

УДК 577.152.3

СРАВНЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АНТЕННЫ АРАБИДОПСИСА И ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ СВЕТА РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ*

© 2019 Д.В. Ветошкина, М.А. Козулева, В.В. Терентьев, Е.М. Журикова,
М.М. Борисова-Мубаракшина, Б.Н. Иванов**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Федерального исследовательского центра
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290 Пушкино, Россия; электронная почта: ivboni@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.04.2019

После доработки 23.05.2019

Принята к публикации 23.05.2019

Изменения распределения энергии света между фотосистемами 1 и 2 (ФС1 и ФС2), осуществляемые за счет обратимого перемещения между фотосистемами части светособирающего комплекса (ССК2), так называемые изменения состояния (ИС), были исследованы в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) при кратковременном освещении светом разной интенсивности, преимущественно возбуждающим ФС2. Вызываемые освещением изменения соотношения максимумов при 745 и 685 нм в спектре низкотемпературной (77 К) флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*), характеризующих поглощение энергии ФС1 и ФС2 соответственно, не позволили достаточно определенно выявить различие в процессе ИС в ячмене и арабидопсисе, поскольку было найдено, что изменение отношения этих максимумов при высокой интенсивности света не связано с ИС. Накопление на свету фосфорилированных белков ССК2, Lhcb1 и Lhcb2, участвующих в перемещении части ССК2 от ФС2 к ФС1, в листьях растений обоих видов уменьшалось при увеличении интенсивности света, будучи при одинаковых интенсивностях выше в ячмене, чем в арабидопсисе. Релаксацию нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) Хл *a* после освещения, характеризующую возвращение части ССК2 от ФС1 к ФС2, наблюдали в листьях ячменя в большем диапазоне увеличивающихся интенсивностей света, чем в листьях арабидопсиса. Различия в уровнях накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 и в характеристиках релаксации NPQ после освещения показали, что в листьях ячменя процесс ИС может осуществляться не только при низких, но и при высоких интенсивностях света, при которых он отсутствует в листьях арабидопсиса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: арабидопсис, ячмень, фотосинтез, фосфорилирование белков, флуоресценция хлорофилла.

DOI: 10.1134/S0320972519090094

Один из механизмов приспособления фотосинтетического аппарата растений к условиям окружающей среды – перераспределение поглощаемой энергии квантов света между фото-

системами вследствие обратимого перемещения внешней части светособирающего комплекса (ССК2) между фотосистемой 2 (ФС2) и фотосистемой 1 (ФС1). При освещении светом, возбуждающим преимущественно ФС2, активируется киназа STN7, которая фосфорилирует внешние белки ССК2, что приводит к их отделению от ФС2, присоединению к ФС1 и формированию так называемого состояния 2 (С2) [1, 2]. Последующее освещение светом, возбуждающим ФС1, или затенение приводят к активации фосфатазы PPH1/TAP38 – фермента, который дефосфорилирует белки ССК2, позволяя им возвращаться к ФС2, формируя так называемое состояние 1 (С1) [3, 4]. Эти процессы известны как классические «изменения состояний» (ИС, state transitions).

Принятые сокращения: ИС – изменения состояния (state transitions); ССК – светособирающий комплекс; С1, С2 – состояния 1 и 2; ФС1, ФС2 – фотосистемы 1 и 2; Хл – хлорофилл; At-ДТ, At-*stn7* – растения арабидопсиса дикого типа и арабидопсиса с нокаутом гена, кодирующего киназу STN7; Нv-NaF, Нv-Н₂O – листья ячменя, инкубированные в растворе NaF или в воде; NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции; ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-127, 05.08.2019.

** Адресат для корреспонденции.

Прямой подход к оценке ИС считается выявление изменений после освещения в спектре флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*) при температуре жидкого азота (77 К), при которой молекулы Хл *a*, связанные с ФС2 или ФС1, излучают флуоресценцию с максимумами, характеризующими поступление энергии света к фотосистемам [5]. Другой подход – измерение светоиндуцированного накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2, формирующих внешнюю антенну ССК2 [6]. Этот подход позволяет выявить, однако, только предпосылки для перераспределения энергии между фотосистемами, но не наличие такого перераспределения. Измерения флуоресценции Хл *a* ФС2 при комнатной температуре, когда вклад ФС1 незначителен, могут быть использованы для выявления ИС путем анализа изменения нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) Хл *a*, т.е. изменения расхода энергии, поступившей в ФС2. Сложность этого подхода состоит в том, что ряд других процессов, помимо перераспределения световой энергии между фотосистемами, вызывает это тушение [7–9].

Влияние интенсивности света на протекание ИС в высших растениях довольно хорошо изучено в арабидопсисе как модельном организме [10]. Процесс ИС был исследован также в кукурузе [11], сое [12], ячмене [13], шпинате и тыкве [14]. Однако эти работы, проведенные в разных лабораториях, не позволили установить особенности протекания ИС в листьях растений разных видов. Для выявления возможных отличий в протекании ИС в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) мы исследовали в одинаковых условиях влияние интенсивности света на переходы С1 → С2 и С2 → С1. Классический процесс ИС инициировали освещением растений светом, преимущественно возбуждающим ФС2. Для оценки ИС были применены все три описанных выше подхода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия выращивания растений и проведения экспериментов. Растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа экотипа Columbia (At-ДТ) и мутантные растения с нокаутом гена *At1g68830* (*At-stn7*) выращивали в климатической камере (20 °С) при освещении белым светом интенсивностью 60 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ и продолжительности светового периода 8 ч в день в течение 5–6 недель. Растения ячменя (*Hordeum vulgare*) выращивали в тех же условиях в течение 12–14 дней. В представленных экспериментах время освещения листьев составляло

20 мин, поскольку ранее мы показали, что освещение при 50 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ в течение этого времени достаточно для полного перехода в С2, что согласуется с данными литературы [15, 16].

Измерение спектров флуоресценции хлорофилла *a* при 77 К. Отделенные листья затемняли в течение 90 мин, а затем либо сразу замораживали при температуре жидкого азота, либо перед замораживанием освещали с помощью светодиода с максимумом излучения при (640 ± 10) нм. Интенсивность света варьировали, изменяя силу тока через светодиод. Спектры низкотемпературной флуоресценции Хл *a* в ответ на возбуждение светом низкой интенсивности с длиной волны 435 нм регистрировали с помощью спектрофлуориметра (модель 850, «Hitachi», Япония). Максимум флуоресценции при 745 нм показывал поступление энергии к ФС1, а максимум при 685 нм – к ФС2 [5].

