



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Биологически факултет

Катедра „Физиология на растенията“

Велмира Людмилова Димитрова

МЕХАНИЗМИ НА АДАПТАЦИЯ КЪМ СОЛЕВИ СТРЕС

ПРИ *LYCIUM*

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Докторска програма Физиология на растенията

София, 2018 г.

Дисертацията е написана на 158 печатни страници и включва 40 фигури и 11 таблици. Цитирани са 319 литературни източника.

Изследванията по дисертацията са извършени в катедра „Физиология на растенията” и катедра „Биофизика и радиобиология” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, катедра „Дендрология” на Лесотехнически университет, Институт по физиология на растенията и генетика „Акад. М. Попов” – БАН и във фирма „Био Трии” ООД, София.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен съвет на катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, проведено на 01.02.2018 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на..... от.....
в Заседателната зала на Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, бул. „Драган Цанков” №8.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се на сайта на Биологическия факултет.



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Биологически факултет

Катедра „Физиология на растенията“

Велмира Людмила Димитрова

**МЕХАНИЗМИ НА АДАПТАЦИЯ КЪМ СОЛЕВИ СТРЕС
ПРИ *LYSIUM***

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Докторска програма Физиология на растенията

Научен ръководител:

проф. д-р Юлиана К. Марковска

Рецензенти:

проф. д-р Ира В. Станчева

проф. д-р Катя М. Георгиева

Бих искала да изкажа благодарността си на моя научен ръководител – проф. д-р Юлиана К. Марковска – отличен професионалист, с дългогодишен опит, чиито указания и напътствия определиха основните концепции в моя дисертационен труд. Също така и на проф. д-р. Евгени Ананиев, проф. д-р. Венета Капчина-Тотева и доц. д-р Ганка Чанева, без чиято научна компетенция не бих развила така добре своята тема, както и на цялата Катедра по физиология на растенията, за подкрепата при подготовката на материалите по дисертацията ми.

Изказвам специални благодарности на гл. ас. д-р Петър Петров за помощта при изпълнението на структурните изследвания на обектите, на сп. Момчил Паунов, и особено на проф. д-р Василий Гольцев за тяхната отзивчивост и съдействие при измерването на флуоресцентните характеристики на растенията, както и на гл. ас. д-р Светослав Анев за измерването на параметрите на тяхната газова обмяна.

Специални благодарности на инж. Теодора Георгиева, изпълнителен директор на „Био Трии“ за отзивчивостта и оказаната помощ при предоставянето на растителните обекти и експерименталната база.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

- ABS/RC** – поток от енергия, погълнат от един активен реакционен център (RC)
- Asc** – редуцирана форма на аскорбата
- APX** – аскорбат пероксидаза
- CAT** – каталаза
- C₃ растения** – растения с C₃ тип на фотосинтеза
- C₄ растения** – растения с C₄ тип на фотосинтеза
- CAM растения** – растения с CAM тип на фотосинтеза
- DTNB** – 5,5'-дитиобис (2-нитробензоена киселина)
- DHA** – дехидроаскорбат
- DI₀/RC** - общо количество енергия, което се разсейва от един реакционен център (RC) под формата на топлина, флуоресценция или при преноса към друга фотосистема
- E**- интензивност на транспирацията
- EDTA** – етилендиаминотетраоцетна киселина
- F₀**- минимална флуоресценция на хлорофил а, при тъмнинно адаптирани растения
- F_M** – максимална флуоресценция на хлорофил а, при тъмнинно адаптирани растения
- GR** – глутатион редуктаза
- GSH** – редуциран глутатион
- GSSG** – окислен глутатион
- Φ_{P0}** - максимален квантов добив на първична фотохимична реакция
- Φ_{E0}** - квантов добив на електронния транспорт след Q_A
- Φ_{R0}** - квантов добив на електронния транспорт при редукцията на крайните електронни акцептори от страната на ФС I
- MDA** – малондиалдехид
- ME** – меркаптоетанол
- M₀**- параметър, който отразява скоростта, с която се закриват реакционните центрове на ФС II
- N** – параметър, характеризиращ количеството електрони, което е необходимо за пълното редуциране на всички акцептори след Q_A
- NADP-ME**– НАДФ – зависим малик ензим
- NaAA** – натриев аскорбат
- PAR** – фотоактивна радиация

PEP- фосфоенол пируват

PEPC – фосфоенолпируват карбоксилаза

PI_{ABS} - показател за функционалната активност на ФС II, отнесен към погълнатата енергия

PI_{Total} - показател за функционалната активност на ФС II, ФС I и електрон – транспортната верига между тях

P_N – скорост на нето-фотосинтезата

PPDK – пируват ортофосфат дикиназа

ROS – активни форми кислород

POX –гваякол пероксидаза

PVP – поливинилпириролидон

SOD – супероксид дисмутаза

TXO – трихлороцетна киселина

WUE – ефективност на използване на водата

I.УВОД

Около половината от всички съществуващи в света почви, които се напояват, са засегнати от засоляване, алкализирание и преовлажняване. Тези почви, с влошени качества, обикновено са неподходящи за селскостопанско производство.

Под засоляване се разбира натрупването на разтворими соли на Na, Mg и Ca в почвите до степен, при която плодородието им е силно намалено. Содификацията е процес, при който се увеличава съдържанието на Na в почвите. Засоляването се свързва с райони, където има слаби валежи, силно изпаряване или структурата на почвите възпрепятства измиването на солите. Засоляването е един от най-разпространените процеси на деградация на почвата. Според някои изследвания, общата площ на засегнатите райони е около 1 000 000 000 ha. Те се срещат главно в полусухите региони на Азия, Австралия и Южна Америка.

Съгласно Националния доклад за състоянието на околната среда, през 2009 г. в България обработваемите площи, в процес на засоляване, възлизат на 35 500 ha. От тях 252 ha почви са засолени. Независимо от факта, че засолените почви заемат относително малък процент от територията на България, те представляват сериозен проблем за устойчивото функциониране на екосистемите.

Засоляването на почвите е един от важните фактори на околната среда, които водят до намаляване на продукцията на биомаса от селскостопанските растения в аридни и семиаридни условия. Затова проблемът с изхранването на населението, в региони с естествено засоляване, може да бъде решен посредством подобряване на солеустойчивостта на растенията. В тази връзка изучаването на физиологичните характеристики, идентифицирането на ключови гени и/или откриването на молекулярни маркери, при по-голям набор от видове, би довело до изясняване на механизмите на тяхната толерантност с оглед повишаване на продуктивността им.

Дълбочинното засоляване на почвите налага използването на алтернативни, бързо растящи дървесни видове, с дълбока коренова система и възможности да се развиват върху бедни на минерални елементи почви. Счита се, че повишаването на толерантността към засоляване на многогодишните растения (такива като дървесни видове и храсти) е един от ключовете за намаляване на разпространението на вторичното засоляване на почвите, възникнало при неподходящи мелиоративни действия, докато повишаването на толерантността на селскостопанските видове може да увеличи продуктивността им при почви с естествено (първично) засоляване. Чрез използване на солеустойчиви растения в значителна степен може да се намали площта на деградирани земи, като земеползването им се промени в посока на отглеждане на високопродуктивни култури за добив на ценни от стопанска гледна точка биопродукти.

Видовете от род *Lycium* (*Solanaceae*) са многогодишни храсти, които обитават аридните и семиаридни региони на Азия, Америка и Африка, а плодовете им представляват изключителен интерес от медицинска и фармацевтична гледна точка. Високата им сухо- и солеустойчивост ги правят предпочитани растения за предотвратяване на деградирани и засоляването на застрашени почви и рекултивация на пустеещи земи. Стопанският интерес към производството на *Lycium* в световен

мащаб е голям. Направени са инвестиции за милиарди, включващи отглеждането, съхранението, обработката, пакетирането и разпространението му. Търговски интерес има към всякакъв вид производство на основата на *Lycium*: сушени плодове, пакетиран като сок, екстракт, снакс и др. Непремереното използване на естествените популации обаче, води до постепенното им изчезване и налага разработването на *in situ* стратегии за консервацията и тяхната защита. Препоръчва се и микроразмножаване на застрашените видове, но селектирането на сортове с високи качества се оказва изключително трудно. Затова в бъдеще се налага за по-ефективна селекция на отделни сортове от род *Lycium*, успешно да бъдат съчетани анализ на химичния състав, важен от медицинска гледна точка, с генетичен структурен анализ.

В БИО ТРИИ ООД са микроразмножени редица видове от род *Lycium*, с цел подобряване на техните характеристики (сухоустойчивост, студоустойчивост): *Lycium barbarum* L., *Lycium chinense* Mill. и др. Изследванията върху толерантността към солеви стрес на тези видове, култивирани *ex vitro* при различни условия на отглеждане – хидропонни и оранжерийни, са все още недостатъчни. Разработването на система от подходящи физиологични, биохимични и биофизични маркери ще позволи характеризирането на функционалната активност и капацитета за възстановяване в условия на засоляване на два от избраните моделни обекти – *Lycium barbarum* L. и *Lycium chinense* Mill., отличаващи се с ценни фармакологични и медицински свойства.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е въз основа на физиологични, биохимични и биофизични изследвания да бъдат проучени механизмите на адаптация и толерантност към солеви стрес на *Lycium barbarum* L. и *Lycium chinense* Mill..

За реализиране на целта, бяха поставени следните основни задачи:

1. Да се проучи влиянието на кратковременното и продължителното засоляване върху *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани при хидропонни и оранжерийни условия, като се изследват промените в морфометричните показатели (свежа и суха биомаса), газовата обмяна (нето-фотосинтеза и воден режим) и в антиоксидантната им защита (ензимни и неензимни компоненти);
2. Да се изследват измененията във функционалното състояние на ФС II посредством метода на бързата хлорофилна флуоресценция (prompt fluorescence);
3. Да се определят промените в съдържанието на алкални и алкалоземни метали в корените и надземните части на двата вида, при различни условия на отглеждане;
4. Да се изследват ключови биофизични и физиолого-биохимични показатели в качеството им на стресови маркери и да се посочат най-чувствителните, характеризиращи толерантността на растенията към солеви стрес.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Растителен материал и условия на отглеждане

1.1. Хидропонни опити

Семена и *in vivo* експлантите от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* бяха използвани за разработване на протокол за *in vitro* микроразмножаване. За индуциране образуването на стъбла, експлантите от *Lycium barbarum* бяха отгледани в 4 g cm^{-3} среда на Murashige and Skoog (1962), включваща 30 g cm^{-3} захароза и 8 g cm^{-3} агар. При разработването на мултипликационния протокол, към MS средата беше добавено 1.0 ml cm^{-3} индолил-3-оцетна киселина (IAA). За индуциране на образуването на стъбла, експлантите от *Lycium chinense* бяха отгледани в 2.37 g cm^{-3} McCown Woody plant solution (Lloyd and McCown, 1981). Средата съдържаше още 24.3 g cm^{-3} захароза, 8 g cm^{-3} агар и 0.3 g cm^{-3} аденин. За разработване на мултипликационния протокол, към средата беше добавено 0.125 g cm^{-3} гиберелинова киселина (GA_3), 1.0 ml cm^{-3} индолил-3-оцетна киселина (IAA) и 0.5 ml cm^{-3} индолил-3-маслена киселина (IBA). След намножаването на надземните части, от тях бяха взети връхчета с височина 1.5 – 2 cm и прехвърлени в среда за инициране на коренообразуване (вкореняване), която съдържаше $\frac{1}{2}$ от солите на MS или McCown средата, с добавка на компонентите, изброени по-горе. Във всички среди рН беше доведено до 6.0 с помощта на 0.1 N HCl или 0.1 N NaOH преди автоклавирането. Всички култури бяха инкубирани при следните стандартни условия – 16 h фотопериод, интензивност на осветление $-100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ и температури $24/18 \pm 1^\circ\text{C}$. След три седмици растенията бяха измивани от средата за вкореняване с дестилирана вода и коренчетата бяха изплаквани с 1.5 g cm^{-3} разтвор на Proplant.

Експериментите при хидропонни условия включваха 4 третираня, заедно с контролите, като при всяко третиране бяха използвани 10-16 растения. *In vitro* отгледаните растения от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* бяха пренесени в полиетиленови съдове, с обем 1.2 cm^3 , съдържащи 4x разреден хранителен разтвор на Hoagland с рН 5.9 (Hoagland and Arnon, 1941). Полиетиленовите съдове бяха поставени във фототермостатна камера (POL-ECO) с 16-h фотопериод (PAR $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, измерена на горната листна повърхност с помощта на луксметър, $25/17 \pm 1^\circ\text{C}$ дневни/нощни температури, относителна влажност 54/45%). Всеки съд съдържаше по четири растения и представляваше едно повторение. След 21 дни на култивиране, растенията бяха прехвърлени на 2x разреден разтвор на Hoagland (рН 5.9), съдържащ същите компоненти, както предишния. Третирането на растенията с NaCl беше извършено на 48-я ден от отглеждането им. Вариантите включваха: контрола (без добавяне на NaCl) и вариант 1, 2 и 3, съответстващи на концентрации 50, 100 и 200 mM NaCl. Разтворите бяха аерирани всеки ден, а средата беше заменяна изцяло с нова със същия състав на всеки 3 дни, с цел предотвратяване изчерпването на хранителните вещества. Продължителността на третиране на растенията с NaCl беше 10 дни.

1.2. Почвени опити

Експериментите при оранжерийни условия бяха проведени с два типа почви. Двата типа бяха събрани от различни места на един и същ регион - землището на с. Белозем, област Пловдив, България. Събирането на почвени образци беше направено от повърхността и на дълбочина от 30 до 60 cm. Тяхното общо тегло беше приблизително 60 kg. В последствие образците бяха обединени, изсушени до постоянно тегло и пресяти през найлоново сито. Първият тип почва беше характеризирани като незасолена, ливадно-блатна, а втория като засолена, средно алкална, както беше описано от Иванова (2016). Агрехимичните характеристики на двата типа почви бяха направени от Централната лаборатория на Института по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Никола Пушкарров”, София съгласно приетите за страната методи – ISO 260/14254.

Освен двата типа почви за извеждане на експериментите при оранжерийни условия беше използван и торф, смесен с перлит в съотношение 2:1 (v:v). Торф-перлитът се използва за засаждане от производителите на посадъчен материал поради факта, че съдържа влагозадържащ агент и по този се начин поддържа благоприятен воден режим за отглеждане и дълготрайно съхранение на растенията.

В началото на експеримента растенията бяха пренесени и засадени (по 1 растение на съд) в предварително дренирани пластмасови съдове, съдържащи по 1.0 kg от тестираните почви и торф-перлит. Всеки вариант беше представен със 7 повторения. Продължителността на експеримента беше два вегетационни сезона (от април 2015 до септември 2016 г.). Растенията бяха отглеждани при оранжерийни условия при обичайните за сезона: осветление от 10 000 до 25 000 лукса, температура на въздуха от 15° С до 35° С и относителната влажност – от 40% до 65%. Поливането на почвата беше извършвано ежедневно с чешмяна вода до 75% от пълната почвена влагоемност.

