

УДК 581.1

РОЛЬ КИНАЗЫ SNRK1 В ОТВЕТЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА НА СОЛЕВОЙ СТРЕСС

© 2023 г. А. В. Муртузова^а, Е. В. Тютерева^{а, *}, О. В. Войцеховская^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ботанический институт имени В.Л. Комарова Российской академии наук”, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ETutereva@binran.ru

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Киназа SnRK1 (Sucrose non-fermenting-Related protein Kinase 1) растений регулирует активацию катаболических процессов, включая автофагию, в ходе стрессовых ответов. SnRK1 часто рассматривают как сенсор энергетического статуса клетки. Фотосинтез является крупнейшим процессом, поставляющим энергию зеленым клеткам растений на свету, и можно полагать, что SnRK1 является одним из его регуляторов. В листьях линий *Arabidopsis*, различающихся уровнем экспрессии гена *KIN10*, кодирующего каталитическую субъединицу SnRK1, сравнивали квантовый выход фотосистем и нефотохимического тушения флуоресценции, формирование электрохимического градиента протонов на тилакоидных мембранах, а также содержание АТФ в проростках в оптимальных условиях и при воздействии солевого стресса. В результате проведенного исследования нами показаны изменения фотохимической активности хлоропластов, ассоциированные с конститутивной активацией SnRK1 киназы в двух линиях, сверхэкспрессирующих каталитическую субъединицу KIN10. Обнаруженные особенности световых реакций фотосинтеза сохранялись в этих линиях и при благоприятных условиях роста, и при адаптации к солевому стрессу. Подавление функции SnRK1 киназы методом замалчивания РНК-интерференцией в линиях арабидопсиса, напротив, приводило к отсутствию выраженного ответа на солевой стресс на уровне фотохимической активности хлоропластов.

Ключевые слова: катаболизм, фотосинтез, засоление, SnRK1, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31857/S0015330322600796, **EDN:** IBVUFZ

ВВЕДЕНИЕ

У растений одним из крупных регуляторов роста и морфогенеза выступает киназный комплекс TOR (target of rapamycin) [1]. TOR является основным активатором анаболических процессов в клетках эукариот. В условиях стресса рост растений останавливается и происходит активация катаболических программ, в том числе автофагии, что предоставляет необходимые энергетические эквиваленты и метаболиты как для биосинтеза защитных веществ и ферментов, так и для замены поврежденных компонентов клетки новыми. В некоторых случаях стрессовое воздействие приводит к запуску запрограммированной клеточной смерти (ПКС), или мега-автолиза, что также можно рассматривать как крайнюю степень катаболизма. Катаболизм и защитные программы у растений находятся под контролем другого киназного комплекса — SnRK1 [2]. SnRK1 представляет собой растительный ортолог АМР-киназы (АМРК) животных, и Sucrose Non-Fermenting 1 (SNF1)-киназы дрожжей. В клетках

эукариот киназы АМРК, SNF1 и SnRK1 считаются сенсорами их энергетического статуса; они активируются в стрессовых условиях и выступают ингибиторами киназного комплекса TOR [3]. В условиях недостатка энергии SnRK1 помогает восстановить энергетический баланс, усиливая, с одной стороны, гликолиз, митохондриальное дыхание и окисление жирных кислот, а с другой стороны — ингибируя биосинтетические пути, в которых расходуется АТФ [4]. Это может достигаться либо прямым фосфорилированием ключевых ферментов различных метаболических путей, например, гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы или сахарозофосфатсинтазы, либо транскрипционной регуляцией, например, генов, участвующих в автофагии (autophagy-related genes, *ATG*) [2, 4, 5]. Таким образом, регуляторный модуль “TOR-SnRK1” у сельскохозяйственно ценных культур представляет собой очень привлекательную мишень регуляции: тонкая настройка этого модуля у растения может помочь достичь одновременной активации программ роста и механизмов защиты от стрессов, не вызывая запуска таких программ

стрессового ответа как ПКС [3, 6]. Это позволило бы получать растения с высоким уровнем стрессоустойчивости и урожайности даже в субоптимальных условиях; однако, для достижения этой амбициозной цели необходимо точное понимание того, каким образом модуль “TOR-SnRK1” интегрирован в метаболизм растений.

В отличие от ортологичных киназ дрожжей и животных, у растений главными регуляторами TOR и SnRK1 выступают молекулы сахаров и сахарофосфатов. Киназный комплекс TOR растений активируется в присутствии глюкозы — единственного пока метаболита, для которого доказано прямое влияние на активность TOR у растений [1]. Активность киназы SnRK1 растений регулируется главным образом сахарофосфатами, что резко отличается от клеток дрожжей и животных, в которых основным аллостерическим регулятором ортологичных киназ SNF1 и AMPK выступает АМФ [3]. Столь важная роль сахаров и сахарофосфатов в регуляции баланса между анаболизмом и катаболизмом (опосредованно через киназные комплексы TOR и SnRK1), возможно, связана с тем, что именно сахара — продукты фотосинтеза — обеспечивают приток энергии в метаболизм растений. Для обеих киназ, TOR и SnRK1, было показано участие в регуляции фотосинтетического метаболизма. TOR играет важную роль в регуляции фотоморфогенеза, в том числе позеленения пластид [1]. У проростков *Arabidopsis* ингибирование TOR приводило к изменению экспрессии множества генов, участвующих в фотосинтезе [7]. В зрелых листьях растений *Arabidopsis* TOR участвует в регуляции плазмодесм, и, таким образом, экспорта фотосинтатов из листа и их распределения между донорными органами [8]. Влияние SnRK1 на фотосинтетический метаболизм растений в настоящий момент является предметом активного изучения [9]. Блокирование электронного транспорта в ФСII с помощью диурона вызывало активацию SnRK1 [2]. В то же время показано, что транскрипция многих генов, участвующих в фотосинтезе, зависит от активности SnRK1 [10], и ряд ядерных генов, кодирующих фотосинтетических белки, регулируется транскрипционными факторами — потенциальными мишенями фосфорилирования SnRK1 [5]. SnRK1 мигрирует между цитоплазмой и ядром в суточном цикле [11] и в ответ на стресс [12]; показано, что перенос SnRK1 из цитоплазмы в ядро коррелирует с уровнем фотосинтетической продукции АТФ [11]. В некоторых работах высказано предположение, что SnRK1 может быть локализована и в хлоропластах [13]. Также показано, что SnRK1 оптимизирует нитратный сигналинг в ответ на голодание по углероду или азоту [14]. В том случае, когда фотосинтез значительно снижен (например, по причине недостатка света, ингибирования переноса электронов в электрон-транс-

портной цепи) или развивается голодание по азоту, SnRK1 подавляет нитратный сигналинг путем фосфорилирования регуляторного белка NLP7, что приводит к блокированию его переноса из цитоплазмы в ядро и последующей деградации [14].

Поскольку активность SnRK1 зависит от энергетического статуса клетки, можно предположить, что эта киназа участвует, напрямую или опосредованно, в регуляции фотосинтетической продукции энергии в хлоропластах либо ее адаптации к потребностям клетки в энергии или сахарах. Однако до настоящего времени данный вопрос не исследовался.

Киназный комплекс SnRK1 включает три субъединицы, две регуляторные (β и $\beta\gamma$) и одну каталитическую α -субъединицу; каждая субъединица представлена несколькими изоформами. Комбинации различных изоформ, возможно, могут образовывать киназные комплексы с несколькими различными функциональными характеристиками [15, 16]. У *Arabidopsis* каталитическая α -субъединица кодируется тремя генами, *KIN10*, *KIN11* и *KIN12*, но экспрессируются, по-видимому, только два гена, *KIN10* и *KIN11* [2]. Сверхэкспрессия *KIN10* приводит к соответствующему увеличению ферментативной активности SnRK1 [2]. Активация SnRK1 может осуществляться либо при изменении концентраций ингибирующих метаболитов, т.е. сахаров и сахарофосфатов, либо фосфорилированием ее каталитической субъединицы с помощью киназ SnAK (SnRK1-Activating Kinases). Примечательно, что *in vivo*, по-видимому, активна только небольшая часть SnRK1, а большая часть белка активируется в условиях стресса [15]. Несмотря на это, растения со сверхэкспрессией *KIN10* (*KIN10-OX*) проявляли отчетливый фенотип при прорастании и на стадии проростка даже в оптимальных условиях [2, 17]. В условиях стрессов, таких как голодание по углероду, засуха, гипоксия или засоление, растения *KIN10-OX* оставались более жизнеспособными, чем растения дикого типа или растения, у которых экспрессия *KIN10* была подавлена по механизму РНК-интерференции (*KIN10-RNAi*) [17, 18]. Высокая стрессоустойчивость объяснялась увеличением индукции автофагии в растениях *KIN10-OX* из-за ингибирования комплекса TOR [17, 18]. Примечательно, что активация автофагии наблюдалась в растениях *KIN10-OX* по сравнению с растениями дикого типа даже в оптимальных условиях [17, 18].

