), которое, по нашим данным, инициируется образованием H_2O_2 и/или, возможно, АБК. Накопление осмотически активных веществ, к которым относятся продукты разложения ХХХ и ХХ - бетаин и пролин (Sheng et al., 2006), также может вносить вклад в повышение стресс-устойчивости ФА.

2. Предоблучение красным светом повышает устойчивость ФА к УФ-радиации

Известно, что УФ излучение повреждает различные молекулы мишени и системы ФА, особенно ФС2, прежде всего такие компоненты как Q_A , Q_B , PQ и белок D1 (Kollí et al., 1998; Babu et al., 1999). С другой стороны, УФ-радиация активирует различные защитные системы ФА, усиливает синтез фотозащитных соединений, поглощающих УФ. При этом возрастает активность и/или синтез антиоксидантных ферментов, и происходит накопление низкомолекулярных антиоксидантов (Strid et al., 1994; Häder et al., 2003; Соловченко, Мерзляк, 2008). Важную роль в фотозащите ФА от УФ-радиации и/или в процессах фотореактивации может играть видимый свет низкой интенсивности, в частности, в синей (Han et al., 2001; Häder et al., 2003) и красной области спектра (Joshi et al., 1991; Biswal et al., 2003), которые могут действовать через фоторецепторы синего света – криптохромы и фототропины) и красного света - фитохромы. Предполагается, что КС индуцирует переход фитохрома в физиологически активную форму ($Ph_{дк}$), которая поддерживает структуру и активность хлоропластов во время старения листьев, а также предохраняет Хл от деградации (Joshi et al., 1991; Lingakumar, Kulandaivelu, 1993; Biswal et al., 2003). Вместе с тем имеется мало данных и теоретических разработок о том, как

формируются механизмы защитного действия КС против УФ-индуцированного ингибирования фотосинтеза, такие фоторецепторы и сигнальные интермедиаты, а также стресс-защитные системы ФА, такие как антиоксидантная, участвуют в процессе формирования и регуляции защитных механизмов.

Одним из важнейших фоторецепторов КС является фитохром, который является, прежде всего, датчиком качества света (Smith, 1986). Роль этого фоторецептора больше всего исследована в «классических» фитохром-контролируемых реакциях. В этом случае при последовательном облучении КС с $\lambda_{\text{max}}=660$ нм (5-10 мин), затем ДКС с $\lambda_{\text{max}}=730$ нм (5-10 мин), регуляторные эффекты КС снимаются (Kendrick, Kronenberg, 1994).

Предоблучение КС защищает фотосинтетические пигменты от УФ-индуцированной дегградации. Известно, что в листьях растений, помещенных в темноту, может наблюдаться старение (Biswal, Biswal, 1984; Biswal et al., 2003), которое проявляется в постепенной потере Хл и белков. Как УФ-В, так и УФ-А могут ускорять, а КС и/или синий свет замедлять старение листьев (Biswal et al., 2003). Однако, механизм действия КС во многом не ясен.

Роль Фх и возможных интермедиатов защитного действия КС была изучена на двух основных объектах - отделенных настоящих и нативных семядольных листьях, которые часто используются для исследования старения. При длительном выдерживании растений салата в темноте (>2 сут.) наблюдали старение листьев, которое проявлялось в постепенной дегградации Хл ($a+v$) и каротиноидов. Облучение растений УФ приводило к более быстрой дегградации пигментов в темноте, особенно у растений, выращенных на слабом свете (табл. 6). При предоблучении проростков КС ($\lambda_{\text{м}}=660$ нм, 8 мин) наблюдали частичное снижение скорости дегградации пигментов, которую вызывало УФ-облучение (рис. 6), тогда как сам по себе КС (без УФ) оказывал незначительное влияние. Последующее облучение листьев ДКС ($\lambda_{\text{м}}=730$ нм) полностью снимало защитное действие КС (табл. 6), что свидетельствует об участии Фх в качестве фоторецептора. Вес семядольных листьев снижался после УФ-А-облучения, но потери веса были ниже при предоблучении КС (КС→УФ), что указывает на интегральное развитие окислительного стресса в листьях, облученных УФ, и меньший уровень стресса в листьях, предоблученных КС. На другом объекте исследований - отделенных листьях шпината, при более длительном КС-облучении (2 ч) обнаружены аналогичные закономерности: предоблучение листьев КС уменьшало потери Хл и каротиноидов.

Считается, что важную роль в процессе дегградации Хл в листьях играют протеолитические ферменты (Pjon et al., 1992), а образование некоторых АФК, по-видимому, индуцирует их синтез. Следовательно, УФ-облучение, индуцирующее образование АФК, может приводить к усилению дегградации фотосинтетических

пигментов. Обнаруженное нами повышение антиоксидантной активности в листьях растений, предоблученных КС, наоборот, вероятно, обеспечивает защиту Хл от дегградации (Креславский и др., 2009).

Пигменты, поглощающие УФ. В зависимости от световых условий выращивания и дозы УФ-облучение приводило как к увеличению, так и уменьшению содержания пигментов, поглощающих УФ (ППУ) в листьях салата и шпината. Эти пигменты являются преимущественно флавоноидами (Mirecki, Teramura, 1984). Предобработка КС приводила к возрастанию уровня ППУ (табл. 6), вероятно, вследствие КС-индуцированного их синтеза. Вывод согласуется с ростом пула ППУ в листьях, облученных одним только КС, которое проявляется после некоторой лаг-фазы.

Таблица 6. Действие предоблучения КС и ДКС, а также УФ-А на содержание (на 1 г сырого веса) фотосинтетических пигментов и пигментов, поглощающих УФ (ППУ), а также сырой вес пары семядольных листьев 10-дн. растений салата, выращенных при разной интенсивности света. Все параметры определяли после облучения растений и выдерживания их в темноте (Т) в течение 2 или 26 ч. [Хл (a+b)] составляла в контроле для № 2, № 3, № 4 – 0.4, 0.5 и 0.7 мг г⁻¹, соответственно. ППУ определяли в единицах оптической плотности. Время УФ экспозиции – 50 и 100 мин (Креславский и др., 2009).

№ оп.	Инт. света, Вт м ⁻²	Экспоз. УФ-А, мин	Т, ч	Параметры	УФ-А	КС→УФ*	КС→ДКС→УФ
1	0.5	50	2	Каротиноиды	97.5 (2.0)*	98.0 (2.0)	-
				Хл (a+b)	96.5 (3.0)*	97.0(3.0)	-
2	0.5	50	26	Сырой вес	95.5 (1.0)	100 (0.5)	98.0 (0.08)*
				Каротиноиды	83.5 (3.1)	97.5 (2.5)	86.0 (2.6)
				Хл (a+b)	82.5 (3.2)	96.0 (3.6)	84.0 (2.3)
3	1.5	50	26	Каротиноиды	89.0 (2.1)	101.0 (2.5)	-
				Хл (a+b)	91.5 (1.5)	100.1 (1.5)	-
				ППУ	97.0 (2.0)	106.0 (2.0)	
4	10	100	26	Каротиноиды	93.0 (1.6)	100.0 (1.7)	
				Хл (a+b)	92.0 (1.3)	99.0 (1.2)	-

*- недостоверная разница между опытом и контролем (p>0.05). Во всех вариантах нет разницы между контролем и (КС→УФ).

Фотосинтетическая активность. В наших (Кобзарь и др., 1997,1999; Kobzar et al., 1998; Креславский и др., 2004а, 2009) и других работах (Lingakumar, Kulandaivelu, 1993; Bossalandro et al., 2001; Biswal et al., 2003; Константинова и др., 2004) показано,

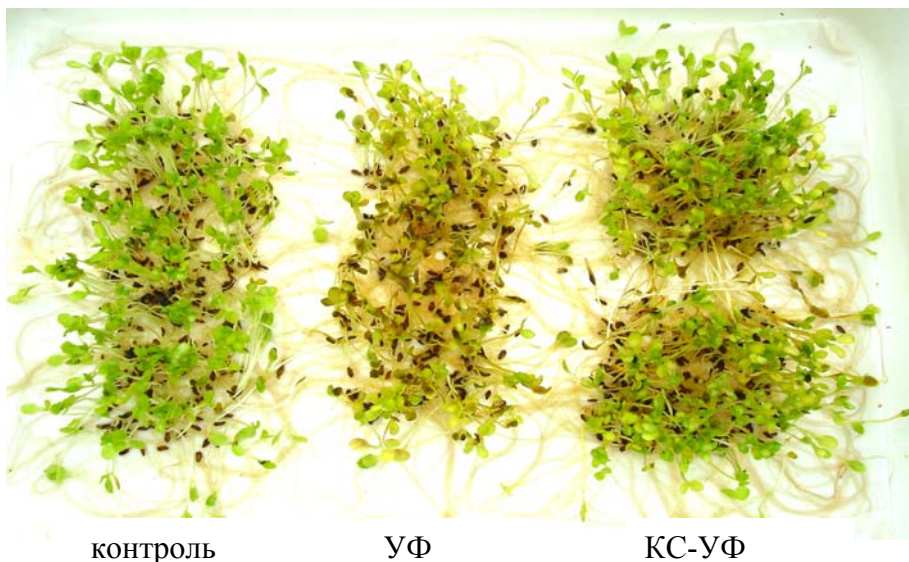


Рис. 6. Фотографии 8-дн. растений салата, предоблученных КС, затем УФ-А, или только УФ-А, выдержанных в темноте в течение 5 сут. Исходно до обработок $F_v/F_0=3.5\pm 0.1$. Через 5 сут. отношение F_v/F_0 снижалось до 3.0 ± 0.2 в контроле и в варианте КС→УФ, и до 1.5 ± 0.3 в варианте УФ.

что КС низкой интенсивности

модифицирует действие УФ-радиации на рост, фотосинтез и накопление хлорофилла. Однако неясно, как развивается защитное действие КС, какие сигнальные интермедиаты участвуют в формировании повышенной устойчивости ФА к УФ-радиации. Для решения этой задачи были проведены эксперименты по исследованию действия УФ-радиации на фотосинтетическую активность и развитие окислительного стресса в листьях салата и в отделенных листьях шпината, фасоли и рябины, а также по изучению защитного действия предоблучения КС. В результате облучения листьев УФ-А/В и последующего их выдерживания в темноте наблюдали ингибирование активности ФС2 (рис. 7, 8) и усиление перекисного окисления липидов (см. диссертацию). Наиболее существенно снижалась после УФ-облучения относительная амплитуда быстрой (~100 мс) компоненты ЗФл (рис. 7), которая отражает активность электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 (Lambrev, Golstev, 1999).

