

ЭФФЕКТ Na-АСКОРБАТА В ЗАЩИТЕ АКТИВНОСТИ ФС II В УСЛОВИЯХ ОДНОВРЕМЕННОГО ДЕЙСТВИЯ Co^{2+} И ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ

Ганиева Р.А.¹, Атакишиева С.А.¹, Гасанов Р.А.²

¹ Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана,
Бадамдарское шоссе, 40, г. Баку, 1004, Азербайджан; e-mail: SevincAtakisliyeva@gmail.com

² Бакинский государственный университет
ул. Академика Захида Халилова, 23, г. Баку, AZ 1148, Азербайджан; e-mail: ra38hasan@gmail.com

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Функциональное состояние ФС II в листьях проростков пшеницы, подвергнутых комплексному действию Co^{2+} и фотоингибированию определяли на основании различных характеристик замедленной флуоресценции хлорофилла а (мсек ЗФ Хл а). Воздействие Co^{2+} выразилось в резком падении характеристической величины мсек ЗФ Хл а реакционного центра ФС II и в более слабом блокировании донорной стороны характеризующей состояние Mn_4O_5Ca кластер и Y_z . Реактивные формы кислорода, генерируемые в процессе фотоингибирования, блокировали также в большей мере акцепторную сторону ЭТЦ ФС II. Увеличение времени адаптации наблюдалось значительное падение активности на донорной стороне ЭТЦ ФС II. Комплексное воздействие обоих факторов слабо влияло на изменение флуоресцентных характеристик, которые оставались почти на уровне действия Co^{2+} . Показано, что адаптивные возможности фотохимических реакций, протекающих в ЭТЦ ФС II при комплексном стрессе стимулируется низкомолекулярным антиоксидантом Na-аскорбатом. Предполагается, что Na-аск играет решающую роль в защите хлоропластов от окислительного стресса посредством тушения O_2 и *OH .

Ключевые слова: ФС II, ЭТЦ, Co^{2+} , фотоингибирование, РФК, Na-аскорбат.

ВВЕДЕНИЕ

Для сохранения роста и развития растительного организма происходит естественная запрограммированная смерть клетки [1]. Однако, экстремальные абиотические факторы отрицательно влияют на растительный организм, вызывая окислительный стресс и подавляя физиологические процессы [2, 3]. В данных условиях реактивные формы кислорода (РФК) генерируются как побочные продукты большинства энергопродуцирующих процессов, в частности, при фотосинтезе. Хлоропласты являются основным органом, продуцирующим РФК [4-6]. Антиоксидантная система не всегда способна сохранять баланс между образованием РФК и удалением. В данной ситуации защита становится не эффективной [7, 8]. В природе растительный организм подвергается одновременному воздействию многих отрицательных факторов. Наиболее уязвимыми являются ФС II и ее компонент кислород-выделяющий комплекс [9]. Разрушение его в условиях стресса приводит к денатурации, протеолизу белка и перекисному окислению липидов в реакционном центре (РЦ) и подавлению транспорта электрона в электрон транспортной цепи [10]. Важной задачей является определение сайта токсического действия стрессовых факторов в электрон транспортной цепи ФС II. Показано, что ТМ, включаясь в фотосинтетические пути транспорта электронов на многих участках влияют на ее фотохимическую активность [11, 12]. Фотоингибирование снижает скорость переноса электрона при высокой интенсивности света и способствует образованию фотохимически неактивных реакционных центров ФС II. Фотоингибирование определяется скоростью деградации и ресинтеза одного из ключевых белков ФС II – D_1 белок [13, 14]. Инактивация РЦ ФС II при окислительном стрессе может быть восстановлена лишь через деградацию и синтез белка D_1 *de novo* [15]. Известно, что в природе длительное воздействие стрессовых факторов приводит к неспецифическому повышению устойчивости растений называемой перекрестной адаптацией. Возможно, этот феномен связан с повышенной активностью защитных антиоксидантных соединений высокомолекулярных и низкомолекулярных, способных нейтрализовать свободные радикалы [16, 17]. Основная цель данной работы заключалась в определении механизма действия Na-аск на восстановление работы ЭТЦ ФС II подавляемой двойным стрессом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные в водной среде в факторостатных условиях (t 24°C, влажность 80%, освещение 250 мкВт/см²). Проростки подвергали в течение 48 часов действию $CoCl_2$ ($10^{-3}M$) и действию в течение 24 часов светом высокой интенсивности (4000 μM фотон/м²/с). Проростки, переживающие двойной стресс, переносили 1) в воду и 2) в раствор $CoCl_2$ в присутствии Na-аск $4 \cdot 10^4$ М. Исследования проводили *in vivo* на листьях *Triticum aestivum* L. Функциональную активность ЭТЦ ФС II оценивали методом замедленной флуоресценции (мсек ЗФ Хл а) [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность фотохимических процессов в электрон транспортной цепи (ЭТЦ) ФС II, после действия на проростки Co^{2+} и фотоингибированием оценивали по изменению индукционных переходов кинетических кривых мсек ЗФ Хл *a*. Действие света высокой интенсивности в течении 2-х часов вызывало падение активности донорной стороны ЭТЦ. Величина отношения быстрой флуоресценции к стационарной флуоресценции (б/с), характеризующая донорную сторону, уменьшалась через 2 часа лагфазы в 1,6 раза, а через 24 часа лагфазы, эта величина уменьшалась в 3 раза (рис. 1).

