

Милена Танева Герганова

***Роля на температурата и
каротеноидите за устойчивостта на
висши растения към висок светлинен
интензитет***

АВТОРЕФЕРАТ

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

Професионално направление 4.3. „Биологически науки” и научна
специалност „Биофизика”

Научен ръководител: проф. Мая Янева Величкова
Научен консултант: проф. Антоанета Видолова Попова

София, 2017 г.

Дисертационния труд е обсъден на разширен научен семинар на секция „Фотовъзбудими мембрани“ на ИБФБМИ – БАН, проведен на 11.09.2017 г. и насочен за защита.

Дисертационния труд съдържа 157 страници, включващи текст, 67 фигури (от тях: 58 фигури и 2 таблици в раздел <<Резултати и Обсъждане>>), цитирани са 289 литературни източници. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 3 научни публикации. Забелязани са две независими цитирания.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2017 г. от часа в залата на Института по Физиология на растенията и генетика – БАН, София, 1113, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2. Материалите, свързани със защитата, са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 105, София.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Милена Танева Герганова

***Роля на температурата и
каротеноидите за устойчивостта на
висши растения към висок светлинен
интензитет***

АВТОРЕФЕРАТ

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

Професионално направление 4.3. „Биологически науки” и научна
специалност „Биофизика”

Научен ръководител: проф. Мая Янева Величкова

Научен консултант: проф. Антоанета Видолова Попова

София, 2017 г.

Списък на използваните съкращения

Car – каротеноиди

Chl *a* – хлорофил *a*

Chl *b* – хлорофил *b*

Chl/Car – отношение на общия хлорофил към общите каротеноиди

F_v/F_m – максимална квантова ефективност на PSII

FW – свежо тегло

HT-HL – висока температура и висок светлинен интензитет

HT-NL – висока температура и нормален светлинен интензитет

Lhc – Lhc-мономер

LT-HL – ниска температура и висок светлинен интензитет

LT-NL – ниска температура и нормален светлинен интензитет

MDA – малондиалдехид

NPQ – нефотохимично гасене

NT-HL – нормална температура и висок светлинен интензитет

NT-NL – нормална температура и нормален светлинен интензитет

PAM – импулсно амплитудно модулирана хлорофилна флуоресценция

PSI – фотосистема 1

PSII – фотосистема 2

qP – фотохимично гасене

ROS – реактивни кислородни форми

ΦNO – квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на ксантофиловия цикъл

ΦPSII – квантов добив на PSII в светлинно-адаптирано състояние

BN-PAGE – нативна (синьо оцветена) полиакриламидна гел електрофореза

SDS-PAGE – натриев додецил сулфат-полиакриламидна гел електрофореза

УВОД

Фотосинтезата е забележителен процес, при който висшите растения, водорасли и цианобактерии преобразуват светлинната енергия в енергия на макроергични връзки. Фотосинтезата заема централно място в кръговрата на енергията в света, като осигурява отделяне на кислород в атмосферата и затова животът на Земята зависи от ефективността на фотосинтезата. Познаването на механизмите на усвояване и преобразуване на светлината във фотосинтетичния апарат на растенията е от основно значение при контролирането на фотосинтезата. През последните години проблемът за стреса при растенията придобива все по-голяма актуалност, поради неблагоприятните промени в климата и замърсяването на околната среда, които оказват неблагоприятно влияние върху земеделските култури. Най-характерните стресови фактори за растенията у нас са засушаване, ниски и високи температури, дефицитът на минерални елементи, висока осветеност, UV-радиация, засоляване и др.

В настоящата работа са използвани домати растения (*Solanum lycopersicum* cv. М 82) и растения от *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* - Col-0) за изследване на връзката между организацията на фотосинтетичния апарат и промените, настъпващи във функционалната му активност след въздействие със светлина с висок интензитет при висока или ниска температура. Проследени са стрес-индуцираните промени в ефективността на първичните фотосинтетични процеси, синтеза на защитни вещества, аклиматизацията към съответните условия при няколкодневно третиране, както и степента на възстановяване при връщане на растенията при оптимални условия. Представените резултати в дисертационния труд дават важна информация за отговора на растенията към въздействие на висок светлинен интензитет при субоптимална и висока температура, включваща данни относно количеството на каротиноидите, пигментния състав, промени в организацията и състава на пигмент-белтъчните комплекси, промени в окислението на мембранните липиди и синтеза на защитни вещества и за чувствителността и аклиматизацията на фотосинтетичния апарат към светлина с висок интензитет при оптимална, висока и субоптимална температура.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Все по-неблагоприятните условия на променящия се климат на Земята поставят по-високи изисквания към толерантността и устойчивостта на икономически значимите растения към стресови фактори от околната среда, най-вече към екстремни температури, висок светлинен интензитет и др. Ето защо е от изключителна важност да се изучат механизмите, чрез които растенията се аклиматизират към външната среда и успяват да преодолеят стресовите въздействия

и да поддържат ефективна фотосинтеза. Доматите принадлежат към голямото семейство *Solanaceae*, те са негов типичен представител и познаването на техния отговор към неблагоприятните условия на околната среда и механизмите на тяхната аклиматизация е от съществено значение. Знанията, получени от изследвания, проведени с домати растения могат лесно да бъдат приложени върху други селскостопанско-значими култури от същото семейство като картофи, чушки, патладжан, тютюн. Основен обект на нашите изследвания бяха домати растения *Solanum lycopersicum* cv. М 82. По отношение на функционалните характеристики на фотосинтетичния апарат, липидно окисление и синтеза на антоциани в изследванията беше включено и моделното висше растение *Arabidopsis thaliana* – див тип (Col-0), което е по-толерантно към ниски температури в сравнение с топлолюбивите домати.

Целта на настоящата дисертация е да се изследва ролята на температурата и каротеноидите в отговора и аклиматизацията на *Solanum lycopersicum* към висок светлинен интензитет и да се сравнят функционалните характеристики на фотосинтетичния апарат на *Solanum lycopersicum* с тези на моделното растение *Arabidopsis thaliana*, отличаващо се с различна термотолерантност.

За постигането на тази цел бяха поставени следните конкретни задачи:

1. Да се определят промените в съдържанието на каротеноиди и хлорофили в *Solanum lycopersicum* при продължително въздействие на светлина с висок интензитет при оптимална, висока и субоптимална температура.
2. Да се определят светлинно-индуцираните промени в организацията и състава на пигмент-белтъчните комплекси и ефекта на висока и субоптимална температура върху наблюдаваните изменения в *Solanum lycopersicum*.
3. Да се изследва влиянието на високия светлинен интензитет в комбинация с висока и субоптимална температура върху синтеза на антоциани и да се проследят промените в степента на окисление на мембранните липиди в *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*.
4. Да се характеризират *in vivo* промените в максималната квантова ефективност и квантовия добив на фотосистема 2, активността на фотосистема 1 и нефотохимично гасене в *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana* при дълговременно действие на висок светлинен интензитет при оптимална, висока и субоптимална температура.
5. Да се сравни отговора и степента на аклиматизация на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, различаващи се по своята термотолерантност, към продължително въздействие на висок светлинен интензитет, прилаган при висока или субоптимална температура.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. РАСТИТЕЛЕН МАТЕРИАЛ

Оптималните условия на отглеждане на *Solanum lycopersicum* (дневен/нощен цикъл 16/8 часа при 22/20 °C, светлинен интензитет 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ и влажност 70%) бяха подбрани след предварителни експерименти и съобразно литературните данни (Quadrana и съавт., 2013).

Условията за отглеждане на *Arabidopsis thaliana* (дневен/нощен цикъл 16/8 часа при 21/18 °C и светлинен интензитет 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) са базирани на литературни данни и са общоприетите при лабораторно отглеждане на растенията (Wanner и Junttila, 1999).

2. УСЛОВИЯ НА ТРЕТИРАНЕ НА РАСТЕНИЯТА

За да се проследи отговора и аклиматизацията на растенията бяха подбрани стойности на температурата и светлинния интензитет, които са неблагоприятни, но не са летални и са съобразени със съответните оптимални условия за двата вида.

2.1. Третиране на *Solanum lycopersicum*

Напълно развитите домати растения (достигнали 5-6-ти лист) се третират в камери (FytoScope Chamber FS 130) в продължение на 6 дни при различни комбинации температура-светлина:

- NT-NL – контролни растения, отглеждани при 22/20 °C и светлинен интензитет 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- HT-NL – растения отглеждани при висока температура 38/29 °C и нормален светлинен интензитет 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- NT-HL – оптимална температура 22/20 °C и висок светлинен интензитет 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- HT-HL – висока температура 38/29 °C и висок светлинен интензитет 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- LT-NL – ниска температура 12/10 °C и нормален светлинен интензитет 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- LT-HL – ниска температура 12/10 °C и висок светлинен интензитет 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$.

2.2. Третиране на *Arabidopsis thaliana*

Напълно развити растения (развита розетка) от *Arabidopsis* се третират в камери при различни комбинации от светлинен интензитет и температури:

- NT-NL – контролни растения - 21/18 °C и осветеност 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- HT-NL – висока температура 32/29 °C и осветеност 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- NT-HL – оптимална температура 21/18 °C и осветеност 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- HT-HL – висока температура и висок светлинен интензитет - 32/29 °C и 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;

- LT-NL – ниска темепартура и оптимален светлинен интензитет - 12/10 °C и 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$;
- LT-HL – ниска температура и висок светлинен инетенитет - 12/10 °C и 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$.

Експериментите са проведени на 0 ден, след 2 и 6 дни на третиране и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия (NT-NL).

3. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

3.1. Количествено определяне на фотосинтетичните пигменти

За определяне на концентрацията на фотосинтетичните пигменти беше измерена абсорбцията на ацетоновия извлек от свежи листа при 663, 646.8 и 470 nm с помощта на Specord 210 Plus (Analytic Jena-Germany). Концентрацията на пигментите беше определена по формулите на Lichtenthaler (1987).

3.2. Кислородно отделяне

Кислородното отделяне на цели листа беше определено с помощта на Кларков електрод за листни дискове (модел LD1/2, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK) в атмосфера, наситена с CO_2 , осигурена от 200 μl 1M NaHCO_3 .

3.3. Определяне степента на липидно окисление

Прекисното окисление на липидите се определя по метода на Esterbauer и съавт. (1990) чрез спектрофотометрично определяне на комплекса малондиалдехид/тиобарбитурова киселина.

3.4. Определяне съдържанието на антоциани

Съдържанието на антоциани беше определено спектрофотометрично, прилагайки метода описан от Murrays и съавт. (1991).

3.5. Измерване на хлорофилната флуоресценция

Импулсно амплитудно модулираната хлорофилна (PAM) флуоресценция беше измерена на цели листа при стайна температура с флуориметър (PAM 101-103, Walz, Effeltrich, Germany). Измерванията бяха направени върху тъмнинно адаптирани листни дискове. За инициране на фотосинтетичните процеси и измерване на флуоресцентните параметри в светлинно-адаптираното състояние на PSII беше използвана актинична светлина със интензитет 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ при доматени растения и 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ при *Arabidopsis thaliana*. За изчисляване на параметрите на хлорофилната флуоресценция бяха използвани следните формули (Van Kooten и Snell, 1990):

Максимална квантова ефективност на PSII: $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$;

Квантов добив на електронния транспорт на PSII в светлинно-адаптирано състояние: $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$;

Фотохимично гасене: $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$;

Нефотохимично гасене: $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$;

Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на ксантофиловия цикъл (Kramer и съавт., 2004): $\Phi_{\text{NO}} = F_s/F_m$.