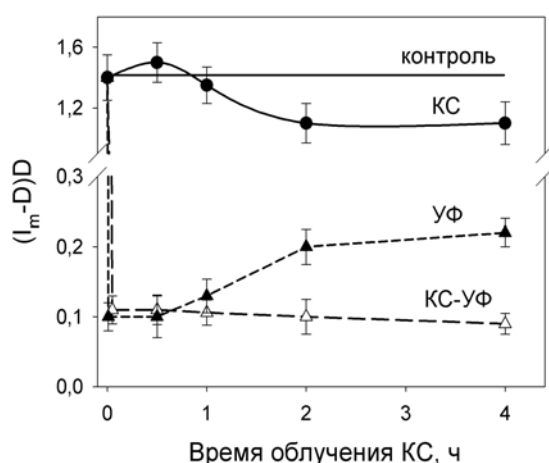


Рис. 7. Влияние облучения КС на амплитуду быстрой компоненты ЗФл (I_m-D)/D в отделенных листьях шпината. Отделенные листья облучали КС в течение 0; 0.5; 1; 2; 4 ч (КС). После каждого указанного промежутка времени часть листьев, облученных КС, подвергали УФ-А-облучению (КС+УФ). Другую часть облучали только УФ, без КС предоблучения (УФ). Контроль – без облучений.

Защитное действие КС проявлялось через 1-2 ч и выражалось в меньшем снижении этой компоненты в УФ-облученных листьях.

Обнаружено два типа защитного действия КС при действии УФ-радиации: один тип реакций (Креславский и др., 2001, 2004а) наблюдали при относительно длительном (>1 ч) облучении и умеренных дозах КС (~0.3-2 Дж см⁻²) (рис. 8, 9). Предоблучение

КС (КС→УФ) частично снимало ингибирующее действие УФ, а последующее облучение ДКС, в свою очередь, снимало эффект КС.

Само облучение КС вызывало снижение быстрой (рис. 7, 8) и медленной компоненты ЗФл. Эти изменения наблюдались не менее, чем через 1 ч после облучения листьев КС вследствие, как мы предполагаем, транзитного повышения пула H_2O_2 в КС-облученных листьях с максимумом через 0.5 ч (рис. 9).

Другой тип защитных реакций изучен на нативных семядольных листьях салата при кратковременном облучении (5-10 мин) и низкой дозе (0.05 Дж см^{-2}) КС (рис. 10).

В экспериментах было обнаружено УФ-индуцированное снижение скорости (P_n) и эффективности $(F_m - F_s)/F_s$, где F_s – стационарный уровень флуоресценции, фотосинтеза и защитное действие КС. Частичная обратимость эффекта КС при последующем облучении ДКС и низкая интенсивность ($1-2 \text{ Вт м}^{-2}$) свидетельствуют

Рис. 8. Влияние световых предобработок (КС и КС→ДКС) и облучения УФ-А отделенных листьев шпината на активность ФС2, измеренную после 24 ч выдерживания листьев в темноте. Варианты облучения: УФ-А (40 мин) (УФ), КС (2 ч), КС→УФ, а также КС→ДКС→УФ. Контроль (К) необлученные листья.

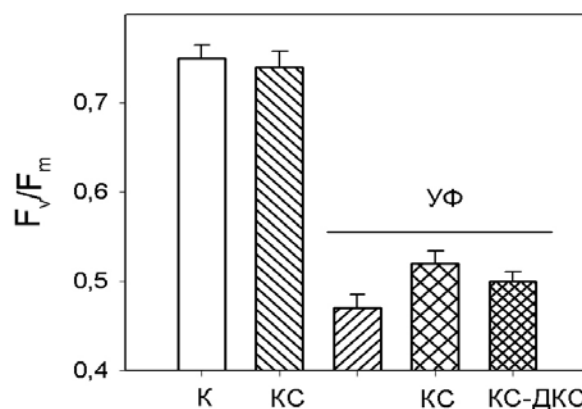
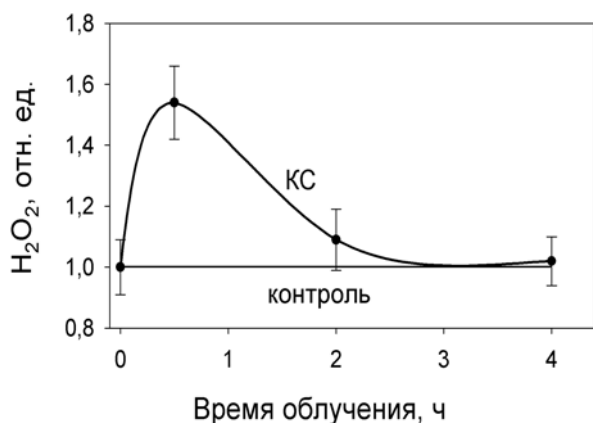


Рис. 9. Влияние облучения КС (2 ч, 1.5 Вт м^{-2} , 660 нм) на содержание H_2O_2 в отделенных листьях шпината. Контроль – необлученные листья.

о проявлении классической КС/ДКС обратимой низкоэнергетической реакции, свойственной обычно фотостабильному ФхВ (Креславский, Аллаhverдиев, 2006).

Защитное действие КС, оцененное по изменению быстрой компоненты ЗФл в листьях шпината при относительно высоких дозах ($\sim 0.3-3 \text{ Дж см}^{-2}$), не наблюдалось в присутствии ингибитора белкового синтеза линкомицина (0.4 мМ) (см. диссертацию). Отсюда следует, что синтез *de novo* белков играет определенную роль в защитном действии предоблучения.

Предоблучение при тех же дозах другими длинами волн ($\lambda_m=540$ и $570, 690$, и 730 нм) не приводило к заметному проявлению защитного эффекта при действии УФ-А-

радиации. Это согласуется с участием в защитном действии предоблучения активной формы фитохрома, предположительно, ФхВ.

Было также изучено УФ-защитное действие КС при одновременном облучении листьев КС и УФ-радиацией. И в этом случае КС частично снимал индуцированное УФ ингибирование активности ФС2, что предполагает комплексное влияние КС в защите ФА. Защитное действие КС было наиболее выражено после достаточно длительной темновой экспозиции растений до облучений, что, вероятно, связано с уменьшением % Фх_{ДК} в этих условиях.

Роль фитогормонов в защитном действии КС. На основании полученных данных по световой регуляции роста хлореллы и выделения этилена в клеточной суспензии было высказано предположение, что Фх-подобный фоторецептор регулирует рост хлореллы и образование этилена (Креславский и др., 1988, 1989; Kreslavski et al., 1997). При этом наблюдали увеличение уровня этилена при действии КС (10-30 мин)

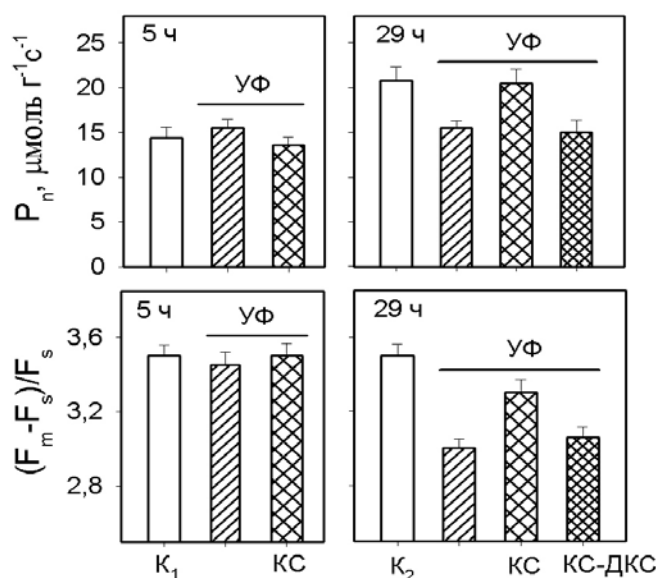


Рис. 10. Влияние предоблучения 10-дн. растений салата КС (660 нм), а также КС и ДКС (по 8 мин) по схеме КС→ДКС→УФ на УФ-А-индуцированное снижение нетто-фотосинтеза P_n , и отношение $(F_m - F_s)/F_s$. Растения, выдержанные в темноте 16 ч, облучали и вновь выдерживали в темноте 5 или 29 ч (Креславский и др., 2009).

и снятие этого эффекта последующим облучением ДКС (рис. 11), что свойственно низкоэнергетическим

процессам, контролируемым ФхВ. На основании литературных (Møller et al., 2002) и наших данных по регуляции выделения этилена экзогенными фитогормонами (Креславский и др., 1988) высказано предположение, что как Фх_{ДК}, так и эндогенные цитокинины играют роль интермедиатов, через которые реализуется влияние КС и ДКС на выделение этилена. Это также согласуется с обнаруженной корреляцией между относительным уровнем Фх_{ДК} и уровнем цитокининов, образующихся в листьях пшеницы в процессе их зеленения (Креславский и др., 2004б; Kreslavski et al., 2005). Вероятно, одним из путей влияния на клетку КС (при исходно низком пуле Фх_{ДК}) является повышение пула Фх_{ДК}, что приводит к изменению гормонального баланса.

Роль соотношения про-/антиоксидантов в защитном действии КС. Изменение про-/антиоксидантного равновесия является одним из неспецифических признаков

стрессовой реакции (Веселова и др., 1993), в частности при УФ-облучении (Frohnmeier, Staiger, 2003). Помимо этого, в настоящее время высказывается предположение о том, что это соотношение является также инструментом, с помощью которого клетка может регулировать многие процессы роста и адаптации (Dat et al., 2000; Pastori, Foyer, 2002), а также реагировать на действие некоторых экзогенных фитогормонов (Dat et al., 1998; Pei et al., 2000). Мы попытались связать обнаруженные защитные эффекты КС с индукцией синтеза антиоксидантных ферментов, которые часто служат важным звеном в нейтрализации окислительного стресса в растениях (Allen, 1995).

