

## Изменения оптических свойств листьев бобов при формировании их фотосинтетического аппарата

© О.А. Калмацкая, А.В. Михалькова, И.С. Сусличенко, В.А. Караваев, А.Н. Тихонов

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

e-mail: kalmackaya@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 28.11.2024 г.

В окончательной редакции 10.01.2025 г.

Принята к публикации 07.04.2025 г.

В настоящей работе изучены оптические характеристики листьев бобов (*Vicia faba* L., сорт „Русские черные“), отражающие функциональные свойства фотосинтетического аппарата (ФСА) хлоропластов. О функционировании ФСА судили по кинетике возбуждения флуоресценции хлорофилла *a* и по светоиндуцированным изменениям поглощения света, отражающим редокс-превращения фотореакционных центров фотосистемы 1 ( $P_{700}$ ). Проведено сравнение оптических свойств листьев контрольных образцов (растения, выращенные при умеренной интенсивности света (2000–3000 lx) и этиолированных листьев растений, культивированных при низкой освещенности (5–10 lx). По флуоресценции хлорофилла *a* и изменениям состояния  $P_{700}$  мы следили за формированием фотосинтетического аппарата хлоропластов в ходе освещения этиолированных листьев. Показано, что формирование активных хлоропластов в листьях этиолированных растений происходит через 2–3 суток после их освещения интенсивным светом. Важной особенностью использованных нами методов диагностики ФСА является то, что эти методы являются неинвазивными и не требуют выделения хлоропластов (или их компонентов). Таким образом, инструментальными средствами по оптическим свойствам листьев можно осуществлять неинвазивный мониторинг ФСА растений *in situ* на различных стадиях культивирования растений.

**Ключевые слова:** фотосинтетический аппарат растений, флуоресценция хлорофилла, электронный транспорт.

DOI: 10.61011/OS.2025.05.60789.26-25

### Введение

Дезиоляция листьев растений (или переход от роста в темноте к фотоморфогенезу) — один из самых сложных этапов онтогенеза растений. Существенную роль в этом процессе играют фитогормоны и свет [1,2]. В ходе дезиоляции синтезируется хлорофилл — важнейший пигмент фотосинтеза и формируется фотосинтетический аппарат [3,4]. Наряду с увеличением содержания хлорофилла возрастает фотосинтетическая активность растений [5,6]. В этот период онтогенеза формируются регуляторные механизмы, обеспечивающие оптимальную работу двух фотосистем растений и в конечном итоге всего фотосинтетического аппарата [7,8]. Изучение этих регуляторных механизмов — важная и актуальная задача физиологии растений и биофизики фотосинтеза. В настоящей работе проростки бобов *Vicia faba* L. выращивали в условиях затенения, а затем переносили в условия интенсивного естественного освещения. В течение одной недели после такого переноса регистрировали содержание хлорофилла, флуоресцентные характеристики зеленеющих листьев, а также кинетические кривые фотоиндуцированных редокс-превращений реакционных центров фотосистемы 1.

Флуоресцентные показатели фотосинтезирующих объектов зависят от широкого круга биотических и абиотических факторов, они позволяют следить за изменени-

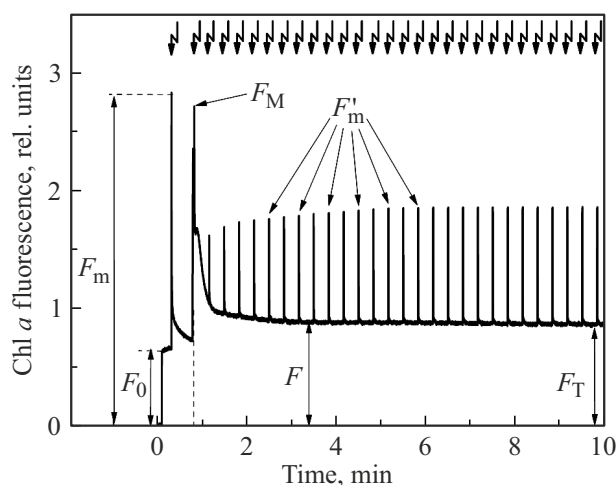
ями структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата (ФСА) растений [9–12]. Особый интерес представляют индуцированные изменения параметров флуоресценции, регистрируемые с использованием широко распространенных в настоящее время импульсных флуорометров, позволяющих определять ряд важных, с точки зрения функционирования ФСА, показателей [13,14]. Регистрация кинетики изменений состояния  $P_{700}$  при действии света различного спектрального состава позволяет изучать особенности совместного функционирования фотосистем 1 и 2 [15,16]. Предполагалось, что использование отмеченных спектроскопических методов исследования позволит получить дополнительную информацию об особенностях формирования фотосинтетического аппарата растений в процессе дезиоляции.