Величина отношения медленной флуоресценции к стационарной флуоресценции (м/с), характеризующая активность акцепторной стороны ЭТЦ, уменьшалась через 2 часа лагфазы в 1,3 раза, а через 24 ч – в 2,3 раза. При действии на проростки в течении 48 часов Co^{2+} приводило к падению через 2 ч лагфазы активности б/с в 1,3 раза и в большей мере величина м/с – 2 раза, а через 24 часа величина б/с в 0,8 раз, а величина м/с оставалась почти на таком же уровне (рис. 1). После одновременного действия на проростки Co^{2+} и фотоингибирования особых отклонений в активности ЭТЦ не наблюдалось. Величины б/с и м/с оставались почти на уровне действия Co^{2+} . Испытуемые проростки после двойного стресса были помещены на 24 часа в раствор содержащий Co^{2+} и в воду. Наблюдалось резкий спад в активности работы ЭТЦ. Величина б/с в условии с водой падала в 2,2 раза, а м/с в 2,3 раза. В условии с Co^{2+} величина б/с уменьшалась в 2,4 раза, а величина м/с в 3 раза (рис. 2). Действие Na-аск восстанавливало активность ЭТЦ подавляемой одновременным действием Co^{2+} и фотоингибированием.

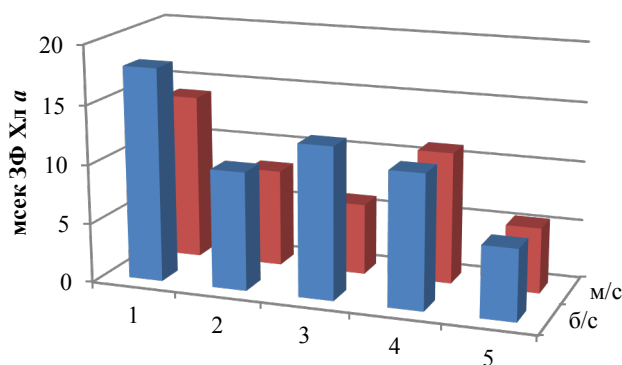


Рисунок 1. Изменение отношения быстрой и медленной флуоресценции к стационарной флуоресценции (б/с; м/с), определяющих работу донорной и акцепторной стороны ЭТЦ ФС II в условиях CoCl_2 (10^{-3}M) и фотоингибирования ($4000 \mu\text{M}$ фотон/ $\text{m}^2/\text{с}$): 1. контроль; 2. Co^{2+} (48ч); 3. Co^{2+} (48ч) через 24 ч; 4. фотоингибирование (2ч); 5. фотоингибирование (2ч) через 24 ч

