

Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Биологически факултет

Катедра „Биофизика и радиобиология“

---

Момчил Мартинов Паунов

**Разработване на биофизичен подход за фенотипиране и оценка  
на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при  
растенията**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за присъждане на научната и обзаводателна степен „доктор“

професионално направление 4.3. Биологически науки

Научен ръководител: проф. д-р Василий Николаевич Гольцев

София, 2020 г.



## Съдържание

<b>1. Увод</b> .....	6
<b>2. Цел и задачи</b> .....	8
<b>3. Материали и методи</b> .....	10
3.1. Растителен материал, отглеждане и третиране на растенията.....	10
3.1.1. Отглеждане на <i>Scenedesmus</i> в различни по източник на азот и концентрация на CO <sub>2</sub> хранителни среди.....	10
3.1.2. Третиране на слънчоглед с хербицид имазамокс и биостимулант аминокиселинен екстракт .....	10
3.1.3. Засушаване и възстановяване на водното съдържание при два екотипа източен чинар.....	11
3.1.4. Отглеждане на грах при различни светлинни условия .....	12
3.2. Измерване на индукционни криви на флуоресценцията на хлорофил <i>a</i> .....	15
3.3. Обработка на данните и статистически анализи .....	17
<b>4. Резултати и обсъждане</b> .....	22
4.1. Ефект на качеството и количеството на хранителните вещества върху ФСА при <i>Scenedesmus sp.</i> .....	22
4.2. Влияние на имазамокс и аминокиселинен екстракт върху ФСА при слънчоглед	33
4.3. Ефект на засушаването и възстановяването на водното съдържание върху ФСА при два екотипа източен чинар .....	42
4.4. Влияние на качеството и количеството на светлината върху ФСА и способността за цъфтеж при грах .....	51
<b>5. Обобщение на получените резултати</b> .....	58
<b>6. Изводи</b> .....	62
<b>7. Приноси</b> .....	64
<b>8. Научни публикации по темата на дисертационния труд</b> .....	65
<b>9. Участия в научни форуми</b> .....	67
<b>10. Цитирани литературни източници</b> .....	68

## Използвани съкращения

<b>АКЕ</b>	аминокиселинен екстракт
<b>АТФ</b>	аденозинтрифосфат
<b>Б</b>	бяла светлина
<b>БГ</b>	български екотип
<b>БС</b>	бяла слаба светлина
<b>ГК</b>	главни компоненти
<b>ДК</b>	диференциална/и крива/и
<b>ЕТВ</b>	електрон-транспортна верига
<b>ИК</b>	индукционна/и крива/и
<b>ИТ</b>	италиански екотип
<b>КОС</b>	Кислород-отделяща система
<b>НАДФ<sup>+</sup></b>	никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат
<b>ПХ</b>	пластохинон
<b>Рубиско</b>	рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза/оксигеназа
<b>РЦ</b>	реакционен център / реакционни центрове
<b>ССК1</b>	светосъбиращ комплекс на фотосистема 1
<b>ССК2</b>	светосъбиращ комплекс на фотосистема 2
<b>СЧ</b>	синьо-червена светлина
<b>СЧС</b>	синьо-червена слаба светлина
<b>ТМ</b>	тилакоидни мембрани
<b>ТС</b>	тъмнинни спадове на флуоресценцията
<b>Фео</b>	феофитин
<b>ФНР</b>	фередоксин-НАДФ <sup>+</sup> редуктаза
<b>ФС1</b>	фотосистема 1
<b>ФС2</b>	фотосистема 2

<b>ФСА</b>	фотосинтетичен апарат
<b>хл.</b>	хлорофил
<b>V<sub>t</sub></b>	относителна вариабилна флуоресценция
<b>qP</b>	фотохимично гасене на флуоресценцията
<b>NPQ</b>	нефотохимично гасене на флуоресценцията
<b>PPFD</b>	плътност на потока фотосинтетично-активни фотони

## 1. Увод

В природни условия растенията постоянно са подложени на неблагоприятното въздействие на факторите на околната среда, които при голямо отклонение от нормалните стойности се превръщат във фактори на стрес, предизвикващи неблагоприятни изменения в растението и довеждащи до потискане на растежа и развитието на растението и в крайна сметка дори до смърт. Влиянието на външните фактори е силно намалено при отглеждане на растения в изкуствена среда (оранжерии, биореактори за микроводорасли), но постигането на максимални добиви зависи от намиране на оптимални условия за дадения вид. За ефективно управление на селскостопанските култури и мониторинг на природните екосистеми са необходими неинвазивни, бързи и евтини методи и подходи за оценка на наличието и силата на действащия стрес върху жизнеността на растенията. Пример за такъв метод е анализът на хлорофилната флуоресценция – биофизичен процес характерен за фотосинтезиращите организми, които имат голямо значение за човека – висши растения и микроводорасли. Той дава възможност за задълбочен анализ на фотосинтетичните реакции *in vivo* и *in situ* чрез прилагане на различни протоколи и получаване на редица параметри. Това прави метода добре познат и широкоизползван в научната практика за проследяване ефекта на различни фактори върху фотосинтетичния апарат, но приложението му в практиката все още е ограничено. Това от една страна се дължи на цената на апаратурата, а от друга на не съвсем лесната интерпретация на резултатите. Докато първият проблем може да се счита за почти решен с разработването на все по-достъпни апарати през последните години, то вторият е по-сериозен и извличането на полезна обобщаваща информация от многобройните параметри е основна задача за улесняване на използването на метода като подход за описание на цялостното състояние на различни растителни обекти при различни стресови фактори. Освен това, ефекта на тези фактори много често е на границата на стреса и често действието върху фотосинтетичните реакции не е пряко, а косвено, което налага нуждата от намиране на най-чувствителни параметри, които първи реагират на външните промени.

В настоящата работа е разработен високо информативен и надежден биофизичния подход за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията основаващ се на анализа на хлорофилната флуоресценция.

Подходът позволява описание на стресовия отговор към разнообразни по вид и интензитет стресови фактори, които имат значение както в природата, така и в изкуствени условия на отглеждане. Анализирани са кинетиката на фотоиндуцираните преходи на флуоресценцията в точкови проби на цели растения и водораслови суспензии и е изучен стресовият отговор на растенията при прилагане на четири вида абиотични стресови фактори – химични агенти, различен състав на хранителни среди, различни светлинни условия и засушаване. При някои обекти е анализирана динамиката на стреса и са дефинирани състояния, характеризиращи определени стадии на стресовия отговор и свързаните с тях параметри, а при други е проверена възможността за предсказване на конкретен макроефект при различни условия. Разработеният подход може да намери приложение при управление на селскостопански полета и оранжерийни култури и за екологичен мониторинг.

## 2. Цел и задачи

Новите предизвикателствата, свързани с решаването на продоволствения и енергийния проблеми на човечеството, както и напрегната екологична обстановка, засилена от глобалното затопляне, изискват нови възможности за постоянен мониторинг на състоянието на растителните организми. Това поставя на дневен ред разработване на високоинформативни и високочувствителни биофизични експериментални подходи за анализ на прижизненото състояние на растителните обекти. През последните две десетилетия анализът на хлорофилната флуоресценция широко се използва за мониторинг на стресови ефекти върху растенията. Динамиката на излъчването на хлорофилната флуоресценция в различни времеви диапазони отразява не само фотоиндуцираните реакции във ФСА на растенията, непосредствено влияещи върху ефективността на излъчването на флуоресцентните кванти, но и други процеси в хлоропластите, растителната клетка и растението като цяло. Затова целта на настоящата работа е:

Разработване на биофизичен подход, базиращ се на регистриране и анализ на фотоиндуцираната динамика на хлорофилната флуоресценция, който да се използва за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растения с различна организация и при въздействие на различни външни фактори.

За осъществяване на целта планирахме да изпълним следните задачи:

1. Да се анализира влиянието на условията на култивиране (азотни източници и концентрация на въглеродния диоксид) върху ФСА в клетъчни суспензии на *Scenedesmus*;
2. Да се анализира ефектът на хербицида имазамокс върху ФСА на слънчогледови растения;
3. Да се анализира ефектът на биостимулант *Terra-sorb foliar* върху ФСА на слънчогледови растения;
4. Да се анализира комбинираният ефект на хербицида и биостимуланта върху ФСА на слънчогледови растения;
5. Да се анализира влиянието на водния режим (засушаване и повторно оводняване) в листа на млади дръвчета от два екотипа (български и италиански) източен чинар;



6. Да се проучи влиянието на количеството и качеството на светлината върху ФСА и връзката му със способността за цъфтеж при отглеждане на грахови растения.

### 3. Материали и методи

#### 3.1. Растителен материал, отглеждане и третиране на растенията

##### 3.1.1. Отглеждане на *Scenedesmus* в различни по източник на азот и концентрация на CO<sub>2</sub> хранителни среди

Неаксенични монокултури от едноклетъчни водорасли *Scenedesmus sp.* щам BGP са отглеждани автотрофно в четири типа хранителна среда по стандартен протокол (Georgiev 1978):

1. Среда 1 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) с 2% CO<sub>2</sub> – нормални условия на отглеждане, контролен вариант
2. Среда 1 с 0.04% CO<sub>2</sub>
3. Среда 2 (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) с 2% CO<sub>2</sub>
4. Среда 2 с 0.04% CO<sub>2</sub>

За анализ на фотосинтетичната активност културите са събрани на 72-рия час от инкубацията, на средата на експоненциалната фаза на растеж.

##### 3.1.2. Третиране на слънчоглед с хербицид имазамокс и биостимулант аминокиселинен екстракт

В този експеримент е използван слънчоглед (*Helianthus annuus L.*) хибрид *Mildimi* по технология *Clearfield*, носещ халотип 5 на ген AHAS1 (белег *Imisun*). След формирането на добре развита трета листна двойка растенията са разделени на 4 групи:

1. Контролни растения – не са третирани нито с хербицид имазамокс (*imazamox*), нито с аминокиселинен екстракт (АКЕ);
2. Растения, чиито листа са третирани с аминокиселинен екстракт (АКЕ) *Terra-sorb foliar*, Bioiberica, Барселона, Испания в количество 10 µl на растение, еквивалентно на 3 L ha<sup>-1</sup>. Това е биостимулант съставен от белтъчни хидролизати, който се получава чрез ензимно разграждане на животински тъкани.
3. Растения, чиито листа са третирани с хербицид имазамокс (*imazamox*) с търговско наименование *Pulsar 40*, BASF, Германия. Приложен е в количество 132 µg на растение, еквивалентно на 40 g.ha<sup>-1</sup> активна съставка;

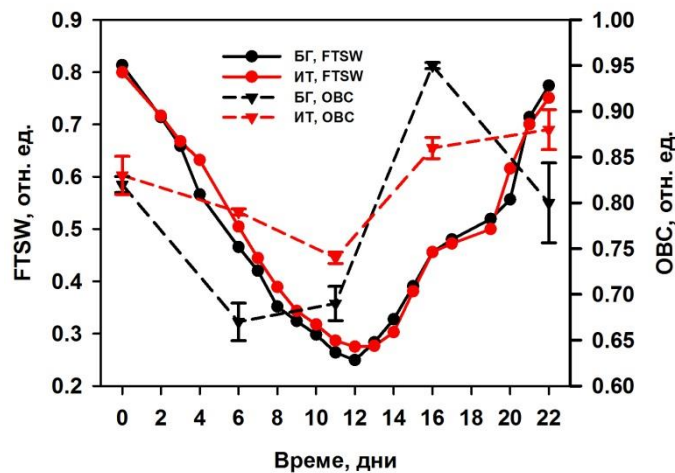
4. Слънчогледови растения, подложени на комбинирано третиране с имазамокс и АКЕ.

На 7-мия ден след третирането са проведени флуоресцентните изследвания на последният напълно развит лист.

### 3.1.3. Засушаване и възстановяване на водното съдържание при два екотипа източен чинар

Семена от два екотипа източен чинар (*Platanus orientalis* L.) са събрани от естествените им местообитания: дефилето Кресна, България и Сицилия, Италия и посети в Института по физиология на растенията и генетика, Българска академия на науките. Едномесечните прорастъци са пресадени в малки саксии в Катедрата по биофизика и радиобиология, Биологически факултет, Софийски университет и са поставени във фитостатен бокс. Водният режим на всяко растение в началото на отглеждането е 50 ml на седмица, после се повишава до 100 и накрая до 500 ml на седмица, съответствайки на нарастващите водни нужди на растенията.

Засушаването на почвата продължава 12 дни, а възстановяването на влажността ѝ – 10 дни, като и двете се провеждат постепенно. Нивото на водния дефицит се следи по водното съдържание в саксиите (FTSW – *fraction of the transpirable soil water*) и в листата (ОВС – относителното водно съдържание). FTSW за деня (0) преди започване на експеримента е 0.8, на 12-тия ден (най-засушени) – около 0.25, след което се възстановява до 0.76 на последния, 22-ри ден (Фигура 1). Дневната промяна на FTSW е около 0.05. ОВС се анализира веднъж на всеки 5 дни, тъй като изисква разрушаване на листата. Промяната му по време на експеримента е значително по-малка от промяната на FTSW – в границите от 0.85 до 0.65 и е различна за двата екотипа.



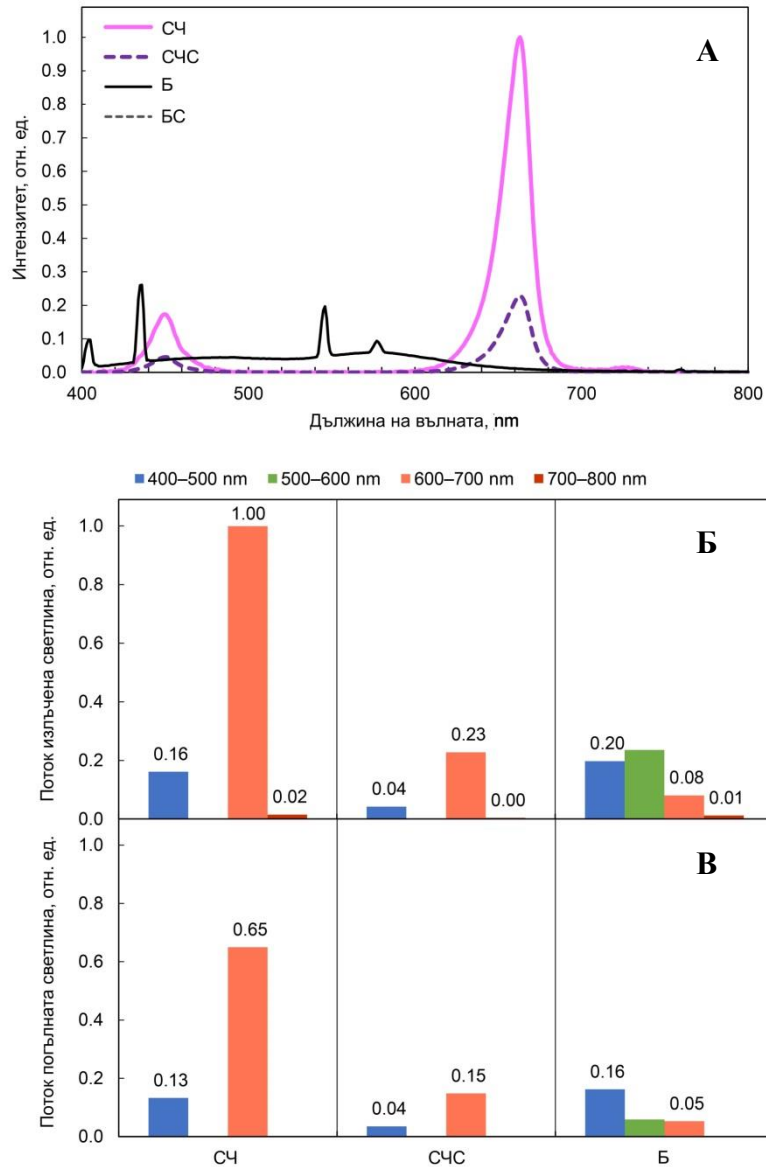
**Фигура 1.** Промяна на частта на транспираиращата се почвена вода (FTSW) и относителното водно съдържание на листата (OVC) по време на експеримента, проследяващ стресовия отговор на млади дръвчета *Platanus orientalis*, отгледани от семена от български (БГ) и от италиански (ИТ) екотип към засушаване и възстановяване на влажността.

Динамиката на водния стрес е проследена през цялото време на експеримента чрез измерване на хлорофилната флуоресценция в добре развит лист от среден етаж на дръвчетата през ден.

### 3.1.4. Отглеждане на грах при различни светлинни условия

Шестдневни прорастъци на грах (*Pisum sativum* L. cv. *RAN 1*), отгледани при бяла светлина ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD, студена дневна флуоресцентна TL-D 36W/54-765 1SL/25 Philips, цветна температура 6200 K, фотопериод 16/8 часа светлина/тъмнина) са поставени при различни светлинни условия (без промяна на останалите условия на отглеждане) за още 7 или 25 дни: бяла (Б) флуоресцентна светлина ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD), бяла слаба (БС) флуоресцентна светлина ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD), синьо-червена (СЧ) диодна светлина ( $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD) и синьо-червена слаба (СЧС) диодна светлина ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD). Диодната светлина съответства на комбинация от 3 сини ( $\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$ ), 15 свръхчервени ( $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$ ) и 2 далечно-червени диоди ( $\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$ ) (съотношение синя:червена:далечно-червена светлина 15%:75%:10%). Осветяване СЧ е препоръчано от производителя на светодиодите, OSRAM Opto Semiconductors, за стимулиране на цъфтеж при растения. Интензитетите на светлинните условия СЧ и СЧС съответстват на максималната и минималната осветеност на

камерите за отглеждане на растения, произведени от Метагал ООД (София, България). Камерите са изработени от PVC плоскости KömaTex (Kömmerling, Пирмазенс, Германия) с добра отразяваща способност и панел от четири лампи (всяка лампа има мощност 16 W и съдържа комбинацията диоди, спомената по-горе). Представени са спектрите на излъчване на диодните и флуоресцентните светлинни източници (Фигура 2А) и относителните стойности на плътността на излъчения светлинен поток за четири области от видимия спектър: синя (400-500 nm), зелена (500-600 nm), червена (600-700 nm) и далечно червена (700-800 nm) (Фигура 2Б). Основавайки се на спектрите на поглъщане на фотосинтетичните пигменти (Nishio 2000, Laisk, Oja et al. 2014), е направена груба количествена оценка на светлинния поток, който може да се усвои от ФСА (погълне от листата), за различни части от спектъра (Фигура 2В) като плътността на светлинния поток, излъчен от източника, във всяка от четирите спектрални области е умножен по изчисления абсорбционен коефициент на листа за съответната област (Nishio 2000). Флуоресцентните измерванията са направени на втория напълно развит лист на 7-мия ден след поставяне на растенията при четирите различни светлинни условия.



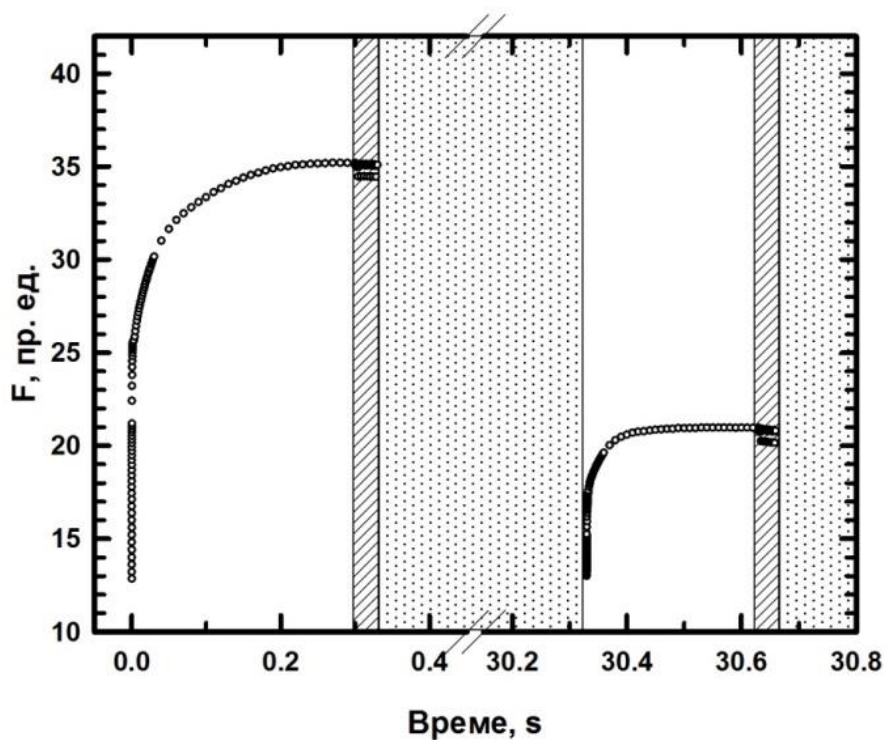
**Фигура 2.** **А** Спектър на излъчване на четири типа светлинни източници, използвани за отглеждане на *Pisum sativum*: бял (Б) флуоресцентен, бял слаб (БС) флуоресцентен, синьо-червен (СЧ) диоден и синьо-червен слаб (СЧС) диоден. **Б** Интензитет на светлинния поток, излъчен от четирите светлинни източници. **В** Интензитет на потока на погълната от листата светлина, излъчена от четирите светлинни източници, за четири области от видимия спектър: синя (400-500 nm), зелена (500-600 nm), червена (600-700 nm) и далечно червена (700-800 nm).