Одним из ключевых антиоксидантных ферментов при УФ-индуцированном окислительном стрессе является пероксидаза (Rao et al., 1996), которая обладает

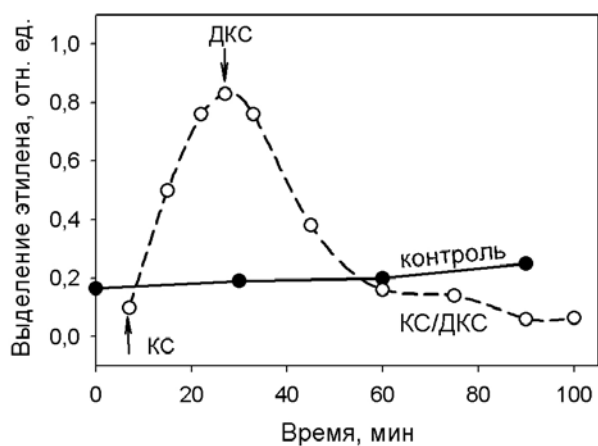


Рис. 11. Влияние КС (1 Вт м^{-2}) с $\lambda_{\text{м}}=660 \text{ нм}$ и последующего ДКС на выделение этилена клетками хлореллы (КС/ДКС). Контроль – без облучения КС и ДКС. Исходная плотность (n_0)= 70.5×10^6 клеток на 1 мл (Креславский и др., 1988; Kreslavski et al., 1997).

широкой субстратной специфичностью и способна катализировать реакции окисления различных органических соединений. Активность пероксидазы также может регулироваться фитохромной системой (Sharma et al., 1976) и УФ. Эти результаты подтверждаются нашими данными по исследованию влияния предоблучения УФ-А и КС на пероксидазную активность в листьях шпината, которая повышалась практически сразу после УФ-облучения (рис. 12). Кроме того, мы наблюдали синергизм в действии КС и УФ, а также частичную обратимость эффекта КС последующим облучением ДКС, что предполагает участие $\text{Фх}_{\text{ДК}}$ в стимулирующем действии КС на пероксидазную активность. Аналогичные закономерности были обнаружены при исследовании пероксидазной активности в препаратах тилакоидных мембран, выделенных из облученных УФ-А, а также из КС-предоблученных листьев салата.

Участие $\text{Фх}_{\text{ДК}}$ в индукции пероксидазной активности также согласуется с нашими данными, полученными на этиолированных 7-8-дн. проростках пшеницы. После их предоблучения КС с $\lambda_{\text{макс}}=660 \text{ нм}$ (7,5 мин) вслед за лаг-фазой наблюдалось быстрое увеличение пероксидазной активности в листьях, которое было частично обратимо ДКС (Любимов, Креславский, 2008).

Таким образом, нами установлено, что индукция стресс-устойчивости ФА к повреждающему действию УФ связана с активацией Фх в результате предоблучения растений КС с $\lambda_m=625$ и 660 нм, а также с усилением активности антиоксидантной системы, включающей как антиоксидантные ферменты, так и низкомолекулярные антиоксиданты. К последним также относятся УФ-поглощающие фотозащитные пигменты флавоноиды и каротиноиды (Takeuchi, 1996).

Мы предполагаем, что активация пероксидазы и других антиоксидантных ферментов с помощью КС может происходить путем, описанным для трансдукции фитохромного сигнала через активацию факторов транскрипции типа P1F3, обеспечивающих прямую фоторегуляцию экспрессии защитных генов (Креславский и др., 1993; Креславский, Аллахвердиев, 2006) и через транзитное повышение уровня

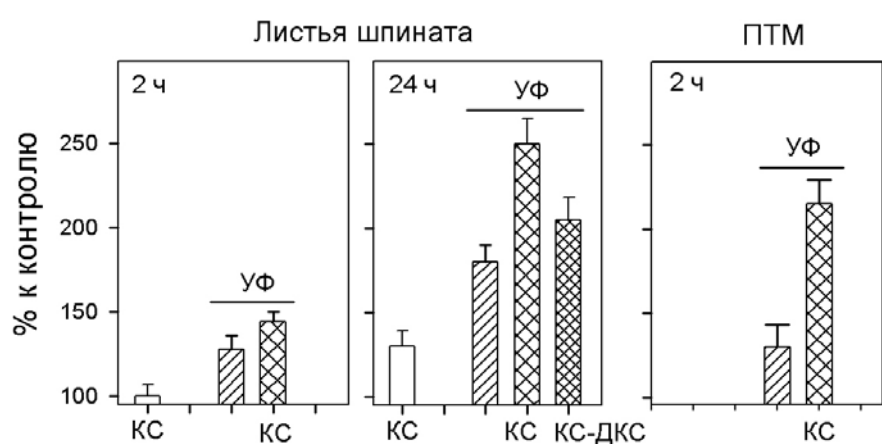


Рис. 12. Эффект предоблучения листьев шпината КС и/или ДКС на пероксидазную активность в отделенных листьях, облученных УФ-А (УФ) и необлученных светом (контроль), а также в препаратах тилакоидных мембран (ПТМ), выделенных из листьев.

свободного Ca^{2+} в

цитозоле. Как при УФ, так и КС облучении активность пероксидазы, может быть повышена за счет усиленного синтеза субстратов пероксидазы, например, фенольных соединений, в частности флавоноидов. Считается, что повышение уровня флавоноидов происходит через свето-индуцированную активацию ФАЛ и халконсинтазы (Gaspar et al., 1982; Wade et al., 2001). При относительно высоких дозах КС при облучении в темноте могут наблюдаться повышение уровня АФК, и активация защитных клеточных систем (Lubart et al., 1997; Саляев и др., 2003). Эти данные согласуются с наблюдаемым нами транзитным, с максимумом образования через 0.5 ч, повышением пула H_2O_2 , которое предшествовало повышению пероксидазной активности и снижению активности ФС2 при длительном предоблучении листьев КС (рис. 9). При высоких дозах КС (>5 Дж $см^{-2}$) наблюдали более значительное снижение активности ФС2 и понижение устойчивости ФС2 к УФ-А-радиации.

Установлено, что образование Фх_{ДКС} сопровождается увеличением уровня стрессового гормона этилена (Kreslavski et al., 1997), а также активности пероксидазы и пула каротиноидов и пигментов, поглощающих УФ (преимущественно флавоноиды), которые защищают ФА от АФК и продуктов ПОЛ (Креславский и др., 2009). По

нашим данным повышенная антиоксидантная активность индуцируется вследствие транзитного увеличения пула H_2O_2 .

На основе полученных данных можно предположить, что в естественных условиях защитное действие видимого света от УФ-излучения, ингибирующего рост и фотосинтез растений, проявляется в значительной степени благодаря поглощению света в области 620-670 нм (КС), которая стимулирует образование активной формы фитохрома. В полуденное время и в солнечный день, когда велика доля УФ-радиации, а отношение КС/ДКС высокое (Музафаров и др., 1995), пул $\Phi_{хДК}$ в листьях высокий, и наблюдается заметная компенсация ингибирующего эффекта УФ-радиации за счет активации Φ_x . В потоке солнечного света, попадающего в листовую тень, а также в условиях облачности отношение КС к ДКС падает с 1.1 до 0.2-0.7 (Weinig et al., 2004) компенсация ингибирующего эффекта не нужна, так как доля УФ мала.

Предоблучение растений КС может приводить к активации антиоксидантных ферментов, но механизм во многом неясен (Sharma et al., 1976; Qi et al., 2000, 2002). В настоящее время все большее признание находит идея свободно-радикальной регуляции синтеза белков (Артюхов и др., 2005). Развивая эту идею, мы предположили, что реализуется следующая схема повышения стресс-устойчивости ФА к УФ-облучению: КС ($\lambda_m=660$ нм) \rightarrow Φ_x \rightarrow $\Phi_{хДК}$ \rightarrow (транзитное повышение содержания Ca^{2+} , АФК и некоторых фитогормонов) \rightarrow повышение активности антиоксидантных ферментов и пула низкомолекулярных антиоксидантов \rightarrow повышенная стресс-устойчивость ФА (рис. 13). По этой схеме, АФК, транзитно образующиеся при действии КС, играют роль сигнальных интермедиатов в формировании повышенной стресс-устойчивости ФА.

Установлено, что повышение пула H_2O_2 происходит даже при облучении листьев умеренными дозами КС и инициирует повышение пероксидазной активности, а также синтез низкомолекулярных антиоксидантов, в частности флавоноидов и каротиноидов (Креславский и др., 2009). При высоких дозах КС, следовательно, высоких уровнях АФК, устойчивость ФА к УФ-А-радиации снижена. Внутриклеточное транзитное возрастание АФК, даже в небольших количествах, может вызвать переход многих факторов транскрипции в активное состояние. Они связываются с соответствующим промоторным участком гена и индуцируют экспрессию генов, кодирующих различные защитные белки.

Повышение стресс-устойчивости ФА при облучении низкими дозами КС необязательно связано с усиленным транзитным образованием АФК. В недавних работах было показано, что после активации кратковременным КС, $\Phi_{хДК}$ переходит из цитозоля в ядро, где с помощью факторов транскрипции прямо взаимодействует со светоактивируемыми генами, вызывая их экспрессию (Quail, 2002, 2006, 2007).