### 1. Объекты и методы

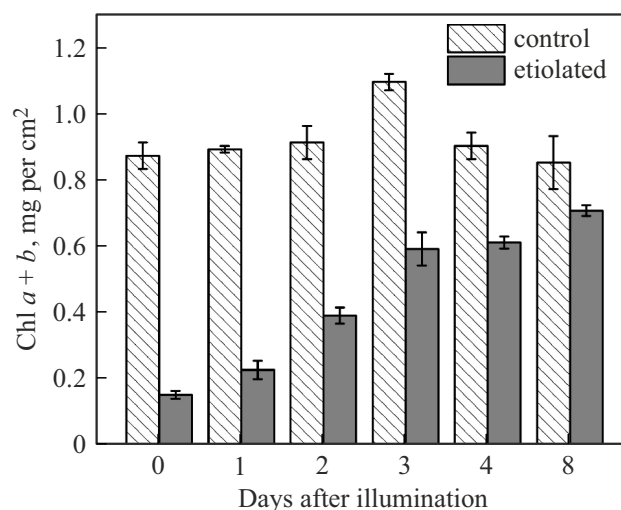
Объектами исследований служили проростки бобов *Vicia faba* L. сорта „Русские черные“. Растения выращивали в пакетах с землей объемом 0.5 L при температуре 25°C в лабораторных условиях при разной освещенности: один вариант — в условиях затенения при освещенности 5–10 lx (опытные растения), а другой — при освещенности 2000–3000 lx (контрольные растения).

Длительность освещения растений естественным светом составляла 15 h в сутки. Освещенность измеряли в дневное время суток при помощи портативного цифрового люксметра Mastech MS6610. После трех недель выращивания опытные растения переносили в условия повышенной освещенности. Непосредственно перед переносом, а также ежедневно в течение последующей недели измеряли содержание хлорофилла, флуоресцентные показатели листьев контрольных и опытных растений, а также кинетику светоиндуцированного окисления реакционных центров  $P_{700}$ .

Кинетику изменений выхода флуоресценции хлорофилла *a* в листьях бобов измеряли с помощью импульсного флуорометра РАМ-2500 (фирма Вальц, Германия). Лист, не отрывая от стебля, помещали в прибор и выдерживали в темноте в течение 5 min перед началом измерений. Протокол измерений интенсивности флуоресценции показан на рис. 1. Флуоресценцию возбуждали импульсным измерительным светом ( $\lambda = 630$  nm,  $\Delta\lambda = 5$  nm,  $I = 10 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ); сразу после включения „измерительного“ света определяли исходный уровень флуоресценции  $F_0$ . Измерительный свет представляет собой миллисекундные (5 ms) вспышки низкой интенсивности ( $I = 10 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ), подаваемой в периодических паузах, когда выключался более сильный свет „действующий“ свет (actinic light), интенсивность которого заметно превышала интенсивность измерительного света. ( $I = 500 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ). Суть такого стандартного протокола освещения образцов заключается в том, что „действующий“ свет используется для светоиндуцированного изменения состояния фотосинтетического аппарата растений, а во время кратковременных темновых пауз, когда не действовал „актиничный“ свет, проводили измерения флуоресценции в ответ на вспышки „измерительного“ света. Низкая интенсивность измерительного света практически не вносит изменения в состояние фотосинтетического аппарата.



**Рис. 1.** Протокол измерений флуоресценции с помощью РАМ-флуорометра. Зигзагообразными стрелками указаны моменты включения насыщающих вспышек света.



**Рис. 2.** Зависимость содержания хлорофилла (mg на  $1 \text{ cm}^2$  листовой пластинки) от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль — растения, выращенные в условиях естественного освещения).