Выделение тилакоидных мембран и проведение вестерн-блот-анализа. Листья затемняли на 90 мин, а затем либо использовали сразу для выделения тилакоидов, либо предварительно освещали в течение 20 мин светом с максимумом при 640 нм и интенсивностью 50, 300, 600 или 1200 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Листья гомогенизировали в среде, содержащей 15 мМ NaF, 25 мМ HEPES-КОН (pH 7,6), 400 мМ сахарозу, 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂; для выделения и очистки тилакоидных мембран использовали серию центрифугирований [17]. К препаратам мембран добавляли 200 мМ Tris-HCl-буфер (pH 6,8), содержащий 8%-ный Ds-Na, 32%-ный глицерин, 0,4%-ный бромфеноловый синий и 400 мМ диотреитол, нагревали при 95 °С в течение 5 мин и центрифугировали при 4500 g в течение 15 мин. Препараты выравнивали по содержанию хлорофилла; 1,5 и 2,0 мкг хлорофилла в препаратах арабидопсиса и ячменя соответственно наносили на гель. Разделение белков проводили с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 16%-ном ПААГ в камере Mini-PROTEAN Cell («Bio-Rad», США). Также на гель наносили 5 мкл предварительно окрашенных белковых маркеров молекулярного веса PageRuler Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», США). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», «Protran», США; 0,45 мкм NC) с использованием системы для блоттинга Mini Trans-Blot Cell («Bio-Rad», США). Мембраны инкубировали с первичными антителами против белков Lhcb1 и Lhcb2, а также фосфорилированных белков Lhcb1P и Lhcb2P (AS13 2704, AS13 2705 и AS01 004, AS01 003; «Agrisera», США) в течение ночи при 4 °С. Применимость

этих антител против Lhcb белков ячменя была подтверждена в предварительных экспериментах, в которых варьировали концентрацию тилакоидов ячменя, наносимых на гель. В качестве вторичных антител использовали антитела, меченные пероксидазой хрена («GE Healthcare», США), в разведении 1 : 5000. Конъюгаты антитело–антиген детектировали с помощью набора для вестерн-блоттинга Pierce ECL Plus («Thermo Scientific», США) и системы гель-документации ChemiDoc («Bio-Rad», США). Оптическую плотность полос измеряли с помощью программного пакета Image J.

Измерения эффективного квантового выхода ФС2 на свету и релаксации нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) хлорофилла после освещения. Растения выдерживали в темноте в течение 90 мин. В экспериментах с NaF отделенные листья перфорировали с нижней стороны и инкубировали в темноте в воде или в растворе NaF в течение еще 60 мин. Концентрация NaF, 10 мМ для ячменя и 15 мМ для арабидопсиса, а также длительность инкубации листьев были подобраны в предварительных экспериментах с учетом возможного влияния этого соединения на другие процессы в хлоропластах, помимо ингибирования фосфатазы.

Измерение флуоресценции Хл *a* листьев проводили с помощью флуориметра Mini-PAM («WALZ», Германия), но для освещения использовали светодиод с максимумом излучения при 640 нм. Вспышки насыщающего света (0,6 с, 6000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, белый свет) подавали в темноте, перед выключением действующего света и через 1 мин после выключения света, а затем через каждые 3 мин в темноте для регистрации релаксации NPQ. Эффективный квантовый выход ФС2 рассчитывали по формуле: $(F^m - F_s)/F^m$, где F_s – стационарный уровень флуоресценции на свету, а F^m – уровень флуоресценции при подаче насыщающей вспышки на свету перед выключением света. NPQ после освещения рассчитывали по формуле: $(F^m - F^{dm})/F^{dm}$, где F^m – уровень флуоресценции в адаптированных к темноте листьях при подаче вспышки насыщающего света, F^{dm} – уровень флуоресценции при подаче вспышки насыщающего света в темноте после освещения. Величины NPQ на рис. 3 и в табл. 1 и 2 рассчитывали на основании величины F^{dm} в указанное время после выключения света.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры низкотемпературной флуоресценции хлорофилла *a* листьев арабидопсиса дикого типа

(At-ДТ), нокаутного мутанта арабидопсиса по киназе STN7 (At-*stn7*) и ячменя после освещения светом разной интенсивности. На рис. 1, *a* показаны характерные спектры флуоресценции Хл *a* листьев арабидопсиса при 77 К до и после освещения этих листьев светом, возбуждающим преимущественно ФС2. За счет переноса части ССК2 от ФС2 к ФС1 процесс $C1 \rightarrow C2$ отражается в этих спектрах как уменьшение максимума флуоресценции при 685 нм, характеризующего поступление световой энергии к ФС2, и увеличение максимума флуоресценции при 745 нм, характеризующего поступление световой энергии к ФС1 (рис. 1, *a*). Для оценки влияния интенсивности света на переход $C1 \rightarrow C2$ использовали изменение после освещения отношения величин этих максимумов (рис. 1, *b*). Отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2 существенно увеличивалось по сравнению с отношением в темноте как в At-ДТ, так и в ячмене при освещении светом интенсивностью 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Это увеличение действительно отражало наличие перехода $C1 \rightarrow C2$, т.к. оно отсутствовало у мутанта, не имеющего киназы STN7. В At-ДТ это соотношение при увеличении интенсивности света до 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ становилось ниже, чем при 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, что согласуется с данными работ Mekala et al. [18] и Trotta et al. [19], в которых максимальное проявление ИС наблюдали при низкой освещенности. Однако при 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ это отношение резко возрастало (рис. 1, *b*). В листьях ячменя отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2 мало различалось при 50, 300 и 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, но, как и в At-ДТ, оно значительно увеличивалось при 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

На основании аналогичных измерений в растениях At-*stn7* может быть установлено, характеризует ли отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2 переход $C1 \rightarrow C2$ в At-ДТ при интенсивностях света, превышающих 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. В мутантных растениях это отношение по сравнению с темновым уровнем было немного выше при 300 и заметно выше – при 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. При этом при 300 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ оно было ниже, чем в At-ДТ, но при 600 и 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ достоверно не отличалось от такого отношения в At-ДТ (рис. 1, *b*). Таким образом, увеличение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 в At-ДТ при интенсивности света > 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ вряд ли связано с переходом $C1 \rightarrow C2$.