3.6. Определяне на активността на фотосистема I

Изменението на редокс състоянието на P700 беше проследено чрез измерване на абсорбционните изменения при 830 nm на цели листа при стайна температура с помощта на флуориметър (PAM 101-103, Walz, Effeltrich, Germany) свързан с емитер-детекторната система ED-800T.

3.7. Определяне съдържанието на каротеноиди и ксантофили на домати растения

Проби от листа на домати растения бяха приготвени и анализирани със система Agilent 1200 Series HPLC, съгласно Martinis и съавт. (2013), с малки модификации. Каротеноидите бяха идентифицирани и количествено определени при 440 nm в зависимост от абсорбционния им пик и реда им на елуиране (Gupta и съавт., 2015 г.) и след сравняване с миграцията на стандарти (β -каротин, лютеин, виолаксантин, неоксантин и зеаксантин). Измерванията бяха направени в лаборатория по физиология на растенията, Институт по биология в Университета на Нюшател, Швейцария.

3.8. Определяне на белтъчния състав

3.8.1. Изолване на тилакоидни мембрани

От листната маса на домати растени (*Solanum lycopersicum* cv. M 82) бяха изолирани тилакоидни мембрани, съгласно методиката, описана от Velitchkova и Ророва (2005). След определяне на хлорофилната концентрация, пробите се съхраняват при -80 °C до провеждане на измерванията.

3.8.2. Първо направление BN-PAGE (1-D)

За разделяне на нативните пигмент-белтъчните комплекси беше проведена неденатурираща 1-D електрофореза, използвайки BN-PAGE с 5-12% акриламидни градиентни гелове.

3.8.3. Второ направление SDS-PAGE (2-D)

При второ направление се използва 10-18% SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Част от измерванията бяха направени в Катедрата по физиология на растенията и молекулярна биология на растенията, Будапеща, Унгария (Eötvös University).

4. СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните от проведените изследвания представляват средни стойности $\pm$ SE ($n=3-4$) от поне четири независими експеримента. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата (на 0 ден) са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$).

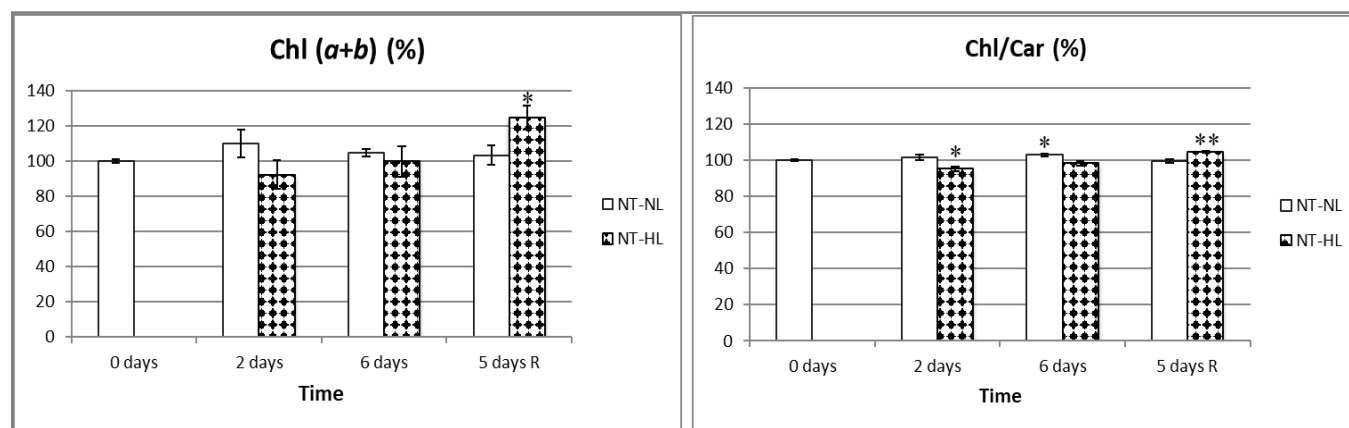
РЕЗУЛТАТИ

1. ЗАЩИТА И АКЛИМАТИЗАЦИЯ НА ВИСШИТЕ РАСТЕНИЯ *Solanum lycopersicum* И *Arabidopsis thaliana* ПРИ ТРЕТИРАНЕ С ВИСОК СВЕТЛИНЕН ИНТЕНЗИТЕТ

1.1. *Solanum lycopersicum*

1.1.1. Промени в пигментния състав

В сравнение с растенията при оптимални условия, на 2-рия ден при NT-HL количеството на Chl (*a+b*) намалява с около 7%, а на Car с 3%, което води до намаление в отношението на Chl/Car (фиг. 1). Намалението на Chl (*a+b*) на втория ден след третиране с HL се дължи на намаленото количество на Chl *a* при третираните растения. След 5 дни на възстановяване при третираните растения има повишение в общото съдържание на хлорофили и каротеноиди, по-силно изразено за общия хлорофил, което води до повишение в отношението Chl/Car.

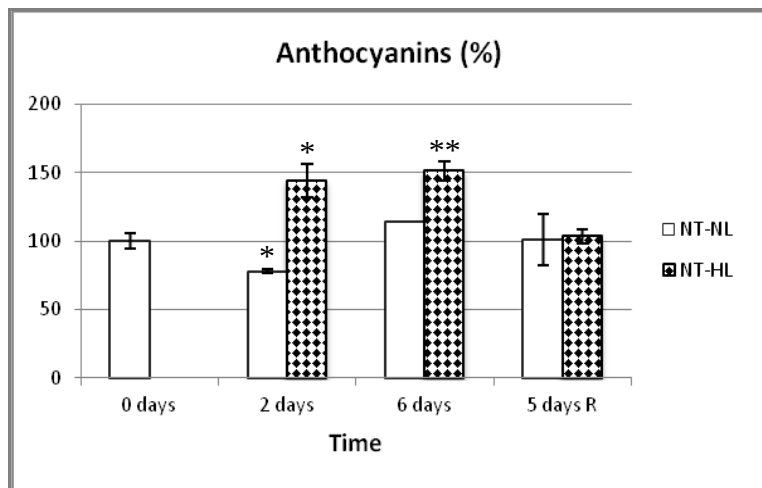


Фиг. 1. Промени в пигментното съдържание на листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при нормални условия (NT-NL) и при нормална температура и висок светлинен интензитет (NT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Съдържанието на пигментите е изчислено в mg пигмент/g FW и резултатите са представени като процент от съдържанието на пигментите при домати листа, изчислени спрямо 0 ден на всички експерименти. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от най-малко три независими експеримента с четири паралелни повторения. 100% отговарят на: 1.761 mg/g FW за Chl (*a+b*), 3.04 за Chl/Car.

На втория ден след третиране при NT-HL отношението на Chl *a/b* намалява с 16% по отношение на контролната стойност, а на шестия - с 22%, а след 5 дни на възстановяване леко се повишава. Намалението на отношението Chl *a/b* при третираните растения се дължи на по-силно изразено намаление в количеството на Chl *a* в сравнение с това на Chl *b*.

1.1.2. Антоциани

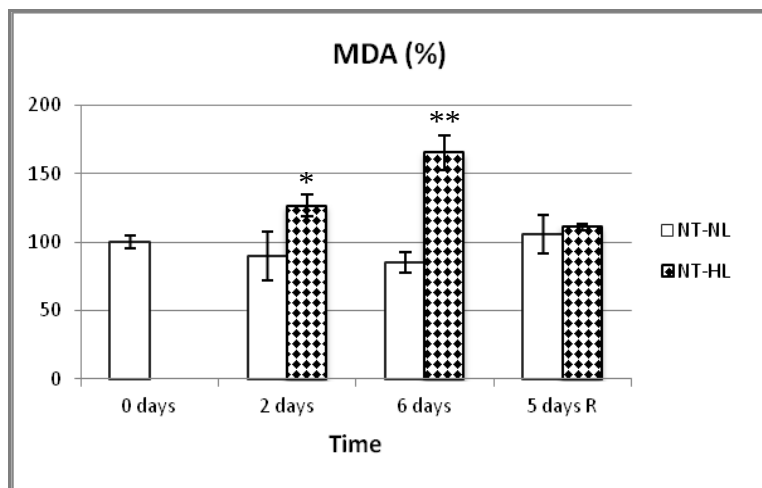
В отговор на третирането на растенията с висок светлинен интензитет се повишава синтеза на антоциани (Фиг. 2). На втори и шести ден има значително увеличение в количеството на антоцианите - с 44% и 51%, съответно. След пет дни на възстановяване при нормални условия се регистрират стойности, близки до тези на контролните растения.



Фиг. 2. Съдържанието на антоциани в листа от контролни домати растения (0 ден) и такива, третиран с висок интензитет на светлината след 2 и 6-ти ден от третирането и след 5 дни на възстановяване при нормални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 4 независими експеримента с четири паралелни проби за всеки етап на експеримента и са изразени като процент от стойността в началото на всеки експеримент. 100% отговарят на 0.064.

1.1.3. Липидна пероксидация

При проведените експерименти установихме, че отглеждането на растенията при висок светлинен интензитет води до увеличение на MDA (фиг. 3). На втория и шестия ден след третирането има значително увеличение (с 26% за 2-ри ден и с 65% на 6-тия ден) на количеството MDA. Повишението на MDA при висок светлинен интензитет най-вероятно е свързано с генерирането на активни кислородни форми (ROS), които инициират окисление на мембранните липиди. Данните показват, че след петдневно възстановяване, стойностите за MDA при третираните домати растения достигат стойности, характерни за растения, отглеждани при оптимални условия.

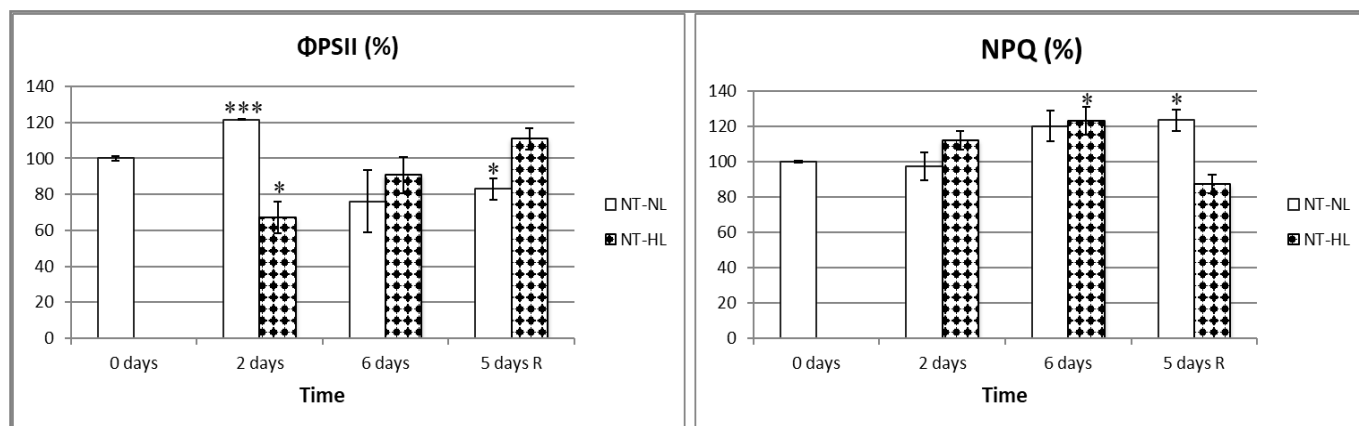


Фиг. 3. Степен на липидната пероксидация, определена по MDA метода, при домати растения, отглеждани в продължение на 6 дни при нормални условия и на растения, третиран с висок светлинен интензитет. Средните стойности $\pm$ SE са определени от четири независими експеримента с четири паралелни проби и са представени в процент от стойностите в началото на всеки експеримент. 100% отговарят на 39.133 nmol MDA/g FW.