Цель данной работы — анализ влияния сверхэкспрессии *KIN10*, кодирующего каталитическую α -субъединицу SnRK1-киназы, а также подавленной по механизму РНК-интерференции экспрессии *KIN10* на световые реакции фотосинтеза в листьях взрослых растений *Arabidopsis thali-*

ana, выращенных на почве в оптимальных условиях и под воздействием солевого стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения и условия выращивания. Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. экотипа Landsberg erecta (Ler) были получены в Ноттингенском центре Арабидопсиса (Великобритания). Растения с измененным уровнем экспрессии гена AT3G01090 — две линии сверхэкспрессоров каталитической субъединицы киназы SnRK1, (O1 и O2 линии, далее по тексту — *KIN10-OX1* и *KIN10-OX2*), и две линии RNAi с нокадауном *KIN10*, (10-1 и 10-2 линии, далее по тексту — *KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2*), были любезно предоставлены Dr. Filip Rolland (Католический Университет г. Левен, Бельгия). После поверхностной стерилизации семена высаживали вертикально на чашки со средой Мурасиге-Скуга (MC1) с добавлением 1% (м/об) сахарозы и 0.35% (м/об) фитагеля (“Sigma-Aldrich”, США). В возрасте 14 дней проростки перенесли в почву (почва: торф = 1: 1). Проростки росли при 20–22°C и плотности потока фотонов 150 мкмоль/(м² с), относительной влажности 80% в режиме 16 ч свет/8 ч темнота. В опытах использовали как 12-дневные проростки, так и взрослые 6–7-недельные растения. Полив производился каждый второй день 10% раствором Хогланда [19]. Для создания солевого стресса экспериментальную группу растений в течение недели поливали через день 30 мл 10% раствора Хогланда с добавлением NaCl до конечной концентрации 100 мМ. Контрольную группу растений поливали тем же количеством 10% раствора Хогланда без добавления NaCl.

Определение уровня экспрессии генов интереса методом ПЦР в реальном времени. РНК экстрагировали из листьев *Arabidopsis* реагентом TRIzol [20]. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой, очищенной от РНКаз (“Thermo Scientific”, США). Синтез кДНК проводили с помощью набора реактивов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (“Thermo Scientific”, США). Эффективность обработки ДНКазой препарата тотальной РНК перед проведением обратной транскрипции, а также качество синтезированной кДНК проверяли с помощью классической ПЦР с праймерами к гену убиквитина (F: 5'-ATGCGATYTTTGTGAAGAC-3', R: 5'-AC-CACCACGRAGACGGAG-3'). ПЦР проводили с помощью C1000 Touch Thermal Cycler (“BioRad”, США). Программа ПЦР включала: 1) денатурацию матрицы ДНК при 95°C, 5 мин; 2) 34 цикла амплификации, состоящих из денатурации ДНК при 95°C, 30 с; отжига праймеров при 52°C, 30 с и элонгации при 72°C, 75 с; 3) завершение синтеза ДНК при 72°C, 5 мин. ПЦР-РВ проводили с помощью термоциклера Eco Real-Time PCR system

(“Illumina Eco”, США) и набора реактивов для ПЦР SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Программа включала: 1) активацию полимеразы при 95°C, 10 мин; 2) 40 циклов амплификации, состоящих из денатурации ДНК при 95°C, 15 с; отжига праймеров при 56°C, 30 с и элонгации при 72°C, 30 с; 3) построение кривых плавления: а) 95°C, 15 с; б) 55°C, 15 с; в) 95°C, 15 с. Для каждого гена были синтезированы три пары специфических праймеров (“Евроген”, Россия). Использовали только те праймеры, которые приводили к накоплению единственного ампликона согласно анализу кривых плавления и показывали эффективность ПЦР ≥ 95%. В качестве референсного гена использовали *A. thaliana* Actin2 (AT3G18780). Выбранные праймеры для *AtKIN10* были следующими: F: 5'-ACCACCTCATCGAATCGCTC-3', R: 5'-GGATGAGCCCGAGACTGAAG-3'; для *AtKIN11* — F: 5'-ATTCTCGGATCTACTCCAAGACG-3', R: 5'-ATCTCCCTCCTCACTTTCTCT-3'; для *AtAct2* — F: 5'-TCCTCTCCGCTTTGAATT-3', R: 5'-CCAGCCTTCACCATACCG-3'. На одну реакцию ПЦР-РВ использовали 10 нг матрицы кДНК. ПЦР-РВ для каждого генотипа проводили в четырех биологических и трех аналитических повторностях. Результаты обрабатывали с использованием уравнения $2^{-\Delta C_t}$ [21].

Измерения флуоресценции хлорофилла *a* осуществляли с помощью Dual-PAM 100 (“Walz”, Германия). Регистрацию световых кривых проводили на неотделенных листьях арабидопсиса. В режиме двухканальной записи для одновременного определения фотохимической активности фотосистем ФСІ и ФСІІ осуществляли следующую программу измерений: после 1 ч темновой адаптации определяли значения начальной флуоресценции F_0 , максимальной флуоресценции F_m (в темноте) и P700-зависимого сигнала модулированного отражения/поглощения света P_m (согласно встроенной программе после 5 с предосвещения дальним красным светом), а затем 11 этапов освещения с постепенным увеличением интенсивности актиничного красного света (0, 18, 25, 34, 65, 107, 138, 228, 351, 543 и 837 мкЕ м⁻² с⁻¹). Длительность каждого этапа освещения составляла 30 с, общая длительность записи световой кривой — 5 мин. В конце каждого этапа освещения подавался насыщающий импульс (5000 мкЕ м⁻² с⁻¹ в течение 800 мс) и детектировались следующие параметры: $Y(I)$ — реальный квантовый выход ФСІ, $Y(II)$ — реальный квантовый выход ФСІІ, $Y(NPQ)$ — квантовый выход регулируемой диссипации энергии, $Y(NO)$ — квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции. В экспериментах было изучено по 10 растений контрольной и экспериментальной групп для каждого генотипа.

Анализ электрохромного сдвига поглощения пигментов. Использовали систему Dual-PAM 100 (“Walz”, Германия) с дополнительным P515/535 модулем, включающим в себя эмиттер Dual-EP515 и детектор Dual-DP515 (“Walz”, Германия). Эксперименты проводились по протоколу, описанному Dmitrieva с соавт. [22], основанному на методике Schreiber и Klughammer [23]. Перед проведением измерений растения в течение 1 ч адаптировали к темноте. После включения измеряющего света (PML, 515 и 550 нм) с интенсивностью 24 мкЕ последовательно с интервалом в 30 с подавали три вспышки красного насыщающего света (630 нм, 5000 мкЕ, 800 мс). По кинетике падения сигнала рассчитывали экспоненциальную и линейную скорость синтеза АТФ согласно Dmitrieva et al. [22] и Sukhov et al. [24]. Затем после 10 с темноты на лист подавали красный актиничный свет (630 нм, 430 мкЕ) на протяжении 10 мин. После выключения актиничного света в течение 5 мин регистрировали кинетику быстрой темновой релаксации ESC. Амплитуду относительного электрохромного сдвига (ECS_{pmf} , P515), а также двух его компонентов — $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$ определяли согласно протоколам Dmitrieva et al. [22] и Sukhov et al. [24]. Измерения были выполнены в 6-кратной биологической повторности для каждого генотипа и каждого варианта воздействия.