### 3.2. Измерване на индукционни криви на флуоресценцията на хлорофил *a*

Индукционните преходи на флуоресценцията на хл. *a* при слънчогледа са измерени с преносимия флуориметър *Handy PEA (Handy Plant Efficiency Analyzer)*, а при всички останали експерименти е използван флуориметър *M-PEA (Multi-function Plant Efficiency Analyzer)*. И двата апарата са произведени от *Hansatech Instruments, Кингс Лин, Обединено Кралство*. Всеки флуоресцентен запис се извършва *in vivo* след закачане на измервателна щипка за определена част от листа на растението и закрепянето ѝ за главата на апарата. Щипката ограничава измерваната площ до около 13 mm<sup>2</sup> и може да се затваря и отваря чрез метална пластинка. За измерване на водорасли, суспензиите се накапват върху затворена щипка, поставена в хоризонтално положение.

Преди измерване ФСА трябва да е в тъмнинно-адаптирано състояние, което е постигнато чрез затъмняване за 1 час на целите растения или суспензии за всички обекти, освен за слънчогледа, при който единствено измерените точки от листата са затъмнени чрез затваряне на щипките за 1 час. Индукционните криви са регистрирани с измервателен протокол, съдържащ единичен запис на интензитета на флуоресценция за 1 секунда по време на осветяване с насищаща фотосинтетично-активна светлина с интензитет 3000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD (максимума на *Handy PEA*) за слънчогледа и 4000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD за останалите обекти.

Преди флуоресцентните измервания на суспензиите от *Scenedesmus sp.*, хлорофилната им концентрация е определена спектрофотометрично и е уеднаквена чрез разреждане до 1 mg(хл.).ml<sup>-1</sup>. При тях освен протоколът за регистрация на индукционните преходи е използван и протокол за регистрация на гасенето на флуоресценцията (Фигура 3). Той се състои от два последователни флуоресцентни записа при 4000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD: първият е по-дълъг (300 ms) и не съдържа тъмнинни интервали, а вторият е по-къс (30 ms) и съдържа тъмнинни интервали от 1 ms. Двата записа се повтарят през 30 s в рамките на 10 минути като между записите пробите се осветяват с ненасищаща фотосинтетично-активна светлина с интензитет 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD.



**Фигура 3.** Първи два флуоресцентни записа от протокола за регистрация на гасенето на флуоресценцията, използван при *Scenedesmus sp.* Обектите се подлагат на три различни светлинни режима, които се редуват: непрекъсната насищаща светлина с интензитет  $4000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  PPFД за 0.3 s (бял фон), прекъсното осветяване (съдържащо 7 периода тъмнина, продължаващи по 1 ms) с насищащата светлина за 0.03 ms (фон с напречни линии) и осветяване с ненасищаща светлина с интензитет  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  PPFД за 30 s (фон с точки). Флуоресценцията се измерва само по време на осветяването с насищаща светлина: по време на непрекъснатото осветяване се записва индукционното нарастване на флуоресценцията, а по време на прекъснатото осветяване – спадовете на флуоресценцията след тъмнинни периоди от по 1 ms. Протоколът съдържа общо 21 флуоресцентни записа и продължава 10 минути.



### 3.3. Обработка на данните и статистически анализи

Апаратите записват интензитета на флуоресценцията в произволни (условни) единици ( $F$ ). Те се превръщат в единици на относителна вариабилна флуоресценция ( $V_t$ ) чрез двойно отнасяне (нормиране) към минималната стойност  $F_0$  ( $V_t = 0$ ) и максималната  $F_M$  ( $F_P$ ) ( $V_t = 1$ ). Когато стойностите на  $V_t$  за контролата се извадят от стойностите на  $V_t$  за другите варианти (за еднакви стойности на индукционното време) се построяват диференциални криви (ДК). Освен от цялата ИК на  $V_t$ , ДК могат да се получат и след двойно нормиране на флуоресцентния сигнал към междинни стъпки ( $F_K$ ,  $F_J$  и  $F_I$ ).

Стойностите интензитета на флуоресценцията  $F_0$ ,  $F_{50\mu s}$ ,  $F_{300\mu s}$  ( $F_K$ ),  $F_J$ ,  $F_I$ ,  $F_P$  от ИК и площта над ИК до  $F_M$  се използват за изчисляване на крайните биофизични параметри на JIP теста (Strasser, Srivastava et al. 1995, Strasser, Tsimilli-Michael et al. 2004, Tsimilli-Michael and Strasser 2008, Strasser, Tsimilli-Michael et al. 2010, Stirbet and Govindjee 2011, Kalaji, Goltsev et al. 2012, Tsimilli-Michael and Strasser 2013). В настоящата работа са използвани 20 JIP параметъра, чиито определения са представени в Таблица 1.

$F_0$	Минимална флуоресценция
$F_M$	Максимална флуоресценция
$t(F_M)$	Време за достигане на $F_M$
$\varphi_{Po}$	Максимален квантов добив на първичната фотохимична реакция на ФС2
$\varphi_{Eo}$	Квантов добив на електронния транспорт до междусистемните преносители
$\varphi_{Ro}$	Квантов добив на електронния транспорт до крайните акцептори на ФС1
$V_J$	Относителна вариабилна флуоресценция на стъпка J от ИК
$\gamma_{RC}$	Вероятност хл. молекула от ФС2 да функционира като РЦ
$S_m$	Нормирана площ над ИК; Електронни преносители за 1 активен РЦ
$N$	Оборотно число на редукция на $Q_A$ – брой реакции по редукция на $Q_A$ за $t(F_M)$
$M_0$	Апроксимиран начален наклон на ИК
$ABS/RC$	Поток на погълната от антенните молекули хл. енергия за 1 активен ( $Q_A$ -редуциращ) РЦ
$TR_0/RC$	Поток на уловената енергия (водещ до редукция на $Q_A$ ) за 1 активен РЦ
$ET_0/RC$	Поток на електронния транспорт след $Q_A^-$ за 1 активен РЦ
$RE_0/RC$	Поток на електронния транспорт редуциращ крайните акцептори на ФС1 за 1 активен РЦ
$RC/CS_0$	Повърхностна плътност на активните РЦ
$DI_0/RC$	Поток на разсеяната енергия (неводещ до редукция на $Q_A$ ) за 1 активен РЦ
$RC/ABS$	Активни РЦ падащи се на 1 молекула хл. от антената на ФС2
$PI_{ABS}$	Индекс на производителност за запазване на енергията на фотоните погълнати от ФС2 под формата на редуцирани междусистемни преносители
$PI_{total}$	Индекс на производителност за запазване на енергията на фотоните погълнати от ФС2 под формата на редуцирани крайни електронни акцептори

**Таблица 1.** Определения на използваните в настоящата работа флуоресцентни параметри изчислени от индукционните криви на флуоресценцията на хл. *a* чрез подхода JIP тест (Strasser, Tsimilli-Michael et al. 2004, Tsimilli-Michael and Strasser 2013).

Данните от протокола за определяне на гасенето на флуоресценцията при *Scenedesmus* са използвани за изчисляване на параметрите от анализа на флуоресцентното гасене (Maxwell and Johnson 2000) (Фигура 4А):

- фотохимично гасене (qP), относителна част на „отворените“ РЦ на ФС2,

$$qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_o'),$$

където  $F_m'$  е максималната флуоресценция в светлинно-адаптирано състояние ( $F_M$  на всяка ИК от протокола без първата), а  $F_t$  е флуоресценцията в светлинно-адаптирано състояние непосредствено преди прилагане на насищащата светлина (апроксимирано като  $F_O$  от всяка ИК на протокола без първата), а  $F_o'$  е минималната флуоресценция на светло, която не може да бъде измерена с флуориметъра *M-PEA* и е апроксимирана чрез формулата (Oxborough and Baker 1997):

$$F_o' = F_o / (F_v / F_m + F_o / F_m'),$$

където  $F_o$  е минималната флуоресценция в тъмнинно-адаптирано състояние ( $F_O$  от първата ИК на протокола),  $F_m$  е максималната флуоресценция в тъмнинно-адаптирано състояние ( $F_M$  от първата ИК на протокола), а  $F_v$  – максималната вариабилна флуоресценция е разликата между двете,

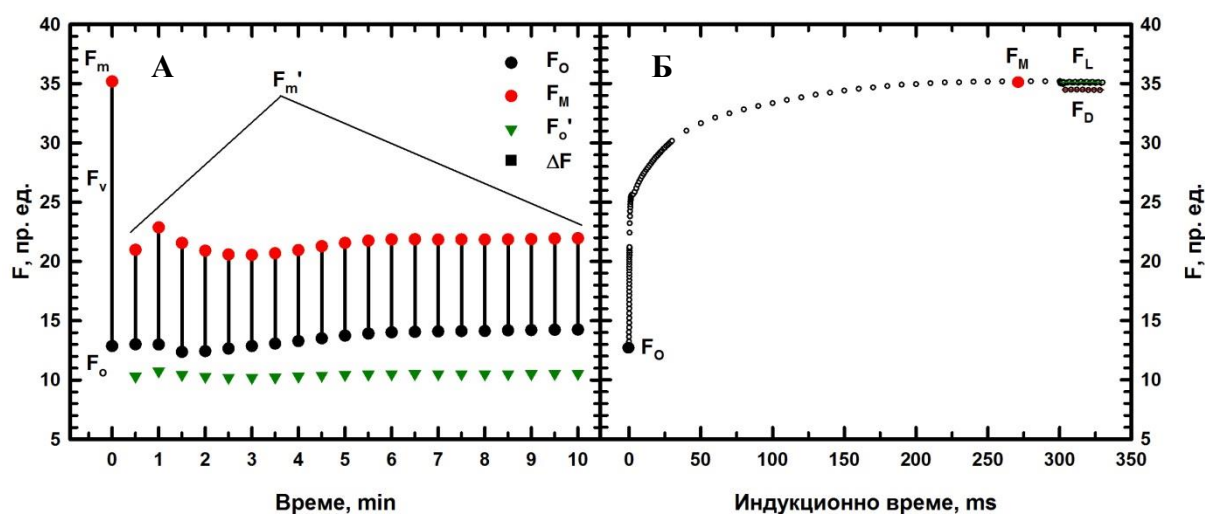
$$F_v = F_m - F_o;$$

- нефотохимично гасене (NPQ), отношението на промяната на максималната флуоресценция към крайната ѝ стойност,

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m';$$

- действителният (в светлинно-адаптирано състояние) квантов добив на първичната фотохимичната реакция ( $\Phi_{PSII}$ ), частта на погълнатата от ФС2 светлинна енергия, която е използвана за осъществяване на фотохимичната реакция,

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'.$$



**Фигура 4.** А Извличане на първичните параметри от анализа на флуоресцентното гасене от параметрите на ИК, записани с протоколът представен на Фигура 3: минимална ( $F_0$ ), максимална ( $F_m$ ) и вариабилна ( $\Delta F$ , разликата на  $F_m$  и  $F_0$ ) флуоресценция. Първата ИК е измерена в тъмнинно-адаптирано състояние, поради което нейните стойности се приемат за  $F_0$ ,  $F_m$  и  $F_v$  съответно (параметри, характеризиращи тъмнинното състояние). Стойностите на  $F_m$  от останалите криви (записани в различно светлинно-адаптирано състояние) се взимат като  $F_m'$ , а от него и останалите параметри се изчислява  $F_0'$ . По времето на измерване  $F_0'$  практически не се променя, което доказва надеждността на апроксимирането му чрез другите параметри. Б Извличане на параметрите, по които се изчисляват тъмните спадове (ТС) на флуоресценцията за първата ИК от А:  $F_m$ ,  $F_0$ ,  $F_L$  и  $F_D$ . По време на непрекъснатото осветяване с насищаща светлина флуоресценцията се покачва от  $F_0$  до  $F_m$ , а по време на прекъснатото – тя се колебае между стойността преди ( $F_L$ ) и стойността след период от 1 ms тъмнина ( $F_D$ ). За изчисление на ТС за ИК, измерени в светлинно състояние,  $F_0$  се заменя с  $F_0'$ .

Заедно с анализа на флуоресцентното гасене е приложен и анализ на спадите в интензитета на флуоресценцията след кратките тъмнинни интервали, траещи 1 ms по време на втория флуоресцентен запис на протокола, наречен анализ на тъмнинните спадове (ТС) (Goltsev, Gurmanova et al. 2013). Тъмнинните спадове са изчислени по формулата:

$$ТС = (F_L - F_D) / (F_m - F_0')$$

където  $F_L$  е стойността на флуоресценцията, измерена непосредствено преди тъмнинния период, а  $F_D$  е стойността, измерена веднага след този период, като тези

стойности се взимат от втория запис, а  $F_M$  се взема от първия запис (на ИК) на протокола (Фигура 4Б). Важно е да се отбележи, че  $F_L \approx F_M$ , защото двата флуоресцентни записа се прилагат непосредствено един след друг при използвания протокол. За изчисляване на ТС за първия флуоресцентен запис, измерен в тъмнинно-адаптирано състояние,  $F_o'$  се заменя с  $F_o (= F_0)$

Първичната обработка на флуоресцентните данни, получени от *Handy PEA*, е направена чрез софтуер *HandyBarley*, а данните от *M-PEA* са обработени с *M-PEA Data Analyzer*. И двете програми са разработени от Петко Чернев в Катедрата по Биофизика и радиобиология, Биологически факултет, Софийски Университет “Св. Климент Охридски”, София, България. Вторичната обработка, включително изчисляването на всички флуоресцентни параметри на JIP теста, е направена с Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Редмънд, Вашингтон, САЩ). Графиките са направени в Sigma Plot 11 (Systat Software, Сан Хосе, Калифорния, САЩ).

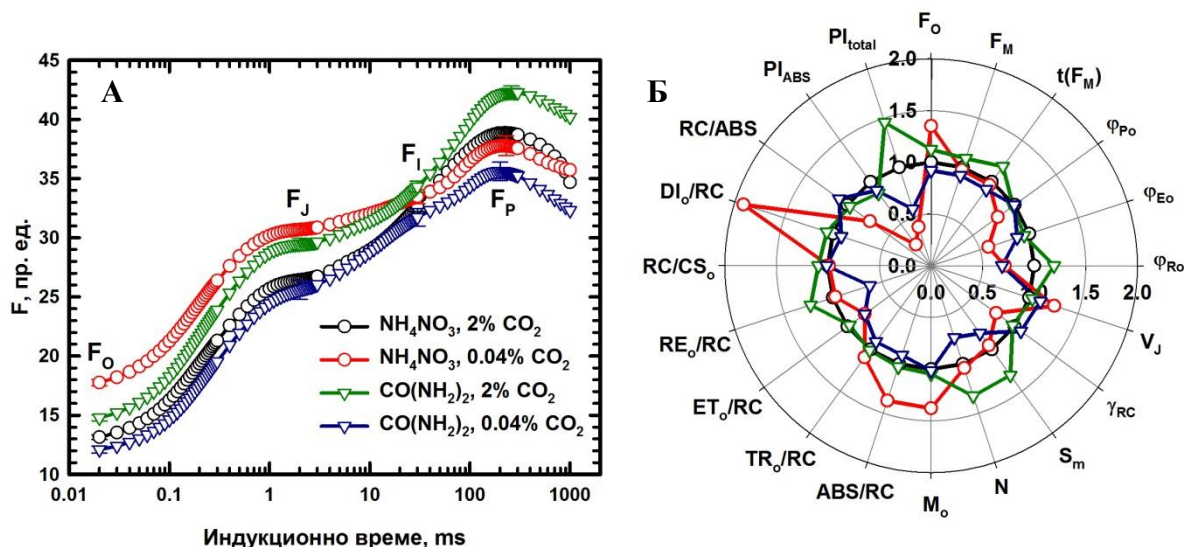
Всеки експеримент е повторен минимум 2 пъти, като всеки път са изследвани няколко биологични повторения (най-малко 3 индивида) и няколко технически повторения (най-малко 2 измервания на лист), така че общият брой на повторенията за всеки експериментален вариант  $n \geq 8$ . Данните са представени като средни стойности със стандартна грешка. За оценка на разликите между вариантите е приложен еднопосочен дисперсионен анализ (*One-way ANOVA*) последван от статистически тест на Холм-Сидак или Бонферони с ниво на значимост  $\alpha = 0.05$  в *Sigma Plot 11.0* (Systat Software, Сан Хосе, Калифорния, САЩ).

При граха за определяне възможността за разграничаване на изследваните светлинни варианти чрез изследваните JIP параметри ( $RC/CS_0$ ,  $ABS/RC$ ,  $\Phi_{P_0}$ ,  $\Phi_{E_0}$ ,  $\Phi_{R_0}$ ,  $PI_{ABS}$ ,  $PI_{total}$ ) е приложен Анализ на главните компоненти (*Principal Component Analysis*) чрез функцията *prcomp* в програмния език R 3.3.3 след логаритмично нормиране на данните, а графиката на анализа е направена с помощта на пакета *ggbiplot*. Коефициентът на корелация (R) между усреднените стойности на флуоресцентните параметри и параметрите на растежа/цъфтежа за четирите варианта ( $n = 4$ ) е изчислен чрез корелационен анализ на Пийърсън с  $\alpha = 0.05$  в *Sigma Plot*.

## 4. Резултати и обсъждане

### 4.1. Ефект на качеството и количеството на хранителните вещества върху ФСА при *Scenedesmus sp.*

Проведено е изследване на влиянието на качеството и количеството на хранителни вещества върху ФСА на *Scenedesmus* при отглеждане с четири различни хранителни среди. Те се различават по типа на източника на азот: неорганичен – амониев нитрат ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) или органичен – урея ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), и по концентрацията на  $\text{CO}_2$  – въздушна (0.04%) или висока (2%). Изследвани са разликите между четирите варианта както в светлинните, така и в тъмнинните фотосинтетични реакции. Влиянието на типа азотен източник и концентрацията на  $\text{CO}_2$  върху светлинните реакции в ТМ на *Scenedesmus* е проследено чрез записване на индукционни криви (ИК) на флуоресценцията на хл. *a* за 1 s при  $4000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  PPFD (Фигура 5А). Кривите силно се различават по стойностите на основните флуоресцентни стъпки и по формата си (съотношенията между тези нива). При варианта на отглеждане с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$  началното флуоресцентно ниво ( $F_0$ ) и първото квазистационарно ниво ( $F_I$ ) са по-високи от тези при контролата ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 2%  $\text{CO}_2$ ) с 35% и 16% съответно, докато второто квазистационарно ниво ( $F_J$ ) и максимума ( $F_P$ ) не се различават от контролните. При  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  в комбинация с 2%  $\text{CO}_2$  флуоресценцията е по-силна в сравнение с контролната с около 9-12%, но разликите отново са минимални (5%) при  $F_I$ . При  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 0.04%  $\text{CO}_2$  флуоресцентните стойности са съвсем слабо понижени в сравнение с контролните, като значително отклонение (8%) се наблюдава единствено за  $F_P$ .



**Фигура 5.** Влияние на условия на отглеждане – вид азотен източник ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  или  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) и концентрация на  $\text{CO}_2$  (0.04% или 2%), върху: индукционните криви (ИК) на флуоресценция на хл. *a* (А) и параметрите (Б), изчислени от тези криви, измерени в клетъчни култури *Scenedesmus* при интензитет на фотосинтегично-активна светлина  $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD за 1 s. Показани са усреднените ИК и стандартните грешки само за характеристичните точки на кривите (за по-добра прегледност) – минимална флуоресценция ( $F_0$ ), флуоресценция след 2 ms осветяване ( $F_i$ ), флуоресценция след 30 ms осветяване ( $F_1$ ) и максимална флуоресценция ( $F_M$ ). Флуоресцентните параметри са представени като средни стойности, отнесени към тези, измерени при контролните условия на отглеждане ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 2%  $\text{CO}_2$ ), без стандартни грешки за по-добра прегледност. Клетъчните суспензии са с изравнена концентрация на хл. ( $1 \text{ mg}(\text{хл.})\cdot\text{ml}^{-1}$ ) и са тъмнинно-адаптирани за 1 час преди измерване.

Силно различаващите се индукционни преходи предполагат големи разлики във флуоресцентните параметри, изчислени от тези криви според JIP теста. Сравнение на стойностите на 20 JIP параметъра при различните варианти спрямо контролните условия на отглеждане са представени чрез радарна диаграма на Фигура 5Б. Всеки вариант на отглеждане се характеризира със специфични промени на параметрите. Най-силни изменения се наблюдават при отглеждане в среда с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$  и в среда с  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 2%  $\text{CO}_2$ , но засегнатите параметри са различни и довеждат до качествено различен краен ефект при двата варианта.

Културите, отглеждани в среда с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$  се характеризира с пониски квантови добиви на: първичната фотохимична реакция ( $\phi_{P_0}$ ), междусистемния електронен транспорт ( $\phi_{E_0}$ ) и електронния пренос до крайните акцептори на ФС1 ( $\phi_{R_0}$ ),

и по-ниска вероятност, дадена хл. молекула от ФС2 да функционира като РЦ ( $\gamma_{RC}$ ). Всички тези промени причиняват намаляване на стойностите на индекса на производителност на ФС2 ( $PI_{ABS}$ ) с 75% в сравнение с контролата и намаляване на индекса на производителност на ФС2 и ФС1 ( $PI_{total}$ ) с 60%. Следователно светлинните фотосинтетични реакции, извършващи се в ТМ, са силно потиснати при култивиране в среда, съдържаща  $NH_4NO_3$  и 0.04%  $CO_2$ , в сравнение с контролата, която се различава единствено по по-голямата си концентрация  $CO_2$  – 2%. Разглеждайки промените в останалите флуоресцентни параметри, могат да се определят конкретните места в ТМ, които са засегнати. Повишените с по около 40% начален наклон на ИК ( $M_0$ ) и привиден размер на антената на ФС2 ( $ABS/RC$ ) свидетелстват за по-голям поток енергия на възбуждане, предаващ се към РЦ на ФС2, вероятно поради повече хл. молекули в антените при запазващ се брой на активните РЦ на ФС2 за единица площ ( $RC/CS_0$ ), което определя намаляването на  $\gamma_{RC}$  (изчислява се от  $RC/ABS$ ). Двукратното повишаване на потока на разсеяната енергия ( $DI_0/RC$ ) за сметка на минималното покачване на потока на уловената енергия ( $TR_0/RC$ ), падащи се на активен РЦ на ФС2, обуславя понижаването на  $\phi_{R_0}$ , т.е. засегнато е функционирането на активните РЦ. Повишаването на  $ABS/RC$  и понижаването на електронния поток от  $Q_A^-$  до електронните акцептори между двете фотосистеми ( $ET_0/RC$ , инхибиране в акцепторната страна на ФС2) определя ниското  $\phi_{E_0}$ . Повишаването на  $ABS/RC$  без промяна на електронния поток от електронните акцептори между двете фотосистеми до крайните акцептори на ФС1 ( $RE_0/RC$ ) определя ниското  $\phi_{R_0}$ .

