

Photosynthèse/Photosynthesis
(Biophysique/Biophysics)

Photosystem II assembly in 2-day-old bean leaves during the first 16 hrs. of greening

Benoît SCHOEFS and Fabrice FRANCK

Abstract — We have studied the assembly of the photosynthetic apparatus during the greening of 2-day-old bean leaves in continuous white light by using fluorimetric methods. We have recorded 77 and 298 K fluorescence kinetics at 690 nm in order to detect electron flow through the photosystem II reaction centre (RC_{II}) at increasing greening periods. In those experiments, the 77 K fluorescence spectra were also considered. Charge separation is detected 1 hr. after the onset of the illumination. Room temperature fluorescence variation showing the « O-I-P » phases are detected after 4 hrs. of illumination. Typical fluorescence bands at 688, 697 and 735 nm appear after 14 hrs. of illumination.

Assemblage du photosystème II dans des feuilles de haricot âgées de 2 jours au cours des 16 premières heures du verdissement

Résumé — L'assemblage de l'appareil photosynthétique a été étudié dans des feuilles de haricot âgées de 2 jours par des méthodes fluorimétriques au cours des 16 premières heures de verdissement en lumière continue. Pour des durées de verdissement croissantes, nous avons enregistré les cinétiques de fluorescence à 690 nm à température ordinaire et dans l'azote liquide afin de détecter le flux d'électrons dans le centre réactionnel du photosystème II (RC_{II}). Nous avons également enregistré les spectres de fluorescence à 77 K au cours de la même période. Les cinétiques de fluorescence à 77 K montrent que la séparation de charge dans le RC_{II} peut être induite après 1 h d'illumination. Des variations de fluorescence à 293 K montrant les phases dénommées « O-I-P » sont détectées dès la fin de la 4^e heure du verdissement. Les spectres de fluorescence à 77 K montrent les bandes typiques centrées à 688, 697 et 735 nm après 14 h d'illumination.

Version française abrégée — INTRODUCTION. — De nombreuses études ont été réalisées sur le verdissement des angiospermes ([1]-[2]). Cependant, la majorité de ces études a été réalisée sur des plantes ayant poussé à l'obscurité durant plusieurs jours (de 1 à 3 semaines). Les plantes étiolées contiennent des plastes différenciés en étioplastes, caractérisés par la présence d'un corps prolamellaire [3]. Lorsqu'elles sont éclairées, le corps prolamellaire disparaît et la différenciation en chloroplaste a lieu [4]. Dans des conditions naturelles, les plantes perçoivent la lumière à un stade bien plus précoce de leur développement [5] et le passage par le stade étioplaste n'a pas lieu, le chloroplaste se formant directement à partir du stade proplaste [3]. Les observations décrites ici sont les premières montrant le développement de l'appareil photosynthétique dans les feuilles primordiales très jeunes. Les haricots de 2 jours utilisés pour cette étude contiennent au départ des proplastides [3]. Les feuilles sont encore enfermées dans la graine et ne reçoivent la lumière que par l'intermédiaire de la radicule qui en émerge ([5], [6]).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les graines de haricot (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Commodore) ont été mises à germer pendant 2 jours à l'obscurité puis éclairées sous tubes fluorescents à une intensité de 120 W. Les appareils utilisés et les conditions de culture du haricot sont décrits en détail dans [4], [5] et [7]. Les résultats des expériences reportés ici ont nécessité plus de 1 000 feuilles dont la surface n'excède pas 10-15 mm². Les spectres de fluorescence à 77 K et les cinétiques de fluorescence ont été enregistrés toutes les 15 mn aux cours des 16 premières heures du verdissement.