Определение содержания АТФ проводили в тканях 16-дневных проростков, выращенных в стерильной фитагелизированной MC1 среде. Для создания солевого стресса раствор 100 мМ NaCl в объеме 10 мл наносили дозатором на поверхность среды, в которой выращивались проростки. Солевой раствор мгновенно абсорбировался средой и не создавал эффекта затопления. В качестве положительного фармакологического контроля использовали аппликацию на поверхность среды 10 мл раствора олигомицина (“Serva”, Германия) в концентрации 10 мкМ, которая, как было показано ранее, эффективно ингибирует митохондриальное дыхание, но не фотосинтез [25]. Через 16 ч инкубации с солевым раствором или 2 ч инкубации с раствором олигомицина проростки собирали, готовили 30 мг навески, а затем АТФ-содержащие экстракты по методу Lundin и Thore [26] и Surova с соавт. [27] с небольшими модификациями. Навеску растительного материала (30 мг) помещали в 1.5 мл пробирку типа Эппендорф и гомогенизировали микропестиком, непрерывно охлаждая пробирку в жидком азоте. К гомогенату добавляли 60 мкл двухкомпонентного буфера (0.51 М ТХУ и 17 мМ ЭДТА) и оставляли при +4°C на 15 мин в темноте. Далее для нейтрализации ТХУ добавляли 9.24 мкл 3 М КОН. Экстракты центрифугировали в течении 10 мин при 12000 g на центрифуге Sigma 1-14K (Германия) и отбирали супернатант для исследования. С помощью набора ATP Determination Kit (“ThermoFisher Sci-

entific”, США) в полученных экстрактах на мульти-модальном ридере Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (“ThermoFisher”, США) на длине волны 560 нм проводили детекцию интенсивности люминесценции люциферин-люциферазной реакции, а затем с использованием калибровочной кривой (диапазон детектируемых концентраций от 0.1 нМ до 500 нМ) рассчитывали абсолютное содержание АТФ в опытных образцах. Эксперименты были выполнены в 5-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторностях по каждому генотипу и экспериментальному воздействию.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы R version 4.1.2 (2021-11-01) — “Bird Hippie” Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64. Достоверность различий в относительном уровне транскриптов генов интереса определяли с помощью t-критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0.05$. Достоверность различий между выборками по значениям других параметров оценивали методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки (Tukey HSD test), уровень значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень экспрессии KIN10 и KIN11 в проростках и взрослых растениях арабидопсиса

При выращивании в оптимальных условиях растения *KIN10-OX* имеют ярко выраженные фенотипические изменения на стадии проростков [2, 17], тогда как для растений *KIN10-RNAi* не описаны какие-либо особенности фенотипа, обусловленные подавлением функций SnRK1, ни на одной из стадий развития [2, 17]. Для того чтобы подтвердить стабильность экспрессии трансгенов, отвечающих за повышение и подавление уровня экспрессии *KIN10* в листьях взрослых растений арабидопсиса *KIN10-OX* и *KIN10-RNAi*, а также показать, что изменения в уровнях экспрессии *KIN10* не скомпенсированы изменениями экспрессии *KIN11*, был проведен ПЦР-РВ анализ накопления транскриптов соответствующих генов. Результаты представлены на рисунке 1. Показано, что в листьях дикого типа *Ler* уровень относительного содержания транскриптов *KIN10* оказался значительно выше, чем в проростках (рис. 1а), в то время как экспрессия *KIN11* не отличалась (рис. 1д). Экспрессия *KIN10* в проростках и листьях взрослых растений *KIN10-OX* в несколько раз превысила таковую в растениях дикого типа *Ler* (рис. 1а, г). Уровень *KIN10* транскриптов в проростках и листьях *KIN10-RNAi* оказался достоверно ниже, чем у дикого типа *Ler* на обеих стадиях развития растений (рис. 1а–в). Экс-

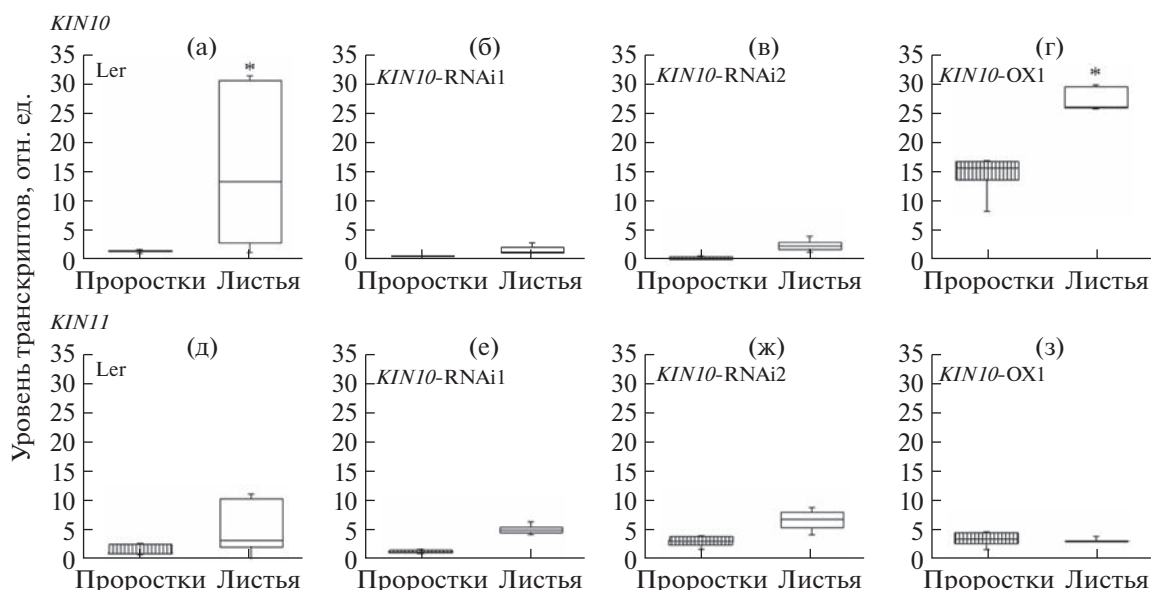


Рис. 1. Относительные уровни транскриптов *KIN10* и *KIN11* в проростках и листьях взрослых растений арабидопсиса дикого типа *Ler* (а, д), нокдаун-линий *KIN10-RNAi1* (б, е) и *KIN10-RNAi2* (в, ж), а также линии-сверхэкспрессора *KIN10-OX1* (г, з), где а, б, в, г — относительный уровень экспрессии *KIN10*; д, е, ж, з — относительный уровень экспрессии *KIN11*. Достоверность различий определяли с помощью t-теста Стьюдента. * — достоверные отличия относительного количества транскриптов гена интереса в листьях и в проростках одного и того же генотипа.

прессия *KIN11* достоверно не различалась у всех изученных генотипов арабидопсиса (рис. 1д–з).

Фенотипические изменения растений под действием солевого стресса

У растений *Arabidopsis* дикого типа *Ler* на третьи сутки умеренного солевого стресса происходило появление слабого хлороза и скручивание отдельных листьев. К пятым суткам эксперимента данные фенотипические изменения усиливались (рис. 2а–в). Сходные признаки влияния стресса развивались и у растений со сверхэкспрессией *KIN10* (*KIN10-OX1*, *KIN10-OX2*), но хлороз был отмечен на третьи сутки, а скручивание листьев только на пятые сутки засоления (рис. 2ж–и). В линиях со сниженной экспрессией *KIN10* (*KIN10-RNAi1*, *KIN10-RNAi2*) не было выявлено морфологических изменений листьев, связанных со стрессовым воздействием (рис. 2г–е).

Изменения фотохимической активности фотосистем II и I на фоне солевого стресса

Изучили изменения важнейших показателей фотохимической активности фотосистем: эффективные квантовые выходы ФСII и ФСI ($Y(II)$ и $Y(I)$), а также $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$ в диапазоне интенсивности актиничного света от 0 до 837 мкМ $m^{-2} s^{-1}$ (в ходе т.н. световых кривых) в листьях растений арабидопсиса в оптимальных контрольных условиях и под действием солевого

стресса через трое и пять суток от начала полива раствором Хогланда с добавлением 100 мМ NaCl (рис. 3–5).

В листьях растений дикого типа *Ler* происходило достоверное снижение реального квантового выхода $Y(II)$ при освещении средними интенсивностями актиничного света (107, 138, 228, 351 мкмоль $m^{-2} s^{-1}$) на третьи и пятые сутки солевого стресса (рис. 3а). В листьях двух линий сверхэкспрессоров *KIN10-OX* обнаружено достоверное увеличение $Y(II)$ на третьи сутки засоления и снижение данного параметра на пятые сутки засоления до значений у растений в контрольных условиях (рис. 3г, д). У растений с нокдауном гена каталитической субъединицы *KIN10* либо не наблюдалось изменений в $Y(II)$ (в линии *KIN10-RNAi1*), либо происходило снижение $Y(II)$ к пятым суткам засоления (в линии *KIN10-RNAi2*) (рис. 3б, в).