2. Експериментални методи

2.1. Биометрични показатели – измерване на свежо и сухо тегло на корени и на надземна част;

2.2. Микроскопски наблюдения върху листната структура с помощта на светлинен микроскоп *Amplival (Carl Zeiss Jena, Germany)*. За целите на микроскопското наблюдение беше използван процесор (*International Micro-Vision Inc., 667 El Camino Real, Redwood City, CA, USA*);

2.3. Определяне на съдържанието на пигменти (Lichtenthaler, 1987);

2.4. Изследване на листния газообмен, посредством автоматичен газанализатор LICOR 6400 (*Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA*), с използване на red-blue LED светлинен източник;

2.5. Измерване на параметрите на бързата хлорофилна флуоресценция, посредством флуориметър *PEA (Hansatech Instruments, UK)*;

2.6. Определяне на съдържанието на пероксиди (Jessup et al., 1994);

2.7. Определяне на степента на липидно пероксидиране (Heath and Packer, 1968);

- 2.8. Определяне на обща антиоксидантна активност** (Prieto et al., 1999);
- 2.9. Определяне на антиоксидантната активност** чрез DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) радикаловия метод (Tepe et al., 2006);
- 2.10. Определяне на фериредуциращата антиоксидантна способност (FRAP assay)** (Benzie and Strain, 1996);
- 2.11. Определяне на количеството на пролина** (Bates et al., 1973);
- 2.12. Определяне на общото фенолно съдържание** (Pffefer et al., 1998);
- 2.13. Определяне на общото флавоноидно съдържание** (Zhishen et al., 1999);
- 2.14. Определяне съдържанието на разтворими белтъци** (Lowry et al., 1951);
- 2.15. Определяне на количеството на нискомолекулни антиоксиданти – аскорбат и дехидроаскорбат** (Foyer et al., 1983) и на окислен и редуциран глутатион (Griffith, 1980);
- 2.16. Определяне на ензимни активности – супероксид дисмутаза (EC 1.15.1.1)** (Marklund and Marklund, 1974), **аскорбат пероксидазна (EC 1.11.1.11)** (Nakano and Asada, 1981), **глутатион редуктазна (EC 1.6.4.2)** (Sherwin and Farrant, 1998), **каталазна (EC 1.11.1.6)** (Aebi, 1984), **гваякол пероксидазна (EC 1.11.1.7)** (Polle et al., 1994), **фенилаланин амоняк-лиаза (EC 4.3.1.24)** (Yuan et al., 2002), **фосфоенолпируват карбоксилазна (EC 4.1.1.31)** (Ashton et al., 1990), **пируват фосфат дикиназна (EC 2.7.9.1)** (Ashton et al., 1990) и **НАДФ – малик ензимна (EC 1.1.1.40)** (Garnier – Dardart and Quieroz, 1974);
- 2.17. Определяне на общото количество на Са, Mg, Na и К** в биодостъпната фракция от торфени и почвени образци, както и в растителни образци – след киселинна хидролиза с помощта на атомно-абсорбционен спектрофотометър (*Perkin-Elmer 5000, UK*) – по Doumett et al. (2008);
- 2.18. Статистическа обработка на резултатите** чрез използване на метода на Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$), след прилагането на ANOVA анализ (Statgraphics Plus, V. 2.1).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Хидропонни опити

1.1. Влияние на NaCl върху растежа и развитието на растенията

В таблица 1 са представени промените в съотношението свежа биомаса/суха биомаса за корени и надземни части от двете растения след третиране с нарастващи концентрации на NaCl за период от 10 дни. При растенията от *L. barbarum* се наблюдава известно повишаване на съотношението, отнасящо се за корените при 100 mM NaCl, докато при *L. chinense* подобно увеличение, в сравнение с контролния вариант, се установява при 50 и 200 mM NaCl (единствено разликата при най-високата концентрация, обаче е статистически значима). Промените в съотношението, отнасящи се за надземните части показват, че концентрацията от 50 mM NaCl проявява известен стимулиращ ефект при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* се установява постепенно нарастване на този параметър (отчетените разлики са статистически значими, обаче единствено при най-високата концентрация на NaCl).

Таблица 1. Промени в съотношението свежа/суха биомаса при корени и надземни части на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ (n = 5-7). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

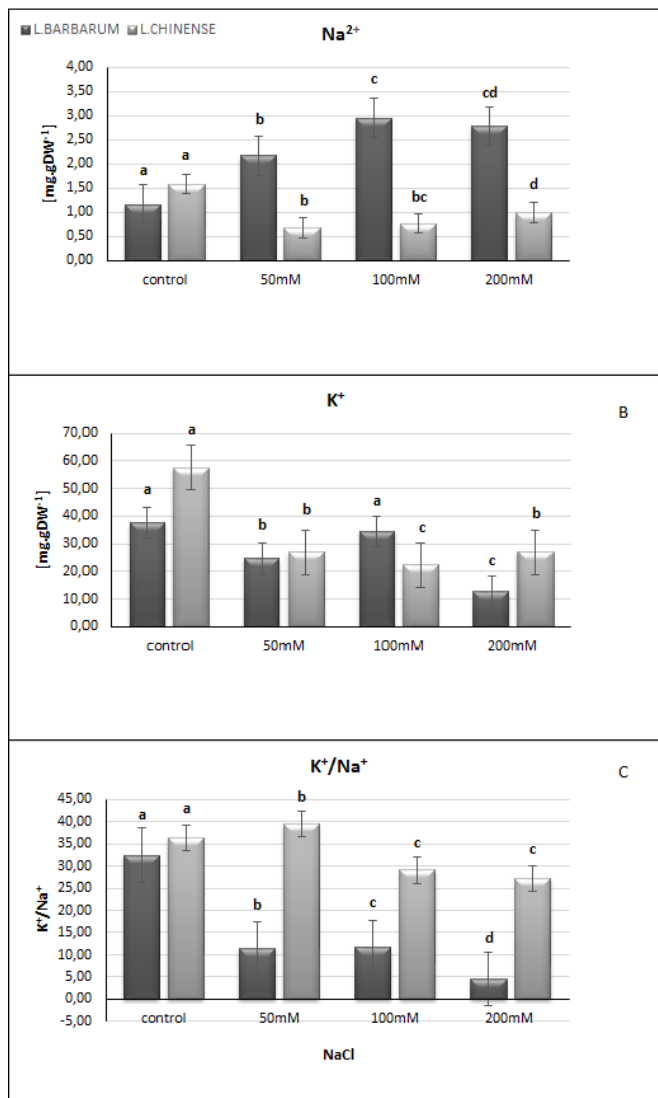
Третиране	Коренова свежа/ суха биомаса	Надземна свежа/ суха биомаса
	[g/g]	[g/g]
<i>Lycium barbarum</i>		
Контрола	13.84±2.43a	8.48±1.84a
50 mM NaCl	12.85±1.65a	9.20±0.84a
100 mM NaCl	13.44±1.92a	7.60±0.69a
200 mM NaCl	9.29±0.87b	4.85±0.36b
<i>Lycium chinense</i>		
Контрола	9.94±0.79a	7.32±0.63a
50 mM NaCl	10.38±1.25a	7.98±0.59a
100 mM NaCl	9.83±0.89b	8.30±0.77a
200 mM NaCl	12.61±1.37c	8.72±0.74b

Добавянето на 50 mM NaCl действа благоприятно, както върху съотношението свежа/суха биомаса на надземните части при *L. barbarum*, така и върху анатомичните особености на листата, докато при *L. chinense* беше установена най-голяма дебелина на

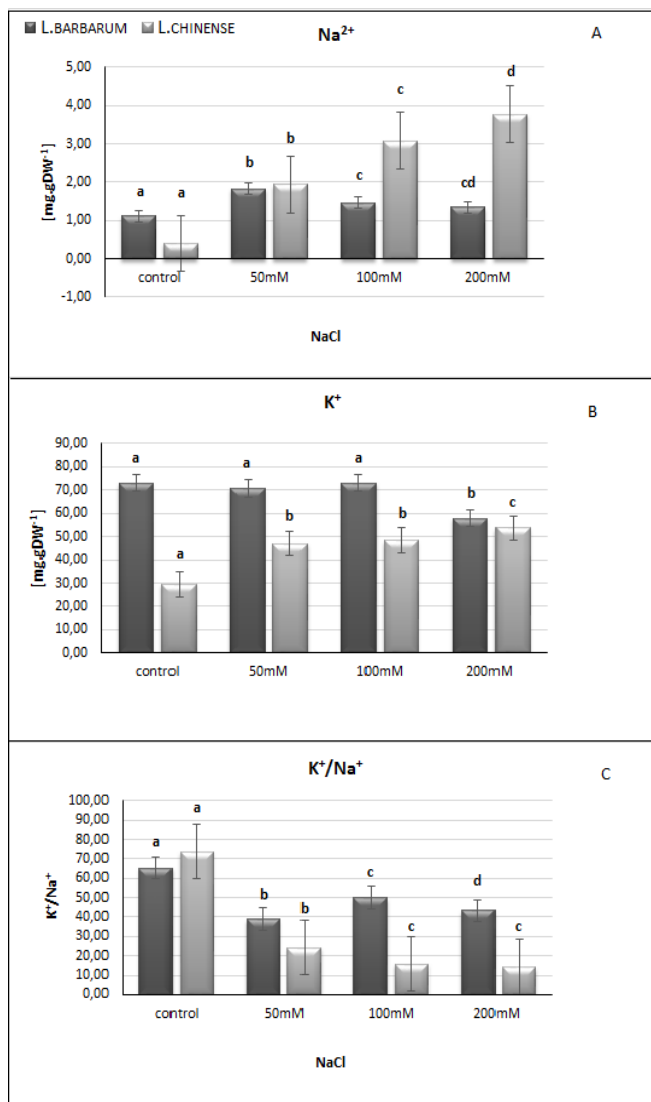
листната петура, на гъбчестия мезофил и на междуклетъчното пространство в него, след третиране с 100 mM NaCl.

1.2. Натрупване на алкални и алкалоземни метали в корени и листа

Двете растения вероятно притежават различни механизми за регулация на поглъщането и транспорта на соли от корените към надземните части. Количеството на акумулирания Na^+ постепенно нараства в корените на *L. barbarum*, докато при *L. chinense* намалява с увеличаване на степента на засоляване на хранителния разтвор (Фиг. 2А). Количеството на K^+ намалява в сравнение с контролния вариант (Фиг. 2В), а съотношението Na^+/K^+ се редуцира постепенно и при двете растения, но при *L. chinense* то остава по-високо в сравнение с *L. barbarum* след всички варианти на третиране (Фиг. 2С).



Фиг. 2А,В,С. Натрупване на Na^+ (А), K^+ (В) и промени в съотношението Na^+/K^+ (С), измерени в корените на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Фиг. 3А,В,С. Натрупване на Na⁺(А), K⁺ (В) и промени в съотношението Na⁺/K⁺ (С), измерени в надземните части на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с M ± SE (n = 5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

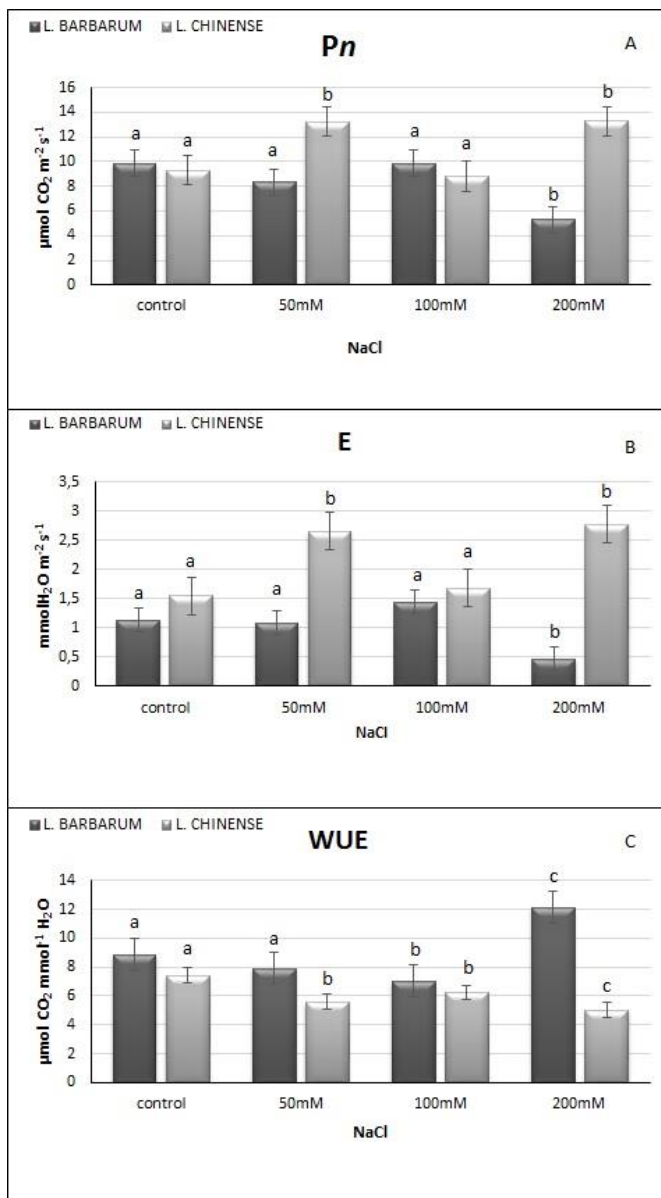
Количеството на Na⁺ се увеличава слабо в надземните части на *L. barbarum* след третиране с нарастващи концентрации на NaCl, като най-високи стойности са отчетени при 50 mM NaCl. При същите условия акумулацията на Na⁺ в надземните части на *L. chinense* значително нараства (Фиг. 3А). Промените в акумулацията на K⁺ са по-слаби – при *L. barbarum* тя намалява, а при *L. chinense* се увеличава, с увеличаване на засоляването (Фиг. 3В). Съотношението Na⁺/K⁺ намалява в сравнение с контролния вариант, по-значително при *L. chinense* (Фиг. 3С).

Резултатите за разпределението на алкалоземните метали показаха, че количеството на Mg²⁺ в надземните части на растенията е значително по-високо в сравнение с корените. Не са наблюдавани съществени различия в количествата на този йон след третиране на растенията, с нарастващи концентрации на NaCl, както в корените, така и в надземните части. Промените в количеството на Ca²⁺ в корените и надземните части на растенията следват тези в количеството на Mg²⁺. Доказано е, че високата толерантност на растения, които отделят соли с кореновите ексудати, се дължи на замяната на Na⁺ с Ca²⁺ в по-голяма степен, отколкото на промяната в осмотичния потенциал в ризосферната зона. Причината за това е адсорбцията на Ca²⁺

върху мембраните на кореновите клетки, което намалява проникването на едновалентните йони (Munns et al., 1983).

1.3. Влияние на NaCl върху листния газообмен

Резултатите показват, че при *Lycium barbarum* 100 mM NaCl оказват стимулиращ ефект върху P_N и E, докато при *Lycium chinense* същият ефект се наблюдава при 50 и 200 mM NaCl (Фиг. 10А,В). Ходът на изменения на WUE при *Lycium barbarum* показва постепенно повишаване, докато при *Lycium chinense* – се понижава с нарастване на концентрацията на NaCl в хранителния разтвор (Фиг. 10С).