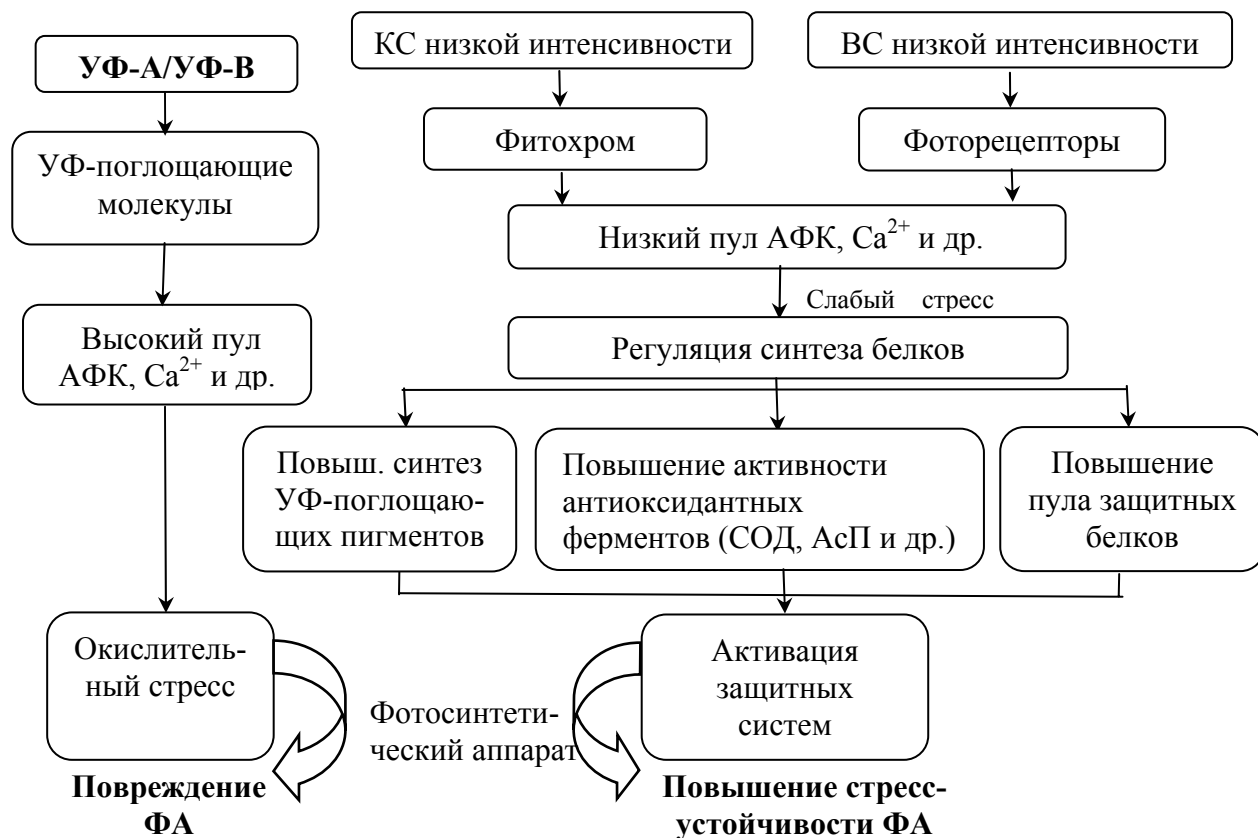


Рис. 13. Общая схема регуляции устойчивости ФА к УФ-облучению как итог предоблучения растений красным светом (КС) и видимым светом (ВС). Стрелки показывают путь трансдукции светового сигнала. Предполагаемые интермедиаты световой сигнализации – АФК, Ca^{2+} , факторы транскрипции и т.д. Схема составлена на основе наших и литературных данных (Hung et al., 2005; Karu, 2008; Kreslavski et al., 2009a; Романов, 2009).

3. Тепловая предобработка повышает устойчивость ФА к повторному тепловому стрессу и фотоингибированию. Факторы, регулирующие устойчивость

Явление «тепловой закалки» — способность к обратимому увеличению устойчивости клеток в ответ на действие высокой, но еще не летальной температуры, является важным адаптивным механизмом (Александров, 1958, 1975, 1995; Титов и др., 2006). Часто тепловое закаливание изучается при достаточно длительном действии повышенных температур и при одновременном освещении (Кислюк и др., 2007, 2008). В этом случае успевают синтезироваться белки *de novo*, и происходит восстановление сниженной во время стресса фотосинтетической активности. Эффекты закаливания исследуются также в результате кратковременного нагревания порядка нескольких минут, когда синтез белков не успевает проявиться (Титов и др., 1987, 2006; Карпец, 2007). Нами был использован несколько другой подход. Было исследовано, как кратковременное нагревание проростков пшеницы при закаливающих температурах (39-42°C) и длительное последующее свето-зависимое восстановление влияют на устойчивость ФА к вторичному тепловому стрессу и фотоингибированию. Важно было понять, как формируется повышенная стресс-

устойчивость ФА, какова роль АФК, а также изменения баланса про-/антиоксидантов и насколько обеспечено энергетически это повышение стресс-устойчивости.

Результаты влияния кратковременного прогрева растений при умеренной температуре (40°C, 20 мин) на устойчивость ФА к последующему тепловому шоку (44°C, 20 мин) представлены на рис. 14. Из них следует, что первичная устойчивость ФА в закаленных растениях меняется незначительно, тогда как свето-зависимое восстановление ФА заметно ускоряется. Этот результат можно объяснить как ускоренной репарацией поврежденной ФС2 и системы фиксации CO₂, так и синтезом белков теплового шока (БТШ). Это согласуется с тем, что БТШ стимулируют восстановление фотосинтеза при тепловом стрессе (Allakhverdiev et al., 2008).

Вероятно, в процессе термоиндуцированного фотоингибирования одной из ключевых реакций является ингибирование образующимися АФК синтеза фотосинтетических белков *de novo* (прежде всего, белка D1), необходимых для восстановления ФС2. Это означает, что большую роль в восстановлении поврежденного ФА играет активность

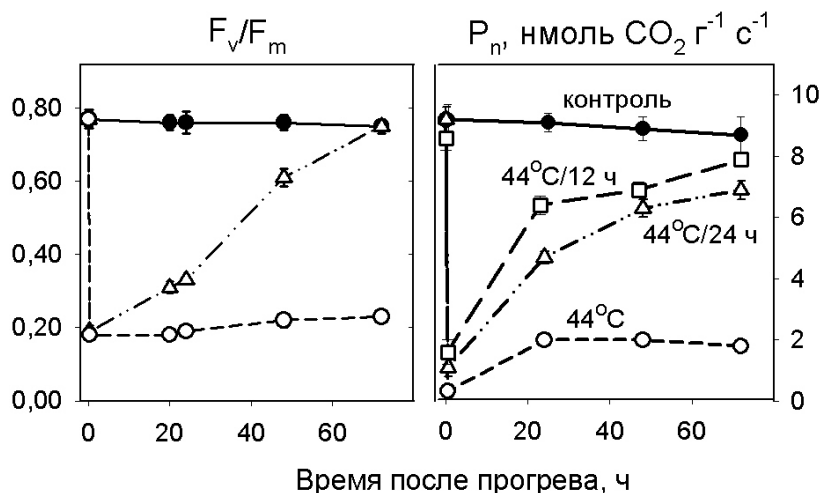


Рис. 14. Влияние тепловой закалки при 40°C (20 мин) и теплового шока при 44°C (20 мин) на активность ФС2 (F_v/F_m) и фотосинтез (P_n). После инкубации на свету в течение 12 или 24 ч, закаленные (44°C(12) и 44°C(24)) и незакаленные растения подвергали (44°C) или не подвергали (контроль) тепловому шоку и инкубировали на свету.

антиоксидантных ферментов, а также содержание низкомолекулярных антиоксидантов и осмолитов, таких как пролин и глицинбетаин, снижающих уровень АФК (Mamedov et al., 1993; Allakhverdiev et al., 1996, 2007; Khan et al., 2009). Содержание этих антиоксидантов можно также увеличить экзогенным путем, например, обрабатывая растения ХСС (Креславский и др., 2007а; Sheng et al., 2006).

Усиленное образование H₂O₂, обнаруженное нами сразу после прекращения прогрева растений пшеницы при 40°C (рис. 15), сменялось снижением уровня H₂O₂ через 12 ч, которое соответствует максимальной теплоустойчивости (рис. 14). Однако такое длительное снижение не наблюдалось при 42°C. По-видимому, вклад в повышение теплоустойчивости, вносит увеличение активности антиоксидантных ферментов и уровня низкомолекулярных антиоксидантов вследствие транзитного накопления

АФК, а также образование БТШ. Это согласуется с проявлением повышенной активности АсП в листьях предобработанных (закаленных) при 40°C растений (рис. 5 и 15) и с ускорением свето-индуцированного восстановления ФА растений пшеницы при внесении в питательный раствор антиоксиданта-аскорбиновой кислоты (Kreslavski et al., 2008). Стимуляция синтеза БТШ в результате образования H₂O₂ известна из литературы (Königshofer et al., 2008). Вероятно, основные БТШ образуются на свету после прекращения прогрева.

Сразу после прогрева оценивали первичную теплоустойчивость, не зависящую от восстановления ФА, а также скорость светозависимого восстановления фотосинтетической активности (рис. 14). Видно, что первичная теплоустойчивость мало зависит от предшествующего прогревания, тогда как скорость восстановления

после теплового шока зависит

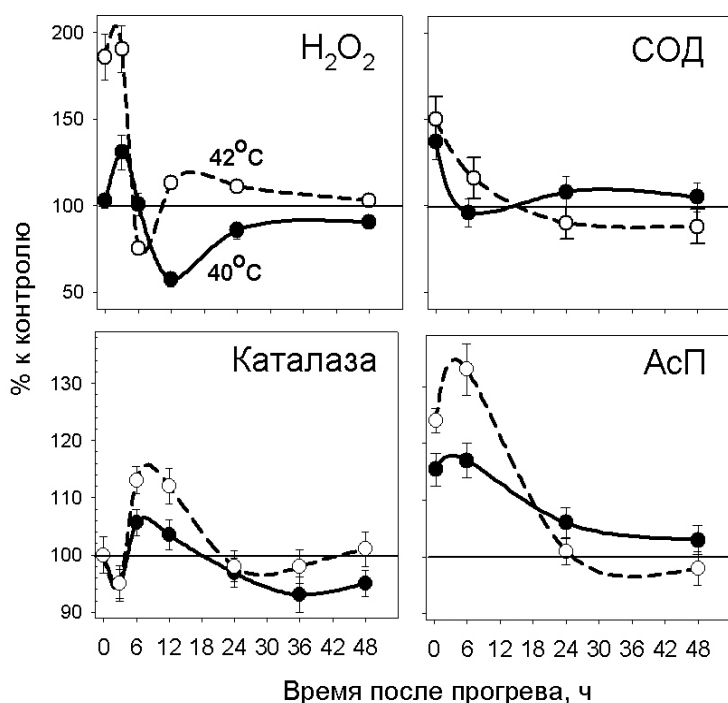


Рис. 15. Изменение уровня H₂O₂ и активности СОД, каталазы и АсП после прогревания при 40 и 42°C и в процессе пост-стрессового восстановления при 20°C и I=40 мкЕ. Исходные активности СОД, каталазы и АсП – 430±40 ед. г⁻¹, 2500 мкмоль H₂O₂ г⁻¹мин⁻¹, и 6.3±1 мкмоль мин⁻¹г⁻¹, соответственно (Kreslavski et al., 2009b).

существенным образом. Восстановление блокируется ингибиторами белкового синтеза, линкомицином и хлорамфениколом, и ускоряется светом (Креславский, Христин, 2003; Kreslavski et al., 2008; 2009b). То есть для

восстановления активности ФА нужны свет и синтез белков *de novo*. Важна также обеспеченность процесса восстановления АТФ. Более эффективное восстановление активности ФА закаленных растений, по-видимому, является следствием повышения скоростей циклического фотофосфорилирования и темнового дыхания у закаленных прогреванием проростков по сравнению с незакаленными (Kreslavski et al., 2008).