Фосфорилирование белков Lhcb1 и Lhcb2 в листьях арабидопсиса и ячменя при освещении светом разной интенсивности. После выдержива-

ния растений в темноте (см. «Методы исследования») количество фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 (т.е. Lhcb1P и Lhcb2P) было различным в листьях арабидопсиса и ячменя: через 90 мин в темноте эти белки не детектировались в ячмене, тогда как до 30% от их максимального уровня обнаруживали в арабидопсисе. Более того, белки Lhcb1P и Lhcb2P детектировались в листьях арабидопсиса даже после 2 ч темноты. Уровни Lhcb1P и Lhcb2P в листьях At-ДТ и ячменя увеличивались при действии света, возбуждающего преимущественно ФС2 (рис. 2). Наибольшие изменения происходили при 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Накопление белков Lhcb1P и Lhcb2P в At-ДТ было меньше после освещения светом интенсивностью 300 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и еще меньше при 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ по сравнению с их накоплением при 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (рис. 2, б). Эти результаты соответствуют данным, показывающим ингибирование киназы STN7 при высокой освещенности [18, 19]. Более низкие уровни светоиндуцированного накопления Lhcb1P и Lhcb2P при высоких интенсивностях света не были результатом деструкции этих белков, что было проверено вестерн-блот-анализом суммарных уровней белков Lhcb1 и Lhcb2 (данные не приведены).

Принимая во внимание, что отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2 в At-ДТ на свету интенсивностью 300 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ было выше, чем в At-*stn7*, накопление Lhcb1P и Lhcb2P в At-ДТ при этой интенсивности света

обеспечивало переход С1 → С2. Однако при 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ небольшое накопление этих белков в At-ДТ (рис. 2, б) не было достаточным для перехода С1 → С2. Об отсутствии этого перехода свидетельствует то, что отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2 в At-ДТ при 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ было близко к отношению в мутанте (рис. 1, б). При 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ уровни накопления Lhcb1P и Lhcb2P в At-ДТ на свету были очень малы. Поэтому можно вновь отметить, что увеличение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 при 600 и 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (рис. 1, б) едва ли связано с переходом С1 → С2.

В листьях ячменя значительные уровни белков Lhcb1P и Lhcb2P, накапливающихся на свету, наблюдались не только при 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, но и при 300 и 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (рис. 2, в). Более высокие по сравнению с At-ДТ уровни фосфорилированных белков, вероятно, позволяли осуществлять переход С1 → С2 в ячмене при 300 и 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, поскольку в ячмене, в отличие от At-ДТ, отсутствовало падение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 при этих интенсивностях света (рис. 1, б). Отсутствие такого падения даже при 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, по-видимому, было результатом суммирования повышенного по сравнению с темновым уровнем отношения ФС1/ФС2 вследствие перехода С1 → С2 и не связанного с этим переходом увеличения этого отношения при увеличении интенсивности света, как это наблюдается в At-*stn7* (рис. 1, б).

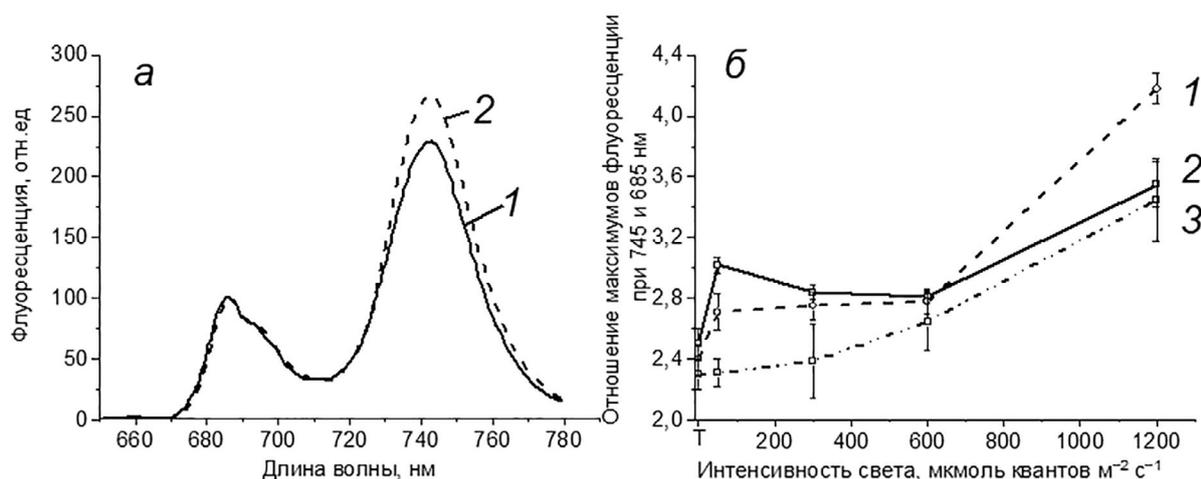


Рис. 1. а – Спектры низкотемпературной (77 К) флуоресценции хлорофилла в листьях арабидопсиса: 1 – после 90 мин в темноте, 2 – после 90 мин в темноте и последующего освещения светом с $\lambda_{\text{max}} = 640$ нм интенсивностью 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ в течение 20 мин. Флуоресценцию возбуждали светом с $\lambda = 435$ нм. Спектры нормировали при $\lambda = 685$ нм; б – отношение выходов флуоресценции при 745 и 685 нм в листьях ячменя (1), арабидопсиса дикого типа (2) и арабидопсиса с нокаутом гена *AtIg68830* (3). Листья замораживали либо после адаптации в темноте (Т), либо после 20 мин освещения светом с $\lambda_{\text{max}} = 640$ нм указанной интенсивности. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка среднего (из трех измерений в трех выращиваниях растений)

