*БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 10, с. 1761 – 1774*

*УДК 577.352.4*

# ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА В ХЛОРОПЛАСТАХ *Chara in vivo*

**© 2023 А.А. Булычев*, С.Ю. Шапигузов, А.В. Алова**

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: bulychev@biophys.msu.ru*

Поступила в редакцию 31.05.2023
После доработки 30.06.2023
Принята к публикации 02.07.2023

Потенциалы действия растительных клеток участвуют в регуляции многих клеточных процессов, включая фотосинтез и течение цитоплазмы. Возбудимые клетки харовых водорослей, находясь в средах с повышенным содержанием $K^+$, способны генерировать гиперполяризационные электрические сигналы. Активный ответ плазмалеммы возникает при пропускании входящего электрического тока, сравнимого по величине с природными токами, циркулирующими в освещенных междоузлиях *Chara*. В литературе отсутствуют сведения о влиянии гиперполяризационных ответов *Chara* на активность фотосинтеза. В данной работе показано, что гиперполяризационный сдвиг мембранного потенциала клетки, вызывающий поток $K^+$ в цитоплазму, сопровождается задержанным снижением выхода фактической флуоресценции хлорофилла (*F′*) и максимального выхода ($F_m'$) на фоновом свету с интенсивностью 12,5 мкмоль/м$^2$·с. Переходные изменения *F′* и $F_m'$ проявлялись только в освещенных клетках, что свидетельствует об их тесной связи с фотосинтетическим преобразованием энергии в хлоропластах. Пропускание входящего тока вызывало также возрастание pH у поверхности клетки ($pH_o$), что служит показателем высокой $H^+/OH^-$-проводимости плазмалеммы и указывает на снижение pH цитоплазмы при поступлении в клетку протонов. Сдвиги $pH_o$ проявлялись лишь в ответ на первый гиперполяризующий импульс, но исчезали при повторной стимуляции, что свидетельствует о длительной инактивации $H^+/OH^-$-проводимости плазмалеммы. Подавление потоков $H^+$ через плазмалемму не устраняло гиперполяризационные ответы и анализируемые изменения флуоресценции хлорофилла. Результаты указывают на участие потоков $K^+$ между средой, цитоплазмой и стромой в изменениях состояния хлоропластов, выявляемых по динамике выхода флуоресценции *F′* и $F_m'$.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Chara*, электрические сигналы, гиперполяризация, $K^+$-проводимость плазмалеммы, изменения флуоресценции хлорофилла, транспорт $H^+$, взаимодействия плазмалеммы и хлоропластов.

**DOI:** 10.31857/S0320972523100044, **EDN:** OSQNJB

## ВВЕДЕНИЕ

Многие процессы растительной клетки, такие как фотосинтез, передача сигналов и внутриклеточная регуляция, связаны с изменением электрических потенциалов на плазмалемме и мембранах органелл. Возбудимые мембраны генерируют потенциалы действия в ответ на механическую, химическую и электрическую стимуляцию. Мембраны тилакоидов осуществляют фотосинтетический транспорт электронов (ФТЭ), сопряженный с переносом $H^+$ и генерацией фотопотенциала. В лаборатории Л.А. Драчева был предложен эффективный способ изучения электрогенеза фототрофных бактерий с использованием полимерных пленок и адсорбированных пигмент-белковых комплексов и хроматофоров [1]. Действие коротких вспышек позволяло устранить ряд кинетических ограничений, таких как темновая инактивация акцепторного участка фотосистемы I (ФСI) и

Принятые сокращения: ГО – гиперполяризационный ответ; ИПВ – искусственная прудовая вода; КВ – квантовый выход переноса электронов; ПД – потенциал действия; ФТЭ – фотосинтетический транспорт электронов; Фл – флуоресценция; ФС – фотосистема; ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл; NPQ – нефотохимическое тушение; $pH_o$ – pH в примембранных слоях среды.

* Адресат для корреспонденции.

замедление ФТЭ при повышении ΔpH в тилакоидах. Вместе с тем лимитирующие факторы существенно влияют на ФТЭ в изолированных пластидах и хлоропластах целых клеток, модулируя индукционные кривые мембранного потенциала и флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл) [2, 3]. В связи с этим понятен интерес к изучению путей регуляции ФТЭ *in vivo*, которые намного разнообразнее, чем в препаратах тилакоидов и интактных пластид. Влияние электрических сигналов плазмалеммы на фотосинтез представляет один из аспектов этой проблемы.

Метод импульсно модулированной микрофлуориметрии позволяет судить о квантовом выходе фотореакции ФСII (КВ ФСII) и скорости линейного ФТЭ на микроучастках клетки, а также следить за быстрыми изменениями нефотохимического тушения (NPQ), которые отражают величину ΔpH в тилакоидах. Исследования возбудимых клеток водоросли *Chara* выявили участие электрогенеза плазмалеммы в регуляции потока электронов при фотосинтезе. Генерация потенциала действия (ПД) в освещенных клетках вызывала быстрое (~30 с) снижение КВ ФСII с амплитудой до 50% от исходного уровня, а также возрастание NPQ на период до 15 мин [4, 5]. Очевидно, что состав компонентов цитоплазмы (ионов и метаболитов) весьма лабилен и зависит от состояния ионных каналов плазмалеммы. Опыты с чередованием локального и общего освещения клетки говорят о том, что пространственная неоднородность цитоплазмы, обусловленная наличием фотосинтетически активных и неактивных зон, остается скрытой в стационарных условиях при регистрации Фл на заданном участке клетки, но проявляется после обратимой остановки циклоза при возбуждении [6].

Изменения состава цитоплазмы представляют лишь одно звено в цепи трансформации сигнала плазмалеммы до функциональных проявлений на уровне хлоропластов. Важной стадией в каскаде событий является перенос в строму из цитоплазмы агентов-посредников, к которым относятся прежде всего $H^+$ и $Ca^{2+}$ [7, 8]. Влияние $Ca^{2+}$ на Фл Хл опосредовано его действием на активность ферментов и сопутствующими сдвигами pH в строме и люмене. При генерации ПД в клетках растений уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ повышается от 0,1 до 10–40 мкМ [9]. Это способствует поступлению $Ca^{2+}$ в освещенные пластиды под влиянием отрицательного потенциала стромы [10]. Известно, что повышение $[Ca^{2+}]$ в строме подавляет реакции цикла Кальвина и потребление в этих реакциях ATP и NADPH [11]. При этом возрастает ΔpH в тилакоидах, что усиливает NPQ и замедляет линейный поток электронов [12].

Внутренняя мембрана оболочки хлоропластов содержит ионные каналы, проницаемые для одно- и двухвалентных катионов, а также системы обменного транспорта $K^+/H^+$ (KEA1/2) [13–15]. Важная роль ионного обмена, опосредованного транспортерами KEA1/2, выявляется по нарушениям фотосинтеза при выращивании мутантных растений на средах с разным солевым составом. В опытах с выделенными хлоропластами показано, что удаление $K^+$ из наружной среды понижает pH стромы и замедляет фотосинтетическое выделение $O_2$ в связи с $K^+/H^+$-обменом [16]. Вместе с тем остается неясным, сказываются ли воздействия, повышающие уровень $K^+$ в цитоплазме и строме пластид, на функциональных параметрах хлоропластов в краткосрочных опытах *in vivo*.

Электрическая активность клеток харовых водорослей не ограничена генерацией ПД. Стимуляция клеток входящим электрическим током в средах с повышенным содержанием $K^+$ вызывает активный гиперполяризационный ответ (ГО), представленный немонотонными изменениями мембранного потенциала [17, 18]. Важно отметить, что индуцирующие гиперполяризацию токи сравнимы по величине с природными круговыми электрическими токами освещенных клеток. Наблюдаемый в ходе ГО сдвиг мембранного потенциала обусловлен частичной инактивацией $K^+$-проводимости, а также параллельным включением других мало изученных электрогенных механизмов. Сведения о возможном влиянии ГО у харовых водорослей на Фл Хл в настоящее время отсутствуют. Однако они представляют интерес, поскольку потоки ионов, связанные с этим сигналом плазмалеммы, кардинально отличаются от потоков, запускаемых при ПД. В ходе измерений ГО исследуемая часть клетки находится в среде с концентрацией $K^+$ ~100 мМ и полностью деполяризована. Отрицательный сдвиг потенциала цитоплазмы при пропускании входящего тока заставляет $K^+$ поступать внутрь в количествах, превышающих потоки других ионов. Это связано с высокой проницаемостью мембраны для $K^+$ и высокой концентрацией $K^+$ в среде. Благодаря транспортерам мембран оболочки накопление $K^+$ в цитоплазме должно индуцировать поступление $K^+$ в строму хлоропласта в обмен на удаление $H^+$ из стромы. В таком случае ГО может модулировать Фл хлоропластов при участии $K^+/H^+$-обмена через оболочку пластид.