При отглеждане в среда с  $CO(NH_2)_2$  и 2%  $CO_2$  общата производителността на светлинните фотосинтетични реакции се повишава –  $PI_{total}$  се увеличава с 50% спрямо контролата, което се дължи на по-ефективната работа на ФС1 (повишените  $RE_0/RC$  и  $\phi_{R_0}$ ). Разлики във функционирането на ФС2 ( $PI_{ABS}$ ) между варианта и контролата не се наблюдават както на ниво РЦ (еднакви  $\phi_{R_0}$  и  $\phi_{E_0}$ ), така и на ниво антенните комплекси ФС2 (еднакви  $M_0$  и  $ABS/RC$ ). Повишава се обаче нормираната площ над ИК ( $S_m$ ), а оттам и обратното число на редукция/реокисление на  $Q_A$  ( $N$ ), съответстващо на относителния брой на електронните акцептори в ЕТВ, падащи се на активен РЦ.

При  $CO(NH_2)_2$  и 0.04%  $CO_2$  общата производителността на ФСА в ТМ ( $PI_{total}$ ) намалява с 40% от контролната заради спад в ефективността на ФС1 (понижените



RE<sub>O</sub>/RC и φ<sub>Ro</sub>). S<sub>m</sub> и N също намаляват. Интересно е, че при двата варианта с CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> едни и същи параметри се променят спрямо контролата, но в различни посоки.

От изброените по-горе резултати, може да се направи извода, че и двата изследвани фактора на отглеждане (концентрация на CO<sub>2</sub> и тип азотен източник) оказват влияние върху ФСА в ТМ на *Scenedesmus* и в зависимост от комбинацията на факторите се повлиява повече една от двете фотосистеми. ФС2 (предимно) се активира от висока концентрация на CO<sub>2</sub> при среда с неорганичен източник на азот и от CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> при отглеждане с 0.04% CO<sub>2</sub>. Единствено ФС1 (без ФС2) се активира от висока концентрация на CO<sub>2</sub> при среда с органичен източник на азот. Ето защо при варианта на отглеждане в присъствие на CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> и 2% CO<sub>2</sub> производителността на ФСА в ТМ е най-висока, а при NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub> тя е най-ниска.

Въпреки наблюдаваните големи различия в светлинните фотосинтетични реакции между четирите варианта на отглеждане на *Scenedesmus*, промяната на концентрацията на основния субстрат на фотосинтезата, CO<sub>2</sub>, и вида на азотния източник предполагат съществени разлики най-вече в биохимичните пътища на усвояване на тези вещества и съответно в бавно индуциращите се тъмнинни фотосинтетични реакции (цикъла на Калвин-Бенсон), а оттам и различно адаптиране на ФСА към светлинните условия. Изследването на тези процеси не може да се осъществи чрез анализ на индукционните криви, а чрез проследяване на по-бавните промени в интензитета на флуоресценцията – нейното намаляване, гасене, при продължително (минутно) осветяване. Анализът на гасенето на флуоресценцията обикновено се извършва чрез флуориметри, използващи амплитудно-импулсна модулация на светлинния сигнал – *Pulse-Amplitude Modulation* (РАМ). Подходът на измерване при тези апарати се основава на редуване с висока честота на включване и изключване (модулиране) на светлинния източник, който се използва за измерване на флуоресценцията, и регистриране от детектора само на флуоресценцията, възбудена от измерващата светлина (Maxwell and Johnson 2000), дори в присъствие на допълнително фоново осветяване. По този начин с РАМ флуориметър може да се проследи промяната в относителният добив на флуоресценцията (гасенето ѝ) при преминаване на фотосинтезиращия обект от тъмнинно- към светлинно-адаптирано състояние при осветяване със светлина с нисък интензитет, по време на което през равни интервали обектът се облъчва с кратки импулси силна насищаща светлина. Използваният за експериментите, представени в настоящата работа,

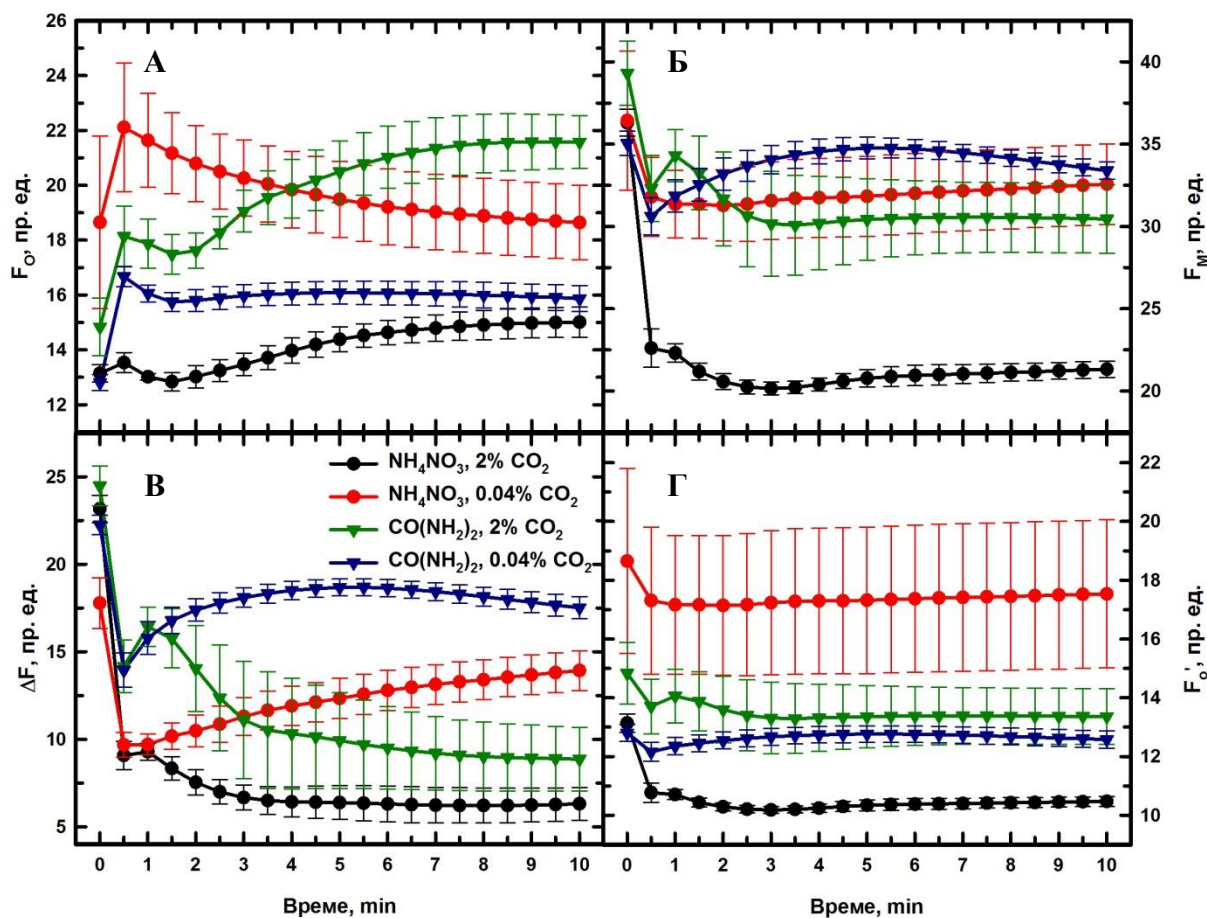
флуориметър *M-PEA* се основава на коренно различен подход: използва се продължително осветяване с една и съща насищаща фотосинтетично-активна светлина за индуциране и измерване на флуоресценцията. За да проведем анализ на гасенето на флуоресценцията с апарата *M-PEA*, създадохме специален протокол, който се състои от редуване на осветяване с насищаща светлина ( $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD) за 300 ms, по време на което се записва ИК, и осветяване с ненасищаща светлина ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD) за 30 s, по време на което не се измерва флуоресценция. Общото времетраене на протокола е 10 минути, т.е. записват се общо 21 ИК – първата е регистрирана в тъмнинно-адаптиран обект (аналогична на ИК, записвани при обикновеното приложение на флуориметъра *M-PEA*), а останалите 20 се записват в различно светлинно-адаптирано състояние на обекта: втората е след 30-секундно осветяване, третата – след 60-секундно осветяване и т.н. От всяка ИК се извлича минималното ( $F_0$ ) и максималното ( $F_M$ ) ниво на флуоресценцията, от които се изчисляват параметрите от анализа на флуоресцентното гасене и се проследява как те се променят по време на продължаващото 10 минути осветяване с ненасищащата светлина.

Промяната на  $F_0$  при преминаване от тъмнинно- в светлинно-адаптирано състояние на ФСА се различава силно между различните условия на отглеждане на *Scenedesmus* (Фигура 6А). При култивиране в присъствие на  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 2%  $\text{CO}_2$   $F_0$  нараства слабо и бавно по време на осветяването, докато при среда с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$   $F_0$  не се променя. При отглеждане в среда, съдържаща  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 2%  $\text{CO}_2$ ,  $F_0$  нараства най-силно като в първите 30 s осветяване се наблюдава скок, след което нарастването спира и чак след 5 минути отново се наблюдава покачване. При култивиране с  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 0.04%  $\text{CO}_2$   $F_0$  нараства най-силно за първите 30 s, след което леко намалява и след 3 минути спира да се променя. Въпреки различната динамика на  $F_0$  при различните варианти,  $F_0$  на ИК, измерени в светлинно-адаптирано състояние (всички стойности след първата за всеки вариант на Фигура 6А), е по-голямо или равно на  $F_0$  на ИК, измерена в тъмнинно-адаптирано състояние (първата стойност за всеки вариант на Фигура 6А). Нарастването на  $F_0$  се обяснява с факта, че на светло определена част от РЦ са „затворени“.

За разлика от  $F_0$ , светлинно-индуцираната динамика на  $F_M$  се характеризира с намаляване (Фигура 6Б). Намаляването на  $F_M$  се обяснява с наличието на нефотохимично гасене, което понижава квантовия добив на флуоресценцията в

антенните комплекси. Динамиката на  $F_M$  се различава между вариантите на отглеждане. При контролния вариант ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 2%  $\text{CO}_2$ )  $F_M$  намалява най-силно за първите 30 s в сравнение с останалите варианти, след което промените са минимални: в първите 3 минути  $F_M$  слабо намалява, след което слабо се покачва. Въпреки че стойностите на  $F_M$  при останалите три варианта се припокриват, динамиката им е различна: при среда с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$  такава липсва, при среда с  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 2%  $\text{CO}_2$   $F_M$  намалява бързо за 30 s, след което спира да се променя, а при отглеждане с  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 0.04%  $\text{CO}_2$   $F_M$  намалява бързо за 30 s, нараства бавно за 5 минути, след което започва отново да намалява бавно.

Промените на  $F_0$  и  $F_M$  по време на преминаване от тъмнинно- в светлинно-адаптирано състояние определят и динамиката на разликата между тях, вариабилната флуоресценция ( $\Delta F$ ) за всяка ИК (Фигура 6B). И при четирите варианта на отглеждане  $\Delta F$  намалява най-силно в първите 30 s като най-голям е спадът при контролата, след което динамиката се различава: при средите с 2%  $\text{CO}_2$  се наблюдава бавно намаляване (по-бързо при  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 2%  $\text{CO}_2$ ), а при средите с 0.04%  $\text{CO}_2$  – нарастване (по-бързо при  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 0.04%  $\text{CO}_2$ ). При отглеждане в среда с  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 0.04%  $\text{CO}_2$   $\Delta F$  започва слабо да спада след 6 минути осветяване. Интересно е културите с еднакъв азотен източник имат еднакви стойности на  $\Delta F$  на 30 s и 1 минута, съответно ефектът на концентрацията на  $\text{CO}_2$  върху  $\Delta F$  се наблюдава едва след осветяване 1.5-2 минути.

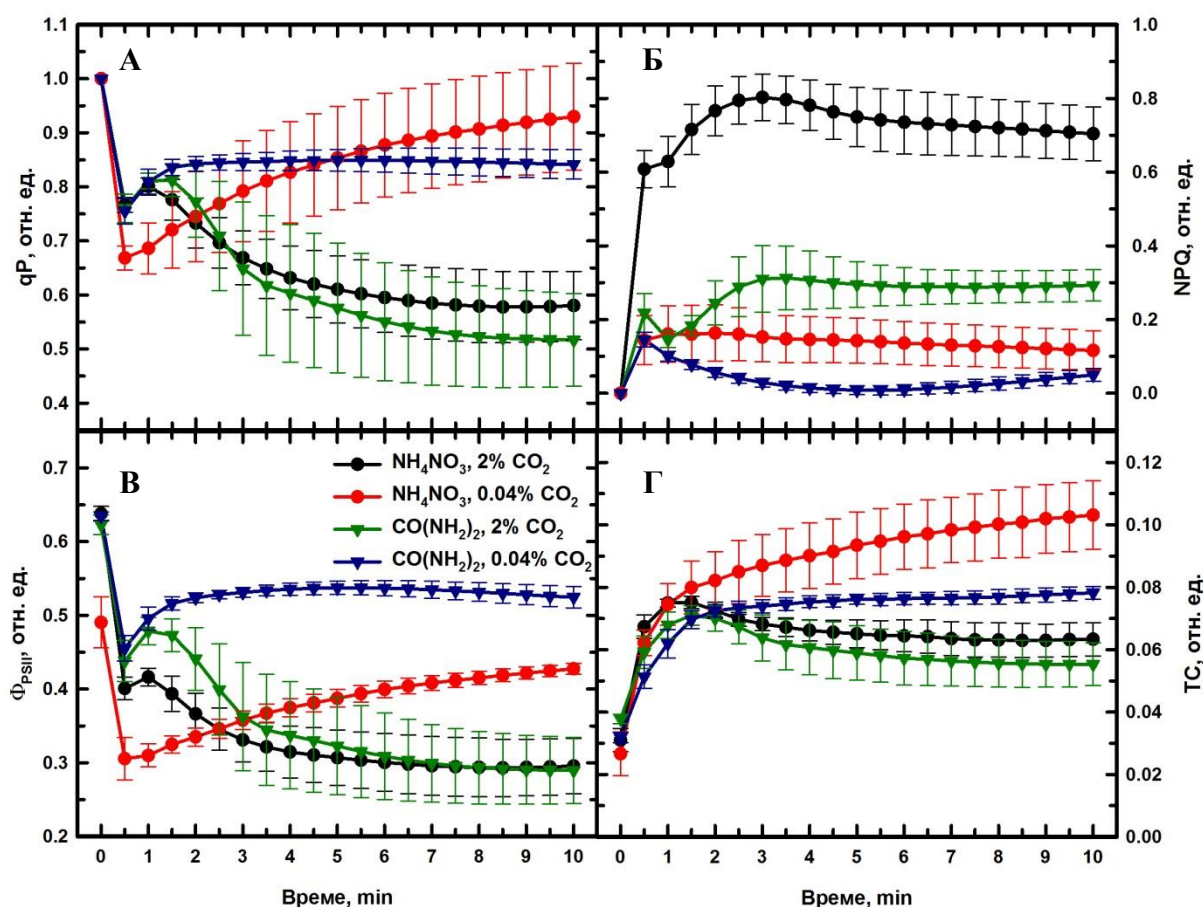


**Фигура 6.** Светлинно-индуцираната динамика на първични параметри от анализа на флуоресцентното гасене: **А** – минималната флуоресценция ( $F_0$ ), **Б** – максималната флуоресценция ( $F_M$ ), **В** – вариабилната флуоресценция ( $\Delta F$ ) и **Г** – минималната флуоресценция в светлинно-адаптирано състояние ( $F_0'$ ); по време на 10-минутно осветяване на клетъчни култури *Scenedesmus*, отгледани при различни условия – азотен източник ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  или  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) и концентрация на  $\text{CO}_2$  (0.04% или 2%), с фотосинтетично-активна светлина с ненасищащ интензитет ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD) и облъчване с импулси насищаща светлина ( $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD) за 330 ms през 30 s. Импулсите се използват за измерване на  $F_0$  и  $F_M$ , от които се изчисляват  $\Delta F$  (разликата между  $F_M$  и  $F_0$ ) и  $F_0'$  (за формула виж 3.3). Клетъчните суспензии са с изравнена концентрация на хл. ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) и са тъмнинно-адаптирани за 1 час преди измерване.

Важен първичен параметър за изчисляването на параметрите от анализа на флуоресцентното гасене е минималната флуоресценция в светлинно-адаптирано състояние ( $F_0'$ ), която лесно се измерва с *РАМ* флуориметър при осветяване със светлина от далечно-червената област на спектъра. Тъй като  $F_0'$  не може да бъде

измерено с апарата *M-PEA*, използвахме разработената от Oxborough и Baker формула за апроксимиране на  $F_o'$  от стойностите на  $F_o$ ,  $F_m$  и  $F_m'$  (Oxborough and Baker 1997). Въпреки че стойностите на  $F_o'$  се различават между различните варианти на отглеждане (най-ниско при  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 2%  $\text{CO}_2$  и най-високо при  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$ ),  $F_o'$  за всеки вариант не се променя по време на осветяването (Фигура 6Г).

От стойностите на  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_o'$  и  $F_m'$  са изчислени параметрите от анализа на флуоресцентното гасене при осветяване на различни култури *Scenedesmus* с ненасищаща светлина ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD) за 10 минути: фотохимично гасене, нефотохимично гасене и действителен квантов добив на първичната фотохимичната реакция на ФС2 (Фигура 7 А, Б и В съответно). В тъмнинно-адаптирано състояние стойността на фотохимичното гасене ( $q_P$ ) (Фигура 7А), което съответства на относителна част на „отворените“ РЦ на ФС2, по дефиниция е равно на 1 (първата стойност на фигурата). При осветяване част от РЦ стават „затворени“ и съответно  $q_P$  силно намалява в първите 30 s до 0.65 при култивиране в среда с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$  и до 0.75 при останалите варианти на отглеждане. Светлинно-индуцираната динамика на  $q_P$  след първите 30 s се състои от две фази: бърза, продължаваща 1-1.5 минути, последвана от бавна. Бързата фаза се характеризира с покачване на  $q_P$  и е свързана с активирането на тъмнинните фотосинтетични реакции от цикъла на Калвин-Бенсон, които все по-активно използват редуциращите еквиваленти, натрупани като продукти на светлинните фотосинтетични реакции – все повече молекули НАДФН се превръщат в  $\text{НАДФ}^+$ , което предизвиква „отваряне“ на РЦ. Вариантите на отглеждане не се различават значително по бързата фаза от динамика на  $q_P$ , освен при този с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$ , при който нарастването на  $q_P$  е само тенденция. Големи разлики между вариантите се наблюдават в бавната фаза: при културите с 2%  $\text{CO}_2$   $q_P$  намалява и достига стойности 0.5-0.6, докато при среда с  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 0.04%  $\text{CO}_2$   $q_P$  нараства бавно през цялото време на измерване, достигайки стойности 0.90-0.95, а при култивиране в среда с  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  и 0.04%  $\text{CO}_2$   $q_P$  остава постоянно около 0.85. Бавната фаза на динамиката би могла да бъде обяснена с преходите на състоянието на антенните комплекси на ФС2: намаляването на  $q_P$  е свързано с преход на ССК2 от състояние 2 (антените са свързани с ФС1) към състояние 1 (антените са свързани с ФС2), а нарастването – с обратния преход, от състояние 1 към състояние 2.



**Фигура 7.** Светлинно-индуцираната динамика на параметрите от анализа на флуоресцентното гасене: **А** – фотохимично гасене ( $qP$ ), **Б** – нефотохимично гасене ( $NPQ$ ), **В** – действителен квантов добив на  $ФC2$  ( $\Phi_{PSII}$ ); и на тъмнинни спадове ( $TC$ ) на флуоресценцията след тъмнинен период 1 ms – **Г**; по време на 10-минутно осветяване на клетъчни култури *Scenedesmus*, различаващи се по 2 условия на отглеждане – азотен източник ( $NH_4NO_3$  или  $CO(NH_2)_2$ ) и концентрация на  $CO_2$  (0.04% или 2%), с ненасищаща фотосинтетично-активна светлина с интензитет  $100 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$  PPFD и облъчване с импулси от насищаща светлина ( $4000 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$  PPFD) за 330 ms през 30 s. През първите 300 ms от всеки насиращ импулс се записва ИК, чиито  $F_0$  и  $F_M$  (Фигура 6 А и Б) се използват за изчисляване на  $qP$ ,  $NPQ$  и  $\Phi_{PSII}$ , а последните 30 ms включват тъмнинни периоди от 1 ms и се използват за изчисляване на  $TC$  (за формули виж 3.3). Клетъчните суспензии са с изравнена концентрация на хл. ( $1 mg.ml^{-1}$ ) и са тъмнинно-адаптирани за 1 час преди измерване.

