

УДК 577.355.2

ИССЛЕДОВАНИЕ САЙТОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ ФОТОСИСТЕМЫ II ФОТОСИНТЕЗА IN VIVO ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНО ВЫСОКОЙ ИНСОЛЯЦИИ И ТЕМПЕРАТУРЕ

²Баширзаде А., ¹Махмудов З., ¹Абдуллаев Х., ¹Гасанов Р.

¹Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан;

²Исламский независимый университет, Астаринское отделение, Иран,
e-mail: ra38hasan@yahoo.com

В работе выявлены повреждаемые участки фотосистемы II (ФСII) листьев 7-дневных проростков ячменя и кукурузы в результате воздействия двойного стресса – освещения интенсивным видимым светом, превышающим интенсивность, необходимую для фотосинтеза (320 Вт/м^2), и вызывающим фотоингибирование фотосинтеза и действия высокой, критической для данных культур, температуры ($42\text{--}45^\circ\text{C}$) – на основе анализа различных фаз индукционной кривой замедленной флуоресценции хлорофилла а ФСII в миллисекундном диапазоне (мсЗФ). Установлено, что на донорной стороне ФСII сайт термповреждения совпадает с сайтом фотоингибирования и локализуется в области $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$ кластера или в области тирозина белка D1 (Y_z). На акцепторной стороне ФСII основным сайтом фотоингибирования является пункт, близкий к реакционному центру ФСII, в то время как сайт термоинактивации сохраняется на донорной стороне, что выражается в эффекте усиления повреждения ФСII при двойном стрессе. Листья кукурузы характеризуются большей устойчивостью различных фаз индукционной кривой мсЗФ хлорофилла а при воздействии двойного стресса.

Ключевые слова: фотосистема II, фотоингибирование, высокотемпературный стресс, *Hordeum Vulgare*, *Zea mays*, мс-замедленная флуоресценция, $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$ кластер, Y_z

THE INVESTIGATION IN VIVO OF DAMAGE SITES IN PHOTOSYSTEM II OF PHOTOSYNTHESIS UNDER EXTREMELY HIGH INSOLATION AND TEMPERATURE

²Bashirzadeh A., ¹Mahmudov Z., ¹Abdullayev K., ¹Hasanov R.

¹Baku State University, Baku;

²Department of Agriculture, Islamic Azad University, Astara branch, Iran,
e-mail: ra38hasan@yahoo.com

In this work the damage sites of photosystem II (FSII) in 7 days barley and maize seedlings, as a result of double stress influence-illumination by intensive visible light, excess for photosynthesis (320 W/m^2) and critic high for given culture temperatures ($42\text{--}45^\circ\text{C}$) –on base of analyses of various phases of induction curve of delayed fluorescence of chlorophyll a FSII in millisecond range (msDF) have been observed. It was determined that, on the donor side, site of FSII thermdamage coincides with the site of photoinhibition and is located in the $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$ cluster or on the D1 tyrosine (Y_z). At the same time on the acceptor side of FSII, the main site of photoinhibition is the point close to the reaction centre of FSII, while the thermdamage site was kept on donor side, which is reflecting by the effect of FSII damage increase under double stress. It was determined that the maize is characterized by more tolerance of various phases of msDF under double stress.

Keywords: photosystem II, photoinhibition, high-temperature stress, *Hordeum Vulgare*, *Zea mays*, ms delayed fluorescence, $\text{Mn}_4\text{O}_x\text{Ca}$ cluster, Y_z

В природных условиях фотосинтезирующие организмы наряду с фотоповреждением зачастую одновременно подвергаются действию других неблагоприятных факторов, таких как, например высокие и низкие температуры, высокая концентрация NaCl и других факторов. Установлено, что ФСII весьма чувствительна к изменениям условий окружающей среды и под влиянием этих неблагоприятных факторов активность ФСII падает в большой степени, чем активности других физиологических процессов [1–5]. В ранних исследованиях основное внимание уделялось проблеме выяснения механизма повреждения ФСII in vitro под влиянием различных стрессовых факторов [6–9]. Установлено, что высокая температура инактивирует хлоропласты и в первую очередь реакции,

