20

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 *а* и по светоиндуцированным изменениям поглощения света, отражающим редокс-превращения фотореакционных центров фотосистемы 1 (P₇₀₀). Проведено сравнение оптических свойств листьев контрольных образцов (растения, выращенные при умеренной интенсивности света (2000–3000 lx) и этиолированных листьев растений, культивированых при низкой освещенности (5–10 lx). По флуоресценции хлорофилла *а* и изменениям состояния P₇₀₀ 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

Деэтиоляция 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 деэтиоляции 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 Р₇₀₀ 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 деэтиоляции.

1. Объекты и методы

Объектами исследований служили проростки бобов *Vicia faba* L. сорта "Русские черные". Растения выращивали в пакетах с землей объемом $0.5\,\mathrm{L}$ при температуре $25^{\circ}\mathrm{C}$ в лабораторных условиях при разной освещенности: один вариант — в условиях затенения при освещенности $5{-}10\,\mathrm{lx}$ (опытные растения), а другой — при освещенности $2000{-}3000\,\mathrm{lx}$ (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 а 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 ($\lambda = 630 \, \text{nm}$, $\Delta \lambda = 5 \,\mathrm{nm}, I = 10 \,\mu\mathrm{E/(m^2s)};$ сразу после включения "измерительного" света определяли исходный уровень флуоресценции F_0 . Измерительный свет представляет собой милисекундные (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.

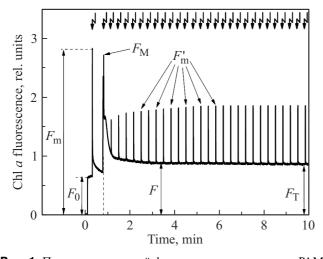


Рис. 1. Протокол измерений флуоресценции с помощью РАМфлуорометра. Зигзагообразными стрелками указаны моменты включения насыщающих вспышек света.

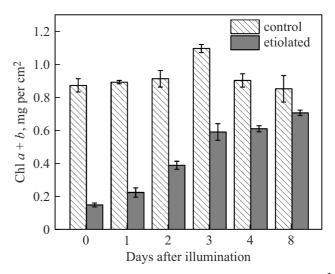


Рис. 2. Зависимость содержания хлорофилла (mg на 1 cm² листовой пластинки) от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль — растения, выращенные в условиях естественного освещения).

Основным источником флуоресценции хлорофилла а в листьях растений (80% и выше) являются светособирающие комплексы фотосистемы 2 (ФС2) [11,17] Максимальный уровень флуоресценции $F_{\rm m}$ определяли при освещении листа насыщающей вспышкой света $(\lambda = 630 \,\mathrm{nm}, \ \tau = 0.5 \,\mathrm{ms}, \ I = 3400 \,\mu\mathrm{E/(m^2s)})$. Индуцированные изменения флуоресценции хлорофилла а регистрировали после включения непрерывного действующего света ($\lambda = 455 \,\mathrm{nm}, I = 500 \,\mu\mathrm{E/(m^2s)}$). Насыщающие вспышки света, подаваемые на фоне непрерывного света, следовали с интервалом в 20 s. В качестве параметров флуоресценции определяли отношения $F_{
m V}/F_{
m m} = (F_{
m m} - F_{
m 0})/F_{
m m}$ фотохимических превращений в ΦC2 и $\Phi_{\text{PSII}} = (F_{\text{m}}' - F)/F_{\text{m}}'$ (характеризует эффективный квантовый выход фотохимических превращений в ФС2 в момент подачи насыщающей вспышки света). Параметр $NPQ = (F_{\rm m} - F_{\rm m}')/F_{\rm m}'$ 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-

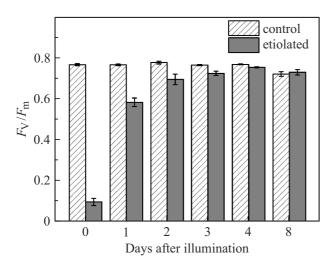


Рис. 3. Зависимость показателя $F_{\rm V}/F_{\rm m}=(F_{\rm m}-F_{\rm 0})/F_{\rm m}$ от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль — растения, выращенные в условиях естественного освещения).