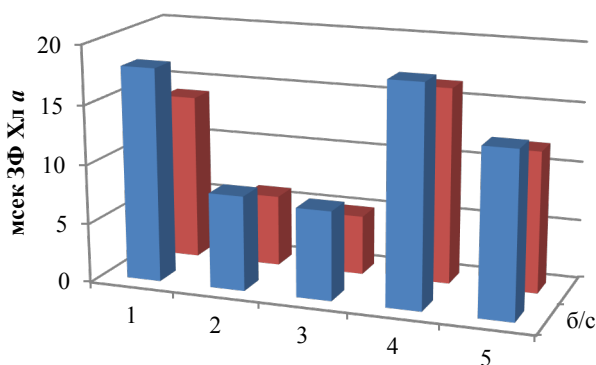


Рисунок 2. Изменение отношения быстрой и медленной флуоресценции к стационарной флуоресценции (б/с; м/с) определяющих работу донорной и акцепторной стороны ЭТЦ ФС II в условиях комплексного действия CoCl_2 +фотоингибирования и в присутствии Na-аск ($4 \cdot 10^4\text{M}$): 1. контроль; 2. Co^{2+} +фотоингибирование через 24ч; 3. Co^{2+} +фотоингибирование → Co^{2+} через 24 ч; 4. Co^{2+} +фотоингибирование → 5 ч Na-аск; 5. Co^{2+} +фотоингибирование → 24 ч Na-аск

Через 5 часов воздействия Na-аскорбата величины б/с и м/с приблизились к контрольному варианту. После 24 часового воздействия Na-аскорбата эти показатели несколько уменьшились, но были в 1,3 раза и 1,8 раза выше показателей при комплексном действии стрессоров (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вызываемый действием ТМ окислительный стресс, генерирующий РФК, приводит к образованию долгоживущих P680⁺ и TylZ радикалов, которые повреждали их белковое окружение, ослабляя этим транспорт электрона между P680 и TylZ. Кроме того, РФК, нарушая функции Q_A-Q_B акцепторов, приводит к формированию синглетного кислорода и к инактивации акцепторной стороны в цепи ФС II [19, 20]. Действие фотоингибирования приводит к инактивации донорной стороны ЭТЦ в результате образования высокоокисленной радикальной пары P680⁺ и TylZ⁺. Наблюдается инактивация и акцепторной стороны. РФК, вовлекаемые в процесс фотоингибирования приводит к деструкции белка D₁, ингибируют синтез белка D₁ *de novo* медленнее, чем инактивация ФС II. Токсическое действие Co²⁺ приводит к нарушению равновесия между фотосистемами и смещению редокс состояния Q_A повышая отток электрона на ФС I. Это приводит к возрастанию стационарной флуоресценции и падению отношения быстрой и медленной флуоресценции к стационару (рис. 1). Возможно, что падение флуоресцентных характеристик связано с нарушением функции мембран и разрушением хлорофилла в хлорофилл-белковых комплексах в ФС II [21]. Наблюдаемое наибольшее уменьшение величины м/с соответствует предположению, что сайтом токсического действия Co²⁺ определена в основном акцепторная сторона ЭТЦ ФС II. Некоторое восстановление флуоресцентных характеристик через 24 лагфазы возможно в результате активизации защитных антиоксидантных систем в растительном организме. Комплексное действие обоих стрессоров привело к незначительным изменениям флуоресцентных характеристик. Вероятно, стрессовое воздействие светом высокой интенсивности и тяжелыми металлами (ТМ) привело к повышению устойчивости растений к дополнительному стрессу или же повышению активности защитных антиоксидантных систем важных для нейтрализации радикалов. Восстановление Na-аскорбатом процессов, подавляемых одновременным действием фотоингибирования и Co²⁺, происходит в индукционный период мсек ЗФ Хл *a* и выражается, повидимому, в результате эффективной нейтрализации образующихся РФК [22-24]. Это указывает на то, что механизм приводящий к изменению характера индукционной картины мсек ЗФ Хл *a* в результате действия обоих факторов имеет единую природу. Механизмом повышения стресс- устойчивости фотосинтетического аппарата при действии защитных систем растений является увеличение активности антиоксидантных ферментов или эффективности действия низкомолекулярных антиоксидантов. В результате фотосинтетический аппарат переключается на адаптивную программу, что и обеспечивает повышение его стресс устойчивости. Являясь сильным антиоксидантом Na-аскорбат способен нейтрализовать образующиеся при стрессе свободные радикалы и поддерживать окислительно-восстановительные реакции в ЭТЦ ФС II.