связанные с выделением кислорода. Выделение кислорода инактивируется при инкубации тилакоидов хлоропластов при $32\text{--}45^\circ\text{C}$ в течение нескольких минут и сопровождается сольюбилизацией 33, 24 и 17 кДа периферических белков кислород-выделяющего комплекса и вываливанием ионов Mn. По этому поводу рассматриваются различные объяснения, но все они сводятся к тому, что сольюбилизация, в частности 33 кДа белка, а также вываливание ионов Mn и есть результат термической обработки тилакоидов и, как правило, термоинактивации выделения кислорода. Так, Williams и Gounaris [10] показали, что высокая концентрация сахарозы повышает термостабильность выделения кислорода в результате стабилизации связи 33 кДа белка с ядром ФСII [11, 12].

Вместе с тем сайты термоинактивации фотосинтеза *in vivo*, а также сайты повреждения ФСII при взаимодействии различных типов стрессов на растительный организм, в частности на активность ФСII, на целом растении практически не исследованы. В этой связи в данной работе представлены экспериментальные данные о сайтах повреждения ФСII при одновременном воздействии высоких температур и избыточно-го для нормального протекания фотосинтеза освещения на активность ФСII двух видов культурных растений – ячменя и кукурузы, отличающихся по степени теплолюбивости.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на семидневных проростках ячменя (*Hordeum Vulgare L. cv. Makooi Barle*) и кукурузы (*Zea Mays L. cv. Var. 540*). Замоченные в течение 24 часов семена переводились на фильтровальную бумагу и проращивались в чашках Петри при температуре 25 °С, с последующим переводом в люминостат (освещение 60 W/м² в течение 16 ч с 8-часовым темновым интервалом). Температурный стресс вызывали, помещая проростки в специальную камеру, которая позволяла поддерживать необходимую температуру ($\pm 0,5$ °С) и режим влажности и аэрации. Фотоингибирование (освещение белым светом 320 W/м²) проростков, выращенных в нормальных условиях и непосредственно после температурного стресса, также проводили в термостатированных условиях с поддержанием влажности и аэрации.

Степень и место повреждения ФСII определяли путем измерения и последующего анализа индукционной кривой мс3Ф хлорофилла а листьев проростков. Измерения проводили на установке с фосфороскопом, позволяющей регистрировать индукционную кривую миллисекундной компоненты 3Ф [13]. Состояние ФСII листьев проростков после воздействия стрессовых факторов оценивалось по характеру изменения различных фаз индукционной кривой мс3Ф хлорофилла а ФСII [14, 15].

Результаты исследования и их обсуждение

В работе рассматриваются изменения двух фаз индукционной кривой мс3Ф (рис. 1) – быстрой, отражающей события в ближайшем окружении реакционного центра ФСII, в частности его переход в закрытое состояние (восстановление первичных акцепторов) [11], и медленной – отражающей события на донорной стороне ФСII [15].

На рис. 2 приведены данные зависимости отношения интенсивности быстрой фазы мс3Ф к стационарному уровню от температуры, при различном времени выдерживания проростков в соответствующих условиях. Как видно из данных, приведенных на рисунке, температура от 25 до 40 °С не изменяет существенно интенсивности быстрой фазы мс3Ф проростков ячменя

(рис. 2,а). Даже при выдерживании их при 40 °С в течение 30 мин это отношение сохраняется на том же уровне. Однако повышение температуры до 42,5 °С понижает интенсивность данной фазы более чем на 50 %, а при повышении температуры до 45 °С уже через 10 минут воздействия излучение этой фазы полностью исчезает. Несколько иной характер индукционной кривой мс3Ф хлорофилла а наблюдается на листьях проростков кукурузы (рис. 2, б). Увеличение температуры воздействия приводит к монотонному уменьшению отношения быстрой фазы к стационарному уровню. Уровень отношения при 42,5 °С несколько ниже, чем у проростков ячменя. Однако, как и для ячменя, у проростков кукурузы мс3Ф хлорофилла а ФСII полностью подавляется даже при кратковременном воздействии температуры 45 °С (10 мин).