Ранее было обнаружено, что тепловая предобработка растений приводит к повышению их устойчивости к комбинированному действию света и температуры (Шаркова, 2001; Буболо и др., 2004; Кислюк и др., 2004, 2008). Мы предположили, что ФА растений, предобработанных нагреванием при 40°C, обладает повышенной устойчивостью не только к совместному действию света высокой интенсивности и

повышенной температуры, но и к свету высокой интенсивности (перекрестная адаптация) при комнатной температуре в условиях обратимого фотоингибирования. Действительно, после предобработки при 40°C ФА растений был более устойчив не только к высокой температуре (44°C) (рис. 14), но и к свету в условиях фотоингибирования (рис. 16). Сразу (и через несколько часов) после нагревания при 40°C и через 24 ч после предобработки при 42°C не наблюдали повышения устойчивости ФА к свету высокой интенсивности. Предполагается, что теплоустойчивость ФА растений, приобретенная при умеренных температурах, частично индуцируется усилением механизмов, защищающих клеточные структуры от окислительного повреждения, вызванного нагреванием (Larkindale, Huang, 2004).

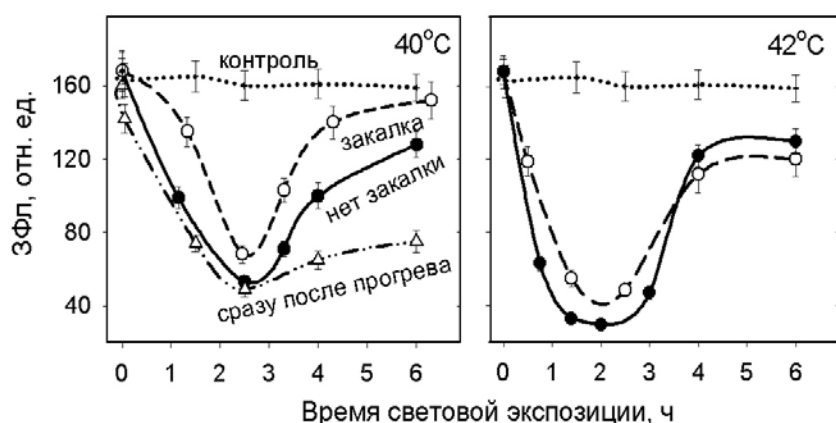


Рис. 16. Влияние тепловой предобработки пшеницы на фотоингибирование ($I=1000 \mu E m^{-2} s^{-1}$), оцененное по максимальной интенсивности замедленной флуоресценции (ЗФл). Нет закалки – без предобработки при 40°C; закалка – прогрев при 40°C или 42°C и восстановление при $I=40 \mu E m^{-2} s^{-1}$ в течение 24 ч. Нижняя кривая – сразу

после прогрева при 40°C. (Kreslavski et al., 2008).

Для развития этих защитных механизмов необходимо определенное время, а также транзитное, не слишком значительное повышение пула АФК. Увеличение содержания H_2O_2 предшествовало повышению активности каталазы и АсП, которые достигали максимума через 6-12 ч после термообработки при 40°C, что соответствовало минимальному уровню H_2O_2 и высокой теплоустойчивости (рис. 14). В закаленных тепловой предобработкой растениях скорость повышения активности одного из ключевых для хлоропластов антиоксидантных ферментов – АсП в ответ на вторичный тепловой стресс была выше, чем в незакаленных растениях (рис. 5). На основе этих данных мы заключили, что наблюдаемое увеличение теплоустойчивости ФА частично обусловлено повышением активности антиоксидантных ферментов в результате кратковременной тепловой закалки. Предполагается, что H_2O_2 является сигнальной молекулой и регулятором экспрессии ряда генов, которые кодируют антиоксидантные ферменты, стресс-защитные и сигнальные белки, такие как киназы, фосфатазы и факторы транскрипции (Hung et al., 2005). Имеются доказательства того, что факторы транскрипции теплового шока (ФТТШ) являются прямыми сенсорами H_2O_2 и других АФК (Miller, Mittler, 2006).

Таким образом, на основании полученных нами (Креславский и др., 2007б; Kreslavski et al., 2009b) и литературных данных (Lopez-Delgado et al., 1998) можно заключить, что АФК регулируют формирование повышенной теплоустойчивости ФА, и, действуя, вероятно, через регуляторно-сигнальные белки, такие как ФТТШ, регулируют скорость экспрессии генов, кодирующих различные белки, которые участвуют в системах, защищающих ФА от окислительного стресса.

Показано, что тепловое закаливание при 40°C заметно ускоряет восстановление ФА растений при тепловом шоке (44°C) и усиливает устойчивость ФА к фотоингибированию (Kreslavski et al., 2008). При этом, согласно нашим (рис. 5 и 14) и литературным данным (Dat et al., 2000; Dash, Mohanty, 2002) в листьях, закаленных прогреванием растений, обнаруживается более высокая антиоксидантная активность. Следовательно, наблюдается корреляция повышенной теплоустойчивости с более высокой антиоксидантной активностью в листьях.

С другой стороны, сразу после предобработки при 40°C устойчивость ФА к свету высокой интенсивности понижена (рис. 16, Kreslavski et al., 2008). Причиной уменьшенной устойчивости к вторичному стрессу и более медленного восстановления ФА может быть значительно повышенное в результате двойного стресса (нагревание и свет высокой интенсивности) содержание АФК, и, как следствие, значительное снижение антиоксидантной активности в процессе фотоингибирования. В процессе термо-индуцированного фотоингибирования, которое наблюдали в препаратах тилакоидных мембран, возможно образование агрегатов светособирающих Хл-белковых комплексов типа ССК 2, что также может вносить вклад в снижение стресс-устойчивости ФА (рис. 17).

Таким образом, существует корреляция между потенциалом теплоустойчивости и потенциальной способностью антиокислительных ферментов нейтрализовать H_2O_2 и другие АФК и, таким образом, уменьшить фотоокислительное повреждение ФА.

Известно, что активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД, каталаза и пероксидаза, могут возрастать после предобработки растений 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислотой – предшественником этилена и АБК (Larkindale, Huang, 2004). По-видимому, фитогормоны индуцируют теплоустойчивость ФА путем повышения антиоксидантной активности. Это согласуется с данными об увеличении устойчивости растений к высоким температурам с помощью экзогенных цитокининов, что объясняется активацией цитокининами работы белоксинтезирующего аппарата (Кулаева и Кузнецов, 2004; Таланова, 2009).

Можно предположить, что повышенная устойчивость растений к нагреванию формируется путем увеличения активности антиоксидантных ферментов, повышения содержания низкомолекулярных антиоксидантов, осмолитов и некоторых гормонов, а также усиления синтеза белков теплового шока. При этом функцию первичного

сигнального элемента, по-видимому, выполняют АФК (H_2O_2), которые через ФТТШ и другие сигнальные элементы регулируют генную активность стресс-защитных систем

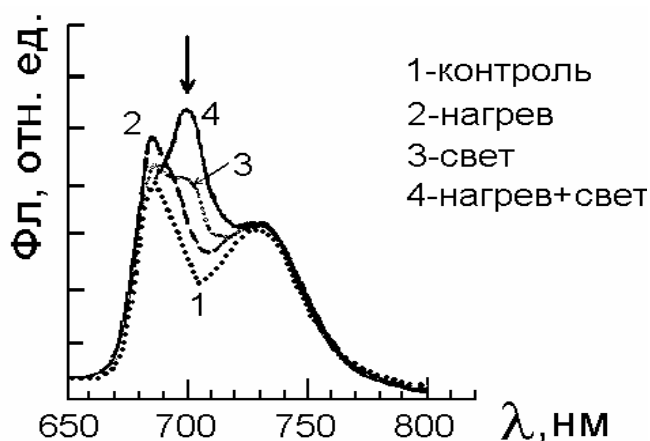


Рис. 17. Низкотемпературные спектры флуоресценции ($77^{\circ}K$) препаратов тилакоидных мембран из растений шпината после разных обработок. Без предобработок (1), прогретые при $42^{\circ}C$ 10 мин, затем выдержанные в темноте (2), или на свету $I=30 \text{ Вт м}^{-2}$ (3) в течение 3 ч. Прогретые при $42^{\circ}C$ (10 мин), затем выдержанные на том же свету (4). Стрелкой показано положение полосы предполагаемого агрегата Хл *a/v* комплекса ФС2 ($\lambda_m=700 \text{ нм}$). λ_m возбуждения = 435 нм.

(Hung et al., 2005). Увеличение антиоксидантной активности приводит к снижению уровня АФК и повышению стресс-устойчивости ФА, что согласуется с опытами на трансгенных растениях-суперпродуцентах антиокислительных ферментов, таких как СОД (Allen, 1995). Все эти факторы, по-видимому, способствуют созданию в клетке условий, стимулирующих синтез АТФ, например, за счет активации циклического фотофосфорилирования и темнового дыхания (Kreslavski et al., 2008; Singh, Grover, 2008). Нами показано, что после кратковременного теплового стресса увеличивается активность некоторых антиоксидантных ферментов, скорости темнового дыхания в листьях и фиксации CO_2 , а также циклического фотофосфорилирования в препаратах тилакоидных мембранах, выделенных из листьев закаленных растений (Kreslavski et al., 2008). Наряду с усиленным образованием БТШ и осмолитов, эти факторы, как следует из наших данных, важны для кросс-толерантности к вторичному тепловому стрессу и фотоингибированию (Kreslavski et al., 2008; Mohanty et al., 2009).

Вероятно, важную роль в высокой общей стресс-устойчивости ФА растений, подвергнутых кратковременной тепловой предобработке, к повторному тепловому стрессу и свету повышенной интенсивности, играет высокая скорость восстановления активности ФА (рис. 14, 16). Критическим для восстановления является скорость синтеза фотосинтетических белков *de novo*, для обеспечения которой необходимо достаточное поступление энергии в виде АТФ. С другой стороны, повышенный уровень АФК ведет к снижению скорости восстановления фотосистем благодаря ингибированию синтеза белков избыточным количеством АФК, которые нейтрализуются антиоксидантной системой. Это означает, что обеспечение АТФ и соотношение антиоксидантной активности и степени развития окислительного стресса являются критическими факторами для восстановления (Allakhverdiev et al., 2005, 2008). Сделанный вывод подтверждается результатами экспериментов по тепловому закаливанию проростков пшеницы (Kreslavski et al., 2008) и с мутантом *Synechocystis* sp PCC 6803, дефицитным по гену, ответственному за синтез

антиоксидантного фермента каталазы–пероксидазы (Креславский и др., 2010а). Пост-стрессовое восстановление ФА проростков пшеницы ускорялось в присутствии экзогенной аскорбиновой кислоты, а в отсутствие каталазы-пероксидазы восстановление замедлялось.