1.1.4. Квантова ефективност на PSII, NPQ, qP, Fv/Fm, ΦNO

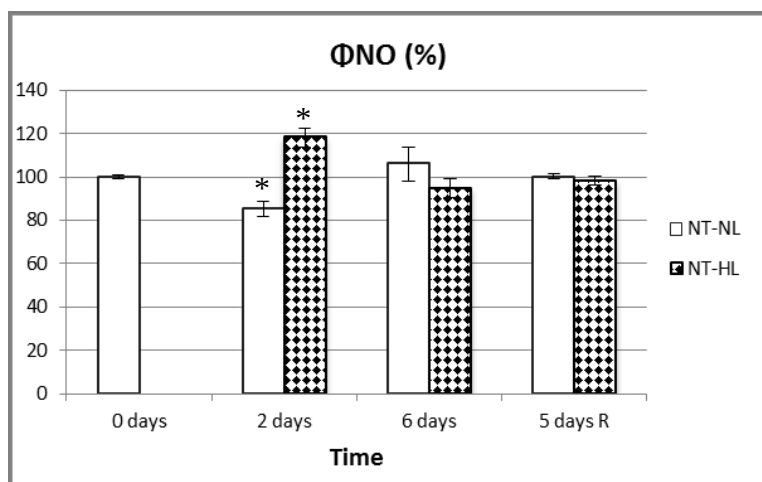
От изследваните флуоресцентни параметри значителни промени се наблюдават в квантовия добив на електронния транспорт на PSII в светлинно-адаптирано състояние ($\Phi PSII$), нефотохимичното гасене (фиг. 4) за нетретиран домати растения (NT-NL) и растения, отглеждани при висок светлинен интензитет (NT-HL). Fv/Fm почти не се променя, а фотохимичното гасене показва тенденция както на $\Phi PSII$ (данните не са показани). Най-голямо намаление се наблюдава на втория ден при третираните растения (NT-HL) в параметрите $\Phi PSII$ и

qP, с 33% и 25%, съответно, докато при NPQ има леко нарастване с около 12%. След 5 дни на възстановяване се наблюдава повишение на квантовия добив на електронния транспорт на PSII в светлинно-адаптирано състояние и на фотохимичното гасене при третирані растения и понижение на нефотохимичното гасене.



Фиг. 4. Представени са данни за квантовата ефективност на PSII (ФPSII) и нефотохимичното гасене (NPQ). Средните стойности $\pm$ SE са усреднени от четири независими експеримента с четири паралелни повторения на контролни домати растения (NT-NL) и такива, третирани с висок светлинен интензитет (NT-HL). 100% отговарят на: 0.442 за ФPSII и 1.312 за NPQ.

На фиг. 5 са представени данни за квантовия добив на гасенето на излишната погълната енергия (ФNO), дисипирана по механизъм, независим от функционирането на ксантофиловия цикъл на листа от домати растения отглеждани при нормални условия (NT-NL) и такива, третирани с висок светлинен интензитет (NT-HL). Резултатите показват, че съществена разлика в резултат на третирането с висок интензитет се наблюдава на втория ден, като е регистрирано увеличение с 18% спрямо 0 ден.

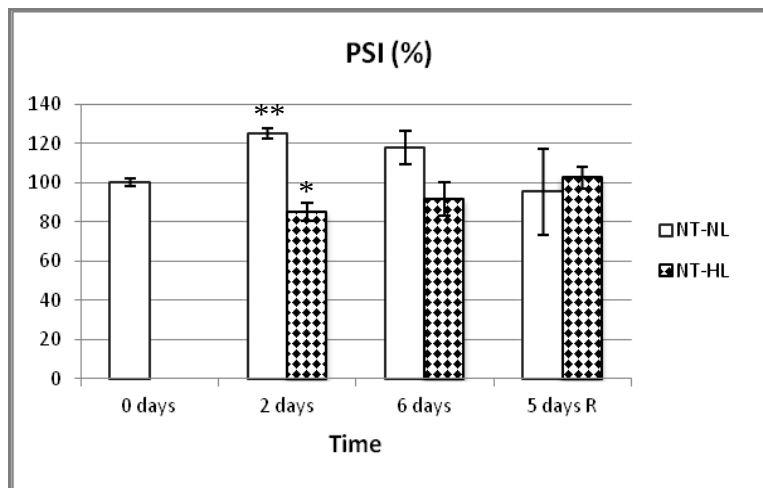


Фиг. 5. Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на ксантофиловия цикъл (ФNO). Измерванията са направени върху листа от домати растения отглеждани при нормални условия (NT-NL) и такива, третирани с висок светлинен интензитет (NT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения изразени в проценти. 100% отговарят на 0.24.

1.1.5. Активност на PSI

Активността на PSI беше оценена по окислението на реакционния център на PSI (P700⁺), индуцирано с дълговълново осветяване на листа. Получените данни показват, че високият светлинен интензитет влияе върху активността на PSI, която е

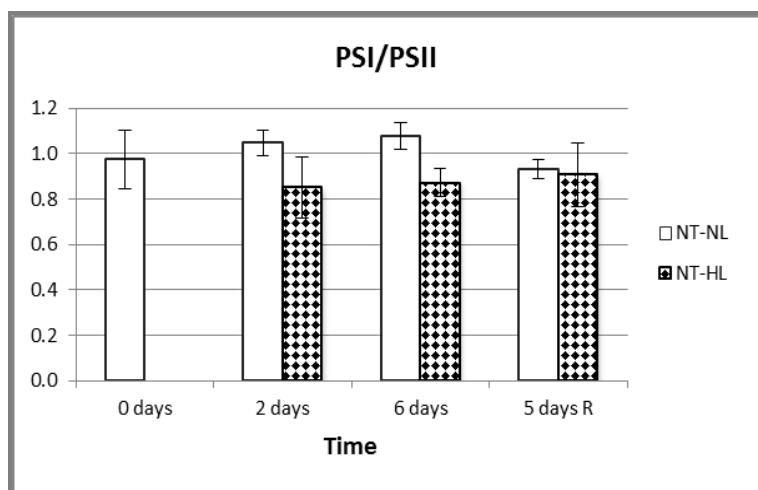
намалена в сравнение с измерените стойности за контролни растения, отглеждани при NT-NL, преди да започне третирането. Инхибирането е по-силно изразено на 2 ден, докато на 6 ден се наблюдава слабо възстановяване. От друга страна, активността на PSI при контролни растения е увеличена на 2-ри и 6-ти ден, съответно с 25% и 18% спрямо нулевия ден (фиг. 6).



Фиг. 6. Фотоокисление на P700 на листа от домати растения на 0, 2 и 6-ти ден при контролни и третиранни растения с висок светлинен интензитет и след 5 дни на възстановяване при нормални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента, с четири повторения за всеки етап и са представени в проценти от стойността в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 15.36.

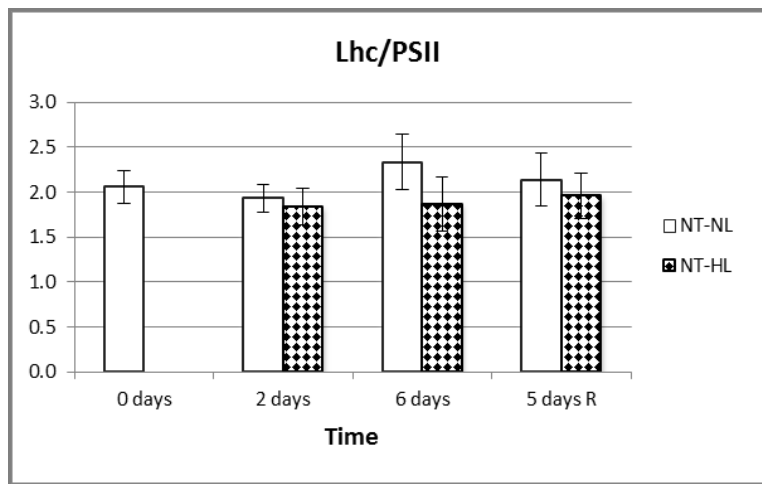
1.1.6. Промени в белтъчния състав на двете фотосистеми при домати растения

При домати растения, отглеждани при нормални условия, отношението между двете фотосистеми (PSI/PSII) се запазва за периода на третирането. Промяна в това отношение е видима при растенията, третиранни с висок светлинен интензитет, като на втори ден намалява с 13%, а на шести ден с 11%, които стойности не се възстановяват напълно спрямо 0 ден след периода на възстановяване (фиг. 7).



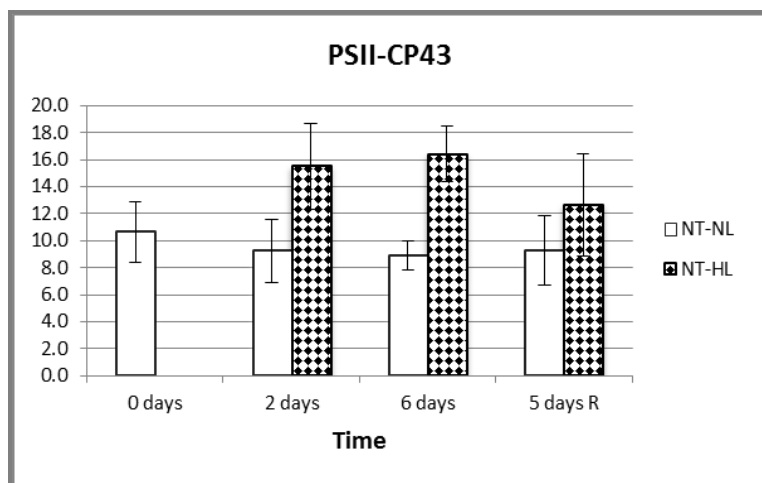
Фиг. 7. Промяна в отношението на PSI/PSII в тилакоидни мембрани от листа на домати растения измерени след провеждане на първо направление на BN-PAGE при контролни растения и такива третирани само с висок светлинен интензитет. Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

В резултат на третирането с висок светлинен интензитет се наблюдава слабо намаление на отношението Lhc/PSII, което се възстановява след 5 дни при оптимални условия (фиг. 8).



Фиг. 8. Промяна в отношението на Lhc/PSII при тилакоидни мембрани от листа на домати растения измерени след провеждане на първо направление на BN-PAGE при контролни растения и такива третирани само с висок светлинен интензитет. Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

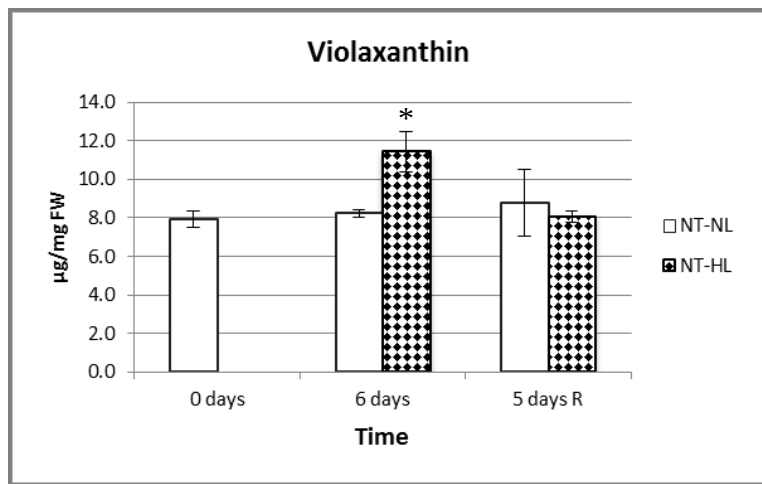
На фиг. 9 е представена промяната в количеството на PSII-CP43 на листа от контролни домати растения (NT-NL) и такива третирани с нормална температура и висок светлинен интензитет (NT-HL). При NT-HL съдържанието на PSII-CP43 се увеличава над 50% както на 2-ри така и на 6-ти ден. След 5 дни при оптимални условия отношението намалява, но не до първоначалната стойност.