В обобщение, след 10-минутно осветяване със фотосинтетично-активна светлина с интензитет  $100 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$  PPFD културите на *Scenedesmus*, отгледани при ниска концентрация на  $CO_2$ , имат високо, а културите, отгледани при висока концентрация на

CO<sub>2</sub> – ниско фотохимично гасене. Разликата се дължи главно на преходите на състоянието на ССК2 освен при варианта на култивиране в среда с CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub>, където преходи на състоянието не се наблюдават. Високата стойност на фотохимичното гасене при CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub> се определя само от постоянната висока активност на реакциите от цикъла на Калвин-Бенсон.

Светлинно-индуцираната динамика на нефотохимичното гасене (NPQ) силно се различава между вариантите на отглеждане на *Scenedesmus* (Фигура 7Б). В тъмнинно-адаптирано състояние стойността на NPQ е равна на 0 по дефиниция (първата стойност на фигурата). Най-голяма стойност NPQ достига при контролата (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> и 2% CO<sub>2</sub>) като първоначално то остава постоянно около 0.6 от 30-ата секунда до 1-вата минута осветяване, след което се покачва до 0.8 на 3-тата минута, последвано от тенденция на слабо намаляване до 0.7. При култивиране в среда с NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub> не се наблюдава динамика на NPQ и стойността му е около 0.1. При отглеждане в присъствието на CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> и 2% CO<sub>2</sub> NPQ слабо намалява от 0.2 на 30-ата секунда докъм 0.1 на 1-вата минута, след което се наблюдава тенденция за покачване до 0.3 на 3-тата минута, когато NPQ спира да се променя. При CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub> NPQ има стойност над 0.1 на 30-ата секунда, след което то изчезва почти напълно за 5 минути осветяване, достигайки стойности близки до 0, последвано от слабо покачване до 0.05 на 10-ата минута. В обобщение, промяната на условията на отглеждане на култури *Scenedesmus* понижават значително нефотохимичното гасене след 10-минутно осветяване със фотосинтетично-активна светлина (100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD) спрямо контролните условия (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> и 2% CO<sub>2</sub>), като по-силен ефект има понижаването на концентрацията на CO<sub>2</sub> на 0.04% отколкото замяната на азотния източник с CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

Първата стойност на квантовия добив на първичната фотохимичната реакция на ФС2 е измерена в тъмнинно-адаптирано състояние и съответства на максималния квантов добив (φ<sub>Р0</sub>), а стойностите измерени след нея са на действителния квантов добив на ФС2 (Φ<sub>PSII</sub>), който дава информация за фотохимичния капацитет на ФС2 в светлинно-адаптирани условия (Фигура 7В). При варианта отгледан в среда, съдържаща NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub>, φ<sub>Р0</sub> има най-ниска стойност (около 0.5), а стойностите му при другите варианти на отглеждане не се различават (около 0.63-0.64), което съответства на резултатите за φ<sub>Р0</sub>, получени от анализа на ИК на БФ (Фигура 5Б). Светлинно-индуцираната динамика на Φ<sub>PSII</sub> се различава между вариантите на

отглеждане на *Scenedesmus*. При вариантите, отгледани с 2% CO<sub>2</sub>, Ф<sub>PSII</sub> не се променя в първите 2-3 минути осветяване, след което бавно намалява и достига стойности от 0.3. Динамиката на Ф<sub>PSII</sub> при вариантите, отгледани с 2% CO<sub>2</sub>, се характеризира с нарастване, което при средата с CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> настъпва бързо (за 2 минути) до 0.525, а при тази с NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> покачването е бавно и продължава и на 10-тата минута осветяване, достигайки стойност 0.425. Ясно се вижда, че светлинната динамика на Ф<sub>PSII</sub> е подобна на тази на qP (Фигура 7А), което се дължи на факта, че Ф<sub>PSII</sub> зависи линейно от qP и може да се изчисли по формулата:

$$\Phi_{PSII} = \Phi_{P_0} \cdot qP.$$

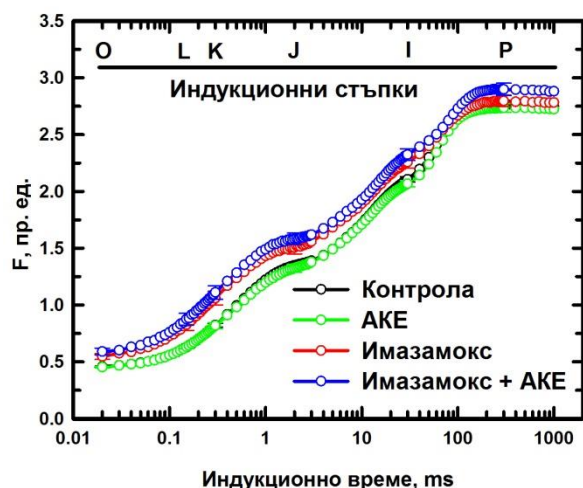
След осветяване на суспензии от *Scenedesmus* със светлина 100 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> PPFD за 10 минути активността на ФС2 е най-висока при средата с CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub>, последвана от тази с NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> и 0.04% CO<sub>2</sub> и най-ниска при културите отгледани с 2% CO<sub>2</sub>.

В допълнение на анализа на флуоресцентното гасене е проследена светлинно-индуцираната динамика на тъмнинните спадове (ТС) на флуоресценцията при различните варианти на отглеждане на *Scenedesmus* (Фигура 7Г). Динамиката на ТС наподобява динамиката на qP (Фигура 7А) и се състои от 2 фази: бърза, в рамките на 1-1.5 минути, и бавна, настъпваща след 1.5 минути осветяване. Това е така, защото ТС съответстват на относителната част на „отворените“ РЦ на ФС2 след краткия период на затъмняване (1 ms при използвания протокол). Бързата фаза се характеризира с нарастване от 0.03-0.04 до 0.07-0.08 и слабо се различава между вариантите на отглеждане (малко по-бързо нарастване при културите с 2% CO<sub>2</sub>, отколкото при 0.04% CO<sub>2</sub>). Тя е свързана с активирането на Рубиско в тъмнинните реакции и все по-голямото използване на НАДФН в тези реакции. Основните разлики между вариантите са в бавната фаза, която е свързана с преходите на състоянието на антенните комплекси. При културите отгледани с 2% CO<sub>2</sub> ТС намаляват до 0.55-0.65, което съответства на преход от състояние 2 към 1, а при културите отгледани с 0.04% CO<sub>2</sub> ТС продължават бавно да се покачват – преход от състояние 1 към 2.



#### 4.2. Влияние на имазамокс и аминокиселинен екстракт върху ФСА при слънчоглед

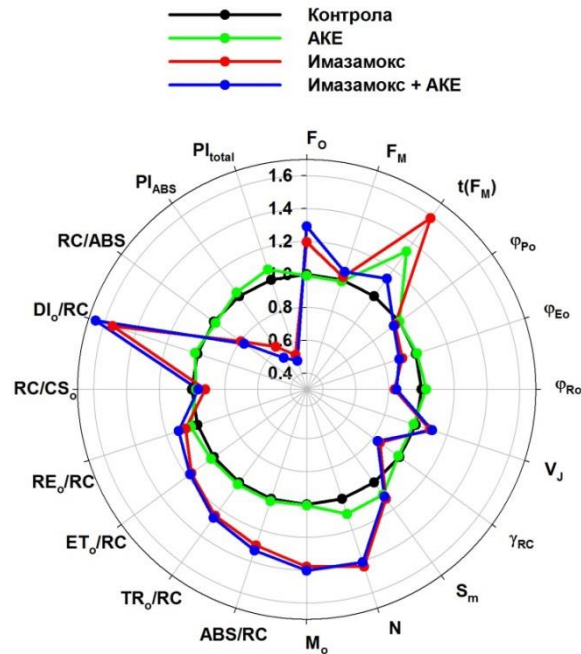
Ефектът на листово приложен хербицид имазамокс, блокиращ биосинтеза на разклонени аминокиселини, върху ФСА на резистентен към хербицида хибрид *Clearfield* слънчоглед (*H. annuus* L.) и влиянието на биостимулант *Terra-sorb foliar*, съставен от аминокиселинен екстракт (АКЕ), върху листа, третирани или нетретирани с имазамокс, е проследено чрез измерване на ИК на флуоресценцията на хл. *a* на седмия ден след прилагане на препаратите (Фигура 8). Флуоресцентните преходи при четирите варианта (нетретирани растения – контрола, третирани с АКЕ, третирани с имазамокс и третирани с комбинация от двете) се различават минимално помежду си и показват типичните стъпки на индукция на хлорофилната флуоресценция: F<sub>0</sub>, F<sub>J</sub>, F<sub>I</sub> и F<sub>p</sub>. Въпреки това интензитетът на флуоресценцията при вариантите, третирани с имазамокс и комбинираното третиране с имазамокс и АКЕ, е по-висок в сравнение с контролата и вариантът третиран единствено с АКЕ като най-големи отклонения се наблюдават от стъпка J до I.



**Фигура 8.** Индукционни криви на флуоресценция на хл. *a* (F), измерени при интензитет на фотосинтетично-активна светлина  $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD за 1 s в листа от резистентен *Clearfield* хибрид *H. annuus* 7 дни след третиране с аминокиселинен екстракт (АКЕ), имазамокс или с комбинация от двете (имазамокс + АКЕ). Показани са усреднените ИК и стандартните грешки само за характеристичните стъпки на флуоресцентните преходи – О (20  $\mu\text{s}$ ), L (150  $\mu\text{s}$ ), К (300  $\mu\text{s}$ ), J (2 ms), I (30 ms) и Р (~300 ms). Кривата за нетретираните растения е означена като контрола. Листата са тъмнинно-адаптирани за 1 час преди измерване.

От ИК са изчислени флуоресцентните параметри (Фигура 9). Относителните стойности на параметрите се различават силно, въпреки слабите различия в ИК, от които се изчисляват. При третирането с имазамокс  $F_0$ ,  $M_0$ , ABS/RC са значително по-високи от контролните, а  $\gamma_{RC}$  е значително по-ниско. Тези наблюдения свидетелстват или за по-голямо количество хл. *a* в антените, които не могат да предадат енергията си на възбуждане към РЦ, поради което се излъчва по-силно флуоресценция, или за повишено количество фотохимично неактивни РЦ (лекият спад на RC/CS<sub>0</sub>). Имазамокс предизвика намаляване на ефективността на първичната фотохимична реакция на ФС2 (по-ниското  $\phi_{P_0}$  и повишено  $DI_0/RC$ ). Квантовите добиви на електронния транспорт ( $\phi_{E_0}$ ) и редукцията на крайните акцептори ( $\phi_{R_0}$ ) се понижават след третиране с имазамокс, което води до силно намаляване на общата производителността на ФСА (индексите  $PI_{ABS}$  и  $PI_{total}$ ). В допълнение, повишаването на параметрите  $t(F_M)$ ,  $S_m$  и  $N$  след третиране с имазамокс показват повишен брой електронни акцептори (от пула на молекулите ПХ или от акцепторите на ФС1) падащ се на един активен РЦ на ФС2. Тези наблюдения биха могли да се дължат на понижен *de novo* синтез на белтъците съставляващи сърцевинните комплекси на ФС2 (от които РЦ са част) в резултат на

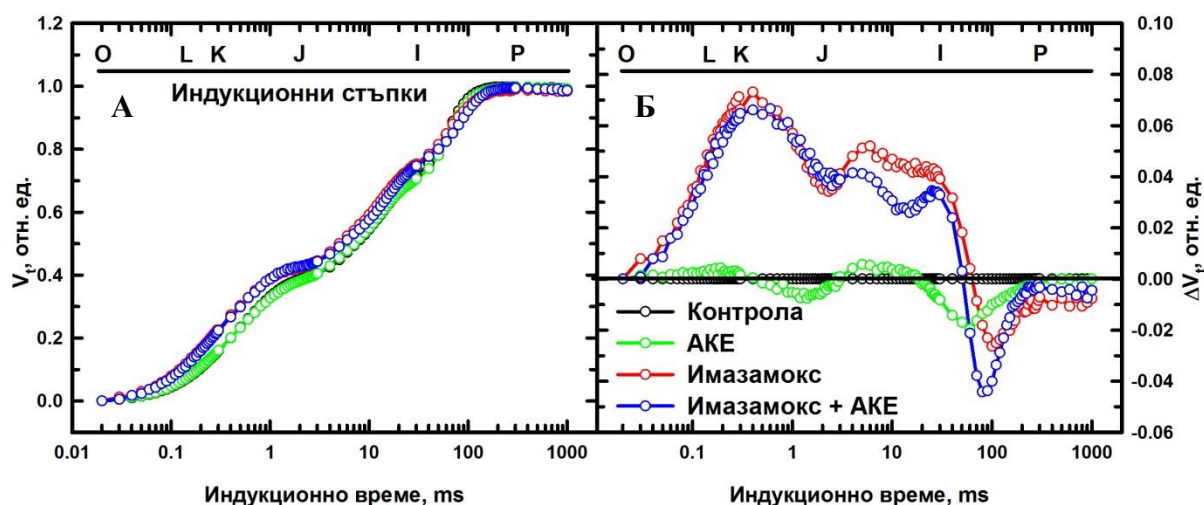
инхибиторния ефект на имазамокс върху синтеза на разклонени аминокиселини. Всички флуоресцентни параметри показват, че ефективността на светлинната фаза на фотосинтезата е засегната силно негативно от имазамокс на седмия ден след третиране.



**Фигура 9.** Флуоресцентни параметри, изчислени от ИК представени на Фигура 8. Представени са стойностите на вариантите, отнесени към тези, измерени при контролата.

Параметрите на JIP теста показват, че действието на АКЕ, върху ФСА е ограничено. Само времето за достигане до максимална флуоресценция  $t(F_M)$  и броя на акцепторите (N) се повишават значително при АКЕ спрямо контролата, а общата производителност ( $PI_{total}$ ) нараства съвсем слабо. Биостимулантът не променя значително ефекта на хербицида като го намалява единствено за  $t(F_M)$  и  $RC/CS_0$ , а за  $F_0$ ,  $DI_0/RC$  и  $PI_{ABS}$  дори го засилва.

Чрез нормиране на измерените стойности на флуоресценцията към  $F_0$  и  $F_M$  се изчисляват относителните ѝ стойности и се получават индукционни преходи на относителната вариабилна флуоресценция ( $V_i$ ) за четирите групи слънчогледови растения (Фигура 10А). Въпреки че формата на кривите е сходна, стойностите на флуоресценцията на стъпки J и I са различни.



**Фигура 10.** А Преходи на относителната вариабилна хлорофилна флуоресценция  $V_t$  записани за 1 s при  $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD след 1 час тъмнинна адаптация на измерените точки на нативни листа от резистентни към имидазолинови хербициди слънчогледови растения, изложени на единично и комбинирано третиране с имазамокс и аминокиселинен екстракт (АКЕ), измерени 7 дни след третиране. За контрола са използвани нетретираните растения. Б Диференциални криви на относителната вариабилна хлорофилна флуоресценция ( $\Delta V_t$ ), получени чрез изваждане на стойностите, измерени за контролата, от стойностите за третираните варианти на А.

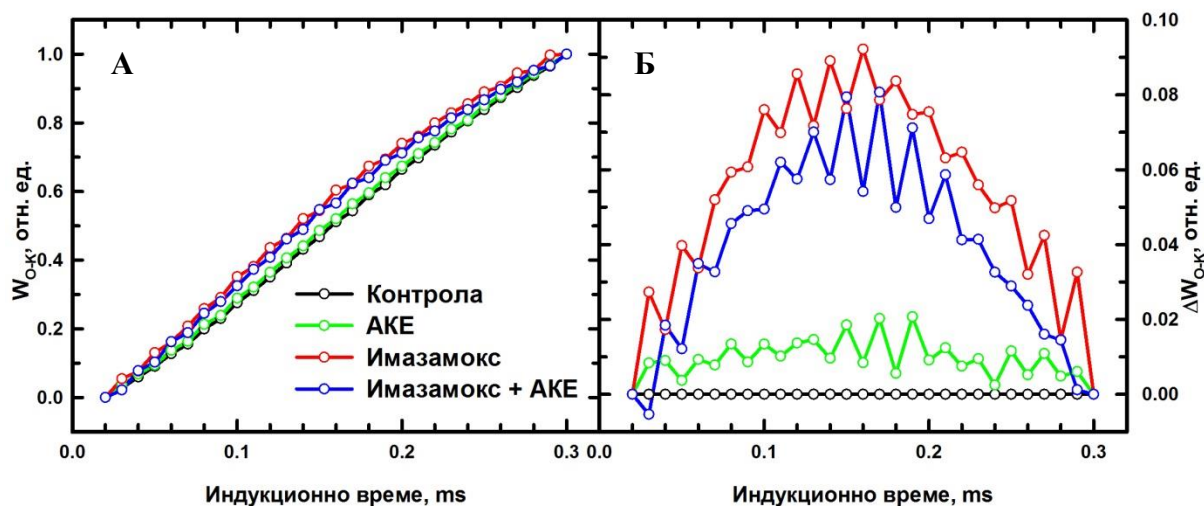
За да се онагледят и анализират по-добре разликите в стойностите на  $V_t$ , са построени диференциални криви (ДК) чрез изваждане на кривата на  $V_t$  за контролата от кривите за третираните растения (Oukaroum, El Madidi et al. 2007) и са получени разликите на относителната вариабилна флуоресценция ( $\Delta V_t$ ) (Фигура 10Б). При третиране с имазамокс (както самостоятелното, така и в комбинация с АКЕ) стойностите на  $\Delta V_t$  са положителни от О докъм началото на прехода I-P (50 ms), след което преминават в отрицателни до Р, където по дефиниция са равни на 0. Освен това, ходът на кривите за двата варианта на третиране с имазамокс практически е еднакъв от О до J, но от J до I се различава – прибавянето на АКЕ към имазамокс понижава стойностите на  $\Delta V_t$  с 25%. Положителни стойности на  $\Delta V_t$  са белег за по-ниска ефективност на реакциите на електронния транспорт, описващи се от съответните индукционни стъпки – електронен транспорт до междусистемните акцептори за J и до крайните акцептори за I, което се вижда и от намаляването на  $\phi_{E_0}$  и  $\phi_{R_0}$  при имазамокс. При третиране с АКЕ  $\Delta V_t$  е в граници от 0.01 до -0.02, което показва, че ИК не се

променят значително спрямо контролата. Тези факти свидетелстват за ясно изразен инхибиторен ефект на имазамокс върху реакциите на светлинната фаза на фотосинтезата, въпреки че специфичното му място на действие не е ФСА, докато АКЕ влияе слабо върху тези реакции. Въпреки това, когато биостимулантът е приложен заедно с имазамокс, негативния ефект на хербицида се частично се неутрализира, което се вижда в понижените стойности на  $\Delta V_t$  за прехода J-I. От друга страна биостимулант засилва действието на хербицида за прехода I-P.

Многокомпонентността (няколкото минимума и максимума) на ДК на  $V_t$  се определя от факта, че индукцията на флуоресценцията зависи от множество различни процеси в ТМ. Въпреки това, покачването на флуоресценцията за всяка фаза от ИК се определя преимуществено от един процес. Анализ на промените в отделни участъци от ЕТВ вседствие на въздействие по разликите в хода на флуоресценцията може да се постигне чрез съставяне на ДК за отделните фази на ИК: от О до К, от О до J, от J до I и от I до P.

Нарастването на относителната вариабилна флуоресценция нормирана от О до К ( $W_{O-K}$ ) зависи пряко от наличието на енергиен пренос между антенните комплекси на отделни РЦ, означавано още като свързаност между фотосинтетични единици. Колкото свързаността е по-голяма, толкова покачването на  $W_{O-K}$  е по-бавно в началото и по-бързо в края на кривата, и обратно. Стойностите на  $W_{O-K}$  за четирите варианта слънчогледови растения (контрола, третирани с имазамокс, с АКЕ и с комбинация от двете) са показани на Фигура 11А. При третиране с имазамокс самостоятелно и в комбинация с АКЕ стойностите на  $W_{O-K}$  нарастват по-бързо в началото и по-бавно в края на кривите в сравнение с другите два варианта (контрола и АКЕ) като 0.15 ms (стъпка L на ИК) след началото на осветяване отклоненията са най-големи – появява се слаба положителна L ивица. Амплитудата на L ивицата може да се изчисли чрез изваждане на стойностите за определен (контролен) обект от стойностите за изследван (третиран) обект – изчисляване на разликите на  $W_{O-K}$  ( $\Delta W_{O-K}$ ), т.е. построяване на диференциални криви от О до К (Фигура 11Б). ДК позволяват сравнителен анализ на свързаността между фотосинтетичните единици при различни обекти. Положителни стойности на  $\Delta W_{O-K}$  свидетелстват за по-малка свързаност, а отрицателни – за по-голяма свързаност спрямо контролата. При слънчогледови растения третирани с имазамокс и имазамокс в комбинация с АКЕ свързаността между фотосинтетичните

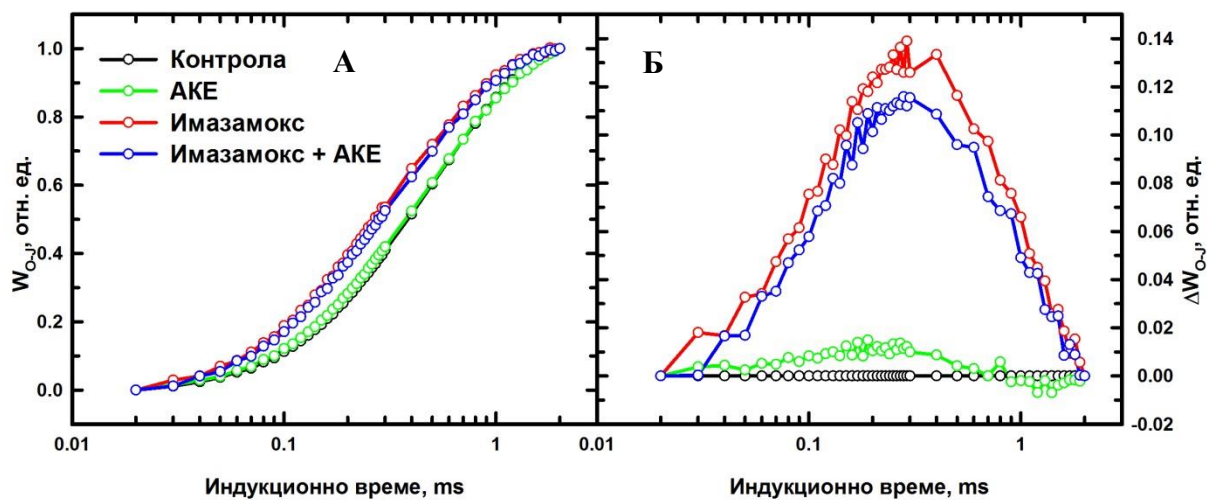
единици е значително по-малка от тази при контролата. Амплитудата на L ивицата при комбинираното въздействие е малко по-ниска от тази при самостоятелно добавения хербицид, което показва, че биостимулантът частично неутрализира хербицидния ефект. При самостоятелно третиране с АКЕ свързаността съвсем леко се понижава спрямо контролата.