Квантовый выход ФСИ достоверно уменьшался под действием засоления в диком типе *Ler* (в диапазоне значений 107–351 мкМ фотонов) к третьим суткам засоления и не возвращался к уровню в контроле к пятым суткам солевого стресса (рис. 4а). В листьях растений *KIN10-OX1* и *KIN10-OX2* происходило увеличение показателя $Y(I)$ на третьи сутки солевого стресса, а затем наблюдалось снижение активности ФСИ до уровня в контроле во всем диапазоне интенсивности освещения (рис. 4г, д). У растений с подавленной активностью *KIN10* показано либо отсутствие влияния засоления на $Y(I)$, либо достоверное снижение зна-

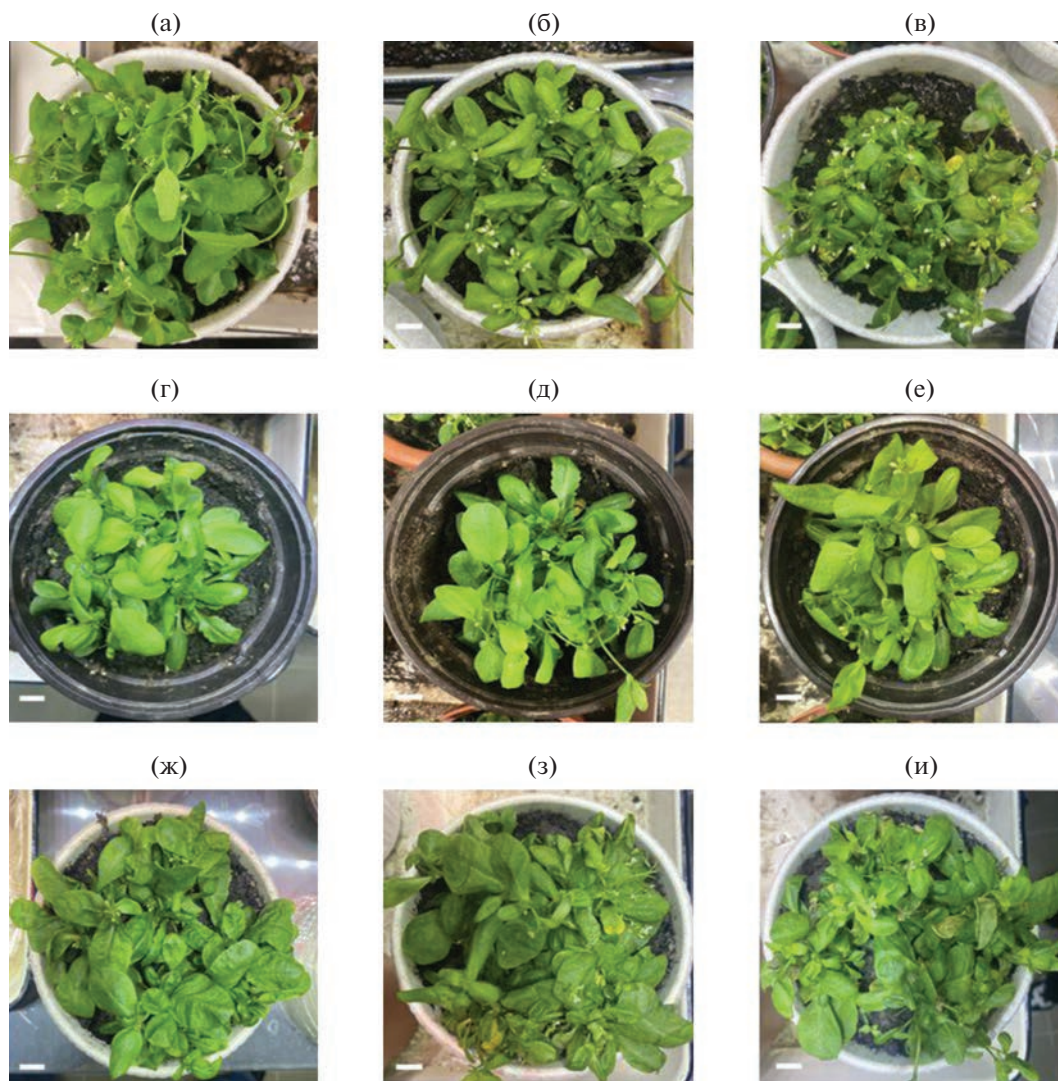


Рис. 2. Фенотипические изменения растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а, б, в), нокадаун-линии *KIN10-RNAi1* (г, д, е) и линии-сверхэкспрессора *KIN10-OX1* (ж, з, и) при хроническом засолении, где а, г, ж — фотографии растений на первые сутки засоления; б, д, з — на третьи сутки засоления; в, е, и — на пятые сутки засоления. Масштабная линейка: 1 см.

чений этого показателя на фоне солевого стресса (*KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2* соответственно) (рис. 4б, в).

Оценили также влияние засоления на квантовый выход регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$ как одного из важнейших механизмов предотвращения разрушения ФСII от избытка поглощенных квантов света (рис. 5). Оказалось, что в листьях арабидопсиса дикого типа Ler происходило достоверное повышение квантового выхода $Y(NPQ)$ к третьим суткам солевого стресса (рис. 5а). В листьях обеих линий *KIN10-OX* обнаружено снижение тепловой диссипации энергии к третьим суткам засоления (рис. 5г, д). В линиях *KIN10-RNAi* уровень $Y(NPQ)$ либо не изменялся, либо повышал-

ся к пятым суткам засоления (*KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2*, соответственно) (рис. 5б, в). Изменений квантового выхода нерегулируемого тушения флуоресценции $Y(NO)$ не выявлено ни в одной из исследуемых линий арабидопсиса (данные не показаны), что свидетельствует об отсутствии структурных нарушений пула ФСII под действием солевого стресса.

Электрохимический градиент и скорость синтеза АТФ

Для того чтобы сравнить относительную энергизованность тилакоидных мембран и эффективность работы АТФ-синтазы в хлоропластах линий арабидопсиса с различным уровнем экспрессии