Фиг. 9. Промяна в количеството на PSII-CP43 на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, измерени след провеждане на второ направление SDS-PAGE при контролни растения и такива, третирани с висок светлинен интензитет. Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

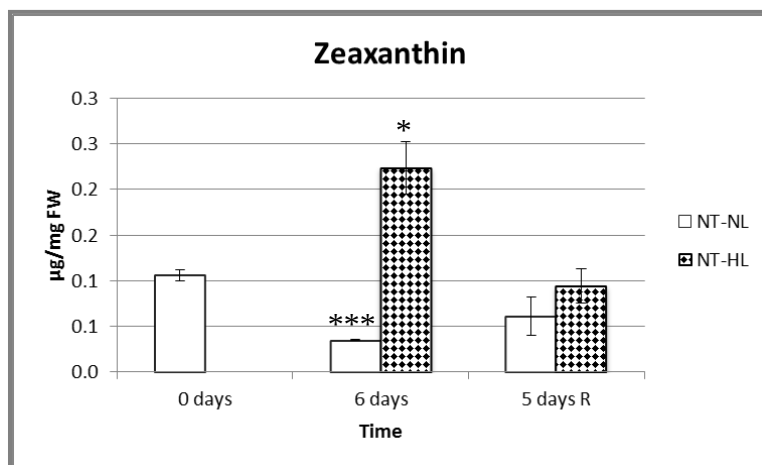
1.1.7. Определяне съдържанието на каротеноиди при домати растения

За да проверим дали третирането с висок интензитет има за резултат промени в състава на каротеноидите, бяха определени промените в съдържанието на виолаксантин, зеаксантин, неоксантин, лютеин и β -каротин. Данните показват, че виолаксантинът при контролни растения не се променя, но при растения, третирани с висока светлина при нормална температура на 6 ден се увеличава с 44%. След 5 дни при оптимални условия се наблюдава пълно възстановяване (фиг. 10).



Фиг. 10. Промени в съдържанието на виолаксантин в листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при нормални условия (NT-NL) и при нормална температура и висок светлинен интензитет (NT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Съдържанието е изчислено в $\mu\text{g}/\text{mg FW}$. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от два независими експеримента с пет паралелни повторения.

На фиг. 11 са представени данните за съдържанието на зеаксантин. На шестия ден и след 5 дни на възстановяване стойността за контролата намалява, докато при растения, третирани с висок светлинен интензитет, зеаксантинът нараства на 6 ден с 111%.



Фиг. 11. Промени в съдържанието на зеаксантина на листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при нормални условия (NT-NL) и при нормална температура и висок светлинен интензитет (NT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Съдържанието е изчислено в $\mu\text{g}/\text{mg FW}$. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от два независими експеримента с пет паралелни повторения.

Таблица 1. Съдържание на неоксантин, лютеин и β -каротин в листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при нормални условия (NT-NL) и при нормална температура и висок светлинен интензитет (NT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Съдържанието е изчислено в $\mu\text{g}/\text{mg FW}$. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от два независими експеримента с пет паралелни повторения.

Каротеноиди $\mu\text{g}/\text{mg FW}$	Време (дни)	Третиране	
		NT-NL	NT-HL
Неоксантин	0 ден	2.541 ± 0.324	2.541 ± 0.324
	6 ден	2.889 ± 0.074	2.669 ± 0.195
	5 дни на възстановяване	3.441 ± 0.922	2.677 ± 0.197
Лютеин	0 ден	9.867 ± 1.274	9.867 ± 1.274
	6 ден	11.238 ± 0.225	10.656 ± 0.693
	5 дни на възстановяване	13.367 ± 3.142	10.646 ± 0.495
β -каротин	0 ден	6.573 ± 0.346	6.573 ± 0.346
	6 ден	6.522 ± 0.102	6.805 ± 0.357
	5 дни на възстановяване	8.254 ± 2.317	6.693 ± 0.388

В таблица 1 са представени данни за съдържанието на неоксантин, лютеин и β -каротин в листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при нормални условия (NT-NL) и при нормална температура и висок светлинен интензитет (NT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. При контролни растения се регистрира повишение на съдържанието на неоксантин, лютеини и β -каротин в края на изследвания период спрямо 0 ден, но промените са в рамките на грешката. При растения, третирани с висок светлинен интензитет, промяна има в съдържанието на лютеина на 6 ден след третирането и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия, но разликата не е статистически достоверна.

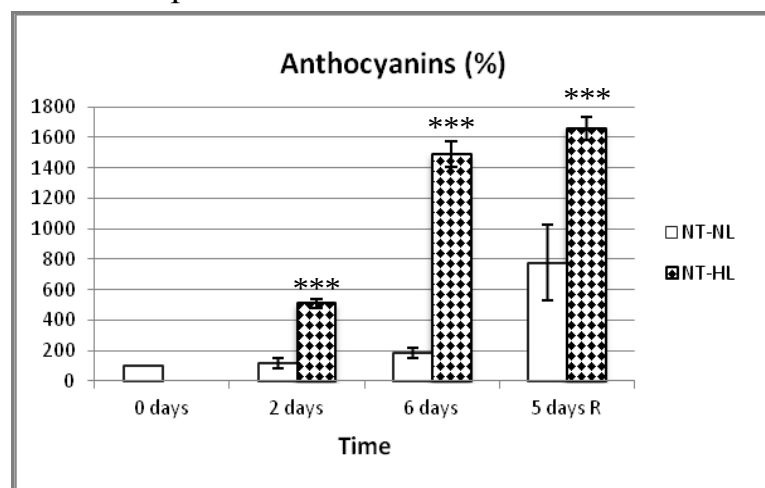
1.2. *Arabidopsis thaliana*

1.2.1. Промени в пигментния състав

Промените в пигментното съдържание при контролни (NT-NL) и третирани растения с висок светлинен интензитет ($500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) (NT-HL) бяха проследени и при растението за сравнение - *Arabidopsis* див тип (*Arabidopsis thaliana* - Col-0). Повишеният светлинен интензитет води до промени в съдържанието на различните фотосинтетични пигменти. Общото съдържание на хлорофили (Chl (a+b), отношението Chl a/b и Chl/Car намаляват значително на шестия ден след началото на третирането с висок светлинен интензитет, докато общото количество на каротеноидите е по-слабо повлияно. Количеството на общия хлорофил (Chl (a+b)) намалява с 31%, а отношението Chl a/b намалява с 24%. Отношението на Chl/Car се редуцира с 22%, поради по-силно изразено намаление на хлорофилите на 6-тия ден при третираните растения. Най-пълно възстановяване след третирането с висока светлина се наблюдава в количеството на каротеноидите.

1.2.2. Антоциани

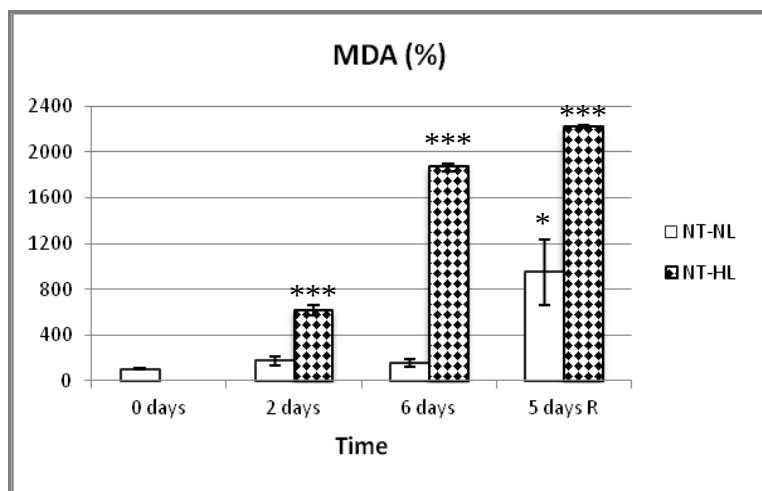
Отглеждането за 2 и 6 дни в условия на висок светлинен интензитет води до повишено синтезиране на антоциани при растения от *Arabidopsis*. На 2-ри и 6-ти ден след третирането се наблюдава многократно увеличение в съдържанието на антоциани - с 408% и 1391%, съответно, което е значително по-високо от това при домати растения.



Фиг. 12. Съдържание на антоциани в листа от *Arabidopsis* - контролни растения и такива, третирани с висок светлинен интензитет на 0, 2 и 6-ти ден от третирането и след 5 дни на възстановяване при нормални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни проби. 100% отговарят на 0.043.

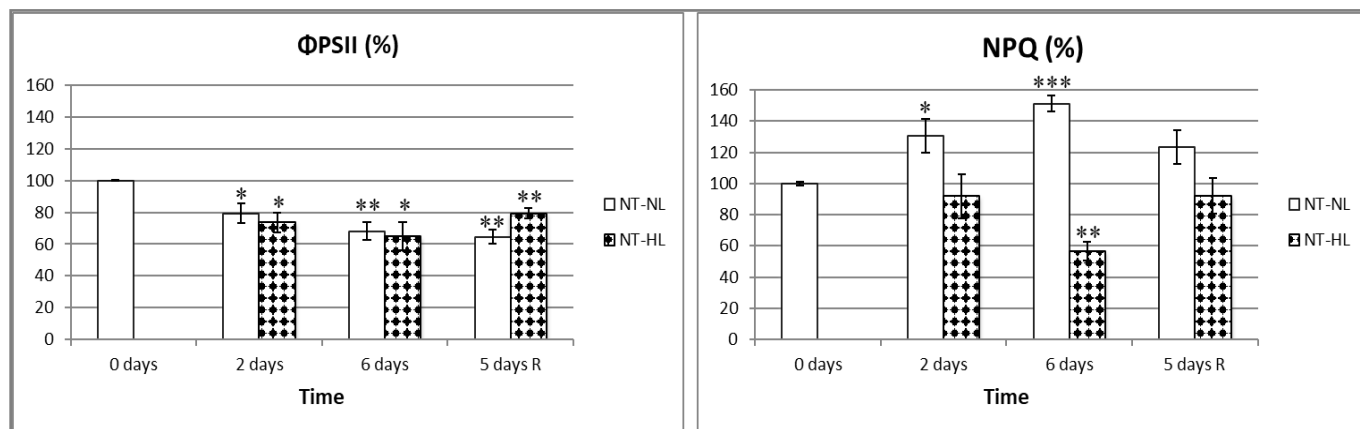
1.2.3. Липидна пероксидация

На фиг. 13 са представени резултати за количеството на MDA при листа на *Arabidopsis*, изразено в % от стойността в началото на всички експерименти, при контролни и третирани с висок светлинен интензитет растения. Трябва да се отбележи, че при контролните растения се наблюдава увеличение на MDA в края на изследвания период. При третиране на растенията с висок светлинен интензитет нивото на MDA се покачва многократно, както на втори така и на шести ден. Повишаването на нивото на MDA продължава и в периода на възстановяване.