В данной работе изучено влияние электрических сигналов плазмалеммы *Chara* и *Nitella* на Фл Хл как показатель состояния фотосинтетического аппарата (ФСА). Показано действие гиперполяризации на выход фактической флуоресценции ($F'$) и максимальный выход ($F_m'$) на фоновом свету. Результаты выявляют связи между ГО плазмалеммы, потоками $H^+$ из среды в цитоплазму и параметрами Фл хлоропластов, что расширяет сведения о путях регуляции фотосинтеза при участии электрической активности плазмалеммы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на клетках междоузлий харовых водорослей *Chara australis* R. Br. и *Nitella translucens* (Pers.) C.Agardh. Культуры были получены из лаборатории профессора Ilse Foissner (University of Salzburg). Водоросли выращивали в стеклянных сосудах при комнатном освещении. Интернодальные клетки длиной 40–50 мм и диаметром 0,9 мм и 0,3 мм (для *Chara* и *Nitella* соответственно) вырезали из побега и помещали в искусственную прудовую воду (ИПВ), содержащую 0,1 мМ KCl, 1 мМ NaCl и 0,1 мМ $CaCl_2$. В подготовленный раствор вносили $NaHCO_3$ для доведения pH до 7,0. Изолированные клетки выдерживали в ИПВ не менее суток после их отделения от примыкающих междоузлий.

Закончившие рост междоузлия *Chara* структурно неоднородны. В цитоплазме по длине междоузлия чередуются области с высоким и низким содержанием харасом – особых органелл с высоким содержанием $H^+$-АТРазы, способствующих поступлению в клетки субстрата фотосинтеза ($CO_2$) [19]. Неоднородные свойства проявляются также в чередовании вдоль оси кальцинированных и свободных от кристаллов областей на поверхности клетки. Кальцинированные области, как правило, располагаются в участках с низкой активностью фотосинтеза и высоким pH в примембранных слоях среды. Измерения Фл хлоропластов и мембранного потенциала плазмалеммы проводили в некальцинированных или слабо кальцинированных участках клеток.

Интернодальную клетку укрепляли в трехсекционной прозрачной камере (рис. 1), которую помещали на столик инвертированного микроскопа Axiovert 25-CFL («Zeiss», Германия), оснащенного микрофлуориметром Microscopy-PAM («Walz», Германия). Между секциями камеры имелись воздушные полости диаметром 4 мм, служившие для электрической изоляции отсеков. Площадь поверхности клетки *Chara* в центральной секции составляла примерно 0,1 $см^2$. Раствор в центральном отсеке контактировал с электродом сравнения Ag/AgCl (площадь поверхности ~15 $см^2$) через гибкий солевой мостик, заполненный раствором 1 М KCl с добавлением 2% агара. Разность потенциалов на плазмалемме измеряли с помощью капиллярных микропипеток из стекла пирекс. Измерения проводили в средней части клетки, расположенной в центральном отсеке. Разность потенциалов регистрировали электрометрическим усилителем У5-9 («НПО им. В.И. Ленина», Минск, СССР); напряжение с выхода усилителя поступало на аналого-цифровой преобразователь (PCI-6024E, «National Instruments», США) и монитор компьютера.

В боковых отсеках камеры находились соединенные между собой электроды Ag/AgCl, к которым через нагрузочное сопротивление 1,2 МОм прикладывали командное напряжение от АЦП (PCI-6024E) для пропускания ступени тока. Сила тока варьировала от 3 до 8 мкА, что соответствовало плотности тока от 30 до 80 мкА/$см^2$ в центральной части клетки *Chara*.

Флуоресценцию Хл измеряли на участках клеток диаметром ~100 мкм. Выход фактической флуоресценции $F'$ при фоновом освещении клетки измеряли с помощью модулированного синего света, излучаемого светодиодом устройства Microscopy-PAM («Walz», Германия).

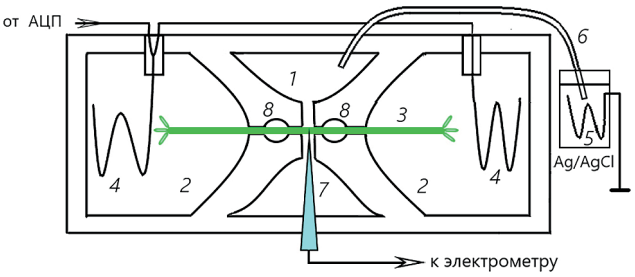


**Рис. 1.** Схема расположения интернодальной клетки и электродов в трехсекционной экспериментальной камере. *1* – Центральный отсек, заполненный средой с повышенной концентрацией KCl; *2* – боковые отсеки, заполненные искусственной прудовой водой; *3* – интернодальная клетка водоросли *Chara* (*Nitella*); *4* – электроды Ag/AgCl, используемые для пропускания электрического тока; *5* – электрод сравнения Ag/AgCl, общий для измерительной цепи и пути пропускания тока; *6* – гибкий солевой мостик; *7* – электродный микродатчик (капиллярный внутриклеточный электрод для измерения мембранного потенциала плазмалеммы или pH-чувствительный внеклеточный микроэлектрод для измерения локальных сдвигов pH на поверхности клетки); *8* – воздушные полости, обеспечивающие электрическую изоляцию между центральным и боковыми отсеками

Вспышки измерительного света длительностью 5 мкс следовали с частотой 24 Гц. Длительность насыщающих вспышек, создаваемых тем же светодиодом, составляла 800 мс. Перед входным окном фотоумножителя был расположен красный светофильтр RG645 толщиной 2 мм («Schott», Германия). Подробное описание устройства Microscopy-PAM можно найти на сайте компании «Walz» (https://www.walz.com/downloads.html); особенности измерения выхода флуоресценции хлорофилла на одиночных клетках описаны в работе Goh et al. [20]. Общее фоновое освещение клетки создавали верхним осветителем микроскопа, свет от которого проходил через сине-зеленый (СЗС-22, $\lambda < 580$ нм) и нейтральный (НС-3) светофильтры. Интенсивность фоновой подсветки составляла 12,5 мкмоль квантов/м$^2$·с. Эффективный КВ переноса электронов в ФСII находили с помощью насыщающих световых импульсов и программы WinControl-3 («Walz», Германия). Значения КВ ФСII (YII) на фоновом свету в контрольных условиях составляли 0,7–0,745. Выходной сигнал ФЭУ обрабатывали в программах WinControl-3 и WinWCP («Strathclyde Electrophysiology», Великобритания) и выводили на монитор компьютера.

Влияние гиперполяризационного ответа на максимальный выход флуоресценции $F_m'$ изучали с применением насыщающих световых импульсов, разделенных интервалами 10 с. Включение серии насыщающих импульсов обычно сопровождалось заметным снижением амплитуды $F_m'$. В связи с этим клетку стимулировали ступенчатым импульсом тока после замедления вызванного вспышками падения $F_m'$.

Величину pH у поверхности клетки ($pH_o$) измеряли с помощью $H^+$-специфичных сурьмяных микроэлектродов в стеклянной изоляции и электрометрического усилителя У5-9 [4]. При обработке исходных показаний микродатчика pH вычитали постоянное падение напряжения, создаваемое током на последовательном сопротивлении среды, солевого мостика и электрода сравнения.

В работе использовали раствор цитохалазина D («Sigma», США) в диметилсульфоксиде (ДМСО), который разводили до конечной концентрации 10–20 мкМ. Конечная концентрация ДМСО не превышала 0,2%. В данной концентрации ДМСО не оказывает влияния на параметры Фл Хл, мембранный потенциал и скорость движения цитоплазмы.

На рисунках приведены результаты типичных опытов, выполненных не менее чем на четырех клетках. Усредненные кинетические кривые сдвигов $F'$ со стандартными ошибками представлены с указанием общего числа измерений ($n$) на разных клетках ($N$). Для усреднения значений $F'$, полученных на разных клетках, кинетические кривые нормировали на средние уровни флуоресценции в интервале времени 0–25 с, регистрируемые до приложения импульса тока. Усредненная кинетика $F_m'$ для разных клеток получена после нормирования значений $F_m'$ в ответ на первый насыщающий импульс в серии из 30 вспышек.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мембранный потенциал освещенных клеток *Chara* в стандартных условиях (клетки, омываемые ИПВ) составлял от –170 до –210 мВ. Стимуляция клетки деполяризующим импульсом тока (2 мкА, 150 мс) вызывала генерацию потенциала действия с амплитудой до 200 мВ, которая сопровождалась кратковременной остановкой течения цитоплазмы и его возобновлением за время ~5 мин при температуре 25 °C.

**Влияние света и течения цитоплазмы на гиперполяризационый ответ плазмалеммы.** Измерения характерных значений мембранного потенциала в покое и при возбуждении в начале каждого опыта, а также регистрация эффективного квантового выхода переноса электронов в реакции ФСII на уровне 0,7–0,745 служили показателем адекватного физиологического состояния клетки. После замены ИПВ в центральном отсеке камеры на аналогичный раствор с высоким содержанием KCl (0,1 М) пропускание стандартного надпорогового импульса тока вызывало скачкообразную деполяризацию клетки до уровня мембранного потенциала ~ 0 мВ. Это состояние характеризуется высокой $K^+$-проводимостью плазмалеммы [21] и мембранным потенциалом, соответствующим нулевому равновесному нернстовскому потенциалу.

Последующее пропускание прямоугольного импульса входящего тока (плотность тока 30–80 мкА/см$^2$, длительность импульса 50–75 с) сопровождалось генерацией активного гиперполяризационного ответа (рис. 2). Развитие ГО характеризуется ускоряющимся нарастанием отрицательного потенциала цитоплазмы, которое завершается острым спайком и последующей небольшой деполяризацией мембраны [22]. При равных концентрациях $K^+$ в среде и цитоплазме (~100 мМ) отрицательный сдвиг мембранного потенциала заставляет ионы $K^+$ поступать в клетку в связи с высокой $K^+$-проводимостью мембраны.