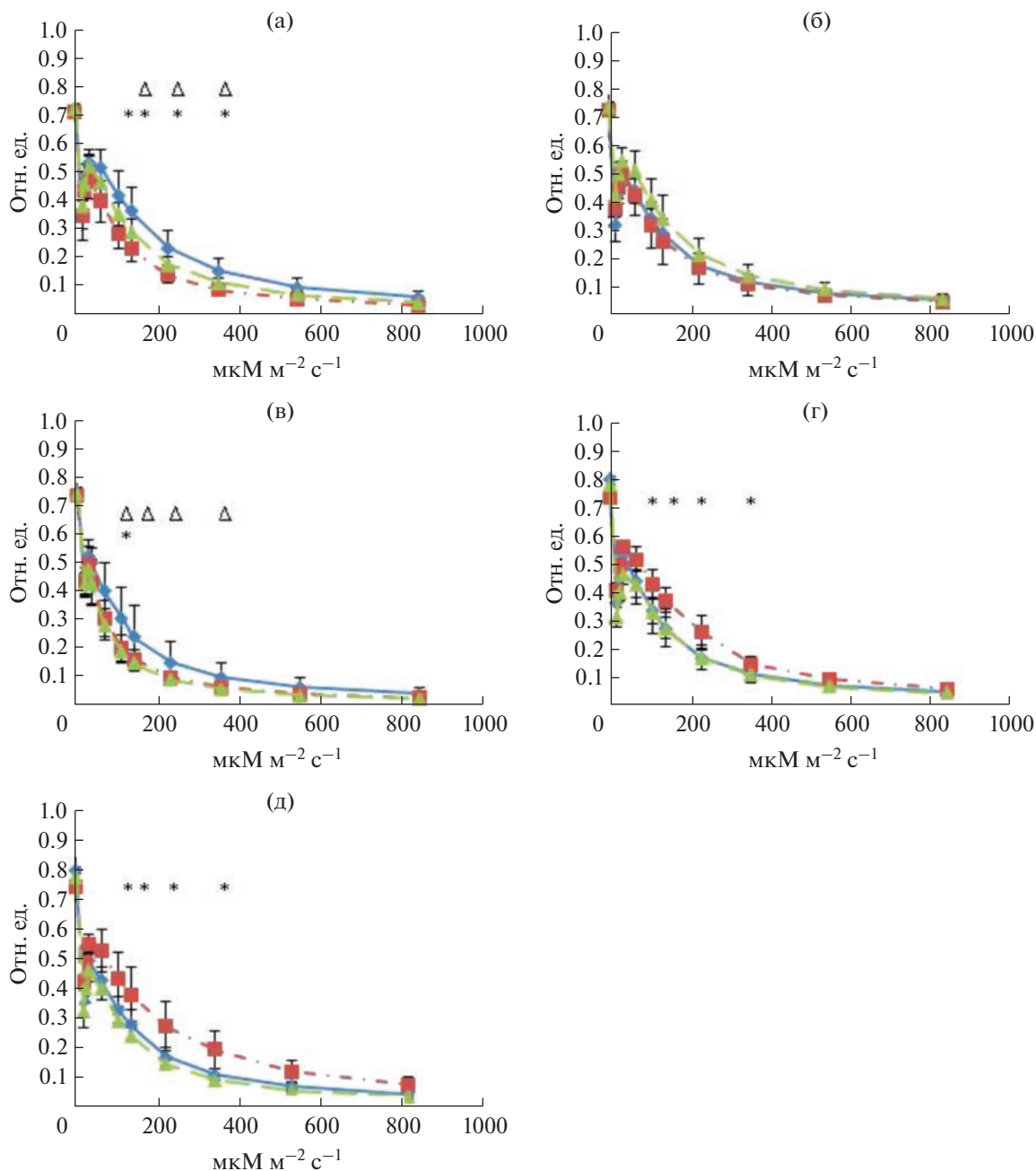


Рис. 3. Зависимость квантового выхода ФСП ($Y(II)$) от интенсивности света (“световая кривая”), измеренная в листьях растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), нокадаун-линий *KIN10-RNAi1* (б) и *KIN10-RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10-OX1* (г) и *KIN10-OX2* (д), в оптимальных условиях и на фоне засоления. Условные обозначения на графиках: сплошная линия с маркерами-ромбами — значения, полученные на растениях в контрольных условиях; штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами — значения, полученные на третьи сутки хронического засоления растений; пунктирная линия с маркерами-треугольниками — значения, полученные на пятые сутки хронического засоления растений; * — достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 сутки солевого стресса согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$; Δ — достоверные различия между измерениями в контроле и на пятые сутки солевого стресса согласно ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$. На графиках показаны средние арифметические значения десяти независимых измерений, выполненных на 10 листьях разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в $\mu\text{M фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$; по оси ординат — значения параметра $Y(II)$ в относительных единицах.

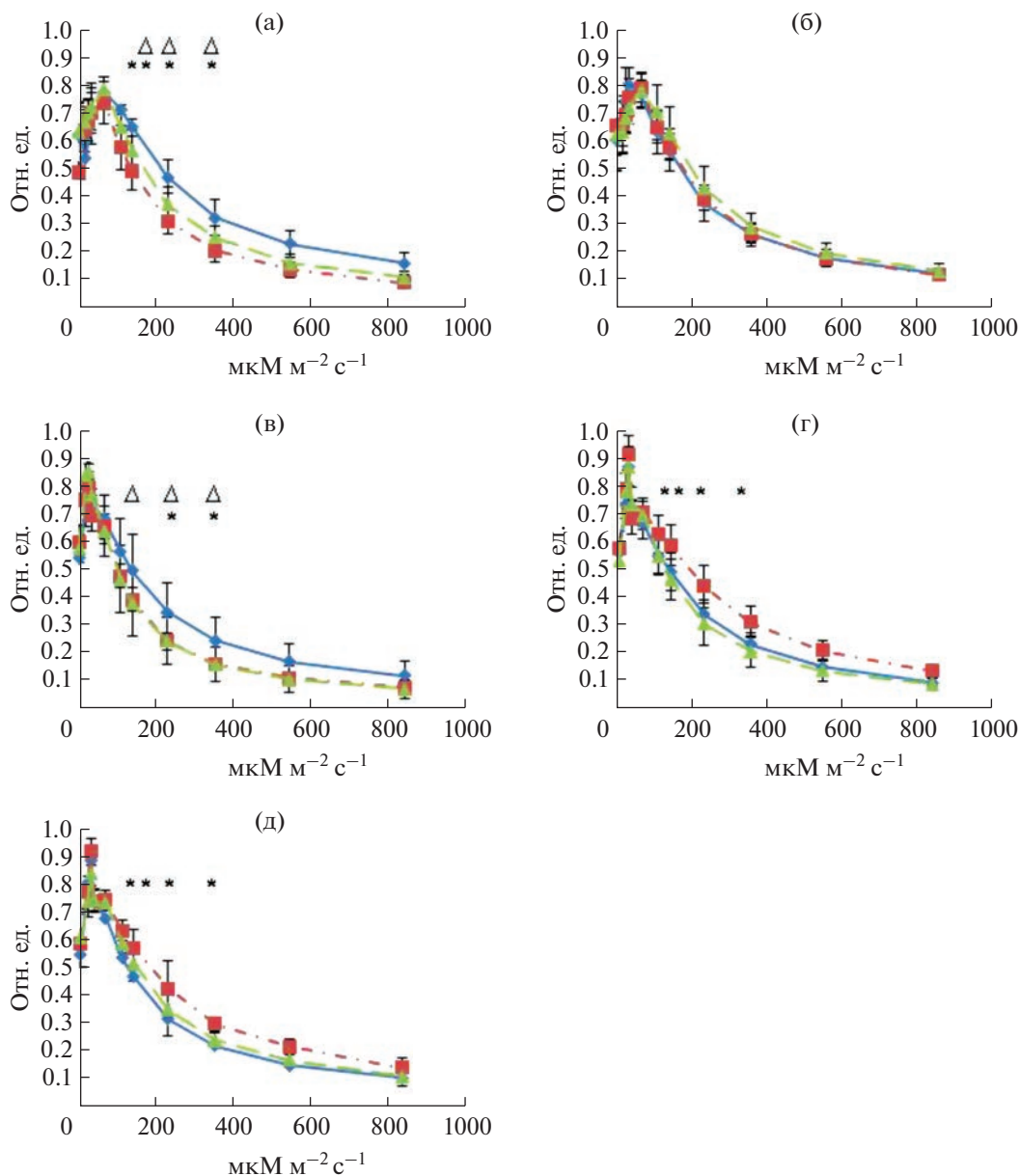


Рис. 4. Зависимость квантового выхода ФЦИ ($Y(I)$) от интенсивности света (“световая кривая”), измеренная в листьях дикого типа Ler (а), нокдаун-линий *KIN10-RNAi1* (б) и *KIN10-RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10-OX1* (г) и *KIN10-OX2* (д), в оптимальных условиях и на фоне засоления. Условные обозначения на графиках: сплошная линия с маркерами-ромбами — значения, полученные на растениях в контрольных условиях; штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами — значения, полученные на третьи сутки хронического засоления растений; пунктирная линия с маркерами-треугольниками — значения, полученные на пятые сутки хронического засоления растений; * — достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 сутки солевого стресса согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$; Δ — достоверные различия между измерениями в контроле и на пятые сутки солевого стресса согласно ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$. На графиках показаны средние арифметические значения десяти независимых измерений, выполненных на 10 листьях разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в μM фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; по оси ординат — значения параметра $Y(I)$ в относительных единицах.

KIN10 исследовали амплитуду светоиндуцированной протон-движущей силы ECS_{pmf} , а также относительные величины двух ее компонентов: градиента трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\Psi$) и градиента концентрации протонов (ΔpH)

(рис. 6а–в). У сверхэкспрессоров (*KIN10-OX1-2*) по сравнению с другими исследуемыми линиями обнаружена выраженная тенденция к более низкому уровню электрического градиента на мембранах хлоропластов (рис. 6б). В то же время