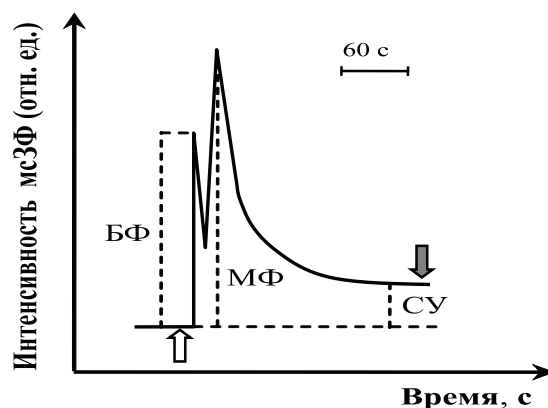


Рис. 1. Характерная индукционная кривая мс-3Ф листа проростков ячменя: БФ – быстрая фаза; МФ – медленная фаза; СУ – стационарный уровень

Медленная фаза мс3Ф характеризуется меньшей устойчивостью к температурному воздействию (рис. 3). Так, медленная фаза мс3Ф проростков ячменя полностью подавляется при 42,5 °С (рис. 3,а). Вместе с тем медленная фаза мс3Ф хлорофилла а ФСII листьев проростков кукурузы оказывается более устойчивой к температурному воздействию и флуоресценция этой фазы сохраняется до 42,5 °С и эта фаза мс3Ф проростков кукурузы полностью подавляется лишь при температуре 45 °С (рис. 3,б). При фотоингибировании проростков ячменя и кукурузы после выдерживания различного времени при близкой к критической температуре 42,5 °С наблюдается подавление обеих фаз мс3Ф (рис. 4,5). Однако степень и характер подавления значительно различаются. Быстрая фаза мс3Ф хлорофилла а листьев ячменя подавляется значительно сильнее, чем кукурузы (рис. 4).

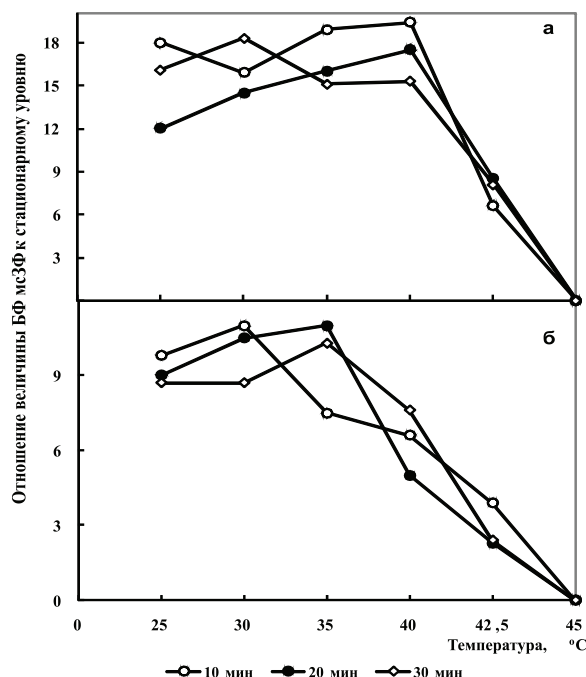


Рис. 2. Зависимость отношения интенсивности быстрой фазы (БФ) к величине стационарного уровня (СУ) мс3Ф хлорофилла а ФСII листьев проростков ячменя (а) и кукурузы (б) от времени выдерживания при различных температурах