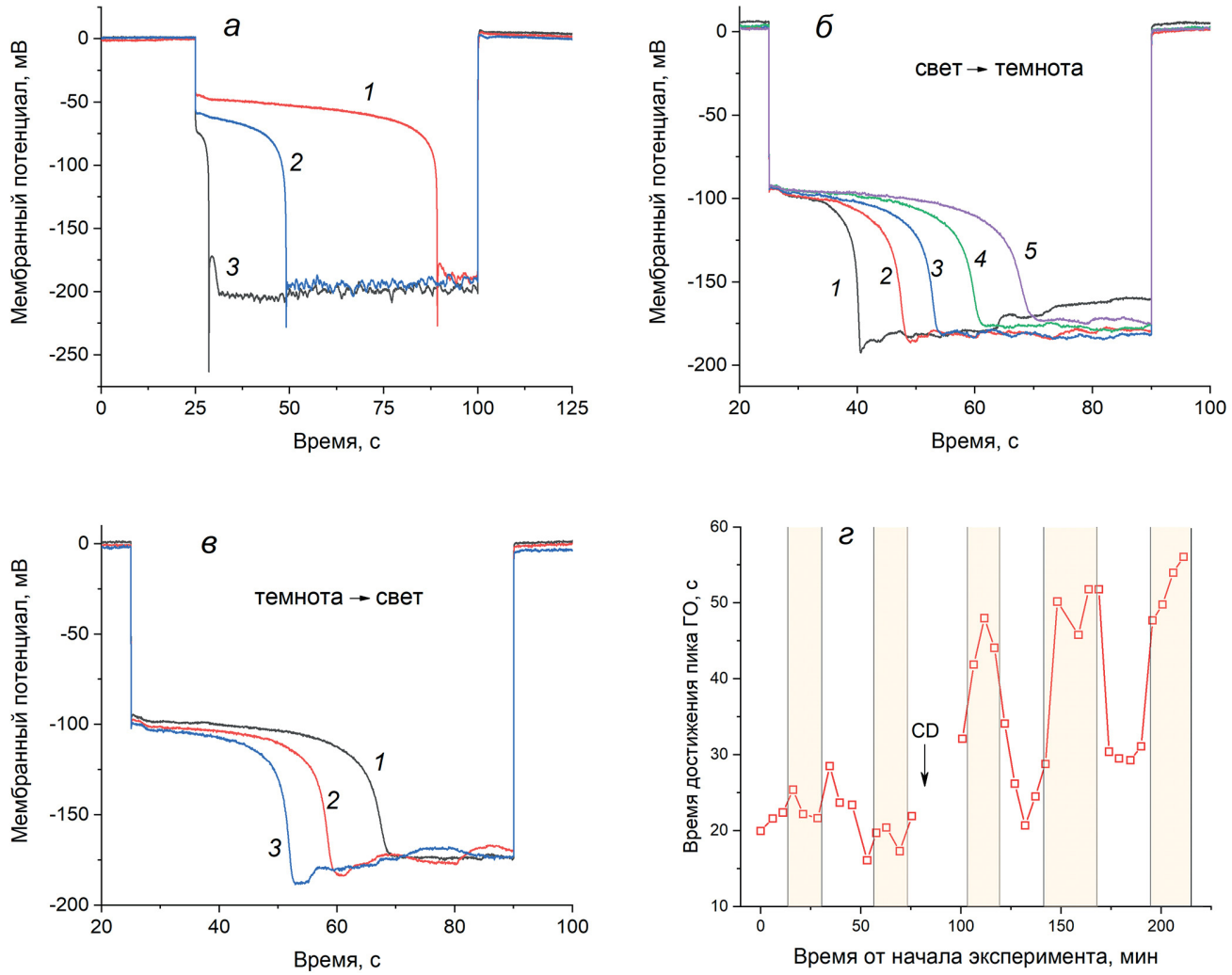


**Рис. 2.** Гиперполяризационные ответы (ГО) клеток *Chara*, вызываемые пропусканием входящего электрического тока в присутствии 0,1 М KCl в среде. *а* – Кинетические кривые ГО при разной плотности электрического тока: 33 мкА/см$^2$ (*1*); 45 мкА/см$^2$ (*2*); 50 мкА/см$^2$ (*3*). *б* – Кинетические кривые ГО, наблюдаемые в присутствии 20 мкМ цитохалазина D после переноса клетки в темноту: на фоновом свету (плотность потока квантов – 12,5 мкмоль/м$^2$·с) (*1*); через 0,5, 5, 10 и 15 мин после выключения фонового освещения (*2–5* соответственно). *в* – Кинетические кривые ГО той же клетки в присутствии цитохалазина D после перехода от темноты к освещению через 0,5, 5 и 10 мин после включения света (*1–3* соответственно). Плотность электрического тока в период импульса на панелях (*б*) и (*в*) составила 33 мкА/см$^2$. *г* – Влияние смены световых условий на время достижения пика ГО от момента включения входящего тока в отсутствие ингибиторов и после подавления циклоза 20 мкМ цитохалазином D (CD). Момент внесения CD отмечен стрелкой. Вертикальные светлые и затененные полосы отмечают периоды освещения и затемнения клетки соответственно; плотность тока в период импульсов – 58 мкА/см$^2$

Время достижения пиковой гиперполяризации сокращалось с повышением плотности входящего тока (рис. 2, *а*). При этом стационарный потенциал, наблюдаемый после спайка, слабо зависел от плотности тока. Стадии пиковой гиперполяризации и последующей быстрой деполяризации заметно сглаживались при обработке клеток цитохалазином D, ингибитором полимеризации актина (рис. 2, *б* и *в*). Сходное подавление этих стадий ранее наблюдали при действии цитохалазина B на поверхностную мембрану изолированной капли цитоплазмы, не содержащей хлоропластов ([22] и ссылки в ней). В наших опытах внесение в среду 20 мкМ цитохалазина D вызывало остановку течения цитоплазмы. В присутствии ингибитора кинетические кривые ГО при постоянной плотности тока существенно зависели от освещения клетки (рис. 2, *б* и *в*).

При затемнении клетки время достижения спайка возрастало в течение ~20 мин (рис. 2, *б*), а при возобновлении освещения – сокращалось (рис. 2, *в*). Интересно, что влияние смены световых условий на ГО, наблюдаемое в присутствии цитохалазина D, не проявлялось в контрольных условиях без до-