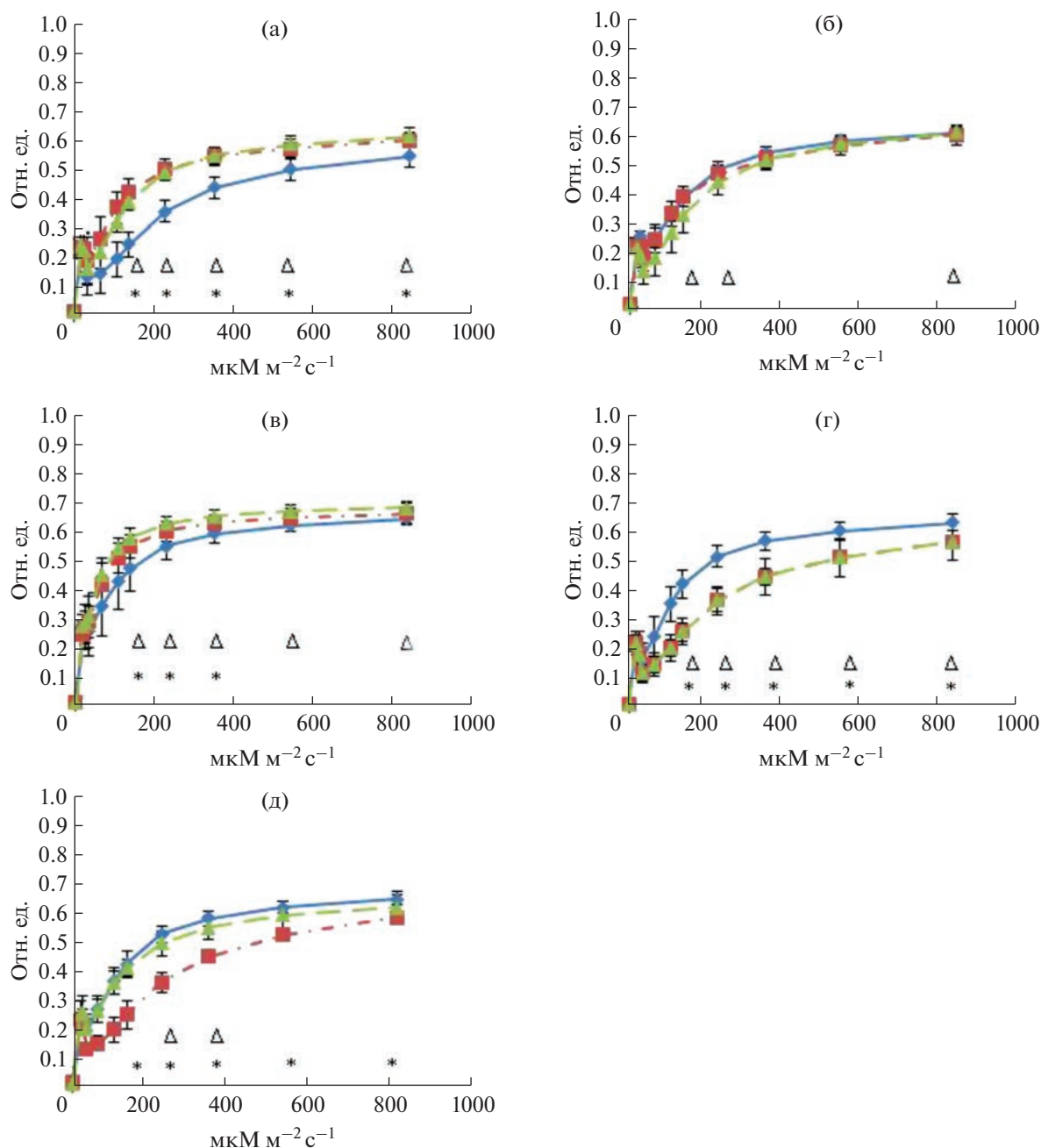


Рис. 5. Зависимость квантового выхода нефотохимического тушения флуоресценции ($Y(NPQ)$) от интенсивности света ("световая кривая"), измеренная в листьях дикого типа Ler (а), нокдаун-линий *KIN10-RNAi1* (б) и *KIN10-RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10-OX1* (г) и *KIN10-OX2* (д), в оптимальных условиях и на фоне засоления. Условные обозначения на графиках: сплошная линия с маркерами-ромбами — значения, полученные на растениях в контрольных условиях; штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами — значения, полученные на третьи сутки хронического засоления растений; пунктирная линия с маркерами-треугольниками — значения, полученные на пятые сутки хронического засоления растений; * — достоверные различия между измерениями в контроле и на третьи сутки солевого стресса согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$; Δ — достоверные различия между измерениями в контроле и на пятые сутки солевого стресса согласно ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$. На графиках показаны средние арифметические значения десяти независимых измерений, выполненных на 10 листьях разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в $\mu\text{M фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$; по оси ординат — значения параметра $Y(NPQ)$ в относительных единицах.

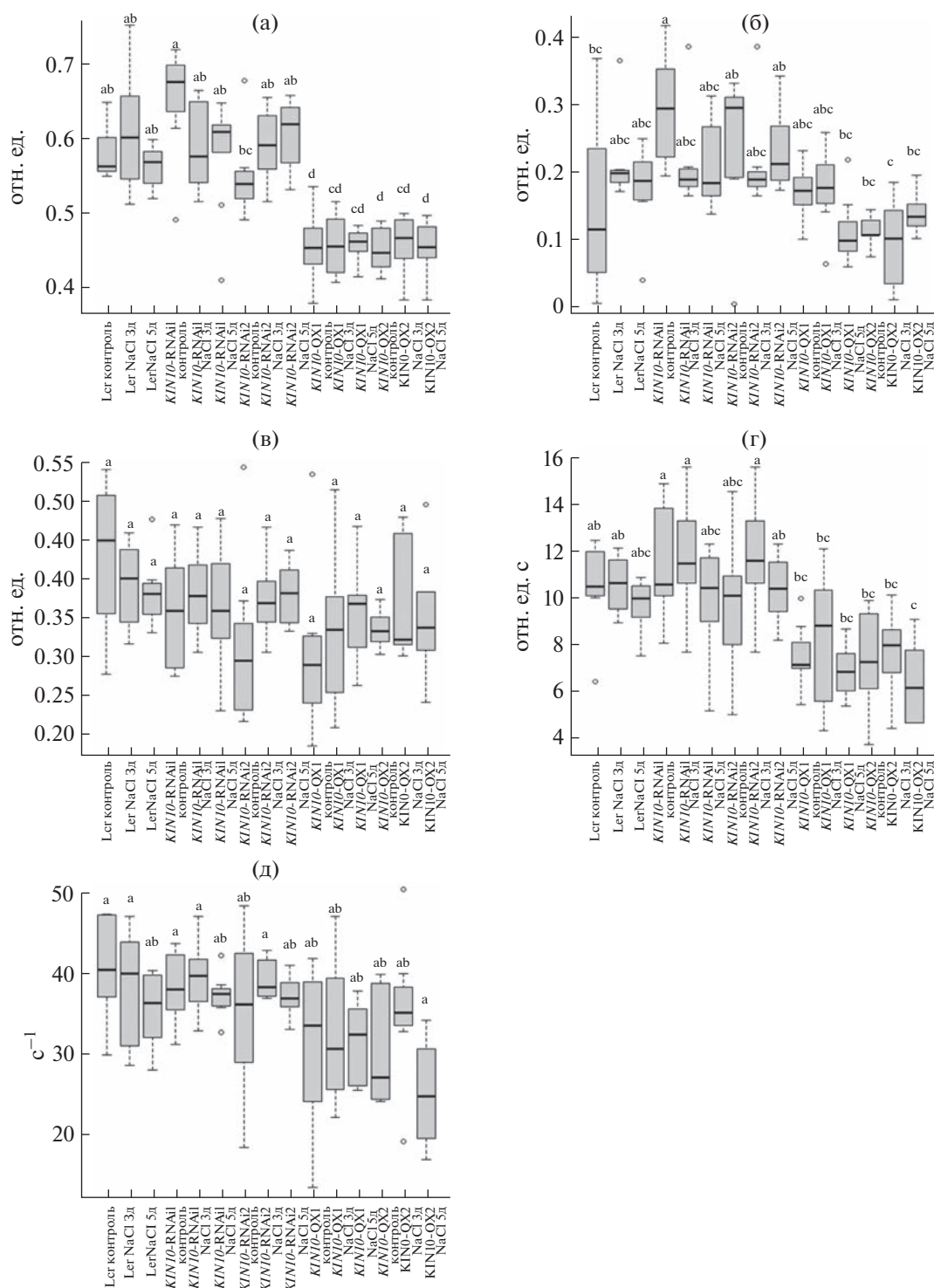


Рис. 6. Относительные уровни электрохимического градиента ECS_{pmf} (а), градиента электрического потенциала $ECS_{\Delta\psi}$ (б), градиента концентрации протонов $ECS_{\Delta pH}$ (в), линейной (г) и экспоненциальной (д) скорости синтеза АТФ в листьях растений дикого типа Ler, линий-сверхэкспрессоров *KIN10-OX1* и *KIN10-OX2*, а также линий с подавленной экспрессией *KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2* на фоне засоления. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. “Контроль” – значения показателя в оптимальных условиях роста, “NaCl 3д” и “NaCl 5д” – значения показателя на третьи и пятые сутки хронического засоления. Достоверность различий оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$.

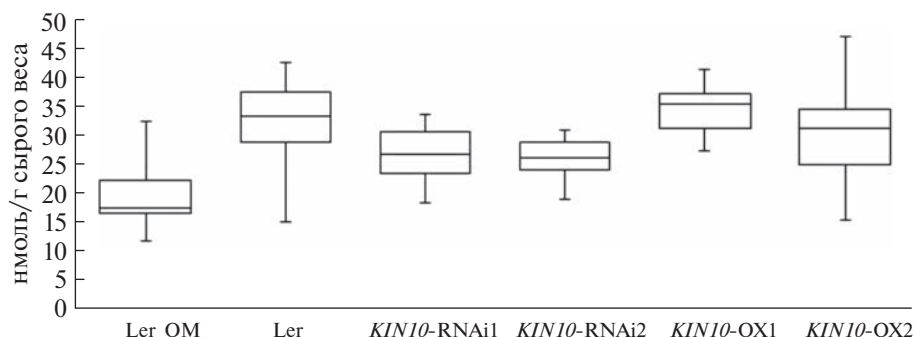


Рис. 7. Уровни АТФ в проростках дикого типа Ler, линий-сверхэкспрессоров *KIN10* (*KIN10-OX1* и *KIN10-OX2*) и линий с подавленной экспрессией *KIN10* (*KIN10-RNAi1* и *KIN10-RNAi2*) после 16 ч солевого стресса. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Эксперименты выполнены в пяти биологических и трех технических повторностях. OM – растения, обработанные олигомицином. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0.05$.