**Фигура 11.** Индукционни криви на относителна вариабилна флуоресценция, двойно нормирана към  $F_0$  и  $F_K$  ( $W_{O-K}$ ) (А) и построени от тях диференциални криви ( $\Delta W_{O-K}$ ) (Б). Изходните измерени флуоресцентни стойности и условията на измерване са както на Фигура 8.

Нарастването на относителната вариабилна флуоресценция нормирана от О до J ( $W_{O-J}$ ) (Фигура 12А) е пряко свързано само с процеси във ФС2 – натрупването на „затворени“ РЦ  $P_{680}Q_A^-$  вследствие на първичната фотохимична реакция, което зависи от баланса на електронния транспорт в донорната и в акцепторната страна на ФС2. При нормални условия бързият електронен пренос от  $Y_Z$  към  $P_{680}^+$  след първата фотохимична реакция и от КОС чрез  $Y_Z$  при следващите фотохимични реакции и по бавния пренос от  $Q_A^-$  към  $Q_B$  осигуряват натрупването на „затворени“ РЦ. Когато функцията на КОС е нарушена, след втората фотохимична реакция започват да се натрупват РЦ в състояние  $P_{680}^+Q_A^-$ , тъй като рeredукцията на  $P_{680}^+$  е забавена. Натрупването на  $P_{680}^+Q_A^-$  води до спад във флуоресценцията, тъй като  $P_{680}^+$  е високоефективен гасител на флуоресценцията, който разсейва погълнатата светлинна енергия като топлина. От друга страна ускоряване на електронния пренос в акцепторната страна ще води до по-бавно натрупване на „затворените“ РЦ (по-бавно

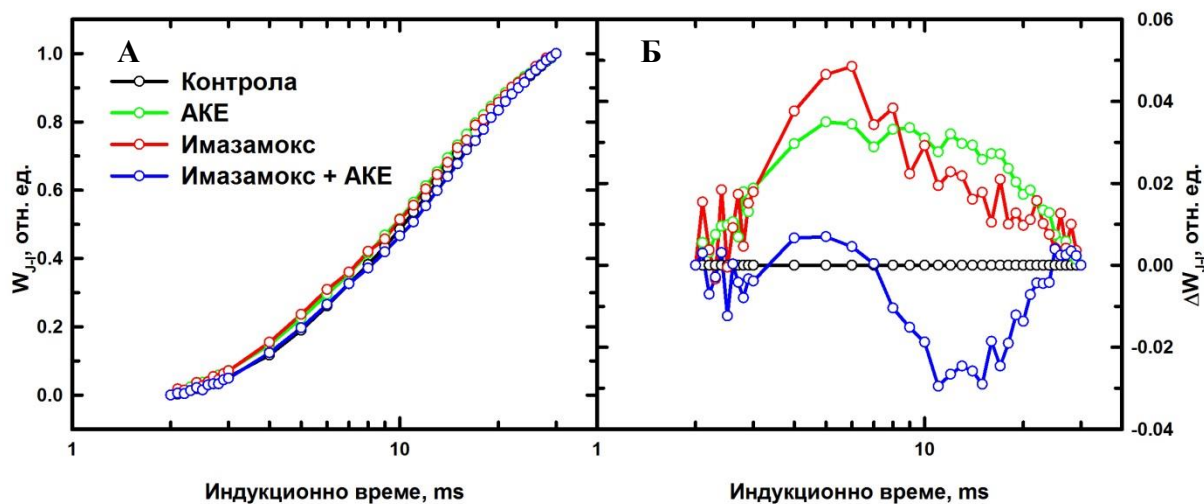
нарастване на флуоресценцията), а забавянето му – до по-бързото им натрупване (по-бързо нарастване на флуоресценцията). Разлики в баланса на електронния транспорт през ФС2 на изследван спрямо контролен обект могат да се опишат чрез съставяне на ДК от О до J ( $\Delta W_{O-J}$ ) (Фигура 12Б), аналогично на ДК на  $W_{O-K}$ . Изразени стойности на  $\Delta W_{O-J}$  при 0.3 ms са познати като ивица (на стъпка) К. Положителна К ивица се наблюдава, когато работата на донорната страна на ФС2 (КОС) е по-потисната (Strasser, Tsimilli-Michael et al. 2004) и/или работата на акцепторната страна е по-активна спрямо контролата. Обратно, при по-активна работа на донорната страна и/или по-потисната работа на акцепторната страна спрямо контролата се наблюдава отрицателна К ивица. При третиране с имазамокс (самостоятелно и в комбинация с АКЕ) се наблюдава положителна ивица К като биостимулантът частично неутрализира хербицидният ефект. При самостоятелно третиране с АКЕ К ивица практически не се наблюдава.



**Фигура 12.** Индукционни криви на относителна вариабилна флуоресценция двойно нормирана към  $F_0$  и  $F_J$  ( $W_{O-J}$ ) (А) и построени от тях диференциални криви ( $\Delta W_{O-J}$ ) (Б). Изходните измерени флуоресцентни стойности и условията на измерване са както на Фигура 8.

Нарастването на относителната вариабилна флуоресценция нормирана от J до I ( $W_{J-I}$ ) (Фигура 13А) зависи пряко от броя на молекулите ПХ, които обслужват една ЕТВ – по-голям брой определя по-бавно нарастване на флуоресценцията и обратно. Разликите в хода на  $W_{J-I}$  между четирите варианта слънчогледови растения са минимални. Сравнителен анализ на количеството на молекулите ПХ се постига чрез

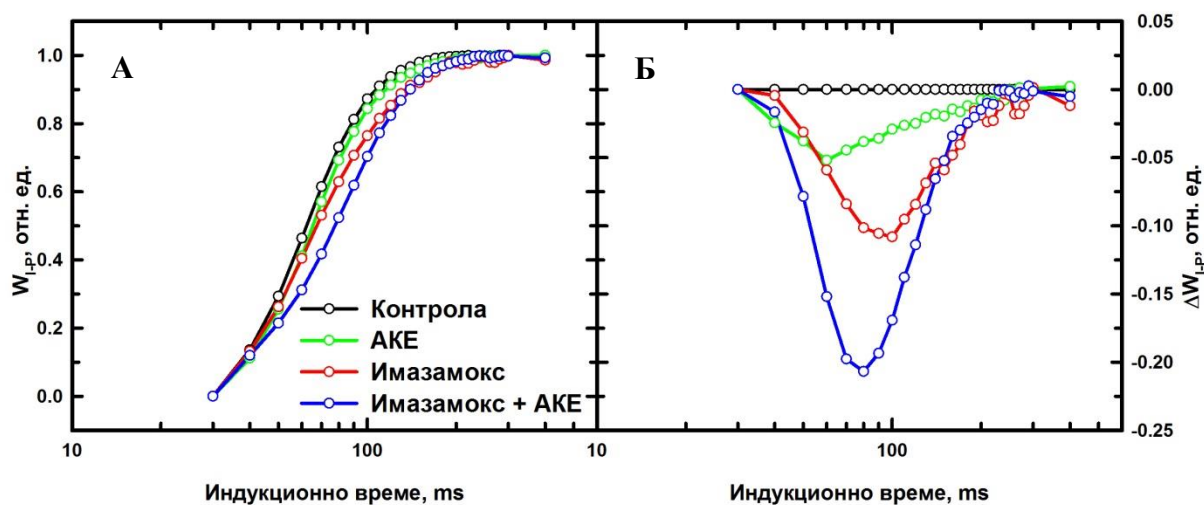
позстрояване на ДК от J до I ( $\Delta W_{J-I}$ ) (Фигура 13Б). При третиранията с имазамокс и АКЕ се наблюдават положителни ивици, съответстващи на по-малък брой ПХ молекули в сравнение с контролата. При комбинираното въздействие стойностите на  $\Delta W_{J-I}$  са почти нулеви до 7 ms, след което се появява изразена отрицателна ивица, съответстваща на по-голям брой ПХ молекули в сравнение с контролата.



**Фигура 13.** Индукционни криви на относителна вариабилна флуоресценция двойно нормирана към  $F_J$  и  $F_I$  ( $W_{J-I}$ ) (А) и построени от тях диференциални криви ( $\Delta W_{J-I}$ ) (Б). Изходните измерени флуоресцентни стойности и условията на измерване са както на Фигура 8.

Нарастването на относителната вариабилна флуоресценция нормирана от I до P ( $W_{I-P}$ ) (Фигура 14А) се определя от количеството на акцепторите на ФС1 (фередоксин и НАДФ<sup>+</sup>) за една ЕТВ. По-бавно нарастване на  $W_{I-P}$  е свързано с по-голям брой на крайните акцептори. Разликите в хода на  $W_{I-P}$  между четирите варианта слънчогледови растения са значително по-големи в сравнение с тези в хода на  $W_{J-I}$ . Сравнителен анализ на количеството на акцепторите се постига чрез позстрояване на ДК от I до P ( $\Delta W_{I-P}$ ) (Фигура 14Б). При всички варианти се наблюдават отрицателни ивици, следователно броят на молекулите фередоксин и НАДФ<sup>+</sup> нараства спрямо контролата. Най-голямо повишение се наблюдава при комбинираното третиране, а АКЕ влияе най-слабо.



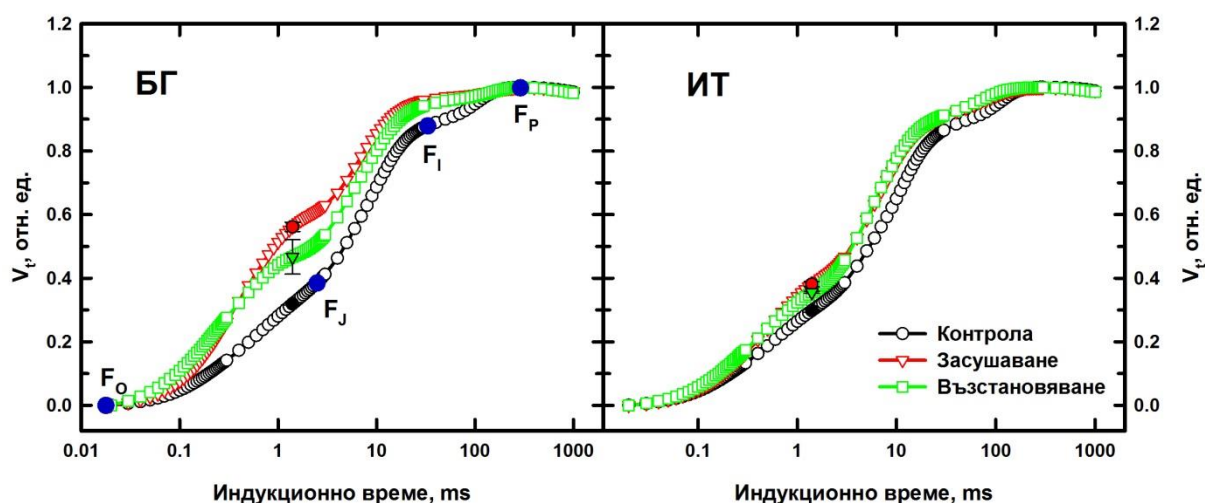


**Фигура 14.** Индукционни криви на относителна вариабилна флуоресценция двойно нормирана към  $F_I$  и  $F_P$  ( $W_{I-P}$ ) (А) и построени от тях диференциални криви ( $\Delta W_{I-P}$ ) (Б). Изходните измерени флуоресцентни стойности и условията на измерване са както на Фигура 8.

В обобщение, хербицидът имазамокс има силен негативен ефект върху различните светлинни фотосинтетични реакции. При растенията третирани с имазамокс концентрацията на активните РЦ на ФС2 ( $RC/CS_0$ ) слабо намалява спрямо контролата, но относителната част на хлорофилните молекули, съставлящи активните РЦ спрямо общия брой хлорофилни молекули ( $\gamma_{RC}$ ), се понижава значително. Това води до увеличение на относителната антена, падаща се на активен РЦ ( $ABS/RC$ ), и увеличено обратно число ( $N$ ) на редукция/реокисление на  $Q_A$ . Намаляват квантовите добиви на реакциите в ЕТВ, което води до намаление на производителностите на самостоятелна работа на ФС2 ( $PI_{ASB}$ ) и съвместна работа на двете фотосистеми ( $PI_{total}$ ). Функционалното взаимодействие между антенните комплекси на различни фотосинтетични единици на ФС2 е нарушено в резултат на третирането с имазамокс (положителна L ивица). АКЕ влияе слабо върху ФСА както при контролни (единствено броя на електронните акцептори се променя), така и при третирани с имазамокс растения, частично неутралирайки хербицидният ефект върху някои процеси (брой на активни РЦ) и усилвайки го за други (квантовият добив на първичната фотохимична реакция).

### 4.3. Ефект на засушаването и възстановяването на водното съдържание върху ФСА при два екотипа източен чинар

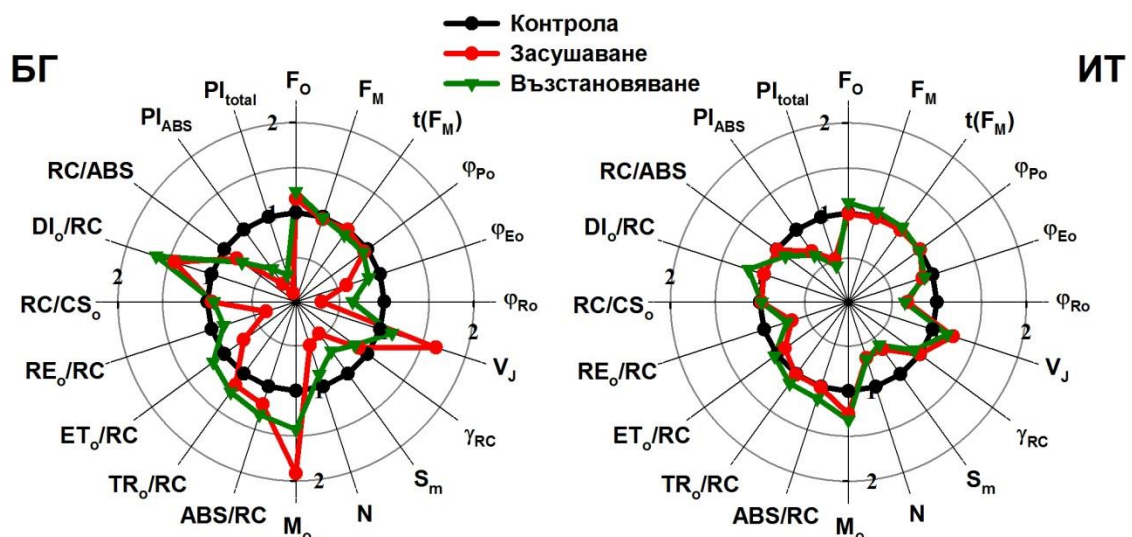
Отговорът на светлинната фаза на фотосинтезата в листа от чинар към воден стрес е проследен чрез ИК (Фигура 15). Формата на кривите се променя значително при българския (БГ) екотип: нивото  $F_J$  се повишава при засушаване и частично се възстановява при връщане на поливането, докато промените на  $F_I$  имат сходен ход, но по-слаба амплитуда. По-високо  $F_J$  отразява по-ниска скорост на електронен транспорт от  $Q_A$  до  $Q_B$ , а по-високо  $F_I$  – по-бавен електронен транспорт от  $Q_B$  до ПХ. От друга страна разликите в ИК при италианския (ИТ) екотип са по-слабо изразени, въпреки че отново са статистически значими.



**Фигура 15.** Индукционни криви на относителната вариабилна флуоресценция ( $V_t$ ) записани за 1 s при  $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PPFD в листа от млади дръвчета *Platanus orientalis* отгледани от български (БГ) и италиански (ИТ) екотип, претърпяващи стрес от засушаване в различен момент от прилагането му: преди началото на стреса (контрола), по време на максимален воден дефицит на почвата (засушаване) и след възвръщане на водното ѝ съдържание (възстановяване). За яснота със сини точки са означени характеристикните точки на ИК за една крива и стандартните грешки за една точка, представителни за останалите точки от всяка крива.

Широк набор от параметри на JIP теста са използвани за оценка на общото състояние на светлинните реакции преди, по време и след засушаване. Мултипараметрична картина на стресовия отговор на двата екотипа е представена като радарна диаграма (Фигура 16). ФСА на българския екотип претърпява драстични

промени. Наблюдаван е ограничен потенциал за съхраняване на енергията в светлинната фаза на фотосинтезата – и двата индекса на производителност ( $PI_{ABS}$  и  $PI_{total}$ ) намаляват при стрес и показват слабо възстановяване. Оказва се, че причината за това са намалените квантови добиви на електронния транспорт след  $QA^-$  ( $\phi_{Eo}$  и  $\phi_{Ro}$ ), тъй като квантовият добив на фотохимичната реакция ( $\phi_{Po}$ ) остава постоянен през целия период на експеримента. Още повече, наблюдението е в съответствие с по-високите стойности на  $V_J$  и по-ниските специфични енергийни потоци  $ET_o/RC$  и  $RE_o/RC$ , общата площ над ИК ( $S_m$ ) и обратното число ( $N$ ). Интересно, и уловения ( $TR_o/RC$ ) и енергийният поток разсеян като топлина ( $DI_o/RC$ ) се увеличават, заедно с абсорбционния поток ( $ABS/RC$ ). Почти всички параметри претърпяват възстановяване поне до известна степен.

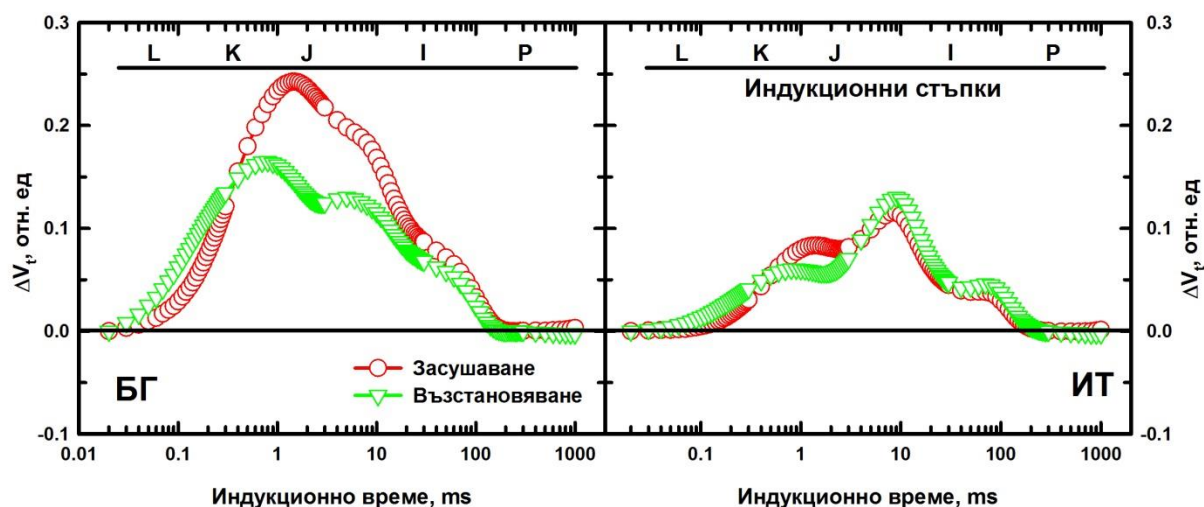


**Фигура 16.** Сравнение на параметри на JP теста за дръвчета от български (БГ) и италиански (ИТ) екотип *Platanus orientalis*, подложени на засушаване и възстановяване спрямо контролата (преди прилагане на стресовия фактор), чрез отнасяне на стойностите към контролните. Параметрите са изчислени от индукционните криви, представени на Фигура 15.