нему виду от проростков, выращенных на свету. Они имели удлиненные стебли и тонкие вытянутые листья с бледно-зеленой окраской и низким содержанием хлорофилла. После перемещения этих проростков в условия повышенной освещенности 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 $F_{\rm V}/F_{\rm m} = (F_{\rm m} - F_{\rm 0})/F_{\rm m}$ — отношения переменной флуоресценции $F_{\rm m} - F_{\rm 0}$ к максимальной $F_{\rm m}$ (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 вспышек 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 $F_{\rm V}/F_{\rm m}$ в первую неделю после начала освещения этиолированных проростков отражает увеличение активности ФС2, которая, как известно, формируется позже ФС1 [5].

О возрастании активности Φ C2 в процессе деэтиоляции листьев свидетельствуют кинетические кривые по-казателя $\Phi_{PSII} = (F_{\rm m}' - F)/F_{\rm m}'$, характеризующего изменения квантового выхода фотохимических превращений Φ C2 после включения действующего света (рис. 4). Действующий (актиничный) свет имеет достаточно высокую интенсивность, что влияет на процессы фотосинтеза и изменяет состояние фотосинтетического аппарата.

У контрольных растений стационарные значения Φ_{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 Φ_{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 Φ_{PSII} , наблюдавшаяся на ряде объектов в определенных экспериментальных условиях.

Тушение флуоресценции хлорофилла а 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]. Нефотохимическое тушение хлорофилла а, входящего в состав ФС2, связано, во-первых, с образованием трансмембранной разности концентрации протонов (ΔpH) 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 вспышек измерительного света насыщающей вспышки, а также пониженные значения уровня флуоресценции $(F'_{\rm m})$, показанные на рис. 1, отражают такие явлений, как фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла a (см. подробнее [15]).

До 4-го дня деэтиоляции кинетические кривые для NPQ (коэффициент нефотохимического 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 ΔрН на мембране тилакоидов в начале освещения и последующим уменьшением ДрН за счет прогрессирующего синтеза АТФ [29-31]. Стационарные значения параметров NPQ и ФРSII постепенно возрастают по мере деэтиолирования 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

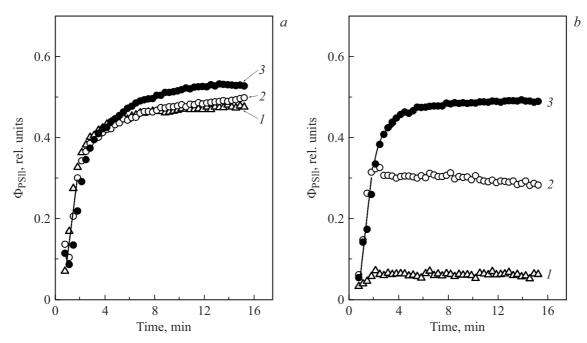


Рис. 4. Характерные кривые изменения показателя Φ_{PSII} листьев бобов, выращенных при естественной освещенности (*a*) и в затенении (*b*). Кривые зарегистрированы: сразу после перемещения этиолированных образцов в условия естественного освещения (*1*), 1 сутки спустя (*2*), 4 суток спустя (*3*).

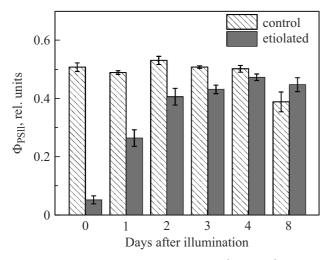


Рис. 5. Зависимость показателя $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$ от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль — растения, выращенные в условиях естественного освещения).