Фиг. 13. Степен на липидна пероксидация при растения от *Arabidopsis* в резултат на третиране с висок светлинен интензитет (NT-HL), сравнен с контролни растения. Количеството на MDA е определено на 0, 2 и 6 ден от третирането и след 5 дни на възстановяване при нормални условия (NT-NL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с четири паралелни проби и са представени като процент от стойностите в началото на всеки експеримент. 100% отговарят на 19.888 nmol MDA/g FW.

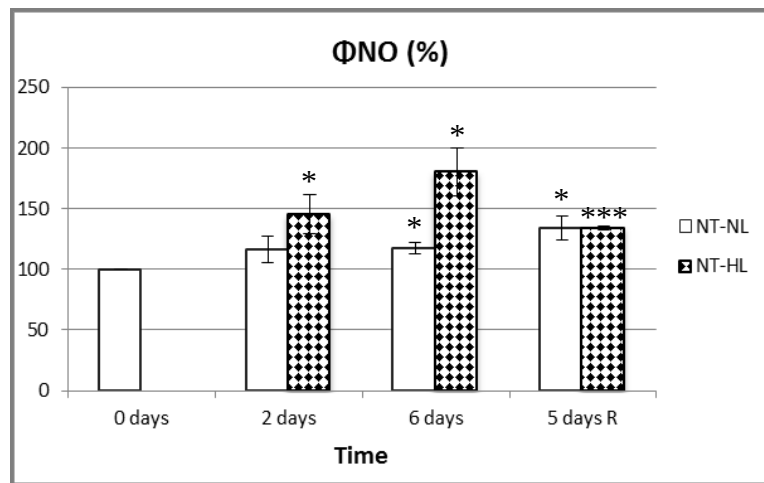
1.2.4. Квантова ефективност на $\Phi PSII$, NPQ, qP, Fv/Fm, ΦNO



Фиг. 14. Ефект на високия светлинен интензитет върху флуоресцентните параметри, измерени с РАМ флуориметър - квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние ($\Phi PSII$) и нефотохимично гасене (NPQ). Данните са представени за контролни (NT-NL) и за третирани с висок светлинен интензитет (NT-HL) растения от *Arabidopsis*, изразени като процент от стойностите в началото на всеки експеримент. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни проби. 100% отговарят на: 0.558 за $\Phi PSII$ и 0.652 за NPQ.

При проведените експерименти с *Arabidopsis* най-съществена разлика между контролни и третирани растения се наблюдава при нефотохимичното гасене (NPQ). Квантовият добив на електронния транспорт на PSII в светлинно-адаптирано състояние ($\Phi PSII$) и фотохимичното гасене (qP) намаляват както при третирани, така и при контролни растения, съответно на 2, 6 ден след третирането и след 5 дни

на възстановяване. Максималната квантова ефективност на PSII (Fv/Fm) почти не се повлиява от високия светлинен интензитет. Леко намаление има на шестия ден след третирането, но то е с около 12%.



Фиг. 15. Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на зеаксантиновия цикъл (Φ_{NO}). Измерванията са направени върху листа от *Arabidopsis* отглеждан при нормални условия (NT-NL) и такива, третирани с висок светлинен интензитет (NT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения изразени в проценти. 100% отговарят на 0.27.

На фиг. 15 са представени данни за квантовия добив на гасенето на излишната погълната енергия, дисипирана по механизъм, независим от функционирането на зеаксантиновия цикъл (Φ_{NO}) в листа от *Arabidopsis*, отглеждани при нормални условия (NT-NL) и такива, третирани с висок светлинен интензитет (NT-HL). При контролни растения има увеличение с 16% на Φ_{NO} на 2-ри ден, което се запазва и на шестия ден. При растения, третирани с висок светлинен интензитет, стойността за Φ_{NO} нараства значително спрямо контролните растения и се увеличава с дните на третиране. И при двата вида растения не се достига възстановяване до стойностите от 0 ден.

2. РОЛЯ НА ВИСОКАТА ТЕМПЕРАТУРА В ОТГОВОРА И ПРОЦЕСА НА АКЛИМАТИЗАЦИЯ НА *Solanum lycopersicum* И *Arabidopsis thaliana* КЪМ ВИСОК СВЕТЛИНЕН ИНТЕНЗИТЕТ

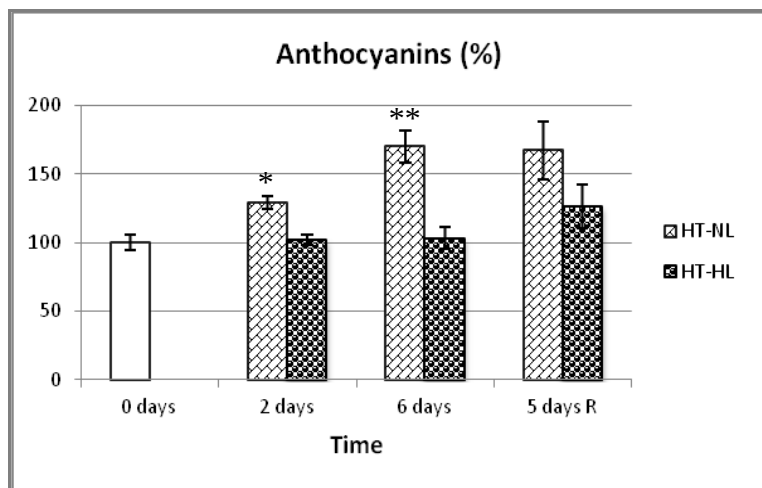
2.1. *Solanum lycopersicum*

2.1.1. Промени в пигментния състав

Съдържанието на Chl (a+b) и каротеноиди на 2-я ден намалява, но по-слабо изразено при Car и при двата вида третирания, докато съществена разлика се наблюдава на 6-я ден. При растения, третирани с висока температура, се наблюдава увеличение в съдържанието на Chl (a+b) с 18% и на Car с 24% (на 6 ден), в резултат на което се наблюдава намаление в отношението Chl/Car. При растения, третирани с висока температура и висока светлина (HT-HL) на 6-тия ден съдържанието на Chl (a+b) е по-ниско с 32% в сравнение с началото на експеримента, а понижението при количеството на Car - с 17%, което води до по-ниско отношение Chl/Car. Chl (a+b) и Car при HT-NL и HT-HL не се възстановяват след 5 дни при оптимални условия.

2.1.2. Антоциани

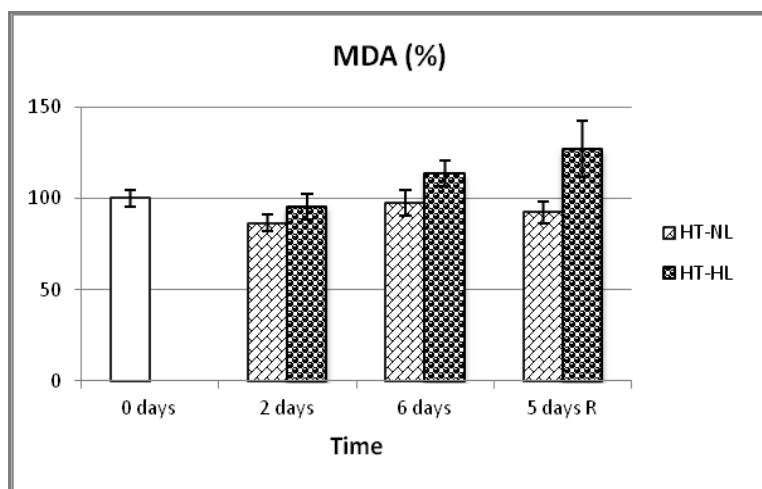
От проведените експерименти установихме, че при домати растения, третирани с висока температура на 2, 6-ти ден и след 5 дни на възстановяване, има повишено синтезиране на антоциани, съответно с 29%, 70% и 67%. При растения, третирани с висока температура и висока светлина, промени не се наблюдават, с изключение след 5 дни на възстановяване, когато се отчита леко повишение.



Фиг. 16. Съдържание на антоциани при листа от домати растения, третирани с висока температура (HT-NL) и такива третирани с висока температура и висок интензитет на светлината (HT-HL) при 0, 2 и 6-ти ден от третирането и след 5 дни на възстановяване при нормални условия (NT-NL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 4 повторения на всеки етап на експеримента и са изразени като процент от стойността в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 0.064.

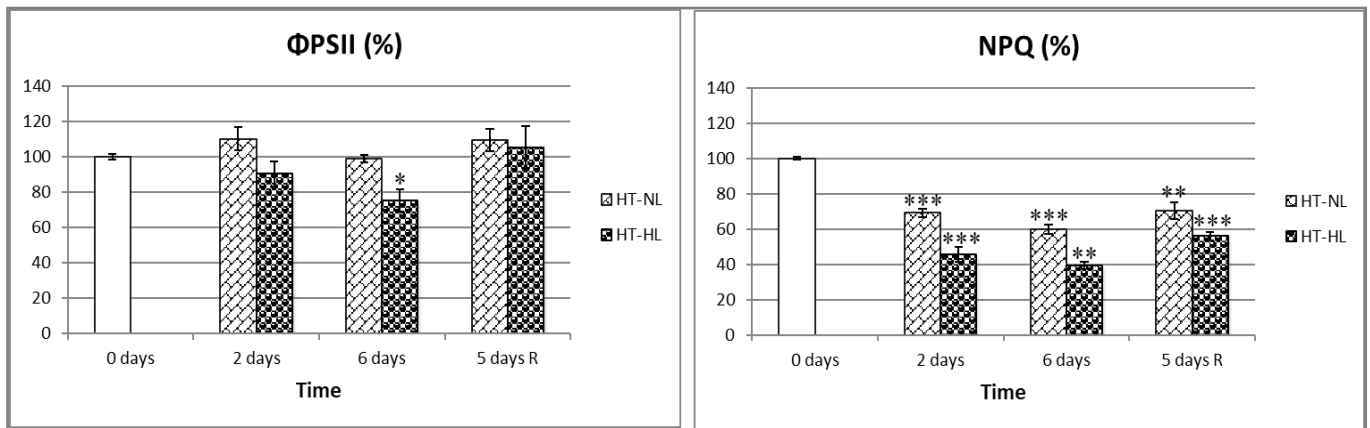
2.1.3. Липидна пероксидация

На фиг. 17 са представени резултати за количеството на MDA, определено в листа на домати растения третирани с HT-NL и HT-HL. Данните показват, че при растения, третирани с висока температура, почти няма промяна в съдържанието на MDA. Има леко намаление само на втория ден след третирането с около 14%. При растения, подложени на комбиниран стрес (HT-HL), на 6-ти ден се наблюдава увеличение с 14%, което е значително по-малко от регистрираното при действие само на висок светлинен интензитет.



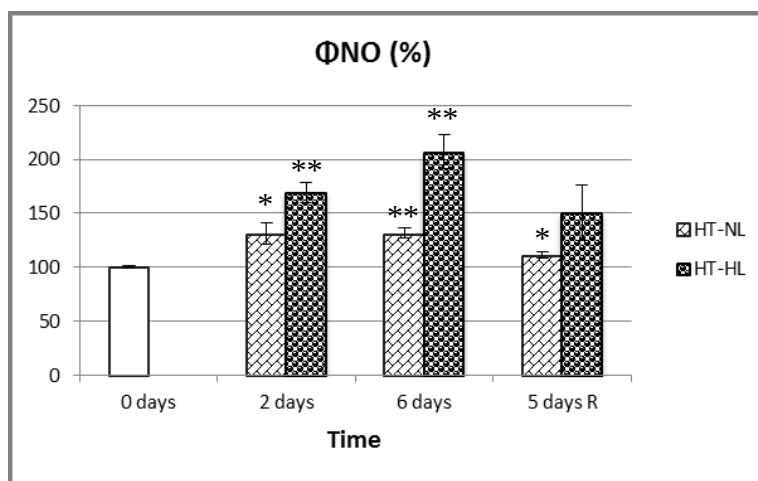
Фиг. 17. Степен на липидната пероксидация, която е определена по MDA метода, при домати растения, третирани с висока температура (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL), сравнени с 0 ден. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни проби и са изразени като процент от стойностите в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 39.133 nmol MDA/g FW.