Флуоресцентни параметри, които се променят всредствие на засушаването при ИТ екотип са същите като при БГ – най-силно намаляват  $\phi_{Eo}$ ,  $\phi_{Ro}$ ,  $S_m$ ,  $N$ ,  $RE_o/RC$ ,  $PI_{ABS}$  и  $PI_{total}$ , а най-силно се увеличават  $V_J$  и  $M_o$ . Въпреки че стресовият отговор на италианските дръвчета е сходен с този на българските, той е по-слаб – само  $PI_{total}$  показва намаление по-голямо от 2 пъти. Възстановяването на параметрите при ИТ е

много по-слабо в сравнение с БГ екотип като някои параметри ( $M_0$ ,  $DI_0/RC$ ) дори имат по-големи отклонения от контролата след възстановяване на водното съдържание, отколкото при засушаване.

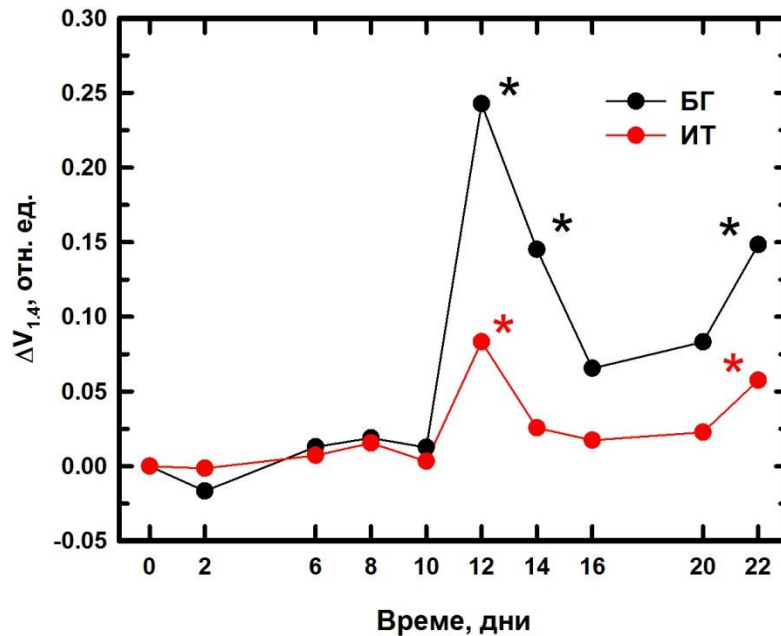
За прецизно определяне на местата от ЕТВ чувствителни към засушаване е използван подхода на ДК (Фигура 17). Получават се множество междинни максимуми и минимума показващи големината на отклонението между стойностите на относителната вариабилна флуоресценция  $V_t$  на контролните и стресираните растения на различни стъпки от ИК. При БГ екотип главният максимум се появява около  $F_J$ , което ясно онагледява ограниченията в акцепторната страна на ФС2, настъпващи при засушаване. Основният максимум на кривите от ИТ екотип е много по-нисък и е между  $F_J$  и  $F_I$ . Установена е ясна разлика в поведението на двата екотипа след края на засушаването: кривите при БГ се възстановяват с до 40% от К до I, докато при ИТ възстановяване има само от К до J с до 50%.



**Фигура 17.** Диференциални криви на относителната вариабилна флуоресценция  $V_t$ , изчислени чрез изваждане на ИК за нетретираните растения от ИК, измерени при засушаване и възстановяване на български (БГ) и италиански (ИТ) екотип *Platanus orientalis*, представени на Фигура 15.

Построена е динамиката на амплитудата на максимума при 1.4 ms от началото на измерването за изследвания период (Фигура 18). Стресовият отговор се развива бързо, само за 2 дни – между 10-тия и 12-тия ден след началото на експеримента. На последния (22-ри) ден се наблюдават статистически значими отклонения, въпреки че на

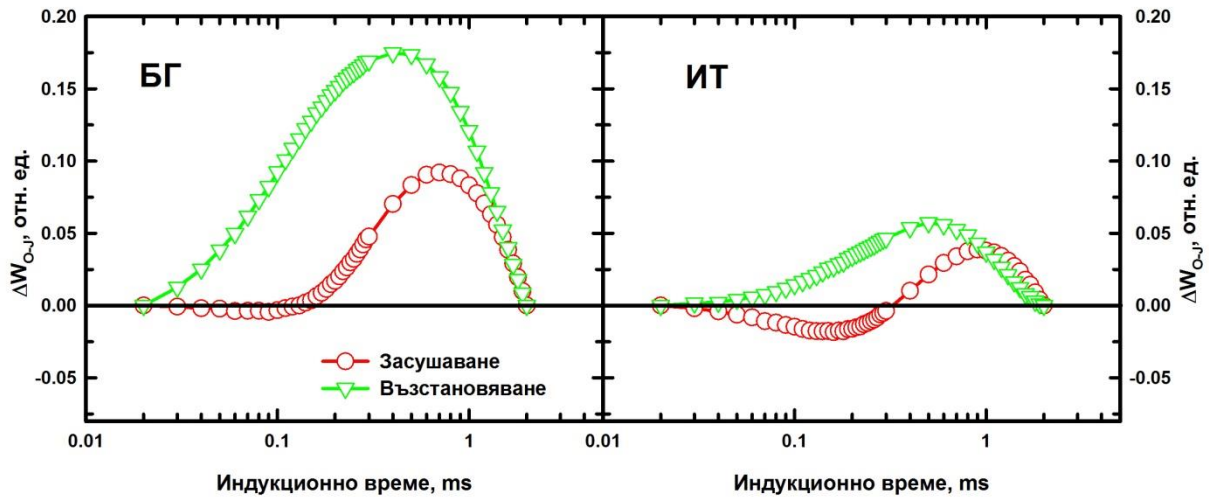
предишните дни (от 16-ти до 20-ти) стойностите не се различават от контролните. БГ екотип се възстановява за 4, а ИТ – само за 2 дни.



**Фигура 18.** Динамика на стресовия отговор на ФСА към засушаване при два екотипа чинар проследена по амплитудата на ДК (при 1.4 ms), представени на Фигура 17. Стойностите, които са статистически различни от контролните (0 по дефиниция) са отбелязани със звездички.

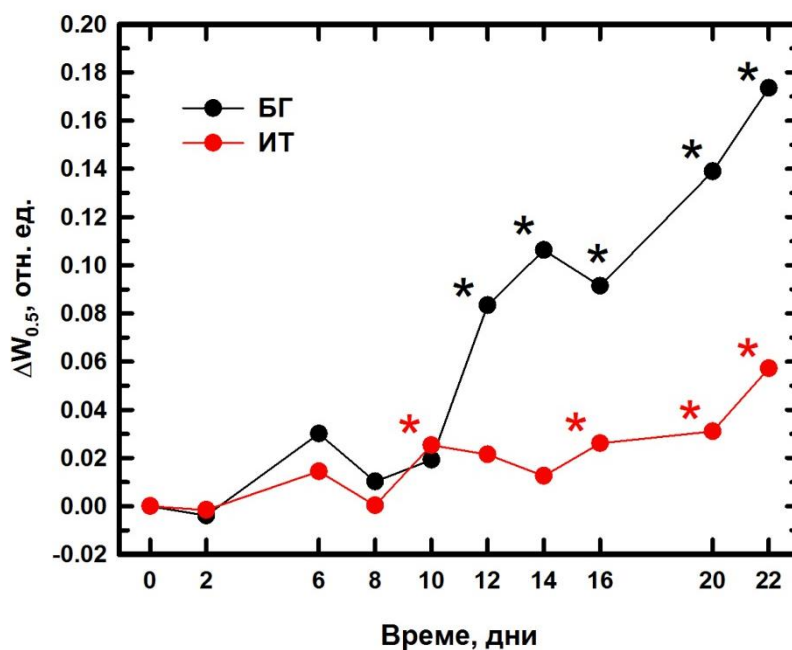
Допълнителните флуоресцентни нива К и L не могат да се видят лесно на ИК и е нужно съставяне на диференциални криви на  $V_t$ , за да се оцени стресовият отговор на процесите, определящи началния ход на флуоресцентната индукция. Още повече, процесите определящи този ход не могат да бъдат изучени пряко чрез параметри на ЛР теста. Точката  $F_K$  е свързана с активността на електронния транспорт в донорната страна на ФС2, най-вече на КОС. Когато структурата на КОС е нарушена тя не може да отдава електрони към РЦ на ФС2 и се натрупват окислени хлорофилни молекули на РЦ ( $P_{680}^+$ ), които са нефотохимични гасители на флуоресценцията.  $F_K$  е забележим, дори главен пик на ИК при 0.3 ms само в условия на силен стрес (Strasser, Tsimilli-Michael et al. 2004). В условия на умерен и слаб стрес се получава ивица при К, която не се забелязва в ИК, но лесно се демонстрира като максимум в ДК, съставени от О до J (Фигура 19). Интересно, и при двата екотипа същинска К ивица (максимум на 0.3 ms) се наблюдава не в деня на максимално засушаване, а чак след началото на

възстановяване на поливането. Амплитудата на К ивицата е 3 пъти по-висока при БГ в сравнение с ИТ растения.



**Фигура 19.** Диференциални криви получени чрез изваждане на стойностите на относителната вариабилна флуоресценция, нормирана от 0 до 1, ( $W_{O_2}$ ) за контролните растения от стойностите при засушаване и възстановяване на български (БГ) и италиански (ИТ) екотип *Platanus orientalis*.

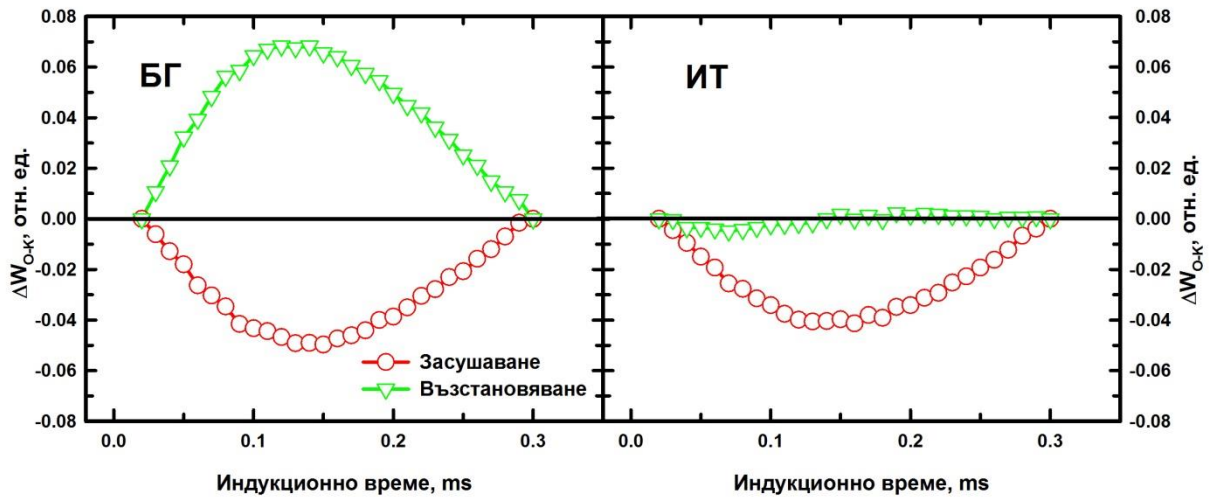
Развитието на К ивица е изобразено като динамика на стойностите на ДК при 0.5 ms по време на експерименталния период (Фигура 20). Големината на ивицата се увеличава сравнително монотонно през целия период. Въпреки това, статистически значими разлики настъпват след 10-12 дни засушаване, в зависимост от екотипа, което показва, че смущенията в КОС са предизвикани от стреса и са необратими поне за изследвания период.



**Фигура 20.** Динамика на стресовия отговор на ФСА към засушаване при два екотипа чинар проследена по амплитудата на ДК на  $W_{0.5}$  (при 0.5 ms), представени на Фигура 19. Стойностите, които са статистически различни от контролните (0 по дефиниция) са отбелязани със звездички.

Флуоресцентното ниво  $L$  е свързано с възможността за миграция на енергията на възбудените състояния между антенните комплекси на различни фотосинтетични единици ФС2. Когато няма свързаност между фотосинтетичните единици началното покачване на флуоресценцията е в пряка пропорционална зависимост от фотохимично неактивните РЦ (тези съдържащи редуциран  $Q_A$ ). Ако се появи свързаност зависимостта става хиперболична, защото (поне) част от излишната енергия на възбуждане в антените на „затворените“ РЦ може да се насочи към фотохимично активните „отворени“ РЦ. Тогава нивото  $F_L$  е понижено, но не може да се забележи в ИК. Затова, подобно на  $K$  ивицата, оценката на  $L$  ивицата е направена чрез съставяне на ДК от  $O$  до  $K$  (Фигура 21). Отрицателна  $L$  ивица (отрицателен максимум на ДК) е индикатор за по-голяма свързаност на фотосинтетичните единици спрямо контролата и обратното, положителна  $L$  ивица (положителен максимум) – по-малка свързаност спрямо контролата. И при двата екотипа фотосинтетичните единици стават по-свързани при засушаване. След възстановяване на поливането свързаността изчезва и при двата екотипа, но докато ИТ екотип се възстановява до контролните нива, БГ екотип развива

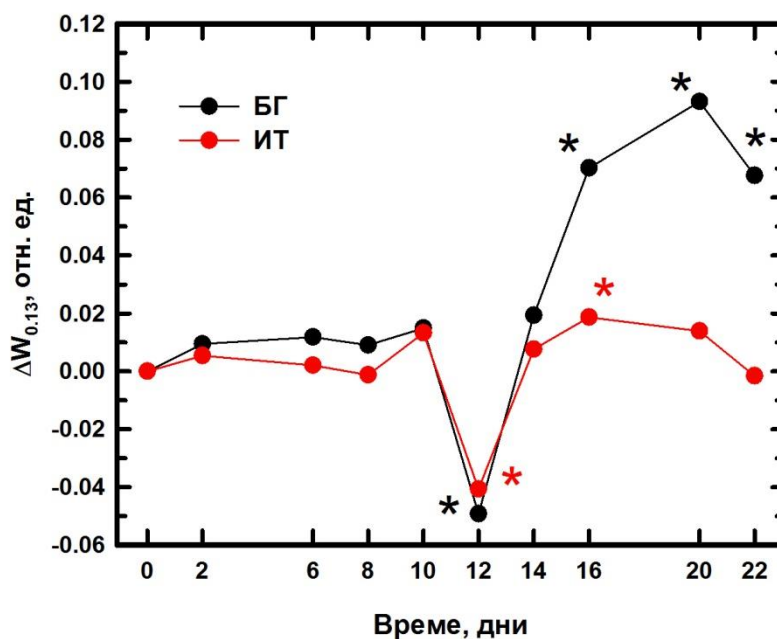
положителна ивица с по-голяма амплитуда дори от отрицателната при засушаването, което говори за по-ниска свързаност в сравнение с контролните нива.



**Фигура 21.** Диференциални криви получени чрез изваждане на стойностите на относителната вариабилна флуоресценция, нормирана от О до К, ( $W_{O-K}$ ) за контролните растения от стойностите при засушаване и възстановяване на български (БГ) и италиански (ИТ) екотип *Platanus orientalis*.

От динамиката на L ивицата, се вижда, че промяната на свързаността настъпва само за 2 дни след 10-тия ден на експеримента (Фигура 22). Различният ход на възстановяване при двата екотипа, описан по-горе, е добре забележим на фигурата.





**Фигура 22.** Динамика на стресовия отговор на ФСА към засушаване при два екотипа чинар проследена по амплитудата на ДК на  $W_{0-к}$  (при 0.13 ms), представени на Фигура 21. Стойностите, които са статистически различни от контролните (0 по дефиниция) са отбелязани със звездички.

Отговорът на фотосинтетичната светлинна фаза към засушаване е изучен в детайли, чрез записване на флуоресценцията в листа от *Platanus orientalis* и различни обработки на този сигнал. И донорната и акцепторната страна на ФС2 са инхибирани при засушаване. Въпреки това, от анализа на ИК може да се заключи, че най-силният негативен стресов ефект е върху ЕТВ между двете фотосистеми. Това се забелязва лесно от по-високите нива J и I – скоростите на процесите, които те отразяват, се забавят. И съответно, квантовите добиви на ЕТ и РЕ се понижават. Смятаме, че причината за тези наблюдения е по-малкият размер на ПХ пул (броя молекули ПХ в тилакоидните мембрани) при воден стрес. Промените в другите ЛР параметри подкрепят това откритие.

Друга чувствителна част от ЕТВ при лимитиращи водни условия е донорната страна на ФС2 (КОС). Оказва се, че смущенията в КОС са силни и се развиват дори след края на засушаването. Високата чувствителност на КОС към воден стрес е в

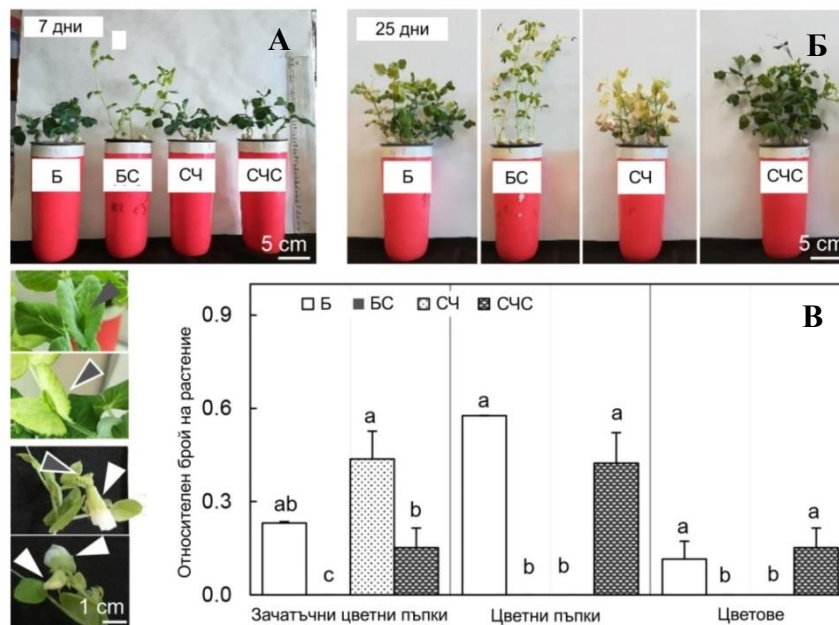
съответствие с наблюденията при други видове растения (Oukarroum, El Madidi et al. 2007).

Наблюдавани са значителни реорганизации в тилакоидната мембрана, съдейки по нивото на свързаност на антенните комплекси. Предполагаме, че когато свободната вода в хлоропластите намалява при засушаване, антенните комплекси физически се сближават и свързаността им се повишава. След спиране на засушаването придобитата свързаност се загубва. При БГ екотип тилакоидните структури не се възстановяват напълно, водните молекули не се включват пълноценно в тях, антените се раздалечават дори повече, което води до свързаност по-слаба дори от тази преди прилагане на стреса.

Стресовата реакция при БГ екотип е ясно изразена, въпреки че почти всички флуоресцентни параметри претърпяват частично възстановяване след прекратяване на стреса. От друга страна ИТ екотип по-слабо променя своите параметри по време на стреса, но ефектът продължава през целият период на изследване.

#### 4.4. Влияние на качеството и количеството на светлината върху ФСА и способността за цъфтеж при грах

Растения *P. sativum* са преместени на шестия ден след посяване за отглеждане за още 7 и 25 дни при бяла (Б), бяла слаба (БС), синьо-червена с висок (СЧ) и синьо-червена с нисък интензитет (СЧС) светлина (Фигура 23 А и Б). Хидропонната култура не съдържа добавки, за да се избегнат възможни растежни ефекти. На ден 7 растенията имат свеж вид заради използването на хранителните запаси на семената. На ден 25 се наблюдават цветове при всички варианти освен при БС (Фигура 23В). При СЧ се появява задържане на фаза на зачатъчни цветни пъпки, докато растенията от СЧС имат еднакъв брой развити цветове с контролните растения от Б. От всички варианти СЧС растенията запазват най-добро състояние със свежи зелени листа, докато СЧ изглеждат напълно изсъхнали.