Есть доказательства, что важными интермедиатами между стрессовым сигналом при повышенной температуре и биохимическим ответом растения, обуславливающим адаптивный ответ, могут быть Ca^{2+} , АФК и продукты перекисного окисления липидов (Курганова и др., 1999; Dat et al., 2000; Hung et al., 2005; Suzuki, Mittler, 2006), а также АБК (Титов и др., 2006). Определенную роль в начальной быстрой реакции на тепловой стресс, по-видимому, играет изменение текучести мембран (Allakhverdiev et al., 2008), которое может действовать как тепловой сенсор (Los', Murata, 2004). Из наших данных следует, что повышение стресс-устойчивости ФА в результате кратковременного действия закаливающих температур связано с временным повышением пула H_2O_2 и последующим повышением уровня антиоксидантной активности, что можно изобразить следующей схемой: индуктор → рецептор → АФК, Ca^{2+} и сигнальные белки → регуляция синтеза белков → повышение активности антиоксидантных ферментов и пула низкомолекулярных антиоксидантов → индукция стресс-устойчивости (Miller, Mittler, 2006; Креславский и др., 2007а).

Предлагаемая нами идея заключается в том, что такая схема первичных этапов сигнализации достаточно универсальна, и подобные системы активации сигнальных систем, приводящие, к повышению стресс-устойчивости ФА, могут работать при использовании умеренных доз индукторов защитных систем, будь то КС, ХСС или повышенная температура.

4. Фотоингибирование у цианобактерии *Synechocystis* sp PCC 6803. Роль антиоксидантных ферментов

Мы установили, что повышение устойчивости ФА растений к свету высокой интенсивности в результате их предварительного прогрева или обработки ХСС в значительной степени обусловлено повышенной скоростью восстановления ФА в обработанных растениях. Степень фотоингибирования зависит от баланса между повреждением ФС2 и восстановлением после повреждения (Nishiyama et al., 2001; 2006). Поэтому важно разделение процессов прямого повреждения ФА и репарации повреждения с помощью ингибиторов белкового синтеза, а также знание факторов, регулирующих каждый из этих процессов. Важным механизмом улучшенного пост-стрессового восстановления ФА может быть изменение соотношения оксидантов и антиоксидантов в сторону увеличения пула антиоксидантов, которое происходит в ходе предобработки индукторами различной природы. Для проверки этого предположения мы использовали цианобактерии, как простую модельную систему с

известным, хорошо изученным и небольшим набором генов, кодирующих определенные антиоксидантные ферменты.

Наряду с СОД, одним из ключевых антиоксидантных ферментов у цианобактерий является каталаза-пероксидаза (Tichy, Vermaas, 1999). Фотоингибирование у мутанта *katG*⁻, в котором отсутствует активность каталазы-пероксидазы, сравнивали с фотоингибированием у исходного дикого типа (ДТ), предполагая, что разница в фотоингибировании будет проявляться в основном за счет разной скорости восстановления фотосинтетической активности. Суспензии клеток освещали сначала сильным фотоингибирующим светом, затем светом низкой интенсивности, восстанавливающим активность ФА (рис. 18).

При подавлении репарации ФА спектиномицином (ингибитор белкового синтеза) скорости фотоингибирования, оцененные по величине $(I_m - I_1)/I_1$, где $I_m - I_1$ - разница между максимальными интенсивностями медленной и быстрой компонент ЗФл, у ДТ и мутанта *katG*⁻ были практически одинаковы. В отсутствие спектиномицина скорость фотоингибирования, оцененная как по величине $(I_m - I_1)/I_1$, так и по СО₂-зависимому выделению кислорода, была выше у мутанта, чем у ДТ. Тот факт, что без подавления репарации фотоингибирование у мутанта происходит быстрее, свидетельствует о менее эффективном восстановлении активности ФА мутанта.

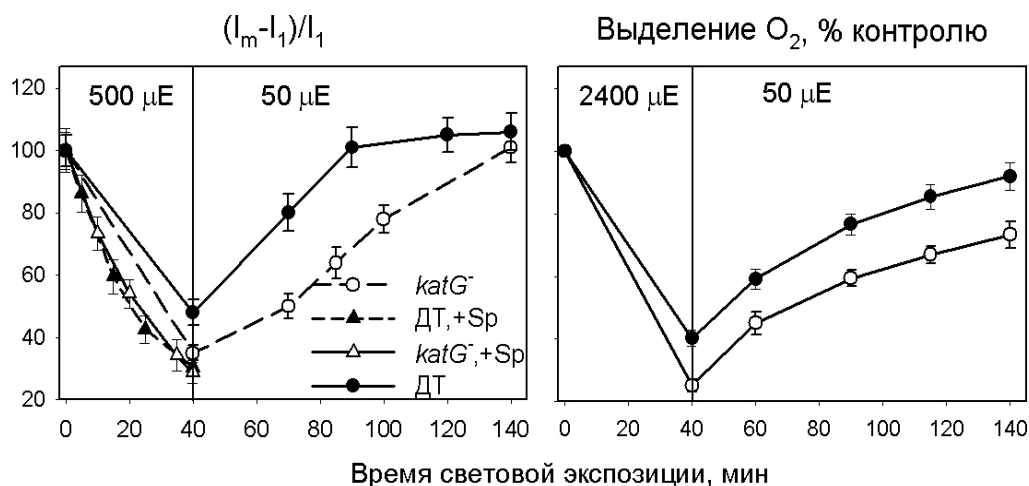


Рис. 18. Кинетики восстановления после фотоингибирования относительной амплитуды медленной фазы кривой ЗФл, рассчитанной из индукционных кривых ЗФл, и светонасыщенного выделения О₂ в клетках штамма дикого типа (ДТ) и *katG*⁻ мутанта. Интенсивность света при фотоингибировании: 500 μЕ м⁻²с⁻¹ или 2400 μЕ м⁻²с⁻¹, а при восстановлении 50 μЕ м⁻²с⁻¹. Sp – спектиномицин (80 μМ). Результаты выражены в % от начальной величины (t=0). (Креславский и др., 2010а).

Действительно, восстановление фотосинтетической активности шло эффективней у ДТ, чем у мутанта (рис. 18). Вероятно, ген *katG*⁻ не участвует в защите ФС2 от фотоингибирования при подавлении репарации ФА и важен именно для процесса репарации при окислении.

Считается, что индукторы окислительного стресса (H₂O₂ и MB) подавляют

активность ФС2 не путем прямого повреждения компонентов реакционного центра, а ингибируя восстановление ФС2 за счет снижения скорости синтеза белков, в основном за счет подавления трансляции и транскрипции гена *psbA*, кодирующего белок Д1, образующимися АФК (Allakhverdiev et al., 2002, 2005). Наши (Kreslavski et al., 2010a) и литературные (Nishiyama et al., 2001; 2006) данные иллюстрируют важность соотношения про-/антиоксиданты для восстановления активности ФА при фотоингибировании.

Индукторы защитных систем растений приводят к увеличению первичной стресс-устойчивости ФА и скорости пост-стрессового восстановления его активности путем сдвига соотношения про-/антиоксиданты в сторону антиоксидантов. При сдвиге баланса в сторону прооксидантов стресс-устойчивость ФА и скорость пост-стрессового восстановления снижаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе механизмов адаптации организмов в стрессовых условиях можно выделить несколько основных защитных механизмов: снижение метаболизма, и, соответственно, образования АФК и различных токсинов; активация образования антиоксидантов, защищающих организм от действия свободных радикалов; активация синтеза стрессовых белков под действием стрессовых факторов, а также накопление низкомолекулярных защитных соединений (осмолиты и др.).

В результате обработки растений регуляторами роста (Ковалев, 1998; Шакирова, 2001) или действия факторов физической природы, например, лазерного облучения (Будаговский, 2008), устойчивость растений к различным стрессорам может повышаться. Устойчивость ФА играет важнейшую роль в защите растений от действия стрессоров. Между тем закономерности регуляции стресс-устойчивости ФА и механизмы ее повышения с помощью регуляторов роста и физических факторов, индуцирующих защитные системы растения, изучены явно недостаточно.

Ранее было показано, что ретарданты ХХХ и ХХ модифицируют фитохром-контролируемые реакции роста и морфогенеза растений, которые индуцируются кратковременным КС (Василенко и др., 1991; Кобзарь и др., 1997; Kobzar' et al., 1999), что предполагает существование общих интермедиатов при действии ХСС и КС. В дальнейшем были исследованы физиологические механизмы регуляции стресс-устойчивости ФА при действии на растения указанных ретардантов и КС. Впервые было изучено действие различных доз этих факторов на ФА и проведено сравнение с действием на стресс-устойчивость ФА закаливающих повышенных температур.

Установлено, что ХХХ и ХХ повышают устойчивость ФС2 и тилакоидных мембран к окислительному стрессу, вызванному УФ-радиацией и нагреванием растений. При этом важную роль в повышении стресс-устойчивости ФА растений играет,

индуцированное ХСС, кратковременное повышение пула H_2O_2 , активирующее антиоксидантную систему, а также, вероятно, накопление АБК, что отражено в общей схеме стресс-защитного действия индукторов устойчивости (Рис. 19).

Из наших и литературных данных следует, что стресс-защитное действие пред-(после)облучения КС от УФ-радиации носит достаточно универсальный характер и проявляется не только у дрожжей, бактерий (Фрайкин и др., 1995; Kohli et al., 2000) и животных клеток (Кагу, 2008; Храмов и др., 2007, 2008), но и у высших растений в первичных и вторичных процессах фотосинтеза (Креславский и др., 2001, 2004а, 2009а). Из наших данных следует, что важную роль в защите ФА от УФ-радиации играет повышение пероксидазной активности и пула низкомолекулярных антиоксидантов, индуцируемое в листьях КС через повышение пула $Ф_{хдк}$, а также сохранение достаточно высокого уровня хлорофилла при УФ-индуцированном старении листьев.

Кратковременная предобработка (закалка) растений умеренными температурами может приводить как к повышению первичной устойчивости растений, так и к увеличению скорости восстановления при вторичном стрессе (Титов и др., 2006, Allakhverdiev et al., 2008). Согласно нашим данным, предобработка растений пшеницы при $40^{\circ}C$ (но не при $42^{\circ}C$) приводит к повышению скорости восстановления ФА после вторичного теплового стресса и после воздействия света высокой интенсивности. Это согласуется с тем, что именно в закаленных при $40^{\circ}C$ растениях обнаружены более высокие скорости темнового дыхания и циклического фотофосфорилирования, а также более высокая активность антиоксидантных ферментов (Kreslavski et al., 2008, 2009b), что согласно нашей концепции, является причиной повышенной скорости пост-стрессового восстановления активности ФА.