статистически достоверных отличий в амплитуде $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$ выявить не удалось и таким образом снижение общей амплитуды pmf в линиях сверхэкспрессоров не может быть объяснено специфическим снижением одного из двух компонентов pmf (рис. 6б, в). В *KIN10-OX1-2* была также выявлена тенденция к сниженной, относительно других линий, линейной скорости АТФ, которая напрямую зависит от протон-движущей силы, тогда как экспоненциальная скорость, зависящая от концентрации аденозинфосфатов и АТФ синтазы, оказалась сходной с таковой в других линиях арабидопсиса (рис. 6г, д).

Супрессия *KIN10* в нокаутных линиях арабидопсиса не вызывала достоверных изменений в амплитуде протон-движущей силы и двух ее компонентов $\Delta\psi$ и ΔpH по сравнению с растениями дикого типа ни в контрольных условиях, ни под действием засоления, за исключением хлоропластов *KIN10-RNAi1*, на мембранах которых в контрольных условиях генерировался более высокий градиент трансмембранного электрического потенциала по сравнению с другими линиями арабидопсиса (рис. 6б, в).

Уровень продукции АТФ в проростках арабидопсиса

Сравнили содержание АТФ в проростках дикого типа арабидопсиса, линий со сниженной и повышенной экспрессией *KIN10* в контрольных условиях и под действием солевого стресса. Для того чтобы оценить вклад митохондриального дыхания в продукцию АТФ в проростках, использовали ингибитор митохондриальной АТФ-синтазы олигомицин. В проростках всех изученных линий арабидопсиса содержание АТФ оказалось сходным (рис. 7). Показано, что примерно половина от суммарного содержания АТФ в

проростках генерируется в результате окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Солевой стресс оказывает комплексный негативный эффект на метаболизм растений, который связан с сокращением поглощения воды вследствие повышенного осмотического давления в ризосфере, с токсическим эффектом накопления катионов натрия и анионов хлора, а также с развитием окислительного стресса [28, 29]. Одной из мишеней хронического солевого стресса у растений является фотосинтетическая функция хлоропластов [30]. Для поддержания фотосинтеза как важнейшего энергопродуцирующего процесса у растений имеется набор адаптивных защитных механизмов, развивающихся в стрессовых условиях на уровне фотосинтетических тилакоидных мембран хлоропластов. Пути регуляции фотосинтетической способности растений со стороны энергетического сенсора растений – центральной регуляторной SnRK1-киназы – в условиях засоления, остаются неизвестными. В данном исследовании мы применили хронический солевой стресс для выявления взаимосвязи между уровнем активности SnRK1-киназы, который был генетически детерминирован уровнем транскрипции каталитической субъединицы фермента в разных линиях арабидопсиса (Ler, сверхэкспрессоры *KIN10-OX1-2*, нокауты *KIN10-RNAi1-2*) и механизмами адаптации фотосинтетической активности у растений арабидопсиса. В листьях взрослых растений с помощью неинвазивного высокочувствительного метода импульсной модулирующей и прямой флуориметрии хлорофилла *a* нами изучена динамика показателей фотохимических реакций фотосинтеза; методом регистрации электро-

хромного сдвига поглощения пигментов листа проведена оценка процессов генерации электрохимического градиента и АТФ-синтазной активности. Дополнительно в проростках биOLUMИ-несцентным методом исследовали содержание АТФ, которое коррелирует с общим энергетический статусом растительных клеток.

По таким фенотипическим признакам стресса как хлороз и скручивание листовых пластинок, наиболее чувствительными к засолению оказались растения арабидопсиса с нормальным и повышенным уровнем экспрессии *KIN10*. Линии с супрессией функции SnRK1-киназы за пять суток умеренного засоления фенотипически не изменялись. Ранее в работах [17, 18] была показана сниженная устойчивость *KIN10*-RNAi к абиотическим стрессорам, что, на первый взгляд, противоречит полученным нами данным. Однако, комплексная оценка фотосинтетической активности листьев исследуемых генотипов на фоне солевого стресса привела к выводам в пользу развития адаптивных изменений в линиях со сверхактивированным пулом SnRK1-киназы (*KIN10*-OX) и слабой выраженностью или полным отсутствием таких изменений у растений *KIN10*-RNAi с подавлением функций SnRK1. Так, за первые трое суток солевого стресса в линиях *KIN10*-OX происходило увеличение реальных квантовых выходов ФСП и ФСІ, и при этом не развивалось стресс-индуцированное нефотохимическое тушение флуоресценции, ассоциированное с регулируемым формированием центров диссипации энергии. Важно отметить, что квантовые выходы ФСП и ФСІ в линиях дикого типа и *KIN10*-RNAi-2 под действием засоления не изменялись или снижались с одновременным увеличением квантового выхода регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции.

Анализ показателей, коррелирующих с общим энергетическим статусом растений, показал, что генотип-специфичное изменение уровня SnRK1-киназы в линиях Leg, *KIN10*-OX и *KIN10*-RNAi ни в благоприятных, ни в стрессовых условиях не приводило ни к изменениям содержания АТФ в проростках, ни к существенному изменению работы АТФ-синтазы. В то же время нами впервые выявлена функциональная особенность работы электрон-транспортной цепи хлоропластов линий сверхэкспрессоров *KIN10*, состоящая в относительно низкой амплитуде формирующейся на свету транстилакоидной протон-движущей силы pmf. Расчет относительных изменений двух компонент pmf показал, что снижение амплитуды pmf, вероятнее всего, связано с низким градиентом электрического потенциала $\Delta\Psi$. Известно, что генерация протон-движущей силы играет критически важную роль в поддержании и регуляции фотосинтеза, поскольку именно электрохимический градиент протонов выступает связующим процессом

между абсорбцией энергии света и использованием поглощенной энергии на синтез АТФ [31]. Ранее низкая способность к генерации $\Delta\Psi$ на высоком свете была описана у мутанта арабидопсиса *pgr5* [32], мутанта-нокаута *chl1-3* с заблокированным биосинтезом хлорофилла *b* [22], а также мутантов с нарушением транспорта катионов и анионов через тилакоидную мембрану, например, по K^+/H^+ антипортеру *kea3* и фосфатному транспортеру *ph4;1* [33]. У исследуемых нами линий сверхэкспрессоров, в отличие от вышеперечисленных мутантов, снижение электрохимического градиента не было связано с нарушением генерации или повышением доли ΔpH компоненты в амплитуде pmf, что также коррелировало с сохранением способности *KIN10*-OX к развитию нефотохимического тушения флуоресценции. Известно, что поддержание сниженного градиента электрического потенциала в условиях флуктуирующего света является защитным механизмом, препятствующим развитию фотоповреждения ФСII [34]. SnRK1-киназа является важнейшим интегратором сигналов и центральным регулятором стрессовых ответов растений, который поддерживает развитие защитных процессов. На основании полученных данных мы предполагаем, что в линиях со сверхэкспрессией SnRK1 индуцирован неизученный пока механизм, изменяющий потоки ионов через тилакоидные мембраны на свету, что может оказывать защитное действие при накоплении ионов натрия и хлора в хлоропластах и обеспечивать поддержание активности фотосистем при засолении. Мы предполагаем также, что увеличение активности SnRK1-киназы в линиях *KIN10*-OX приводит к усилению процессов репарации хлоропластов, в первую очередь с участием автофагии [17, 18]. Таким образом, нами показаны изменения фотохимической активности хлоропластов, ассоциированные с конститутивной активацией SnRK1-киназы в двух линиях, сверхэкспрессирующих каталитическую субъединицу *KIN10*. Обнаруженные особенности световых реакций фотосинтеза сохранялись в этих линиях и при благоприятных условиях роста, и при адаптации к солевому стрессу. Подавление функции SnRK1-киназы методом замалчивания РНК-интерференцией в линиях арабидопсиса, напротив, приводило к отсутствию выраженного ответа на солевой стресс на уровне фотохимической активности хлоропластов. Согласно последним результатам изучения интерактивных и фосфопротеомных массивов данных [35] показано взаимодействие SnRK1-киназы с транскрипционным и трансляционным аппаратами клетки, протеинкиназами и фосфатазами, системами убиквитинирования и сумоилирования белков, цитоскелетом, системой внутриклеточного транспорта белков и автофагией. Конкретные молекулярные мишени SnRK1-зависимой сигнальной сети, которые

участвуют в регуляции энергетического метаболизма хлоропластов, остаются малоизученными. Полученные нами данные на модели растений арабидопсиса с измененным уровнем активности SnRK1-киназы представляются перспективными для проведения дальнейших исследований регуляции функций хлоропластов со стороны центрального энергетического сенсора SnRK1 и выявления путей регуляции энергетического статуса растительных клеток [4, 5, 36].