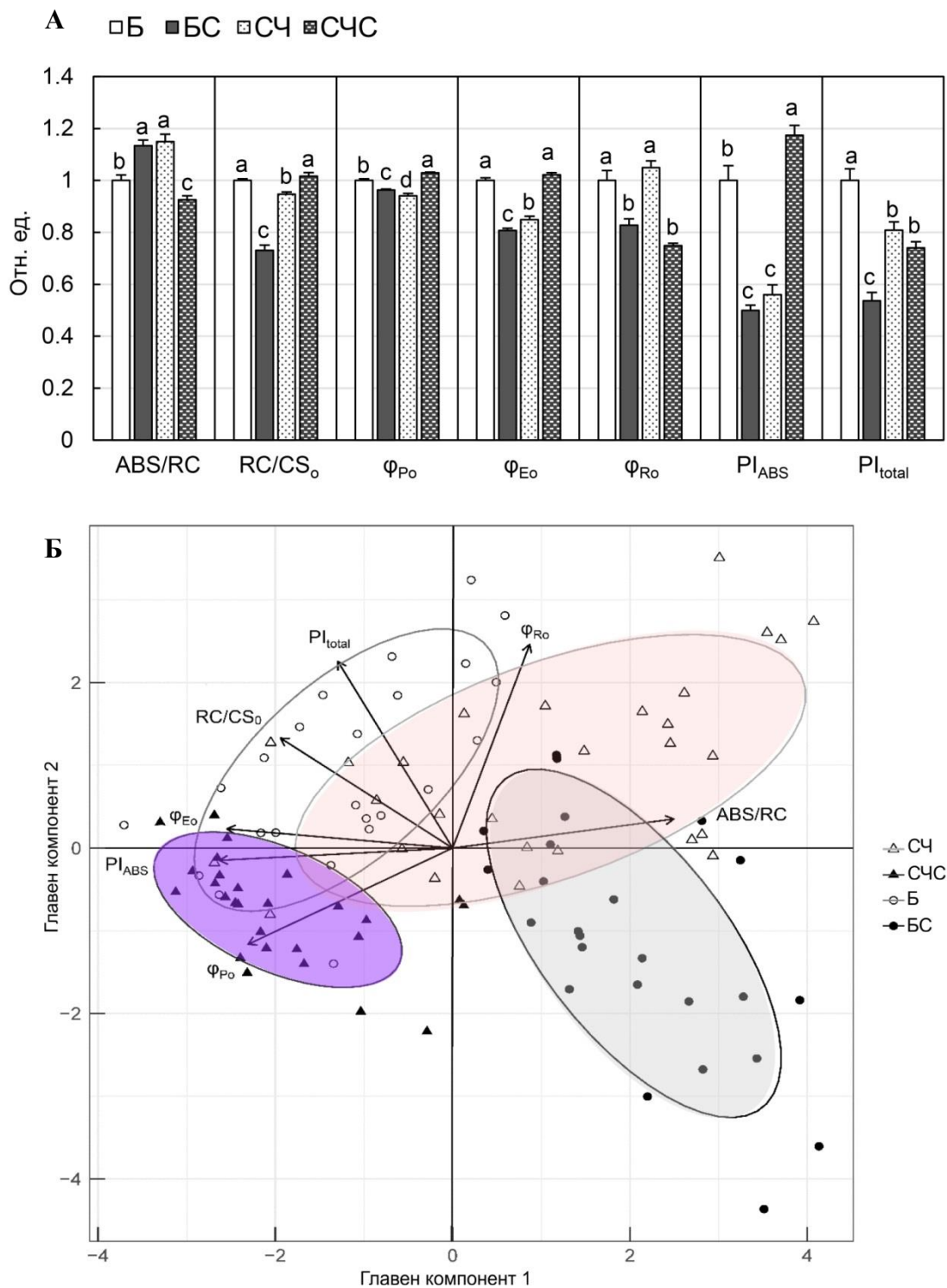


**Фигура 23.** Растения *Pisum sativum* отгледани за 7 (А) и 25 дни (Б) при бяла (Б), бяла слаба (БС), синьо-червена с висок (СЧ) и синьо-червена с нисък интензитет (СЧС) светлина. В Брой на зачатъчните (сива стрелка) и развитите цветни пъпки (сива стрелка с бял ръб) и цветовете (бяла стрелка) на 25-тия ден от отглеждането. С различни букви са означени статистически достоверни разлики.

Изследванията на фотосинтезата са проведени върху втория лист на растенията. Асимилацията на  $\text{CO}_2$  е по-ниска при вариантите БС, СЧ и СЧС в сравнение с

контролата Б, а скоростта на транспирация не се променя (данните не са показани). За анализирани на фотохимичната активност на ФС2 е приложен ЈР теста (Фигура 24А). Потокът на погълнатата светлинната енергия падаща се на активен ( $Q_A$ -редуциращ) РЦ (ABS/RC) е по-голям при варианти СЧ и БС в сравнение с контролата Б, което отразява по-голям привиден размер на антената. В съответствие на това, броят на активните РЦ на единица осветена площ ( $RC/CS_0$ ) при СЧ и БС е по-малък. При тези варианти квантовите добиви на фотохимичната реакция в РЦ на ФС2 ( $\phi_{P_0}$ ) и на електронния транспорт на ФС2 ( $\phi_{E_0}$ ) са по-ниски, което съответно води и до ниска на продуктивността на ФС2 ( $PI_{ABS}$ ). При вариант СЧС привидния размер на антената ABS/RC е по-малък (без промяна в  $RC/CS_0$ ) отколкото при контролата Б, а параметрите на електронния транспорт на ФС2 са еднакви с контролните, което повишава  $PI_{ABS}$ . При варианти БС и СЧС квантовият добив на електронния транспорт до крайните акцептори на ФС1 ( $\phi_{R_0}$ ) е значително понижен. Поради тези резултати всички варианти имат по-ниска обща производителност на ФС2 и ФС1 ( $PI_{total}$ ) в сравнение с контролата Б.

Общият принос на двата главни компонента (ГК) в дисперсията на набора от данни е 92.8%: 63.4% за ГК1 и 29.4% за ГК2 (Фигура 24Б). Образуването на ГК1 е основно заради разлики в параметрите, описващи състоянието на ФС2: ABS/RC и  $\phi_{P_0}$ ,  $\phi_{E_0}$ ,  $PI_{ABS}$  в обратни посоки. Образуването на ГК2 е заради параметъра на ФС1  $\phi_{R_0}$ . Параметрите  $PI_{total}$  и  $RC/CS_0$  допринасят почти еднакво и за двата главни компонента. Експерименталните точки (групираны по вероятност 68% да се отнасят към съответния вариант) не се разполагат хомогенно в равнината ГК1/ГК2. Интересно е, че всяка група заема преимуществено един от четирите квадранта: СЧ – I, Б – II, СЧС – III и БС – IV. ГК1 разделя съвсем слабо СЧ от Б, но много ясно СЧС от БС. ГК2 разделя умерено СЧС от Б и СЧ от БС. И двата главни компонента разделят Б от БС и СЧ от СЧС. В обобщение, наблюдава се значително припокриване между четирите групи освен за двойките Б/БС и СЧС/БС и минимално припокриване между вариантите СЧ/СЧС. В допълнение, проведенният корелационен анализ между изследваните ЈР параметри и броя на развитите цветове показва най-добра корелация за параметъра  $PI_{ABS}$  ( $R = 0.997$ ,  $p = 0.00319$ ).



**Фигура 24.** А Параметри на JIP теста, изчислени за втори лист на растения *Pisum sativum*, отгледани 7 дни при бяла (Б), бяла слаба (БС), синьо-червена с висок (СЧ) и синьо-червена с нисък интензитет (СЧС) светлина. С различни букви са означени статистически достоверни разлики. Б Анализ на главните компоненти на флуоресцентните параметри разкриващ приликите и разликите между ФСА на четирите изследвани групи.

В последните години диодното осветление позволява на учените да изучават ефекта на спектъра на светлината върху растежа на растенията и допринася за подобряване на производителността на растенията (Darko, Heydarizadeh et al. 2014, Rehman, Ullah et al. 2017, Monostori, Heilmann et al. 2018). Качеството и количеството на светлината, включително интензитета и фотопериода, трябва да са подбрани специфично за конкретния вид растение. В настоящия експеримент е изследван ефектът на комбинация от синя:червена:далечно-червена светлина с висок (СЧ) и нисък (СЧС) интензитет върху растежа и цъфтежа на грах. Приблизителната оценка на потока погълнатата енергия от ФСА за различни спектрални области показва, че потокът на флуоресцентната светлина Б е най-голям в синята област и сходен с този при СЧ и по-висок отколкото при СЧС, докато и двата варианта светодиодни източници дават повишен поток в червената област в сравнение с контролния вариант Б. Потокът в далечно-червената област е най-голям при СЧ, но е пренебрежим в сравнение с другите области, а потокът в зелената област е най-голям при Б.

Повечето анализи на фенотипа отнемат много време и изискват разрушаване на растенията. В настоящето изследване на ефективността на избраната синьо-червена диодна светлинна рецепта целта е да се намери средство за ранна диагностика на физиологичното състояние, което да допринесе за по-бързата оценка на влиянието на използваните светлинни условия. За определяне на промените, настъпващи при отглеждане с изследваната светлинна рецепта с различни интензитети, първо са сравнени основни параметри на растежа на растенията в ранна и в късна фаза от цикъла на развитие. Въпреки сходният вид на растителните варианти в ранната фаза на развитие, светлината СЧС води до удължаване на надземните части, докато СЧ стимулира натрупване на коренова биомаса и намалява водното съдържание (данните не са показани). На по-късен етап СЧС предизвиква развитие на цветове сходно с контролата Б, докато при СЧ образуването на цветове спира в начална фаза придружено със значително изсъхване на надземните части. Основавайки се на последни литературни данни, резултатите, описани по-горе могат да се обобщят в модел, според който светлинният интензитет контролира разпределението на захарите между корена и надземните части (Sakuraba, Kanno et al. 2018, van Gelderen, Kang et al. 2018, van Gelderen, Kang et al. 2018, Zhou, Wang et al. 2019). При светлина СЧС настъпва пренасочване на асимилатите към надземните части за цъфтеж.

Фокусът на по-нататъшното изследване е детекцията на промени в фотосинтетичната производителност, настъпващи още в ранното развитие на растенията отгледани при различни светлинни условия. Растежът и хлорофилното съдържание на втория лист са сходни при СЧ и СЧС вариантите, а при БС са намалени (Фигура 29 в дисертацията). Въпреки това, анализът на хлорофилната флуоресценция разкрива, че ефективността на ФС2 е по-ниска при СЧ подобно на БС, за разлика от СЧС, за всяка стъпка от оползотворяването на светлината. Привидният размер на антената (ABS/RC) се повишава при СЧ, което противоречи на предишни данни за по-малка антена при силна светлина (Wientjes, van Amerongen et al. 2013). Тъй като хлорофилната концентрация е еднаква с контролната, по-голямото съотношение ABS/RC може да се обясни с по-ниският брой на активните РЦ за единица площ ( $RC/CS_0$ ), дължащо се на фото-оокисление (Takahashi and Murata 2008). Предполага се, че при силно възбуждане на ФС1 с далечно-червена светлина, ССК2 се премества от ФС1 към ФС2, за да се погасят възбудените състояния или за да се увеличи размера на антената на ФС2 (Wientjes, van Amerongen et al. 2013). От друга страна, по-високото ABS/RC при БС се дължи както на значително по-ниското  $RC/CS_0$ , което най-вероятно е причинено от нарушено образуване на РЦ, така и от понижения хлорофилен синтез и дестабилизация на макроорганизацията на ТМ (съдейки по изместване на термалния преход при 56°C към по-ниски температури в калориметричните профили на ТМ, изолирани от растения, отглеждани при четирите светлинни рецепти, данните не са показани). По-високо ABS/RC е наблюдавано и при дефицити на хранителни вещества (Kalaji, Oukarroum et al. 2014). Светлината СЧС намалява привидния размер на антената на ФС2 без да променя концентрацията/плътността на РЦ, което може да се дължи на по-ниското поглъщане на синя светлина. Квантовите добиви на фотохимичната реакция във ФС2 ( $\phi_{P_0}$ ) и електронния транспорт до междинните акцептори ( $\phi_{E_0}$ ) са по-ниски при СЧ и БС. При СЧ повишеното разсейване на енергията (ниско  $\phi_{P_0}$ ) може да е механизъм, използван от стресираните растения, за предпазване от излишната погълната светлина, превръщайки я в топлина (Kalaji, Oukarroum et al. 2014). Силна ултравиолетова и синя светлина, и червена светлина до известна степен, могат да причинят фотоинхибиране на ФС2, настъпващо в КОС (Takahashi and Murata 2008). При БС силно намаленият светлинен интензитет не може да причини такова увреждане на ФС2, поради което ниските квантови добиви могат да се обяснят със структурни нарушения в комплексите на РЦ още при синтеза им. По-високото  $\phi_{P_0}$  при СЧС предполага липса на фотоинхибиране и на необходимост от разсейване на енергията.

Съществуват данни, подкрепящи по-ефективното функциониране на ФС2 при умерена осветеност (Ilieva, Ivanova et al. 2010).

По отношение на ефективността на електронния транспорт до крайните акцептори на ФС1 ( $\phi_{R0}$ ) СЧ не се различава от контролата Б. Възможно е този ефект да е резултат от динамичната регулация на разпределянето на енергията на възбуждане между двете фотосистеми, която е важен механизъм за поддържане на правилното функциониране на ФСА в ТМ (Laisk, Oja et al. 2014). Различни изследователски групи докладват значително увеличаване на нестикваните участъци на ТМ *in vivo* при високи светлинни интензитети, което подпомага миграцията на белтъчните комплекси в ТМ и значителното изместване на енергийният поток към ФС1 и води до по-ниска фотохимична активност на ФС2 (Khatoon, Inagawa et al. 2009, Herbstová, Tietz et al. 2012, Yamamoto, Nori et al. 2013). При СЧС и БС  $\phi_{R0}$  силно намалява, което показва чувствителността на параметъра към интензитета на светлината. Доказано е, че абсолютното поглъщане на пигментите във ФС1 е по-ниско от това на пигментите във ФС2 (Laisk, Oja et al. 2014). Интересно е, че при СЧС червената светлина не изглежда лимитираща, което предполага специфичен ефект на намалената синя светлина върху електронния транспорт през ФС1. В обобщение, СЧ и СЧС имат понижена обща продуктивност на ФС2 и ФС1 спрямо контролата.

Анализът на главните компоненти на изследваните ЛР параметри показва, че въпреки припокриването между анализираниите групи, ефектите на различните светлинните рецепти върху ФСА в ТМ може да се разграничат. ГК1 разделя вариантите според активността на ФС2 – ниските стойности отговарят на по-добра производителност (ниско поглъщане на светлина, високи добиви на първична фотохимична реакция и електронен транспорт). Разделянето по ГК2 се определя от активността на ФС1 – по-високи стойности отговарят на по-висока ефективност. Растенията, отгледани при Б светлина имат най-висока, а растенията – при БС имат най-ниска обща производителност на ФС2 и ФС1. При СЧ функционирането на ФС2 е нарушено, а на ФС1 не е засегнато, докато при СЧС е обратно – производителността на ФС1 е ниска, а на ФС2 е интактна. По този начин вариантите СЧ и СЧС се разполагат между Б и БС, което съответства на умерено понижена обща фотосинтетична активност.



Анализът на главните компоненти може да разкрие корелация между фотосинтезата и цъфтежа. Растенията от вариантите Б и СЧС, които имат висока производителност на ФС2 (отрицателни стойности на ГК1) на ден 7-мия от отглеждането, покъсно в развитието си образуват еднакъв брой цветове, докато растенията от БС и СЧ, имащи потисната активност на ФС2 (положителни стойности на ГК1), нямат развити цветове на ден 25-и. Изследвайки приноса на всеки параметър, формиращ индекса на производителност на ФС2,  $PI_{ABS}$ , ( $ABS/RC$ ,  $\phi_{Po}$ ,  $\phi_{Eo}$ ), към ГК1 по дължината и посоката на векторите на променливите на графиката, може да се смята, че цъфтежът най-специфично се предвижда от малък привиден размер на антената на ФС2 и висока ефективност на електронния транспорт. Въпреки това, най-точният параметър за предвиждане на цъфтежа е  $PI_{ABS}$ , който има и най-висок коефициент на корелация с броя на развитите цветове.

В съответствие с ниската продуктивност на ФСА в ТМ ( $PI_{total}$ ) при СЧ и СЧС, биохимичните реакции по асимилация на  $CO_2$  също са потиснати. Тъй като скоростта на транспирация при различните варианти е еднаква, газообменът изглежда не е нарушен. Високите светлинни интензитети повишават натрупването на активни форми на кислорода, които могат да причинят както фотоинхибиране на ФС2, така и забавяне на редуцията на  $CO_2$ . Доказано е, че фиксацията на  $CO_2$  регулира генерирането на кислородни радикали (Takahashi and Murata 2008, Wang, Wang et al. 2018). Оксидативният стрес може да промени пътя на редуциращите еквиваленти (НАДФН) от включване в цикъла на Калвин-Бенсон към използване за синтез на вторични метаболити за гасене на свободните радикали (Selmar and Kleinwächter 2013, Karchina-Toteva, Dimitrova et al. 2014). При ниски светлинни интензитети цикличния електронен транспорт около ФС1 се потиска, което намалява асимилацията на  $CO_2$ , растежа и добивите при ориз (Yamori, Shikanai et al. 2015). Асимилацията на  $CO_2$  намалява и поради факта, че съдържанието и активността на Рубиско зависят от интензитета на светлината (Leong and Anderson 1984).

## 5. Обобщение на получените резултати

В настоящата работа са разработени високо информативни методи, представляващи допълнение към конвенционално прилагания JIP тест на индукционните криви на хлорофилна флуоресценция. Тези подходи са валидирани при изследване на четири фотосинтезиращи биологични вида, подложени на различни типове абиотичен стрес – сред тях три вида висши растения със стопанско и екологично значение (*Helianthus annuus* L, *Platanus orientalis* и *Pisum sativum*) и един вид микроводорасло с биотехнологично значение (*Scenedesmus sp.*).

Един от най-добре познатите и най-широко използвани методи за анализ на хлорофилната флуоресценция е проследяването на нейното гасене при осветяване с насищаща светлина по време на продължително осветяване с ненасищаща светлина, благодарение на развитието на PAM флуориметри през последните 30 години и голямата им достъпност в наши дни. От друга страна анализът на индукционните криви на флуоресценцията набира все по-голяма популярност поради развитието на флуориметри, използващи непрекъснато осветяване, по-кратките и лесно приложими протоколи на измерване. В настоящата работа е представен нов подход за анализ на гасенето на флуоресценцията чрез редуване на записване на индукционни криви и осветяване със слаба светлина с M-PEA, флуориметър, използващ непрекъснато осветяване. За изчисление на параметрите на гасенето (фотохимично, нефотохимично, действителен квантов добив на светло) е нужно измерването на минималната флуоресценция в светлинно-адаптирано състояние ( $F_0'$ ). При флуориметри, използващи непрекъснато осветяване това е невъзможно, поради което се налага то да се изчислява от другите параметри. Доказано е, че апроксимацията на  $F_0'$  (Oxborough and Baker 1997) може надеждно да се прилага, тъй като то остава постоянно в светлинно-адаптирани условия по време на цялото измерване (10 минути при *Scenedesmus sp.*).

Анализът на индукционните криви на флуоресценция по JIP тест свидетелства за най-висока производителност на ФСА в ТМ (проследена чрез параметъра  $PI_{total}$ ) в условия на отглеждане на *Scenedesmus sp.* в среда с органичен източник на азот (урея) и 2%  $CO_2$ , а най-ниска – при неорганичен източник на азот (амониев нитрат) и 0.04%  $CO_2$ . Очаквано, реакциите от тъмнинната фаза на фотосинтезата, проследени чрез анализа на гасенето на хлорофилната флуоресценция, се повлияват по-силно от концентрацията на  $CO_2$ , отколкото от типа на азотния източник. Динамиката на

фотохимичното гасене ( $qP$ ) и действителния квантов добив на ФС2 ( $\Phi_{PSII}$ ) по време на осветяване се определя главно от концентрацията на  $CO_2$  в средата на отглеждане. От друга страна, нефотохимичното гасене (NPQ) показва по-голяма специфичност към конкретните условия на отглеждане – ходът на кривите на NPQ по време на осветяване е строго специфичен за всяка от изследваните комбинации на двата фактора. Динамиката на тъмнинните спадове е сходна с тази на  $qP$ , което предполага, че и двата параметъра отразяват едни и същи процеси. Така, анализът на фотохимичното гасене може да бъде допълнен или заменен от изследване на ТС, които отразяват скоростта на реокисление на  $Q_A$  от електронните преносители след него.

Изготвянето на диференциални криви за различни участъци на индукционната крива на хлорофилната флуоресценция допълва анализа на JIP теста, като онагледява промените (спрямо контролен обект) в електронния пренос в различни стъпки от ЕТВ. Този подход е приложен за проучването на ефекта на хербицида имазамокс и биостимуланта *Terra-sorb foliar* върху слънчоглед, а също така и за проследяване на динамиката на предизвиканите от засушаване промени във ФСА при чинар.

JIP тест на пръскани с имазамокс слънчогледови растения показва, че ефектът на този хербицид се демонстрира най-ясно от относителния брой на хлорофилните молекули, които изпълняват функцията на РЦ ( $\gamma_{RC}$ ), квантовия добив на междусистемния електронен транспорт ( $\phi_{Eo}$ ) и редуцирането на крайните акцептори ( $\phi_{Ro}$ ). Тези ефекти се отразяват и на стойностите на  $PI_{total}$ , които са двойно понижени при растенията, пръскани с имазамокс. В допълнение, положителната L ивица, получена при съставяне на диференциални криви от т. О до т. К, показва, че при третираните с имазамокс растения има по-малка функционална свързаност между суперкомплексите на ФС2. К ивицата на диференциалната крива от т. О до т. J индикира инхибиране на електронния транспорт откъм донорната страна, или ускоряване на електронния транспорт откъм акцепторната страна. Данните от JIP теста обаче изключват второто предположение. Ивицата на фаза J-I също е положителна и свидетелства за по-малък брой пластохинонови молекули за един РЦ. Отрицателната ивица на фаза I-P показва по-голям брой крайни електронни акцептори. Може да бъде направен изводът, че въпреки че имазамокс не е фотосинтетичен хербицид, той има силно потискащо действие върху ФСА. Най-ветоятно то се дължи на блокиране на синтеза на разклонени аминокиселини. т.е. потискащият ефект на имазамокс върху

ФСА има неспецифичен механизъм, засягащ не само ФСА, но и всички белтъци, чиито аминокиселинни последователности включват разклонени аминокиселини.

Действието на биостимуланта съдържащ АКЕ върху ФСА е ограничено. Той има много слаб стимулиращ ефект върху нативни и третиранни с имазамокс листа. При третираните само с биостимулант растения са повлияни главно параметрите  $N$  и  $PI_{total}$ . Според диференциалните криви броят на пластохионовите молекули намалява, а броят на крайните акцептори се увеличава. При изследване на растения, третиранни и с двата препарата, става ясно, че *Terra-sorb foliar* не предотвратява ефекта на хербицида имазамокс, а според някои ЛР параметри и диференциални криви дори го засилва ( $DI_O/RC$ ,  $PI_{ABS}$ , отрицателна J-I ивица).