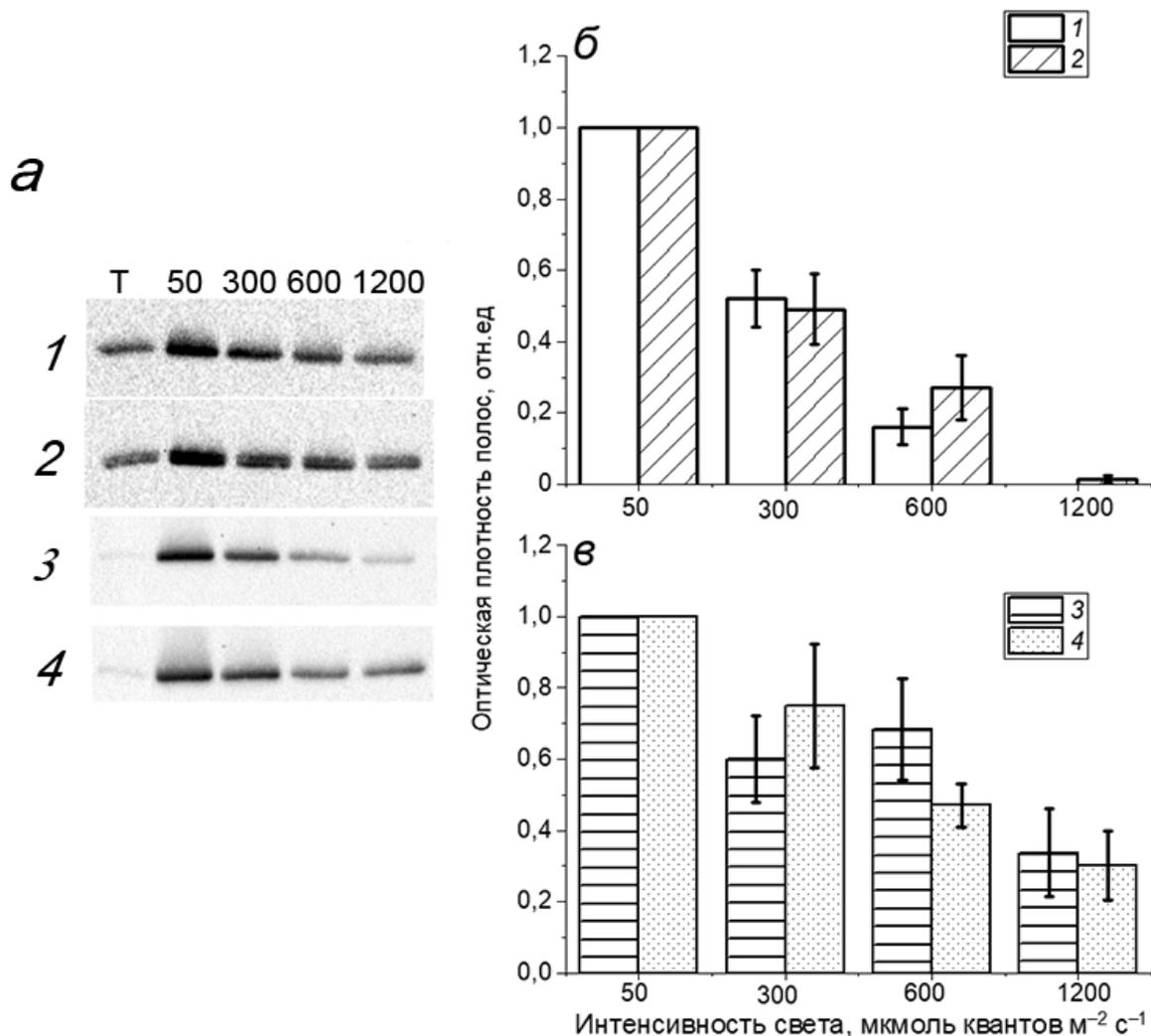


Рис. 2. *a* – Типичные иммуноблоты фосфорилированных белков Lhcb1P и Lhcb2P в листьях арабидопсиса дикого типа (1, 2) и ячменя (3, 4). Тилакоиды выделяли либо после 90 мин адаптации в темноте (Т), либо после 20 мин освещения светом с $\lambda_{\text{max}} = 640$ нм указанной интенсивности; *б, в* – относительная оптическая плотность полос, содержащих белки Lhcb1P (1, 3) и Lhcb2P (2, 4), в листьях арабидопсиса дикого типа (1, 2) и ячменя (3, 4). Оптическую плотность полос нормировали на максимальное значение, которое наблюдали после освещения листьев обоих видов растений светом 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Из оптической плотности после освещения вычитали оптическую плотность после адаптации к темноте. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка среднего (из трех измерений в четырех выращиваниях растений)

Результаты, представленные в предыдущих подразделах, показывают, что оценка перехода $C1 \rightarrow C2$ при освещении светом, возбуждающим преимущественно ФС2, по изменению отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 при температуре 77 К не способна достаточно определенно выявить различие между арабидопсисом и ячменем в зависимостях ИС от интенсивности этого света, т.к. происходит не связанное с ИС повышение данного отношения при увеличении интенсивности света. Уровень фосфорилированных белков, в свою очередь, не может служить прямой оценкой ИС, поскольку данные литературы свидетельствуют, что количество

белков Lhcb1P и Lhcb2P напрямую не коррелирует со степенью перехода $C1 \rightarrow C2$, т.к. некоторые уже фосфорилированные белки могут оставаться связанными с ФС2 [20–23].

Релаксация нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* листьев арабидопсиса и ячменя после освещения светом разной интенсивности. Типичные кривые релаксации NPQ после 20 мин освещения светом интенсивностью 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, возбуждающим преимущественно ФС2, т.е. в условиях максимального перехода $C1 \rightarrow C2$ в At-ДТ и Hv-Н₂O (что следует из рис. 1 и 2), представлены на рис. 3. Для выявления NPQ, связанного с пере-

ходом $C2 \rightarrow C1$, релаксацию NPQ сравнивали в At-ДТ (рис. 3, а, кривая 2) и в мутанте *At-stn7*, в котором пигментный аппарат при освещении оставался в состоянии $C1$ (рис. 3, а, кривая 3), а также в листьях ячменя, которые инкубировали либо в воде (*Hv-H₂O*) (рис. 3, б, кривая 2), либо в присутствии ингибитора фосфатазы NaF (*Hv-NaF*) (рис. 3, б, кривая 1); в последнем случае пигментный аппарат после освещения оставался в состоянии $C2$. Видно, что в *At-stn7* значение NPQ в первые минуты после выключения света ниже, чем в At-ДТ, что указывает на отсутствие вклада перехода $C1 \rightarrow C2$ в NPQ. При этом и в *Hv-NaF*, и в At-ДТ-NaF начальные темновые значения NPQ близки к таковым в *Hv-H₂O* и в At-ДТ, т.к. в этих листьях происходит переход $C1 \rightarrow C2$. Стационарные уровни NPQ в листьях, инкубированных в растворах NaF, т.е. с нарушенным переходом $C2 \rightarrow C1$, были выше, чем в листьях с «нормальным» протеканием этого процесса, поскольку часть ССК2, перешедшая к ФС1, оставалась связанной с этой фотосистемой, и к ФС2 поступало меньше энергии. Это обуславливало меньший уровень флуоресценции, чем до освещения, что отражалось в большей величине NPQ.