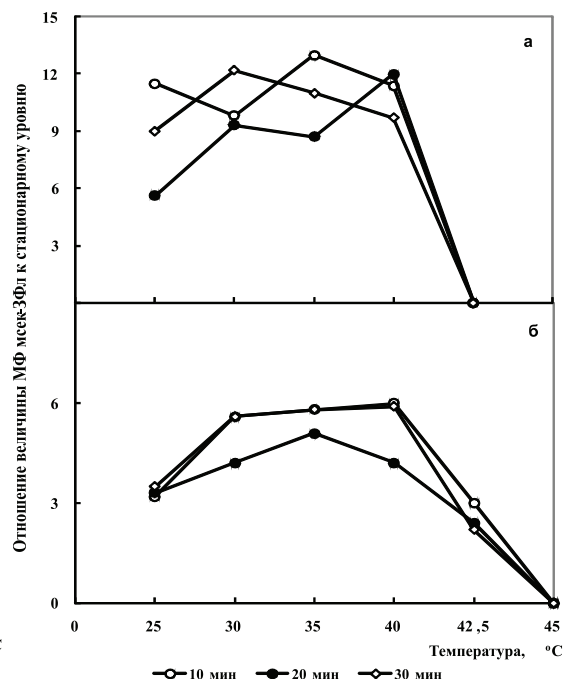


Рис. 3. Зависимость отношения интенсивности медленной фазы (МФ) к величине стационарного уровня (СУ) мс3Ф хлорофилла а ФСII листьев проростков ячменя (а) и кукурузы (б) от времени выдерживания при различных температурах

Медленная фаза мс3Ф хлорофилла а листьев кукурузы также несколько более устойчива, однако интенсивный свет резко подавляет эту фазу мс3Ф у обеих культур уже в первые минуты (рис. 5).

При этом фотоингибирование медленной фазы мс3Ф значительно сильнее, особенно в первые 2–3 минуты после 10-минутного выдерживания проростков при 42,5 °C. (рис. 5, а). Далее характер фотоингибирования изменяется и при 20 мин теплового воздействия медленная фаза мс3Ф хлорофилла а листьев кукурузы демонстрирует большую устойчивость к избыточному освещению (рис. 5, б). После 30 мин теплового воздействия сильный свет еще сильнее подавляет медленную фазу мс3Ф хлорофилла а листьев ячменя (рис. 5, в).

Итак, с помощью измерения и анализа индукционной кривой мс3Ф хлорофилла а листьев проростков ячменя и кукурузы нами предпринята попытка выяснения сайтов повреждения ФСII под влиянием высоких температур и высокой интенсивности видимого света. Метод замедленной эмиссии света хлорофиллом а ФСII, в частности медленная фаза индукционной кривой мс3Ф позволяет говорить о том, подвергается ли инактивации Mn_4O_xCa кластер ФСII. Как

правило, эта фаза связана с реакцией рекомбинации хлорофилла реакционного центра ФСII ($P680 Q_A^-$) с одним из состояний S_{0-4} фотоокисления Mn_4O_xCa кластера [12]. В случае если мы не наблюдаем этого компонента, или в случае его уменьшения по интенсивности, мы можем сделать вывод об инактивации одного из состояний окисления Mn_4O_xCa кластера (S_{i+1}) [12]. Действительно, достаточно обработать листья проростков ячменя или кукурузы при температуре 42,5 °C в течение 10 мин, как мы наблюдаем полное исчезновение медленной компоненты на индукционной кривой мс3Ф (см. рис. 3). Таким образом, мы можем утверждать, что в целом неповрежденном листе, одним из наиболее уязвимых сайтов термоинактивации является одно из состояний окисления Mn_4O_xCa кластера. Конечно, возможен и обсуждаемый выше и известный ранее механизм повреждения, связанный с солюбилизацией 33 кДа периферического белка ФСII. Однако хорошо известно, что в целом растении периферические белки ФСII более устойчивы, чем в изолированных тилакоидах, подвергнутых термической обработке. Поэтому мы имеем больше оснований предполагать о непосредственном повреждении S_{i+1} состояния Mn_4O_xCa кластера.