окисления реакционных центров P_{700} . Об окислении P_{700} судили по измерениям разностного сигнала $\Delta A_{870-830}$, предствляющего собой разность поглощения света, измеренного при длинах волн 870 и 830 nm (см. подробнее [15]). Амплитуда сигнала $\Delta A_{870-830}$ пропорциональна 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 ($\lambda_{\text{макс}} = 635 \, \text{nm}$, свет λ_{635}), эффективно возбуждающего обе фотосистемы, и дальнего красного света $(\lambda_{\text{макс}} = 720 \,\text{nm}, \,\,\text{свет} \,\,\,\lambda_{720}), \,\,$ 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 Р₇₀₀. 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 изза низкого потребления NADPH — восстановленного конечного акцептора электронов в ФС1 [32]. По мере освещения хлоропластов красным светом (λ_{635}) происходит активация ферментов ЦКБ, скорость оттока электронов от ФС1 возрастает, в результате наблюдается заметное окисление Р₇₀₀. После выключения света наблюдается сравнительно быстрое восстановление P_{700^+} (время полуспада сигнала от P_{700^+} составляет $t_{1/2} \sim 20-30\,{\rm ms}$). Это происходит за счет восстановленных молекул пластохинола (РQН2), образовавшихся во время действия света λ_{635} , возбуждающего Φ C2. Следующее за этим включение дальнего красного света (ДКС, λ_{720}), возбуждающего преимущественно Φ С1, приводит к сравнительно быстрому росту сигнала от P_{700^+} . При этом спад сигнала $\Delta A_{870-830}$ в темноте замедляется $(t_{1/2} \sim 1-3 \,\mathrm{s})$, 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-

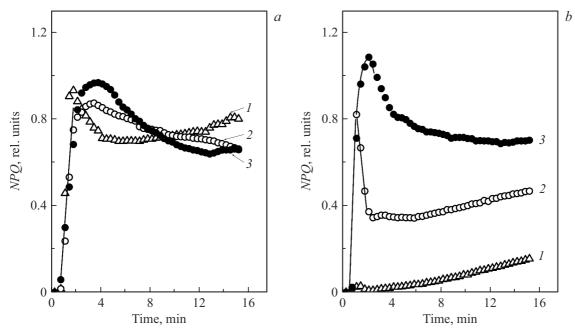


Рис. 6. Характерные кривые изменения показателя NPQ листьев бобов, выращенных при естественной освещенности (a) и в затенении (b). Кривые зарегистрированы: сразу после перемещения этиолированных образцов в условия естественного освещения (1), 1 сутки спустя (2), 4 суток спустя (3).

ным центрам P_{700^+} , заметно ниже, чем в контрольных образцах (рис. 7, a). В ответ на включение дальнего красного света, возбуждающего преимущественно Φ C2, величина сигнала заметно ниже, чем в листьях контрольных растений. Эти различия объясняются тем, что в этиолированных листьях еще не сформировались реакционные центры Φ C1. И только после достаточно длительной экспозиции растений к световым условиям (несколько суток) появляется сигнал, свидетельствующий о формировании Φ C1.

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 а и по поглощению света фотореакционными центрами Р₇₀₀, можно диагностировать состояние ФСА и следить за формированием активных хлоропластов in situ в ходе деэтиолирования 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.

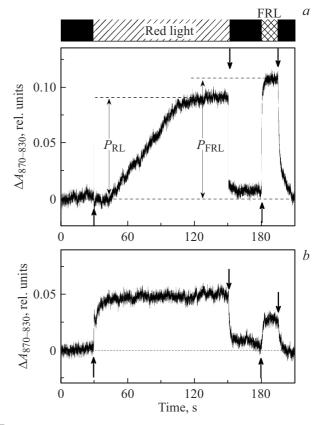


Рис. 7. Типичные кривые светоиндуцированных изменений величины разностного сигнала поглощения света, измеряемого при 870 и 830 nm (сигнал $\Delta A_{870-830}$) в контрольном образце (a) и этиолированном листе (b).

Финансирование работы

Работа проводилась в рамках темы научноисследовательских 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

- 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 C₃- и C₄-растений: механизмы и регуляция (Мир, М., 1986). [G.E. Edwards, D.A. Walker. C₃, C₄, mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis (Blackwell Scientific Publications, 1983)].
- [3] С.В. Конев, И.Д. Волотовский. Фотобиология, изд. 2-е (БГУ, Минск, 1979).
- [4] B.B. 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
- 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. Holzwart, 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. Minagava. Biochim. Biophys. Acta, 1807, 897 (2011). DOI: 10.1016/j.bbabio.2010.11.005
- [28] M. Tikkanen, E.-M. Aro. Biochim. Biophys. Acta, 1817, 232 (2012). DOI: 10.1016/j.bbabio.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.bbabio.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