

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени
М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА
«Флуоресцентные показатели листьев бобов в условиях абиотического
стресса»

Выполнила студентка
605 группы
Михалькова Анна Вадимовна

подпись студента

Научный руководитель
к.ф.-м.н., доцент Калмацкая Олеся Алексеевна

подпись научного руководителя

Допущена к защите

Зав. кафедрой _____

подпись зав. кафедрой

Москва

2026

Содержание

Введение.....	3
1. Обзор литературы.....	5
1.1. Строение растительной клетки и организация ее фотосинтетического аппарата.....	5
1.2. Поглощение света молекулой хлорофилла, работа светособирающей антенны	8
1.3. Пути перехода молекулы хлорофилла в основное состояние.....	10
1.4. Импульсная флуориметрия.....	12
1.5. Влияние тяжелых металлов на онтогенез растений	16
1.6. Роль магния в процессе жизнедеятельности растений	18
1.7. Движение хлоропластов под действием возбуждающего света	20
1.8. Влияние температурного стресса на рост и развитие растений.....	21
1.9. Оптические измерения редокс-превращений P700	22
1.10. Деэтиоляция.....	24
1.11. Поведение фотосинтетического аппарата в различных условиях освещённости.....	24
1.12. Цепь электронного транспорта хлоропластов	25
1.13. Факторы регуляции электронного и протонного транспорта	27
2. Материалы и методы	29
2.1. Объект исследования.....	29
2.1.1. Исследование влияния тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат растений	29
2.1.2. Исследование влияния температурного стресса на фотосинтетический аппарат растений.....	30
2.1.3. Исследование процесса деэтиоляции растений.....	30
2.2. Измерение флуоресцентных показателей растения методом импульсной флуориметрии	31
2.3. Измерение редокс-превращений реакционного центра фотосистемы 1 (P700).....	32
2.4. Определение концентрации хлорофилла	33
3. Результаты эксперимента и их обсуждение	34
3.1. Флуоресцентные показатели листьев бобов в зависимости от концентрации солей металлов в растворе для гидропоники.....	34

3.2. Исследование состояние фотосинтетического аппарата листьев бобов при деэтиоляции.....	39
3.2.1. Изменения флуоресцентных показателей листьев бобов после акклимации растений к условиям высокой освещённости.....	39
3.2.2. Концентрация хлорофилла в листьях растений, выращенных в условиях низкой освещённости.....	42
3.2.3. Фотоиндуцированные изменения редокс-состояния реакционного центра фотосистемы 1	43
3.3. Влияние температурного и светового стресса на проростки бобов	44
3.3.1. Флуоресцентные показатели листьев бобов в условиях температурного и светового стресса.....	44
3.3.2. Фотоиндуцированные изменения редокс-состояния реакционного центра фотосистемы 1 в условиях температурного и светового стресса.....	50
Заключение	54
Список литературы	57

Введение

Фотосинтез является важнейшим процессом для поддержания жизни на нашей планете, он необходим для роста и развития растений, которые, в свою очередь, обеспечивают поддержание содержания кислорода в атмосфере, преобразуют неорганические соединения в органические, являются источником пищи для людей и животных, а также основой для создания многих лекарственных средств. Фотосинтез является ключевым процессом в круговороте вещества и энергии, обеспечивая доступность энергии и углерода для живых организмов.

С развитием цивилизации увеличивается влияние различных антропогенных факторов на окружающую среду. Таким образом растения подвергаются различным видам абиотического стресса, таким как загрязнение почвы тяжёлыми металлами, температурный стресс, избыток или дефицит воды и освещения и другим факторам. Стрессовые условия нарушают работу важнейших процессов в растениях, включая фотосинтез, и несут угрозу глобальной экологической безопасности.

Важной задачей современной биофизики и биохимии является детальное изучение фотосинтетического аппарата высших растений и влияния различных стрессовых факторов на его работу. Всесторонние данные о реакции растений на стресс могут помочь в глубоком понимании механизма фотосинтеза, а также для решения практических задач агропромышленного комплекса и обеспечения продовольственной безопасности. Одними из наиболее информативных и неинвазивных методов исследования эффективности фотосинтетического аппарата растений является метод импульсной флуориметрии (Pulse-Amplitude-Modulation Fluorometry) и импульсной дифференциальной абсорбционной спектроскопии.

Целью данной работы было изучение флуоресцентных показателей листьев проростков бобов *Vicia faba* L. (сорт «Русские чёрные») методом импульсной флуориметрии и редокс-превращений P700 (реакционного центра

фотосистемы 1) при различных абиотических стрессовых факторов (соли тяжелых металлов, пониженная освещенность, различные температурные режимы).

1. Обзор литературы

1.1. Строение растительной клетки и организация ее фотосинтетического аппарата

Фотосинтез у высших растений протекает в клетках мезофилла – ткани листа, содержащей хлоропласты. Помимо хлоропластов, в состав клеток мезофилла также входят другие органеллы: вакуоль, ядро и ядрышко, митохондрия, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, пероксисомы. Органеллы погружены в цитоплазму, клетку окружает клеточная стенка. Хлоропласты в клетке преобразуют энергию и играют важнейшую роль в фотосинтетическом процессе высших растений [1].

Хлоропласт имеет линзовидную форму, он окружен двойной оболочкой, состоящей из внутренней и внешней мембран [1]. В пространстве внутри мембран, строме, находятся молекулы ДНК, РНК, рибосомы, ферменты, а также тилакоиды – структуры, представляющие собой изогнутые липидные и слои образующие замкнутые пузырьки [2]. Тилакоиды могут группироваться в образования, имеющие форму стопки (граны), но могут и выступать наружу из гран (межгранные тилакоиды). Мембрана тилакоидов состоит из молекул липидов и включает в себя макромолекулярные фотосинтетические белковые комплексы, такие как две фотосистемы, каждая из которых является сложным макромолекулярным ансамблем [3].

Фотосистема 1 (ФС1) и фотосистема 2 (ФС2) включают в себя светособирающую антенну, фотореакционные центры и переносчики электрона. В состав ФС2 так же входит водорасщепляющий комплекс, отвечающий за разложение молекул воды за счет энергии поглощенного света [3].

Кроме фотосистем в мембрану тилакоидов встроены ферредоксин-НАДФ-редуктаза и b_6f -комплекс, – белковые комплексы цепи переноса электронов, а также подвижные молекулы пластохинона и пластоцианина. Пластохинон служит посредником между ФС2 и b_6f -комплексом, а от него к

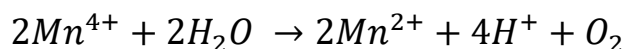
реакционному центру ФС1 электрон переносит пластоцианин. Ферредоксин, находящийся в строме, связывает ФС1 и ферредоксин-НАДФ-редуктазу, которая в конечном итоге восстанавливает молекулу НАДФ⁺ [4]. Схема первичных процессов фотосинтеза отражена на рисунке 1.

В процессе фотосинтеза происходит закисление внутритилакоидного пространства хлоропластов за счет протонов, выделяющихся при разложении воды, окислении пластохинола b_6f -комплексом. Создающаяся на мембране тилакоидов разность электрохимических потенциалов ионов водорода обеспечивает работу АТФсинтазы, катализирующей синтез аденозинтрифосфорной кислоты АТФ из АДФ и P_i [5]. Результатом работы цепи электронного транспорта является синтез АТФ и восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата НАДФН, которые впоследствии используются как источники энергии в темновой фазе фотосинтеза [3].

Функцию сбора света выполняют светособирающие пигменты: хлорофиллы, каротиноиды, фикоэритрины, фикоцианины. У зеленых растений основную роль играют именно хлорофиллы (в частности, хлорофилл *a*, поглощающий свет с длинами волн меньше 480 нм и в диапазоне от 650 до 700 нм). Хлорофиллы *a* и *b* отличаются строением и спектрами поглощения. У растений хлорофилл *a* является основным компонентом фотореакционных центров, его количество в клетке примерно в 3 раза больше, чем количество хлорофилла *b* [1].

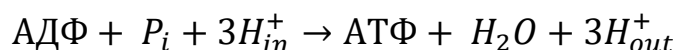
В хлоропласте пигменты собраны в светособирающие антенны – ансамбли пигментов из 200-400 молекул, направляющие энергию к реакционному центру. При поглощении кванта света молекула хлорофилла переходит в возбужденное состояние (процесс данного перехода будет подробнее рассмотрен в следующем разделе). Эта избыточная энергия передается от молекулы к соседним, мигрируя по антенне, пока не попадает на фотореакционный центр, или теряется – диссипирует в тепло или выделяется как квант света. В реакционных центрах заряд делится и переносится на первичные акцепторы [4].

В окисленном реакционном центре ФС2 с окислительно-восстановительным потенциалом +0,81 В происходит расщепление молекулы воды при помощи ионов Mn. Ионы водорода попадают во внутритилакоидное пространство.



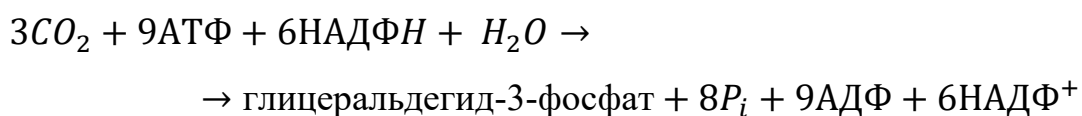
ФС1 может восстанавливать НАДФ⁺ через ферредоксин-НАДФ-редуктазу. Между фотосистемами электроны переносятся через нециклический электронный транспорт, включающий в себя пластохинон, цитохромный b₆f-комплекс (состоит из цитохрома f и двух цитохромов b₆) и пластоцианин, связывающий b₆f и реакционный центр ФС1 [4].

При переносе электрона по цепи электронного транспорта происходит выделение энергии, большая часть которой используется для работы АТРсинтазы. При этом синтез АТФ связан с протонным транспортом из тилакоидов в строму:



Такой процесс происходит из-за сильного увеличения концентрации ионов водорода внутри тилакоидов (в 100-1000 раз) при освещении хлоропласта [3].

Полученные в результате световой фазы фотосинтеза АТФ и НАДФН – высокоэнергетичные соединения – используются в темновой фазе для образования углеводов из углекислого газа и воды. Ферменты, катализирующие реакции темновой фазы растворены в строме [3]. Процесс восстановления углекислого газа до уровня углеводов называют восстановительным пентофосфатным циклом (ВПФ-цикл), или циклом Кальвина – Бенсона – Бассэма [2]. Суммарное уравнение реакций цикла имеет вид [4]:



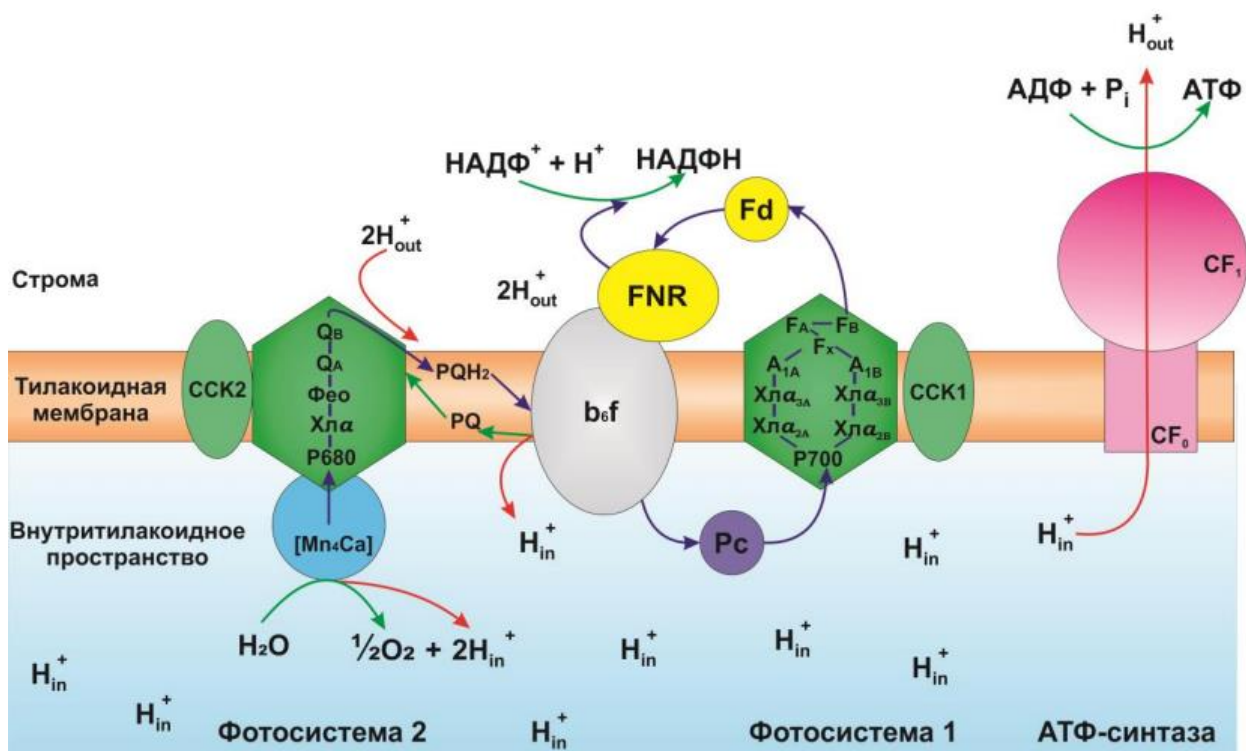


Рис. 1. Схема первичных процессов фотосинтеза высших растений [2].

Основная часть получившихся молекул глицеральдегид-3-фосфата превращается в цитозоле клетки во фруктозо-6-фосфат и глюкозо-6-фосфат, из которых впоследствии образуется предшественник сахарозы – сахаросфосфат. Остальная часть молекул глицеральдегид-3-фосфата идет на синтез крахмала [3]. Крахмальные зерна плавают в строме хлоропласта и служат хранилищем углеводов [1].

1.2. Поглощение света молекулой хлорофилла, работа светособирающей антенны

Как описано выше, энергия солнечного света попадает на реакционные центры через молекулы хлорофилла – после перехода в возбужденное состояние они могут передавать энергию внутри клетки. Рассмотрим, как именно происходит данный процесс.

Энергия, переносимая фотонами, пропорциональна частоте колебаний световой волны. Энергия одного моля фотонов может быть представлена в виде:

$$E = h\nu N_a = h \frac{c}{\lambda} N_a$$

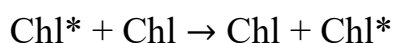
Красный свет с максимальной длиной волны, используемой в фотосинтезе (700 нм), содержит 170 кДж/моль фотонов, а фиолетовый – около 300 кДж/моль фотонов [1].

При поглощении молекулой хлорофилла фотона полученная энергия передается электронам, и они переходят на более высокий энергетический уровень. Энергия молекулы хлорофилла увеличивается, что соответствует ее возбужденному состоянию.

Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b* имеют два основных максимума, соответствующих двум возбужденным состояниям – первому S_1 и второму S_2 синглетные состояния. Первое синглетное состояние с временем жизни $\tau_1 = 4 \cdot 10^{-9}$ с более стабильно, чем второе ($\tau_2 = 10^{-12}$ с).

Сложная структура спектра поглощения хлорофилла обусловлена тем, что и в основном, и в возбужденных синглетных состояниях молекулы хлорофилла могут находиться на разных колебательных и вращательных подуровнях. Энергия поглощается только дискретными порциями, энергетические уровни тоже дискретны.

Возбужденная молекула хлорофилла Chl^* может передать энергию соседним пигментам:



Эффективность передачи энергии через антенну к реакционному центру очень велика за счет высокой упорядоченности структуры ансамбля пигментов, что обеспечивает хорошее взаимодействие между ними и, как следствие, низкую вероятность потери энергии (не более 10 - 15%) и высокую скорость ее передачи. Общее время переноса энергии к реакционному центру не превышает $10^{-10} - 10^{-9}$ нс.

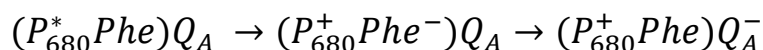
Однако из-за того, что характерные времена жизни возбужденных состояний молекул пигментов очень малы, существует вероятность потери

энергии на пути в процессе ее миграции [3]. При этом молекула хлорофилла переходит в основное состояние одним из способов, рассмотренных ниже.