2.1.4. Квантова ефективност на PSII, NPQ, qP, Fv/Fm, ΦNO



Фиг. 18. Флуоресцентни параметри, измерени с РАМ флуориметър върху листа от домати растения, изразени като процент от средната стойност на нулевите дни. Представени са данни за квантовата ефективност на PSII (ΦPSII) и нефотохимично гасене (NPQ). Средните стойности ± SE са усреднени от три независими експеримента с четири повторения на домати растения, третирани с висока температура (HT-NL) и такива третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). 100% отговарят на: 0.442 за ΦPSII и 1.312 за NPQ.

По-високата температура на отглеждане не повлиява съществено параметрите ΦPSII, qP и Fv/Fm на 2, 6-ти ден и след периода на възстановяване, но значително намаление се наблюдава при нефотохимичното гасене на 2-ри ден - с 31% и на 6-ти ден - с 40%, което леко се възстановява след 5 дневния период при оптимални условия, но не достига до 100%. При HT-HL и четирите параметъра са редуцирани, изразено най-силно при нефотохимичното гасене и не се възстановяват след 5 дни при нормални условия. Намалението при Fv/Fm е много слабо изразено на 2-ри и 6-ти ден. На втори и шести ден ΦPSII и qP намаляват, но след 5 дни при нормални условия достигат до пълно възстановяване. Тук трябва да се отбележи, че инхибирането на 2 ден за растенията при HT-HL е по-слабо изразено в сравнение с растения, третирани с HL при оптимална температура (фиг. 4).

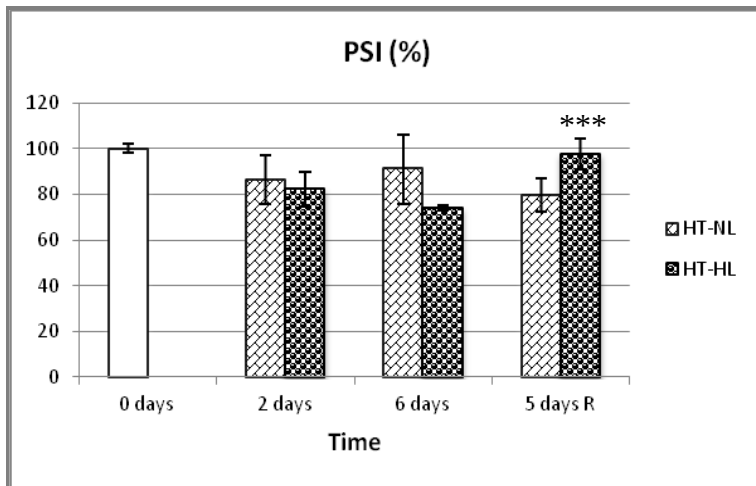


Фиг. 19. Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на ксантофиловия цикъл (ΦNO). Измерванията са направени върху листа от домати растения, отглеждани при висока температура и нормален светлинен интензитет и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет. Средните стойности ± SE са изразени в проценти. 100% отговарят на 0.24.

На фиг. 19 са представени данни, които показват увеличение на ΦNO както на втори, така и на 6-ти ден след третирането с висока температура с около 31%. При растения, третирани с висока температура в комбинация с висок светлинен интензитет, се наблюдава увеличение на 2-ри ден с 69% и най-вече на 6-ти ден със 107%, а след 5 дни при оптимални условия се наблюдава непълно възстановяване.

2.1.5. Активност на PSI

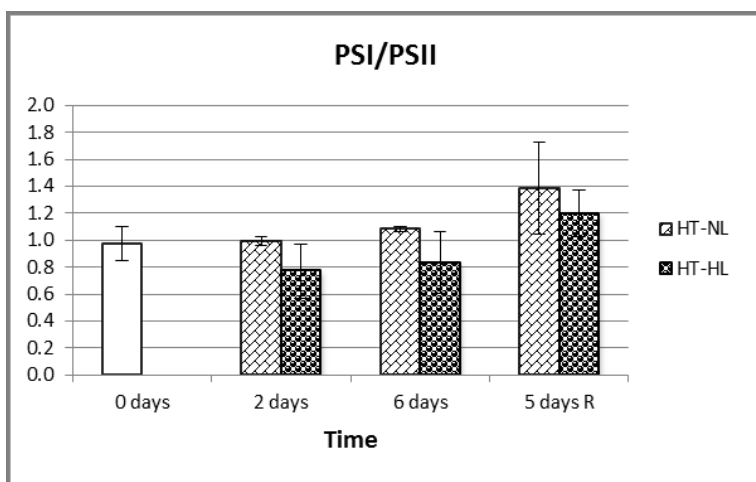
При растения, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет, се наблюдава инхибиране на активността на фотосистема 1 на 2-ри ден (18%) и на 6-ти ден (26%) след третирането, но след 5 дни на отглеждане при оптимални условия се наблюдава пълно възстановяване. Активността на PSI при HT-NL намалява на 2-ри и 6-ти ден и след 5 дни на възстановяване (20%).



Фиг. 20. Стойности на фотоокисление на PSI на листа от домати растения на 0, 2 и 6-ти ден при растения, третирани с висока температура (HT-NL) и такива, в комбинация с висок светлинен интензитет (HT-HL) и след 5 дни на възстановяване при нормални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експерименти всеки в четири повторения, представени в проценти. 100% отговарят на 15.36.

2.1.6. Промени в белтъчния състав на двете фотосистеми при домати растения

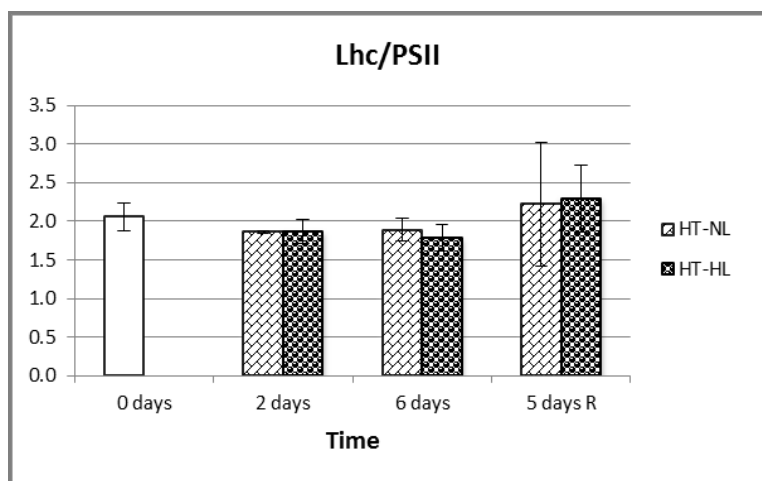
На фиг. 21 е представена промяната в отношението на PSI/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, измерени след провеждане на първо направление на BN-PAGE при растения, третирани с висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Отношението PSI/PSII намалява при HT-HL на втори и на шести ден след третирането, но след 5 дни при оптимални условия се наблюдава известно повишаване.



Фиг. 21. Промяна в отношението на PSI/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, измерени след провеждане на първо направление на BN-PAGE при растения, третирани с висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

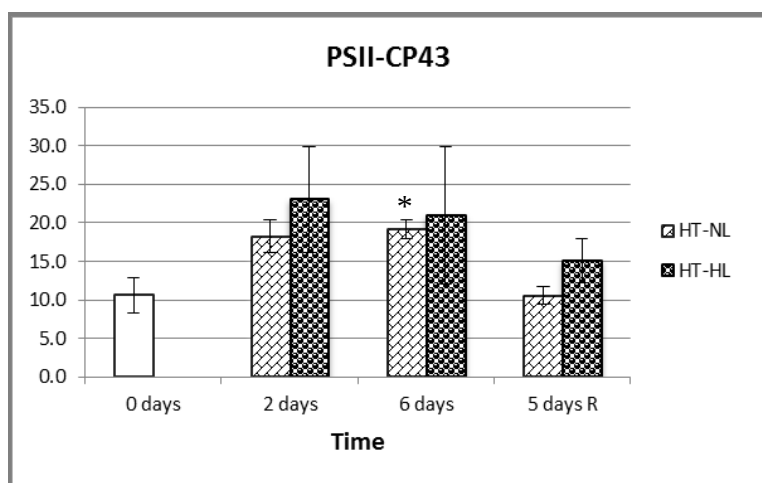
На фиг. 22 са показани стойностите за отношението на Lhc/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, третирани с висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Данните показват незначително намаление

на 2 и 6 ден. След 5 дни на възстановяване се наблюдава известно нарастване и при двете третираня.



Фиг. 22. Промяна в отношението на Lhc/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, измерени след провеждане на първо направление на BN-PAGE при растения, третирани с висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

Получените резултати след провеждане на второ направление SDS-PAGE при растения, третирани с висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL), показват, че количеството на PSII-CP43 се е увеличило на 2 и 6 ден при двата вида третираня (фиг. 23).



Фиг. 23. Промяна в количеството на PSII-CP43 на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, измерени след провеждане на второ направление SDS-PAGE при растения, третирани с висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

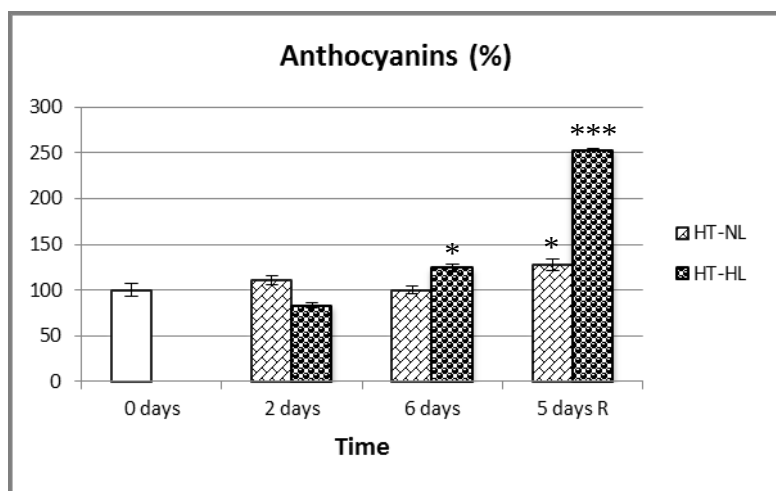
2.2. *Arabidopsis thaliana*

2.2.1. Промени в пигментния състав

Получените резултати от експериментите, проведени с *Arabidopsis* за определяне на фотосинтетичните пигменти, показват намаление както на 2-ри, така и на 6-ти ден след третирането с висока температура в комбинация както с нормален, така и с висок светлинен интензитет. При растения, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет, количеството хлорофил Chl (a+b) намалява с 55%, докато каротеноидите са по-леко засегнати (38%) на 6 ден, докато при растенията, третирани само с висока температура, такива значителни промени не се наблюдават. На втория ден и при двата вида третираня се наблюдава спад и в четирите параметъра. След 5 дни на възстановяване, общият хлорофил, общите каротеноиди и отношението Chl a/b не достигат до 100%.