Основным источником флуоресценции хлорофилла *a* в листьях растений (80% и выше) являются светособирающие комплексы фотосистемы 2 (ФС2) [11,17]. Максимальный уровень флуоресценции  $F_m$  определяли при освещении листа насыщающей вспышкой света ( $\lambda = 630$  nm,  $\tau = 0.5$  ms,  $I = 3400 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ). Индуцированные изменения флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали после включения непрерывного действующего света ( $\lambda = 455$  nm,  $I = 500 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ). Насыщающие вспышки света, подаваемые на фоне непрерывного света, следовали с интервалом в 20 s. В качестве параметров флуоресценции определяли отношения  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  фотохимических превращений в ФС2) и  $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$  (характеризует эффективный квантовый выход фотохимических превращений в ФС2 в момент подачи насыщающей вспышки света). Параметр  $NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$  характеризует коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции.

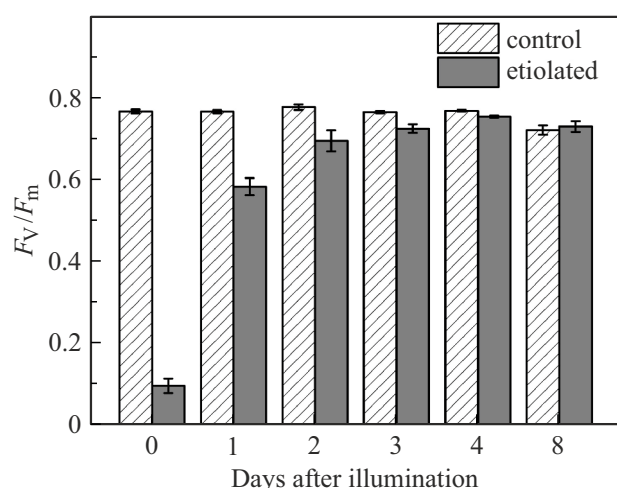
Приведены значения флуоресцентных показателей и содержания хлорофилла, усредненные для серии из четырех образцов. Также для каждого использованного показателя вычисляли выборочное стандартное отклонение среднего арифметического.

О светоиндуцированном окислении центров  $P_{700}$  в листьях судили по разности поглощения света на длинах волн 870 и 830 nm (оптический сигнал  $\Delta A_{870-830}$ ) согласно методике, описанной ранее [15].

Содержание хлорофилла в листьях растений определяли, используя ацетоновые вытяжки, по методике, описанной в [18].

## 2. Результаты и обсуждение

Этиолированные проростки бобов, выращенные в условиях затенения, существенно отличались по внеш-



**Рис. 3.** Зависимость показателя  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль — растения, выращенные в условиях естественного освещения).

нему виду от проростков, выращенных на свету. Они имели удлинённые стебли и тонкие вытянутые листья с бледно-зеленой окраской и низким содержанием хлорофилла. После перемещения этих проростков в условия повышенной освещённости содержание хлорофилла постепенно увеличивалось, причем как в расчете на биомассу растений, так и на площадь листовой пластинки (рис. 2). Наряду с увеличением содержания хлорофилла наблюдалось постепенное увеличение показателя  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  — отношения переменной флуоресценции  $F_m - F_0$  к максимальной  $F_m$  (рис. 3). Этот показатель характеризует эффективность использования света в ФС2 [17,19] или, по-другому, максимальный квантовый выход фотохимических превращений в ФС2 [10]. Действительно, выход флуоресценции хлорофилла во время действия всплеск кратковременного измерительного света зависит от состояния ФСА: он минимален, когда реакционные центры (РЦ) активны („открыты“) и могут захватить энергию возбуждения из пигментной матрицы, и максимален, когда РЦ неактивны („закрыты“). Таким образом, увеличение выхода флуоресценции при „закрывании“ РЦ характеризует ту часть световой энергии, которая использовалась в первичных реакциях фотосинтеза при „открытых“ РЦ [20]. Постепенный рост показателя  $F_v/F_m$  в первую неделю после начала освещения этиолированных проростков отражает увеличение активности ФС2, которая, как известно, формируется позже ФС1 [5].