1.3. Пути перехода молекулы хлорофилла в основное состояние

Молекула хлорофилла может вернуться в основное состояние различными путями, что отражено на энергетической диаграмме (рис. 2). Освобождаемая при переходе энергия может быть потрачена на совершение химической работы по созданию транс-тилакоидной разности рН (ΔpH) на тилакоидной мембране, излучение света (флуоресценцию), выделение тепла при последовательном переходе через различные колебательные и вращательные уровни или на фосфоресценцию (при совершении перехода через первый триплетный уровень T_1) [1]. Три из этих процессов являются основными: флуоресценция, фотохимические реакции и тепловая диссипация.

Активность фотохимических реакций зависит от окислительно-восстановительного состояния молекулы пластохинона Q_A , на которую через первичный акцептор Phe попадает электрон от возбужденного реакционного центра фотосистемы 2 P_{680}^* [3]:



При применении вспышки света все молекулы пластохинона переходят в восстановленное состояние, при адаптации к свету в восстановленном состоянии находится лишь часть Q_A . При повышении степени восстановленности Q_A в хлоропластах активность фотохимических реакций падает.

Реакционные центры могут быть повреждены светом слишком большой интенсивности (превышающей возможности электронного транспорта), поэтому растения выделяют часть энергии в виде тепла. Такую тепловую диссипацию называют нефотохимическим тушением флуоресценции.

Все эти процессы являются конкурентными, поэтому при увеличении эффективности одного из них происходит противоположно направленное изменение двух других [6]. Таким образом, измеряя эффективность

флуоресценции можно оценить изменения интенсивности тепловой диссипации и фотохимических процессов.

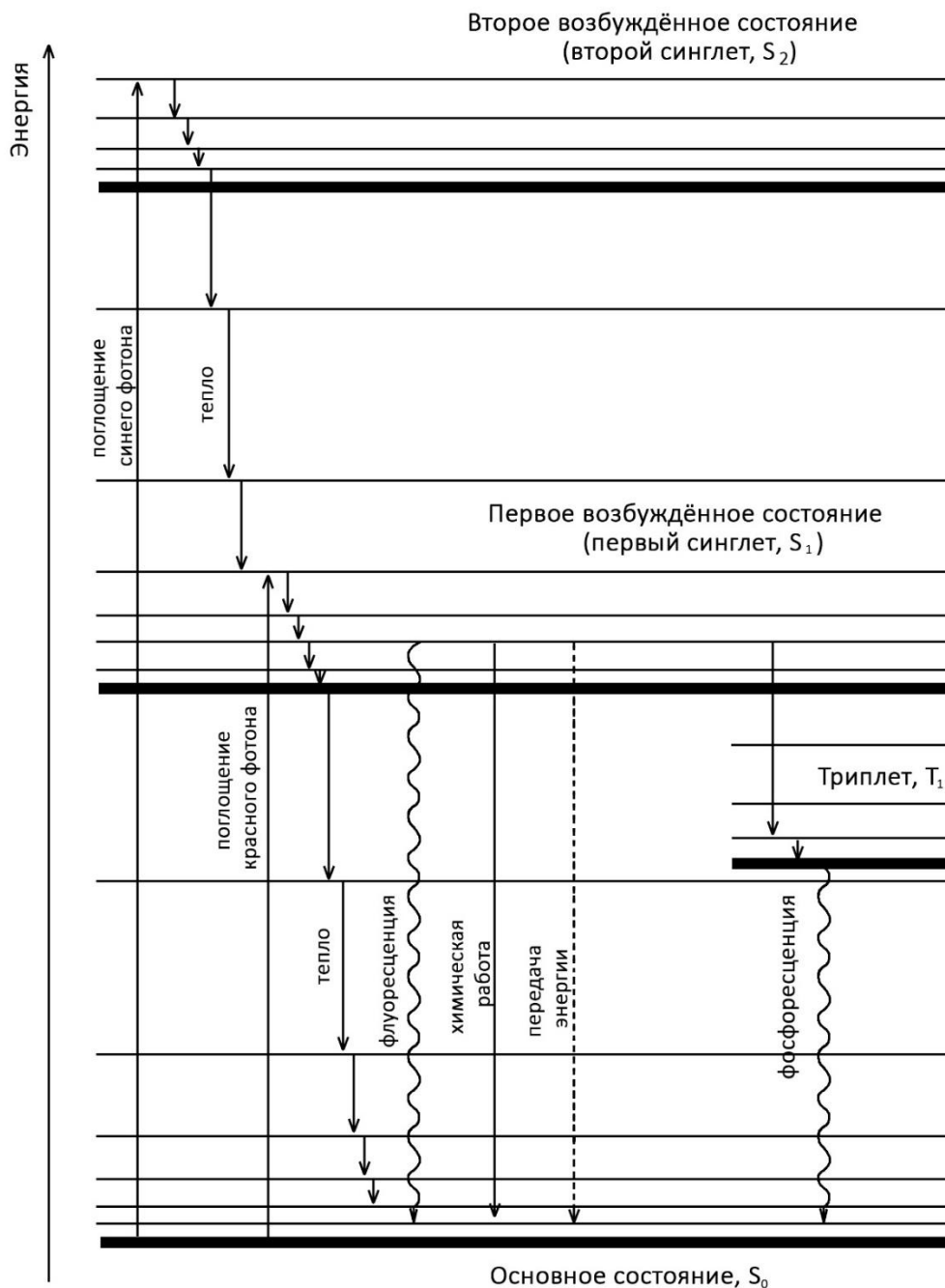


Рис. 2. Схема возбужденных состояний хлорофилла а и его возвращения в основное состояние из возбужденных состояний [1].

Хотя общее количество флуоресценции хлорофилла весьма мало (1 - 2% от всего поглощенного света), измерения достаточно просты. Спектр флуоресценции отличается от спектра поглощенного света: пик флуоресценции наблюдается на большей длине волны, чем пик поглощения

[7]. Это связано с тем, что часть энергии возбуждения успевает рассеяться в форме тепла, поэтому энергия квантов флуоресценции меньше энергии, затраченной для перехода на первый синглетный уровень [1]. Таким образом, выход флуоресценции может быть оценен следующим образом: лист растения освещают светом с определенной длиной волны и измеряют количество выделившегося света с большими длинами волн.

В современных измерительных системах применяются модулированные источники света: они включаются и выключаются с высокой частотой, а детектор настроен на измерение флуоресценции, вызванной измерительным светом. Так, относительный выход флуоресценции может быть измерен в присутствии фоновой засветки или даже при солнечном свете, что позволяет применять этот метод в полевых условиях [7].

1.4. Импульсная флуориметрия

Как было указано выше, измерение и анализ флуоресценции хлорофилла дает информацию об эффективности преобразований первичной энергии возбуждения. Была обнаружена тесная связь между флуоресцентными показателями листьев растений и ростом корней, дыханием, видимым повреждением листьев, что подтверждает возможность использования флуоресцентного метода для мониторинга температурного стресса у растений [8]. Для проведения таких исследований активно используются РАМ-флуориметры, основанные на принципе пульс-амплитудной модуляции (pulse-amplitude modulation) [9]. В РАМ-флуориметре флуоресценция возбуждается микросекундными вспышками выбранной частоты (рис. 3) – модулированным измерительным светом (ИС), фотосинтетические реакции индуцируются путем включения и выключения действующего света (ДС), а насыщающие вспышки высокой интенсивности (НВ) позволяют определить вклады фото- и нефотохимического тушения по отдельности. Насыщающие вспышки приводят к закрытию реакционных центров ФС2, но их длительность и интенсивность подобраны так, что увеличения тепловой диссипации и

долговременных изменений фотосинтетической активности не происходит [2].

При рассмотрении фотохимического тушения и флуоресценции учитывают два возможных состояния, определяемых состоянием реакционных центров ФС2 образца. В адаптированном к темноте состоянии все реакционные центры открыты, а при воздействии насыщающего света – они закрыты. В этих ситуациях выход флуоресценции будет минимален или максимален соответственно.

Перед началом измерений необходимо провести темновую адаптацию образца, после чего происходит включение измерительного света, который позволяет определить начальное (минимальное) значение флуоресценции F_0 . Затем применяется насыщающая вспышка, приводящая к кратковременному увеличению флуоресценции до максимального значения F_m [2,7] и следующему за ним медленному ее спаду, отражающему активацию электронного транспорта и различных регуляторных процессов [9]. С момента, когда уровень флуоресценции достигает начального значения, включается действующий свет, при этом интенсивность флуоресценции резко возрастает, а затем вновь постепенно снижается [2]. Во время последующих насыщающих импульсов достигаются максимальные значения выхода флуоресценции F'_m , значения которых ниже изначального максимального выхода F_m . Так как нефотохимическое тушение остается постоянным во время короткой световой вспышки, снижение значения F_m можно считать мерой нефотохимического тушения. Включение и выключение действующего света и насыщающие вспышки производят синхронно в середине периодов затемнения между импульсами измерительного света, это позволяет избежать искажений измерений [9]. На рисунке 3 представлен пример протокола измерений флуоресценции методом РАМ-флуориметрии.

Измеренные характеристики используют для расчета различных параметров и коэффициентов, позволяющих оценить вклад различных процессов в тушение флуоресценции.

Для анализа вклада фотохимического тушения вводится коэффициент q_P :

$$q_P = \frac{F'_m - F}{F'_m - F_o'}$$

Он характеризует долю открытых реакционных центров ФС2. Изменение его величины связано с закрытием реакционных центров из-за увеличения активности фотосинтеза при освещении образца. Область значений q_P : от 0 до 1.

С помощью насыщающих импульсов также можно получить достаточно точную оценку для максимального и эффективного квантовых выходов преобразования энергии в ФС2:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_o}{F_m} - \text{максимальный квантовый выход,}$$

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F}{F'_m} - \text{эффективный квантовый выход ФС2.}$$

Показатель F_v/F_m – мера максимальной (потенциальной) эффективности ФС2, то есть ее квантового выхода при условии, что все реакционные центры открыты. Он измеряется после длительной темновой адаптации образца. Изменение его величины отражает изменение активности нефотохимического тушения. Для большинства видов растений в норме этот параметр равен примерно 0,83. Более низкие значения F_v/F_m свидетельствуют о стрессовом состоянии растения и подавлении его фотосинтетических функций.

Параметр Φ_{PSII} характеризует долю поглощенной энергии возбуждения, используемой в фотохимических реакциях [7]. Он изменяется от 0 до F_v/F_m .

Φ_{PSII} , q_P и F_v/F_m связаны между собой равенством:

$$F_v/F_m = \Phi_{PSII}/q_P$$

Для оценки вклада нефотохимического тушения рассчитывают показатель q_N :

$$q_N = 1 - \frac{F'_m - F'_0}{F_m - F_0}$$

Недостатком этого показателя является необходимость измерения F_0 . Кроме того, так как q_N изменяется от 0 до 1, он слабо чувствителен к изменениям больших величин нефотохимического тушения.

Более наглядным и удобным для измерения является показатель NPQ :

$$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$$

Он линейно связан с тепловой диссипацией и может изменяться от 0 до бесконечности. На практике его значения обычно лежат в пределах от 0,5 до 3,5 при воздействии насыщающего света.

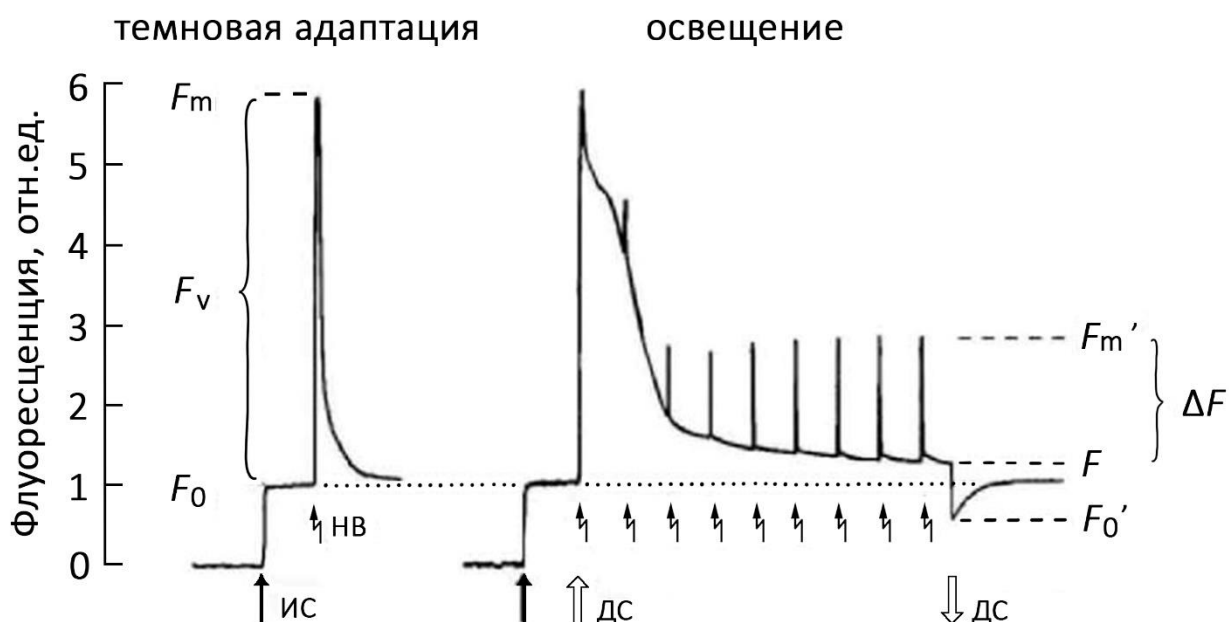


Рис. 3. Протокол измерений кинетики флуоресценции с помощью импульсного флуориметра. ИС – измерительный свет, ДС – действующий свет, зигзагообразные стрелки – насыщающие вспышки (НВ) [9].

Важно отметить, что и q_N и NPQ отражают изменения в активности тепловой диссипации относительно состояния темновой адаптации, поэтому недостаточное предварительное затемнение образца может привести к занижению значений этих параметров [7].

Все эти показатели дают возможность исследовать фотосинтетический аппарат растения, оценить состояние фотосистемы 2. Измерение

флуоресценции хлорофилла – быстрый, неинвазивный и эффективный способ обнаружить повреждения фотосистемы 2 в растениях, подверженных абиотическому стрессу [10]. Однако, в случае неправильного проведения эксперимента результаты могут содержать артефакты, сильно затрудняющие процесс анализа полученных данных [2].

1.5. Влияние тяжелых металлов на онтогенез растений

Термин «тяжелые металлы» относится к любым металлам с относительно высокой плотностью, являющимся токсичными даже при небольших их концентрациях. Некоторые тяжелые металлы (например, кадмий, ртуть, мышьяк) очень ядовиты для чувствительных к металлам ферментов, что приводит к замедлению роста и гибели живых организмов. Растения стационарны, и их корни активно контактируют с ионами тяжелых металлов, содержащихся в почве и воде.

Источники тяжелых металлов в окружающей среде могут быть природными, но в большей степени они являются антропогенными. Сельское хозяйство, горное дело, транспортировка и переработка руды и другие виды деятельности человека приводят к загрязнению среды тяжелыми металлами.

Неорганические и органические удобрения вносят наибольший вклад в загрязнение тяжелыми металлами сельскохозяйственных почв. Фунгициды, фосфатные и известковые удобрения, пестициды, а также воды, взятые для орошения из глубоких колодцев, рек или озер, имеют различные уровни содержания Cd, Cr, Ni, Pb и Zn. В частности, содержание кадмия вызывает особый интерес, так как при накоплении в растениях его содержание особенно высоко в листьях, которые могут быть употреблены в пищу животными или людьми. Несмотря на небольшой уровень содержания тяжелых металлов, многократное применение удобрений на постоянной основе приводит к опасно высокой аккумуляции некоторых элементов [11]. В Японии был зарегистрирован случай массовой хронической интоксикации солями кадмия,

попавшего в организм людей по трофическим цепям – болезнь итай-итай часто заканчивалась смертью больных [12,13].

Тяжелые металлы попадают в окружающую среду в виде самостоятельных элементов или их органических или неорганических соединений. Реками металлы переносятся в растворенном виде или в виде взвеси, а затем сохраняются в отложениях или проникают в грунтовые воды [11].

Кадмий освобождается при сжигании дизельного топлива. Его используют для получения пигментов, в производстве лаков, эмалей, керамики, стабилизаторов для пластмасс [13]. Также кадмий выделяется как побочный продукт переработки цинка и свинца.

Многие факторы влияют на интенсивность поглощения тяжелых металлов растениями: температура, водородный pH показатель и аэрация почвы, вид и размер растения и другие показатели. В данных условиях поглощение металла растением может быть оценено из биологического коэффициента поглощения:

$$\text{БКП} = \frac{[Mp]}{[Ms]},$$

где Mp – концентрация элемента в растении, Ms – его концентрация в почве.