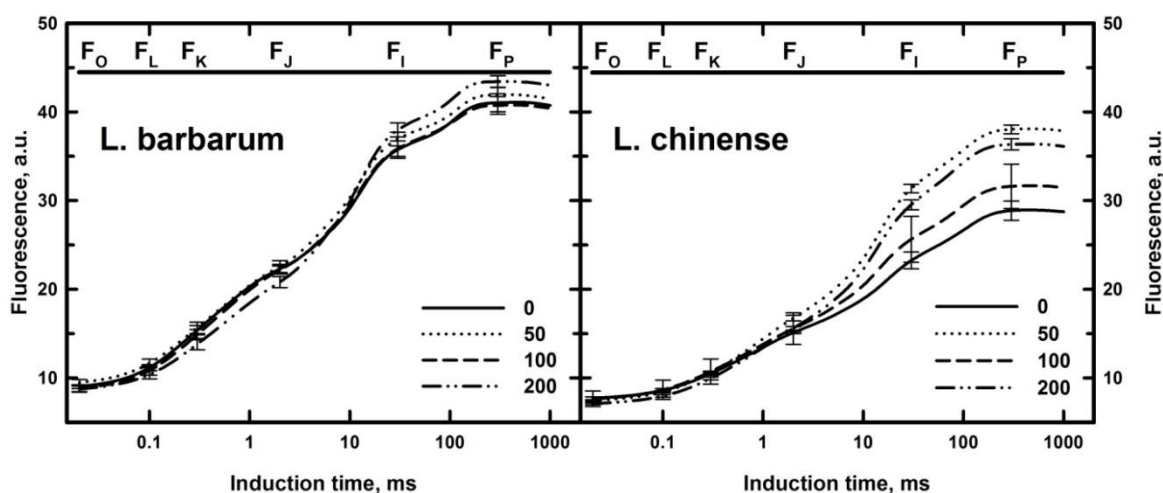
Фиг. 4А,В,С. Промени в скоростта на нето-фотосинтезата (P_N) - (А), транспирацията (E) – (В) и ефективността на използване на водата (WUE) – (С) при *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 20$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Най-високата концентрация на NaCl – 200 mM, подтиска нето-фотосинтезата и транспирацията, но повишава ефективността на използване на водата при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* са установени високи стойности на P_N и E, но най-ниска WUE.

Беше установено, че третирането с нарастващи концентрации на NaCl на *L. barbarum* води до постепенно намаляване на количеството на хлорофил а и хлорофил b, подобно на скоростта на нето-фотосинтезата (Фиг. 4А), докато количеството на каротеноидите се увеличава. Установено беше също, че промените в количеството на двата хлорофилни пигмента и каротеноидите следват тези на P_N след третиране на *L. chinense* с NaCl (Фиг. 4А), а стойностите им остават по-високи в сравнение с установените при контролния вариант.

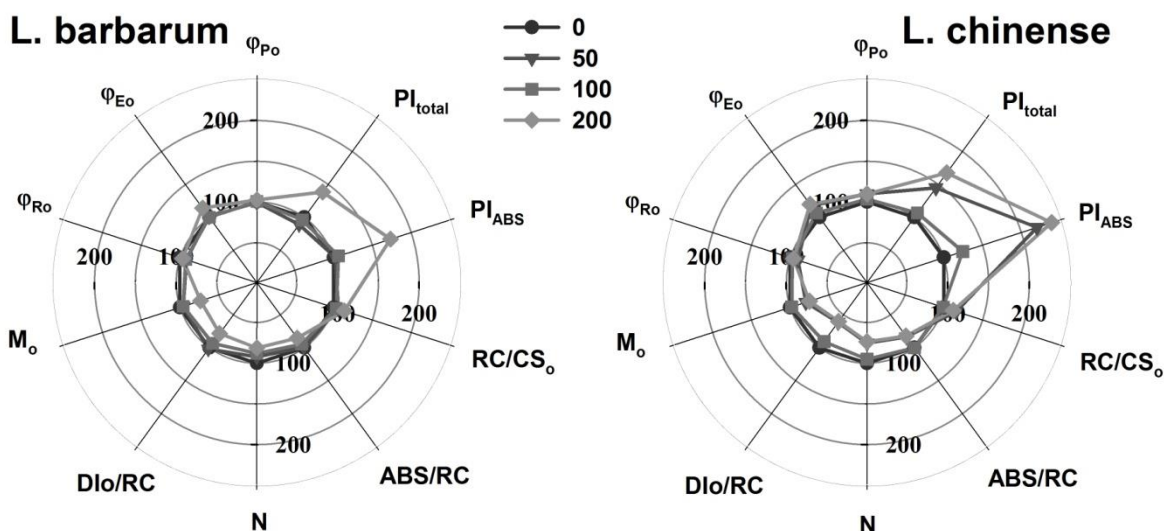
1.4. Влияние на NaCl върху параметрите на бързата флуоресценция

Резултатите от регистриране на транзиентните флуоресцентни ОJIP-криви за контролни растения от *L. barbarum* и *L. chinense* показват, че техният ход е подобен, но стойностите на флуоресценцията при *L. chinense* са по-ниски в сравнение с *L. barbarum*. Ходът на характерните фази на транзиентната крива O-J-I-P е запазен след третиране на растенията с нарастващи концентрации на NaCl, но се наблюдава изместване, особено силно проявено при *L. chinense* (Фиг. 5).



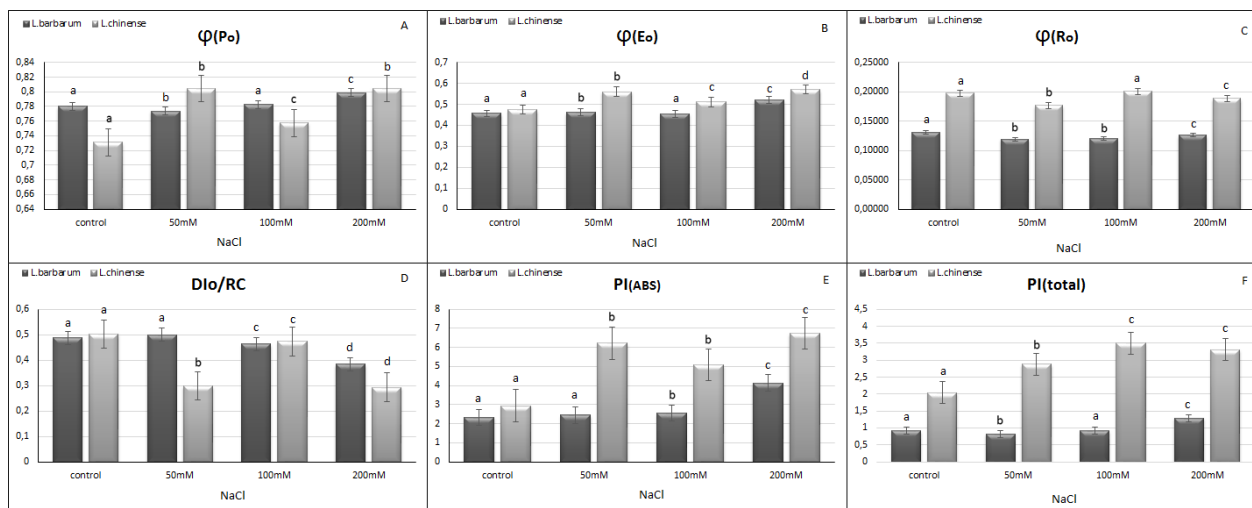
Фиг. 5. Индукционни криви на бързата хлорофилна флуоресценция (prompt fluorescence – PF), като мярка за активността на ФС II при *Lyium barbarum* и *Lyium chinense*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Транзиентните флуоресцентни ОJIP-криви са регистрирани с помощта на М-РЕА (Hansatech, UK) апарат при 650 nm, след тъмнинна адаптация (30 мин) и интензитет на възбуждането 4000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Представа за относителното отклонение на ОJIP – параметрите на изследваните растения, подложени на стресово влияние в сравнение с контролния вариант, се получава от т.н. паякообразни диаграми (spider plots). От двете диаграми се вижда, че най-големи отклонения в избраните параметри се установяват при третиране на *L. barbarum* със 200 mM NaCl, докато при *L. chinense* по-силно влияние оказва третирането с 50 и 200 mM NaCl (Фиг. 6). Тези резултати съвпадат с регистрираните най-големи отклонения в стойностите на P_N и E, след третиране на *L. barbarum* и *L. chinense* с нарастващи концентрации на NaCl (Фиг. 4А,В).



Фиг. 6. Паякообразни диаграми на относителното отклонение на ОЛР – параметрите, регистрирани на листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Отклонението на тези параметри е представено по отношение на контролните варианти (величините им са приети като 100%), а групирането е извършено по: скорост на потоците на енергията, квантови ефективности, специфични потоци на енергията (приведени към един реакционен център), феноменологични относителни потоци (приведени към единица възбудена повърхност от фотосинтезиращия обект) и функционални показатели на ФС II.

Параметрите, изчислени на базата на транзитните криви от фиг. 5, са представени на фиг. 7 и показват квантовите добиви от първичната фотохимична реакция до акцептора Q_A (Φ_{Po}), добива на електронния транспорт отвъд Q_A (Φ_{Eo}) и редуцията на крайните електронни акцептори откъм акцепторната страна на ФС I (Φ_{Ro}). Стойностите на първия показател - Φ_{Po} намаляват незначително единствено след третиране на *L. barbarum* с 50 mM NaCl, докато при второто растение се увеличават в сравнение с контролата, а най-слабото увеличение е регистрирано след третиране със 100 mM NaCl (Фиг. 7А). Стойностите на Φ_{Eo} се увеличават постепенно с нарастване на концентрациите на NaCl при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* увеличението е различно – най-слабо след третиране със 100 mM NaCl. Ходът на промените на този параметър е същият, както на Φ_{Po} при *L. chinense* (Фиг. 7В). Третият показател - Φ_{Ro} следва ходът на промените на Φ_{Po} при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* е противоположен на първите два показателя (Фиг. 7С).



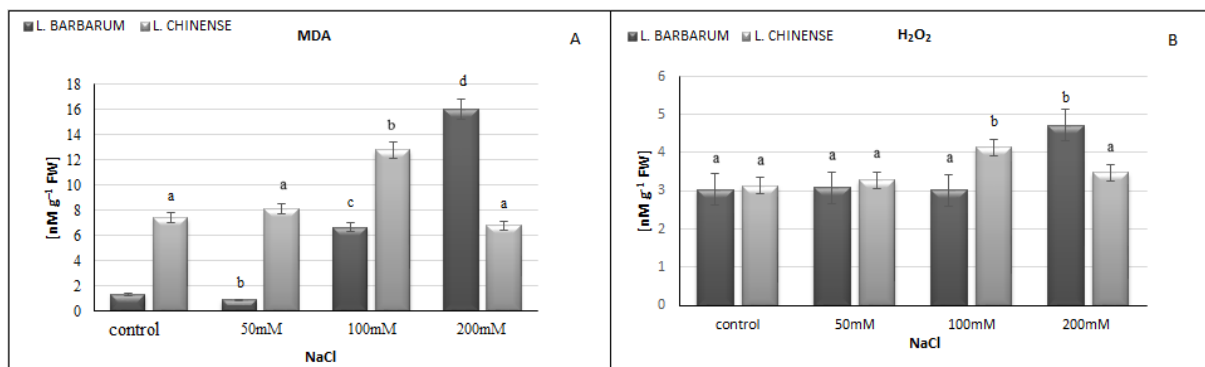
Фиг. 7А,В,С,Д,Е,Ф. Параметри на бързата хлорофилна флуоресценция (квантови добиви – Φ_{P_o} , Φ_{E_o} , Φ_{R_o} , индекси на производителност – PI_{ABS} , PI_{Total} и топлинна дисипация - DI_o/RC) на ФС II, регистрирани в листа на *Lucium barbarum* и *Lucium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ (n = 5-7). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher`s LSD test (P<0.05).

Други анализирани параметри са индексите на производителност, performance index (PI_{ABS} , PI_{Total}), както и вероятността за електронен пренос отвъд $Q_A(\psi_o)$ и топлинната дисипация DI_o/RC . Индексите на производителност отразяват съответно ефективността на запазване на енергията на уловения светлинен квант от ФС II до междинните електронни преносители (PI_{ABS}) и до крайните електронни акцептори от ФС I (PI_{Total}).

Нашите резултати показват, че индексът PI_{ABS} нараства постепенно с нарастване на концентрациите на NaCl при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* нарастването след третиране със 100 mM NaCl е относително по-слабо в сравнение с контролата (Фиг. 7Е). Следващият параметър - PI_{Total} намалява в по-голяма степен след третиране на *L. barbarum* с 50 mM NaCl, а при *L. chinense* нараства постепенно и е най-висок след третиране със 100 mM NaCl (Фиг. 7F). Топлинната дисипация - DI_o/RC , е най-висока след третиране на *L. barbarum* с 50 mM NaCl, докато при *L. chinense* са регистрирани пониски стойности след третиране, а най-близка до контролата е стойността, отчетена след добавяне на 100 mM NaCl (Фиг. 7D).

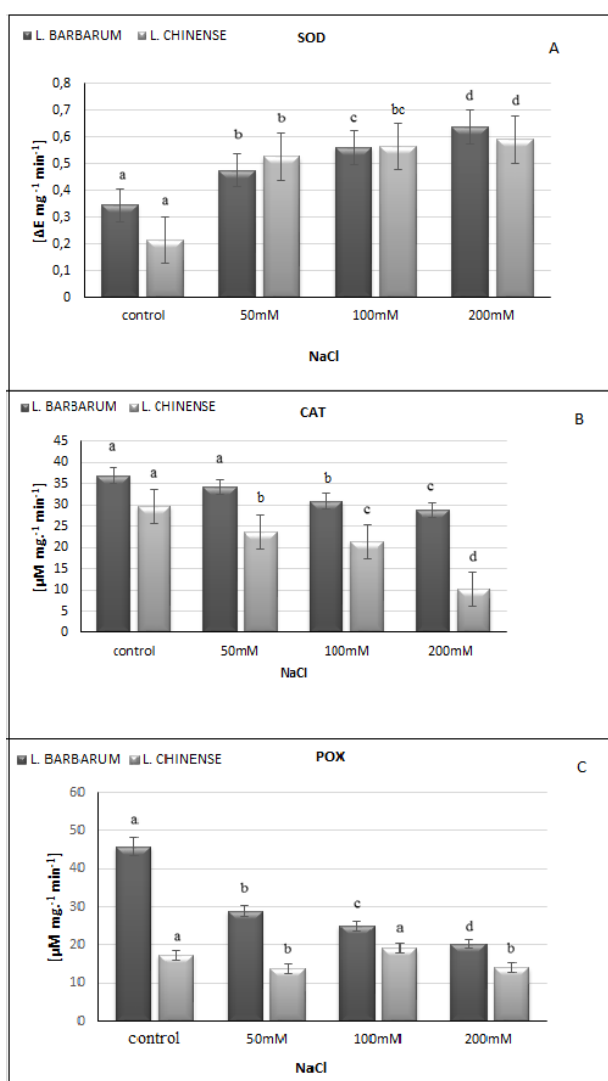
1.5. Влияние на NaCl върху антиоксидантната защита

Промените в количеството на MDA и H_2O_2 , установени в листа от *L. barbarum* и *L. chinense* показват рязко увеличение, особено след третиране на първото растение със средни и високи концентрации на NaCl. Ходът на промените на тези параметри при *L. chinense* е един и същ, като най-високи стойности са отчетени при 100 mM NaCl (Фиг. 8А,В). При същата концентрация са отчетени най-ниски стойности на нето-фотосинтезата (Фиг. 5А), на Φ_{P_o} и на Φ_{E_o} (Фиг. 7А,В), както и на количеството на хлорофил а, хлорофил b и на каротеноидите след третиране, а растежът на растенията от този вариант е най-угнетен.