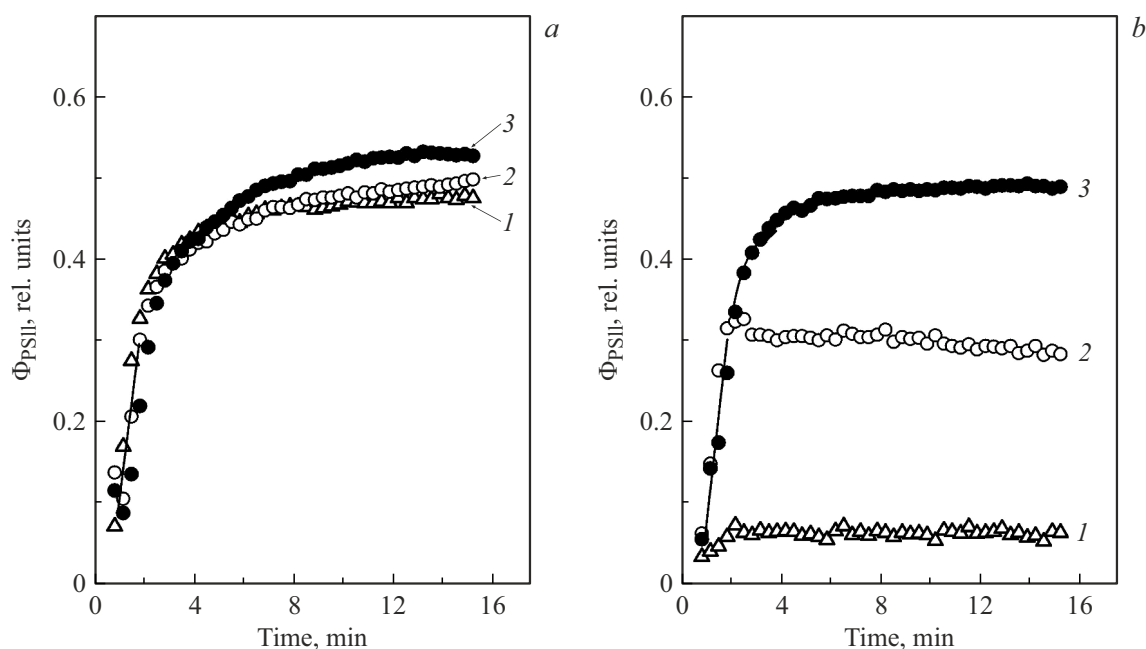
О возрастании активности ФС2 в процессе дезиоляции листьев свидетельствуют кинетические кривые показателя  $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$ , характеризующего изменения квантового выхода фотохимических превращений ФС2 после включения действующего света (рис. 4). Действующий (актиничный) свет имеет достаточно высокую интенсивность, что влияет на процессы фотосинтеза и изменять состояние фотосинтетического аппарата.

У контрольных растений стационарные значения  $\Phi_{PSII}$  в течение всего периода измерений практически не изменялись, а у опытных монотонно возрастали аналогично росту содержания хлорофилла и показателю  $F_v/F_m$  (рис. 5). Можно считать, что увеличение значений  $\Phi_{PSII}$  свидетельствует о повышении фотосинтетической активности в целом. Это согласуется с данными работы [21], в которой предполагается пропорциональная зависимость между квантовым выходом фиксации  $CO_2$  и стационарными значениями  $\Phi_{PSII}$ , наблюдавшаяся на ряде объектов в определенных экспериментальных условиях.