Загрязнение сельскохозяйственных почв тяжелыми металлами стало критической проблемой окружающей среды из-за потенциально неблагоприятного влияния на растения, растущие на таких почвах. Такие эффекты могут быть как хроническими, так и острыми.

У растений, произрастающих на загрязненных кадмием почвах, проявляются такие нарушения, как угнетение роста, потемнение кончиков корней, хлороз. Все эти негативные явления могут привести к гибели организма. Кадмий нарушает поглощение и использование растением некоторых элементов (таких, как Ca, Mg, P, K), а также воды, снижает поглощение нитратов и угнетает их транспорт от корней к побегам.

Токсичность металла влияет на проницаемость плазматической мембраны, приводя к снижению содержания воды и, тем самым, нарушению водного баланса, снижает активность АТФсинтазы. Кадмий также приводит к изменениям в функциональности мембраны, вызывая перекисное окисление липидов и приводя к нарушениям в метаболизме хлоропластов, снижая активность ферментов, участвующих в фиксации CO_2 . Связывание металла с ядром клетки приводит к модификациям ДНК, интер и интрамолекулярным перекрестным связям ДНК и белков, разрывам цепей ДНК и перестановкам внутри них, приводя к различным мутациям [11].

1.6. Роль магния в процессе жизнедеятельности растений

Магний является восьмым по распространенности на земле минеральным элементом. Его источниками в природе являются силикаты. Важность магния вытекает из его химических свойств: размер, заряд, плотность, структура, которые делают его уникальным среди других биологических катионов. Он слабо поглощается растворами почвы, из-за чего он склонен к выщелачиванию. Две основные причины, объясняющие нехватку магния в растениях: его абсолютный дефицит и конкуренция катионов других металлов.

Конкуренция катионов может быть естественной или вызванной некорректным использованием удобрений. Хорошо известно, что в условиях дефицита Са, К или Mg, может возникать относительный или абсолютный избыток других катионов. Эти вещества резко антагонистичны, и при этом магний поглощается растением в последнюю очередь. В мезофилле листьев бобовых растений поглощение магния обеспечивается двумя системами: неселективным ионным каналом, который может переносить кальций и калий в листья и корни, приводя к повышению их концентраций, в то время как в условиях нехватки магния используется другая система ($\text{H}^+/\text{Mg}^{2+}$ обменный канал). Таким образом, конкуренция за поглощение рассматривается как

последствие нехватки специализированных каналов поглощения для каждого катиона.

Поглощение магния растениями сильно подавляется при дисбалансе питательных веществ. Также стрессовые условия такие, как засуха и жара, могут серьезно усугубить дефицит магния, так как он переносится массовым потоком.

Магний является неотъемлемым макроэлементом для роста, развития и многих ключевых функций в растениях. Вплоть до 35% содержания магния в растениях приходится на хлоропласты, что объясняет его важность для осуществления процесса фотосинтеза. Магний считается кофактором и аллостерическим модулятором для более 300 белков, включая киназы, фосфатазы, АТФ-азы и другие. Также магний играет ключевую роль в поддержании энергетического баланса клетки, благодаря его взаимодействию с различными метаболитами.

Нехватка магния приводит к подавлению фотосинтетических процессов, накоплению углеводов в листьях и, вследствие, ухудшению роста корней и изменениям в ультраструктуре хлоропластов. Дефицит магния неблагоприятно влияет на рибулезо-1,5-бифосфат-карбоксилазу/оксигеназу, участвующую в фиксации CO₂, что объясняет снижение эффективности фотосинтеза. Также он отрицательно влияет на структуру и фотохимическую деятельность ФС1 и ФС2 у некоторых видов (в т.ч. *Vicia faba* L. [14]), что приводит к снижению F_v/F_m — максимальной квантовой эффективности ФС2. Хлоропласты в условиях нехватки магния становятся больше и принимают округлую форму из-за накопления увеличенных крахмальных зерен и разрушенных тилакоидов. Ухудшение фиксации CO₂ и увеличение образования активных форм кислорода повреждает различные компоненты клетки: мембранные липиды, белки и нуклеиновые кислоты, что приводит к нарушению метаболизма растения. Аккумуляция сахаров в листьях считается самым разрушительным эффектом, негативно влияющим на дальнейший рост растения, фотосинтетическую активность и морфологию листьев.

Избыток магния вынуждает растения приспосабливаться для выживания в условиях его высокой концентрации. Для этого вырабатываются следующие адаптации: запасание избыточного магния в вакуолях, селективное поглощение Са корнями и его транспорт к побегам, ограничение внутреннего накопления Mg и связывание Mg на уровне корней [15].

1.7. Движение хлоропластов под действием возбуждающего света

При изменении интенсивности возбуждающего света в клетках растений происходит движение хлоропластов с целью увеличения фотосинтетической активности и минимизации повреждений, вызванных светом насыщающей интенсивности [16]. В условиях темноты или слабого освещения хлоропласты в клетке располагаются перпендикулярно к падающему свету (accumulation-эффект). В случае резкого возрастания интенсивности освещения органеллы выстраиваются таким образом, чтобы затенять друг друга и уменьшать воздействие падающего света (avoidance-эффект) (рис. 4) [2].

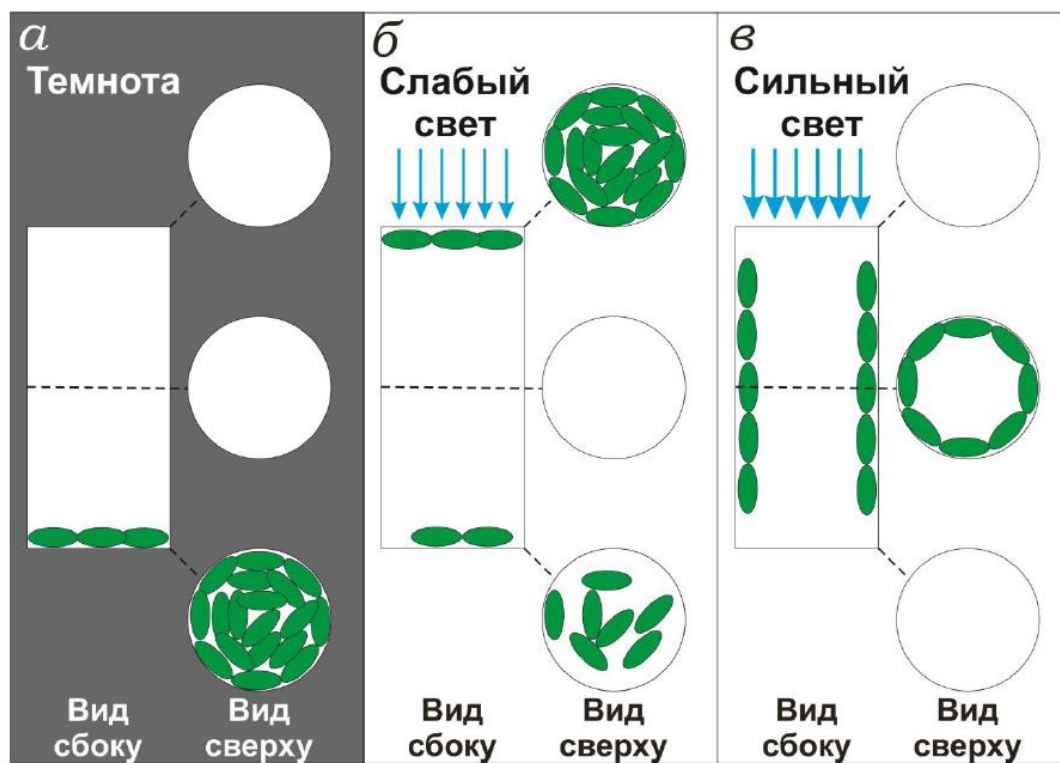


Рис. 4. Схема расположения хлоропластов в клетке: а) в темноте; б) на слабом свете; в) на сильном свете [14].

1.8. Влияние температурного стресса на рост и развитие растений

Абиотические стрессовые факторы, такие как высокая или низкая температура, наличие солей в почве, засуха и другие, могут сокращать объём урожая вплоть до 80%. Температурный стресс, в частности, оказывает серьёзное влияние на морфологическое, биохимическое и физиологическое состояние растений, их рост и развитие. Многие растения имеют узкий диапазон оптимальных для роста температур, поэтому температурный режим, выходящий за рамки оптимальных значений, как в большую, так и в меньшую сторону, негативно влияет или даже нарушает такие метаболические процессы в высших растениях, как фотосинтез и дыхание [17].

В литературе накоплен обширный массив данных об оптимальном значении температуры для выращивания *Vicia faba* L., которое не является единой величиной и существенно варьируется в зависимости от стадии онтогенеза и генотипа. В работе [18] на выборке из шести генотипов было показано, что оптимальная температура для появления всходов лежит в диапазоне 19,9-26,5 °C, тогда как для скорости развития растений до фазы цветения этот диапазон несколько уже и составляет 19,9-25,4 °C. Для процесса прорастания семян в работе [19] были определены более высокие значения оптимума: от 24,9 до 28,8 °C в зависимости от сорта. Исследуя *Vicia faba* var. *minor* авторы работы [20] с использованием нескольких индексов и математического моделирования, определили, что оптимальной температурой для прорастания является 20 °C, поскольку при данной температуре достигалась максимальная скорость прорастания и пик скорости удлинения главного корня, при этом на финальную всхожесть температура в диапазоне 10-30 °C значимо не влияла, однако снижение температуры до 5 °C уменьшало всхожесть примерно на 4 % и многократно замедляло процесс. Что касается непосредственно фотосинтетической активности, было установлено, что оптимальная температура для ассимиляции углерода листьями *Vicia faba* составляет 26-27 °C, при этом работа фотосинтетического аппарата

остаётся стабильной в более широком диапазоне от 21 до 32 °С [21]. Ключевой для формирования урожая этап завязывания бобов, согласно недавнему исследованию [22], протекает наиболее успешно при диапазонах для максимальной температуры 23,7-26,1 °С и для среднесуточной температуры 12,7-13,9 °С. Обобщая эти данные, можно заключить, что, несмотря на холодостойкость вида, его продукционный процесс в целом лимитируется как низкими положительными температурами, так и длительным воздействием температур выше 27-30 °С, что необходимо учитывать при интерпретации показателей стресса, в том числе флуоресцентных показателей листьев.

Растущие ранней весной и осенью бобы *Vicia faba* L. могут подвергаться низким температурам в период вегетации и высоким в период цветения [10]. При адаптации к температурному стрессу растения развивают молекулярные, биохимические и физиологические механизмы для выживания [23]. Слишком низкие и высокие температуры оказывают воздействие на разные компоненты фотосинтетической системы, включая размер устьиц, образование фотосинтетических пигментов, функционирование фотосистем 1 и 2, активность ферментов цикла Кальвина-Бенсона, а также процессы поглощения и фиксации CO₂ [24,25]. Вызванное жарой повреждение хлоропластов приводит к инактивации чувствительных к теплу белков, включая активазу рубиско, нарушает окислительно-восстановительный баланс, что приводит к образованию реактивных форм кислорода, и снижает фотосинтетическую активность [25,26]. Именно фотосинтез является самым чувствительным по отношению к жаре процессом, он зачастую подавляется раньше, чем ослабевают другие клеточные функции [26]. А комплексы фотосистемы 2 считаются самыми чувствительными к тепловому стрессу компонентами фотосинтетического аппарата листьев растений [27].

1.9. Оптические измерения редокс-превращений P700

Фотосистема 1 традиционно считается более устойчивой к фотоповреждению по сравнению с фотосистемой 2, однако её повреждение

носит более критический и часто необратимый характер. В связи с этим у растений развиты механизмы защиты фотосистемы 1, включающие регуляцию редокс-состояния реакционного центра P700. О светоиндуцированном окислении центров P700 в листьях судили по разности поглощения света на длинах волн 870 и 830 нм (оптический сигнал $\Delta A_{870-830}$). Амплитуда сигнала $\Delta A_{870-830}$ прямо связана с числом окисленных центров P700⁺. В листьях, прошедших темновую адаптацию, при включении красного света регистрируется постепенный рост сигнала $\Delta A_{870-830}$ до стационарного уровня, что отражает процесс окисления P700. Наблюдаемая задержка в нарастании сигнала обусловлена неактивным состоянием цикла Кальвина–Бенсона после адаптации листа к темноте. В этих условиях отток электронов от ФС1 ограничен вследствие низкого потребления НАДФН — восстановленного конечного акцептора электронов фотосистемы 1. При освещении хлоропластов красным светом ($\lambda = 635$ нм) происходит активация ферментов цикла Кальвина–Бенсона, что приводит к увеличению скорости оттока электронов от ФС 1 и, как следствие, к выраженному окислению P700. После прекращения освещения наблюдается относительно быстрое восстановление P700⁺. Это обусловлено восстановлением молекул пластохинола, сформированных в ходе освещения светом с длиной волны $\lambda = 635$ нм и световым потоком $1100 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, возбуждающим фотосистему 2. Последующее включение дальнего красного света насыщающей интенсивности (ДКС, $500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$, $\lambda = 720$ нм), преимущественно активирующего фотосистему 1, вызывает относительно быстрое увеличение сигнала P700⁺, что позволяет определить максимальный уровень сигнала P700. Интенсивность измерительного инфракрасного света ($\lambda = 870$ и 830 нм) составляла $\approx 9 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$ [28]. При этом в темноте замедляется спад сигнала $\Delta A_{870-830}$, поскольку при действии ДКС фотосистема 2 практически не возбуждается и восстановление компонентов пластохинонового пула не происходит [29].

1.10. Деэтиоляция

Деэтиоляция представляет собой адаптационный механизм, совокупность морфофизиологических и молекулярных изменений, происходящих в растениях при переходе от роста в условиях темноты (этиоляции) к развитию на свету. Данный процесс обеспечивает активацию фотосинтетического аппарата, синтез хлорофилла и формирование функционально зрелых листьев [29].

Развитие растений в различных условиях освещённости происходит по-разному: образцы, испытывающие нехватку света (этиолированные), имеют вытянутые стебли и бледно-зелёные листья, а растения получающие достаточно света, имеют хорошо развитые листья, сбалансированный рост, насыщенную зелёную окраску. В процессе деэтиоляции прекращается удлинение стебля, листья разворачиваются, увеличиваются в площади и получают более насыщенную зелёную окраску, вызванную синтезом хлорофилла.

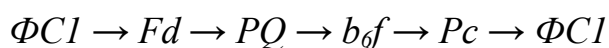
1.11. Поведение фотосинтетического аппарата в различных условиях освещённости

В ответ на высокую интенсивность освещения зачастую наблюдается повышение коэффициента нефотохимического тушения (NPQ), что является регуляторным защитным механизмом фотосинтетического аппарата от избытка энергии [29]. В условиях высокой освещённости количество светособирающих белков сокращается, а содержание комплексов ФС2 возрастает по сравнению с ФС1. Противоположный эффект наблюдается при низкой освещённости: снижается число комплексов ФС2, что связано с ростом числа светособирающих белков [30]. В листьях гороха было показано, что низкий уровень освещения ($65 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) защищает листья от теплового стресса лучше в сравнении с листьями, содержащимися в темноте. Более яркий свет ($1000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) повышал чувствительность листьев [8].

1.12. Цепь электронного транспорта хлоропластов

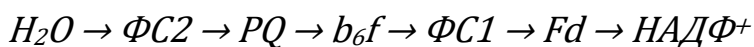
Основные процессы фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах включают в себя циклический электронный транспорт (ЦЭТ), нециклический (линейный) электронный транспорт (НЭТ) и псевдоциклический электронный транспорт (ПЭТ). Рассмотрим каждый из этих путей подробнее.

- *ЦЭТ*

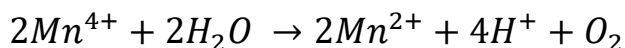


Цепь *ЦЭТ* электронов вокруг $\Phi C1$ включает ферредоксин-хинон-редуктазу. Через этот фермент восстановленный ферредоксин (Fd^-) передаёт электрон в пул пластохинонов, откуда он затем возвращается к окисленному реакционному центру $P700^+$. При этом восстановления $НАДФ^+$ не происходит, однако осуществляется перенос протонов из стромы в люмен — внутритилакоидное пространство хлоропластов, что создаёт разность потенциалов на мембранах тилакоидов и способствует выработке АТФ. Это перенос электронов по цепи вокруг $\Phi C1$, в итоге которого электроны возвращаются к $\Phi C1$, формируя цикл в темновой фазе фотосинтеза.