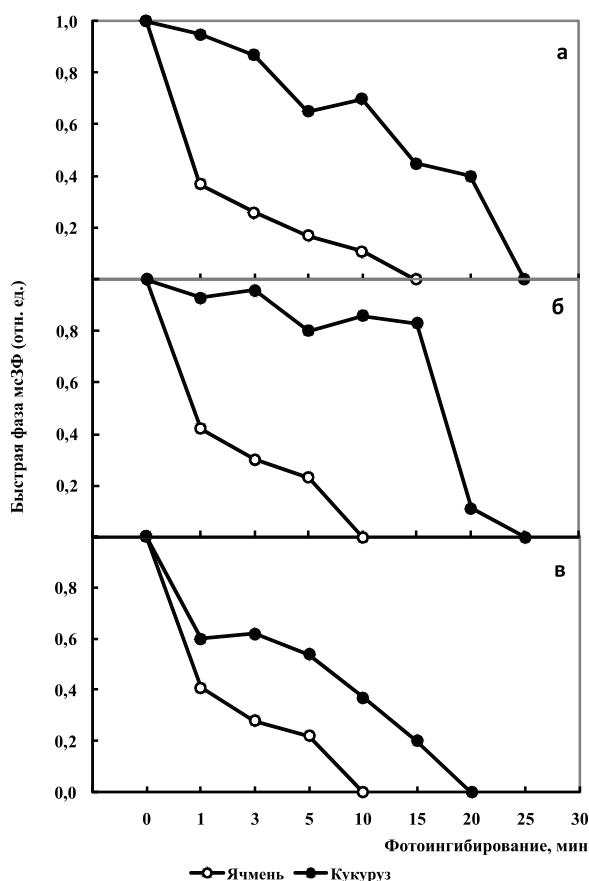


Рис. 4. Фотоингибирование (белый свет, 320 W/m²) быстрой фазы индукционной кривой мсЗФ листьев проростков ячменя и кукурузы при выдерживании их при близкой к критической температуре 42,5 °С в течение 10 мин (а), 20 мин (б), 30 мин (в)

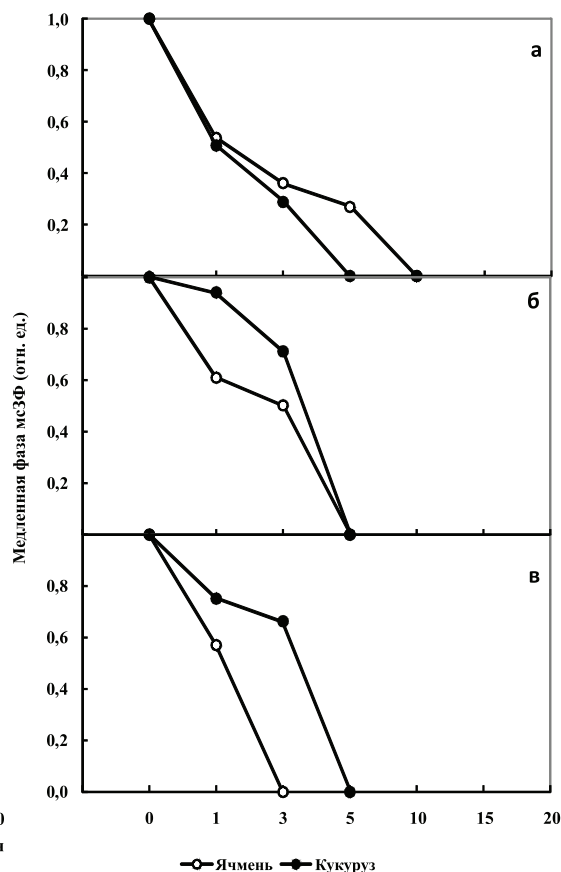


Рис. 5. Фотоингибирование медленной фазы индукционной кривой мсЗФ хлорофилла а листьев проростков ячменя и кукурузы при выдерживании их при близкой к критической температуре 42,5 °С в течение 10 мин (а), 20 мин (б), 30 мин (в)

Реакционный центр ФСII более устойчив, и при фотоингибировании быстрая фаза мсЗФ для проростков ячменя подавляется после 10 мин освещения избыточным светом, а для проростков кукурузы – через 20 мин). Вместе с тем мы с полным основанием можем утверждать о том, что наиболее уязвимым сайтом при термической обработке целого растения является Mn_4O_xCa кластер ФСII. При двойном стрессе – высокой интенсивности видимого света и экстремально высокой температуре – сайт повреждения на донорной стороне, как для высокой инсоляции, так и для высокой температуры локализуется в одном месте – по видимому на $Mn_4O_xCa_2$ кластере или на Y_z . На акцепторной стороне сайт повреждения от сильного света локализуется между Q_a и Q_b . Таким образом, полученные результаты позволяют сделать экспериментально обоснованные выводы о сайтах повреждения фотосисте-