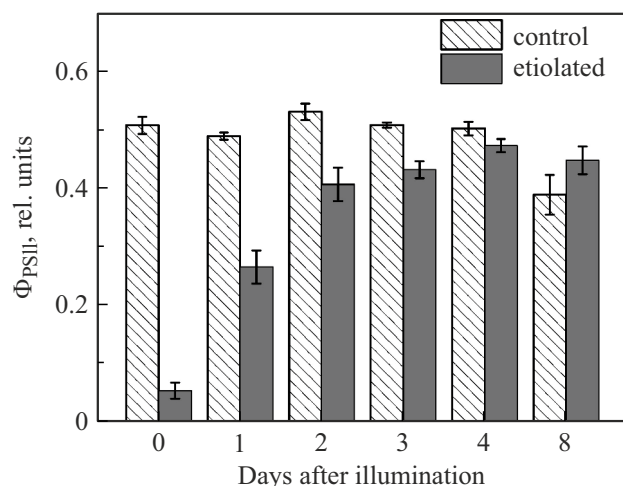
Тушение флуоресценции хлорофилла *a* по мере освещения непрерывно действующим светом (рис. 1) обычно подразделяют на фото- и нефотохимическое тушение [9,10,22]. Фотохимическое тушение флуоресценции связано с изменением окислительно-восстановительного состояния акцепторов электронов ФС2 [23]. Нефототоксическое тушение хлорофилла *a*, входящего в состав ФС2, связано, во-первых, с образованием трансмембранной разности концентрации протонов ( $\Delta pH$ ) на мембране (так называемое энергетическое тушение) и, во-вторых, с перераспределением энергии поглощаемого света в пользу ФС1 (переходы „состояние 1“ — „состояние 2“) [9,10,24–26]. Считается, что такие переходы связаны с обратимым фосфорилированием мобильного светособирающего пигмент-белкового комплекса (ССК2) и его перемещением между участками мембраны с разным содержанием комплексов ФС1 и ФС2 [21,27,28]. Возрастание флуоресценции, измеряемой в момент подачи всплеск измерительного света насыщающей всплески, а также пониженные значения уровня флуоресценции ( $F'_m$ ), показанное на рис. 1, отражение таких явлений, как фотохимическое и нефототоксическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (см. подробнее [15]).

До 4-го дня дезиоляции кинетические кривые для NPQ (коэффициент нефототоксического тушения флуоресценции) имели ярко выраженный аномальный характер, свидетельствующий о недостаточно развитом фотосинтетическом аппарате: пониженные значения NPQ и замедленное (более 15 min) достижение стационарного уровня (рис. 6). Немонотонный характер кинетических кривых, как предполагается, связан с формированием  $\Delta pH$  на мембране тилакоидов в начале освещения и последующим уменьшением  $\Delta pH$  за счет прогрессирующего синтеза АТФ [29–31]. Стационарные значения параметров NPQ и  $\Phi_{PSII}$  постепенно возрастают по мере дезиолирования листьев, что отражает увеличение фотосинтетической активности проростков и формирование регуляторных механизмов, обеспечивающих оптимизацию фотосинтетических процессов.

В дополнение к флуоресцентным методам неинвазивной диагностики формирования ФСА могут служить оптические методы, основанные на измерениях поглощения света светособирающими пигментами, входящими в состав ФСА. В качестве примера рассмотрим данные опытов по измерениям кинетики светоиндуцированного



**Рис. 4.** Характерные кривые изменения показателя  $\Phi_{PSII}$  листьев бобов, выращенных при естественной освещенности (a) и в затенении (b). Кривые зарегистрированы: сразу после перемещения этиолированных образцов в условия естественного освещения (1), 1 сутки спустя (2), 4 суток спустя (3).