2.2.2. Антоциани

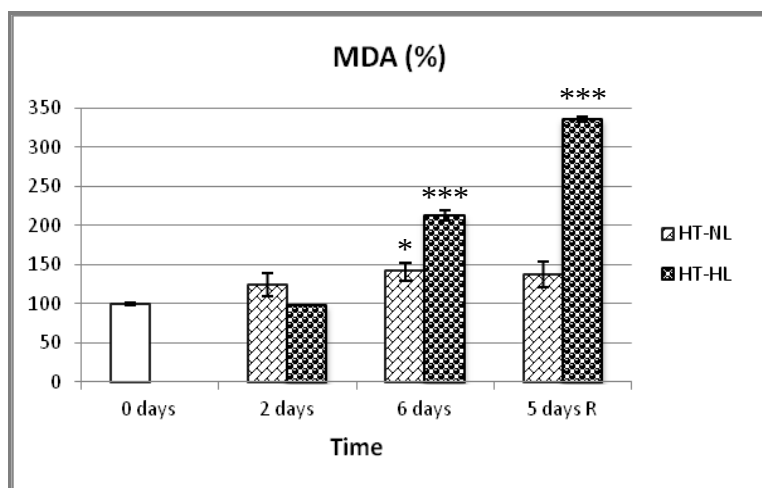
Получените резултати от *Arabidopsis* показват различни стойности, в сравнение с тези при доматени растения, третирани по аналогичен начин. При *Arabidopsis* данните показват, че почти няма промяна в количеството на антоцианите при растения, третирани само с висока температура, леко повишение се наблюдава след 5 дни на възстановяване. При растения, третирани с висока температура и висока светлина, се наблюдава намаление на 2-рия ден с 17% и увеличение на 6-тия с 24%. Докато при растения третирани с висок светлинен интензитет при оптимална температура (NT-HL) увеличението на 2 и най-вече на 6 ден е много по-голямо.



Фиг. 24. Съдържание на антоциани в листа от *Arabidopsis*, третирани с висока температура (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL) на 0, 2 и 6-ти ден от третирането и след 5 дни на възстановяване. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения и са изразени като процент от стойността в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 0.052.

2.2.3. Липидна пероксидация

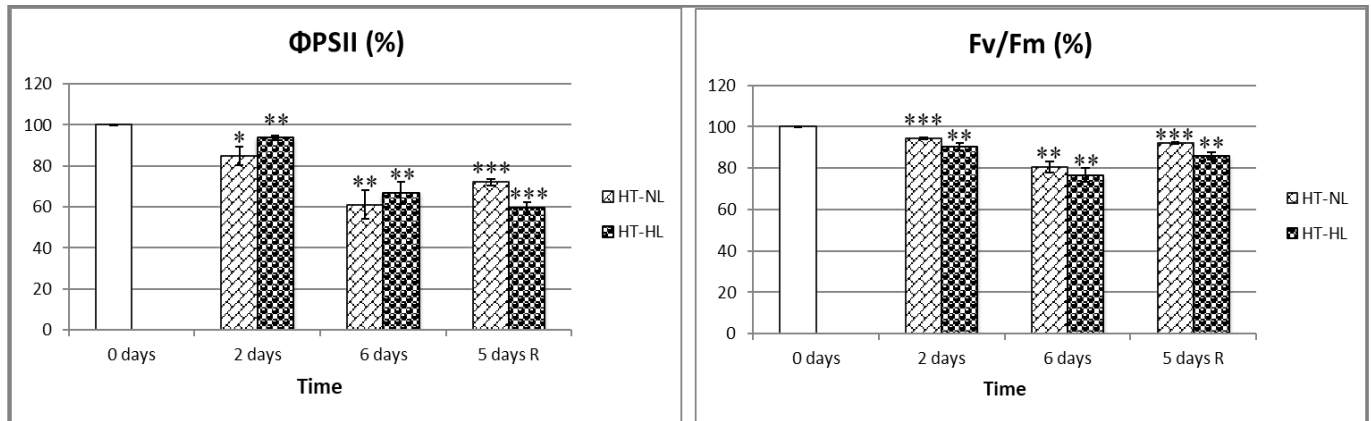
Липидната пероксидация беше изследвана при растения от *Arabidopsis*, третирани с висока температура и такива, третирани с комбинация на висока температура с висок светлинен интензитет. Данните на фиг. 25 показват, че при HT-NL - третираните растения има повишение в съдържанието на MDA на 2 и 6 ден и след 5 дни на възстановяване. При HT-HL това увеличение е в много по-голяма степен - на 6 ден с 113% и след 5 дни на възстановяване с 236% сравнено с 0 ден. При NT-HL това увеличение е много по-голямо (с 519% на 2 ден и 1768% на 6 ден).



Фиг. 25. Промени в степента на липидна пероксидация при *Arabidopsis*, третирани с висока температура (HT-NL) и висока температура с висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения и са представени като процент от стойността в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 25.128 nmol MDA/g FW.

2.2.4. Квантова ефективност на $\Phi PSII$, NPQ , qP , Fv/Fm , ΦNO

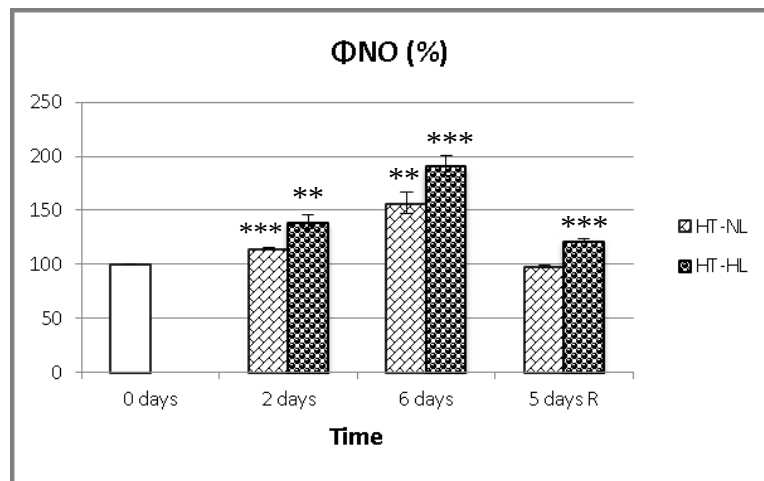
Квантовата ефективност на $PSII$ в светлинно-адаптирано състояние намалява при растения от *Arabidopsis*, третирани с висока температура и за тези, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (фиг. 26). Fv/Fm е сравнително стабилен параметър, който не се променя значително при различни третирания, но данните показват, че той намалява с 19 и 23% при HT-NL и HT-HL на 6 ден (фиг. 26).



Фиг. 26. Ефект на високата температура върху функциите на фотосинтетичния апарат измерени с РАМ флуориметър, върху откъснати листа от *Arabidopsis*, третирани с висока температура (HT-NL) и други с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Данните показват квантовата ефективност на $PSII$ в светлинно-адаптирано състояние и максималната ефективност на $PSII$. Средните стойности $\pm SE$ са изчислени от три независими експеримента с четири независими повторения изразени в проценти. 100% отговарят на: 0.558 за $\Phi PSII$ и 0.856 за Fv/Fm .

На втория ден това намаление е по-слабо в сравнение с шести ден от третирането и след 5 дни на възстановяване. Трябва да се отбележи, че при комбинираното действие на HT и HL стойностите за $\Phi PSII$ и qP са малко поредуцирани от тези за растенията, отглеждани при HT-NL. Нефотохимичното гасене (данните не са показани графично) при HT-NL почти не се променя след втория и шестия ден, но след 5 дни при нормални условия се наблюдава почти двойно повишение спрямо 0-я ден. Интересни са резултатите, получени при HT-HL, които показват, че NPQ намалява с 55% на 2-ри ден и с 65% на 6-ти ден и след 5 дни на възстановяване се увеличава с 62%. Фотохимичното гасене и при двата вида третирания се редуцира на 6-тия ден, при HT-NL с 21% и при HT-HL със 17%. След 5 дни при оптимални условия фотохимичното гасене не се възстановява напълно.

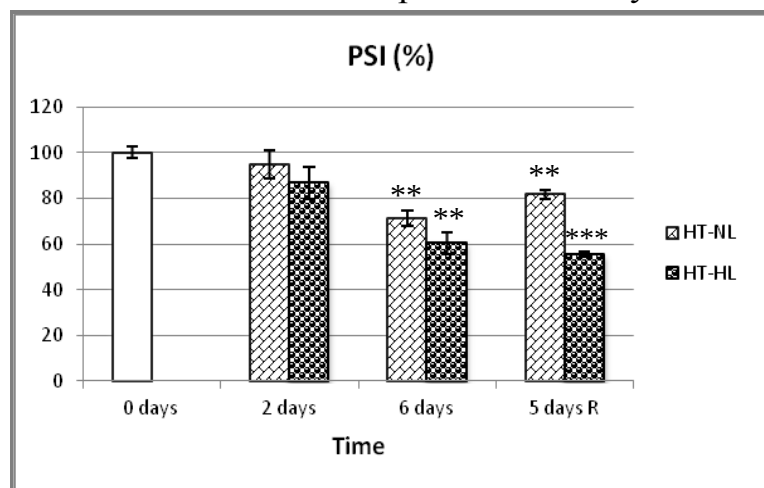
При двата вида стрес ΦNO нараства с дните на третирание, но по-силно е изразено при растения, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (фиг. 27). Тези промени са напълно обратими за растения, третирани само с висока температура, докато за такива в комбинация с висок светлинен интензитет не се възстановяват напълно.



Фиг. 27. Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на ксантофилевия цикъл (ΦNO). Измерванията са направени на листа от *Arabidopsis*, отглеждан при висока температура и нормален светлинен интензитет (HT-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения изразени в проценти. 100% отговарят на 0.27.

2.2.5. Активност на PSI

Активността на PSI е по-силно засегната при *Arabidopsis*, отколкото при домати растения, третирани с висока температура и висока температура и висок светлинен интензитет. Данните на фиг. 28 показват намаление на активността на PSI на втори и в по-голяма степен на шестия ден от третирането, като по-силно е изразено при HT-HL. Промените и при двата вида третираня са необратими след 5 дни на възстановяване при оптимални условия.



Фиг. 28. Фотоокисление на PSI при *Arabidopsis*. Данните са представени като % от средната стойност на нулевите дни при растения, третирани с висока температура (HT-NL) и висока температура с висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 независими проби. 100% отговарят на 6.33.