мы II изученных растений при двойном стрессе – высокой интенсивности видимого света и экстремально высокой температуре, которые располагаются как на донорной, так и на акцепторной стороне ФСII. При этом сайт повреждения на донорной стороне, как для высокой инсоляции, так и для высокой температуры локализуется в одном месте – по видимому на Mn_4O_xCa кластере или на Y_z . На акцепторной стороне сайт повреждения от сильного света локализуется вблизи реакционного центра ФСII, в то время как высокая температура повреждает в первую очередь Mn_4O_xCa кластер. Вместе с тем следует указать на то, что метод мсЗФ может быть применен для ранней диагностики устойчивости растений к различным стрессовым факторам, а также может быть использован в качестве инструмента для скрининга при отборе новых сортов, отличающихся по устойчивости к изучаемым стрессам.

Список литературы/References

1. Aro E.M., Virgin I., Andersson B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation protein damage and turnover // *Biochim. Biophys. Acta* 1993. – 1143. – P. 113–134.
2. Andersson B., Aro E.M. Photodamage and D1 protein in photosystem II, in: E.M. Aro, B. Andersson (Eds). Regulation of photosynthesis. – Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 2001. – P. 377–393.
3. Berry J., Bjorkman O.. Photosynthetic response and adaptation temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol // Plant Molecular Biol.* – 1980. – №31. – P. 491–543.
4. Demming-Adams B., Adams W.W.. Photoprotection and other responses of plants in high light stress. *Annu. Rev // Plant Physiol, Plant Mol. Biol.* – 1992. – №43. – P. 599–626.
5. Jones L.W., Kok B. Photoinhibition of chloroplast reactions: I Kinetics and action spectre // *Plant Physiol.* – 1966. – №41. – P. 1037–1043.
6. Jones L.W., Kok B. Photoinhibition of chloroplast reactions: II Multiple effects // *Plant Physiol.* – 1966. – №41. – P. 1044–1049.
7. Boyer J.S., Bowen B.L. Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials // *Plant Physiol.* – 1970. – 45. – P. 612–615.
8. Bjorkman O., Powles S.B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level // *Planta.* – 1984. – №16. – P. 490–504.
9. Nash D., Miyao M., Murata N. Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – №807. – P. 127–133.
10. Williams W.P., Gounaris K. Stabilisation of PSII-mediated electron transport in oxygen-evolving PSII core preparations by the addition of compatible co-solutes, *Biochim // Biophys. Acta.* – 1992. – №110. – P. 92–97.
11. Allakhverdiyeva Y.M. Mamedov M.D, Ferimazova N.N. Papageorgiou G.G., Gasanov R.A. Glycinebetaine stabilizes of photosystem I and Photosystem II electron transport in spinach thylacoid membranes against heat inactivation // *Photosynth.* – 1999. – №37. – P. 423–432.
12. Rubin P., Matorin D., Krendeleva T., Venediktov P. The initial processes of photosynthesis and productivity // *Arg. Biol.* – 1985. – №6. – P. 81–92.
13. Gasanov R., Aliyeva S., Arao S., Ismailova A., Katsuta N., Kitade H., Yamada S., Kavamori A., Mamedov F.. Comparative study of the water oxidizing reactions and the millisecond delayed chlorophyll fluorescence in photosystem II at different pH J. of Photochem. and Photobiol // B: Biology. – 2007. – №86. – P. 160–164.
14. Mahmudov Z.M., Abdullayev Kh.D., Gasanov R.A. Photoinhibition in vivo of photosystem II reactions during development of the photosystems of wheat seedling. *Photosynth. – Research*, 2005. – №84. – P. 9–14.
15. Gasanov R., Aliyeva S., Mamedov F. Delayed Fluorescence in a millisecond Range—a Probe for the Donor Side Induced Photoinhibition of photosystem II. In: «Photosynthesis: overview on recent progress and future perspectives» (Eds. S. Hot, P. Mohanty and K. Guruprasad) // K. Publisheres. – 2011. – P. 101–107.

Рецензент –

Курбанова И.М., д.б.н., доцент, зав. лабораторией биофизики, Институт ботаники Академии наук Азербайджана, г. Баку.

Работа поступила в редакцию 12.04.2012.