Результаты, полученные с помощью мутанта *katG*⁻ цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, свидетельствуют о важной роли активности антиоксидантных ферментов, в частности каталазы-пероксидазы, в процессе пост-стрессового восстановления ФА. Это согласуется с развиваемой нами (Креславский и др., 2007а, 2010а) и другими исследователями (Nishiyama et al., 2005; Murata et al., 2007) концепцией о том, что АФК в условиях окислительного стресса ингибируют в основном систему белкового синтеза, но не повреждают белки фотосистем. Усиление антиоксидантной активности в обработанных индукторами растениях приводит к снижению уровня АФК, следовательно, и к ускорению восстановления фотосистем за счет увеличения скорости синтеза белка *de novo*. Усиление темнового дыхания и циклического фотофосфорилирования обеспечивают этот процесс энергией.

Во многих работах показано, что сорта культурных растений, которые обладают более высоким исходным уровнем антиоксидантной активности или способностью к ее быстрому увеличению, отличаются большей устойчивостью к окислительному

стрессу (Allen, 1995; Mittler, 2002). На основе наших данных о повышенной антиоксидантной активности листьев растений при действии КС и использованных ХСС сделан общий вывод о том, что одним из ключевых механизмов повышения стресс-устойчивости ФА является активация антиоксидантных ферментов и повышение уровня низкомолекулярных антиоксидантов, которое индуцируется предобработкой индукторами различной природы (рис. 19). Согласно нашей концепции, эта активация является следствием транзитного повышения уровня АФК при использовании относительно высоких доз индукторов устойчивости, приводящих к развитию в листе слабого окислительного стресса. Наши данные о повышенном образовании гормонов АБК при обработке растений ХСС и этилена при облучении КС (через Фх_{дк}), а также данные других авторов (Шакирова, 2001; Веселов, 2001; Титов и др., 2006) позволяют предположить, что повышение содержания свободной АБК и этилена является важным первичным звеном при формировании повышенной стресс-устойчивости ФА при использовании индукторов различной природы. Другими стресс-защитными механизмами ФА могут быть усиление темнового дыхания и циклического фотофосфорилирования, а также повышение скорости тепловой диссипации поглощенной энергии.

Из наших данных следует, что повышение стресс-устойчивости ФА связано с кратковременным развитием слабого окислительного стресса, вызванного облучением растений КС в достаточно высоких дозах ($\geq 0.3-2$ Дж см⁻²), а также обработкой растений ретардантными дозами ХСС или действием закаливающей температуры. Из совокупности полученных данных следует, что одним из общих первичных механизмов действия индукторов устойчивости ФА при относительно высоких дозах используемого фактора является транзитная генерация АФК и изменение содержания гормонов, участвующих в преобразовании сигнала от индукторов в биохимический и физиологический ответ клетки (Рис. 19). Образование АФК может также привести к усилению темнового дыхания и циклического фотофосфорилирования важных для энергетического обеспечения повышенной стресс-устойчивости фотосинтезирующих организмов (Kreslavski et al., 2008).

Образование даже небольшого количества АФК может вызвать переход многих факторов транскрипции в активное состояние и индуцировать транскрипцию белков и ферментов антиоксидантной защиты, регулирующих стресс-устойчивость ФА.

При действии КС через Фх_{дк}, может работать схема, рассмотренная ранее для цепи трансдукции фитохромного сигнала (Kreslavski et al., 2009a). Фх_{дк} может действовать на промоторы свето-активируемых генов опосредованно через сигнальные белки и различные интермедиаты светового сигнала, в частности, ФхА и ФхВ могут связываться с факторами транскрипции, влияя на экспрессию защитных генов, кодирующих пероксидазы и ферменты фенилпропаноидного пути. В большей

степени при кратковременном, но также и при длительном воздействии стрессовых факторов функционируют общие механизмы устойчивости, которые позволяют организму снизить энергетические затраты, связанные с формированием специальных механизмов устойчивости. Повышение содержания гормонов, таких как АБК и этилен, образование стрессовых белков, а также, индукция активности антиоксидантной системы могут рассматриваться как наиболее общие механизмы повышения стресс-устойчивости ФА индукторами различной природы.

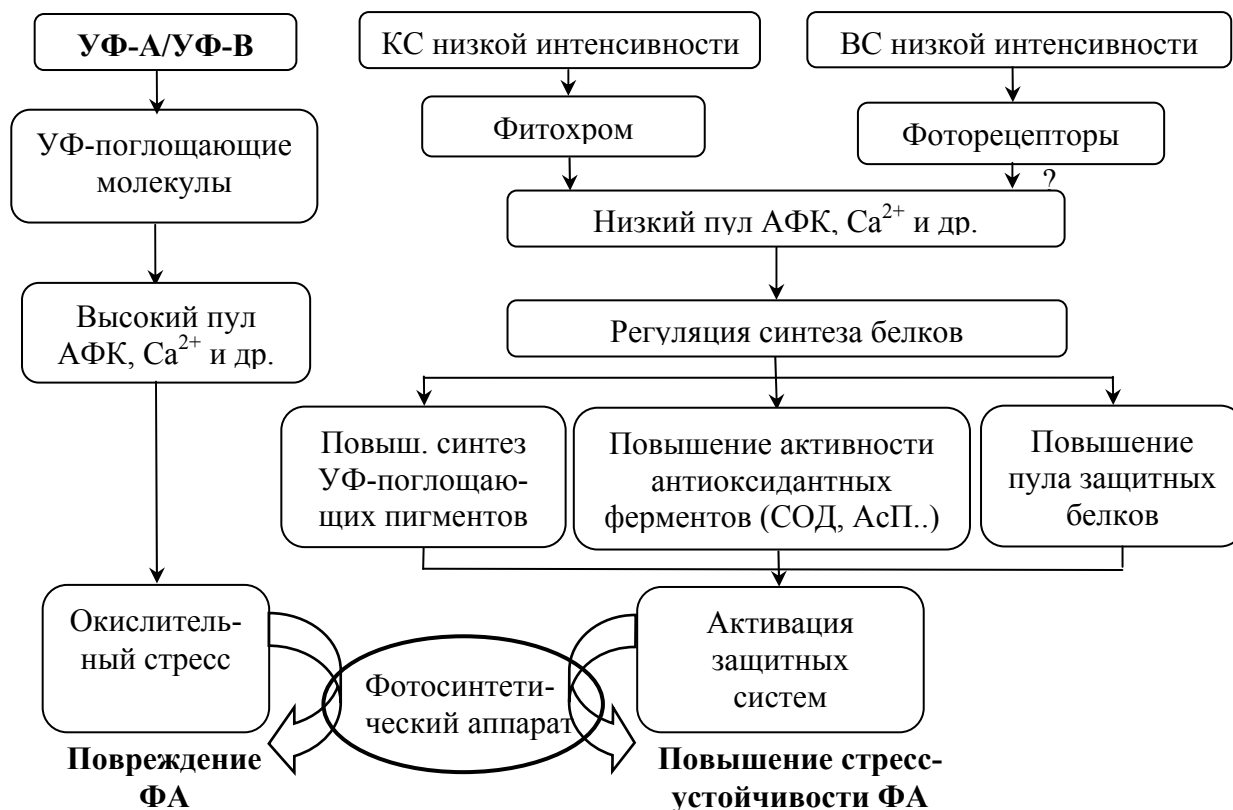


Рис. 19. Предполагаемые пути трансдукции сигнала от различных по природе индукторов стресс-устойчивости ФА и преобразования этого сигнала в биохимические и физиологические ответы клетки. Низко-мол. анти-тов – низкомолекулярных антиоксидантов. Предложено на основе полученных экспериментальных данных и обзоров (Hung et al., 2005; Singh, Grover, 2008; Колупаев, Карпец, 2009; Kreslavski et al., 2009a; Романов, 2009).

ВЫВОДЫ

1. Обработка растений ретардантными дозами хлорхолинхлорида и холинхлорида приводит к повышению устойчивости фотосинтетического аппарата к УФ-радиации и высоким температурам. Обнаружена связь защитного действия этих ретардантов с увеличением активности антиоксидантных ферментов и содержания низкомолекулярных антиоксидантов в листьях и хлоропластах, а также с повышением содержания АБК в листьях.

2. Увеличение пула H_2O_2 в листьях растений, обработанных хлорхолинхлоридом, предшествует росту тепловой устойчивости ФА, что предполагает участие АФК в ее повышении.
3. Одним из ключевых факторов в защитном действии предоблучения узкополосным КС с λ_m -625 и 660 нм от УФ-индуцированного ингибирования фотохимической активности ФС2 и фиксации CO_2 , а также потери Хл и каротиноидов при экспозиции листьев растений в темноте является увеличение пероксидазной активности и повышение пула низкомолекулярных антиоксидантов в предоблученных листьях. Активная форма фитохрома участвует в формировании КС-индуцированного повышения устойчивости ФА растений к УФ-радиации.
4. При длительном (> 1 ч) облучении и умеренных дозах КС ($\sim 0.3-2$ Дж $см^{-2}$) перекись водорода является сигнальным интермедиатом, что предполагает участие АФК в повышении устойчивости ФА к УФ-радиации.
5. Приобретенная в результате кратковременного теплового стресса повышенная стресс-устойчивость ФА обеспечивается более высокой скоростью синтеза белков, темнового дыхания и циклического фотофосфорилирования, а также более высокой антиоксидантной активностью в листьях закаленных растений, что является следствием транзитного увеличения уровня H_2O_2 в листьях.
6. Соотношение про/антиоксиданты является одним из ключевых факторов, регулирующих скорость восстановления фотосинтетической активности после кратковременного теплового или светового стресса. Сдвиг соотношения в сторону антиоксидантов приводит к ускорению восстановления и, наоборот, в сторону прооксидантов ведет к его замедлению.
7. Из совокупности полученных данных следует, что одним из ключевых путей повышения стресс-устойчивости фотосинтетического аппарата при действии индукторов защитных систем растений является увеличение активности антиоксидантных ферментов и/или содержания низкомолекулярных антиоксидантов. Общими сигнальными интермедиатами в индукции защитных систем при действии всех рассмотренных индукторов являются АФК. В результате действия индукторов, фотосинтетический аппарат и растение в целом переключаются с обычной программы развития на адаптивную, что обеспечивает повышение стресс-устойчивости фотосинтетического аппарата.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Креславский В.Д.**, Макаров А.Д., Брандт А.Б. и др. Влияние красного света, фитогормонов и производных дихлорфенилмочевины на выделение этилена хлореллой // Физиология растений. 1988. Т. 35. № 6. С 1162-1169.