Note présentée par Alexis MOYSE.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Sur la base des spectres de fluorescence à 77 K, on peut diviser les 16 h d'illumination en trois périodes. La première couvre les 3 premières heures durant lesquelles le maximum d'émission de la fluorescence de la chlorophyllide (Cide) se déplace de 673 vers 683 nm (*fig. 1, b et c*). Ce déplacement résulte probablement de l'intégration de la Cide formée durant les premières minutes de l'illumination dans les précurseurs des protéines antennes (pLHCP). La fluorescence variable à 77 K est détectée après 55 mn d'illumination (*fig. 2, b*), démontrant la séparation de charge dans le centre réactionnel du photosystème II (RC_{II}) [8]. Son amplitude augmente ensuite avec le temps de l'illumination (*fig. 2, b-d*).

La deuxième période, de la 4^e à la 13^e heure du verdissement, est caractérisée par la présence d'une bande de fluorescence unique aux environs de 685 nm (*fig. 1, d*) tandis que la fluorescence variable à 293 K se développe progressivement (*fig. 3*). Celle-ci montre d'emblée les phases « O-I-P » qui traduisent le transfert d'électrons au-delà de Q_A ([13]-[14]). En présence de DCMU, la phase photochimique montre une forme sigmoïde après 9 h, indiquant l'apparition de transferts d'énergie entre les unités PS_{II} (*fig. 4*) [9].

La 3^e période, de la 14^e à la 16^e heure du verdissement, se caractérise par l'apparition dans le spectre de fluorescence à 77 K, d'un épaulement à 697 nm et d'une bande d'émission vers 730 nm (*fig. 1, e*). Ces deux maximums sont caractéristiques du PS_{II} et du PS_I des feuilles vertes [10].

Les résultats présentés ici, bien que semi-quantitatifs montrent que l'ontogenèse de l'appareil photosynthétique se déroule, dans les feuilles très jeunes, à la même vitesse ou à une vitesse légèrement supérieure que dans les feuilles étiolées de pois (Thorne et Boardman, 1971) ou de haricot (Franck et coll., 1984 ; Bertrand et coll., 1988).

INTRODUCTION. — The light-induced greening of angiosperms has been extensively studied in leaves grown in darkness for a long period (etiolated leaves). Only few studies have been performed on very young leaves ([1]-[2]), although they represent the normal stage at which plants are illuminated in nature.

We present here the first observations on the assembly of the photosynthetic apparatus in 2-day-old bean seedlings, which are known to contain proplastids in contrast to older, etiolated leaves containing etioplasts [3]. In the material used here, chloroplast differentiation thus occurs strictly from the proplastid stage. Light reaches the leaves (still hidden between the cotyledons) through the radicle which protrudes from the seedlings ([5]-[6]).

MATERIAL AND METHODS. — Intact seedlings were grown in darkness for 2 days and then illuminated with 120 W fluorescent tubes placed at a 50 cm-distance. Detailed culture conditions are described in [5]. Fluorescence variation at 293 and 77 K were recorded at 690 nm (bandwidth at half-peak: 28 nm) using a 632.8 nm exciting light (5 mW.cm⁻²) as described in [5], [7]. Fluorescence spectra were recorded at 77 K as described in [4] under an excitation light at 436 nm (bandwidth: 46 nm).

RESULTS AND DISCUSSION. — Non-illuminated leaves contain a small amount of photoactive protochlorophyllide (Pide) which results in a 77 K fluorescence band at 657 nm (*Fig. 1, a*), as observed in older, etiolated leaves [11]. When light is turned on, this Pide is rapidly reduced into Cide [12] showing a fluorescence maximum at 673 nm (*Fig. 1, b*). It is well known that in older leaves, the Cide fluorescence maximum shifts