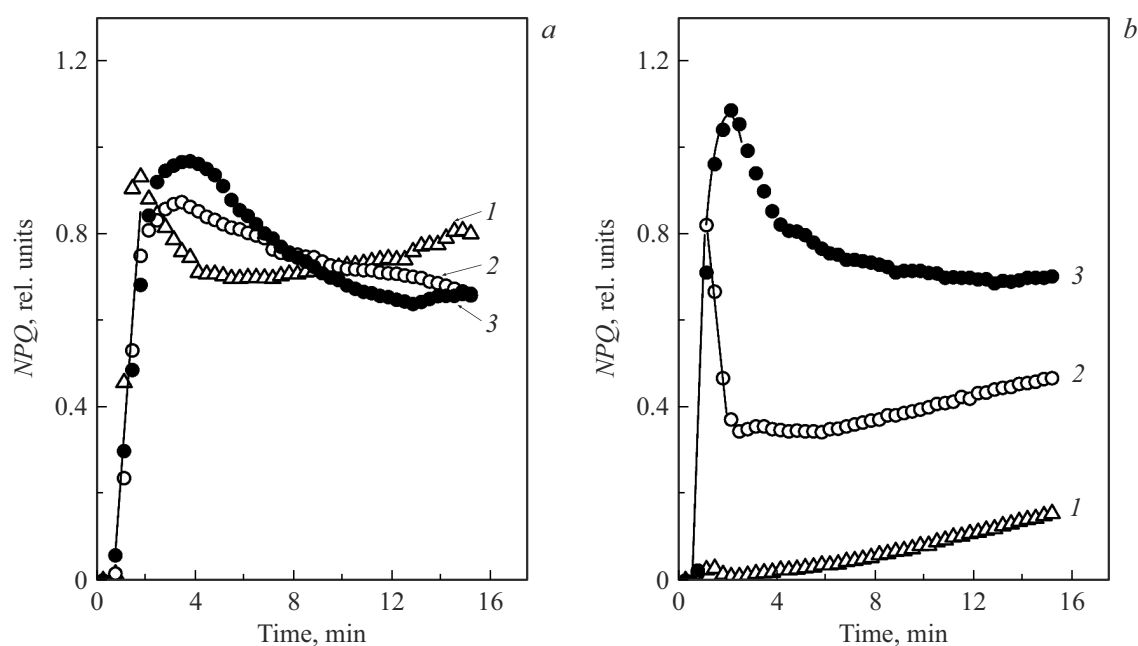


**Рис. 5.** Зависимость показателя  $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$  от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль — растения, выращенные в условиях естественного освещения).

окисления реакционных центров  $P_{700}$ . Об окислении  $P_{700}$  судили по измерениям разностного сигнала  $\Delta A_{870-830}$ , представляющего собой разность поглощения света, измеренного при длинах волн 870 и 830 нм (см. подробнее [15]). Амплитуда сигнала  $\Delta A_{870-830}$  пропорционально количеству окисленных центров  $P_{700+}$ . На рис. 7, a показана типичная кривая светоиндуцированных изменений величины разностного сигнала  $\Delta A_{870-830}$  в контрольном образце после включения непрерывного

красного света ( $\lambda_{\text{макс}} = 635$  nm, свет  $\lambda_{635}$ ), эффективно возбуждающего обе фотосистемы, и дальнего красного света ( $\lambda_{\text{макс}} = 720$  nm, свет  $\lambda_{720}$ ), возбуждающего преимущественно ФС1. В листьях, адаптированных к темноте в течение 5 min, в ответ на включение красного света наблюдается рост сигнала  $\Delta A_{870-830}$  к стационарному уровню, обусловленный фотоокислением центров  $P_{700}$ . Рост сигнала происходит после некоторой задержки, которая объясняется тем, что после адаптации листа к темноте цикл Кальвина–Бенсона (ЦКБ) неактивен. В этом случае отток электронов от ФС1 ограничен из-за низкого потребления NADPH — восстановленного конечного акцептора электронов в ФС1 [32]. По мере освещения хлоропластов красным светом ( $\lambda_{635}$ ) происходит активации ферментов ЦКБ, скорость оттока электронов от ФС1 возрастает, в результате наблюдается заметное окисление  $P_{700}$ . После выключения света наблюдается сравнительно быстрое восстановление  $P_{700+}$  (время полуспада сигнала от  $P_{700+}$  составляет  $t_{1/2} \sim 20-30$  ms). Это происходит за счет восстановленных молекул пластохинола ( $PQH_2$ ), образовавшихся во время действия света  $\lambda_{635}$ , возбуждающего ФС2. Следующее за этим включение дальнего красного света (ДКС,  $\lambda_{720}$ ), возбуждающего преимущественно ФС1, приводит к сравнительно быстрому росту сигнала от  $P_{700+}$ . При этом спад сигнала  $\Delta A_{870-830}$  в темноте замедляется ( $t_{1/2} \sim 1-3$  s), поскольку при действии ДКС ФС2 практически не возбуждается, и не восстанавливаются молекулы пластохинонового пула.

В случае этиолированных листьев наблюдается иная картина (рис. 7, b). Индуцированный красным светом сигнал  $\Delta A_{870-830}$ , который можно приписать окислен-