В листьях *At-stn7* (рис. 3, а, кривая 3) и в листьях At-ДТ-NaF (рис. 3, а, кривая 1) NPQ выходило на плато через 12–15 мин, в то время как в At-ДТ (рис. 3, а, кривая 2) уменьшение NPQ продолжалось. Следовательно, за 12–15 мин в листьях арабидопсиса дикого типа про-

исходила полная релаксация процессов, вызывающих NPQ, за исключением ИС. Существенно, что это время не зависело от способа нарушения ИС – отсутствие киназы STN7 или обработка NaF. Переход $C2 \rightarrow C1$ после освещения в первом случае не осуществлялся из-за отсутствия перехода $C1 \rightarrow C2$ на свету, а во втором – из-за ингибирования фосфатазы. В листьях ячменя при использовании обработки NaF для ингибирования перехода $C2 \rightarrow C1$ релаксация NPQ в листьях *Hv-NaF* выходила на плато через 6–9 мин (рис. 3, б, кривая 1), тогда как в листьях ячменя, инкубированных в воде, уменьшение NPQ продолжалось и после этого времени (рис. 3, б, кривая 2).

NPQ в листьях At-ДТ и *At-stn7* достигало в темноте нулевого значения, т.е. происходила полная релаксация NPQ. В листьях *Hv-H₂O* (рис. 3, б; табл. 2) и в листьях At-ДТ-*H₂O* (данные не приведены), т.е. перфорированных перед инкубацией в воде, NPQ достигало стационарных значений 0,03 и 0,02 соответственно, что, возможно, являлось следствием перфорации листьев. Как показало сходство релаксации NPQ в листьях *At-stn7* и At-ДТ-NaF, перфорация, однако, не влияла на кинетику перехода $C2 \rightarrow C1$. Близкие величины эффективного квантового выхода ФС2 в листьях *Hv-H₂O* и *Hv-NaF* (0,69 и 0,68 соответственно) свидетельствуют о том, что обработка листьев ячменя 10 мМ NaF не оказывала побочного влияния на перенос электронов в ФС2. В экспериментах с

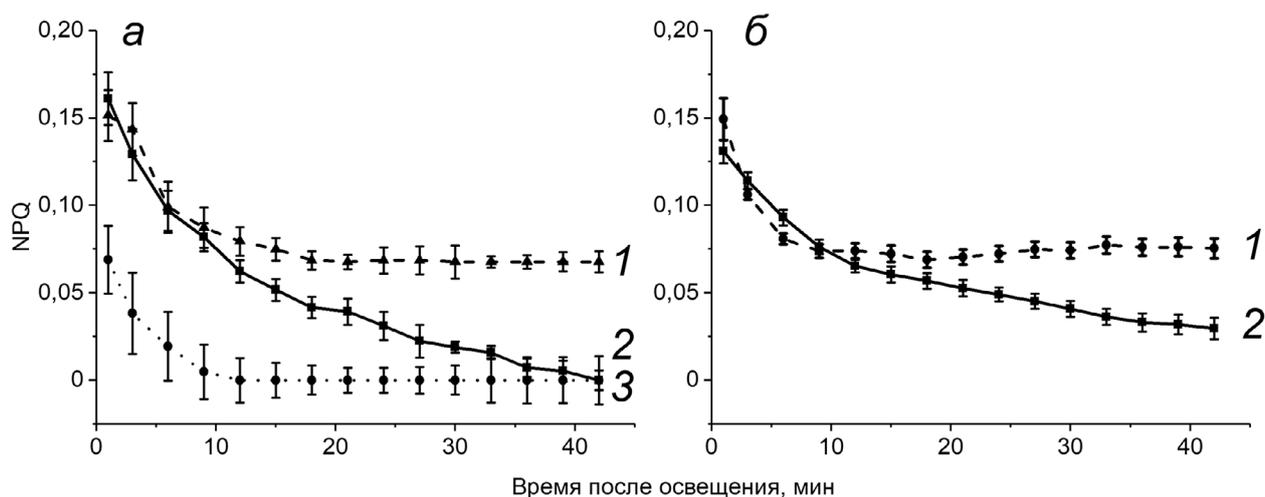


Рис. 3. Релаксация NPQ после 20 мин освещения светом с $\lambda_{\text{max}} = 640$ нм интенсивностью $50 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ растений, выдержанных перед освещением в темноте в течение 90 мин. а – 1 – Листья арабидопсиса дикого типа, инкубированные в 15 мМ NaF; 2 – листья арабидопсиса дикого типа; 3 – листья арабидопсиса с нокаутом гена *At1g68830*; б – 1 – листья ячменя, инкубированные в 10 мМ NaF; 2 – листья ячменя, инкубированные в воде. Представлены типичные зависимости, полученные усреднением трех измерений в одном из пяти выращиваний растений

Таблица 1. Влияние интенсивности света ($\lambda_{\max} = 640$ нм) при предварительном освещении им в течение 20 мин листьев арабидопсиса дикого типа (Арабидопсис, Ат-ДТ) и листьев мутанта арабидопсиса с нокаутом гена *Atlg68830* (Арабидопсис, Ат-*stn7*) на релаксацию нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) хлорофилла *a* после освещения

Интенсивность света, мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$	Арабидопсис, Ат-ДТ			Арабидопсис, Ат- <i>stn7</i>		
	NPQ (15')	NPQ (42')	NPQ (15') – NPQ (42')	NPQ (15')	NPQ (42')	NPQ (15') – NPQ (42')
50	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01
300	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01
600	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,01
1200	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Примечание. NPQ (15') и NPQ (42') – величины NPQ через 15 и 42 мин после выключения света. Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего (из трех измерений в типичном из пяти выращиваний растений).

Таблица 2. Влияние интенсивности света ($\lambda_{\max} = 640$ нм) при предварительном освещении им в течение 20 мин листьев ячменя, инкубированных в воде (Ячмень, Нв- H_2O), и листьев ячменя, инкубированных в 10 мМ NaF (Ячмень, Нв-NaF), на релаксацию нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) хлорофилла *a* после освещения

Интенсивность света, мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$	Ячмень, Нв- H_2O			Ячмень, Нв-NaF		
	NPQ (9')	NPQ (36')	NPQ (9') – NPQ (36')	NPQ (9')	NPQ (36')	NPQ (9') – NPQ (36')
50	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,00 ± 0,01
300	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,02 ± 0,01
600	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,04 ± 0,02
1200	0,40 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,15 ± 0,02

Примечание. NPQ (9') и NPQ (36') – величины NPQ через 9 и 36 мин после выключения света. Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего (из трех измерений в типичном из пяти выращиваний растений).

листьями арабидопсиса обработка 15 мМ NaF не влияла на этот параметр (см. «Методы исследования»).