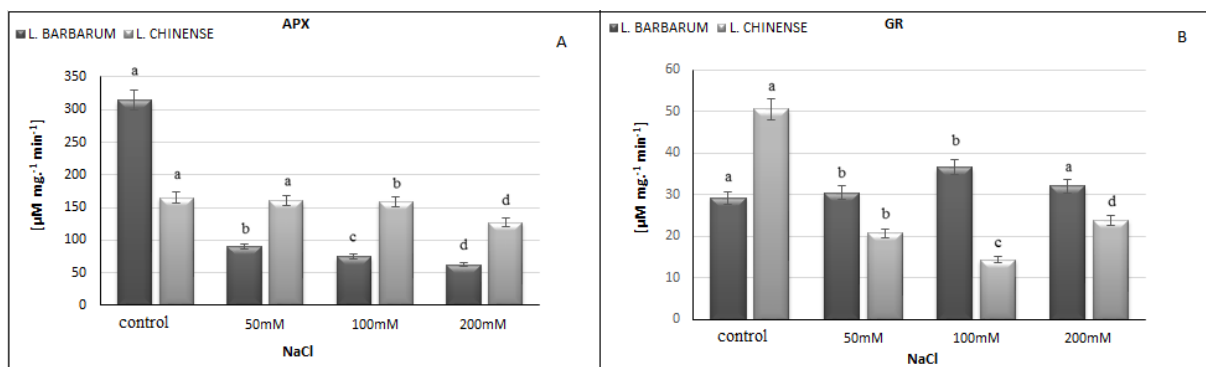
Фиг. 8А,В. Промени в количеството на MDA (А) и H₂O₂ (В) в листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с М ± SE (n = 5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

Третирането със 100 mM NaCl на *L. chinense* води до най-силен окислителен стрес (най-високи стойности на MDA и H₂O₂), но до акумулацията на най-ниски количества на нискомолекулните антиоксиданти - аскорбат и глутатион. Отчетените активности на



аскорбат пероксидазата (APX) и особено на глутатион редуктазата (GR) при този вариант също са най-ниски (Фиг. 10А,В), докато от останалите изследвани ензими само активностите на супероксид дисмутазата (SOD) и гваякол пероксидазата (POX) нарастват незначително (Фиг. 9А,С).

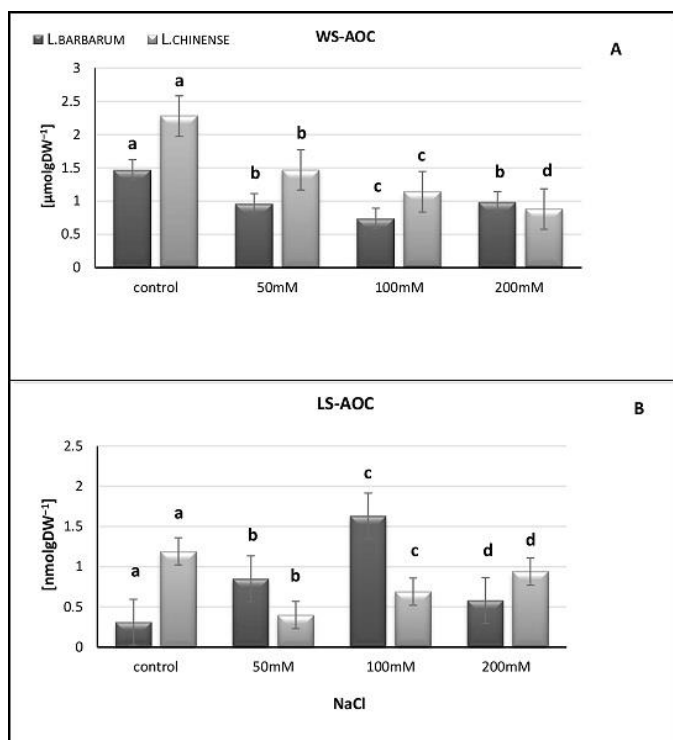
Фиг. 9А,В,С. Промени в активността на супероксид дисмутазата (SOD) –(А), каталазата (CAT) – (В) и гваякол пероксидазата (POX)–(С) в листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия, и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с М ± SE (n = 5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).



Фиг. 10А,В. Промени в активността на аскорбат пероксидазата (APX) – (А) и глутатион редуказата (GR) – (В) в листа от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

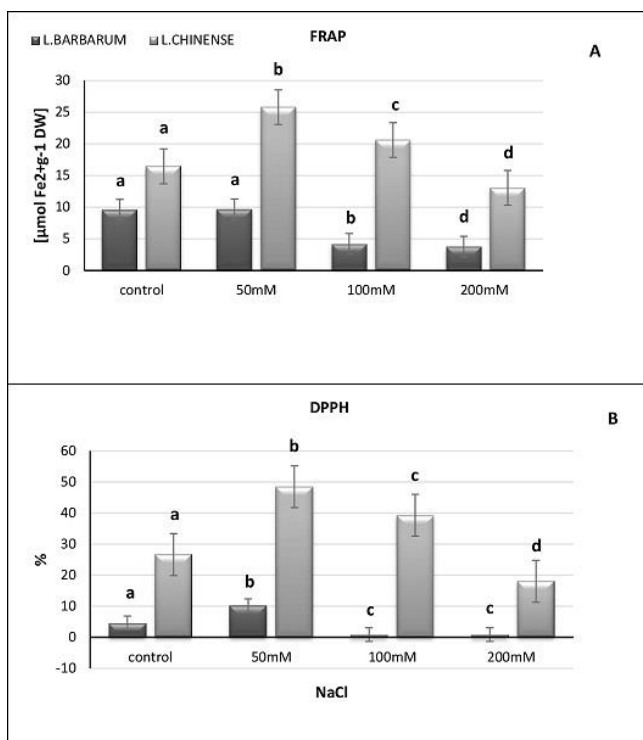
Общата антиоксидантна активност, установена в листата на двете растения е различна. Контролните растения от *L. chinense* се характеризират с по-голяма водно-разтворима и мастно-разтворима фракция, в сравнение с контролните растения на *L. barbarum* (Фиг. 11А). Стойностите на първата фракция постепенно намаляват при *L. chinense*, докато при *L. barbarum* ходът на промените е подобен на този на общото фенолно съдържание. Най-високи стойности на мастно-разтворимата фракция са измерени при *L. barbarum* след третиране със 100 mM NaCl, а най-ниски при *L. chinense* след третиране с 50 mM NaCl (Фиг. 11В).

Общата антиоксидантна активност, измерена посредством DPPH и FRAP методите се променя по един и същ начин в листата на *L. chinense*, и е най-висока след третиране с 50 mM NaCl. Определянето ѝ посредством DPPH метода показва най-високи стойности и за листата на *L. barbarum*, но чрез FRAP метода не се установяват съществени различия между контролния вариант и след добавянето на 50 mM NaCl към хранителния разтвор (Фиг. 12А,В). Изследователите, които изучават динамиката на популациите и характеристиките на инвазивните видове от семиаридни тревисти екосистеми в Северна Америка установяват, че един от инвазивните видове (*Larrea tridentata*) се отличава с по-високо съдържание на каротеноиди и антиоксидантна активност, измерена чрез DPPH метода, в сравнение с неинвазивните видове (*Lycium fremontii*) (Liu and Guan, 2012). Нашите резултати показаха по-високо количество на каротеноидите в листата на *L. chinense*, в сравнение с това на *L. barbarum*, а ходът на промените им е подобен, както този на общата антиоксидантна активност, измерена с помощта на DPPH и FRAP методите. Най-високи стойности в количеството на каротеноидите и общата антиоксидантна активност бяха установени след третиране на *L. chinense* с 50 mM NaCl (Фиг. 12А,В).



Фиг. 11А,В. Промени в общата водно- и мастно-разтворима антиоксидантна активност в листа от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 4$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Фиг. 12А,В. Промени в общата антиоксидантна активност, измерена с помощта на FRAP (А) и DPPH (В) методи в листа от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 4$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Ние наблюдавахме по-големи изменения в активността на ензимите от C₄ фотосинтезата - PEPC и PPKK, след третиране на растенията с нарастващи концентрации на NaCl, и заключихме, че те играят по-съществена роля в метаболизма на органичните киселини и установяването на CO₂ концентриращ механизъм при фотосинтезата на *L. chinense*, поради установения еднакъв ход на промени на двата ензима с този на нето-фотосинтезата (Фиг. 5А). Ролята на NADP-ME оставаше по-неясна, тъй като при *L. chinense* почти не се наблюдаваха промени в активността му, а при *L. barbarum* тази активност нарастваше слабо едва при най-високата концентрация на NaCl – 200 mM.

2. Почвени опити

2.1. Определяне на достъпните количества алкални и алкалоземни метали в почвата преди засаждането и след прибирането на растенията

Ние подбрахме два типа почви от района на с. Белозем, Пловдивско, чийто капацитет на катионообменна адсорбция е подобен, но втория тип се различава от първия с ~ 5 пъти по-голямо количество на обменния Na, както и със степен на солонцеватост – 5,2 пъти по-висока. Съгласно Приложение №16 към чл. 13, т.2. от Наредба №3, обн. в ДВ, бр. 71, 12.08.2008 г., първият тип почва (1) се характеризира като незасолена, а втория (2) като средно алкална (солонцевата).

Нашите опити при оранжерийни условия са изведени с двата вида *Lucium* – *Lucium barbarum* и *Lucium chinense*, които са отгледани върху торф-перлит (0), незасолена (1) и засолена (2) почва в продължение на два вегетационни периода (от април 2015 г. до септември 2016 г.).

Анализът на достъпните количества алкални и алкалоземни метали в биодостъпната фракция от торф и двете почви преди засаждането на растенията показва, че количеството на всички метали в първата фракция е многократно по-високо в сравнение с останалите две, а Ca^{2+} и особено Na^{+} преобладава при засолената почва. рН на биодостъпната фракция е слабо кисело, докато на двете биодостъпни фракции от почвите е алкално (Таблица 2).

Таблица 2. Биодостъпни количества на алкални и алкалоземни метали [$mg\ l^{-1}$] във фракциите от торф-перлит, незасолена и засолена почва преди засаждането, и след прибирането на растенията на втората година (2016). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики, съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Вариант	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Na^{+}	K^{+}	K^{+}/Na^{+}	рН
Преди засаждане на растенията						
Торф (0)	627.0±54.2a	5687.0±325.4a	1072.0±106.5a	4636.0±375.8a	4.32	5.10
Незас.(1)	29.0±2.5b	10.0±1.3b	26.5± 2.9b	34.0±2.9b	1.28	8.00
Засол.(2)	40.0±3.5c	187.0±12.3c	382.2±24.9c	50.0±4.9c	0.13	8.92
След прибиране на <i>L. barbarum</i>						
Торф (0)	87.0±7.9a	587.0±49.6a	584.0±46.5a	361.0±35.2a	0.62	6.10
Незас.(1)	52.0±4.5b	201.0±19.4b	238.0± 26.9b	88.0±6.9b	0.37	7.20
Засол.(2)	46.0±3.8c	151.0±12.5c	244.0±21.4c	159.0±14.3c	0.65	7.40
След прибиране на <i>L. chinense</i>						
Торф (0)	78.0±6.5a	259.0±21.3a	487.0±46.2a	279.0±25.6a	0.57	6.02
Незас.(1)	51.0±4.3b	220.0±18.1b	127.0± 11.3b	77.0±6.1b	0.61	7.56
Засол.(2)	84.0±6.9c	109.0±17.5b	238.0±22.7c	86.0±7.8c	0.36	7.30

С изключение на K^+ , не се наблюдава съществена разлика в количеството на останалите три метала в биодостъпните фракции от незасолена и засолена почва след прибиране на двата вида растения. Съотношенията K^+/Na^+ се променят обратнопропорционално, а рН на фракциите намалява до неутрално. Нашите резултати показват, че отглеждането на растенията от двата вида *Lucium* върху незасолена почва за период от 2 години води до обогатяване на биодостъпните фракции с допълнително количество на всички изследвани метали. Количеството на Na^+ в биодостъпната фракция след прибиране на *L. chinense* е ~ 2 пъти по-ниско, в сравнение с биодостъпната фракция след прибиране на *L. barbarum* (Таблица 2).

Резултатите от измерване на количествата на алкалните и алкалоземните метали в корените показват, че Mg^{2+} се приемат в по-голямо количество от незасолената и засолена почва в сравнение с торф-перлит. Ca^{2+} и K^+ преобладават в корените на *L. chinense* в сравнение с *L. barbarum* след отглеждане на незасолена почва. Установените съотношения K^+/Na^+ в корените на *L. chinense* са ~ 2 пъти по-високи в сравнение с *L. barbarum* след отглеждане на незасолена и засолена почва. Това съотношение е ~ 3 пъти по-високо в корените на *L. barbarum* в сравнение с *L. chinense* след отглеждане върху торф-перлит, благодарение на двукратно по-високото съдържание на K^+ в тях (Таблица 3).

Таблица 3. Промени в количествата на алкални и алкалоземни метали [$mg\ g^{-1}DW$] в корените, след прибирането на растенията на втората година (2016). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики, съгласно Fisher`sLSDtest ($P < 0.05$).

Вариант	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Na^+	K^+	K^+/Na^+
След прибиране на <i>L. barbarum</i>					
Торф (0)	0.88±0.09a	7.48±0.67a	1.84±0.06a	18.78±1.75a	10.21
Незас.(1)	2.00±0.20b	5.40±0.46b	1.84±0.11b	6.96±0.59b	4.67
Засол.(2)	2.71±0.32c	7.39±0.59a	2.95±0.22c	11.15±1.09c	3.78
След прибиране на <i>L. chinense</i>					
Торф (0)	1.27±0.11a	9.13±0.87a	2.88±0.26a	9.02±0.85a	3.13
Незас.(1)	1.95±0.20b	11.04±1.09b	1.51±0.13b	13.42±1.11b	8.89
Засол.(2)	2.06±0.22b	8.58±0.79a	1.77±0.14c	11.50±1.12c	6.50

Количеството на Ca^{2+} е \sim двойно по-високо в надземните части на *L. chinense* в сравнение с *L. barbarum* при всички варианти на отглеждане. Количеството на Na^+ е от цял порядък по-високо в надземните части на *L. chinense*, но количеството на K^+ намалява в сравнение с *L. barbarum*. Отчетените стойности на съотношенията K^+/Na^+ в надземните части на *L. chinense* драстично намаляват в сравнение с *L. barbarum* при

всички варианти на отглеждане, благодарение на по-ниското съдържание на K^+ и по-високото съдържание на Na^+ в тях (Таблица 4).

Таблица 4. Промени в количествата на алкални и алкалоземни метали [$mg\ g^{-1}DW$] в надземните части след прибирането на растенията на втората година (2016). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики, съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Вариант	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Na^+	K^+	K^+/Na^+
След прибиране на <i>L. barbarum</i>					
Торф (0)	5.50±0.49a	9.57±0.86a	1.69±0.16a	43.95±3.45a	26.01
Незас.(1)	5.72±0.43b	11.95±1.16b	1.49±0.17a	52.04±4.52b	28.28
Засол.(2)	5.17±0.39c	7.76±0.68c	2.39±0.21b	57.51±5.09c	24.06
След прибиране на <i>L. chinense</i>					
Торф (0)	5.83±0.51a	17.01±1.15a	31.45±2.96a	14.41±1.35a	0.46
Незас.(1)	5.83±0.43a	23.98±2.06b	20.95±2.01b	32.45±2.99b	1.55
Засол.(2)	6.05±0.62a	18.37±0.79c	22.29±2.16b	36.35±3.24c	1.63

2.2. Влияние на засоляването върху растежа и развитието на растенията

Нашите наблюдения показаха, че с напредване на вегетацията и при двата вида се проявява пожълтяване и опадване първоначално на по-възрастните, а по-късно и на по-младите листа. Опадването на възрастните листа е по-ярко изразено при растенията, отгледани на засолена почва, в сравнение с незасолената и може да се разглежда като проява на фитотоксичност. То настъпваше по-бързо при *L. barbarum*.