- *НЭТ*



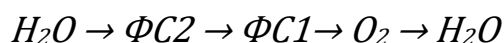
Цепь *НЭТ* начинается с расщепления молекулы воды в водорасщепляющем комплексе:



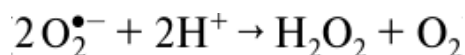
В ходе данного процесса образуется молекулярный кислород, выходящий в атмосферу. Электроны переносятся между $\Phi C2$ и $\Phi C1$ через пластохинон (PQ) и b_6f -комплекс, затем происходит восстановление $НАДФ^+$ через ферредоксин-НАДФ-редуктазу, с образованием НАДФН, которые потребляются в реакциях цикла

Кальвина-Бенсона [31-33]. Сосуществование линейного и циклического электронного транспорта позволяют поддерживать подходящее соотношение между концентрацией молекул АТФ и НАДФН, которое необходимо для оптимального функционирования цикла Кальвина-Бенсона (АТФ/НАДФН = 3/2).

- ПЭТ



ПЭТ или реакция Мелера состоит в переносе электрона на молекулу O_2 с образованием супероксидных радикалов, которые впоследствии образуют молекулярный кислород и молекулу пероксида водорода.



Пероксид водорода в свою очередь, разлагается до конечных продуктов – молекул воды и кислорода. Данный цикл называется также «вода-вода». В ходе него протоны переносятся в люмен, что поддерживает синтез АТФ [31, 32].

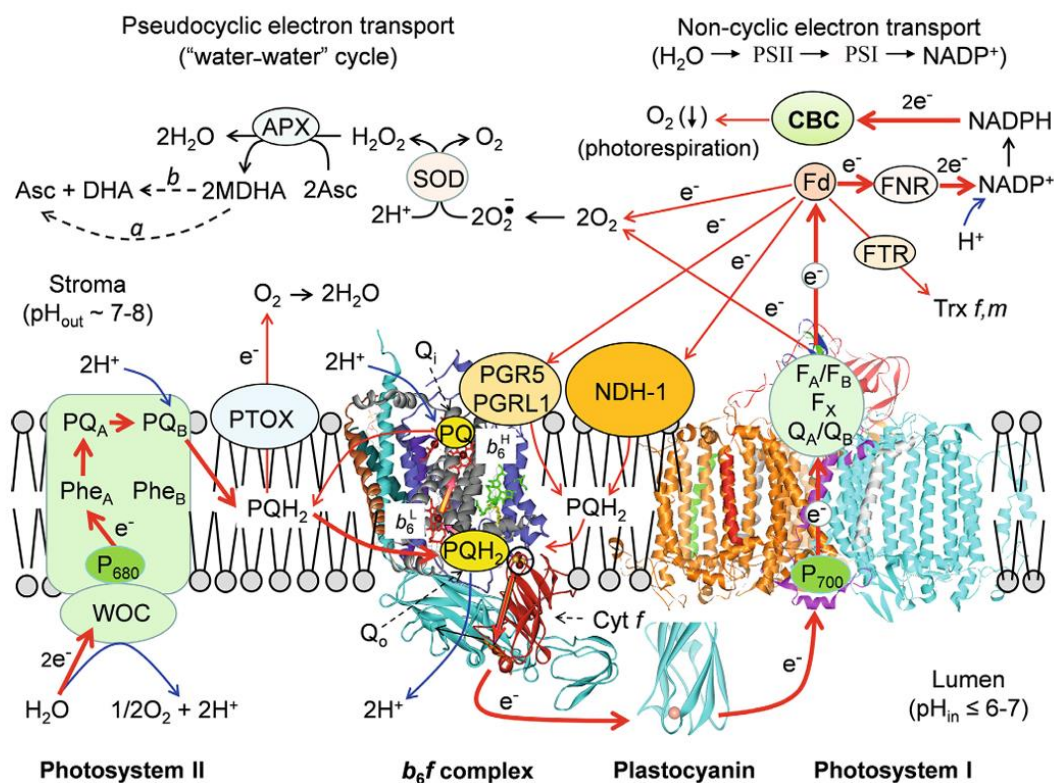


Рис. 5. Схема электронного и протонного транспорта [33].

1.13. Факторы регуляции электронного и протонного транспорта

1. В реакции Мелера («вода – вода») электроны вместо НАДФ⁺ передаются на O₂ с образованием супероксидных радикалов, которые затем быстро обезвреживаются. При «перегрузке» акцепторов ФС1 молекула кислорода выступает как альтернативный акцептор, что позволяет регулировать электронный транспорт в хлоропласте.
2. Известны два основных механизма **pH-зависимого ингибирования переноса электронов** между ФС2 и ФС1, вызванного снижением pH в люмене (pH_{in}):
 - 1) замедление окисления пластохинола (PQH₂) – восстановленной формы пластохинона (PQ) – комплексом цитохрома b₆f, что вызвано механизмом отрицательной обратной связи: окисление PQH₂ сопровождается высвобождением протонов в люмен, а подкисление люмена (снижение pH_{in}) ингибирует дальнейшее окисление PQH₂, что затрудняет депротонирование PQH₂ и замедляет работу цитохрома b₆f, в результате чего снижается скорость переноса электронов между фотосистемами.
 - 2) ослабление фотохимической активности ФС2 вследствие нефотохимического тушения возбуждения хлорофилла [34].
3. **Повышение pH стромы (pH_{out})**, вызванное переносом протонов из стромы в люмен, также может влиять на скорость функционирования фотосинтетической цепи переноса электронов. Увеличение pH_{out} до 7,8–8,0 способствует активации реакций цикла Кальвина-Бенсона. Это приводит к ускоренному потреблению НАДФН и, соответственно, к более быстрому оттоку электронов от ФС1 [33].
4. В отличие от НЭТ, при ЦЭТ не происходит образования восстановителей в строме, что приводит к увеличению соотношения АТФ:НАДФН, образующихся в световых реакциях. Кроме того, создаваемый при ЦЭТ протонный градиент (ΔpH) приводит к

подкислению люмена тилакоидов, что вызывает активацию фотозащитной реакции qE и предотвращает накопление электронов на акцепторной стороне ФС2 [35].

5. **Активация АТФ-синтазы.** рН-зависимая регуляция транспорта электронов лежит в основе явления, называемого «фотосинтетическим контролем». Суть этого явления заключается в том, что поток электронов между ФС2 и ФС1 коррелирует с «фосфатным потенциалом» $P = [АТФ]/([АДФ] \times [P_i])$, где [АТФ], [АДФ] и $[P_i]$ — концентрации АТФ, АДФ и неорганического фосфата соответственно. Соотношение АТФ/АДФ может изменяться в зависимости от физиологического состояния растительной клетки, а также взаимодействия фотосинтетического аппарата с митохондриями и другими метаболическими системами. В состоянии «фотосинтетического контроля» истощение запасов АДФ и/или P_i приводит к снижению синтеза АТФ и уменьшению потока протонов через АТФ-синтазу. Одновременно рН люмена существенно снижается ($pH_{in} < 6$), что замедляет работу комплекса b_6f . Когда же происходит интенсивный синтез АТФ, усиливается отток протонов из люмена в строму, и поэтому столь сильного подкисления люмена, которое могло бы существенно замедлить перенос электронов, не происходит ($pH_{in} \geq 6-6,5$). Это обеспечивает эффективный синтез АТФ и одновременно поддерживает высокую скорость транспорта электронов [33].
6. Регуляция электронного и протонного транспорта в хлоропластах осуществляется, в том числе, за счёт **спектрального состава света**, воспринимаемого фотосенсорными системами, такими как фитохром (красный свет 540–690 нм, максимальная чувствительность на 640–670 нм и дальний красный свет 695–780 нм, максимальная чувствительность на 720–750 нм), рецепторы синего света – криптохромы (340–500 нм, максимальная активность на 400–500 нм с дополнительным пиком на 360–380 нм) и фототропины (~340–500 нм, максимальная активность на

410–480 нм с дополнительным менее эффективным пиком на 360–370 нм) [36]. Различные длины волн по-разному возбуждают ФС2 и ФС1, что может приводить к дисбалансу электронного потока. Он компенсируется механизмами перераспределения светособирающих комплексов. Активность цикла Кальвина-Бенсона (ЦКБ) определяет скорость потребления АТФ и НАДФН, формируемых в световых реакциях. При интенсивной работе цикла происходит быстрое окисление НАДФН и регенерация НАДФ⁺, что поддерживает высокий поток электронов через цепь переноса и способствует формированию протонного градиента. Напротив, при снижении активности ЦКБ происходит накопление восстановленных переносчиков, ограничение акцепторной способности ФС1 и замедление электронного транспорта, что сопровождается изменениями протонного градиента и активацией фотозащитных механизмов [5].

2. Материалы и методы

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали проростки бобов *Vicia faba* L. сорта «Русские чёрные». Это однолетнее зернобобовое растение, культивируемое по всему миру как источник пищи для человека, а также как корм для животных и необходимый для здорового метаболизма источник белка [10]. Для получения хорошей урожайности требуется умеренный температурный режим, достаточное обеспечение влагой.

2.1.1. Исследование влияния тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат растений

Семена бобов сначала высаживали в пакеты с грунтом, укоренившиеся проростки через неделю пересаживали в стаканы с растворами солей CdCl₂ и MgCl₂ концентраций 10⁻⁷ М, 10⁻⁵ М и 10⁻³ М и выращивали далее в условиях гидропоники. В качестве контрольного вещества использовали

дистиллированную воду. Измерения проводили через 2 недели, когда на стебле было сформировано 3 яруса листьев. Для измерений использовали листья второго яруса, Усреднение производили для серии из 3 образцов.

2.1.2. Исследование влияния температурного стресса на фотосинтетический аппарат растений

Семена бобов высаживали в пакеты с грунтом и помещали в камеру для выращивания растений в контролируемой среде FytoScope FS 130. Источником света в камере служит панель из 112 белых светодиодов. Время освещения составляло 12 часов в сутки. Все образцы были разделены на две группы по условиям освещения:

1. Выращивались в условиях высокой освещённости ($1000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$);
2. Выращивались в условиях недостаточной освещённости ($100 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$).

И на три группы по температурному режиму (15°C , 25°C , 30°C).

Измерения проводили через 14-21 день, когда на стебле было сформировано 3 яруса листьев. Для измерений использовали листья второго яруса, усреднение производили для серии из 5 образцов. Разное время культивации объясняется более медленным развитием проростков, помещенных в камеру при 15°C .

2.1.3. Исследование процесса деэтиоляции растений

Семена бобов высаживали в пакеты с грунтом. Все образцы были разделены на две группы по условиям выращивания:

1. Растения контрольной группы всё время выращивали в условиях высокой освещённости (2000-3000 лк).
2. Образцы опытной группы сначала выращивались в условиях недостаточной освещённости (5-10 лк), а на время проведения измерений были помещены в условия первой экспериментальной группы.

Измерения проводили через 14 дней, когда на стебле было сформировано 3 яруса листьев. Для измерений использовали листья второго яруса усреднение производили для серии из 3 образцов. Измерения проводились непосредственно перед перемещением образцов второй группы (опытной) в условия высокой освещённости, а также ежедневно в течение последующей недели.

2.2. Измерение флуоресцентных показателей растения методом импульсной флуориметрии

Измерения индукционных изменений флуоресценции проводились с помощью импульсного флуориметра РАМ-2500 (Walz, Германия). На рис. 6 представлена характерная кривая, полученная при использовании стандартного протокола измерений.

В качестве характеристик освещения используются длина волны падающего света и фотосинтетически активная радиация (ФАР), характеризующая поток фотонов, падающий на образец.

Перед началом измерений проводили темновую адаптацию исследуемого листа, помещая его в темную камеру в держателе-клипсе на 10 мин. После этого в условиях темноты включали слабый измерительный свет ($\lambda = 630$ нм, ФАР ≈ 10 мкЭ м⁻²с⁻¹) и далее для определения параметра F_v / F_m подавали насыщающую вспышку. По прошествии короткого периода релаксации (30 с) включали синий действующий свет ($\lambda = 455$ нм, ФАР ≈ 150 мкЭ м⁻²с⁻¹ для экспериментов с тяжелыми металлами и деэтиоляцией, ФАР ≈ 500 мкЭ м⁻²с⁻¹ для экспериментов с температурным стрессом), и на его фоне подавали кратковременные насыщающие вспышки света ($\Delta t = 0,5$ с, $\lambda = 630$ нм, ФАР ≈ 3500 мкЭ м⁻²с⁻¹). Время измерения кинетики флуоресценции составляло 15 минут.

Из значений интенсивности флуоресценции, полученных при воздействии измерительного и действующего света и насыщающих вспышек, с помощью программного обеспечения прибора автоматически вычислялись

такие флуоресцентные параметры, как F_v/F_m , Φ_{PSII} , NPQ , F_o , F_m . Были построены временные зависимости эффективного выхода флуоресценции (Φ_{PSII}) и нефотохимического тушения (NPQ), определены их средние стационарные значения, а также среднее значение показателя F_v/F_m , F_o , F_m для каждой из концентраций по результатам нескольких измерений.

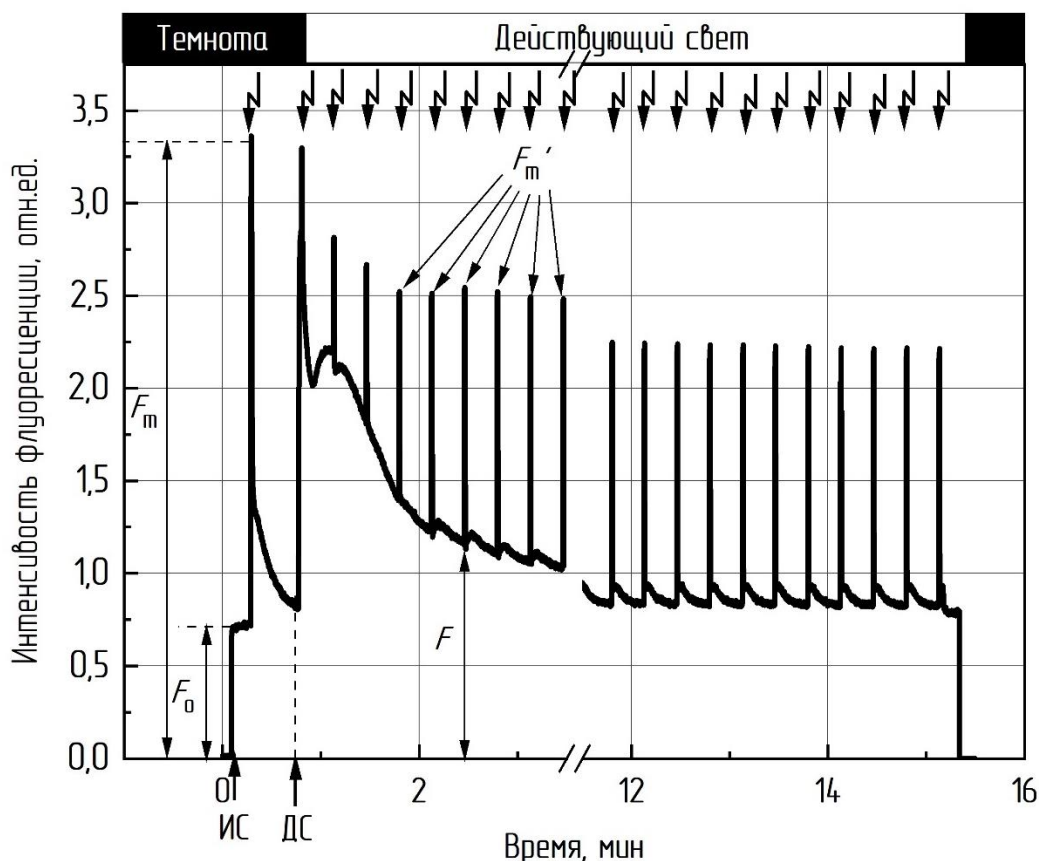


Рис. 6. Протокол измерений флуоресценции листьев *Vicia faba* L. с помощью импульсного флуориметра РАМ-2500: ИС – измерительный свет, ДС – действующий свет, зигзагообразные стрелки – насыщающие вспышки.