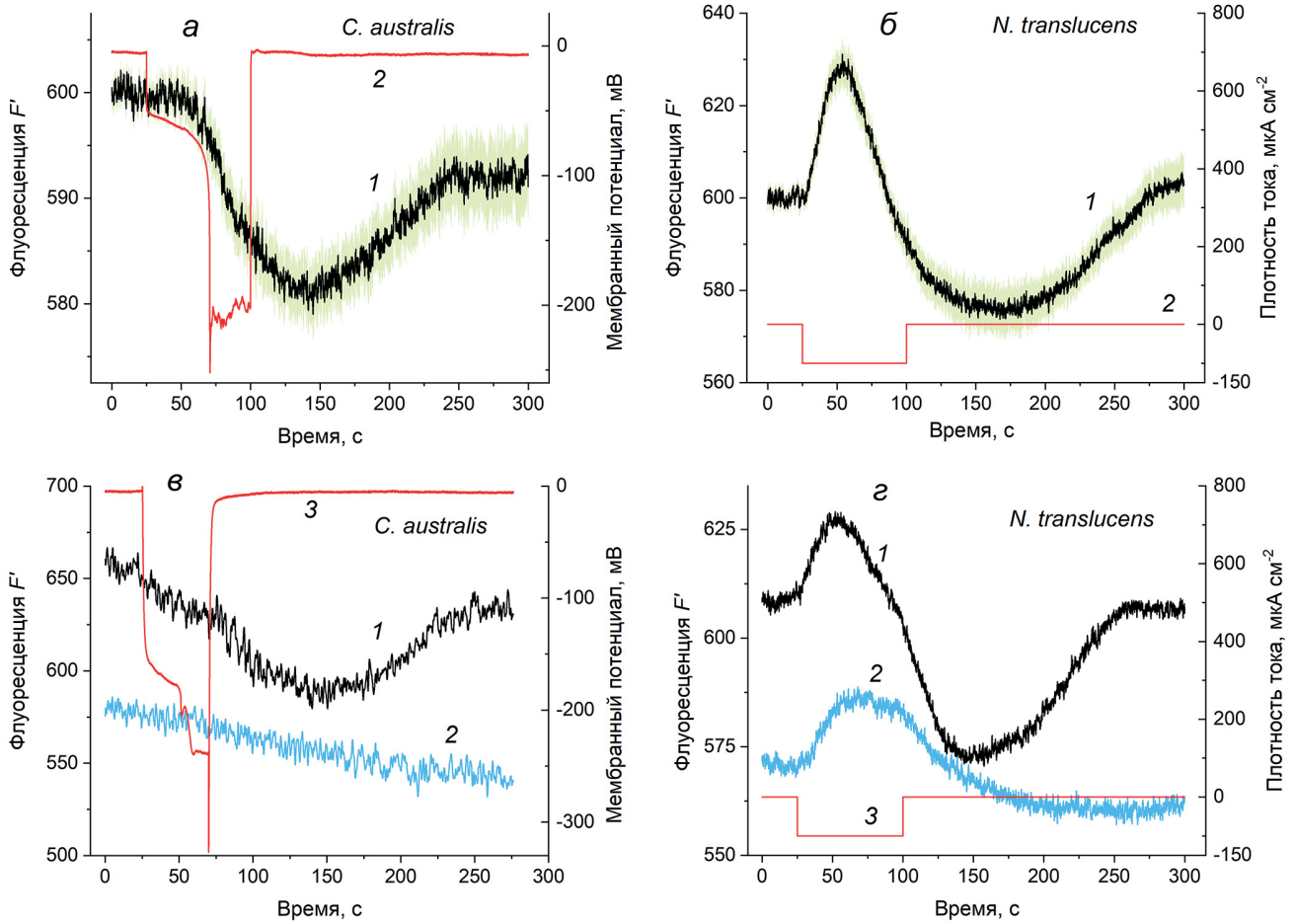


**Рис. 3.** Изменения флуоресценции хлорофилла *F′*, вызванные ступенью входящего электрического тока в клетках водорослей *Chara australis* (*а*, *в*) и *Nitella translucens* (*б*, *г*). *а* – Динамика изменений *F′* (*1*) и мембранного потенциала (*2*), вызванных пропусканием входящего тока. Изменения *F′* (*1*, черная линия) представляют усредненную запись ($n$ = 45, $N$ = 9) на фоне стандартной ошибки среднего. Кривая *2* отражает изменения мембранного потенциала, вызванные импульсом тока с плотностью 35 мкА/см$^2$. *б* – Изменения Фл Хл в клетках *N. translucens* (кривая *1*), вызванные импульсом входящего тока плотностью 100 мкА/см$^2$ (кривая *2*). Усредненная динамика значений *F′* представлена на фоне стандартной ошибки ($n$ = 11, $N$ = 4). *в* и *г* – Зависимость индуцируемого гиперполяризацией снижения *F′* от световых условий в опытах с клетками *C. australis* и *N. translucens* ($n$ = 9–11). *1* – Изменения *F′* на свету; *2* – изменения *F′* в темноте. Кривая *3* на панели (*в*) показывает изменения напряжения в период ГО, а на панели (*г*) – плотность тока на центральном участке клетки

бавления этого ингибитора. Как видно из рис. 2, *г*, времена достижения пика ГО на свету и в темноте примерно совпадали при нормальном течении цитоплазмы, но существенно различались при подавлении циклоза цитохалазином D.

Таким образом, хлоропласты оказывают влияние на ионные каналы плазмалеммы при нарушениях актинового цитоскелета. Переходы «свет–темнота», вероятно, модифицируют состав цитоплазмы, что сказывается на состоянии каналов плазмалеммы, участвующих в генерации ГО. Однако это влияние нивелируется при активном течении цитоплазмы, которое сглаживает состав цитоплазмы между частями клетки с разной активностью фотосинтеза.

**Влияние гиперполяризационного ответа на выход флуоресценции *F′*.** Наибольший интерес представляло возможное влияние ГО на параметры Фл Хл, которые отражают редокс-состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи и энергозависимую диссипацию возбужденных состояний (NPQ). Создание движущей силы для потока $K^+$ из среды в цитоплазму при отрицательном смещении мембранного потенциала плазмалеммы должно сопровождаться накоплением $K^+$ в цитоплазме, что, в свою очередь, может индуцировать $K^+/H^+$-обмен через оболочку хлоропластов и оказывать влияние на флуоресценцию хлоропластов.

На рис. 3, *а* и *б* показаны изменения выхода флуоресценции *F′*, индуцируемые импуль-

сом входящего тока в клетках водорослей *Chara australis* и *Nitella translucens*, помещенных на фоновый свет низкой интенсивности (12,5 мкмоль/м$^2$·с). У обоих видов изменения $F'$ включали задержанную стадию снижения выхода Фл, которая начиналась примерно через 25 с от момента приложения импульса тока и продолжалась в течение ~50 с после завершения ГО.

В клетках *N. translucens* снижению $F'$ предшествовала стадия возрастания Фл, которая начиналась с первых секунд после приложения импульса тока. У клеток *C. australis* иногда наблюдали возрастание $F'$, предшествующее снижению $F'$, однако эта стадия не проявлялась на усредненных записях. Появление противоположно направленных изменений $F'$, связанных с ГО, указывает на протекание нескольких процессов различной природы. Среди них только медленные изменения $F'$ могут быть следствием $K^+/H^+$-обмена через мембранную оболочку хлоропластов, поскольку высокая концентрация $K^+$ в цитоплазме (~100 мМ) исключает ее быстрые изменения. Причины быстрого возрастания Фл в клетках *N. translucens* на данный момент не ясны. Не исключено, что протекание входящего тока связано с электроосмотическим поступлением воды в цитоплазму и внешне неразличимым набуханием пластид. Об этом косвенно говорит тот факт, что возрастание $F'$ проявлялось наиболее отчетливо в клетках малого диаметра с повышенным отношением площади поверхности к объему (*N. translucens*).

Стадию задержанного снижения флуоресценции при генерации ГО наблюдали только на освещенных клетках *C. australis* и *N. translucens*; при помещении клеток в темноту развитие ГО не вызывало таких изменений $F'$ (рис. 3, *в* и *г*). При этом стадия возрастания $F'$, отчетливо заметная у клеток *N. translucens*, не зависела от условий освещения. Это подтверждает предположение о разной природе изменений Фл различной полярности.

**Влияние гиперполяризационного ответа на выход флуоресценции $F_m'$.** В междоузлиях *Chara*, помещенных в стандартную ИПВ с концентрацией $K^+$ 0,1 мМ, значения $F_m'$ на слабом свету приближались к наибольшему уровню, что означает отсутствие нефотохимического тушения. Вместе с тем замена ИПВ на среду с добавлением 0,1 М KCl приводила к заметному снижению $F_m'$, т.е. к появлению NPQ. В связи с этим мы изучили влияние гиперполяризации плазмалеммы на уровень $F_m'$ как индикатор NPQ. На рис. 4 показаны результаты типичного опыта, в котором насыщающие световые импульсы, тестирующие $F_m'$, применяли либо в сочетании с электрической стимуляцией, либо без электростимуляции. Клетку поочередно подвергали нескольким циклам таких воздействий: записи с индукцией ГО чередовали с записями при стационарной деполяризации. Запуск насыщающих вспышек с интервалами в 10 с часто сопровождался начальным снижением $F_m'$ (рис. 4, кривые *3* и *4*; участки при $t \leqslant 75$ с). После замедления спада $F_m'$ (через 75 с после начала записи) подавали ступень тока для индукции ГО плазмалеммы на исследуемом участке клетки (рис. 4, кривая *1*). В тех же условиях без пропускания тока плазмалемма оставалась в деполяризованном состоянии (рис. 4, кривая *2*).

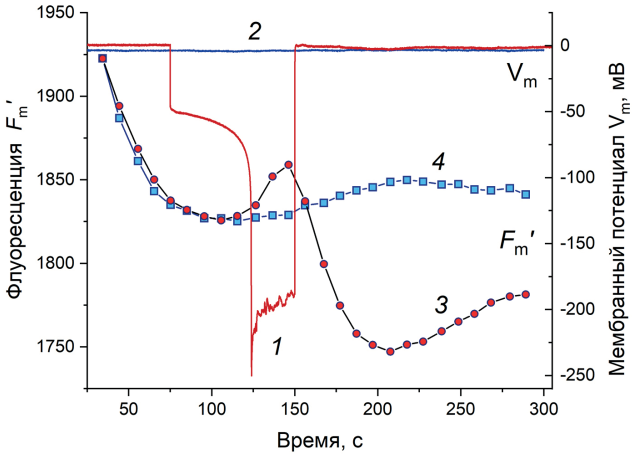


**Рис. 4.** Гиперполяризационный ответ плазматической мембраны в $K^+$-проводящем состоянии и его влияние на флуоресценцию $F_m'$. Гиперполяризацию плазмалеммы (кривая *1*) индуцировали пропусканием импульса входящего тока (42 мкА/см$^2$, длительность 75 с) при слабом фоновом освещении (12,5 мкмоль/м$^2$·с); в отсутствие электрической стимуляции мембранный потенциал оставался стабильно деполяризованным (кривая *2*). Кривые с символами представляют изменения $F_m'$, наблюдаемые при генерации ГО (кривая *3*), а также без индукции ГО (кривая *4*). Монотонное снижение $F_m'$ на отрезке времени $t \leqslant 75$–100 с вызвано включением серии насыщающих световых импульсов. Кривые (*3*) и (*4*) получены в типичном опыте при усреднении результатов по пяти измерениям для каждого варианта