2. Василенко В.Ф., **Креславский В.Д.**, Кузнецов Е.Д. Хлорхолинхлорид как модификатор ряда регулируемых фитохромом процессов роста и фотосинтеза // Доклады АН СССР. 1991. Т. 316. № 6. С. 1512-1514.
3. Kuznetsov E.D., Vasilenko V.F., **Kreslavski V.D.** Stimulation effects of short-term red light and plant growth retardant on greening and formation of photosynthetic apparatus in wheat seedlings // Plant Physiol. Biochem. 1992. V. 30. P. 559-564.
4. **Креславский В.Д.**, Василенко В.Ф., Кузнецов Е.Д., Музафаров Е.Н. О первичных этапах трансдукции светового сигнала в растительной клетке // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. С. 415-424.
5. **Креславский В.Д.**, Садовникова Н.А., Оловянишникова Г.Д., Столовицкий Ю.М. Спектральные и фотохимические свойства комплексов фотосинтетических пигментов с азотсодержащими п-донорами // Ж. Физической химии. 1993. Т. 67. №5. С. 1059-1066.
6. Музафаров Е.Н., **Креславский В.Д.**, Назарова Г.Н. Световая и гормональная регуляция фотосинтеза и роста растений. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, монография, 1995. 140 с.
7. Кобзарь Е.Ф., **Креславский В.Д.**, Кузнецов Е.Д., Музафаров Е.Н. Взаимодействие холиновых соединений и фитохромной системы в процессе роста и развития проростков пшеницы // Доклады РАН. 1997. Т. 63. С. 696-698.
8. **Kreslavski V.D.**, Kobzar E.F., Muzafarov E.N. Effect of red radiation, kinetin and linurone on growth and ethylene production in *Chlorella* // Biologia Plantarum. 1997. V. 39. P. 427-430.
9. Kobzar' E.F., **Kreslavski V.D.**, Muzafarov E.N. Photomorphogenetic responses to UV radiation and short-time red light in lettuce seedlings // Plant Growth Regulation. 1998. V. 26. P. 73-76.
10. Kobzar' E.F., **Kreslavski V.D.**, Muzafarov E.N. Red radiation and choline compounds influence growth and greening of wheat seedlings // Photosynthetica. 1999. V. 36. P. 333-340.
11. Кобзарь Е.Ф., **Креславский В.Д.**, Кузнецов Е.Д., Музафаров Е.Н., Оловянишникова Г.Д. УФ радиация и фитохромная система как регуляторы роста и зеленения проростков салата // Доклады АН СССР. 1999. Т. 364. С. 553-556.
12. Kosobryukhov A.A., **Kreslavski V.D.**, Khramov R. N., Bratkova L.R., Shchelokov R.N. Effect of additional low intensity luminescence radiation 625 nm on plant growth and photosynthesis of plants // Biotronics. 2000. V. 29. P. 1-6.
13. Кособрюхов А.А., **Креславский В.Д.**, Храмов Р.Н., Браткова Л.Р., Щелоков Р.Н. Модифицирующее действие низкоэнергетического люминесцентного света 625 нм на рост и фотосинтез растений // Доклады РАН. 2000. Т. 372. №6. С. 827-829.
14. **Kreslavski V.D.**, Balakhnina T.I., Khristin M.S., Bukhov N.G. Pretreatment of bean seedlings by choline compounds increases the resistance of photosynthetic apparatus to UV radiation and elevated temperatures // Photosynthetica. 2001. V. 39. P. 353-358.
15. Ладыгин В.Г., Ширшикова Г.Н., Семенова Г.А., **Креславский В.Д.** Ультраструктура хлоропластов и рост клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при действии холинхлорида // Биофизика. 2001. Т. 46. №2. С. 256-264.

16. Ширшикова Г.Н., **Креславский В.Д.**, Ладыгин В.Г. и др. Фотосинтетическое выделение кислорода, переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при действии холинхлорида // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 647-651.
17. **Креславский В.Д.**, Христин М.С. Последствие теплового шока на индукцию флуоресценции и низкотемпературные спектры флуоресценции листьев пшеницы // Биофизика. 2003. Т. 48. №5. С. 865-872.
18. **Креславский В.Д.**, Иванов А.А., Кособрюхов А.А. Низкоэнергетический красный свет в области длин волн 620-660 нм уменьшает УФ-В-индуцированное уменьшение повреждения фотосистемы II в листьях шпината // Биофизика. 2004а. Т. 49. №5. С. 840-844.
19. **Креславский В.Д.**, Кобзарь Е.Ф., Музафаров Е.Н., Кузнецов Е.Д. Влияние кратковременного красного света и холиновых соединений на рост, зеленение и уровень цитокининов в проростках пшеницы // Доклады Россельхозакадемии. 2004б. №6. С. 3-5.
20. **Kreslavski V.**, Kobzar E., Ivanova E., Kuznetsov E. Effects of short-time red radiation and choline compounds on cytokinin content, chlorophyll accumulation and photomorphogenesis in wheat seedlings // Plant Growth Regulation. 2005. Т. 47. С. 9-15.
21. Балахнина Т.И., Кособрюхов А.А., Иванов А.А., **Креславский В.Д.** Влияние кадмия на CO₂ газообмен, переменную флуоресценцию хлорофилла и уровень антиоксидантных ферментов в листьях *Pisum sativum* // Физиология растений. 2005. Т. 52. №1. С. 21-26.
22. **Креславский В.Д.**, Аллахвердиев С.И. Механизмы трансдукции фоторецепторного сигнала в растительной клетке. Биологические мембраны. 2006. Т. 23. С. 275-295.
23. **Креславский В.Д.**, Карпентьер Р., Климов В.В., Мурата Н., Аллахвердиев С.И. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу // Биологические мембраны. 2007а. Т. 24. №3. С. 195-217.
24. **Креславский В.Д.**, Любимов В.Ю., Шабнова Н.И. и др. Последствие теплового шока на активность фотосинтетического аппарата и перекисное окисление липидов в листьях пшеницы // Доклады Россельхозакадемии. 2007б. №4. С. 5-9.
25. **Креславский В.Д.**, Фомина И.Р., Кособрюхов А.А., Херберт С.К., Бабыкин М.М., Биль К.Я. Эффекты индукторов окислительного стресса на фотосинтетический аппарат мутанта Prq20 цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Биофизика 2007в. Т. 52. С. 277-286.
26. Храмов Р.Н., Катков Ю.А., **Креславский В.Д.** и др. Оранжево-красный свет снижает ингибирование ультрафиолетом-А пролиферации фибробластов крыс // Доклады РАН. 2007. Т. 413. С. 1-3.
27. Храмов Р.Н., Катков Ю.А., **Креславский В.Д.** и др. Оранжево-красный свет снижает ингибирование ультрафиолетом-А пролиферации фибробластов крыс и оказывает дозозависимый эффект на их прикрепление // Биофизика. 2008. Т. 53. С. 294-298.
28. Allakhverdiev S.I., **Kreslavski V.D.**, Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis // Photosynthesis Research. 2008. V. 98(1-3). P. 541-550.

29. Воробьев В.А., Храмов Р.Н., Власьянц Г.Р., Синельников Б.М., Каргин Н.И., Кособрюхов А.А., **Креславский В.Д.** Светопреобразующий материал и композиция для его получения. 2008. Авторское свидетельство. No: WO 2008/111878 A2.
30. Мартиросян Ю.Ц., Кособрюхов А.А., **Креславский В.Д.** и др. Фотосинтез и продуктивность растений картофеля, выращиваемых в условиях аэропоники при дополнительном освещении светодиодами // Сельхоз. Биол. 2008. №3. С. 102-104.
31. Фомина И.Р., **Креславский В.Д.**, Иванов А.А., Татаринцев Н.П., Кособрюхов А.А., Биль К.Я. Фотоингибирование в цианобактериях. Роль каталазы-пероксидазы // Труды VIII-ого международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Москва. 2009. Т. 2. С. 323-325.
32. **Kreslavski V.**, Tatarinzev N., Shabnova N., Semenova G., Kosobryukhov A. Characterization of the nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings from short-time dark heat exposures and analysis of the mode of acclimation to different light intensities // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 1592-1600.
33. **Креславский В.Д.**, Христин М.С., Шабнова Н.И., Кособрюхов А.А. Предоблучение растений красным светом с $\lambda_m=660$ нм снимает ингибирующее действие УФ-А на фотосинтетический аппарат // Труды VIII-ого международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Москва. 2009. Т.3. С. 127-129.
34. **Kreslavski V.D.**, Carpentier R., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. Transduction mechanisms of photoreceptor signals in plant cells // J. Photochem. Photobiol. C. Photochem. Reviews. 2009a. V.10. P. 63–80.
35. **Kreslavski V.D.**, Lubimov V.Yu., Shabnova N.I., Balakhnina T.I., Kosobryukhov A.A. Heat-induced impairments and recovery of photosynthetic machinery in wheat seedlings. Role of light and prooxidant-antioxidant balance // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2009b. V.15. №2. P. 115-122.
36. Biel., Fomina I.R., **Kreslavski V.D.**, Allakhverdiev S.I. Methods for assessment of activity and stress acclimation of photosynthetic machinery in cyanobacteria and symbiotic microalgae // Protocols on algal and cyanobacterial research (W. Kliner, Nath Bogchi S., Mohanty P. Eds.), Narosa Publishing House. New Delhi. 2009. Chapter 13. 20p.
37. Mohanty P., **Kreslavski V.D.**, Los'D.A., Klimov V.V., Carpentier R., Allakhverdiev S.I. Heat stress: Susceptibility, recovery and regulation // In: Photosynthesis. Plastid biology, energy conversion and carbon assimilation (Eaton-Rye J.J., Tripathy B.C. (Eds). Springer, Dordrecht. The Netherlands. 2010 (in press).
38. **Креславский В.Д.**, Фомина И.Р., Иванов А.А. и др. NaCl-стимулированное фотоингибирование и восстановление фотосинтетической активности мутанта *katG* цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Биофизика. 2010а. Т.55(2). С. 252–258.
39. **Креславский В.Д.**, Балахнина Т.И., Жармухамедов С.К., Шабнова Н.И., Христин М.С., Любимов В.Ю. Механизм повышения термоустойчивости ФС 2 растений пшеницы хлорхолинхлоридом // Доклады Россельхозакадемии. 2010б. №3. С. 7-10.