2.3. Измерение редокс-превращений реакционного центра фотосистемы 1 (P700)

Измерения редокс-превращений реакционного центра фотосистемы 1 производилось с помощью импульсного флуориметра с функцией измерения поглощения Р700 фирмы Walz, Dual-Pam-100. Редокс-превращения были определены, как разность интенсивности поглощения на длинах волн 830 и 870 нм ($\Delta A_{870-830}$). Лист, не отрывая от стебля, помещали между оптическими

держателями (использовались измерительные головки DUAL-DB и DUAL-E). Длина волны актиничного (действующего) света, возбуждающего обе фотосистемы, составляла 635 нм с максимальным световым потоком в $1100 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Для возбуждения ФС1 использовался дальний красный свет с длиной волны 720 нм, с максимальным световым потоком в $1100 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Дальний красный свет насыщающей интенсивности (с максимальным световым потоком в $500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$)¹ использовали для определения максимального значения сигнала от $P700^+$. Типичный протокол измерения: после двух минут освещения действующим светом образец адаптировали к темноте на протяжении 10 минут, затем освещали действующим красным светом, который после переключали на дальний красный свет [37]. Такой протокол позволяет измерить переходные процессы изменения уровня сигнала от $P700$. Типичная кривая изменений величины сигнала от $P700^+$ ($\Delta A_{870-830}$) представлена на рис. 7.

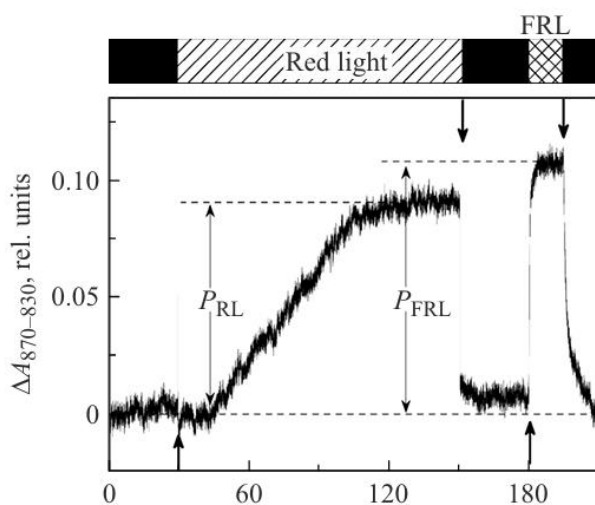


Рис. 7. Типичная кривая светоиндуцированных изменений величины разностного сигнала поглощения света, измеряемого при 870 и 830 нм (сигнал $\Delta A_{870-830}$) [29].

2.4. Определение концентрации хлорофилла

Содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях растений определяли спектрофотометрическим методом. Навеску листьев массой 120 мг растирали в фарфоровой ступке, добавляя 100%-ный ацетон. Полученную вытяжку

фильтровали через стеклянный фильтр №2 с помощью водоструйного насоса и доводили её объём до 25 мл. Спектры поглощения полученного раствора измеряли на спектрофотометре Solar PB2201 и находили значение оптической плотности на длинах волн 645 нм и 662 нм, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* в 100%-ном ацетоне.

Концентрацию хлорофилла определяли по формулам Вернона:

$$C_a = 11,75 \cdot A_{662} - 2,32 \cdot A_{645}, C_b = 18,61 \cdot A_{645} - 3,96 \cdot A_{662},$$

где C_a – концентрация хлорофилла *a*, C_b – концентрация хлорофилла *b*, A_{645} и A_{662} – оптическая плотность на длинах волн 645 и 662 нм соответственно [11].

3. Результаты эксперимента и их обсуждение

3.1. Флуоресцентные показатели листьев бобов в зависимости от концентрации солей металлов в растворе для гидропоники

Как отмечено выше, использованные металлы по-разному влияют на растения. Кадмий относится к тяжелым металлам и является одним из наиболее токсичных представителей данного класса. Его избыток негативно влияет на растение, нарушает процессы фотосинтеза и дыхания [2]. Магний же является одним из важнейших макроэлементов для роста и развития организма, стимулирующим течение ключевых процессов в организме.

По проведенным измерениям индукционных изменений флуоресценции хлорофилла методом импульсной флуориметрии были определены флуоресцентные показатели F_o и F_m – начальное (минимальное) и максимальное значения флуоресценции для различных образцов (таблица 1). Во всех случаях F_m практически не изменялось. F_o оказалось примерно одинаковым для растений, выращенных на растворах хлорида магния различных концентраций, но с увеличением концентрации хлорида кадмия в растворе F_o росло. Данное явление может быть связано с тем, что кадмий

подавляет усвоение и использование магния растением, что может приводить к угнетению синтеза молекул хлорофилла и в итоге негативно сказываться на работе светособирающей антенны и реакционных центров. В связи с этим при включении измерительного света после длительной темновой адаптации полученная растением энергия света хуже усваивается пигментами и больше теряется в виде флуоресценции.

Кинетики изменений показателей Φ_{PSII} и NPQ (рис. 8) имеет схожий вид для контрольных образцов, выращенных на дистиллированной воде, и образцов, выращенных на $MgCl_2$ даже при высоких концентрациях. При этом кинетики для листьев растений, выращенных на $CdCl_2$ 10^{-3} М имеют специфические отличия, выражающиеся в более низком стационарном значении Φ_{PSII} и немономтонном изменении показателя NPQ .

Таблица 1. Флуоресцентные показатели F_o и F_m для различных образцов.

Показатель		F_o	F_m
Концентрация, М			
Контроль		0,77±0,06	3,43±0,06
10 ⁻⁷	MgCl ₂	0,73±0,01	3,35±0,05
	CdCl ₂	0,70±0,04	3,25±0,20
10 ⁻⁵	MgCl ₂	0,72±0,03	3,26±0,18
	CdCl ₂	0,83±0,04	3,25±0,23
10 ⁻³	MgCl ₂	0,75±0,03	3,33±0,03
	CdCl ₂	1,12±0,03	3,33±0,14

Зависимость NPQ от времени при освещении образца имеет двухфазный характер. Первые несколько минут развивается быстрая фаза, связанная с закислением внутритилакоидного пространства и развитием процессов активации механизмов нефотохимического тушения. Сразу после включения действующего света пул пластохинона между фотосистемами полностью восстановлен, но при этом цикл Кальвина – Бенсона активируется не сразу, а

через некоторое время, нециклический транспорт не функционирует. Затем следует более медленная фаза, в которой NPQ снижается у образцов, выращенных на растворе $CdCl_2$, и медленно растет в случае H_2O и $MgCl_2$. Происходит активация цикла Кальвина – Бенсона, начинается расход АТФ и НАДФН. Это приводит к увеличению активности АТФ-синтазного комплекса и уменьшению ΔpH на мембране тилакоидов, вследствие чего снижается коэффициент нефотохимического тушения.

Усредненные значения показателей максимального квантового выхода F_v/F_m для различных концентраций действующих веществ и контрольного образца (рис. 9) демонстрируют с одной стороны малую вариабельность этого параметра, а с другой стороны достоверное снижение значений при увеличении концентрации $CdCl_2$ в растворе. Для образцов, выращенных на растворе $MgCl_2$, F_v/F_m практически не изменялись.

Усредненные значения эффективного квантового выхода ФС2 Φ_{PSII} (рис. 10), а также коэффициента NPQ (рис. 11) для образцов, выращенных на растворе $CdCl_2$, при увеличении концентрации соли в растворе постепенно снижались, что может свидетельствовать о подавлении фотосинтетической активности растения в целом, а также снижении эффективности механизмов нефотохимического тушения. Для образцов, выращенных на растворе $MgCl_2$ существенных изменений в значениях Φ_{PSII} и NPQ выявлено не было.

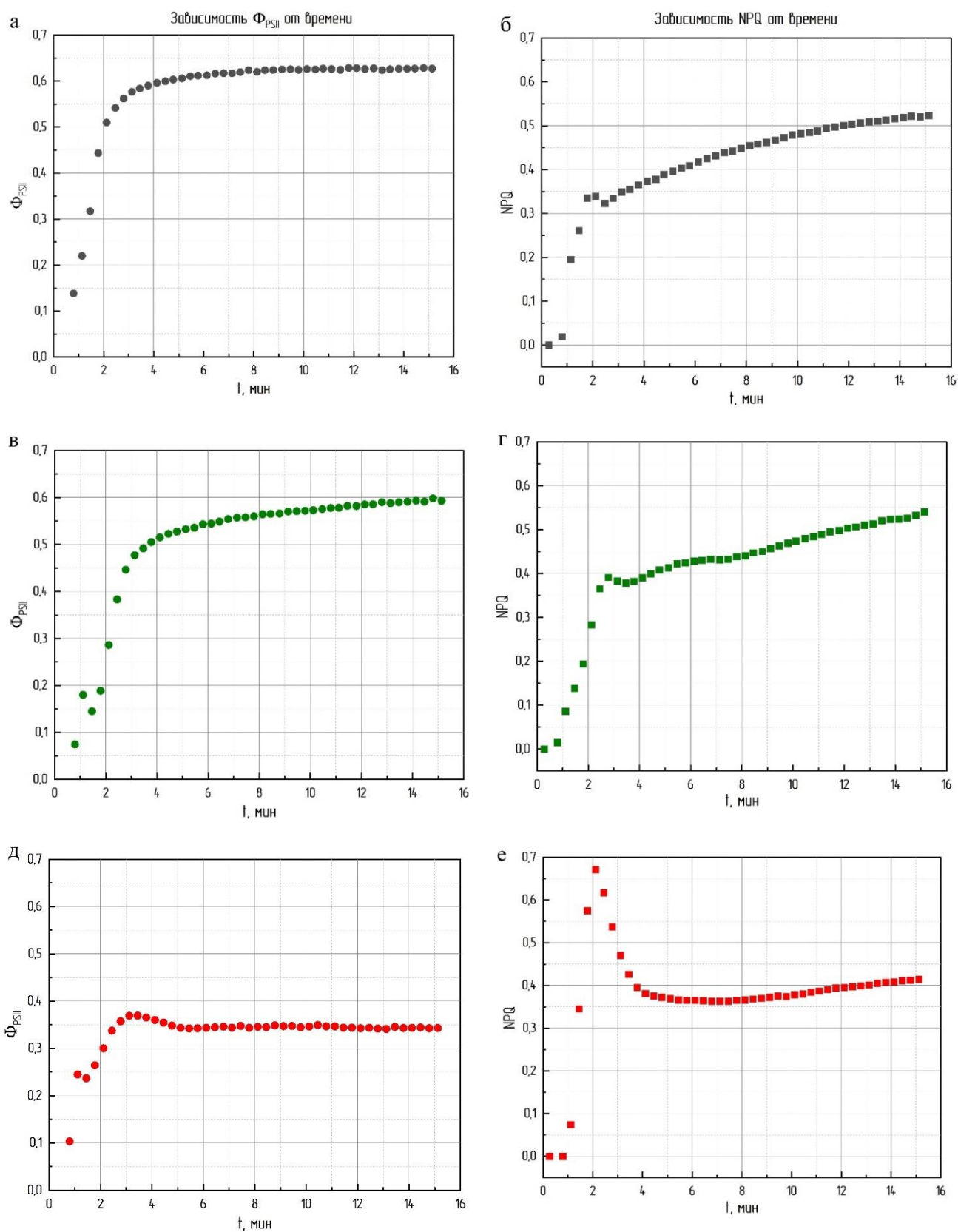


Рис. 8. Эффективный квантовый выход ФС2 (слева) и коэффициенты нефотохимического тушения (справа) для контрольного образца (а, б), $MgCl_2 \cdot 10^{-3} M$ (в, г) и $CdCl_2 \cdot 10^{-3} M$ (д, е).

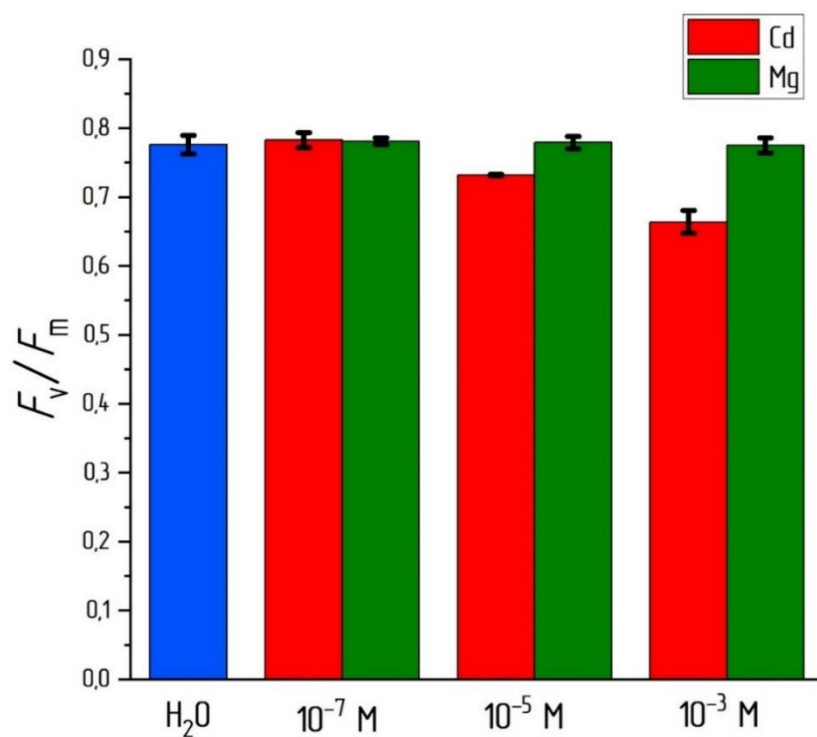


Рис. 9. Средние значения максимального квантового выхода флуоресценции F_v/F_m для различных образцов. Синим отмечен контрольный образец.

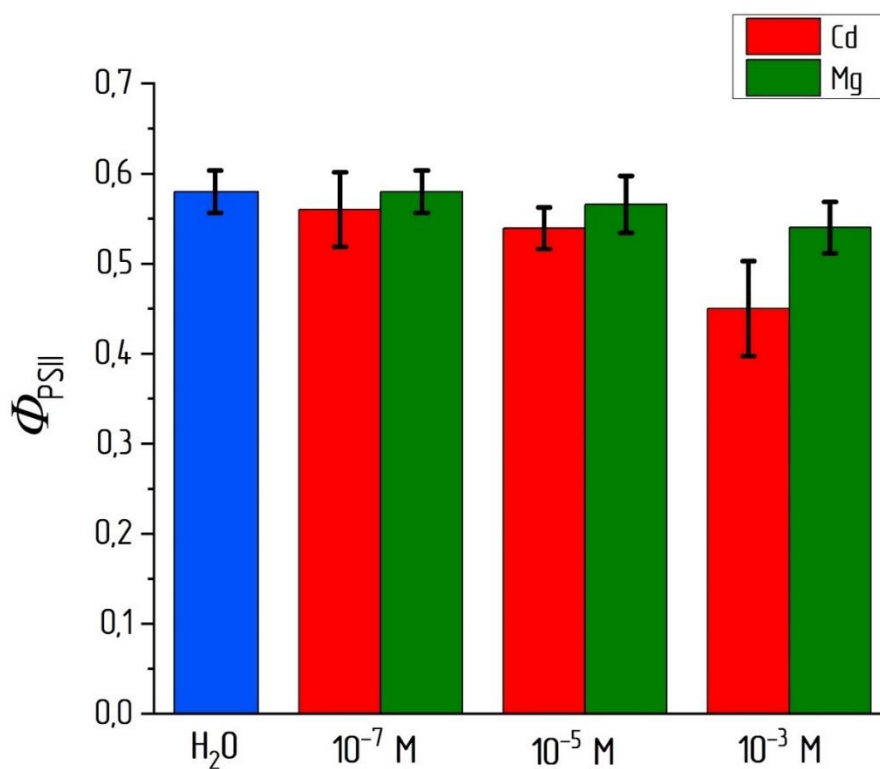


Рис. 10. Средние стационарные значения эффективного квантового выхода флуоресценции Φ_{PSII} для различных образцов.