Переход $\text{C2} \rightarrow \text{C1}$ начинается после прекращения освещения, но релаксация NPQ, связанная с переходом $\text{C2} \rightarrow \text{C1}$, может быть оценена только как разница в уровнях релаксации NPQ в Ат-ДТ и Ат-*stn7* для арабидопсиса и Нв- H_2O и Нв-NaF для ячменя. Для выявления перехода $\text{C2} \rightarrow \text{C1}$ использовали релаксацию NPQ после 15 мин темноты в Ат-ДТ и после 9 мин темноты в Нв- H_2O . Поскольку после освещения светом интенсивностью 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ NPQ в Ат-ДТ релаксировало полностью, т.е. достигало минимального значения, через 42 мин после выключения света, а в Нв- H_2O – через 36 мин, и для оценки NPQ, связанного с переходом $\text{C2} \rightarrow \text{C1}$ в этих растениях, были выбраны разности (NPQ (15') – NPQ (42')) для арабидопсиса и (NPQ (9') – NPQ (36')) для ячменя.

При интенсивностях света, превышающих 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, релаксация других процессов, приводящих к NPQ, за время наблюдения не завершалась (см. ниже). Однако те же временные рамки, что и после освещения 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, были использованы

для относительной оценки ИС при других интенсивностях света, чтобы сравнить релаксацию NPQ, связанную с ИС (возможно, более быструю при более высоких интенсивностях света, как можно было предположить из рис. 1 и 2), при всех интенсивностях света, поскольку ключевым для оценки вклада перехода $\text{C2} \rightarrow \text{C1}$ в релаксацию NPQ было сравнение релаксации NPQ в листьях, в которых этот переход протекал, и в листьях, в которых он отсутствовал.

Значение (NPQ (15') – NPQ (42')) в Ат-ДТ было выше, чем в Ат-*stn7*, только при 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, а при 300, 600 и 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ оно было практически одинаковым в Ат-*stn7* и Ат-ДТ (табл. 1). Это указывает на то, что при 300, 600 и 1200 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ переход $\text{C2} \rightarrow \text{C1}$ или отсутствовал, или был настолько мал, что не регистрировался в интервале от 15-й до 42-й мин темноты, следовательно, на свету отсутствовал переход $\text{C1} \rightarrow \text{C2}$. Поскольку значения NPQ не были равны нулю к 42-й минуте темноты после освещения светом, превышающим 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, как в Ат-ДТ, так и в мутанте, релаксация других процессов, ведущих к NPQ, к этому моменту, как уже отмечалось, не завершалась.

В ячмене разница ($NPQ(9') - NPQ(36')$) была выше в $Hv-H_2O$, чем в $Hv-NaF$, не только при 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, но и при 300 и 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, и была близка в $Hv-NaF$ и в $Hv-H_2O$ только при 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (табл. 2). Таким образом, в отличие от арабидопсиса, переход $S2 \rightarrow S1$ в ячмене имел место не только при 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, но и при 300 и 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$. Высокие значения NPQ и в $Hv-NaF$, и в $Hv-H_2O$ через 36 мин после освещения светом интенсивностью 300, 600 и 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ свидетельствуют о возникновении при этих интенсивностях света длительно релаксирующего тушащего состояния, например, фотоингибирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разница между ИС в растениях арабидопсиса и ячменя не была выявлена достаточно определенно с помощью измерения низкотемпературных спектров флуоресценции Хл *a*, хотя такие измерения считаются стандартным подходом к оценке ИС. Высокие величины отношения пиков флуоресценции $ФC1/ФC2$ при 600 и 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ в *At-ДТ* (рис. 1, б) не коррелировали с уровнем накопления белков *Lhcb1P* и *Lhcb2P* (рис. 2, б): при 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ их уровень составлял лишь 15–25% от уровня, наблюдаемого при 50 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, когда процесс ИС был максимальным, а при 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ в этих растениях практически отсутствовало светоиндуцируемое накопление белков *Lhcb1P* и *Lhcb2P*. У ячменя очень высокое отношение пиков флуоресценции $ФC1/ФC2$ при 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (рис. 1, б) наблюдалось также при невысоком уровне накопления белков *Lhcb1P* и *Lhcb2P*, которое составляло лишь 30% от максимального уровня (рис. 2, в).

Таким образом, данные о накоплении фосфорилированных белков *Lhcb1* и *Lhcb2* при освещении подтверждают вывод о том, что резкое увеличение отношения пиков $ФC1/ФC2$ после освещения светом 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, происходящее и в *At-ДТ*, и в *At-stn7*, не связано с перераспределением светособирающих комплексов между фотосистемами, т.е. не может быть отнесено к переходу $S1 \rightarrow S2$. На данный момент мы не можем дать исчерпывающее объяснение резкому увеличению отношения пиков флуоресценции $ФC1/ФC2$ после освещения листьев растений обоих видов светом 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (рис. 1, б). В то же время можно отметить, что после освещения светом

1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ как в *At-ДТ*, так и в *At-stn7*, и особенно в ячмене, даже после длительного периода темноты, сохранялась значительная величина NPQ (табл. 1 и 2), что может свидетельствовать о возникновении фотоингибирования. В работе Mekala et al. [18] освещение целых растений белым светом 1000 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, возбуждающим обе фотосистемы, даже в течение 2 ч, не привело к такому увеличению отношения пиков флуоресценции $ФC1/ФC2$, как на рис. 1, б. Причина такого различия состоит, очевидно, в том, что в наших экспериментах листья освещались светом, в основном поглощаемым $ФC2$, что приводило к высокому уровню восстановления переносчиков фотосинтетической электрон-транспортной цепи ($ФЭТЦ$) и создавало условия для фотоингибирования $ФC2$ [24]. Поэтому, вероятно, именно фотоингибирование обуславливало резкое увеличение отношения пиков флуоресценции $ФC1/ФC2$ на свету интенсивностью 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$. Некоторое увеличение этого отношения вследствие фотоингибирования проявляется уже при 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (рис. 1, б). Таким образом, в случае применения света, возбуждающего преимущественно $ФC2$, для исследования классического процесса ИС необходимо учитывать, что увеличение отношения пиков флуоресценции $ФC1/ФC2$ при высокой интенсивности света не является следствием этого процесса.