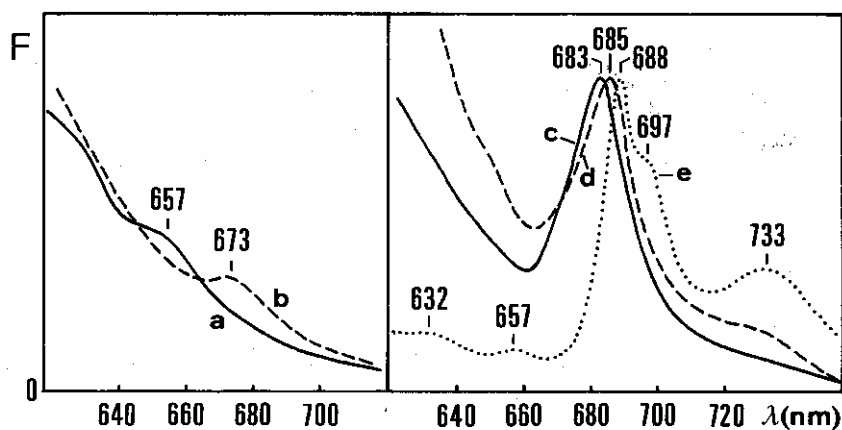
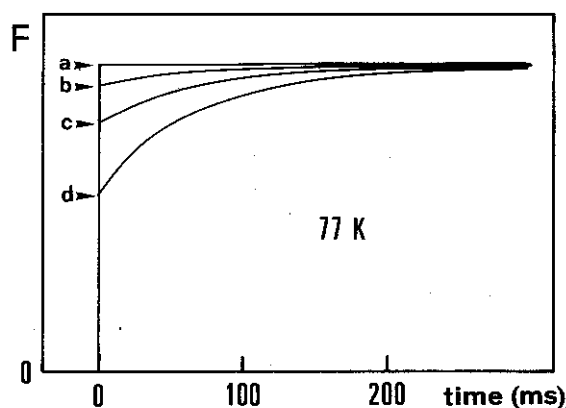


Fig. 1. — 77 K fluorescence emission spectra of 2-day-old leaves before illumination (a) and illuminated for 5 min. (b), 2 hrs. (c), 12 hrs. 45 min. (d) and 16 hrs. (e).

Fig. 1. — Spectres d'émission de la fluorescence à 77 K de feuilles de 2 jours non illuminées (a) et illuminées durant 5 mn (b), 2 h (c), 12 h 45 mn (d) et 16 h (e).

Fig. 2. — 77 K fluorescence kinetics of 2-day-old bean leaves recorded 30 min. (a), 55 min. (b), 1 hr. 55 min. (c) and 10 hrs. (d) after the onset of illumination.

Fig. 2. — Cinétiques de fluorescence à 77 K enregistrées avec des feuilles de 2 jours illuminées durant 30 mn (a), 55 mn (b), 1 h 55 mn (c) et 10 h (d).



from 696 to 683 nm within the first 20-40 min. of illumination [1]. Such a "Shibata shift" is not found in 2-day-old leaves.

After the initial photoreduction step, three periods can be considered on the basis of the 77 K fluorescence spectra recorded every 15 min. during the first 16 hrs. of illumination.

In the 1st period, during the first 3 hrs., the Cide fluorescence shifts from 673 towards 683 nm (Fig. 1, b, c).

In the 2nd period, during the next 10 hrs., the emission bands only show a slight shift from 683 toward 685 nm (Fig. 1, d) and during the 3rd one, after 13 hrs. of illumination, the 695-697 and 733-735 nm bands appear and increase slowly in amplitude while the 685 nm band progressively shifts towards 688 nm (Fig. 1, e).

The sequence of spectral changes reported above coincides with the development of particular functional characteristics which are reflected in the shape of the 298 or 77 K fluorescence kinetics.