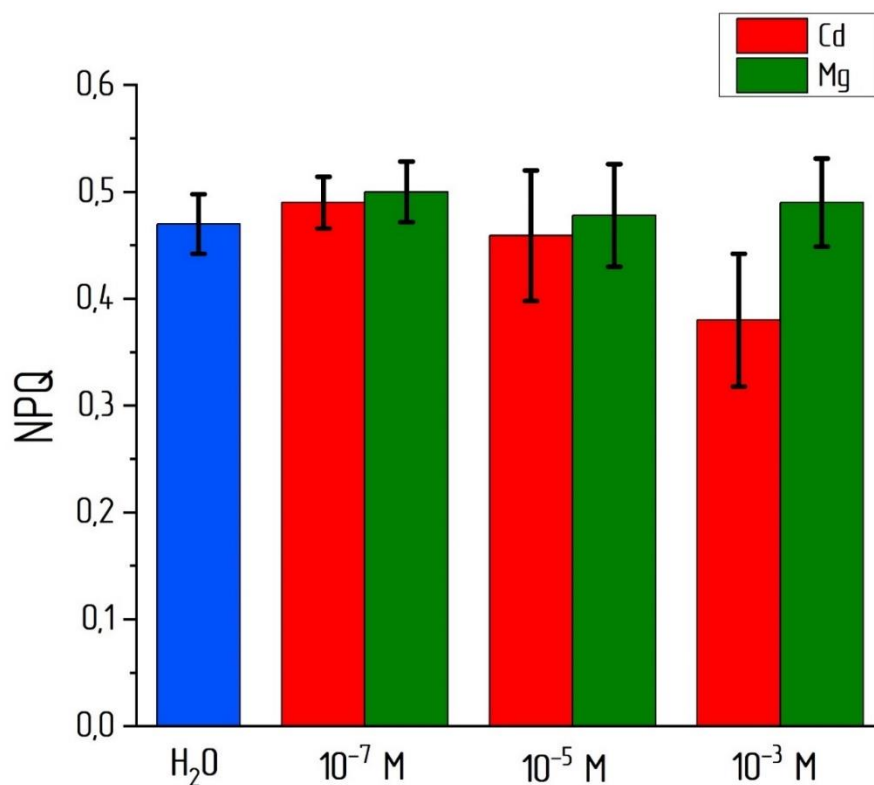


Рис. 11. Средние стационарные значения коэффициента нефотохимического тушения NPQ для различных образцов.

3.2. Исследование состояние фотосинтетического аппарата листьев бобов при деэтиоляции

3.2.1. Изменения флуоресцентных показателей листьев бобов после акклимации растений к условиям высокой освещённости

Развитие растений в различных условиях освещённости также происходит по-разному: образцы, испытывающие нехватку света, имеют вытянутые стебли и листья бледно-зелёной окраски, а растения получающие достаточно света, имеют хорошо развитые листья, сбалансированный рост, насыщенную зелёную окраску. Соответствующим образом выглядели образцы из двух экспериментальных групп в первый день проведения измерений. По мере пребывания образцов, предварительно выращиваемых в темноте, в условиях высокой освещённости происходило постепенное развитие листьев: они разворачивались, их площадь увеличивалась, окраска становилась ярче.

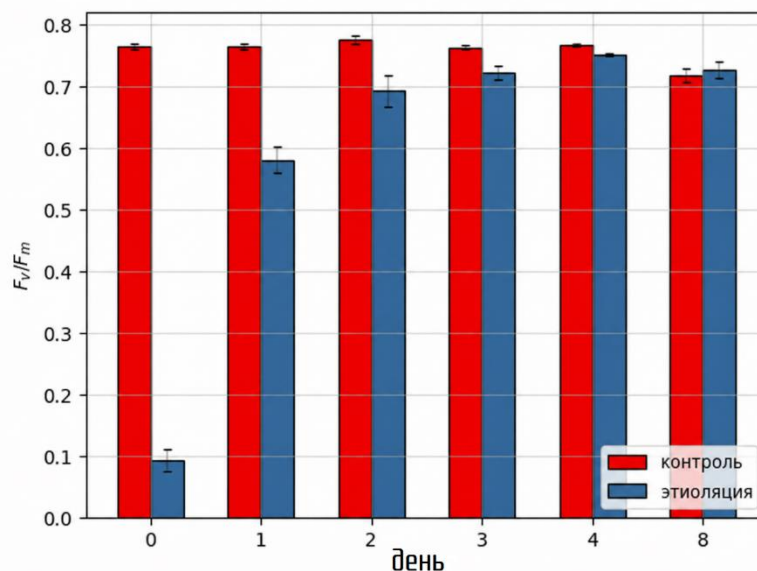


Рисунок 12. Среднее значение показателя $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ в зависимости от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль – растения, выращенные в условиях естественного освещения).

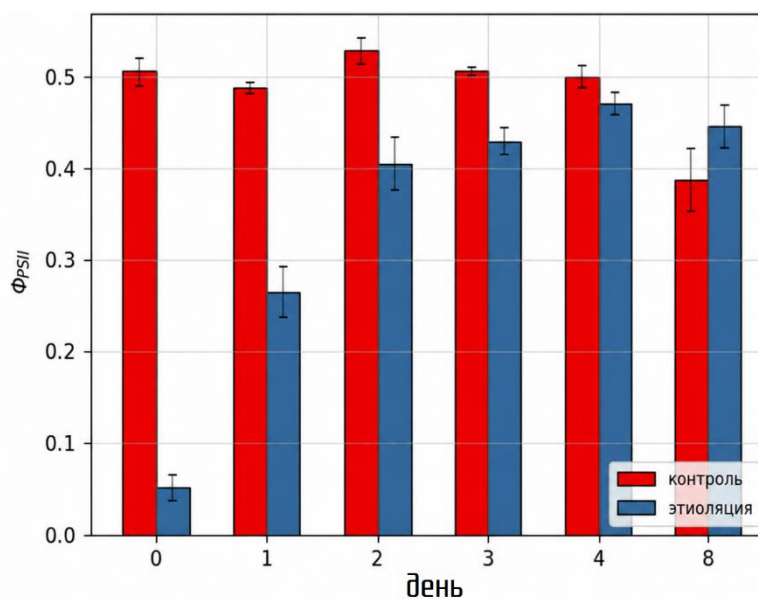


Рисунок 13. Стационарное значение показателя $\Phi_{PSII} = (F_m' - F)/F_m'$ от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль – растения, выращенные в условиях естественного освещения).

В каждый из дней измерения проводились на трёх образцах из каждой группы, с последующим усреднением полученных показателей и

определением погрешностей измерений. После перемещения образцов опытной группы в условия повышенной освещённости значения показателя F_v/F_m постепенно увеличиваются (рис. 12), что отражает рост максимального квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы 2, то есть эффективности использования ею света. Аналогичное изменение наблюдается и у стационарных значений коэффициента Φ_{PSII} : у образцов опытной группы они монотонно возрастают, в то время как образцы контрольной группы демонстрируют практически неизменное значение коэффициента Φ_{PSII} (рис. 13). Данный показатель характеризует эффективный квантовый выход ФС2, поэтому наблюдаемые изменения свидетельствуют о повышении фотосинтетической активности опытных образцов в целом.

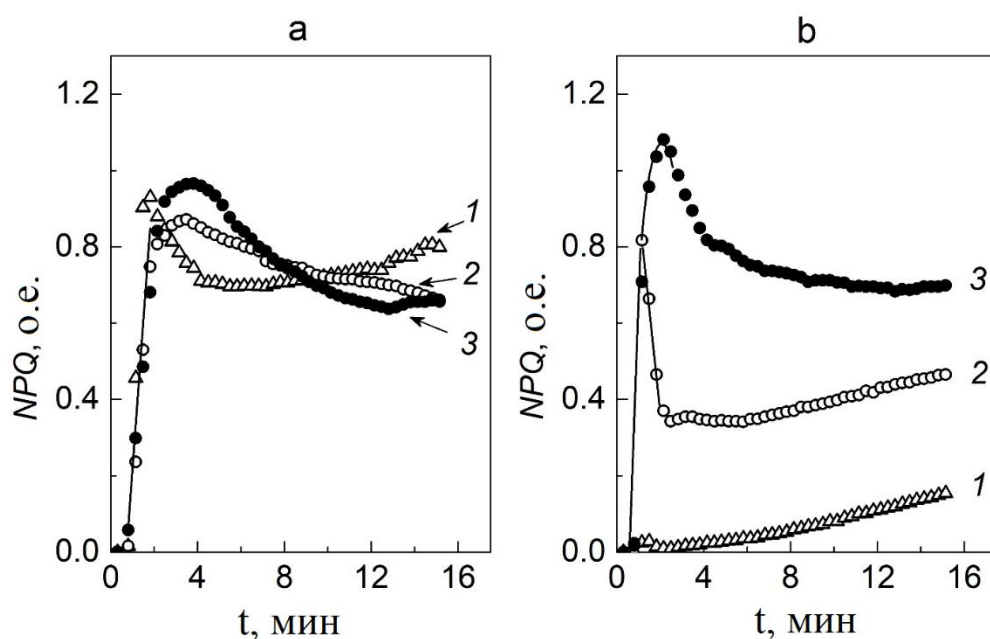


Рисунок 14. Характерные кинетики изменений коэффициента NPQ листьев бобов, выращенных при естественной освещенности (а) и в затенении (б). Кривые зарегистрированы: сразу после перемещения этиолированных образцов в условия естественного освещения (1), 1 сутки спустя (2), 4 суток спустя (3).

Кривые кинетики изменений коэффициента нефотохимического тушения NPQ у деэтиолированных образцов имели аномальный характер до 4 дня измерений: это выражается в пониженном значении данного коэффициента и долгом (более 15 минут) достижении стационарного уровня (рис. 14). Данные изменения свидетельствуют о недостаточно развитом фотосинтетическом аппарате. К 4 дню измерений стационарные значения NPQ становятся равными у двух групп образцов, что отражает постепенное увеличение фотосинтетической активности образцов и формирование регуляторных механизмов, обеспечивающих оптимизацию фотосинтетических процессов. Немонотонный характер данных кривых (характерный пик на второй минуте измерений) может быть вызван формированием ΔpH на мембране тилакоидов в начале освещения и последующим уменьшением ΔpH за счет прогрессирующего синтеза АТФ.

3.2.2. Концентрация хлорофилла в листьях растений, выращенных в условиях низкой освещённости

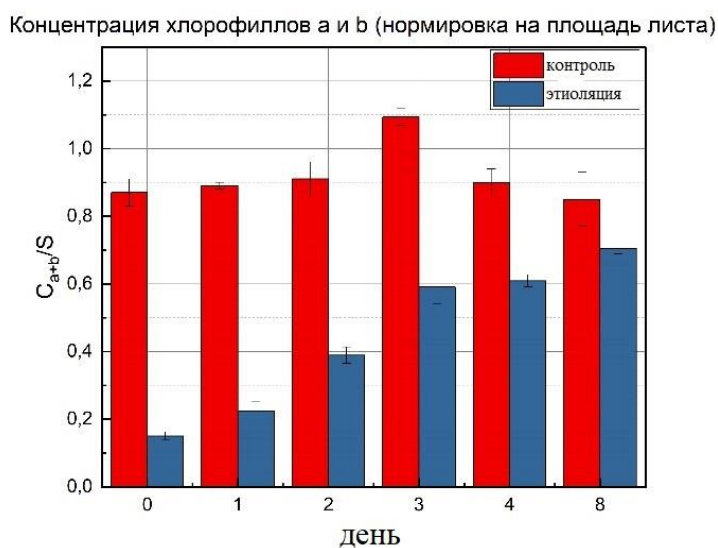


Рисунок 15. Зависимость содержания хлорофилла (mg на 1 см² листовой пластинки) от времени, прошедшего с начала освещения этиолированных листьев (контроль – растения, выращенные в условиях естественного освещения).

Измерения концентрации хлорофилла в листьях образцов подтверждают гипотезу об увеличении содержания пигментов по мере адаптации образцов

из второй группы к условиям высокой освещённости. Результаты эксперимента представлены на рисунке 15. Содержание хлорофилла на площадь листовой пластинки постепенно увеличивалось в процессе эксперимента и к 8 дню измерений разница между значениями концентрации для образцов из двух групп сокращается почти в 5 раз, что видно и по выравниванию окраски листьев.

3.2.3. Фотоиндуцированные изменения редокс-состояния реакционного центра фотосистемы 1

На рисунке 16 представлены типичные кривые светоиндуцированных изменений поглощения света реакционным центром фотосистемы 1 у контрольного (а) и этиолированного (b) образца. У этиолированных листьев наблюдается пониженный сигнал $\Delta A_{870-830}$, связанный с окислением реакционных центров $P700^+$ в ответ на включение красного и дальнего красного света. Эти изменения связаны с неокончательным формированием ФС1 в листьях этиолированных растений.

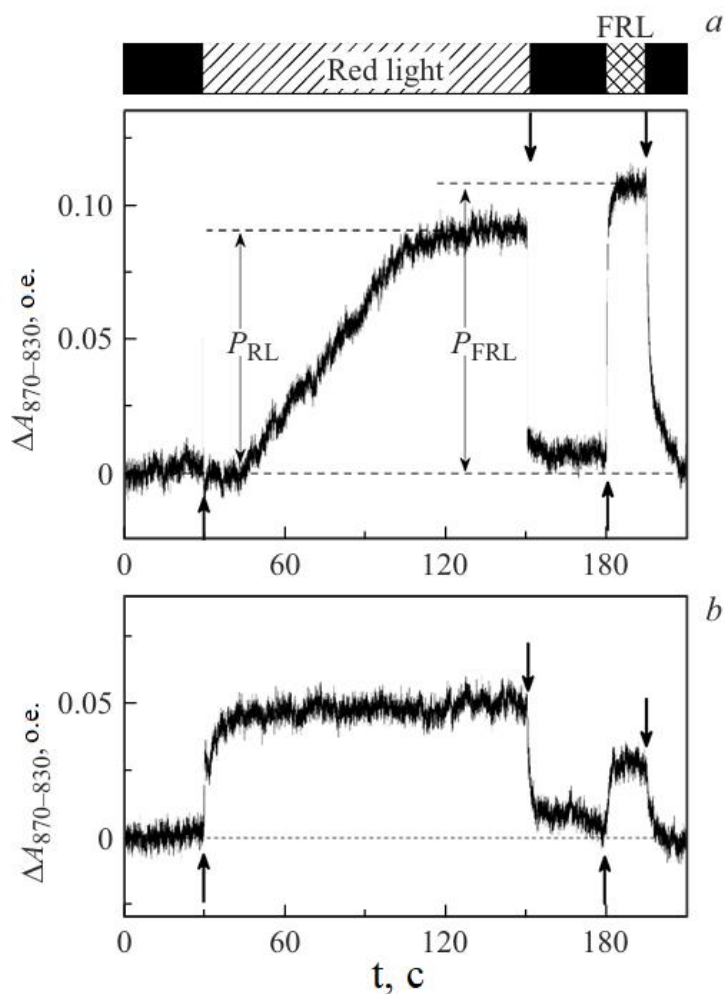


Рисунок 16. Типичные кривые светоиндуцированных изменений величины поглощения света, измеряемого при 870 и 830 нм (сигнал $\Delta A_{870-830}$) в контрольном образце (a) и этиолированном листе (b).

3.3. Влияние температурного и светового стресса на проростки бобов

3.3.1. Флуоресцентные показатели листьев бобов в условиях температурного и светового стресса

Были измерены флуоресцентные показатели листьев растений в различных условиях выращивания: при температурах 15, 25 и 30°C и освещении 100 и 1000 мкЭ м⁻²с⁻¹. Для изучения состояния растений измеряли следующие параметры: F_v/F_m , Φ_{PSII} , NPQ , F_o .

В работе [8] было показано, что при измерениях параметра F_o в диапазоне температур до 40°C (именно эта температурная область исследуется в данной

работе) не наблюдается серьёзное его изменение, что подтверждается данными, полученными в результате эксперимента, проведённого в рамках настоящей работы: значения F_o в условиях одинаковой освещённости при разных температурных режимах имели небольшие различия, что может объясняться незначительной разницей в общем содержании хлорофилла в листьях (рис. 17).

F_o – это интенсивность флуоресценции в момент, когда все реакционные центры открыты. При выращивании растений в условиях нормальной интенсивности света ($1000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) формируется больше фотосистем и, соответственно, больше реакционных центров, поэтому больше энергии может использоваться в фотохимических процессах, а значение флуоресценции наблюдается более низкое.

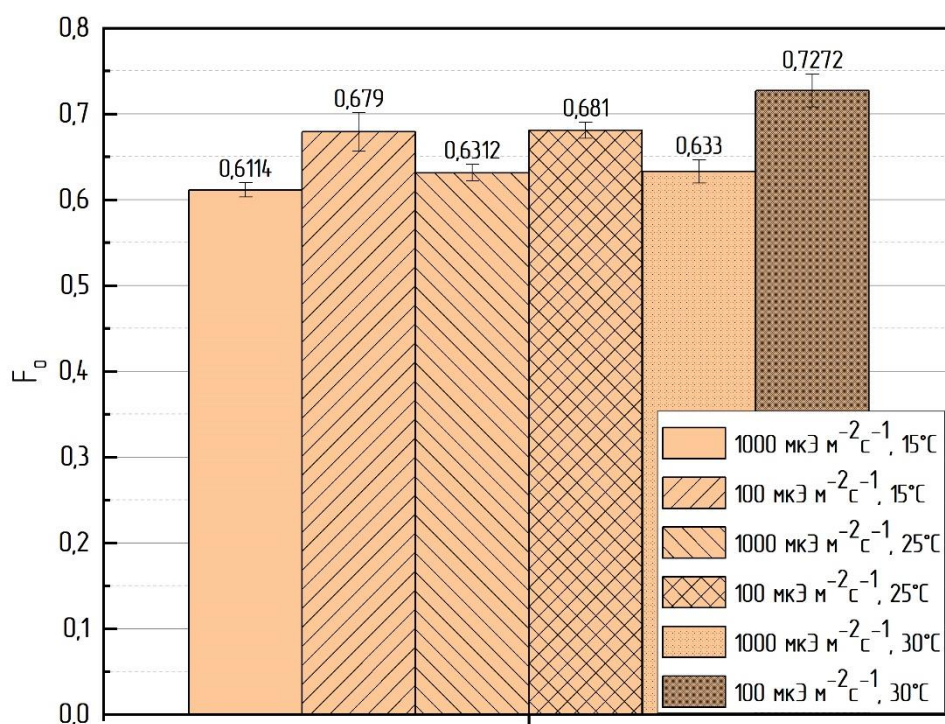


Рис. 17. Усреднённые значения начального значения флуоресценции в листьях бобов, выращенных в условиях температурного и светового стресса (усреднение по 5 образцам).