Авторы статьи выражают благодарность Dr. Filip Rolland (Catholic University of Leuven, Belgium) за любезно предоставленные семена линий *KIN10-OX* и *KIN10-RNAi*. Мы искренне признательны Dr. Katharina Pawlowski (University of Stockholm, Sweden) за критическое обсуждение результатов и рукописи статьи. Благодарим н.с. В.А. Дмитриеву (лаборатория молекулярной и экологической физиологии БИН РАН) за помощь в освоении метода электрохромного сдвига поглощения пигментов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90138.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shi L., Wu Y., Sheen J. TOR signaling in plants: conservation and innovation // *Development*. 2018. V. 145: dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
2. Baena-González E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // *Nature*. 2007. V. 448. P. 938.
3. Margalha L., Confraria A., Baena-González E. SnRK1 and TOR: modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 2261.
4. Nukarinen E., Nägele T., Pedrotti L., Würzinger B., Mair A., Landgraf R., Börnke F., Hanson J., Teige M., Baena-González E., Dröge-Laser W., Weckwerth W. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation // *Sci Rep*. 2016. V. 6: 31697. <https://doi.org/10.1038/srep31697>
5. Würzinger B., Nukarinen E., Nägele T., Weckwerth W., Teige M. The SnRK1 kinase as central mediator of energy signaling between different organelles // *Plant Physiol*. 2018. V. 176. P. 1085.
6. Bakshi A., Moin M., Kumar M.U., Reddy A.B.M., Ren M., Datla R., Siddiq E.A., Kirti P.B. Ectopic expression of *Arabidopsis* Target of Rapamycin (AtTOR) improves water-use efficiency and yield potential in rice // *Sci Rep*. 2017. V. 7: 42835. <https://doi.org/10.1038/srep42835>
7. Dong P., Xiong F., Que Y., Wang K., Yu L., Li Z., Ren M. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci*. 2015. V.6:677. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>
8. Brunkard J.O., Xu M., Scarpin M.R., Chatterjee S., She-myakina E.A., Goodman H.M., Zambryski P. TOR dynamically regulates plant cell–cell transport // *PNAS*. 2020. V. 117. P. 5049.
9. Gutierrez-Beltran E., Crespo J.L. Compartmentalization, a key mechanism controlling the multitasking role of the SnRK1 complex // *J. Exp. Bot*. 2022. V. 73. P. 7055.
10. Zhang Y., Primavesi L.F., Jhurreea D., Andralojc P.J., Mitchell R.A., Powers S.J., Schluepmann H., Delatte T., Winkler A., Paul M.J. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate // *Plant Physiol*. 2009. V. 149. P. 1860.
11. Yuan S., Zhang Z.-W., Zheng C., Zhao Z.-Y., Wang Y., Feng L.-Y., Niu G., Wang C.-Q., Wang J.-H., Feng H., Xu F., Bao F., Hu Y., Cao Y., Ma L., Wang H., Kong D.-D., Xiao W., Lin H.-H., He Y. *Arabidopsis* Cryptochrome 1 functions in nitrogen regulation of flowering // *PNAS*. 2016. V. 113. P. 7661.
12. Ramon M., Dang T.V.T., Broeckx T., Hulsmans S., Crepin N., Sheen J., Rolland F. Default activation and nuclear translocation of the plant cellular energy sensor SnRK1 regulate metabolic stress responses and development // *Plant Cell*. 2019. V. 31. P. 1614.
13. Ruiz-Gayosso A., Rodríguez-Sotres R., Martínez-Barajas E., Coello P. A role for the carbohydrate-binding module (CBM) in regulatory SnRK 1 subunits: the effect of maltose on SnRK 1 activity // *Plant J*. 2018. V. 96. P. 163.
14. Wang H., Han C., Wang J.G., Chu X., Shi W., Yao L., Chen J., Hao W., Deng Z., Fan M., Bai M.-Y. Regulatory functions of cellular energy sensor SnRK1 for nitrate signalling through NLP7 repression // *Nat. Plants*. 2022. V. 8. P. 1094.
15. Martínez-Barajas E., Coello P. How do SnRK1 protein kinases truly work? // *Plant Sci*. 2020. V. 291: 110330. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110330>
16. Zúñiga-Sánchez E., Rodríguez-Sotres R., Coello P., Martínez-Barajas E. Effect of catalytic phosphorylation on the properties of SnRK1 from *Phaseolus vulgaris* embryos // *Physiol. Plant*. 2018. V. 165. P. 632.
17. Chen L., Su Z.-Z., Huang L., Xia F.-N., Qi H., Xie L.-J., Xiao S., Chen Q.-F. The AMP-activated protein kinase KIN10 is involved in the regulation of autophagy in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8:1201. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01201>
18. Soto-Burgos J., Bassham D.C. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS ONE*. 2017. V. 12:e0182591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>
19. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil // *Circ. - Calif. Agric. Exp. Stn*. 1950. V. 347. P. 1.
20. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-

- chloroform extraction // *Anal Biochem.* 1987. V. 162. P. 156.
21. *Schmittgen T.D., Livak K.J.* Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method // *Nat. Protocols.* 2008. V. 3. P. 1101.
 22. *Dmitrieva V.A., Domashkina V.V., Ivanova A.N., Sukhov V.S., Tyutereva E.V., Voitsekhovskaja O.V.* Regulation of plasmodesmata in *Arabidopsis* leaves: ATP, NADPH and chlorophyll *b* levels matter // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 5534.
 23. *Schreiber U., Klughammer C.* New accessory for the DUALPAM-100: the P515/535 module and examples of its application // *PAM Application Notes.* 2008. V. 1. P. 1.
 24. *Sukhov V., Surova L., Morozova E., Sherstneva O., Vodeneev V.* Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7:1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01092>
 25. *Kroemer S., Heldt H.-W.* On the role of mitochondrial oxidative phosphorylation in photosynthesis metabolism as studied by the effect of oligomycin on photosynthesis in protoplasts and leaves of barley (*Hordeum vulgare*) // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 1270.
 26. *Lundin A., Thore A.* Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay // *Appl. Microbiol.* 1975. V. 30. P. 713.
 27. *Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Katicheva L., Semina M., Sukhov V.* Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves // *J. Plant Physiol.* 2016. V. 202. P. 57.
 28. *Pan T., Liu M., Kreslavski V., Zharmukhamedov S., Nie C., Yu M., Kuznetsov V., Allakhverdiev S., Shabala S.* Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2021. V.51. P. 791.
 29. *Zahra N., Al Hinai M.S., Hafeez M.B., Rehman A., Wahid A., Siddique K.H.M., Farooq M.* Regulation of photosynthesis under salt stress and associated tolerance mechanisms // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 178. P. 55.
 30. *Awlia M., Nigro A., Fajkus J., Schmoeckel S.-M., Negrão S., Santelia D., Trilek M., Tester M., Julkowska M.-M., Panzarová K.* High-throughput nondestructive phenotyping of traits that contribute to salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2016. V.7:1414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01414>
 31. *Takizawa K., Cruz J.A., Kanazawa A., Kramer D.M.* The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 1233.
 32. *Yamamoto H., Shikanai T.* PGR5-Dependent Cyclic Electron Flow Protects Photosystem I under Fluctuating Light at Donor and Acceptor Sides // *Plant Physiol.* 2019. V. 179. P. 588.
 33. *Spetea C., Herdean A., Alloreant G., Carraretto L., Finazzi G., Szabo I.* An update on the regulation of photosynthesis by thylakoid ion channels and transporters in *Arabidopsis* // *Physiol Plant.* 2017. V.161. P. 16.
 34. *Davis G.A., Kanazawa A., Schöttler M.A., Kohzuma K., Froehlich J.E., Rutherford A.W., Satoh-Cruz M., Minhas D., Tietz S., Dhingra A., Kramer D.M.* Limitations to photosynthesis by proton motive force-induced photosystem II photodamage // *Elife.* 2016. V. 5:e16921. <https://doi.org/10.7554/eLife.16921>
 35. *Jamsheer M.K., Kumar M., Srivastava V.* SNF1-related protein kinase 1: the many-faced signaling hub regulating developmental plasticity in plants // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 6042.
 36. *Tyutereva E.V., Murtuzova A.V., Voitsekhovskaja O.V.* Autophagy and the energy status of plant cells. *Russ J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 19. <https://doi.org/10.1134/S1021443722020212>