Разница в протекании ИС у арабидопсиса и ячменя была выявлена при изучении фосфорилирования белков *Lhcb1* и *Lhcb2* на свету. В ячмене относительные уровни этих белков в фосфорилированном состоянии (по сравнению с таковыми в темноте) при интенсивностях света 300, 600 и 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ были заметно выше, чем в *At-ДТ* (рис. 2, б, в). Как уже отмечалось выше, степень перехода $S1 \rightarrow S2$ не может быть напрямую сопоставлена с количеством белков *Lhcb1P* и *Lhcb2P*, хотя наличие этих белков служит необходимым условием процесса ИС. Поэтому наблюдаемое различие между арабидопсисом и ячменем в фосфорилировании белков *ССК2* при одинаковой интенсивности света отражает возможную разницу в активности киназы у этих растений. Отличия в количестве фосфорилированных белков в листьях арабидопсиса и ячменя после выдерживания растений в темноте позволяют также предположить отличия и в активности фосфатазы.

В дополнение к различию в фосфорилировании белков *Lhcb1* и *Lhcb2* на свету в листьях арабидопсиса и ячменя были обнаружены различия в релаксации ИС после освещения. Следует отметить, что, по данным Leoni et al. [16],

фосфорилирование белков начинается уже в первые секунды освещения светом, преимущественно возбуждающим ФС2, причем Lhcb2 фосфорилируется быстрее, чем Lhcb1; однако максимальное накопление обоих фосфорилированных белков достигается после 20 мин освещения. Обратный переход С2 → С1 происходит еще медленнее; после достижения максимального перехода С1 → С2 освещение светом, преимущественно возбуждающим ФС1, т.е. в условиях, в наибольшей степени способствующих переходу С2 → С1, вызывало 90%-ное восстановление гранальной структуры тилакоидов только через 30 мин [15]. В арабидопсисе после освещения светом интенсивностью 300 и 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ переход С2 → С1 не выявлялся уже после 15 мин темноты (табл. 1). Это указывает на то, что переход С1 → С2 в At-ДТ при таких интенсивностях света был незначительным или вообще отсутствовал. Однако, как было отмечено в разделе «Результаты исследования», в пользу наличия перехода С1 → С2 в At-ДТ при 300 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ может свидетельствовать заметный уровень фосфорилированных белков при этой интенсивности света и более высокое отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2, чем в At-*stn7*. Проявление перехода С1 → С2 при 77 К и отсутствие проявления перехода С2 → С1 при релаксации NPQ после освещения 300 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ — результат немедленного замораживания листьев после освещения в первом случае и регистрации перехода С2 → С1 только через 15 мин темноты. Если переход С1 → С2 на свету при этой интенсивности света был незначителен, то переход С2 → С1 через 15 мин темноты мог завершиться. В ячмене, в отличие от арабидопсиса, переход С2 → С1 хорошо выявлялся и при 300, и при 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ (табл. 2). Такая разница между ячменем и арабидопсисом хорошо коррелировала с накоплением белков Lhcb1P и Lhcb2P в этих растениях. Разница в ИС у ячменя и арабидопсиса могла бы быть обусловлена разным возрастом растений: 2 недели для ячменя и 5–6 недель для арабидопсиса. Однако листья двухнедельного ячменя и листья третьего яруса арабидопсиса имели практически одинаковую толщину, и мы не установили какой-либо существенной разницы в содержании хлорофилла на единицу площади листьев и в величинах квантового выхода ФС2. Вопрос о влиянии возраста растений и листьев на ИС остается открытым и требует специального исследования.

Таким образом, только применение двух подходов, а именно исследования релаксации NPQ и оценки уровня Lhcb1P и Lhcb2P, позволило сделать вывод о том, что существует разница в протекании ИС у ячменя и арабидопсиса. Процесс ИС в ячмене наблюдался при 50, 300 и 600 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$ и отсутствовал только при 1200 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$, в то время как в растениях арабидопсиса его подавление происходило уже при интенсивностях света, близких к 300 мкмоль квантов $m^{-2} c^{-1}$. Накопление фосфорилированных белков, очевидно, определяет глубину ИС, а уровень этого накопления зависит от активностей как киназы, так и фосфатазы. Поскольку эти ферменты расположены в тилакоидной мембране, их активность зависит от функционирования путей электронного переноса в ФЭТЦ. При одинаковой интенсивности света функционирование ФЭТЦ в арабидопсисе и ячмене может различаться, в частности, по скорости продукции АФК (например, продукция АФК в тилакоидах овса значительно превышает таковую в тилакоидах гороха [25]). Возможно, именно различие в функционировании ФЭТЦ в арабидопсисе и ячмене обуславливает различие во влиянии интенсивности света на ИС.

Процесс ИС имеет решающее значение для растений, поскольку позволяет им быстро регулировать распределение энергии между фотосистемами, приспосабливаясь к резким изменениям условий освещения. Полученные в работе результаты показали, что при одинаковых интенсивностях света этот процесс в ячмене и арабидопсисе происходит по-разному. Такое различие в протекании ИС может отражать генетически закрепленное приспособление растений этих видов к разным условиям обитания.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (гранты № 17-14-01371 и 17-76-10058).