During the 1st period, 77 K fluorescence variations become rapidly measurable. This is shown in Figure 2. A slight fluorescence increase is detected already after 55 min., indicating the onset of charge separation capability of PS_{II} (Fig. 2, b) [8]. The amplitude

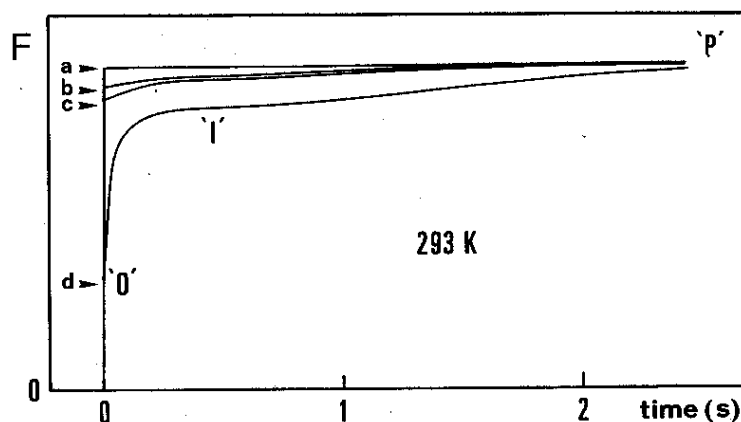


Fig. 3. — 293 K fluorescence kinetics of 2-day-old bean leaves recorded 3 hrs. 15 min. (a), 4 hrs. 20 min. (b), 11 hrs. 45 min. (c) and 16 hrs. (d) after the onset of the illumination.
 Fig. 3. — Cinétiques de fluorescence à 293 K enregistrées avec des feuilles de 2 jours illuminées durant 3 h 15 mn (a), 4 h 20 mn (b), 11 h 45 mn (c) and 16 h (d).

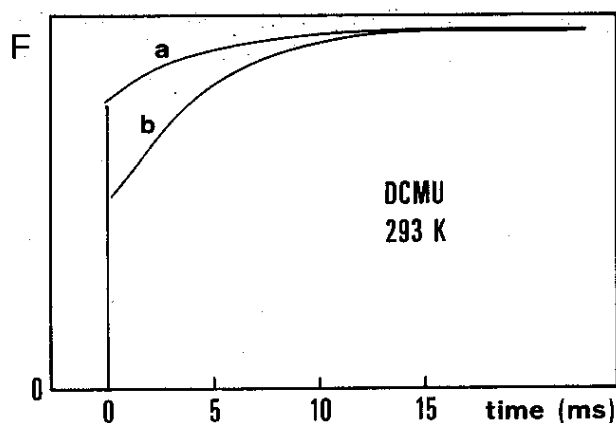


Fig. 4. — 293 K fluorescence kinetics of 2-day-old bean leaves illuminated for 8 hrs. (A) and 10 hrs. (B) and incubated with DCMU for 15 min.
 Fig. 4. — Cinétiques de fluorescence à 293 K de feuilles illuminées durant 8 h (A) et 10 h (B) et incubées avec du DCMU (15 mn) avant l'enregistrement.

of the 77 K fluorescence variations progressively increases for longer greening times (Fig. 2, c, d). The fluorescence shift from 673 to 683 nm observed during this period must coincide with the incorporation of chlorophyll molecules in PS_{II} reaction centres (RC_{II}) and their antenna system (pLHCP). However, a large proportion of pigment-proteins complexes remain unconnected to the native PS_{II} units. This is reflected by the relatively large amplitude of the F₀ fluorescence.

Room temperature fluorescence variations appear during the second period (characterized by the persistence of a unique fluorescence band around 685 nm at 77 K). They are detected after some 4 hrs. of illumination. Their relative amplitude increases slowly (Fig. 3).

The typical "O-I-P" phases are distinguishable as soon as the amplitude of the variations is large enough to allow good resolution. This implies that electron transport is not limited to Q_A reduction in PS_{II} reaction centres. This is apparently not correlated

with any change in the shape of the 77 K fluorescence spectra since a unique 685 nm band is always observed. It must be noticed here that the F_0 intensity remains high, suggesting the persistence of a large amount of chlorophyll-proteins which does not participate in energy transfer to photosynthetic reaction centres.

The relative F_0 intensity decreases dramatically during the third period (Fig. 3). This indicates the progressive incorporation of "free" chlorophyll into PS_{II} units which is also reflected in the development of the 695 fluorescence band at 77 K. The development of the 735 nm band of PS_I during the same period suggests the parallel accumulation in PS_I units (Fig. 1, e).