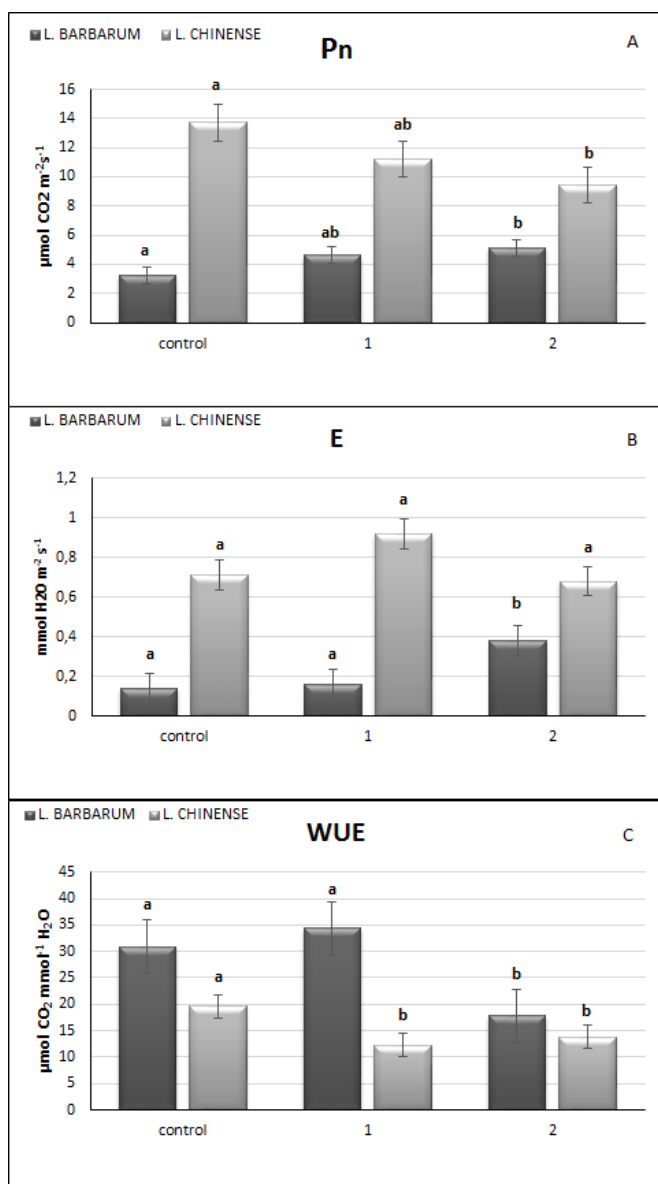
В таблица 5 са представени резултатите от двугодишните измервания на общата свежа (FW) и суха (DW) биомаса на надземните части и корените, както и на съотношението между тях (FW/DW) при *L. barbarum* и *L. chinense*.

Таблица 5. Промени в общата свежа (FW), суха (DW) биомаса и съотношението между тях (FW/DW) при надземни части и корени на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани в продължение на две години на торф-перлит (0), незасолена (1) и засолена (2) почва при оранжерийни условия. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.1$).

Вариант	обща свежа биом.-надз. части [FW] [g]	обща суха биом.-надз. части [DW] [g]	надз. части [FW/DW] [g/g]	обща свежа биом. - корени [FW] [g]	обща суха биом. - корени [DW] [g]	корени [FW/DW] [g/g]

<i>Lycium barbarum</i>						
Торф (0)	7.084±0.724a	0.808±0.079a	8.767	1.811±0.211a	0.276±0.027a	6.561
Незас.(1)	19.793±7.124b	2.728±1.069b	7.225	13.205±1.422b	4.148±0.512b	3.180
Засол.(2)	4.420±2.056c	0.588±0.280c	7.517	3.617±0.346c	0.900±0.079c	4.018
<i>Lycium chinense</i>						
Торф (0)	2.702±0.230a	0.305±0.022a	8.859	1.533±0.170a	0.291±0.022a	5.268
Незас.(1)	1.842±1.319b	0.204±0.131a	9.029	1.181±0.108b	0.288±0.044a	4.101
Засол. (2)	2.649±1.593a	0.288±0.169b	9.198	1.505±0.159c	0.358±0.039b	4.203

Най-високо е съотношението между FW/DW за надземни части и корени при *L. barbarum* след отглеждане върху торф-перлит, докато при *L. chinense* са установени най-високи стойности за корените след отглеждане върху торф-перлит, а за надземните части след отглеждане на засолена почва.



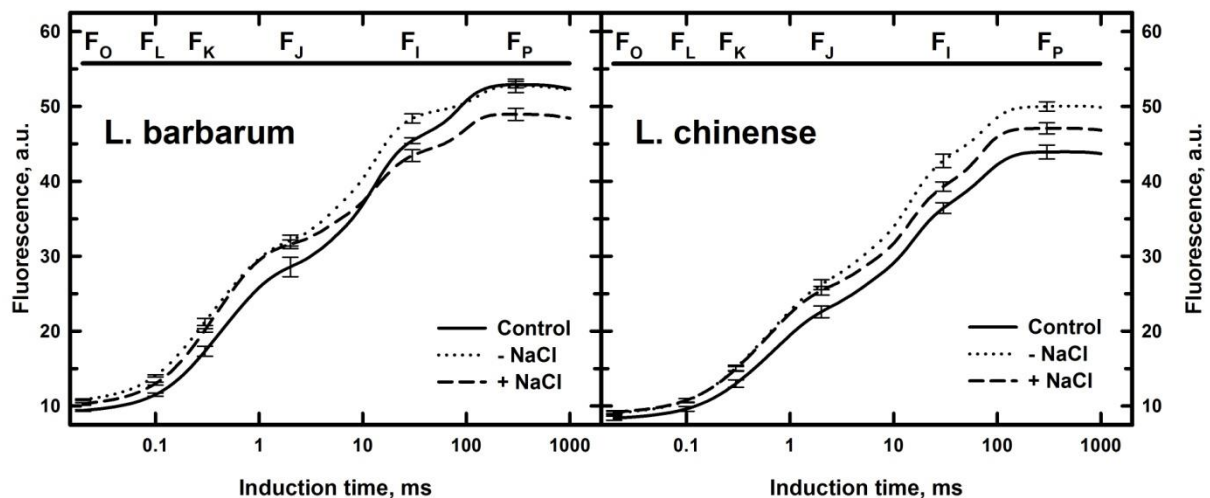
2.3. Влияние на почвеното засоляване върху основните параметри на газообмена

Резултатите от измерване на нето-фотосинтезата (P_N) показват постепенно увеличаване при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* се наблюдава намаляване на стойностите след отглеждането на растенията върху различен почвен субстрат (Фиг. 13А).

Фиг. 13. Промени в скоростта на нето-фотосинтезата (P_N) – А, транспирацията (E) – В и ефективността на използване на водата (WUE) – С при *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 20$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Скоростта на транспирацията (E) се увеличава по-значително при отглеждане на *L. barbarum* върху засолената почва, докато при същите условия при *L. chinense* намалява (установените разлики по отношение на торфа са статистически незначими) (Фиг. 13В). Ефективността на използване на водата (WUE) намалява почти двойно след отглеждане на *L. barbarum* върху засолената почва в сравнение с незасолената, докато при *L. chinense* установените разлики между тези два варианта са незначими (Фиг. 13С).

2.4. Влияние на почвеното засоляване върху параметрите на бързата флуоресценция



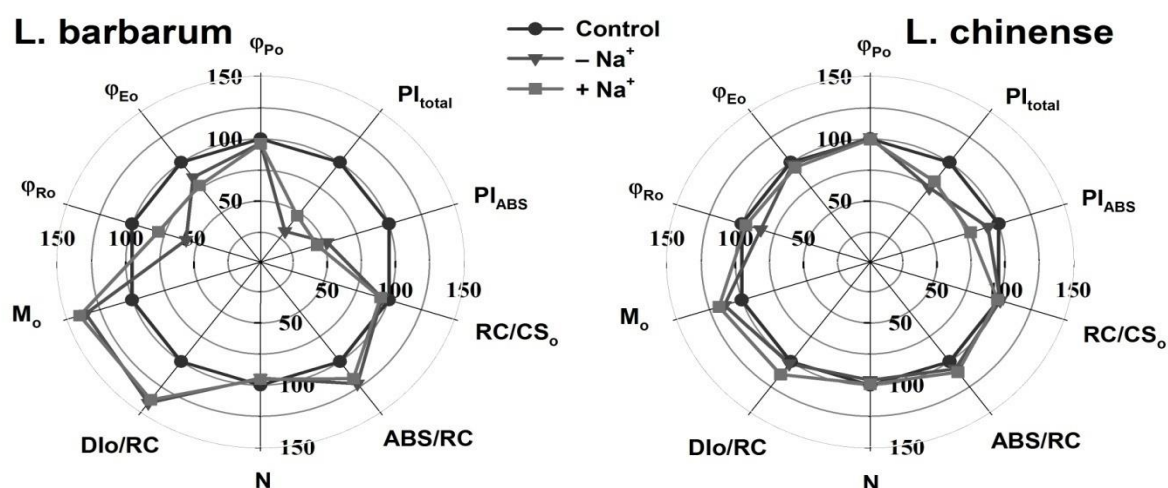
Фиг. 14. Индукционни криви на бързата хлорофилна флуоресценция (prompt fluorescence – PF), като мярка за активността на ФС II при *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (control); 2/ незасолена почва – (-Na⁺); 3/ засолената почва – (+Na⁺). Транзиентните флуоресцентни ОЈР-криви са регистрирани с помощта на М-РЕА (Hansatech, UK) апарат, при 650 nm след тъмнинна адаптация (30 мин) и интензитет на възбуждането 4000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

На Фиг. 14 са представени транзиентните флуоресцентни ОЈР-криви за растения от *L. barbarum* и *L. chinense*, отгледани на торф-перлит и върху незасолена и засолената почва в продължение на две години. Ходът на характерните фази на транзиентната крива О-Ј-І-Р е запазен както при контролния вариант, така и след отглеждане на незасолена и засолената почва на растенията, но стойностите на флуоресценцията при второто растение остават отново по-ниски в сравнение с първото, подобно на хидропонния опит.

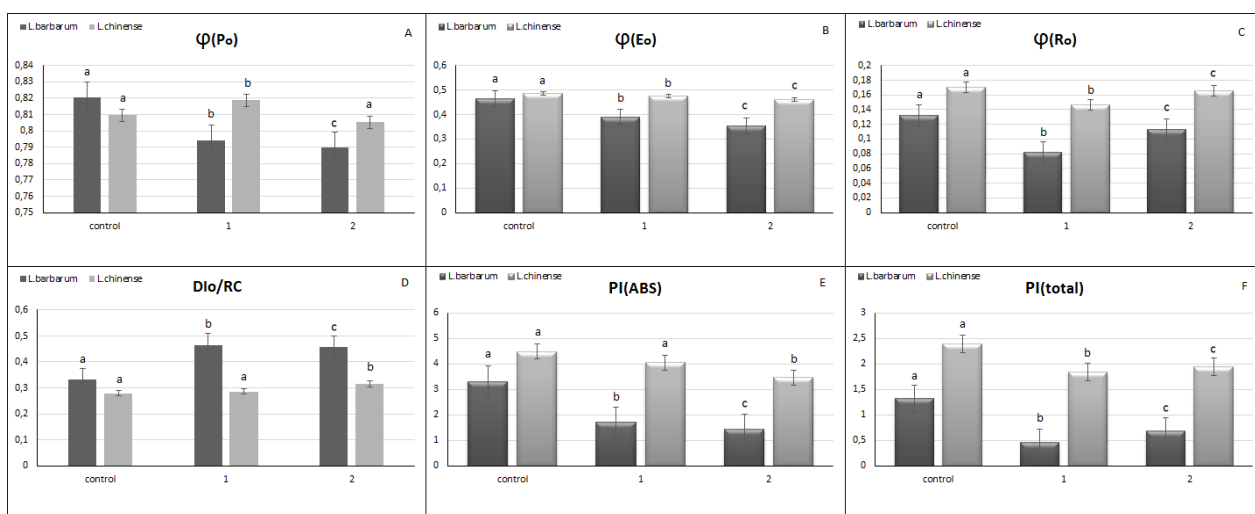
Относителните отклонения на ОЈР – параметрите, представени под формата на диаграми показва, че те са значително по-големи при отглеждане на *L. barbarum* на незасолена и засолената почва, в сравнение с *L. chinense*, отгледан при същите условия (Фиг. 15).

Стойностите на ϕ_{P_0} са значително по-високи за контролните варианти на *L. barbarum* и *L. chinense*, отгледани на торф-перлит, в сравнение с установените за

хидропонния опит, като намаляват незначително при отглеждане на *L. barbarum* и *L. chinense* на незасолена и засолена почва (Фиг. 16А). Стойностите на φ_{Eo} намаляват в много по-голяма степен след отглеждане на *L. barbarum* на незасолена и засолена почва в сравнение с *L. chinense*, отгледан при същите условия (Фиг.16В). Третият показател - φ_{Ro} , намалява след отглеждане и на двете растения на незасолена почва и отново се увеличава при засолената почва, като достига стойностите, характерни за контролните варианти (Фиг.16С).



Фиг. 15. Паякообразни диаграми на относителното отклонение на ОЖР – параметрите, регистрирани на листа от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (control); 2/ незасолена почва – (-Na⁺); 3/ засолена почва – (+ Na⁺). Отклонението на тези параметри е представено по отношение на контролните варианти (величините им са приети като 100%), а групирането е извършено по: скорост на потоците на енергията, квантови ефективности, специфични потоци на енергията (приведени към един реакционен център), феноменологични относителни потоци (приведени към единица възбудена повърхност от фотосинтезиращия обект) и функционални показатели на ФС II.

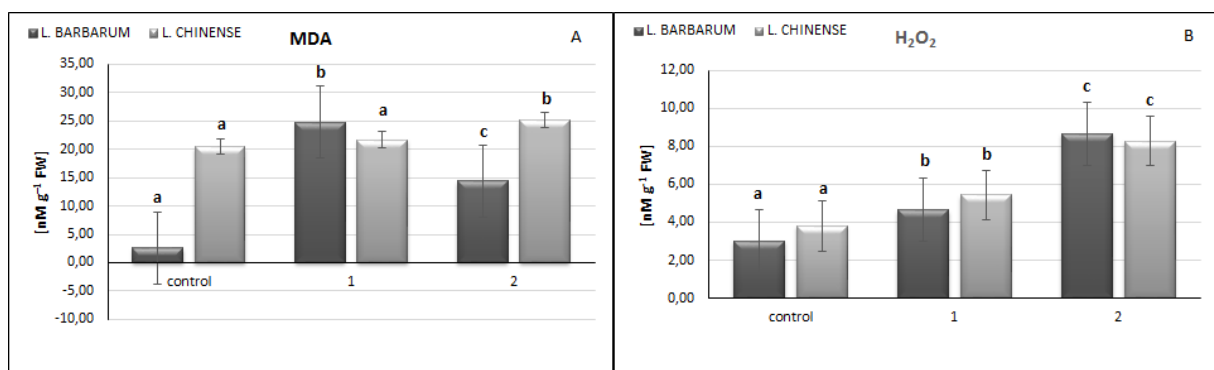


Фиг. 16А,В,С,Д,Е,Ф. Параметри на бързата хлорофилна флуоресценция (квантови добиви – ϕ_{Po} , ϕ_{Eo} , ϕ_{Ro} , индекси на производителност – PI_{ABS} , PI_{Total} и топлинна дисипация - $DI_{O/RC}$) на ФС II, регистрирани в листа на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0 - control); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5-7$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Параметърът PI_{ABS} намалява значително след отглеждане на *L. barbarum* на незасолена и засолена почва в сравнение с *L. chinense* (Фиг. 16Е). Същата тенденция се наблюдава и при параметъра PI_{Total} , но отчетените стойности за засолената почва са по-високи от тези на незасолената (Фиг. 16F). Същевременно стойностите на $DI_{O/RC}$ се повишават по-значително при *L. barbarum*, отгледан на незасолена и засолена почва, в сравнение с *L. chinense* (Фиг. 16D).