Список литературы / References:

1. Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 2008, vol. 51, pp. 167-173. doi: 10.1007/BF03030694
2. Sharma A., Kumar V., Shahzad B., Ramakrishnan M., Singh Sidhu G.P., Bali A.Sh., Handa N., Kapoor Dh., Yadav P., Khanna K., Bakshi P., Rehman A., Kohli S. K., Khan E.A., Parihar R.D., Yuan H., Thukral A.K., Bhardwaj R., Zheng B. Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *J. of plant growth regulation*, 2020, vol. 39, no. 2, pp. 509-531. doi: 10.1007/s00344-019-10018-x
3. Breusegem F.V., Dat J.F. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 2006, vol. 141, no. 2, pp. 384-390. doi: 10.1104/pp.106.078295
4. Barber J. Photosystem II: the engine of life. *Quarterly Rev. Biophys.*, 2003, vol. 36, no. 1, pp. 71-89. doi: 10.1017/S0033583502003839
5. Foyer Ch.H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 2005, vol. 17, no. 7, pp. 1866-1875. doi: 10.1105/tpc.105.033589
6. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 2001, vol. 126, no. 1, pp. 445-462. doi: 10.1104/pp.126.1.445
7. Sabehat A., Weiss D., Lurie S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiol. Plant.*, 1998, vol. 103, pp. 437-441. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1030317.x
8. Anderson B., Barber J. Mechanisms of Photodamage and Protein Degradation during Photoinhibition of Photosystem II. *In book: Photosynthesis and the Environment*, 1996, pp. 101-121.
9. Biswal B. Photosynthetic response of green plants to environmental stress: Inhibition of photosynthesis and adaptational of photosynthesis and adaptational mechanisms. *In handbook of Photosynthesis (ed. Pessarackli M), CRC Press, Florida, USA, 2nd edn, 2005, pp. 739-749.*
10. Biswal B., Joshi P.N., Raval M.K., Biswal U.C. Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signaling and adaptation. *Current Science*, 2011, vol. 101, no. 1, pp. 47-56
11. Gaziyevev A., Aliyeva S., Kurbanova I., Ganiyeva R., Bayramova S., Gasanov R. Molecular operation of metals into the function and state of photosystem II. *Metallomics*, 2011, vol. 3, no. 12, pp. 1362-1367. doi: 10.1039/c1mt00100k