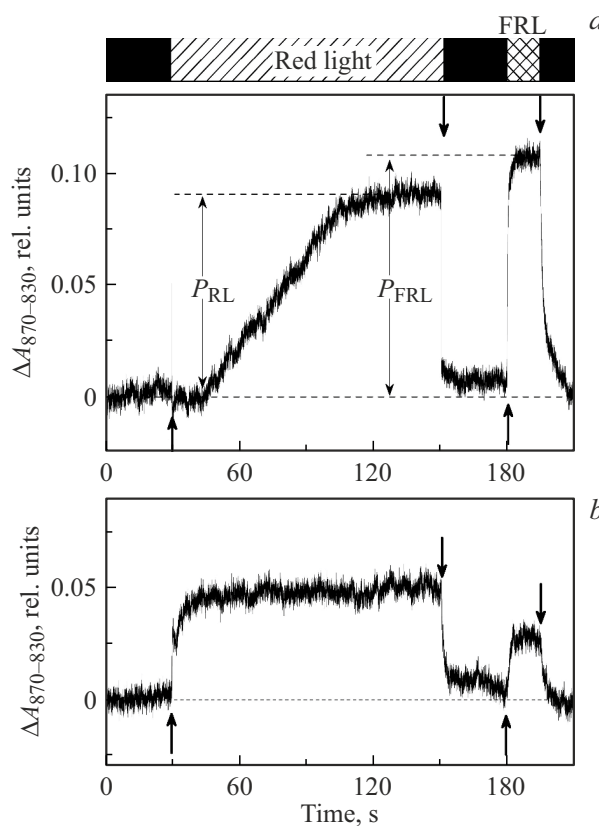


**Рис. 6.** Характерные кривые изменения показателя  $NPQ$  листьев бобов, выращенных при естественной освещенности (а) и в затенении (b). Кривые зарегистрированы: сразу после перемещения этиолированных образцов в условия естественного освещения (1), 1 сутки спустя (2), 4 суток спустя (3).

ным центрам  $P_{700+}$ , заметно ниже, чем в контрольных образцах (рис. 7, а). В ответ на включение дальнего красного света, возбуждающего преимущественно ФС2, величина сигнала заметно ниже, чем в листьях контрольных растений. Эти различия объясняются тем, что в этиолированных листьях еще не сформировались реакционные центры ФС1. И только после достаточно длительной экспозиции растений к световым условиям (несколько суток) появляется сигнал, свидетельствующий о формировании ФС1.

## Заключение

В настоящей работе на примере листьев бобов (*Vicia faba* L., сорт „Русские черные“), показано, как по оптическим показателям листьев растений, измеряемым по кинетике выхода флуоресценции хлорофилла  $a$  и по поглощению света фотореакционными центрами  $P_{700}$ , можно диагностировать состояние ФСА и следить за формированием активных хлоропластов *in situ* в ходе дэтиолирования листьев. Важной особенностью этих методов диагностики является то, что они являются неинвазивными: для оценки функционального состояния ФСА не требуется выделять из листьев хлоропласты (или их компоненты). Таким образом, инструментальными средствами, по оптическим свойствам листьев, можно осуществлять долгосрочный мониторинг функционирования ФСА растений *in situ* на различных стадиях их культивирования.



**Рис. 7.** Типичные кривые светоиндуцированных изменений величины разностного сигнала поглощения света, измеряемого при 870 и 830 нм (сигнал  $\Delta A_{870-830}$ ) в контрольном образце (а) и этиолированном листе (b).