2.5. Влияние на почвеното засоляване върху антиоксидантната защита на растенията

Стойностите на MDA намаляват при отглеждане на растенията на засолена почва, но остават значително по-високи, в сравнение с установените за торф-перлит. Количеството на пероксидите нараства плавно след отглеждане на *L. barbarum* върху торф-перлит, незасолена и засолена почва. Същите показатели нарастват постепенно при отглеждане на *L. chinense* при същите условия (Фиг. 17А,В).

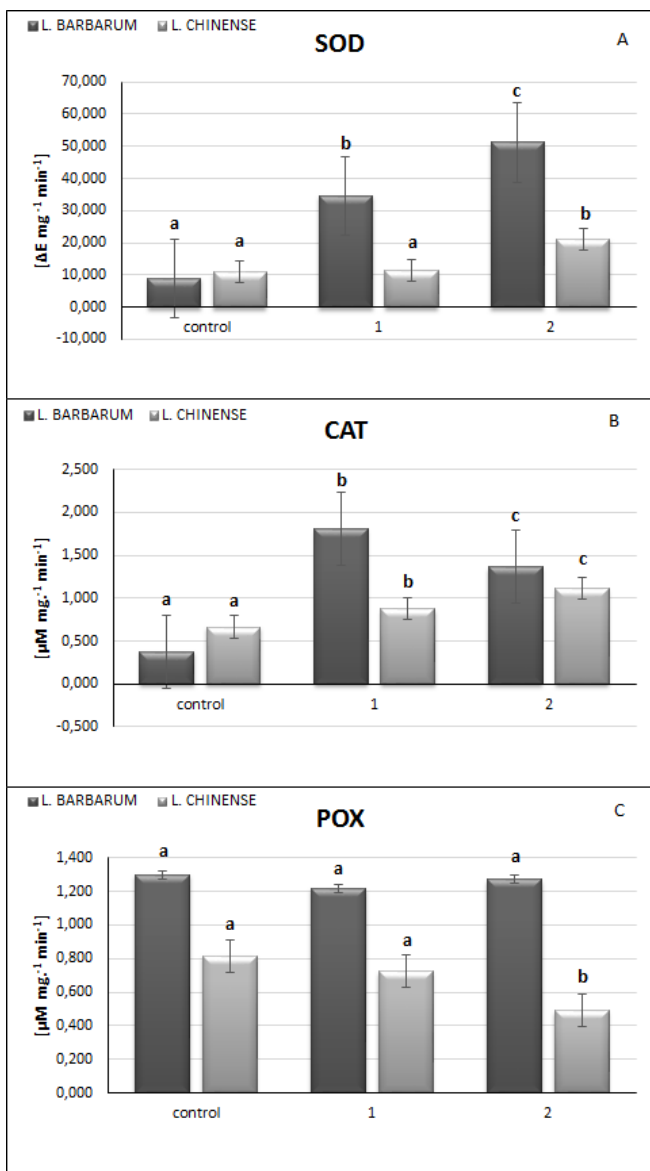


Фиг. 17А,В. Промени в количеството на малондиалдехида (MDA) и водородния пероксид (H_2O_2) в листа от *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

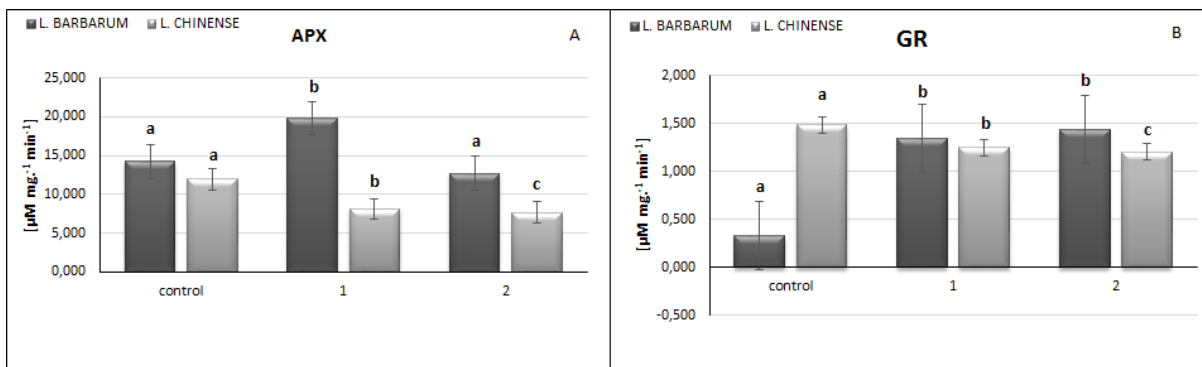
Количеството на нискомолекулярния антиоксидант – аскорбат намаляваше след отглеждане на растенията върху незасолена и засолена почва, в сравнение с торф-перлит, докато динамиката на промени в количеството на глутатиона беше различна – най-високи стойности бяха отчетени след отглеждане на торф-перлит на *L. barbarum* и след отглеждане на незасолена почва на *L. chinense*. Не беше установена корелационна

зависимост в промените на нискомолекулните антиоксиданти – аскорбат и глутатион и активностите на APX и GR (Фиг. 19А,В).

Най-силно се променя активността на SOD и при двете растения, отглеждани на торф-перлит, незасолена и засолена почва (Фиг. 18А). Активността на CAT нараства плавно в същата последователност при *L. chinense*, докато при *L. barbarum* са установени най-високи стойности във варианта с незасолена почва (Фиг. 18В). И при двете растения активността на POX намалява след отглеждане върху торф-перлит, незасолена и засолена почва (Фиг. 18С).

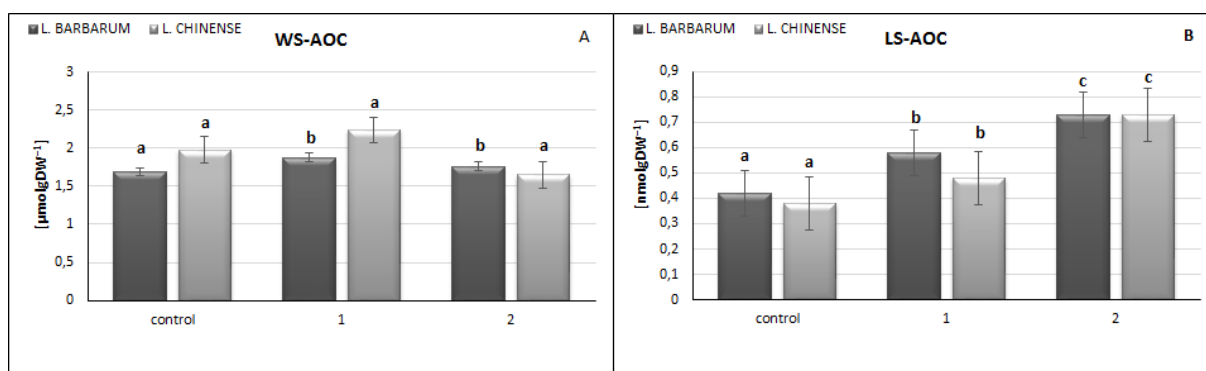


Фиг. 18А,В,С. Промени в активността на супероксиддисмутазата (SOD), каталазата (CAT) и гваякол пероксидазата (POX) в листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher`s LSD test ($P < 0.05$).



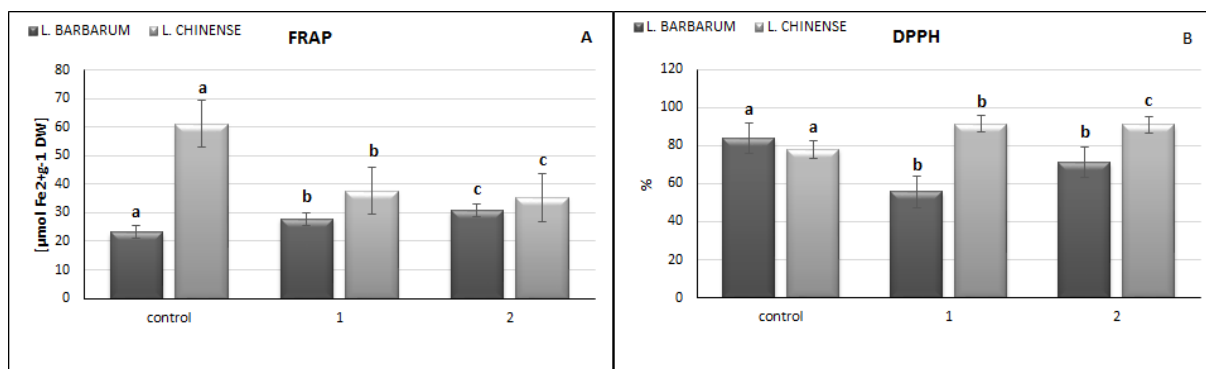
Фиг. 19А,В. Промени в активността на аскорбат пероксидазата (APX) и глутатион редуктазата (GR) в листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

При определяне на общата антиоксидантна активност са установени следните закономерности – водно-разтворимата фракция има най-високи стойности при отглеждане на растенията върху незасолена почва, докато мастно-разтворимата фракция – при отглеждане на растенията на засолена почва (Фиг. 20А,В).



Фиг. 20А,В. Промени в общата водно- и мастно-разтворима антиоксидантна активност в листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Промените, които се наблюдават в стойностите на мастно-разтворимата фракция, получена от *L. chinense*, съвпадат с наблюдаваното изменение на стойностите на антиоксидантната активност, определена с помощта на DPPH метода (Фиг. 21В). Измерването на антиоксидантната активност посредством FRAP метода показва същата тенденция на изменение само при *L. barbarum*, докато ходът на промените при *L. chinense* е обратен (Фиг. 21А,В).



Фиг. 21А,В. Промени в общата антиоксидантна активност, измерена с помощта на FRAP и DPPH методи в листа от *Lyium barbarum* и *Lyium chinense*, отгледани като почвени култури за период от две години на: 1/ торф-перлит – (0); 2/ незасолена почва – (1); 3/ засолена почва – (2). Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n = 5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и третираните варианти), съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Независимо от многобройните изследвания на някои видове от род *Lyium*, осъществени особено през последните години, остават все още неясни неспецифичните и специфични приспособителни механизми, които проявяват растенията при кратковременно и дълговременно влияние на солевия стрес. Съпоставянето на получените резултати от *ex vitro* отглеждането на растенията при хидропонни и оранжерийни условия дава възможност за изследване на техния акумулационен потенциал, морфологични и физиолого-биохимични отговори на адаптация към това стресово влияние, както и за подбор на най-чувствителни маркери за подобряване на тяхната селекция. Използването на бързата флуоресценция, в качеството на скринингов метод за изследване на структурното и функционално състояние на фотосинтетичния апарат, внася още по-голяма яснота при търсенето на обективни критерии за наличието на толерантност към засоляване на отделните видове. Подборът на най-устойчивите от тях и засаждането им на засолени почви биха довели до по-ефективното им използване и смяна на предназначението в посока към отглеждане на растения с ценни фармакологични и медицински свойства.

Резултатите от хидропонните опити, характеризират *Lyium chinense* като по-толерантен към засоляване в сравнение с *Lyium barbarum*, поради високото съотношение на свежа към суха биомаса на корените и надземните части след третиране с 200 mM NaCl (Таблица 1), въпреки че акумулацията на Na^+ в надземните части е най-голяма (Фиг. 3А). При същия вариант са установени ниски стойности на R_N и E , но повишена ефективност на използване на водата при *L. barbarum*, докато при *L. chinense* R_N и E са повишени, а WUE е ниска (Фиг. 4А, В,С). Количествата на хлорофил а, хлорофил b и на каротеноидите нарастват след третиране с нарастващи концентрации на NaCl на *L. chinense*, докато при *L. barbarum* се увеличава само количеството на каротеноидите.

Резултатите от измерване на транзитните криви след третиране на растенията с нарастващи концентрации на NaCl показват всички типични характеристики за класическата флуоресцентна ОЛР крива, като точките O, J, I и P са добре различими. Най-силно изместване надясно на експоненциалната част на кривата преди J (бавно достигане на J), се наблюдава след третиране на *L. barbarum* с 50 mM NaCl, докато при *L. chinense* изместването е наляво (бързо достигане на J), след третиране с 100, 200 и особено с 50 mM NaCl (Фиг. 5). Изместването наляво на експоненциалната част на кривата най-вероятно се дължи на забавяне на електронния пренос при първичния електронен акцептор Q_A , докато изместването надясно - на неговото ускоряване. Повишаване на интензитета на флуоресценцията в стъпката J (F_J), се наблюдава и при други изследвания (Nellaeralli et al., 2012) и е свързано с по-голямото натрупване на

редуциран Q_A . Това води до забавяне на електронния пренос след Q_A . Вероятно още след третиране с 50 mM NaCl на *L. chinense* настъпват промени с образуването на ROS и флуидността на мембраните (при това третиране са установени едни от най-високите стойности на активността на SOD – Фиг. 9А, но нивото на MDA и на H_2O_2 не се променя съществено в сравнение с контролата – Фиг. 8А,В). При тези условия реокислението на PQ се забавя. От друга страна, при третиране на *L. barbarum* с 50 mM NaCl се установява повишаване на стойностите на първоначалната флуоресценция - F_0 , с около 5%. Подобно повишение е регистрирано и след засушаване на *Haberlea* (Strasser et al., 2010), както и след въздействие с ниски температури при *Arabidopsis* (Mishra et al., 2011; Nellaepalli et al., 2012) и при нетолерантни популации на *Arabis alpina* (Колакъзов, 2015), и може да се дължи на натрупване на редуцирани форми на пластохинона (PQH_2) (Toth et al., 2007). По принцип, PQH_2 се натрупва при прекъсване на електронния транспорт между двете фотосистеми. При стрес най-често се забавя електронния транспорт или се проявява недостиг на крайни електронни акцептори, след инхибиране на крайните етапи от фотосинтезата. По-голямата активност на ФС II, в сравнение с ФС I, най-често е основната причина за натрупването на PQH_2 . Освен това, натрупването на PQH_2 е причина за фосфорилиране на ССК II от протеинкиназата STN7 (Nellaepalli et al., 2012). Фосфорилиране на ССК II е било наблюдавано след натрупване на PQH_2 , но без да се влияе от интензивността на осветление. Фосфорилирането на ССК II води до дисоциирането му от ФС II и до свързването му с ФС I, като се предполага, че този процес защитава растението от излишна светлина. Изследванията обаче показват, че след натрупване на PQH_2 се извършва фосфорилиране на ССК II, без това да се дължи на влиянието на светлината, а миграция на ССК II към ФС I не се наблюдава при въздействие с ниски температури на *Arabidopsis*. Установено е също, че след топлинен стрес при *Arabidopsis* редуцираният пластохинон благоприятства фосфорилирането на ССК II (Nellaepalli et al., 2011). След пика J, кривите показват по-високи стойности на флуоресценцията в сравнение с контролата при *L. barbarum* след третиране с 200 mM NaCl, а при *L. chinense* след третиране с 50 mM NaCl, и това може да се тълкува като повишена редукция на компонентите след ФС I. От друга страна показва намаляване на отделянето на електрони от ФС I и потискане на цикличния електронен пренос. Установените стойности на MDA и на H_2O_2 са най-високи след третиране на *L. barbarum* с 200 mM NaCl и на *L. chinense* с 100 mM NaCl (Фиг. 8А,В). Активността на SOD нараства постепенно с увеличаване на концентрацията на NaCl в хранителния разтвор и при двете растения (Фиг. 9А). Следователно този ензим е достатъчно ефективен в отстраняването на ROS, особено при *L. chinense* след третиране с най-високата концентрация на NaCl – 200 mM (нивото на MDA намалява до контролното). Намаляване на максималната флуоресценция - F_M се установява в условия на стрес (Strauss et al., 2007; Strasser et al. 2010, Mishra et al., 2011, Venkatesh et al., 2012). Минимално намаляване на F_M е отчетено единствено при *L. barbarum*, след третиране с 100 mM NaCl. Това може да се дължи най-вече на разграждане на протеините, влизаци в състава на ССК II и РЦ на ФС II (Yamane et al., 1999).