When leaves are incubated with DCMU (10^{-5} M) the 293 K fluorescence kinetics only show the photochemical phase corresponding to the rapid accumulation of electrons on Q_A [13] due to the displacing of Q_B by DCMU [14] (Fig. 4).

Before the 9th hour of greening the shape of the kinetics is exponential (Fig. 4, a) but after this time a sigmoidicity appears (Fig. 4, b) as F_0 decreases, indicating that energy transfer between PS_{II} units occurs [9].

Although our results constitute only a first, semi-quantitative approach to the greening mechanism of very young leaves, they show that the ontogenesis of the photosynthetic apparatus proceeds with a time-course similar to or slightly faster than in older, etiolated leaves as reported in pea by Thorne and Boardman (1971) or in bean by Franck *et al.* (1984) and Bertrand *et al.* (1988).

F. Franck is Research Associate of the Belgian National Fund for Scientific Research.

Note remise le 24 septembre 1990, acceptée après révision le 19 septembre 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. W. THORNE and N. K. BOARDMAN, *Plant. Physiol.*, 47, 1971, pp. 252-261.
- [2] N. K. BOARDMAN, J. M. ANDERSON and D. J. GOODCHILD, In *Current Research in Bioenergetics*, D. R. SANADI and L. P. VERNON Eds., Academic Press, 1978, pp. 35-109.
- [3] J. M. WHATLEY, *New Phytol.*, 78, 1977, pp. 407-420.
- [4] C. SIRONVAL, M. BROUERS, J.-M. MICHEL and Y. KUYPER, *Photosynthetica*, 2, 1968, pp. 268-287.
- [5] B. SCHOEFS, *Mémoire de licence*, Laboratory of Photobiology (B22), University of Liège, Belgium, 1990.
- [6] S. MANDOLI and W. BRIGGS, *Pour la Science*, 84, 1984, pp. 102-111.
- [7] M. JOUY, *Photosynthetica*, 16, 1982, pp. 123-128.
- [8] N. MURATA, *Biochem. Biophys. Acta*, 162, 1968, pp. 106-126.
- [9] G. DUBERTRET and P. JOLIOT, *Biochem. Biophys. Acta*, 357, 1974, pp. 399-411.
- [10] N. N. LEBEDEV and I. V. BARSKAYA, *F.E.B.S. Lett.*, 255, 1989, pp. 248-252.
- [11] B. SCHOEFS and F. FRANCK, In *Current Research in Photosynthesis*, M. BALTSCHIEFSKY Ed., Kluwer Acad Publ., III, 1990, pp. 755-758.
- [12] N. I. MINKOV, C. SUNDQVIST and M. RYBERG, *Photosynthetica*, 23, 1989, pp. 306-313.
- [13] A. P. G. M. THIELEN and H. J. VAN GORKOM, In *Photosynthesis*, G. AKOYUNOGLU Ed., II, Balaban Int Ser, 1981, pp. 57-64.
- [14] J. B. MARDER and J. BARBER, *see ref.* [11], I, 1990, pp. 307-310.
- [15] C. SIRONVAL, F. FRANCK, R. GYSEMBERG, B. BEREZA and E. DUJARDIN, In *Photochlorophyllide reduction and greening*, C. SIRONVAL and M. BROUERS Eds., Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, 1984, pp. 197-222.
- [16] M. BERTRAND, B. BEREZA and E. DUJARDIN, *Z. Naturforsch.*, 43c, 1988, pp. 443-448.

B. S. and F. F. : *Laboratoire de Photobiologie (B22),
Université de Liège, 4000 Liège, Belgique ;*

B. S. : *New Adress : Laboratoire de Cytophysiologie végétale et de Phycologie,
Université des Sciences et des Techniques de Lille-Flandre-Artois, 59655 Villeneuve-d'Ascq.*