12. Kupper H., Setlik I., Spiller M., Kupper F.C., Prasil O. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of *in vivo* heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology*, 2002, vol. 38, pp. 429-441. doi: 10.1046/j.1529-8817.2002.01148.x
13. Tyystjarvi E. Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chem. Rev.*, 2008, vol. 252, no. 3, pp. 361-376. doi: 10.1016/j.ccr.2007.08.021
14. Vass I. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1817, no. 1, pp. 209-17. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.014
15. Chan T., Shimizu Y., Pospíšil P., Nijo N., Fujiwara A., Taninaka Y., Ishikawa T., Hori H., Nanba D., Imai A., Morita N., Yoshioka-Nishimura M., Izumi Y., Yamamoto Y., Kobayashi H., Mizusawa N., Wada H., Yamamoto Y. Quality control of photosystem II: lipid peroxidation accelerates photoinhibition under excessive illumination. *Plos one*, 2012, vol. 7, no. 12, e52100. doi: 10.1371/journal.pone.0052100
16. Джафарова Д., Байрамова С., Ганиева Р. Роль аскорбата в защите ФС2 от фотоокислительного стресса в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.). X Международной научно-методической конференции «*Интродукция нетрадиционных и редких растений*», Россия, 2012, с. 215-220. [Jafarova J., Bayramova S., Ganiyeva R. The role of ascorbate in protection of FSII from photooxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. X International scientific-methodical conference "Introduction of nontraditional and rare plants", Russia, 2012, pp. 215-220. (In Russ)]
17. Nijs D., Kelley P.M. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms *in vivo*. *FEBS Lett*, 1991, vol. 284, no. 2, pp. 147-51. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80672-p
18. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. Delayed chlorophyll fluorescence as a monitor for physiological state of photosynthetic apparatus. *Biotechnol. Biotechnol. Equip*, 2009, vol. 23, pp. 452-457. doi: 10.1080/13102818.2009.10818461
19. Gasanov R.A., Aliyeva S., Arao S., Ismailova A., Katsuta N., Kitade H., Yamada Sh., Kawamori 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. Photobiol.*, 2007, vol. 86, no. 2, pp. 160-164. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.08.008
20. Gasanov R.A., Aliyeva S.A., Mamedov F. Delayed fluorescence in a millisecond range – a probe for the donor side-induced photoinhibition of photosystem II. In: *Photosynthesis: Basics to applications*. [ed] S. Itoh, P. Mohanty, K.N. Guruprasad, New Delhi, India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2015, pp. 101-107
21. Курбанова И.М., Ганиева Р.А., Дадашова С.Б., Байрамова С.А., Гасанов Р.А. Состояние хлорофилл-белковых комплексов РЦ ФС II и ССК при воздействии на проростки пшеницы Cd^{2+} и Co^{2+} . *Актуальные проблемы биоэкологии*, 2010, Москва, с. 168-172. [Kurbanova I.M., Ganiyeva R.A., Dadashova S.B., Bayramova S.A., Gasanov R.A. The state of chlorophyll-protein complexes of RC FS II and LHC under action of Cd^{2+} and Co^{2+} on wheat seedlings, *Actual problems of bioecology*, 2010, Moscow, pp. 168-172. (In Russ)]
22. Naz H., Akram N.A., Ashraf M. Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. *Pak J Bot.*, 2016, vol. 48, no. 3, pp. 877-883.
23. Akram N.A., Shafiq F., Ashraf M. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 613. doi: 10.3389/fpls.2017.00613
24. Xiao M., Li Z., Zhu Li, Wang J., Zhang Bo, Zheng F., Zhao B., Zhang H., Wang Y., Zhang Zh. The Multiple Roles of Ascorbate in the Abiotic Stress Response of Plants: Antioxidant, Cofactor, and Regulator. *Front Plant Sci.*, 2021, vol. 12, p. 598173. doi: 10.3389/fpls.2021.598173

EFFECT OF NA-ASCORBATE IN THE PROTECTION OF PS II ACTIVITY UNDER CONDITIONS OF SIMULTANEOUS ACTION OF CO^{2+} AND PHOTOINHIBITION

Ganiyeva R.A.¹, Atakishiyeva S.A.¹, Gasanov R.A.²

¹ Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences

Baku, Azerbaijan; e-mail: SevincAtakishiyeva@gmail.com

² Baku State University

Baku, Azerbaijan; e-mail: ra38hasan@gmail.com

Abstract. The functional state of PS II in the leaves of wheat seedlings subjected to the complex action of Co^{2+} and photoinhibition was determined on the basis of various characteristics of the delayed fluorescence of chlorophyll a (msec DF Chl a). The effect of Co^{2+} was expressed in a sharp decrease in the characteristic value of msec DF Chl a of the PS II reaction center and in a weaker blocking of the donor side characterizing the state of the Mn_4O_5Ca cluster and Y_{D} . Reactive oxygen species (ROS) generated during photoinhibition also blocked to a greater extent the acceptor side of the PS II ETC. An increase in the adaptation time was observed a significant drop in activity on the donor side of the ETC PS II. The combined effect of both factors had little effect on the change in fluorescence characteristics, which remained almost at the level of the effect of Co^{2+} . It has been shown that the adaptive capabilities of photochemical reactions occurring in the ETC of PS II under complex stress are stimulated by the low molecular weight antioxidant Na-ascorbate. It is assumed that Na-asc plays a decisive role in protecting chloroplasts from oxidative stress by quenching O_2^- and $*OH^{\cdot}$.

Key words: PS II, ETC, Co^{2+} , photoinhibition, ROS, Na-ascorbate.