Резултатите, отразяващи квантовите добиви, показват минимално инхибиране на ϕ_{P_0} с 0.88% след третиране на *L. barbarum* с 50 mM NaCl, на ϕ_{E_0} с 0.44% и на ϕ_{R_0} с 7.90%,

след третиране на *L. barbarum* със 100 mM NaCl. Същевременно единствено ϕ_{Ro} е инхибиран с 10.39% след третиране на *L. chinense* с 50 mM NaCl (Фиг. 7А,В,С). Тези резултати могат да се тълкуват като слабо въздействие на солевия стрес върху светлинната фаза на фотосинтезата и при двете растения. Следващият индекс - PI_{ABS} показва значително увеличение с нарастване на концентрацията на NaCl в хранителния разтвор и при двете растения. Нарастването на стойностите на тези параметри е по-ярко изразено при *L. chinense*. Индексът PI_{Total} намалява само при *L. barbarum* след третиране с 50 и 100 mM NaCl, съответно с 9.82% и 1.13% (Фиг. 7Е,Ф). Тенденцията на промените, отчетени в параметъра ϕ_{Po} , PI_{ABS} и PI_{Total} , след третиране с нарастващи концентрации на NaCl на *L. chinense* са едни и същи, докато при *L. barbarum* установените стойности за PI_{ABS} и особено за PI_{Total} са значително по-ниски. От този факт може да се направи извод за по-голяма чувствителност на компонентите от електронния транспорт на ФС II, които са разположени в близост до ФС I при *L. barbarum* в сравнение с *L. chinense*. За разлика от повечето параметри, които отразяват активността на различни компоненти от светлинната фаза, индексът $DI_{O/RC}$ представлява количеството енергия, която се губи под формата на топлина при протичане на фотосинтезата в стресови условия. В този смисъл, той може да бъде по-точен показател за уврежданията, предизвикани от действието на стреса върху компонентите от светлинната фаза. Тенденцията на промени на този индекс е различна при двете растения и показва, че при *L. barbarum* той се увеличава с 2.27% след третиране с 50 mM NaCl, а след третиране със 100 и 200 mM NaCl – намалява с 5.04% и 21.47%, съответно. При *L. chinense* този показател намалява с 59.45%, 5.78% и 41.67% след третиране с нарастващи концентрации на NaCl (Фиг. 7D). $DI_{O/RC}$ е тясно свързан с най-чувствителния показател, отразяващ цялостното състояние на фотосинтетичния апарат – PI_{Total} , като корелира с него обратно пропорционално. Резултатите показват, че тенденцията на промени в скоростта на нето-фотосинтезата - P_N (Фиг. 4А), F_v/F_m (ϕ_{Po}) и PI_{ABS} (Фиг. 7А,Е) след третиране на *L. chinense* с нарастващи концентрации на NaCl е една и съща – най-ниски стойности на тези параметри са отчетени след третиране със 100 mM NaCl в сравнение с контролата. Намалената скорост на нето-фотосинтезата съвпада с намаления квантов добив от първичната фотохимична реакция, намалената ефективност на запазване на енергията на уловените кванти светлина от ФС II и увеличената топлинна дисипация след третиране на *L. chinense* със 100 mM NaCl. Това корелира с установената най-малка височина на надземните части и дължина на кореновата система на растението.

При нашите изследвания в условия на хидропоник е установено, че РЕРС и РРДК играят съществена роля в метаболизма на органичните киселини и установяването на CO₂ концентриращ механизъм, особено при фотосинтезата на *L. chinense*, тъй като ходът на промените на двата ензима съвпада с този на нето-фотосинтезата (Фиг. 5А).

Сравнявайки количествата на акумулираните алкални и алкалоземни метали в различни части от растенията, отгледани при хидропонни и оранжерийни условия става ясно, че Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ и K⁺ преобладават в надземните части на двете растения в сравнение с корените при отглеждане на незасолена и засолена почва (Таблицы 3 и 4). Количеството на Na⁺ е от цял порядък по-високо в надземните части на *L. chinense*, но количеството на K⁺ намалява в сравнение с *L. barbarum*, затова отчетените стойности

на съотношенията K^+/Na^+ в надземните части на *L. chinense* драстично намаляват в сравнение с *L. barbarum* при всички варианти на отглеждане (Таблица 4). Потенциалът за акумулация на алкални и алкалоземни метали на двете растения се определя до голяма степен от физико-химичните свойства на почвите, както и техния воден режим. Единствено при Na^+ се наблюдава акропетален градиент на разпределение след отглеждане на *L. barbarum* на торф-перлит и засолен почва, а при всички останали варианти – торф-перлит, незасолена и засолен почви, количеството на металите е най-високо в биодостъпната фракция, ниско в корените и по-високо в надземните части и на двата вида растения (Таблицы 2, 3 и 4).

Сравняването на резултатите от хидропонните и оранжерийните опити показва, че *L. barbarum* е по-слабо толерантен към засоляване в сравнение с *L. chinense*, тъй като съхранява по-големи количества Na^+ в корените в сравнение с надземните части (Таблицы 3 и 4), а биодостъпната фракция от незасолената почва съдържа двойно по-голямо количество Na^+ след прибиране на *L. barbarum* в сравнение с *L. chinense* (Таблица 2). Следователно при *L. barbarum* е по-силно изразен механизмът за избягване на стресовото влияние посредством отделянето на излишните количества Na^+ в ризосферната зона на корените. Увеличеното количество Na^+ в надземните части на *L. chinense* води до драстично намаляване на K^+/Na^+ съотношение в сравнение с корените (Таблицы 3 и 4), а по-високата толерантност към засоляване на този вид се дължи вероятно на по-благоприятното съотношение на K^+ и Ca^{2+} спрямо Na^+ , подобно на установените закономерности от Wei et al. (2003) за ечемик. Опитите на други изследователи определят *L. barbarum* като изключително подходящ за мелиорация на засолен почви поради факта, че добивите от него нарастват след отглеждането му върху засолен почва, след поливането ѝ със солена вода в продължение на няколко години в сравнение с плодородна почва, поливана с незасолена вода (Dou et al., 2011). Болшинството от изследванията са изведени с *L. barbarum* L., без да бъде направена съпоставка за толерантността му към засоляване с други видове от род *Lucium*, а закономерностите, които ние установяваме при отглеждането на двата вида важат за растения, които са адаптирани към определени почвени условия, веднага след размножаването им *in vitro*. Затова наблюдаваме по-бързо опадване на възрастните листа при *L. barbarum* в сравнение с *L. chinense* при отглеждане на засолен почва, в сравнение с незасолената и това може да се тълкува като проява на фитотоксичност. Сравнявайки обаче стойностите на съотношенията FW/DW при отглеждане на незасолена и засолен почва се оказва, че при *L. barbarum* повишението е съответно с 4% и 26% за надземните части и корените, докато при *L. chinense* е с около 2% (Таблица 5). Структурният анализ на листните петури показва, че тяхната дебелина, както и дебелината на палисадния и гъбчестия мезофил нарастват драстично при *L. chinense* в сравнение с *L. barbarum* след отглеждане на засолен почва, в сравнение с незасолената. Нашите резултати съвпадат с установените промени в листната морфология и на други растения под действие на NaCl – надебеляване на мезофила, удължаване на палисадните и гъбчестите клетки, и съответно намаляване на междуклетъчните пространства (Bruns and Hecht-Buchholz, 1990). Независимо от регистрираните по-високи стойности за скоростта на нето-фотосинтезата (P_N) и транспирацията (E) при *L. chinense* в сравнение с *L. barbarum*, се наблюдава тенденция

на намаляване на тези параметри при отглеждане на първото растение на засолената в сравнение с незасолената почва (Фиг. 13А,В). Ефективността на използване на водата (WUE) намалява почти двойно след отглеждане на *L. barbarum* върху засолената почва в сравнение с незасолената, докато при *L. chinense* установените разлики между тези два варианта са незначими (Фиг. 13С). Независимо от това, *L. barbarum* се отличава с по-благоприятен воден режим и ефективност на използване на водата в сравнение с *L. chinense*, което вероятно се дължи на по-голямото количество акумулиран K^+ в листата му (Таблица 4). Наблюдаваните изменения в количеството на хлорофилните пигменти не съвпадат с тенденцията на промени в скоростта на нето-фотосинтезата на растенията при трите варианта на отглеждане, което показва, че пътищата за адаптация на фотосинтетичния апарат могат да бъдат различни.

Ходът на характерните фази на транзиентната крива O-J-I-P е запазен както при контролния вариант (торф-перлит), така и след отглеждане на незасолената и засолената почва на растенията, но стойностите на флуоресценцията при второто растение остават по-ниски в сравнение с първото, подобно на хидропонния опит (Фиг. 14). За разлика от *L. barbarum*, при *L. chinense* изместването на кривите наляво по отношение на контролния вариант в последните два участъка $F_J - F_I$ и $F_I - F_P$, е значително. Началните стойности на флуоресценцията - F_0 нарастват и при двете растения след отглеждане на незасолената и засолената почва, а вероятната причина за това може да бъде намаляване на ефективността на преноса на енергия към РЦ на ФС II поради дисоциацията на ССК II от ядрото на ФС II (Kalaji and Rutkowska, 2004). Максималните стойности на флуоресценцията - намаляват с 7.6% само след отглеждане на *L. barbarum* на засолената почва, докато при *L. chinense* нарастват с 12.2% и с 6.7%, съответно, след отглеждането му на незасолената и засолената почва. От двете диаграми става ясно, че при отглеждане на *L. barbarum* на незасолената и засолената почва се установяват значително по-големи отклонения в избраните параметри в сравнение с *L. chinense*, отгледан при същите условия (Фиг. 15). Стойностите на отношението $F_v/F_m = \varphi_{Po}$ за *L. barbarum* са 0.82, а за *L. chinense* – 0.81 при отглеждане на растенията върху торф-перлит. Те са близки до 0.83-0.85, които са характерни за болшинството растения при контролируеми условия (Goltsev et al., 2014). Солевият стрес води до намаляване на параметрите φ_{Po} , φ_{Eo} и φ_{Ro} по различен начин и при двете растения (Фиг. 16А,В,С). В сравнение с φ_{Po} (където стойностите на инхибиране достигат 3.73% за *L. barbarum* и 0.54% за *L. chinense* по отношение на контролния вариант), влиянието на този стрес върху φ_{Eo} е много по-силно (23.56% и 5.37%, съответно), докато върху φ_{Ro} е по-слабо (14.51% and 2.87%, съответно). Параметърът DIo/RC се увеличава при същите условия на отглеждане на растенията с 37.55% и 13.02% (Fig. 16D). Параметрите PI_{ABS} и PI_{total} намаляват за *L. barbarum* на 57.02% и 48.87%, докато за *L. chinense* редуцията е само с 22.60% и 19.25% (Fig. 16E, F). Параметърът φ_{Po} се приема като един от най-стабилните и се използва широко при мониторинга върху състоянието на фотосинтетичния апарат на растенията при различни стресови въздействия (Strasser et al., 2004). Той е свързан с дезактивацията или пълната деградация на реакционните центрове на ФС II, така че минималната му инхибиция показва слабо влияние на солеви стрес върху тази фотосистема. По-голямото инхибиране на параметрите φ_{Eo} и φ_{Ro} в сравнение с φ_{Po} показва, че фотосинтетичния електронен транспорт в близост до ФС I е по-

чувствителен към стресовото влияние (Venkatesh et al., 2012). Параметърът D_{Io}/RC , показващ количеството енергия, която растението не може да използва за фотохимични реакции, е стимулиран в по-голяма степен при *L. barbarum* в сравнение с *L. chinense*, докато двата параметъра - PI_{ABS} и PI_{total} силно намаляват при *L. barbarum* и приблизително 2.5 пъти по-слабо при *L. chinense*. От тези резултати могат да бъдат направени няколко извода: 1/ PI_{ABS} е силно инхибиран при *L. barbarum* под действие на солевия стрес, без да се наблюдава корелация с регистрираните стойности на P_N ; 2/ φ_{P_0} е инхибиран в най-малка степен в сравнение с φ_{E_0} и φ_{R_0} , което показва висока толерантност на ФС II към солеви стрес и при двете растения; 3/ φ_{E_0} и φ_{R_0} са инхибирани в по-голяма степен при *L. barbarum* в сравнение с *L. chinense*; 4/ ние приемаме, че при *L. barbarum* се акумулира по-голямо количество PQH_2 , под влияние на солеви стрес, което води до намаляване на скоростта на електронния транспорт към ФС I. Тези промени в скоростта на междинния електронен транспорт, и по-специално във функцията на ФС I, могат да бъдат възприети като протекционен механизъм срещу акумулацията на ROS при протичане на фотосинтезата под действие на солеви стрес.

За разлика от хидропонния опит, при отглеждането на растенията като почвени култури се наблюдават съществени отклонения в параметрите ABS/RC и M_0 (виж Фиг.15). Стойностите на ABS/RC (характеризира потокът енергия, който се поглъща от един активен реакционен център) и M_0 (отразява скоростта, с която се закриват реакционните центрове на ФС II) нарастват постепенно след отглеждане на растенията на незасолена и засолена почва (Фиг. 15). Останалите два параметъра - RC/CS_0 (характеризира плътността на реакционните центрове, способни на редуцират Q_A) и N (характеризира количеството електрони, което е необходимо за пълното редуциране на всички акцептори след Q_A) намаляват в по-голяма степен след отглеждане на *L. barbarum* на незасолена и засолена почва в сравнение с *L. chinense* (Фиг. 15).

Резултатите показват, че независимо от различния морфо-физиологичен отговор на растенията при отглеждането им върху торф-перлит, нивото на окислителен стрес при тези условия е най-ниско, а двата вида се отличават с високи стойности на съотношението FW/DW за корени и надземни части (Таблица 5), съотношения хлорофил а/хлорофил b, хлорофил а+b/ каротеноиди и скорост на нето-фотосинтезата (Фиг. 13А). Това показва, че изборът на торф-перлит за дълготрайно отглеждане и съхранение на посадъчния материал от двете растения е сполучлив. Установените най-високи стойности за свежа и суха биомаса на корени и надземни части на *L. barbarum* не водят до най-благоприятно съотношение между тези параметри при отглеждане на растението на незасолена почва (Таблица 5), а установеното количество на MDA в листата му е най-високо при тези условия (Фиг. 17А). В същото време намалява значително количеството на нискомолекулните антиоксиданти – глутатион и аскорбат.