Эффективный квантовый выход фотосистемы 2 постепенно снижается с ростом температуры, при этом растения демонстрируют более высокие значения при интенсивном свете, чем при низкой освещённости. Это связано с тем, что растения, акклимизированные к высокой освещённости, способны использовать большее количество световой энергии в фотохимических процессах. Для образцов, выращенных при 15°C было отмечено увеличение показателя Φ_{PSII} на 10-25% по сравнению с образцами, выращенными при 25, 30°C (сравнение было проведено для одинаковых интенсивностей света при выращивании). Такое увеличение может быть объяснено тем, что вид *Vicia faba* L. относится к холодостойким культурам и способен развиваться при минимальных положительных температурах. При этом высокие температуры, с одной стороны, могут повреждать фотосинтетический аппарат тепловым воздействием, а с другой - способствуют понижению влажности почвы и воздуха. Влияние такого фактора как влажность воздуха и почвы было невозможно отделить от теплового воздействия в условиях нашего эксперимента.

У растений, выращенных при высокой интенсивности света наблюдаются меньшие значения NPQ . Это связано с тем, что образцы адаптируются к высокой интенсивности света ($1000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), и их реакция на действующий свет ($500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) не такая сильная, как у образцов, выращенных в условиях низкой освещённости ($100 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$). Совместный анализ данных, приведенных на рисунках 18-19, позволяет предположить более низкое значение градиента ΔpH на мембране тилакоидов у растений, акклимизированных к высокой интенсивности света, так как снижение ΔpH на мембранах приводит к увеличению скорости нециклического транспорта электронов и поддержанию высокой степени окисления пула пластохинонов.

Из литературы известно, что F_v/F_m – самый стабильный параметр, который изменяется только в случае резкого ухудшения физиологического

состояния растения [38], что подтверждается экспериментальными данными (рис. 20).

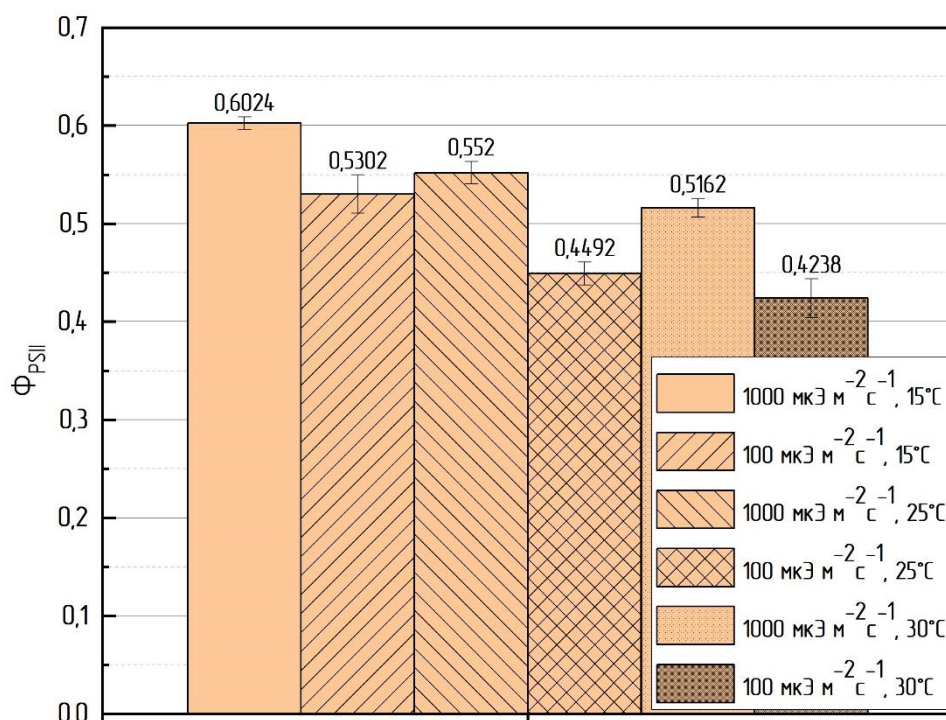


Рисунок 18. Усреднённые стационарные значения эффективного квантового выхода фотосистемы 2 Φ_{PSII} . (усреднение по 5 образцам)

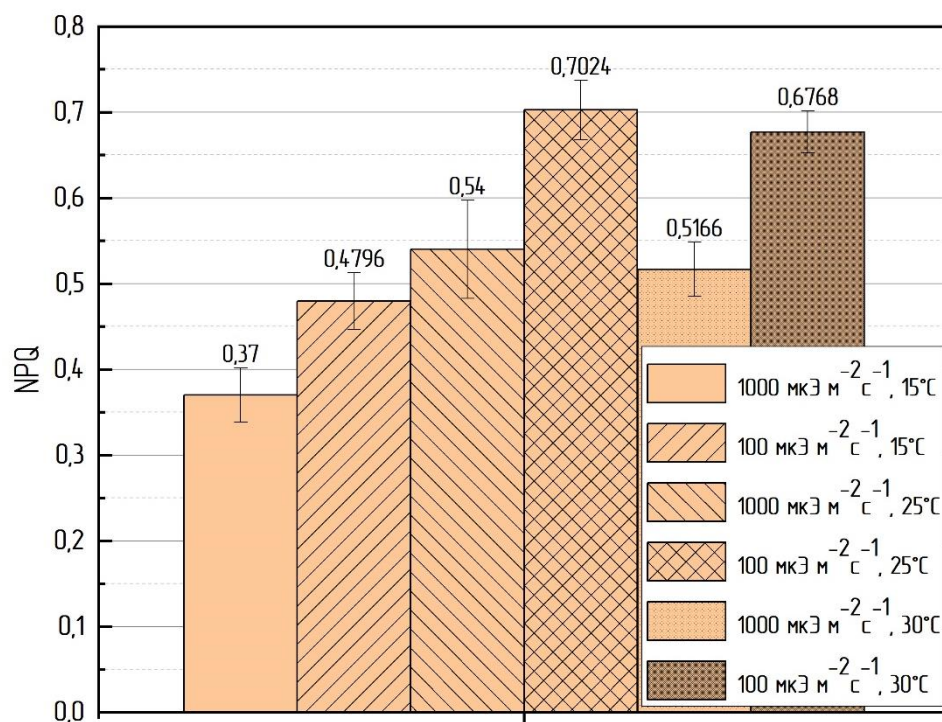


Рис. 19. Усреднённые значения коэффициента нефотохимического тушения NPQ в листьях бобов, выращенных в условиях температурного и светового стресса (усреднение по 5 образцам).

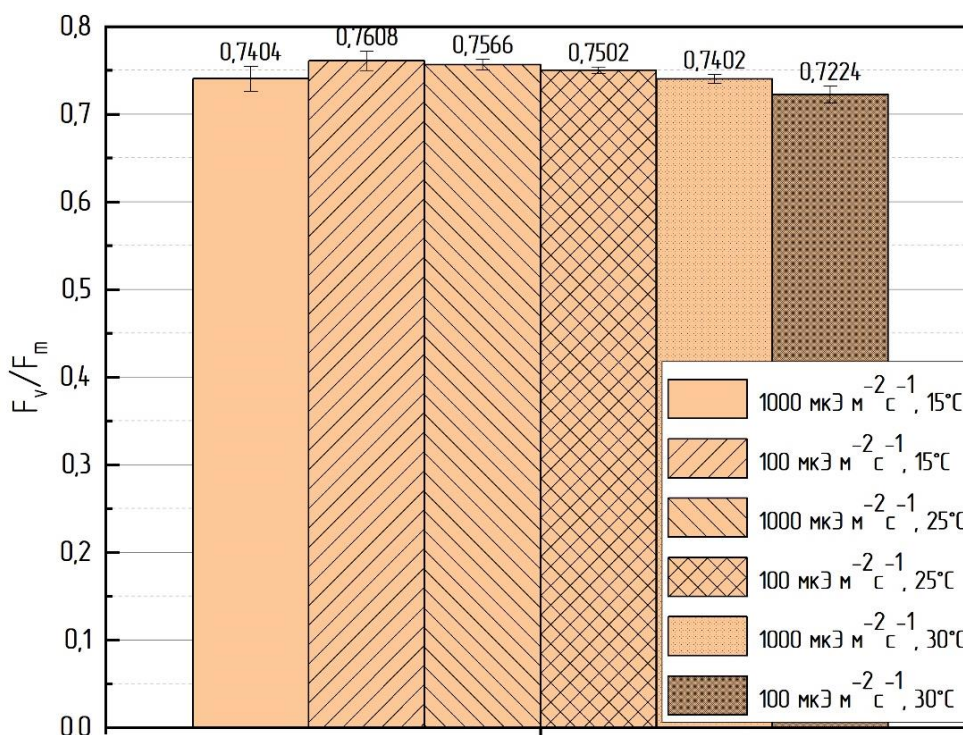


Рис. 20. Усреднённые максимального квантового выхода ФС2 F_v/F_m в листьях бобов, выращенных в условиях температурного и светового стресса (усреднение по 5 образцам).

На рисунке 21 приведены усреднённые кинетики изменений нефотохимического тушения NPQ . Можно отметить, что у образцов, выращенных на сильном освещении, нефотохимическое тушение достигает пиковых значений быстрее, эти значения оказываются меньше и снижаются до стационарных за меньший промежуток времени. Такие особенности могут быть вызваны комбинацией факторов, среди которых более активная работа и быстрый запуск цикла Кальвина-Бенсона, а также меньший вклад псевдоциклического транспорта электронов в первые минуты освещения после темновой адаптации. Как уже отмечалось выше, все эти факторы приводят к более низкому значению ΔpH после 70 секунд освещения.

Однонаправленных изменений в кинетиках нефотохимического тушения при снижении температуры выявлено не было.

Кинетики изменений показателя Φ_{PSII} с ростом температуры демонстрируют однонаправленные изменения, отмеченные ранее на рисунке 18, которые характеризуются снижением стационарных значений (рис. 22). Увеличение интенсивности света при выращивании приводит к росту скорости достижения стационарных значений Φ_{PSII} и увеличению самих стационарных значений. Таким образом, можно утверждать, что при воздействии актиничного света ($500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), интенсивность которого больше интенсивности света при выращивании ($100 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), степень окисленности пула пластохинонов растёт медленнее и эффективность первичных фотосинтетических реакций оказывается меньше в сравнении с ситуацией, когда интенсивность освещенности при выращивании ($1000 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$) превышает актиничный свет ($500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$).

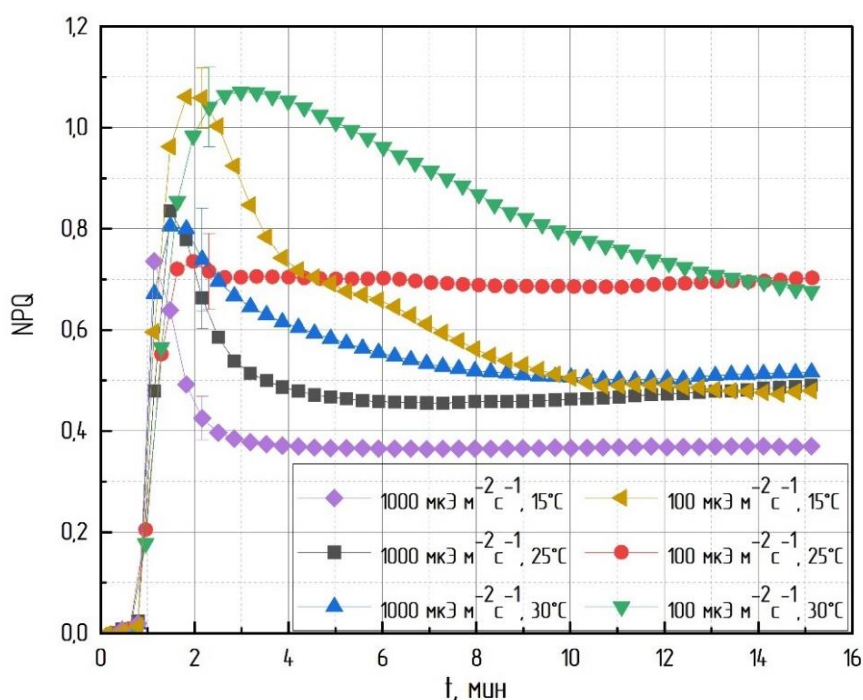


Рис. 21. Усреднённые кинетики изменения показателя нефотохимического тушения NPQ.

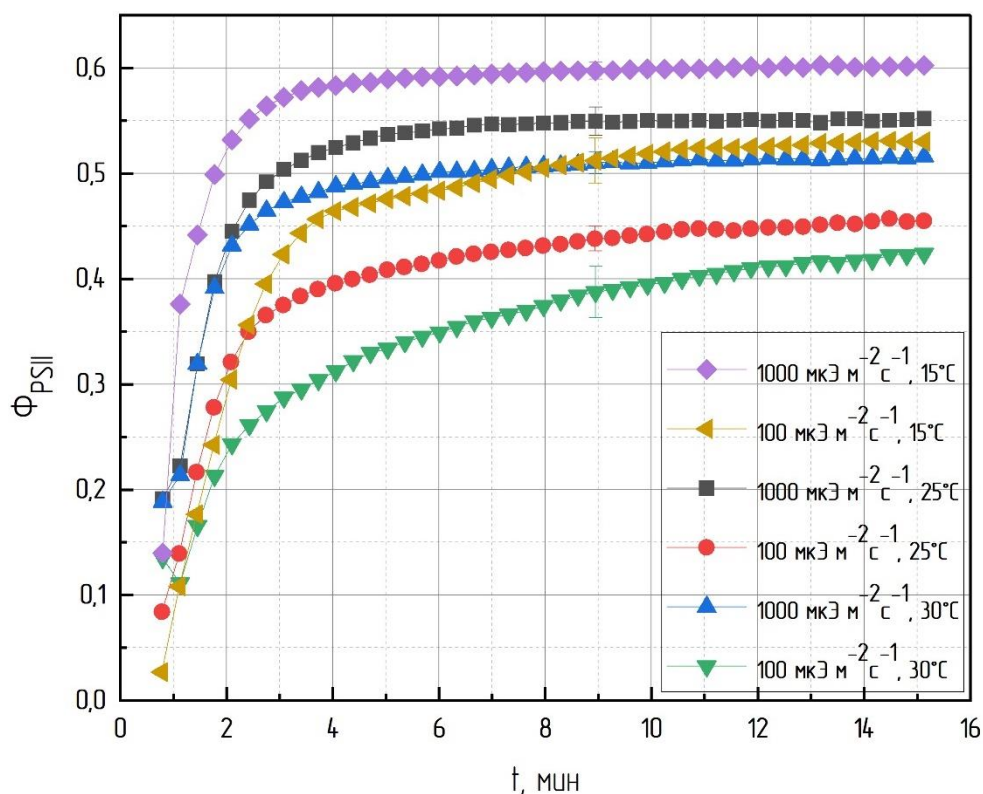


Рис. 22. Усреднённые кинетики изменения эффективного квантового выхода фотосистемы 2 Φ_{PSII} .

3.3.2. Фотоиндуцированные изменения редокс-состояния реакционного центра фотосистемы 1 в условиях температурного и светового стресса

У растений, выращенных в условиях слабого освещения, наблюдается более медленное достижение стационарного значения показателя $\Delta A_{870-830}$, вероятнее всего этот эффект связан с менее активной работой цикла Кальвина-Бенсона в образцах, акклимизированных к низкой освещенности.