Как видно из рис. 4, кривые изменений $F_m'$ (*3*) и (*4*) практически совпадали на начальном участке (при $t \leqslant 75$ с) – до индукции ГО. Вместе с тем выявлено существенное расхождение записей при $t > 100$ с в зависимости от генерации или отсутствия ГО (рис. 4, кривые *3* и *4*). В варианте опыта, когда плазмалемма оставалась в деполяризованном состоянии, значения $F_m'$ выходили к постоянному уровню после сглаженного максимума (рис. 4, кривая *4*). В случае индуцированной гиперполяризации плазмалеммы наблюдали небольшое

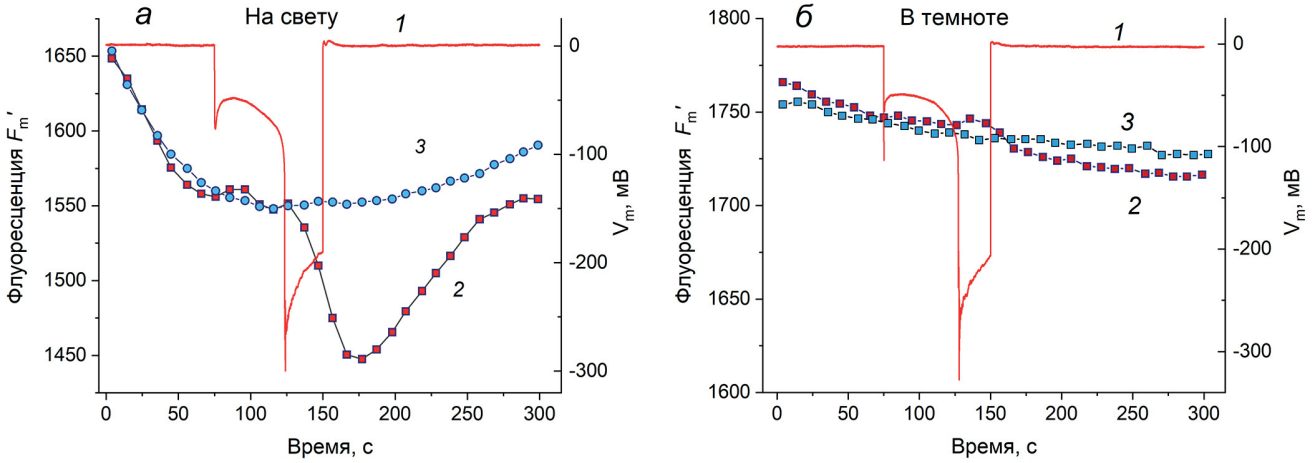


**Рис. 5.** Зависимость вызываемых гиперполяризацией изменений $F_m'$ от световых условий. *а* – Гиперполяризация плазмалеммы освещенных клеток вызывает задержанное снижение $F_m'$. *б* – Влияние гиперполяризации на $F_m'$ исчезает после переноса клетки в темноту. *1* – Изменения мембранного потенциала, вызванные прямоугольным импульсом тока (83 мкА/см$^2$); *2* – изменения $F_m'$, вызываемые насыщающими световыми импульсами и генерацией ГО: на свету (*а*) и в темноте (*б*). *3* – Изменения $F_m'$, вызываемые насыщающими световыми импульсами в покое (без электростимуляции и индукции ГО). Записи кривых (*2*) и (*3*) отражают средние значения, полученные по двум измерениям для каждого варианта опыта

возрастание (или плечо) $F_m'$, которое сменялось сильным снижением $F_m'$ (рис. 4, кривая *3*). Последующее восстановление флуоресценции $F_m'$ занимало ~10 мин. Кинетические кривые изменений $F_m'$ проявляли некоторое сходство с изменениями $F'$ при ГО. Квантовая эффективность переноса электронов в ФСII (параметр YII) претерпевала сравнительно небольшое понижение ($\leqslant$0,03) при низкой интенсивности фонового освещения. Вместе с тем при интенсивности света 25 мкмоль/м$^2$·с вызванное гиперполяризацией снижение КВ ФСII достигало существенных величин (~0,15 ед.). При помещении клеток в темноту развитие ГО не оказывало влияния на КВ ФСII.

Как показано на рис. 5, влияние ГО на $F_m'$ проявлялось только на свету, но исчезало после затемнения клетки. В освещенной клетке кинетические кривые изменений $F_m'$ при действии гиперполяризующего стимула и в его отсутствие резко различались (рис. 5, *а*). Однако после помещения клетки в темноту изменения $F_m'$ при пропускании тока и без стимуляции практически совпадали (рис. 5, *б*). Таким образом, фотосинтетический перенос электронов, сопряженный с мембранным транспортом $H^+$, является необходимым условием для передачи сигнала от плазматической мембраны к хлоропластам.

**Трансмембранные потоки $H^+$ при гиперполяризации и их инактивация.** При высокой $K^+$-проводимости плазмалеммы трансмембранные потоки $K^+$ являются преобладающими. Вместе с тем отрицательный сдвиг потенциала цитоплазмы при ГО предположительно может вызвать перераспределение $H^+$ между цитоплазмой и средой, поскольку плазмалемма освещенных клеток *Chara* обладает проводимостью для ионов $H^+$ или $OH^-$ [4, 5]. В связи с этим были проведены измерения pH в примембранных слоях среды ($pH_o$) при индуцированной током гиперполяризации плазмалеммы *Chara*.

Кривая *1* на рис. 6, *а* показывает сдвиги $pH_o$, вызываемые пропусканием ступени входящего тока через плазмалемму клеток *Chara*. Видно, что гиперполяризующий импульс вызывает повышение $pH_o$ примерно на 0,5 ед., которое в ряде случаев, но не всегда, продолжается некоторое время после завершения импульса тока. Скорость изменений $pH_o$ возрастала в период действия стимула, что предположительно связано с нарастающей гиперполяризацией и увеличением движущей силы для поступления $H^+$ из среды в цитоплазму. По завершении импульса тока значения $pH_o$ опускались, как правило, ниже исходного уровня (рис. 6, *а*; кривая *1*), однако понижение $pH_o$ со временем ослаблялось (рис. 6, *а*; кривая *2*).

В отличие от действия первого электростимула на $pH_o$, приложение второго или, реже, третьего импульса тока не вызывало существенных сдвигов $pH_o$ (рис. 6, *а*; кривая *2*). Это говорит о почти полной инактивации пассивной $H^+$-проводимости плазмалеммы в результате действия первого гиперполяризующего стимула. На отдельных клетках $H^+$-про-

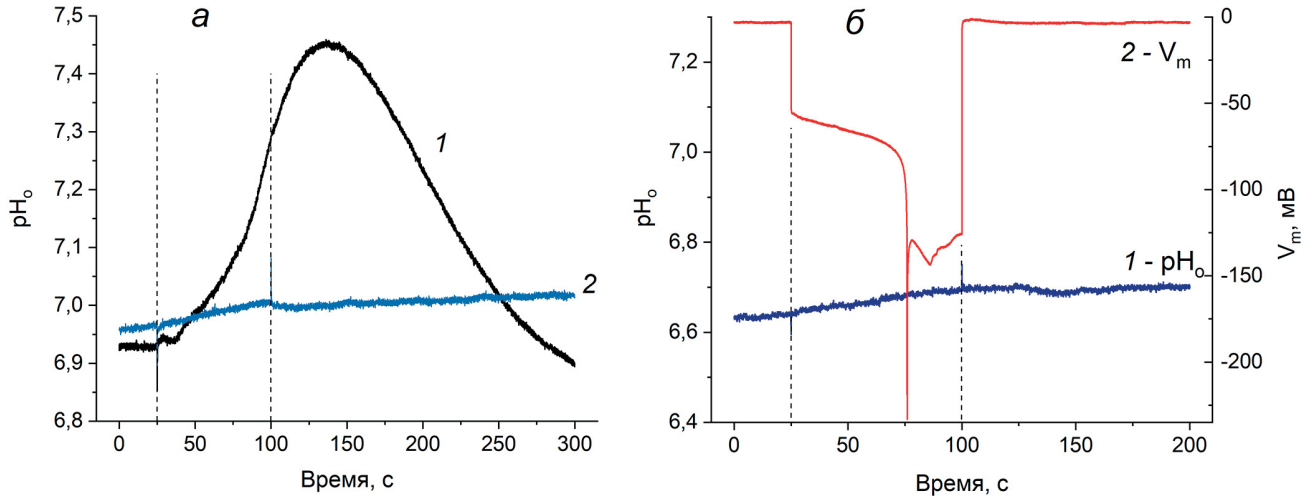


**Рис. 6.** Изменения pH в примембранных слоях среды при индуцированной током гиперполяризации. *а* – Изменения pH у поверхности клетки *Chara* ($pH_o$) при пропускании через плазмалемму гиперполяризующего импульса тока (плотность тока 58 мкА/см$^2$): *1* – повышение $pH_o$ в ответ на первый импульс тока указанной силы; *2* – исчезновение сдвигов $pH_o$ при последующем приложении импульса тока той же силы. *б* – Подавление изменений $pH_o$ в ответ на повторные пропускания тока через плазмалемму (кривая *1*, $pH_o$) не устраняло гиперполяризационные изменения мембранного потенциала (кривая *2*, $V_m$). Результаты, представленные на панелях (*а*) и (*б*), получены на разных клетках. Штриховые вертикальные прямые отмечают время включения и отключения входящего в клетку электрического тока