Нашите изследвания показват повишена активност на SOD и CAT при отглеждане на двата вида върху незасолена и засолена почва (Фиг. 18А,В), както и повишена активност на GR само при *L. barbarum* в сравнение с отглеждането им на торф-перлит (Фиг. 19В). Тези резултати корелират добре с установеното повишаване в количеството на MDA и на H_2O_2 (Фиг. 17А,В). Запазва се тенденцията за повишаване на активността на SOD с увеличаване на стресовото въздействие, установена при хидропонния опит. И

при двата опита ефективността на антиоксидантната защита на двете растения се определя по-скоро от протичането на ензимните, отколкото на неензимните процеси, а нарастването на активността на SOD, CAT и на GR при *L. barbarum*, регистрирано при оранжерийни условия е по-голямо, в сравнение с *L. chinense*.

Наблюдава се тенденция на увеличаване на стойностите и на PEPC, NADP-ME и PPDK при отглеждане на растенията при оранжерийни условия в сравнение с измерените при хидропонния опит. Резултатите от оранжерийните опити потвърждават предположението за основната роля, която изпълняват двата ензима - PEPC и PPDK при установяването на CO₂ концентриращ механизъм, особено при фотосинтезата на *L. barbarum*, тъй като ходът на промените на двата ензима съвпада с този на нето-фотосинтезата. При *L. chinense* ходът на промените в активността на двата ензима е обратно пропорционален на промените в скоростта на нето-фотосинтезата.

Резултатите от измерването на общата антиоксидантната активност при нашите опити трудно могат да бъдат съпоставяни с изследванията на други колективи, тъй като ние определяме тази активност в надземните части на растенията. Те показват, че водно-разтворимата фракция има най-високи стойности при отглеждане на растенията върху незасолена почва, докато мастно-разтворимата фракция – при отглеждане на растенията на засолена почва (Фиг. 20А,В). Изследванията на Dong et al. (2012), отнасящи се до промените в състава на плодовете на *Lycium barbarum* L. показват ясна зависимост от влиянието на факторите на околната среда. Количеството на полифенолите и на общата антиоксидантна активност в плодовете се определя от съдържанието на органичните вещества в почвата, на полизахаридите от количеството на достъпния P в нея, а на каротеноидите – от промените в температурата и осветеността, като между теглото на плодовете и температурните условия е установена обратно корелационна зависимост.

Изучаването на адаптивните възможности на *Lycium barbarum* L. и *Lycium chinense* Mill. при кратковременно и продължително действие на засоляването е добър подход за определяне на техния акумулационен потенциал с оглед на бъдещото им практическо приложение. Установяването на система от морфологични, биофизични, физиологични и биохимични маркери за характеризирание на механизмите на толерантност на двата вида е от съществено значение за използването им в качеството на биомонитори в силно засолени региони.

Сравнявайки отговорите на двата изследвани вида растения от род *Lycium* става ясно, че *Lycium barbarum* L. е по-чувствителен към засоляване в сравнение с *Lycium chinense* Mill.

VI. ИЗВОДИ

1. Установено е, че кратковременното действие на солевия стрес повишава отношението свежа/суха биомаса на корените и надземните части, скоростта на нето-фотосинтезата (P_N) и транспирацията (E) при *Lucium chinense* в сравнение с *Lucium barbarum*, независимо от по-голямото количество Na^+ , акумулиран в листата му.
2. В качеството на стресови маркери за характеризирани на по-високата толерантност на *Lucium chinense* при кратковременно действие на солевия стрес могат да служат повишените количества пластидни пигменти, квантов добив от първичната фотохимична реакция - F_v/F_m (ϕ_{Po}), ефективност на запазване на енергията на уловените кванти светлина от ФС II - PI_{ABS} , активност на супероксид дисмутаза (SOD) и намалената топлинна дисипация - DI_O/RC .
3. Установено е, че продължителното влияние на солевия стрес води до по-голяма акумулация на Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , и особено на Na^+ в надземните части на *Lucium chinense* в сравнение с корените. При отглеждане на *Lucium barbarum* на торф-перлит и засолен почва се установява акропетален градиент на разпределение единствено на Na^+ .
4. *L. barbarum* притежава по-ефективна антиоксидантна защита в сравнение с *L. chinense*, както при отглеждането на растенията в условия на хидропоник, така и при оранжерийни условия, като преобладават ензимните процеси на обезвреждане на ROS.
5. При отглеждане на *L. chinense* на незасолена и засолен почва се установяват значително по-малки отклонения в квантовите добиви - ϕ_{Po} , ϕ_{Eo} , ϕ_{Ro} , както и в PI_{ABS} и PI_{total} в сравнение с *L. barbarum*, отгледан при същите условия, докато DI_O/RC нараства слабо. Тези показатели могат успешно да бъдат използвани като биофизични маркери, заедно с биохимичните - супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион редуктаза (GR) за характеризирани на толерантността на растенията при дълговременно влияние на солевия стрес.
6. Устойчивостта на изследваните видове се определя от съчетаването на механизми за избягване на стреса – екскреция на излишните количества Na^+ в коренообитаемата зона, опадване на по-старите листа, които съдържат по-големи количества Na^+ и съхраняване на K^+ хомеостаза, с механизми на толерантност към стрес – антиоксидантна защита, по-силно изразени при *L. barbarum*.
7. *L. chinense* е значително по-устойчив към засоляване в сравнение с *L. barbarum*, поради което следва да бъде предпочетен за рекултивация на засолен почви.

VII. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е установен акропетален градиент в разпределението на Na^+ при отглеждане на *Lucium barbarum* върху торф-перлит и засолен почва. Акумулирането на алкални и алкалоземни метали е по-голямо в надземните

части, в сравнение с корените на *Lycium barbarum* и най-вече на *Lycium chinense*, при отглеждане на незасолена и засолена почва. Доказано е, че при отглеждането на тези видове на незасолена почва растенията екскретират голяма част от Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ и K^+ в ризосферната зона на корените, като намаляват рН на биодостъпната фракция от нея.

2. Комплексният сравнителен анализ чрез метода на хлорофилната флуоресценция показва за първи път по-слаба чувствителност на ФС II към солеви стрес, като параметрите ϕ_{Po} , ϕ_{Eo} , ϕ_{Ro} , PI_{Total} , PI_{ABS} , $DI_{O/RC}$ се променят значително по-малко при толерантния към засоляване *Lycium chinense* в сравнение с чувствителния *Lycium barbarum*.
3. Установена е връзка между промените в анатомията на листата и интензивността на газовата обмяна и водния режим на *Lycium barbarum* и на *Lycium chinense* (скорост на нето-фотосинтеза, транспирация, ефективност на използване на водата), в следствие на повишената степен на засоляване. В качеството на стресови маркери могат да бъдат използвани параметрите ϕ_{Po} , ϕ_{Eo} , ϕ_{Ro} , PI_{Total} , PI_{ABS} , $DI_{O/RC}$, както и ензимите – супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион редуктаза (GR).
4. За първи път е установено, че *Lycium chinense* се отличава с по-висок акумулационен потенциал и по-висока толерантност към засоляване, в сравнение с *Lycium barbarum* при отглеждане на засолена почва. Доказано е, че устойчивостта на двата вида към засоляване се дължи на съчетаването на механизми за избягване на стреса и толерантност към стрес, по силно изразени при *Lycium barbarum*.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Dimitrova, V.**, T. Georgieva, Y. Markovska. 2016. Influence of salt stress on some physiological characteristics of two *Lycium* varieties grown *ex vitro* in hydroponic, **Ann. de l' Univ. De Sofia "St. Kliment Ohridski", fac. De Biologie**, 101(4), 141-148.
2. **Dimitrova, V.**, T. Georgieva, M. Geneva, Y. Markovska. 2017. Determination of total antioxidant activity in two *Lycium* species grown *ex vitro* at high salinity in hydroponic, **Ann. de l' Univ. De Sofia "St. Kliment Ohridski", fac. De Biologie**, 102(4), 176-185.
3. **Dimitrova, V.**, K. Ivanova, P. Petrov, S. Anev, N. Tzvetkova, T. Georgieva, Y. Markovska. 2017. Influence of salt stress on leaf morphology and photosynthetic gas exchange in two *Lycium* species, **Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.**, 70(3), 367-374. **IF-0.233**
4. **Dimitrova, V.**, P. Petrov, M. Geneva, Y. Markovska. 2017. Effect of soil salinity on leaf anatomy and antioxidant defense in two *Lycium* species, **Genetics and Plant Physiol.**, vol. 7 (1-2), 49-61.

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Dimitrova, V.**, T. Georgieva, K. Ivanova, Y. Markovska. 2016. Effect of salt stress on the growth and antioxidant defense of two *Lycium* species, Seminar of Ecology – 2016 with international participation, 21-22 April 2016, Abstracts, p. 68.
2. **Dimitrova, V.**, T. Georgieva, M. Geneva, Y. Markovska. 2017. Assessment of the impact of salinity on the growth and antioxidant activity of two *Lycium* species, Seminar of Ecology – 2017 with international participation, 27-28 April 2017, Abstracts, p. 40.
3. **Dimitrova, V.**, T. Georgieva, M. Paunov, V. Goltsev, Y. Markovska. 2017. Effect of salt stress on chlorophyll a fluorescence of two *Lycium* species grown *ex vitro* in hydroponic, Младежка научна конференция с международно участие „Климентови дни”, 16-17 ноември 2017, Резюмега, стр. 138.

X. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

Иванова, К. 2016. Физиолого-биохимични проучвания на устойчивостта към засоляване на различни линии *Paulownia*, Автореферат, СУ „Св. Кл. Охридски”, София, 40 стр.

Колакъзов, М. 2015. Хормонална регулация на устойчивостта към нискотемпературен стрес на *Arabis alpina* от френските Алпи и Рила планина, Автореферат, СУ „Св. Кл. Охридски”, София, 46 стр.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*, In: Methods in Enzymol., 105 (Colowick S.D., Caplan N.O., eds.), pp 120-126, Academic Press, New York.

Ashton, A.R., Burnell, J.N., Furbank, R.T., Jenkins, C.L., Hatch, M.D. 1990. Enzymes of C₄ photosynthesis, In: Methods in plant biochemistry, enzymes of primary metabolism (Dey, P.M., Harborne, J.B., eds.), pp 39-72, Academic, London.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, Plant and Soil, 39, 205-207.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, Anal.Biochem., 239, 70-76.

Bruns, S., Hecht-Buchholz, C. 1990. Light and electron-microscope studies on the leaves of several potato cultivars after application of salt at various developmental stages, PotatoRes., 33, 33–41.

Dong, J.Z., Wang, Sh. H., Zhu, L., Wang, Y. 2012. Analysis on the main active components of *Lycium barbarum* fruits and related environmental factors, J. Medic. Plants Res., 6(12), 2276-2283.

Dou, Ch.-Y., Kang, Y.-H., Wan, Sh.-Q., Hu, W. 2011. Soil salinity changes under cropping with *Lycium barbarum* L. and irrigation with saline-sodic water, Pedosphere, 21(4), 539-548.

Doumett S., Lamperi L., Checchini L., Azzarello E., Mugnai S., Mancuso S., 2008. Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa* in a pilot-scale assisted phytoremediation study: influence of different complexing agents, Chemosphere, 72, 1481-1490.

- Foyer C.H., Rowell J., Walker D.**, 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf, protoplasts and chloroplasts during illumination, *Planta*, 157, 239-244.
- Garnier-Dardart, J., Quieroz, O.** 1974. Malic enzyme in the leaves of *Bryophyllum daigremontianum*, *Phytochemistry*, 13, 1695-1702.
- Goltsev V., Kalaji H., Kouzmanova M., Allakhverdiev S.** 2014. Variable and delayed chlorophyll a fluorescence. Basics and application in plant sciences. (Pashchenko, V.Z., Krendeleva, T.E., eds.), Moscow–Izshevsk: Inst.Comp.Sci., pp. 220.
- Griffith O.W.** 1980. Determination of glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine, *Anal. Biochem.*, 106, 207-212.
- Heath R.L., Packer L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 189–190.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I.** 1941. The water culture method for growing plants without soil, *Miscellaneous Publ.*, 354, 347-461.
- Jessup W., Dean R.T., Gebicki J.M.** 1994. Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins, *Methods in Enzymol.*, 233, 289-303.
- Kalaji, M., Rutkowska, A.** 2004. Reakcije aparatu fotosyntetycz negosiewek kukurydzy na stresssolny, *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 496, 545-558.
- Lichtentaler N.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymol.*, 148, 350-383.
- Liu, N., Guan, L.** 2012. Linkages between woody plant proliferation dynamics and plant physiological traits in southwestern North America, *J. Plant Ecology*, 5, 407-416.
- Lloyd, G., McCown, B.** 1981. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, 30, 421-427.
- Lowry O.H., Rosenbough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Marklund, S., Marklund, G.** 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474.
- Mishra, A., Mishra, K.B., Höermiller, I.I., Heyer, A.G., Nedbal, L.** 2011. Chlorophyll fluorescence emission as a reporter on cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions, *Plant Sign. Behav.*, 62, 301–310.
- Munns, R., Greenway, H., Kirst, G.O.** 1983. Halotolerant eukaryotes, In: *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series, Vol. 12C)*, (Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond C.B., Ziegler, H.H., eds.), pp 59–135, Springer-Verlag, Berlin.
- Murashige, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Nakano Y., Asada K.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.
- Nellaepalli, S., Kodru, S., Subramanyam, R.** 2012. Effect of cold temperature on regulation of state transitions in *Arabidopsis thaliana*, *J. Photochem. and Photobiol.*, 112, 23-30.

- Nellaepalli, S., Mekala, N.R., Zsiros, O., Mohanty, P., Subramanyam, R.** 2011. Moderate heat stress induces state transitions in *Arabidopsis thaliana*, *Biochim. Biophys. Acta*, 18079, 1177–1184.
- Pfeffer H., Dannel F., Römheld V.** 1998. Are there connection between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? *Physiol. Plant.*, 104,479-485.
- Polle A., Otter T., Seifert F.** 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.), *Plant Physiol.*, 106, 53-60.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M.** 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolibdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E, *Anal. Biochem.*, 269, 337-341.
- Sherwin H.W., Farrant J.M.** 1998. Protection mechanisms against excess light in resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*, *Plant Growth Regul.*, 24, 203-210.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S., Goltsev, V.** 2010. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 1313-1326.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A.** 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, In: Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration*, 19 (Papageorgiou, G. C., Govindjee, eds.), pp 321-362, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Strauss, J.A., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J., van Heerden, P.D.R.** 2007. The role of low soil temperature in the inhibition of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance, *Physiol. Plant.*, 131, 89–105.
- Tepe B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A.** 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food Chem.*, 95, 200-204.
- Toth, S. Z., Schansker, G., Strasser, R. J.** 2007. In intact leaves, the maximum fluorescence level FM is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1708, 275 – 282.
- Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Yu, J.W., Hemavathi, A., Kim, D.H., Strasser, R.J., Park, S.W.** 2012. Chlorophyll a fluorescence transient analysis of transgenic potato overexpressing D-galactouronic acid reductase gene for salinity stress tolerance, *Hort. Environ. Biotechnol.*, 534, 320–328.
- Wei, W.X., Bilsborrow, P.E., Hooley, P., Fincham, D.A., Lombi, E., Forster, B.P.** 2003. Salinity induced differences in growth, ion growth, ion distribution and partitioning in barley between the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise, *Plant Soil*, 250, 183-191.
- Yamane, K., Aya, I., Namie, S., Nariai, H.** 1999. Strength of CO₂ hydrate membrane in sea water at 40 MPa, *Proceedings of 3rd Int. Conf. on Gas Hydrate*, Sault Lake Sity, USA.
- Yuan Y. J., Li C., Hu Z.D., Wu J.C., Zeng A.P.** 2002. Funga elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *Mairei* for taxol production, *Process Biochem.*, 38, 193-198.
- Zhishen J, Mengcheng T., Jianming W.,** 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chem.*, 64, 555-559.