Един от най-големите предимства на използването на флуоресцентни методи за анализ на физиологичното състояние на растенията е тяхната неинвазивност, която позволява проследяване на промените на ФСА във времето, т.е. на динамиката им. Динамиката на промените в светлинна фаза на фотосинтезата при засушаване на млади дръвчета източен чинар е изучена чрез съвместен анализ на индукционни криви на флуоресценцията – ЛР тест и ДК. ЛР тестът показва, че електронния транспорт след  $Q_A$  е силно потиснат при засушаване (понижение на  $\phi_{E_0}$  и  $\phi_{R_0}$ ), а относителния брой на електронните акцептори ( $N$ ) намалява. Съдейки по динамиката на К ивицата, донорната страна на ФС2 също се засяга при лимитиращи водни условия и дори не претърпява възстановяване след края на засушаването. По динамиката на L ивицата е проследена значителна реорганизация на комплексите в ТМ при засушаване и възстановяване. Стресовата реакция при БГ екотип е по-ясно изразена, но повечето параметри претърпяват частично възстановяване след прекратяване на стреса, докато ИТ екотип по-слабо променя своите параметри по време на стреса, но ефектът продължава през целият период на изследване.

Изследвано е влиянието на различно качество и количество светлина върху ФСА, растежа и развитието при грах, като особено внимание е обърнато на цъфтежа. За улесняване на анализа на ефекта на различните светлинни условия върху отделните участъци от ЕТВ е приложена е допълнителна статистическа обработка на флуоресцентните параметри от ЛР теста, направена чрез анализ на главните компоненти. При бяла светлина цялата ЕТВ функционира добре, а при слаба бяла светлина – ефективността ѝ е силно понижена. При синьо-червена светлина

функционирането на ФС2 е нарушено, а на ФС1 не е засегнато, докато при слаба синьо-червена светлина е обратно – производителността на ФС1 е ниска, а на ФС2 е незасегната. Активността на ФС1 зависи в по-голяма степен от интензитета на светлината, отколкото от спектъра ѝ, докато активността на ФС2 се определя и от двата фактора.

Изследвана е възможността по определени фотосинтетични параметри, измерени на ранен етап от развитието на растението, да се предскаже цъфтежа на по-късен етап. Слабата синьо-червена светлина предизвиква развитие на цветове сходно с това при контролната бяла светлина, докато при синьо-червената и слабата бяла светлина образуването на цветове спира в начална фаза на развитие. Оказва се, че най-подходящ параметър за предсказване на цъфтежа е  $PI_{ABS}$ , като развитието на цветовете е свързано с висока производителност на ФС2.

## 6. Изводи

На база на получените резултати в съответствие с поставените задачи за разработване на биофизичен подход, основаващ се на анализ на фотоиндуцираната динамика на хлорофилната флуоресценция, който да се използва за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на ФСА при въздействие на различни стресови фактори при различни растения са формулирани следните изводи:

1. Фотоиндуцираната динамика на  $\Phi_{PSII}$  и ТС в култура от микроводорасли *Scenedesmus* е чувствителна към условията на средата Концентрацията на  $CO_2$  е определяща и за двата процеса, а урея има стимулиращ ефект – най-ефективен е фотосинтетичния електронен транспорт в културата, растяща в среда с ниска концентрация на  $CO_2$  и урея като азотен източник При културите, отгледани в среда с висока концентрация на  $CO_2$ , антенните комплекси претърпяват преход от състояние 2 към състояние 1. Светлинно-индуцираната кинетика на тъмнинните спадове на флуоресценцията е подобна на кинетиката на  $\Phi_{PSII}$  след първите 30 s на измерване и анализът му представлява алтернативен подход за изследване на фотохимичното и нефотохимичното гасене.
2. Хербицидът имазамокс намалява ефективността на фотосинтетичните процеси на всички етапи от преобразуването на енергията в ТМ: подредба на антенните комплекси (L ивица), енергиен поток към РЦ (ABS/RC), електронния пренос в донорна и акцепторна страна на ФС2 (K ивица,  $\Phi_{E0}$ ,  $PI_{ABS}$ ) и ФС1 ( $\Phi_{R0}$  и  $PI_{total}$ ), въпреки че прекият му механизъм на действие не засяга тези реакции.
3. Биостимулантът *Terra-sorb foliar* не оказва влияние върху структурните и функционалните параметри на ФСА при контролни условия и частично намалява негативния ефект на хербицида имазамокс.
4. Засушаването на млади дръвчета чинар засяга флуоресцентните параметри, свързани както с ФС2 ( $\Phi_{E0}$ , RC/ABS и  $PI_{ABS}$ ), така и дори в по-голяма степен с ФС1 ( $\Phi_{R0}$  и  $PI_{total}$ ), като значително потискане се наблюдава и при капацитета на междинните електронни преносители (N). ФСА в листа от БГ екотип проявява по-висока чувствителност към условията на засушаване спрямо ИТ екотип. При БГ екотип част от изследваните параметри показват връщане към нормата след възстановяване на почвената влажност, докато при ИТ екотипа стойностите при засушаване се запазват.

5. Анализът на диференциалните криви, отразяващи промените в индукционните кинетики на флуоресценцията при прилагане на засушаване и повторно оводняване, показват, че нарушеният баланс в електронния транспорт в донорната и акцепторната страна на ФС2 не са обратими и дори се засилват след прекратяване на водния стрес.
6. Отглеждане на грахови растения при различни условия на осветяване оказва силно влияние върху структурата и функцията на ФСА. При умерена бяла светлина цялата ЕТВ работи ефективно, а много слаба бяла светлина потиска и двете фотосистеми. В сравнение с оптималната бяла светлина, умерена синьо-червена светлина намалява ефективността на ФС1, но не оказва ефект върху ФС2, а силна синьо-червена светлина потиска само ФС2, но не и ФС1.
7. Анализът на главните компоненти, направен на базата на избрани параметри на хлорофилната флуоресценция, позволява да се дефинират 2 взаимно независими групи параметри (направления), промените в които са свързани с интензитета на комбинирана светлина – направление 1 в равнината компонент1/компонент2, и с интензитета на бялата светлина – направление 2. Първото направление е свързано предимно с промени в параметрите на ФС2, а второто – с ефективността на електронния пренос във ФС1.
8. Показано е, че формирането и развитието на цветните пъпки в жизнения период на граховите растения силно зависят от количеството и качеството на светлината, като развити цветове се формират само при силно бяло или слабо синьо-червено осветяване, което се съпровожда с характерни промени в параметрите на хлорофилната флуоресценция. Показано е, че с комбинация от параметри може да се предскаже вероятността за цъфтеж с  $R = 0.997$  ( $p = 0.00319$ ).
9. Различни експериментални подходи и обработка, допълнена с вторичен анализ на кинетиките, правят хлорофилната флуоресценция високоинформативен инструмент за мониторинг на състоянието на растенията в различни условия на средата.

## 7. Приноси

1. Разработен е протокол за надежден анализ на гасенето на флуоресценцията на хлорофил *a* с флуориметър, използващ непрекъснато осветяване за измерване на флуоресценцията, наподобяващ *РАМ* подходът на регистрация на гасенето. Протоколът е допълнен с едновременно измерване на тъмнинни спадове на флуоресценцията, което може да бъде използвано като допълнение или заместител на параметъра фотохимичното гасене.
2. Съставени са диференциални криви на относителната вариабилна флуоресценция, двойно нормирана от стъпка J до стъпка I ( $\Delta W_{J-I}$ ) и от I до P ( $\Delta W_{I-P}$ ) на индукционната крива на флуоресценцията, които могат да се използват за подробен анализ на промените в относителния брой на електронните акцептори в ЕТВ, допълвайки параметрите от JIP теста  $S_m$  и  $N$  – по  $\Delta W_{J-I}$  се определят разлики в относителния брой на пластохиноните спрямо контролен вариант на изследване, а по  $\Delta W_{I-P}$  се определят разлики в относителния брой на крайните акцептори на ФС1 спрямо контролен вариант.
3. Намерен е параметър от JIP теста –  $PI_{ABS}$ , който измерен на ранен етап от развитието на растението (7-ми ден), с голяма точност предсказва цъфтежа на граховите растения на по-късен етап (25-ти ден).



## 8. Научни публикации по темата на дисертационния труд

1. Paunov, M., Dankov, K., Dimitrova, S., Velikova, V., Tsonev, T., Strasser, R., ... & Goltsev, V. (2015). Effect of water stress on photosynthetic light phase in leaves of two ecotypes of *Platanus orientalis* L. plants. *Journal of BioScience & Biotechnology*.

### **Забелязани цитати:**

1. Кеџа, N., Tkaczyk, M., Źólciaк, A., Stocki, M., Kalaji, H. M., Nowakowska, J. A., & Oszako, T. (2018). Survival of European ash seedlings treated with phosphite after infection with the *Hymenoscyphus fraxineus* and *Phytophthora* species. *Forests*, 9(8), 442.
  2. Pakdel, P., Nemati, S. H., Tehranifar, A., Kazemi, F., & Lakzian, A. (2017). EFFECT OF PLANTING BED CONDITIONS ON SOME GROWTH CHARACTERISTICS OF PLANE TREES IN NORTH EASTERN PART OF IRAN. *IIOAB Journal*, 8.
2. Vasileva, I., Ivanova, J., Paunov, M., & Angelova, L. (2016). Urea from waste waters—perspective nitrogen and carbon source for green algae *Scenedesmus* sp. cultivation. *Ecol. Safe*, 10, 311-319.

### **Забелязани цитати:**

1. Grzesik, M., Romanowska-Duda, Z., & Kalaji, H. M. (2017). Effectiveness of cyanobacteria and green algae in enhancing the photosynthetic performance and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants under limited synthetic fertilizers application. *Photosynthetica*, 55(3), 510-521.
2. Setta, N. G. A., Saber, H., El, A. B. A. E. A., & Galal, H. R. (2018). Potentiality of algae extracts in alleviating stresses effect on common bean under upper Egypt conditions. *Advances in Environmental Biology*, 12(12), 28-38.
3. Aziz, E. E., Rezk, A. I., Omer, E. A., Nofal, O. A., Salama, Z. A., Fouad, H., & Fouad, R. (2019). Chemical composition of *Mentha pulegium* L.(Pennyroyal) plant as influenced by foliar application of different sources of zinc. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 18(1), 53.

3. Balabanova, D. A., Paunov, M., Goltsev, V., Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Vassilev, A. (2016). Photosynthetic performance of the imidazolinone resistant sunflower exposed to single and combined treatment by the herbicide imazamox and an amino acid extract. *Frontiers in plant science*, 7, 1559. – **IF 4.106, Q1**

**Забелязани цитати:**

1. Baghbani, F., Lotfi, R., Moharramnejad, S., Bandehagh, A., Roostaei, M., Rastogi, A., & Kalaji, H. M. (2019). Impact of *Fusarium verticillioides* on chlorophyll fluorescence parameters of two maize lines. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2), 337-346.
  2. da Silva, P. S. O., Sena, E. D. O. A., Gonzaga, M. I. S., de Oliveira Junior, L. F. G., dos Santos Maciel, L. B., dos Santos, M. P. F., ... & Carnelossi, M. A. G. (2019). Calcium carbonate particle films and water regimes affect the acclimatization, ecophysiology and reproduction of tomato. *Environmental and Experimental Botany*, 165, 19-29.
  3. Matysiak, K., Miziniak, W., Kaczmarek, S., & Kierzek, R. (2018). Herbicides with natural and synthetic biostimulants in spring wheat. *Ciência Rural*, 48(11).
  4. Liu, X., Zhang, H., Wang, J., Wu, X., Ma, S., Xu, Z., ... & An, B. (2019). Increased CO<sub>2</sub> concentrations increasing water use efficiency and improvement PSII function of mulberry seedling leaves under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 213-223.
  5. CHITBAND, A. A., GHORBANI, R., MOHASSEL, M. H. R., & NABIZADE, M. (2017). The Effect of Sugar Beet Broadleaf Herbicides on Fluorescence Induction Curves in *Amaranthus retroflexus* L. and *Portulaca oleracea* L. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(3), 433-442.
  6. Miziniak, W., Matysiak, K., Górski, D., & Ulatowska, A. (2018). Wpływ łącznego stosowania herbicydów z biostymulatorem Tytanit na zwalczanie chwastów i plonowanie pszenicy jarej. *Zagadnienia Doradztwa Rolniczego*, (4 (94)), 89-98.
4. Zhiponova, M., Paunov, M., Anev, S., Petrova, N., Krumova, S., Raycheva, A., ... & Chaneva, G. (2020). Special issue in honour of Prof. Reto J. Strasser – JIP-test as a tool for early diagnostics of plant growth and flowering upon selected light recipe. *Photosynthetica*. – **IF 2.365, Q2**

## 9. Участия в научни форуми

1. „Phenotyping of the stress response during application of moderate high temperatures and recovery in two ecotypes *Platanus orientalis* by means of fluorescence and optical methods”, M. Paunov, B. Pavlova, S. Dimitrova, K. Dankov, V. Velikova, T. Tsonev, M. Kouzmanova, V. Goltsev. Plant Phenotyping Forum: integrating European plant phenotyping community, 22th - 24th November 2017, Tartu, Estonia: постер
2. "Profiling of *Platanus orientalis* L. leaves by fluorescence and optical methods during the combined treatment with moderate high temperatures and drought“, M. Paunov, B. Pavlova, S. Dimitrova, K. Dankov, V. Velikova, T. Tsonev, M. Kouzmanova, V. Goltsev. Младежка научна конференция „Климентови дни - 2017“, 16-17 ноември 2017 г., София, България: постер
3. „Comparative investigation of the moderate heat stress reaction between two ecotypes of plane (*Platanus orientalis*) and olive (*Olea europaea*) trees“, M. Paunov, B. Pavlova, E. Chachi, St. Dimitrova, K. Dankov, V. Velikova, Ts. Tsonev, M. Kouzmanova, V. Goltsev. Младежка научна конференция „Климентови дни - 2016“, 17-18 ноември 2016 г., София, България: постер
4. „Analyzes of “dark drops” of prompt chlorophyll a fluorescence in leaves of two ecotypes of *Platanus orientalis* during drought stress“, S. Dimitrova, B. Pavlova, M. Paunov, K. Dankov, V. Goltsev, Ts. Tsonev, V. Velikova. Младежка научна конференция „Климентови дни - 2015“, 19-20 ноември 2015 г., София, България: постер
5. „Effect of water stress on photosynthetic light phase in leaves of two ecotypes of *Platanus orientalis* L. Plants“, M. Paunov, K. G. Dankov, S. G. Dimitrova, V. B. Velikova, Ts. D. Tsonev, R. J. Strasser, H. M. Kalaji, V. N. Goltsev. Втора Национална конференция за млади учени “Биологически науки за по-добро бъдеще”, 30-31 октомври.2015 г., Пловдив, България: постер

## 10. Цитирани литературни източници

1. Darko, E., P. Heydarizadeh, B. Schoefs and M. R. Sabzalian (2014). "Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **369**(1640): 20130243.
2. Georgiev, D. (1978). "Milieu Nutritif Tamponne Et Methode De Culture Intensive Des Microalgues Vertes."
3. Goltsev, V., M. Gurmanova, M. Kouzmanova, I. Yordanov, S. Qiang, A. Pentland, N. Wilson, S. Chen, I. Zaharieva and R. J. Strasser (2013). Analysis of dark drops, dark-induced changes in chlorophyll fluorescence during the recording of the OJIP transient. Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future, Springer: 179-183.
4. Herbstová, M., S. Tietz, C. Kinzel, M. V. Turkina and H. Kirchhoff (2012). "Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(49): 20130-20135.
5. Ilieva, I., T. Ivanova, Y. Naydenov, I. Dandolov and D. Stefanov (2010). "Plant experiments with light-emitting diode module in Svet space greenhouse." Advances in Space Research **46**(7): 840-845.
6. Kalaji, H. M., V. Goltsev, K. Bosa, S. I. Allakhverdiev and R. J. Strasser (2012). "Experimental in vivo measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker." Photosynthesis Research **114**(2): 69-96.
7. Kalaji, H. M., A. Oukarroum, V. Alexandrov, M. Kouzmanova, M. Brestic, M. Zivcak, I. A. Samborska, M. D. Cetner, S. I. Allakhverdiev and V. Goltsev (2014). "Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements." Plant physiology and biochemistry **81**: 16-25.
8. Kapchina-Toteva, V., M. Dimitrova, M. Stefanova, D. Koleva, K. Kostov, Z. P. Yordanova, D. Stefanov and M. Zhiponova (2014). "Adaptive changes in photosynthetic performance and secondary metabolites during white dead nettle micropropagation." Journal of plant physiology **171**(15): 1344-1353.
9. Khatoun, M., K. Inagawa, P. Pospíšil, A. Yamashita, M. Yoshioka, B. Lundin, J. Horie, N. Morita, A. Jajoo and Y. Yamamoto (2009). "Quality control of photosystem II thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids." Journal of Biological Chemistry **284**(37): 25343-25352.
10. Laisk, A., V. Oja, H. Eichelmann and L. Dall'Osto (2014). "Action spectra of photosystems II and I and quantum yield of photosynthesis in leaves in State 1." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1837**(2): 315-325.
11. Leong, T.-Y. and J. M. Anderson (1984). "Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. II. Regulation of electron transport capacities, electron carriers, coupling factor (CF<sub>1</sub>) activity and rates of photosynthesis." Photosynthesis research **5**(2): 117-128.
12. Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000). "Chlorophyll fluorescence—a practical guide." Journal of experimental botany **51**(345): 659-668.
13. Monostori, I., M. Heilmann, G. Kocsy, M. Rakszegi, M. Ahres, S. Altenbach, G. Szalai, M. Pál, D. Toldi and L. Simon-Sarkadi (2018). "LED lighting—modification of growth, metabolism, yield and flour composition in wheat by spectral quality and intensity." Frontiers in plant science **9**: 605.

14. Nishio, J. (2000). "Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement." Plant, Cell & Environment **23**(6): 539-548.
15. Oukarroum, A., S. El Madidi, G. Schansker and R. J. Strasser (2007). "Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering." Environmental and Experimental Botany **60**(3): 438-446.
16. Oxborough, K. and N. R. Baker (1997). "Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components—calculation of qP and Fv-/Fm-; without measuring Fo." Photosynthesis research **54**(2): 135-142.
17. Rehman, M., S. Ullah, Y. Bao, B. Wang, D. Peng and L. Liu (2017). "Light-emitting diodes: whether an efficient source of light for indoor plants?" Environmental Science and Pollution Research **24**(32): 24743-24752.
18. Sakuraba, Y., S. Kanno, A. Mabuchi, K. Monda, K. Iba and S. Yanagisawa (2018). "A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition." Nature plants **4**(12): 1089-1101.
19. Selmar, D. and M. Kleinwächter (2013). "Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products." Plant and Cell Physiology **54**(6): 817-826.
20. Stirbet, A. and Govindjee (2011). "On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **104**(1-2): 236-257.
21. Strasser, R. J., A. Srivastava and Govindjee (1995). "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria." Photochemistry and photobiology.
22. Strasser, R. J., M. Tsimilli-Michael, S. Qiang and V. Goltsev (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*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1797**(6-7): 1313-1326.
23. Strasser, R. J., M. Tsimilli-Michael and A. Srivastava (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Springer: 321-362.
24. Takahashi, S. and N. Murata (2008). "How do environmental stresses accelerate photoinhibition?" Trends in plant science **13**(4): 178-182.
25. Tsimilli-Michael, M. and R. J. Strasser (2008). In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. mycorrhiza, Springer: 679-703.
26. Tsimilli-Michael, M. and R. J. Strasser (2013). Biophysical phenomics: evaluation of the impact of mycorrhization with *Piriformospora indica*. Piriformospora indica, Springer: 173-190.
27. van Gelderen, K., C. Kang, R. Paalman, D. Keuskamp, S. Hayes and R. Pierik (2018). "Far-red light detection in the shoot regulates lateral root development through the HY5 transcription factor." The Plant Cell **30**(1): 101-116.
28. van Gelderen, K., C. Kang and R. Pierik (2018). "Light signaling, root development, and plasticity." Plant physiology **176**(2): 1049-1060.
29. Wang, Z., Y. Wang, J. Zhao, L. Ma, Y. Wang, X. Zhang, Y. Nie, Y. Guo, L. Mei and Z. Zhao (2018). "Effects of GeO<sub>2</sub> on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes in apple leaves under strong light." Photosynthetica **56**(4): 1081-1092.

30. Wientjes, E., H. van Amerongen and R. Croce (2013). "LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1827**(3): 420-426.
31. Yamamoto, Y., H. Hori, S. Kai, T. Ishikawa, A. Ohnishi, N. Tsumura and N. Morita (2013). "Quality control of Photosystem II: reversible and irreversible protein aggregation decides the fate of Photosystem II under excessive illumination." Frontiers in plant science **4**: 433.
32. Yamori, W., T. Shikanai and A. Makino (2015). "Photosystem I cyclic electron flow via chloroplast NADH dehydrogenase-like complex performs a physiological role for photosynthesis at low light." Scientific reports **5**: 13908.
33. Zhou, T., L. Wang, Y. Gao, Y. L. Du, L. Zhao and L. W. Guo (2019). "Interactions between light intensity and phosphorus nutrition affect the P uptake capacity of maize and soybean seedling in a low light intensity area." Frontiers in plant science **10**: 183.