Благодарности. Мы благодарны проф. Дарио Лейстеру (Ludwig-Maximilians-Universität, München), за предоставление семян арабидопсиса с нокаутом гена, кодирующего киназу STN7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rochaix, J.-D., Lemeille, S., Shapiguzov, A., Samol, I., Fucile, G., Willig, A., and Goldschmidt-Clermont, M. (2012) Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **367**, 3466–3474, doi: 10.1098/rstb.2012.0064.
- Allen, J.F. (2003) Botany. State transitions – a question of balance, *Science*, **299**, 1530–1532, doi: 10.1126/science.1082833.
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., and Leister, D. (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHC2 dephosphorylation and thylakoid electron flow, *PLoS Biol.*, **8**, e1000288, doi: 10.1371/journal.pbio.1000288.
- Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I., Andres, C., Kessler, F., Rochaix, J.-D., Vener, A.V., and Goldschmidt-Clermont, M. (2010) The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4782–4787, doi: 10.1073/pnas.0913810107.
- McCormac, D.J., Bruce, D., and Greenberg, B.M. (1994). State transitions, light-harvesting antenna phosphorylation and light-harvesting antenna migration *in vivo* in the higher plant *Spirodela oligorrhiza*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1187**, 301–312, doi: 10.1016/0005-2728(94)90004-3.
- Bennett, J. (1979) Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent, *FEBS Lett.*, **103**, 342–344, doi: 10.1016/0014-5793(79)81358-7.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R., and Bjorkman, O. (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion, *Plant Cell*, **10**, 1121–1134, doi: 10.1105/tpc.10.7.1121.
- Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Kong, S.G., Wada, M., and Bassi, R. (2013) Interaction between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in Arabidopsis, *Plant J.*, **76**, 568–579, doi: 10.1111/tbj.12314.
- Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Muller, M., Holzwarth, A.R., and Jahns, P. (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in Arabidopsis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 466–475, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.001.
- Tikkanen, M., Piippo, M., Suorsa, M., Sirpio, S., Mulo, P., Vainonen, J., Vener, A., Allahverdiyeva, Ya., and Aro, E.M. (2006) State transitions revisited—a buffering system for dynamic low light acclimation of Arabidopsis, *Plant Mol. Biol.*, **62**, 779–793, doi: 10.1007/s11103-006-9088-9.
- Fernyhough, P., Horton, P., and Foyer, C. (1984) In *Advances in photosynthesis research*, Springer, Dordrecht, pp. 299–302, doi: 10.1007/978-94-017-4973-2_68.
- Demmig, B., Cleland, R.E., and Bjorkman, O. (1987) Photoinhibition, 77 K chlorophyll fluorescence quenching and phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll-protein complex of photosystem II in soybean leaves, *Planta*, **172**, 378–385, doi: 10.1007/BF00398667.
- Horton, P., and Hague, A. (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **932**, 107–115, doi: 10.1016/0005-2728(88)90144-2.
- Rintamaki, E., Salonen, M., Suoranta, U.M., Carlberg, I., Andersson, B., and Aro, E.M. (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins, *J. Biol. Chem.*, **272**, 30476–30482, doi: 10.1074/jbc.272.48.30476.
- Chuartzman, S.G., Nevo, R., Shimoni, E., Charuvi, D., Kiss, V., Ohad, I., Brumfeld, V., and Reich, Z. (2008) Thylakoid membrane remodeling during state transitions in Arabidopsis, *Plant Cell*, **20**, 1029–1039, doi: 10.1105/tpc.107.055830.
- Leoni, C., Pietrzykowska, M., Kiss, A.Z., Suorsa, M., Ceci, L.R., Aro, E.M., and Jansson, S. (2013) Very rapid phosphorylation kinetics suggest a unique role for Lhcb2 during state transitions in Arabidopsis, *Plant J.*, **76**, 236–246, doi: 10.1111/tbj.12297.
- Ignatova, L.K., Rudenko, N.N., Mudrik, V.A., and Ivanov, B.N. (2011) Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII, *Photosynth. Res.*, **110**, 89–98, doi: 10.1007/s11120-011-9699-0.
- Mekala, N.R., Suorsa, M., Rantala, M., Aro, E.M., and Tikkanen, M. (2015) Plants actively avoid state transitions upon changes in light intensity: role of light-harvesting complex II protein dephosphorylation in high light, *Plant Physiol.*, **168**, 721–734, doi: 10.1104/pp.15.00488.
- Trotta, A., Suorsa, M., Rantala, M., Lundin, B., and Aro, E.M. (2016) Serine and threonine residues of plant STN7 kinase are differentially phosphorylated upon changing light conditions and specifically influence the activity and stability of the kinase, *Plant J.*, **87**, 484–494, doi: 10.1111/tbj.13213.
- Damkjaer, J.T., Kereiche, S., Johnson, M.P., Kovacs, L., Kiss, A.Z., Boekema, E.J., Ruban, A.V., Horton, P., and Jansson, S. (2009) The photosystem II light-harvesting protein Lhcb3 affects the macrostructure of photosystem II and the rate of state transitions in Arabidopsis, *Plant Cell*, **21**, 3245–3256, doi: 10.1105/tpc.108.064006.
- Tikkanen, M., Grieco, M., Kangasjärvi, S., and Aro, E.M. (2010) Thylakoid protein phosphorylation in higher plant chloroplasts optimizes electron transfer under fluctuating light, *Plant Physiol.*, **152**, 723–735, doi: 10.1104/pp.109.150250.
- Wientjes, E., van Amerongen, H., and Croce, R. (2013) LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1827**, 420–426, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.009.
- Zhang, S., and Scheller, H.V. (2004) Light-harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I, *J. Biol. Chem.*, **279**, 3180–3187, doi: 10.1074/jbc.M311640200.
- Osmond, C.B. (1981) Photorespiration and photoinhibition: some implications for the energetics of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **639**, 77–98, doi: 10.1016/0304-4173(81)90006-9.
- Шмелева В.Л., Иванов Б.Н., Пигулевская Т.К., Чернавина И.А. (1984) Электронный транспорт и фотофосфорилирование в хлоропластах растений овса при избытке цинка в среде выращивания, *Физиол. и биохим. культурных растений*, **16**, 31–37.

COMPARISON OF STATE TRANSITIONS OF THE PHOTOSYNTHETIC ANTENNAE IN ARABIDOPSIS AND BARLEY AT VARIOUS LIGHT INTENSITIES

D. V. Vetoshkina, M. A. Kozuleva, V. V. Terentyev, E. M. Zhurikova,
M. M. Borisova-Mubarakshina, and B. N. Ivanov*

*Institute of Basic Biological Problems, Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences»,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: ivboni@rambler.ru*

Received April 23, 2019

Revised May 23, 2019

Accepted May 23, 2019

Changes in light energy distribution between photosystems I and II (PSI and PSII) owing to reversible moving of part of light-harvesting complex (LHCII) between the photosystems (state transitions, ST) have been studied in leaves of barley (*Hordeum vulgare*) and arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) under short-term illumination with light of various intensity exciting mainly PSII. Light-induced changes in the ratio of maxima at 745 and 685 nm in a low-temperature (77 K) spectrum of chlorophyll *a* fluorescence, which characterize an absorption of energy by PSI and PSII, respectively, did not reveal the distinction in ST in barley and arabidopsis at various light intensities; moreover, we found that the change in the ratio of these maxima by high-intensity light was not connected to ST at all. The light-induced accumulation of phosphorylated LHCII proteins, Lhcb1 и Lhcb2, involved in relocation of part of LHCII from PSII to PSI, decreased in leaves of both plant species under increase in light intensity, being higher in barley compared to arabidopsis at all intensities. The relaxation of non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence (NPQ) following illumination that indicates the return of part of LHCII from PSI to PSII was observed in the broader region of increasing light intensities in barley compared to arabidopsis. The differences in the levels of accumulation of phosphorylated proteins Lhcb1 and Lhcb2 as well as in the characteristics of NPQ relaxation following illumination have revealed that in barley leaves the ST process occurs not only at low- but also at high-intensity light, when it is absent in arabidopsis leaves.

Keywords: arabidopsis, barley, photosynthesis, phosphorylation of antenna proteins, chlorophyll *a* fluorescence