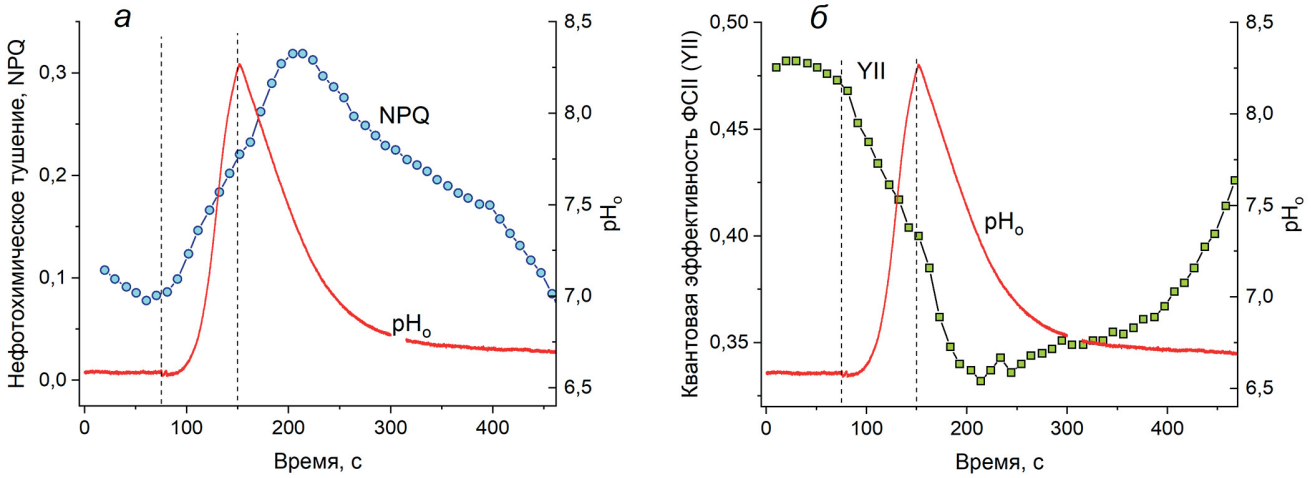


**Рис. 7.** Изменения нефотохимического тушения (NPQ), эффективного квантового выхода фотореакции ФСII (YII) и pH на поверхности клетки *Chara* ($pH_o$), вызванные пропусканием гиперполяризующего импульса тока с плотностью 33 мкА/см$^2$. Центральный отсек камеры заполнен средой (ИПВ) с добавлением 30 мМ KCl; интенсивность фонового освещения – 25 мкмоль/м$^2$·с. Вертикальные штриховые линии отмечают моменты включения и выключения электрического тока

водимость восстанавливалась после периода покоя ~ 1 ч. Однако во многих случаях восстановления $H^+$-проводимости в непрерывном эксперименте заметить не удавалось. Тем не менее сдвиги $pH_o$ в ответ на импульс тока восстанавливались на следующие после опыта сутки при нахождении клеток в стандартной ИПВ. Данные, представленные на рис. 6, *б*, показывают, что подавление $H^+$-проводимости плазмалеммы (кривая *1*) не оказывало ингибирующего действия на развитие ГО (кривая *2*).

Как видно из рис. 7, сдвиги $pH_o$, связанные с пропусканием гиперполяризующего импульса тока, достигают 1,5 ед. и сопровождаются значительным возрастанием нефотохимического тушения (рис. 7, *а*), а также переходным снижением эффективного квантового выхода фотореакции ФСII (рис. 7, *б*). В параллельных опытах было проверено возникновение ГО в данных условиях проведения эксперимента. Уменьшение квантового выхода YII говорит о переходном торможении линейного фотосинтетического потока электронов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клетки многих растений отвечают на физиологические и повреждающие стимулы генерацией электрических сигналов (потенциал действия, вариабельный потенциал), которые вызывают изменения фотосинтеза и Фл Хл [4, 5, 23]. Пути трансформации сигнала плазмалеммы до уровня мембран хлоропластов прослежены лишь частично. Зависимость состояния ФСА от электрической активности плазмалеммы удобно изучать на одиночных клетках Characeae, поскольку они сочетают возбудимость, течение цитоплазмы и пространственно неоднородное распределение потоков $H^+$ и фотосинтеза.

Способность плазмалеммы генерировать активные гиперполяризационные ответы известна уже давно [17, 24], однако связь ГО с другими клеточными процессами и его влияние на ФСА оставались неизученными. Мы обнаружили, что время достижения пика ГО меняется при переходах свет–темнота у клеток, в которых течение цитоплазмы остановлено вследствие нарушения актинового цитоскелета цитохалазином D. Влияние освещения и затемнения на скорость развития ГО (рис. 2), вероятно, обусловлено сдвигами состава цитоплазмы при запуске и отключении светозависимого транспорта через мембранную оболочку хлоропластов. Профиль продольного распределения компонентов цитоплазмы, обмениваемых через оболочку пластид, по-видимому, становится более неравномерным в отсутствие циклоза, поскольку интенсивное течение цитоплазмы сглаживает перепады концентрации этих компонентов. Это представление объясняет отсутствие заметного влияния освещения на развитие ГО при активном течении цитоплазмы, а также выраженную зависимость ГО от действия света после остановки циклоза.

На изолированной капле цитоплазмы ранее отмечали, что нарушение актинового цитоскелета под действием цитохалазина B устраняет острый пик ГО, предположительно вызванный активностью электрогенного насоса ([22] и ссылки в ней). Действие цитохалазина D на целые клетки (рис. 2) также сглаживало пик гиперполяризации и стадию деполяризации. Эти наблюдения говорят о том, что состояние актинового цитоскелета регулирует проводимость каналов, участвующих в формировании ГО. В литературе обсуждают разные варианты взаимодействия ионных каналов с актиновым цитоскелетом [25], которые, вероятно, применимы и к влиянию кортикального актина на каналы плазмалеммы *Chara*. В основе чувствительности ГО к освещению клетки могут лежать изменения содержания $Ca^{2+}$ и $H^+$ в цитоплазме, которые вызваны фотоиндуцированными потоками этих ионов через оболочку пластид и оказывают прямое или косвенное влияние на активность каналов. Пути воздействия $Ca^{2+}$ и $H^+$ на цитоскелет растительной клетки рассмотрены в обзоре Hepler [26].

Основное внимание в работе уделено влиянию ГО на состояние ФСА, выявляемое по изменениям $F'$ и $F_m'$. Здесь важно отметить возможные связи ГО с физиологическими процессами клетки. Известно, что в освещенных клетках *Chara* и *Nitella* циркулируют круговые электрические токи между частями клетки, образующими наружные кислые и щелочные зоны [27]. Плотность светозависимого входящего тока в «щелочных зонах» клеток *Chara* составляет 20–60 мкА/см$^2$ [28]. В нашей работе ГО плазмалеммы вызывали пропусканием электрического тока с плотностью 30–80 мкА/см$^2$. Таким образом, плотности индуцирующих ГО токов лежат в физиологическом диапазоне, а описанные взаимодействия между поверхностной мембраной и хлоропластами могут, в принципе, проявляться при повышении уровня $K^+$ в среде. При попадании освещенной клетки в среду с повышенным содержанием $K^+$ (10–100 мМ) входящий ток, возможно, вызывает защитное снижение $K^+$-проводимости благодаря генерации ГО, а также блокирует проводимость для $H^+$ (рис. 6), чтобы исключить работу $H^+$-насоса в режиме короткого замыкания.

Гиперполяризационные сигналы харовых водорослей имеют некоторые черты сходства с гиперполяризационными сигналами у высших растений, которые возникают при нагреве листа или его повреждении открытым пламенем. В частности, умеренный нагрев листьев пшеницы вызывал градуальную гиперполяризацию клеток на 10–20 мВ в течение 20 мин, которая сопровождалась возрастанием нефотохимического тушения [29]. Результаты, полученные на клетках *Chara*, показывают, что активные гиперполяризационные ответы большой амплитуды (~250 мВ), развивающиеся за сравнительно короткое время (10–75 с), вызывают заметное возрастание регулируемой диссипации энергии в ФСII (рис. 7, *а*), а также снижение квантового выхода реакции ФСII и торможение линейного потока электронов (рис. 7, *б*).

Особый интерес к изучению влияния ГО на клеточные процессы связан с тем, что отри-

цательный сдвиг мембранного потенциала в период развития ГО создает движущую силу для поступления $K^+$ в цитоплазму через мембрану, обладающую высокой $K^+$-проводимостью. Поэтому ГО можно использовать в качестве инструмента для повышения уровня $K^+$ в цитоплазме и изучения последствий возрастания $[K^+]_{цит}$ на состояние ФСА.

В данной работе использовали сравнительно долгие интервалы между токовыми импульсами (600 с), чтобы не препятствовать восстановлению $[K^+]_{цит}$ при переходах от ГО к состоянию покоя. Клетки, подвергнутые неоднократной генерации ГО в ходе опыта, сохраняли жизнеспособность на следующий день, а измеряемые параметры – скорость течения цитоплазмы, эффективный КВ ФСII и потенциал покоя – оставались в пределах нормы. Как правило, перераспределение ионов в связи с генерацией ГО не вызывало необратимого повреждения клетки. Вместе с тем генерация ГО приводила к длительной инактивации потоков $H^+/OH^-$. В физиологических условиях проводимость для $H^+/OH^-$ зависит от освещения. Потоки $H^+/OH^-$, вызванные генерацией ГО, проявлялись и на свету, и, изредка, в темноте. Вместе с тем остается неясным, зависят ли потенциал-чувствительные потоки $H^+/OH^-$ от локализации анализируемого участка в фотосинтетически активных или неактивных областях.