## Финансирование работы

Работа проводилась в рамках темы научно-исследовательских работ физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова „Физические основы строения, функционирования и регуляции биологических систем“ (Госрегистрация № 012004 085 35) и при частичной финансовой поддержке фонда „Вольное дело“.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] В.В. Кузнецов, Н.В. Кудрякова, М.Н. Данилова. Физиология растений, **67** (6), 563 (2020). DOI: 10.31857/S001533032006010X
- [2] Д. Эдвардс, Д. Уокер. *Фотосинтез C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-растений: механизмы и регуляция* (Мир, М., 1986) [G.E. Edwards, D.A. Walker. *C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis* (Blackwell Scientific Publications, 1983)].
- [3] С.В. Конев, И.Д. Волоотовский. *Фотобиология*, изд. 2-е (БГУ, Минск, 1979).
- [4] В.В. Buckanan. Ann. Rev. Plant Physiol., **31**, 341 (1980). DOI: 10.1146/annurev.pp.31.060180.002013
- [5] В.Ф. Гавриленко, М.В. Гусев, К.А. Никитина, П. Хоффманн. *Избранные главы физиологии растений* (МГУ, М., 1986).
- [6] R.E. Blankenship. *Molecular mechanisms of photosynthesis* (Blackwell Science Inc., Malden, MA, 2002).
- [7] S. Matsubara, B. Förster, M. Waterman, S.A. Robinson, B.J. Pogson, B. Gunning, B. Osmond. Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sciences, **367** (1608), 3503 (2012). DOI: 10.1098/rstb.2012.0072
- [8] Z. Li, S. Wakao, B.B. Fischer, K.K. Niyogi. Ann. Rev. Plant Biol., **60** (1), 239 (2009). DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844
- [9] G.H. Krause, E. Weis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol., **42**, 313 (1991). DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- [10] D. Lazar. Biochim. Biophys. Acta, **1412** (1), 1 (1999). DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00047-X
- [11] *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*, ed. by G.C. Papageorgiou (Springer, Dordrecht, 2004). DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9
- [12] N.R. Baker. Annu. Rev. Plant Biol., **59**, 89 (2008). DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
- [13] K. Maxwell, G.N. Johnson. Exp. Botany, **51** (345), 659 (2000). DOI: 10.1093/jexbot/51.345.659
- [14] B. Demmig-Adams, C.M. Cohu, O. Muller, W.W. Adams. Photosynth. Res., **113** (1–3), 75 (2012). DOI: 10.1007/s11120-012-9761-6
- [15] I.S. Suslichenko, B.V. Trubitsin, A.V. Vershubskii, A.N. Tikhonov. Plant Physiol. Biochem., **185**, 233 (2022). DOI: 10.1016/j.plaphy.2022.06.002
- [16] М.А. Беньков, И.С. Сусличенко, Б.В. Трубицин, А.Н. Тихонов. Биол. мембраны, **40** (3), 172 (2023). DOI: 10.31857/S0233475523030039
- [17] H.M. Kalaji, G. Schansker, M. Bresic et al. Photosynth. Res., **132**, 13 (2017). DOI: 10.1007/s11120-016-0318-y
- [18] *Малый практикум по физиологии растений*, под ред. М.В. Гусева (МГУ, М., 1982).
- [19] П.С. Венедиктов, С.Л. Волгин, Ю.В. Казимирко и др. Биофизика, **44**, 1037 (1999).
- [20] B. Genty, J.-M. Briantais, N.R. Baker. Biochim. Biophys. Acta, **990**, 87 (1989). DOI: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- [21] J.F. Allen. Biochim. Biophys. Acta, **1098**, 275 (1992). DOI: 10.1016/S0005-2728(09)91014-3
- [22] A.N. Tikhonov. Photosynth. Res., **116**, 511 (2013). DOI: 10.1007/s11120-013-9845-y
- [23] G. Schansker, S. Tóth, A.R. Holzwardt, G. Garab. Photosynth. Res., **128**, 43 (2014). DOI: 10.1007/s11120-013-9806-5
- [24] E.H. Murchie, A.V. Ruban. The Plant J., **101**, 885 (2020). DOI: 10.1111/tpj.14601
- [25] J. Zaks, K. Amarnath, E.J. Sylak-Glassman, G.R. Fleming. Photosynth. Res., **116**, 389 (2013). DOI: 10.1007/s11120-013-9857-7
- [26] X.-P. Li, A.M. Gilmore, S. Caffarri, R. Bassi, T. Golan, D. Kramer, K.K. Niyogi. J. Biol. Chem., **279** (22), 22866 (2004). DOI: 10.1074/jbc.M402461200
- [27] J. Minagawa. Biochim. Biophys. Acta, **1807**, 897 (2011). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.11.005
- [28] M. Tikkanen, E.-M. Aro. Biochim. Biophys. Acta, **1817**, 232 (2012). DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.05.005
- [29] L.A. Malone, M.S. Proctor, A. Hitchcock, C.N. Hunter, M.P. Johnson. Biochim. Biophys. Acta., **1862** (5), 148380 (2021). DOI: 10.1016/j.bbabi.2021.148380
- [30] А.Н. Тихонов. Биохимия, **88** (10), **1742** (2023). DOI: 10.31857/S0320972523100032
- [31] A.N. Tikhonov. Photosynth. Res., **159**, 203 (2024). DOI: 10.1007/s11120-023-01034-w
- [32] M. Kono, I. Terashima. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, **137**, 89 (2014). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.02.016