Разница показателей при включении красного и дальнего красного света заметнее у растений, выращенных при сильном освещении. Можно привести три гипотезы, объясняющее такое различие:

1. ФС2 у растений, акклимизированных к яркому свету, работает активнее по сравнению с растениями, выращенными в затенении;
2. Циклический транспорт имеет большую скорость у растений, выращенных в условиях высокой освещённости.

3. У растений, выращенных на слабом свете, увеличивается количество периферических комплексов светособирающих антенн ФС2.

В пользу первой гипотезы свидетельствует более высокие значения эффективного квантового выхода ФС2 (рис. 18, 22). Однако, для точного выяснения причины таких изменений необходимо привлечение других методов исследования, таких как регистрация быстрой индукции флуоресценции

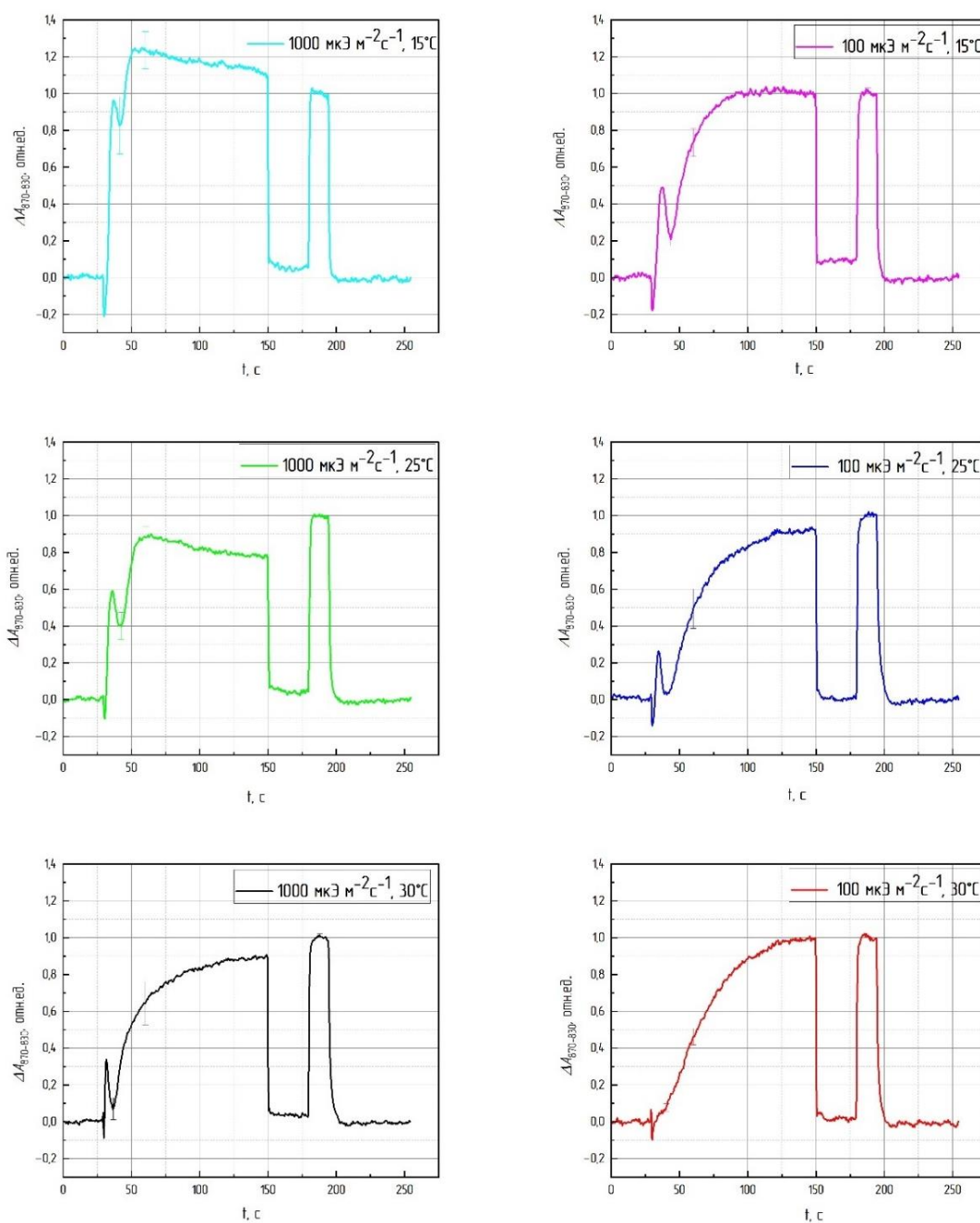


Рис. 23. Усреднённые кинетики изменения показателя $\Delta A_{870-830}$.

Основные результаты и выводы

1. Эксперимент с солями тяжёлых металлов

- а) Снижение эффективного квантового выхода Φ_{PSII} и коэффициента нефотохимического тушения NPQ при высоких концентрациях CdCl_2 отражает подавление фотосинтетической активности растения и механизмов нефотохимического тушения.
- б) Измеренные физиологические показатели демонстрируют негативное влияние солей кадмия в растворе гидропоники на развитие растения.

2. Эксперимент с деэтиоляцией

- а) Этиолированные растения проявляют признаки незрелости фотосинтетического аппарата и механизмов нефотохимического тушения, недостаточного содержания хлорофилла. В процессе деэтиоляции наблюдается выравнивание показателей NPQ , Φ_{PSII} , F_v/F_m , увеличение концентрации хлорофилла, что отражает постепенное улучшение состояния фотосинтетического аппарата образцов, формирование регуляторных механизмов.
- б) Для растений из контрольной группы значения параметров флуоресценции NPQ , Φ_{PSII} , F_v/F_m остаются практически неизменными на протяжении эксперимента по адаптации этиолированных протокков к свету высокой интенсивности

3. Эксперименты с температурным и световым стрессом показали:

- а) Показатель F_v/F_m является стабильным по отношению к стрессовым факторам в сравнении с остальными флуоресцентными показателями, что подтверждается литературными данными.
- б) Для образцов, выращенных при большей освещённости, показатель Φ_{PSII} быстрее достигал стационарных значений, и эти значения оказывались выше. Стационарные значения NPQ наоборот снижались. Из этого следует, что степень окисленности пула

пластохинонов поддерживается выше, а цикл Кальвина-Бенсона работает активнее в случае акклимации растений к высокой интенсивности света.

в) В условиях слабого освещения при выращивании наблюдается более медленное достижение стационарного значения показателя $\Delta A_{870-830}$, вероятнее всего, этот эффект связан с менее активной работой цикла Кальвина-Бенсона в образцах, акклимированных к низкой освещённости.

Заключение

Растения, подверженные различным видам абиотического стресса, демонстрируют нарушения функционирования фотосинтетического аппарата, снижение содержания пигментов, участвующих в фотохимических процессах, и другие проявления воздействия негативного влияния внешних факторов, что можно выявить при помощи современных методов изучения фотосинтетического аппарата, включая анализ флуоресцентных показателей фотосистемы 2 и исследование редокс-превращений реакционного центра P700 фотосистемы 1. Изменение этих параметров отражает степень повреждения фотосистем и активацию регуляторных механизмов, направленных на поддержание энергетического баланса растительной клетки.

Полученные результаты отражают, что фотосинтетический аппарат является одной из ключевых мишеней абиотических стрессовых факторов. Нарушение баланса между фотохимическими реакциями и нефотохимическими процессами приводит к повреждению фотосинтетического аппарата растений, которые отражаются на биофизических показателях листьев, описанных в настоящей работе.

Изучение влияния абиотических факторов на фотосинтетический аппарат имеет важное значение не только для фундаментальной биофизики и биохимии растений, но и для решения прикладных задач. В условиях глобального изменения климата, сопровождающегося нарушением привычного температурного режима, засухами и другими экстремальными абиотическими факторами, устойчивость растений к стрессам становится залогом стабильности экосистем и сельскохозяйственного производства. Нарушение фотосинтетических процессов под воздействием стрессов может приводить к снижению урожайности растений и, как следствие, к угрозам продовольственной безопасности.

Таким образом, исследование механизмов адаптации фотосинтетического аппарата к абиотическим стрессам являются важным

направлением современной науки, способствующим разработке подходов к повышению устойчивости растений и сохранению биологического разнообразия в условиях меняющейся окружающей среды.

Хотелось бы выразить благодарность профессору кафедры биофизики Тихонову Александру Николаевичу за предоставленную возможность проведения измерений на импульсном флуориметре P700 фирмы Walz, Dual-Ram-100 и многочисленные консультации, доценту кафедры общей физики Пацаевой Светлане Викторовне за возможность работать со спектрофотометром Solar PB2201, Российскому фонду «Вольное Дело» за материально-техническую (приборную) поддержку, ведущему инженеру кафедры общей физики Сусличенко Игорю Сергеевичу за помощь в проведении измерений, заведующему кафедрой общей физики Салецкому Александру Михайловичу, а также своему научному руководителю Калмацкой Олеся Алексеевне за профессиональное руководство и помощь на всех этапах подготовки дипломной работы.

Список литературы

1. Хелдт Г.-В. Биохимия растений. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 472 с
2. Калмацкая О.А. Флуоресцентные показатели листьев растений: влияние условий освещения и обработки физиологически активными веществами. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 2017. – 97 с.
3. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 4. – С. 24–32.
4. Полякова И.Б. Медленная индукция флуоресценции листьев растений при разной фотосинтетической активности. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 2002. – 146 с.
5. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С. 8–15.
6. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла – К.: Альтерпресс, 2002. – 188 с
7. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // Journal of Experimental Botany. – 2000. – Vol. 51, № 345. – P. 659–668.
8. Willits D.H., Peet M.M. Measurement of chlorophyll fluorescence as a heat stress indicator in tomato: laboratory and greenhouse comparisons // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2001. – Vol. 126, № 2. – P. 188–194.
9. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview // Chlorophyll a Fluorescence: Advances in Photosynthesis and Respiration / eds. G. C. Papageorgiou, Govindjee. – Dordrecht : Springer, 2004. – Vol. 19. – P. 279–319.
10. Zhou R., Hyldgaard B., Yu X. et al. Phenotyping of faba beans (*Vicia faba* L.) under cold and heat stresses using chlorophyll fluorescence. // Euphytica. – 2018. – Vol. 214, № 4. – Art. 68.

11. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review *Environmental Chemistry Letters*. – 2010. – Vol. 8, № 3. – P. 199–216.
12. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – № 5. – С. 23–29.
13. Стрижаков Л.А., Фомин В.В., Гарипова Р.В. и др. Хроническая болезнь почек в контексте токсического воздействия производственных химических факторов (обзор литературы) // *Терапевтический архив*. – 2019. – Т. 91, № 6. – С. 110–115.
14. Караваев В.А., Баулин А.М., Гордиенко Т.В. и др. Изменения фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания. *Физиология растений* // *Физиология растений*. — 2001. — Т. 48, № 1. — С. 47–54.
15. Farhat N., Elkhouni A., Zorrig W. et al. Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2016. – Vol. 38, № 6. – Art. 145.
16. Wada M., Kong S.-G. Analysis of chloroplast movement and relocation in *Arabidopsis* // *Chloroplast research in Arabidopsis : methods and protocols, Volume 1* / ed. R. P. Jarvis. – New York : Humana Press, 2011. – (Methods in Molecular Biology ; Vol. 774). – P. 87–102.
17. Bhandari S. R., Kim Y.H., Lee J.G. Detection of temperature stress using chlorophyll fluorescence parameters and stress-related chlorophyll and proline content in paprika (*Capsicum annuum* L.) seedlings // *Horticultural Science and Technology*. – 2018. – Vol. 36, № 5. – P. 619–629.
18. Ellis R.H., Roberts E.H., Summerfield R.J. Variation in the optimum temperature for rates of seedling emergence and progress towards flowering amongst six genotypes of faba bean (*Vicia faba*) // *Annals of Botany*. – 1988. – Vol. 62, № 2. – P. 119–126.

19. Norouzi H.A., Vazin F. Modelling of the faba bean (*Vicia faba* L.) sprouting reaction to temperature in farm condition // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 179–185.
20. Khamassi K., Harbaoui K., Teixeira da Silva J.A., Ben Jeddi F. Optimal germination temperature assessed by indices and models in field bean (*Vicia faba* L. var. *minor*) // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. – 2013. – Vol. 78, № 2. – P. 131–136.
21. Avola G., Cavallaro V., Patanè C., Riggi E. Gas exchange and photosynthetic water use efficiency in response to light, CO₂ concentration and temperature in *Vicia faba* // *Journal of Plant Physiology*. – 2008. – Vol. 165, № 8. – P. 796–804.
22. Manning B. K., Trethowan R., Adhikari K. N. Impact of Temperature on Podding in Faba Bean (*Vicia faba*) // *Agronomy*. – 2024. – Vol. 14, № 10. – Art. 2309.
23. Hasanuzzaman M., Nahar, K., Alam M.M., Roychowdhary, R. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14, № 5. – P. 9643–9684.
24. Aazami M.A., Asghari-Aruq M., Hassanpouraghdam M.B., Ercisli S., Baron M., Sochor J. Low temperature stress mediates the antioxidants pool and chlorophyll fluorescence in *Vitis vinifera* L. cultivars // *Plants*. – 2021. – Vol. 10, № 9. – Art. 1877.
25. Noreen Z., Hafeez M. B., Ghaffar A., Kausar A., Al Zeidi M., Siddique K. H. M., Farooq M. Plant photosynthesis under heat stress: Effects and management // *Environmental and Experimental Botany*. – 2023. – Vol. 206. – Art. 105178.

26. Mathur S., Agrawal D., Jajoo A. Photosynthesis: Response to high temperature stress // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2014. – Vol. 137. – P. 116–126.
27. Ogwen J.O., Song X.-S., Hu W. H., Shi K., Zhou Y., Yu J. Detached leaves of tomato differ in their photosynthetic physiological response to moderate high and low temperature stress // Scientia Horticulturae. – 2009. – Vol. 123, № 1. – P. 17–22.
28. Маринин Н.А., Сусличенко И.С., Тихонов А.Н. Регуляция электронного транспорта в хлоропластах: индукционные процессы в листьях растений рода *Cucumis* // Биофизика. – 2025. – Т. 70, № 1. – С. 59–71.
29. Калмацкая О.А., Михалькова А.В., Сусличенко И.С., Караваев В.А., Тихонов А. Н. Изменения оптических свойств листьев бобов при формировании их фотосинтетического аппарата // Оптика и спектроскопия. – 2025. – Т. 133, № 5. – С. 505–510.
30. Kouřil R., Wientjes E., Bultema J. B., Croce R., Boekema E. J. High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. – 2013. – Vol. 1827, № 3. – P. 411–419.
31. Вершубский А.В., Приклонский В.И., Тихонов А.Н. Кислородный фотосинтез: индукция флуоресценции хлорофилла *a* и регуляция электронного транспорта в тилакоидных мембранах in silico // Биологические мембраны. – 2025. – Т. 42, № 1. – С. 3–19.
32. Сусличенко И.С., Трубицин Б.В., Тихонов А.Н. Регуляция электронного транспорта в хлоропластах: индукционные процессы в листьях традесканции // Биофизика. – 2025. – Т. 70, № 2. – С. 265–277.
33. Tikhonov A.N. Electron Transport in Chloroplasts: Regulation and Alternative Pathways of Electron Transfer // Biochemistry (Moscow). – 2023. – Vol. 88, № 10. – P. 1438–1454.

- 34.Вершубский А.В., Тихонов А.Н. Оптимизация оксигенного фотосинтеза: рН-регуляция электронного транспорта в хлоропластах in silico // Биомембраны. – 2025. – Т. 42, № 3. – С. 167–184.
- 35.Strand D.D., Fisher N., Kramer D.M. Distinct energetics and regulatory functions of the two major cyclic electron flow pathways in chloroplasts // Chloroplasts: Current Research and Future Trends / ed. H. Kirchhoff. – Norfolk, UK : Caister Academic Press, 2016. – P. 89–100.
36. Kochetova G.V., Avercheva O.V., Bassarskaya E.M., Zhigalova T.V. Light quality as a driver of photosynthetic apparatus development // Biophysical Reviews. – 2022. – Vol. 14, № 4. – P. 779–803.
37. Suslichenko I.S., Trubitsin B.V., Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. The noninvasive monitoring of the redox status of photosynthetic electron transport chains in Hibiscus rosa-sinensis and Tradescantia leaves // Plant Physiology and Biochemistry. – 2022. – Vol. 185. – P. 233–243.
38. Jiao Q., Hu X. Recent advances and emerging trends in chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m // Phyton-International Journal of Experimental Botany. – 2025. – Vol. 94, № 9. – P. 2615–2630.