Повышение $[K^+]_{цит}$ само по себе является недостаточным для воздействия на ФСА, но оно может влиять на ионный состав стромы при участии переносчиков, локализованных в оболочке пластид. Внутренняя мембрана оболочки содержит $K^+/H^+$-антипортеры [13, 14, 30]. При повышении уровня $[K^+]_{цит}$ эти транспортеры должны переносить $K^+$ в строму в обмен на удаление $H^+$ из стромы пластид, причем активность KEA1/2 сохраняется и в темноте [31]. Повышение pH стромы, как известно, стимулирует реакции фиксации углекислоты, что может сместить редокс-состояние пластохинона и акцептора $Q_A$ в сторону окисления и понизить фактический выход Фл $F'$ (рис. 3). Согласно предполагаемой схеме, задержанные изменения $F'$ и $F_m'$ в ответ на гиперполяризацию плазматической мембраны обусловлены индукцией $K^+/H^+$-обмена через оболочку хлоропластов.

Вместе с тем гиперполяризующие импульсы электрического тока потенциально могут влиять на водный баланс клетки и хлоропластов. Если просвет $K^+$-каналов плазмалеммы несет фиксированные отрицательные заряды, нельзя исключать электроосмотического поступления воды в цитоплазму клетки и сопутствующего набухания хлоропластов. Распределение гранальной системы в большем объеме, возможно, лежит в основе быстрого возрастания $F'$ в клетках *N. translucens*, отличающихся повышенным отношением площади поверхности к объему (S/V). Кроме того, поступление $K^+$ в строму пластид в обмен на выход $H^+$ может также сопровождаться осмотической регуляцией объема хлоропластов. Учет всех сопутствующих факторов будет способствовать более глубокому пониманию механизмов влияния электрических процессов плазмалеммы на состояние и активность хлоропластов.

Гиперполяризация создает движущую силу не только для входа $K^+$, но и для поступления $H^+$ в цитоплазму. Влияние сдвигов мембранного потенциала на pH цитозоля представлялось вероятным, поскольку плазмалемма *Chara* содержит пассивные пути, проводящие $H^+$ или $OH^-$ [5, 27]. Ранее критерием существования $H^+/OH^-$-проводимости плазмалеммы служило образование узких щелочных зон на поверхности клеток при низком содержании $K^+$ в наружной среде и ярком освещении, т.е. в условиях циркуляции круговых электрических токов и низкой $K^+$-проводимости. В данной работе показаны потоки $H^+$, вызываемые гиперполяризацией при высокой $K^+$-проводимости плазмалеммы (рис. 6 и 7).

Результаты, представленные на рис. 6 и 7, выявляют два принципиально различных типа изменений $pH_o$ после выключения входящего тока. Мгновенная смена знака изменений на пике pH на рис. 7 и продолжающееся нарастание pH после завершения импульса тока на рис. 6 говорят о том, что вызванные гиперполяризацией изменения pH включают стадии, имеющие разное происхождение. Сдвиги pH, меняющие направление после смещения мембранного потенциала к нулевым значениям, по-видимому, отражают потенциал-зависимый перенос $H^+$ (или $OH^-$) по проводящим путям плазмалеммы. В отличие от этого, изменения pH, продолжающиеся с почти прежней скоростью после устранения движущей силы (рис. 6), говорят об иной природе пост-гиперполяризационного сдвига pH. Такое нарастание pH имеет черты сходства с образованием локальной щелочной зоны в области микроукола клетки *Chara* после латентного периода ~ 30 с [32]. Параллельные измерения локальных сдвигов pH и концентрации $O_2$ в области микроповреждения клетки в контроле и при действии ингиби-

торов указывали на то, что возрастание pH, сопровождаемое резким падением уровня $O_2$, обусловлено переносом электронов через плазмалемму от NADPH на $O_2$ и последующим потреблением $H^+$ в реакции восстановления $O_2^-$ до $H_2O_2$ [33]. С учетом этих сведений можно сделать вывод, что в защелачивании среды при гиперполяризации плазмалеммы могут участвовать разные механизмы: трансмембранный перенос $H^+$ под влиянием электрохимического градиента протонов, а также комбинированный механизм, включающий биохимические стадии, нечувствительные к трансмембранному градиенту $H^+$.

Интересно отметить, что сдвиги $pH_o$ возникали лишь в ответ на первый (реже, и на второй) импульс тока, тогда как последующие стимулы практически не оказывали влияния на $pH_o$. Поскольку влияние ГО на параметры флуоресценции $F'$ и $F_m'$ проявлялось в ответ на приложение не только первого, но и последующих электростимулов, можно предполагать, что потоки $H^+$, вызываемые гиперполяризацией, не играли критической роли в передаче сигнала от плазмалеммы к хлоропластам в условиях неоднократного приложения стимула. Вместе с тем, учитывая возможные сдвиги pH цитоплазмы при развитии ГО, представляется важным в дальнейшем внимательно исследовать их роль в перестройках ФСА.

Переходные смещения $F_m'$, вызываемые ГО, сходны в некоторых чертах с изменениями $F_m'$, возникающими после генерации ПД при умеренной интенсивности освещения. Известно, что гиперполяризация может активировать $Ca^{2+}$-проводящие каналы [34], открывая путь для поступления $Ca^{2+}$ в цитоплазму. Согласно одной из гипотез, стадия деполяризации после пика ГО в капле цитоплазмы харовых водорослей аналогична фронту потенциала действия интактных клеток и связана с повышением концентрации цитоплазматического $Ca^{2+}$ [22]. В применении к интактным клеткам эта гипотеза не вполне убедительна, поскольку течение цитоплазмы не прекращается на пике ГО, хотя скорость циклоза крайне чувствительна к повышению $[Ca^{2+}]$ в цитоплазме [35]. О регуляции $F'$ и $F_m'$ при участии $\Delta pH$ тилакоидов говорит тот факт, что влияние ГО на эти параметры проявлялось только в освещенных клетках и исчезало в темноте вместе с прекращением фотосинтетического транспорта электронов (рис. 3 и 5).

Существование длительного лаг-периода, предшествующего ГО-индуцированным изменениям $F'$ и $F_m'$, отражает многостадийное преобразование электрического сигнала плазмалеммы до отклика флуоресценции в мембранах тилакоидов. Предполагаемые промежуточные стадии включают сдвиг $[K^+]_{цит}$, обмен $K^+/H^+$ через оболочку хлоропласта, модуляцию активности стромальных ферментов и влияние pH на транспорт электронов и тушение флуоресценции в антенне.

Таким образом, в работе выявлены новые взаимодействия между плазматической мембраной и хлоропластами, которые опосредованы потоками ионов в ответ на электрические сигналы клетки. Результаты показывают, что гиперполяризация плазмалеммы в состоянии с высокой $K^+$-проводимостью приводит к заметным изменениям флуоресценции хлорофилла $F'$ и $F_m'$. Эти изменения указывают на существование регуляторных связей, которые отличаются от ранее обнаруженного пути, связанного с генерацией потенциала действия. Экспериментальные наблюдения согласуются с представлением о том, что $K^+/H^+$-обмен на внутренней мембране оболочки оказывает регуляторное действие не только в долговременных опытах (например, при выращивании растений в условиях засоления), но и при относительно коротких воздействиях. Для более глубокого понимания выявленных внутриклеточных взаимодействий и механизмов влияния электрических процессов плазмалеммы на состояние и активность хлоропластов необходимы дальнейшие исследования.

**Вклад авторов.** А.А. Булычев – общий план работ, проведение опытов и написание статьи; С.Ю. Шапигузов – выполнение экспериментов и обработка результатов; А.В. Алова – обсуждение результатов и руководство работой по проекту РФФИ.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-12015), а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Drachev, L. A., Mamedov, M. D., and Semenov, A. Yu. (1987) The antimycin-sensitive electrogenesis in *Rhodopseudomonas sphaeroides* chromatophores, *FEBS Lett.*, **213**, 128-132, doi: 10.1016/0014-5793(87)81477-1.
2. Bulychev, A. A., Dassen, J. H. A., Vredenberg, W. J., Opanasenko, V. K., and Semenova, G. A. (1998) Stimulation of photocurrent in chloroplasts related to light-induced swelling of thylakoid system, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **46**, 71-78, doi: 10.1016/S0302-4598(98)00129-9.
3. Bulychev, A. A., and Vredenberg, W. J. (1999) Light-triggered electrical events in the thylakoid membrane of plant chloroplasts, *Physiol. Plant.*, **105**, 577-584, doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105325.x.
4. Bulychev, A. A., and Kamzolkina, N. A. (2006) Differential effects of plasma membrane electric excitation on $H^+$ fluxes and photosynthesis in characean cells, *Bioelectrochemistry*, **69**, 209-215, doi: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.001.
5. Bulychev, A. A., and Kamzolkina, N. A. (2006) Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed $H^+$ fluxes in cells and chloroplasts of *Chara corallina*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **53**, 1-9, doi: 10.1134/S1021443706010018.
6. Bulychev, A. A., and Alova, A. V. (2022) Microfluidic interactions involved in chloroplast responses to plasma membrane excitation in *Chara*, *Plant Physiol. Biochem.*, **183**, 111-119, doi: 10.1016/j.plaphy.2022.05.005.
7. Johnson, C. H., Shingles, R., and Ettinger, W. F. (2007) Regulation and role of calcium fluxes in the chloroplast, in *Structure and Function of Plastids* (Wise, R. R. and Hoober, J. K., eds.) Springer, Dordrecht, pp. 403-416, doi: 10.1007/978-1-4020-4061-0_20.
8. Hochmal, A. K., Schulze, S., Trompelt, K., and Hippler, M. (2015) Calcium-dependent regulation of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1847**, 993-1003, doi: 10.1016/j.bbabio.2015.02.010.
9. Williamson, R. E., and Ashley, C. C. (1982) Free $Ca^{2+}$ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*, *Nature*, **296**, 647-651, doi: 10.1038/296647a0.
10. Kreimer, G., Melkonian, M., and Latzko, E. (1985) An electrogenic uniport mediates light-dependent $Ca^{2+}$ influx into intact spinach chloroplasts, *FEBS Lett.*, **180**, 253-258, doi: 10.1016/0014-5793(85)81081-4.
11. Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A. N., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C., and Teige, M. (2012) Plant organellar calcium signalling: an emerging field, *J. Exp. Bot.*, **63**, 1525-1542, doi: 10.1093/jxb/err394.
12. Krupenina, N. A., and Bulychev, A. A. (2007) Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1767**, 781-788, doi: 10.1016/j.bbabio.2007.01.004.
13. Pottosin, I., and Shabala, S. (2016) Transport across chloroplast membranes: optimizing photosynthesis for adverse environmental conditions, *Mol. Plant*, **9**, 356-370, doi: 10.1016/j.molp.2015.10.006.
14. Szabò, I., and Spetea, C. (2017) Impact of the ion transportome of chloroplasts on the optimization of photosynthesis, *J. Exp. Bot.*, **68**, 3115-3128, doi: 10.1093/jxb/erx063.
15. Höhner, R., Aboukila, A., Kunz, H. H., and Venema, K. (2016) Proton gradients and proton-dependent transport processes in the chloroplast, *Front. Plant Sci.*, **7**, 1-7, doi: 10.3389/fpls.2016.00218.
16. Wu, W., and Berkowitz, G. A. (1992) Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral $K^+$ and $H^+$ exchange through chloroplast envelope ion channels, *Plant Physiol.*, **98**, 666-672, doi: 10.1104/pp.98.2.666.
17. Kishimoto, U. (1966) Hyperpolarizing response in *Nitella* internodes, *Plant Cell Physiol.*, **7**, 429-439, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a079194.
18. Homblé, F. (1987) A tight-seal whole cell study of the voltage-dependent gating mechanism of $K^+$-channels of protoplasmic droplets of *Chara corallina*, *Plant Physiol.*, **84**, 433-437, doi: 10.1104/pp.84.2.433.
19. Schmölzer, P. M., Höftberger, M., and Foissner, I. (2011) Plasma membrane domains participate in pH banding of *Chara* internodal cells, *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1274-1288, doi: 10.1093/pcp/pcr074.
20. Goh, C. H., Schreiber, U., and Hedrich, R. (1999) New approach of monitoring changes in chlorophyll *a* fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli, *Plant Cell Environ.*, **22**, 1057-1070, doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00475.x.
21. Beilby, M. J. (2015) Salt tolerance at single cell level in giant-celled characeae, *Front. Plant Sci.*, **6**, 1-16, doi: 10.3389/fpls.2015.00226.
22. Прищепов Е. Д., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Рубин А. Б. (1984) Структурно-функциональные характеристики поверхностной мембраны капель протоплазмы, полученных из клеток харовых водорослей. IV. Исследование электрических свойств мембраны капли методами фиксации тока и потенциала, *Физиология растений*, **31**, 59-72.
23. Sukhov, V. (2016) Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants, *Photosynth. Res.*, **130**, 373-387, doi: 10.1007/s11120-016-0270-x.
24. Blinks, L. R. (1936) The effects of current flow on bioelectric potential: III. *Nitella*, *J. Gen. Physiol.*, **20**, 229-265, doi: 10.1085/jgp.20.2.229.
25. Shaw, J. E., and Koleske, A. J. (2021) Functional interactions of ion channels with the actin cytoskeleton:

does coupling to dynamic actin regulate NMDA receptors? *J. Physiol.*, **599**, 431-441, doi: 10.1113/JP278702.
26. Hepler, P. K. (2016) The cytoskeleton and its regulation by calcium and protons, *Plant Physiol.*, **170**, 3-22, doi: 10.1104/pp.15.01506.
27. Beilby, M. J., and Bisson, M. A. (2012) PH banding in charophyte algae, in *Plant Electrophysiol.* (Volkov, A. G., ed) Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 247-271, doi: 10.1007/978-3-642-29119-7_11.
28. Lucas, W. J., and Nuccitelli, R. (1980) $HCO_3^-$ and $OH^-$ transport across the plasmalemma of *Chara*, *Planta*, **150**, 120-131, doi: 10.1007/BF00582354.
29. Yudina, L., Sukhova, E., Popova, A., Zolin, Y., Abasheva, K., Grebneva, K., and Sukhov, V. (2023) Local action of moderate heating and illumination induces propagation of hyperpolarization electrical signals in wheat plants, *Front. Sustain. Food Syst.*, **6**, 1-20, doi: 10.3389/fsufs.2022.1062449.
30. Spetea, C., Herdean, A., Allorent, G., Carraretto, L., Finazzi, G., and Szabo, I. (2017) An update on the regulation of photosynthesis by thylakoid ion channels and transporters in *Arabidopsis*, *Physiol. Plant.*, **161**, 16-27, doi: 10.1111/ppl.12568.
31. Aranda Sicilia, M. N., Sánchez Romero, M. E., Rodríguez Rosales, M. P., and Venema, K. (2021) Plastidial transporters KEA1 and KEA2 at the inner envelope membrane adjust stromal pH in the dark, *New Phytol.*, **229**, 2080-2090, doi: 10.1111/nph.17042.
32. Bulychev, A. A., Alova, A. V., and Bibikova, T. N. (2013) Strong alkalinization of *Chara* cell surface in the area of cell wall incision as an early event in mechanoperception, *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 2359-2369, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.07.002.
33. Alova, A., Erofeev, A., Gorelkin, P., Bibikova, T., Korchev, Y., Majouga, A., and Bulychev, A. (2020) Prolonged oxygen depletion in microwounded cells of *Chara corallina* detected with novel oxygen nanosensors, *J. Exp. Bot.*, **71**, 386-398, doi: 10.1093/jxb/erz433.
34. Hedrich, R. (2012) Ion channels in plants, *Physiol. Rev.*, **92**, 1777-1811, doi: 10.1152/physrev.00038.2011.
35. Shimmen, T. (2007) The sliding theory of cytoplasmic streaming: fifty years of progress, *J. Plant Res.*, **120**, 31-43, doi: 10.1007/s10265-006-0061-0.

# ELECTRICAL SIGNALS OF THE PLASMA MEMBRANE AND THEIR EFFECT ON CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN *Chara* CHLOROPLASTS *in vivo*

**A. A. Bulychev*, S. Yu. Shapiguzov, and A. V. Alova**

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: bulychev@biophys.msu.ru*

Action potentials of plant cells are involved in regulation of many cell processes, such as photosynthesis and cytoplasmic streaming. Excitable cells of characean algae submerged in media with elevated $K^+$ content are able to generate hyperpolarizing electrical responses. This active response of plasma membrane arises upon the passage of inward electric current comparable in extent to natural currents circulating in illuminated *Chara* internodes. It remains currently unknown whether the hyperpolarizing electrical signals in *Chara* affect the photosynthetic activity. Here we show that the negative shift of cell membrane potential, which causes the $K^+$ influx into the cytoplasm, is accompanied by a delayed decrease in the effective chlorophyll fluorescence yield ($F'$) and maximal yield ($F_m'$) under low background light (12.5 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$). The transient changes in $F'$ and $F_m'$ were evident under illumination only, which indicates their close relation to photosynthetic energy conversion in chloroplasts. The passage of inward current caused an increase in pH at the cell surface ($pH_o$), which reflects a high $H^+/OH^-$ conductance of the plasmalemma and points to the decrease in cytoplasmic pH due to $H^+$ entry into the cell. The shifts in $pH_o$ arising in response to the first hyperpolarizing pulse disappeared upon repeated stimulations, thus indicating the long-term inactivation of plasmalemmal $H^+/OH^-$ conductance. Despite the suppression of plasmalemmal $H^+$ fluxes, the hyperpolarizing responses and the analyzed chlorophyll fluorescence changes did not disappear. The results indicate the participation of $K^+$ flows between the outer medium, cytoplasm, and stroma in chloroplast functional changes that are reflected by the dynamics of $F'$ and $F_m'$.

*Keywords*: *Chara*, electrical signals, hyperpolarization, plasma membrane $K^+$-conductance, chlorophyll fluorescence changes, $H^+$ transport, plasmalemma–chloroplast interactions