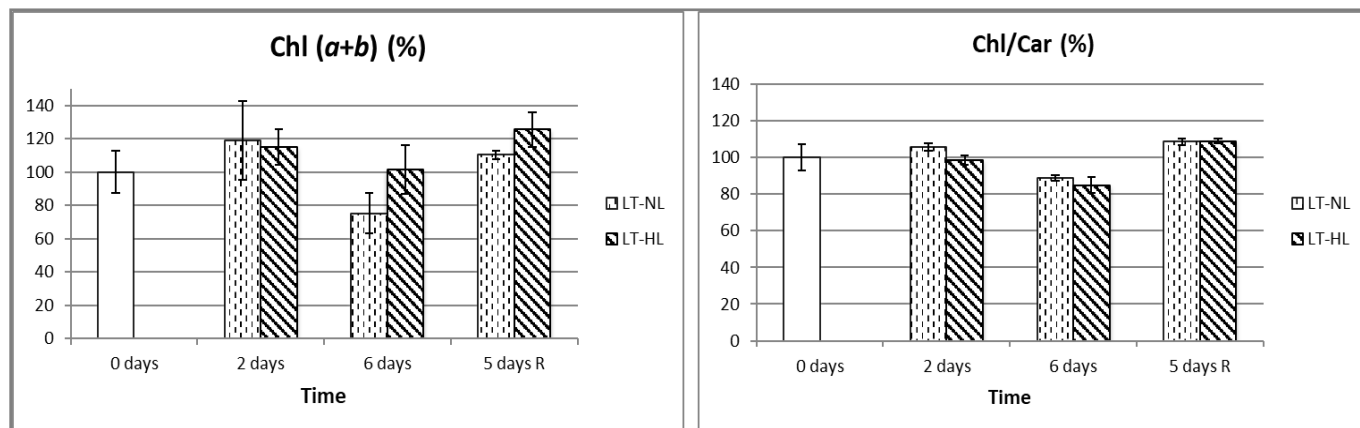
3. РОЛЯ НА СУБОПТИМАЛНАТА ТЕМПЕРАТУРА В ОТГОВОРА И ПРОЦЕСА НА АКЛИМАТИЗАЦИЯ НА *Solanum lycopersicum* И *Arabidopsis thaliana* КЪМ ВИСОК СВЕТЛИНЕН ИНТЕНЗИТЕТ

3.1. *Solanum lycopersicum*

3.1.1. Промени в пигментния състав

След третиране за 6 дни при ниска температура (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) съдържанието на Chl (a+b) и Car намалява с 25% и 13% за LT-NL, в резултат на което отношението Chl/Car също намалява. При LT-HL отношението Chl/Car е по-ниско на шестия ден, което се

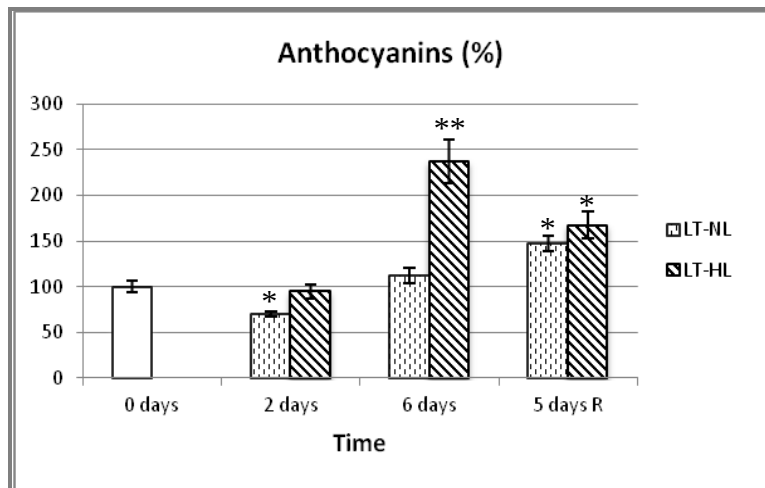
дължи на по-високото съдържание на каротеноидите. Промените в отношението Chl *a/b* при двата вида третирания са незначителни.



Фиг. 29. Промени в пигментното съдържание на листа от домати растения, третирани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL), за различни периоди от време и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения. 100% отговарят на: 1.366 mg/g FW за Chl (a+b) и 2.72 за Chl/Car.

3.1.2. Антоциани

При домати растения, третирани само с ниска температура, съдържанието на антоциани не се повлиява значително по време на третирането, а след 5 дни на възстановяване се повишава с 47%. Значително увеличение на антоцианите се наблюдава при растения, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет - на шестия ден е повече от два пъти, а след 5 дни при оптимални условия намалява до стойности с около 65% по-високи от 0 ден.

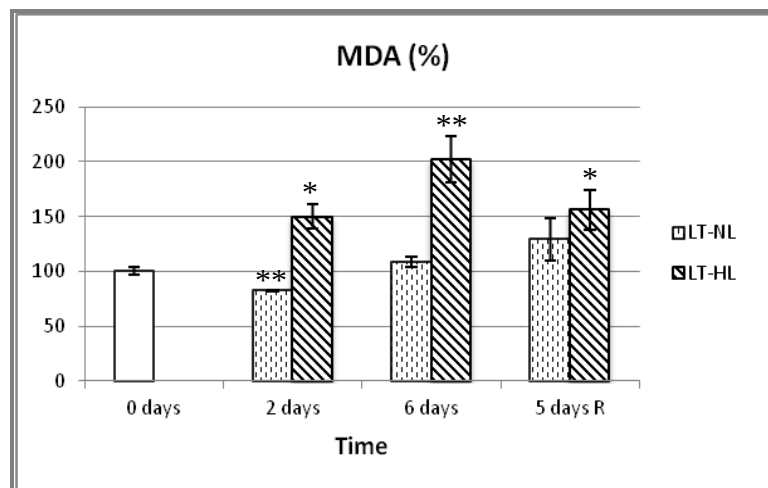


Фиг. 30. Съдържание на антоциани в листа от домати растения, третирани с ниска температура (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок интензитет на светлината (LT-HL) при 0, 2 и 6-ти ден от третирането и след 5 дни на възстановяване. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни проби на всеки етап от експеримента и са изразени в проценти от стойността в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 0.106.

3.1.3. Липидна пероксидация

Липидната пероксидация е най-силно изразена при домати растения, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет. Данните показват, че на 2-ри и 6-ти ден тя се е увеличила с 50 и 102%, съответно. Възстановяването при оптимални условия за 5 дни води до намаление на регистрираното количество MDA спрямо шестия ден, но не до пълно възстановяване. При растения, третирани само с

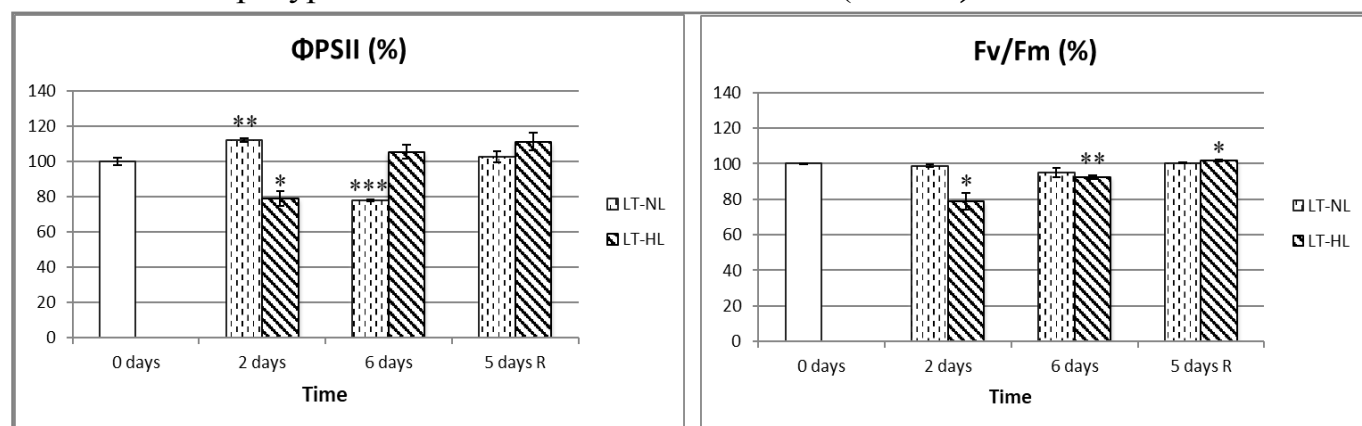
ниска температура, липидната пероксидация е слабо повишена само на 6-тия ден от третирането и след възстановителния период за 5 дни при нормални условия.



Фиг. 31. Степен на липидна пероксидация при листа от домати растения, третирани с ниска температура (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL), сравнени с 0 ден. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три експеримента с четири паралелни повторения и са изразени като процент от стойностите в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 44.741 nmol MDA/g FW.

3.1.4. Квантова ефективност на PSII, NPQ, qP, Fv/Fm, ΦNO

На фиг. 32 са представени данни за $\Phi PSII$ и Fv/Fm, на домати растения, третирани с ниска температура (LT-NL) и такива, третирани с комбинация на ниската температура и висок светлинен интензитет (LT-HL).

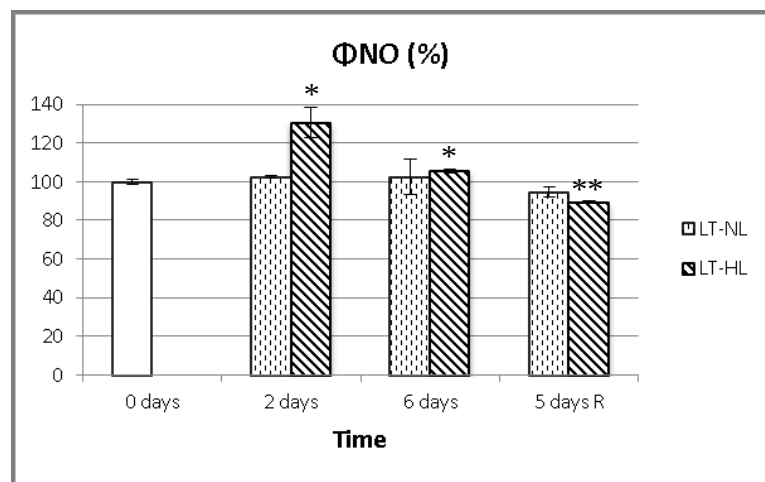


Фиг. 32. Квантовата ефективност на PSII ($\Phi PSII$) и максималната квантова ефективност на PSII (Fv/Fm) при домати растения, третирани с ниска температура (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Данните са представени като процент от средната стойност на нулевите дни (представени като 100%) върху листа от домати растения. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения. 100% отговарят на: 0.398 за $\Phi PSII$ и 0.841 за Fv/Fm.

На втория ден от третирането при LT-NL се наблюдава слабо стимулиране на квантовата ефективност на PSII, а при LT-HL - намаление. След 6 дни при LT-NL параметърът $\Phi PSII$ намалява, докато при комбинацията с висок светлинен интензитет е близо до първоначалната стойност. Максималната квантова ефективност на PSII (Fv/Fm) намалява и при двете третираня, като това инхибиране е по-силно изразено при LT-HL на втори ден. Съществени разлики се наблюдават при нефотохимичното гасене и при двата вида третираня (не са показани графично). На 2-рия ден NPQ намалява с около 18% и при двете третираня, но след 6 дни има видимо увеличение при растенията третирани само с ниска температура. И при двата вида третираня, измерваните параметри са

съизмерими със стойностите в началото на експериментите след възстановяване за 5 дни при нормални условия.

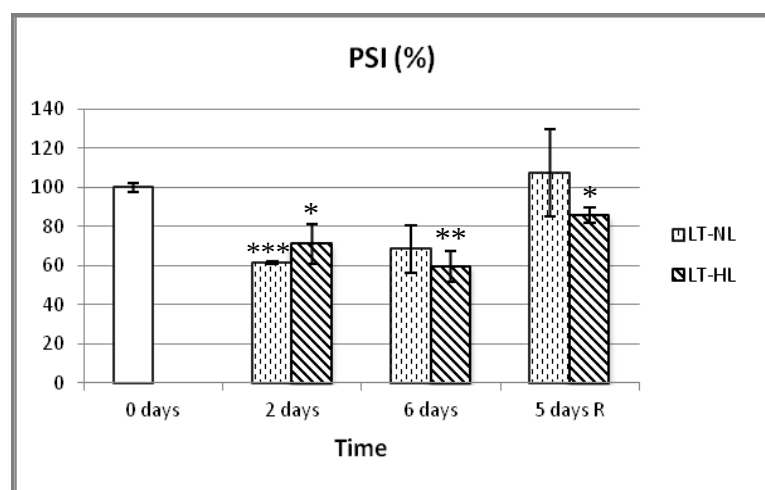
Данните на фиг. 33 показват промяна в квантовия добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на зеаксантиновия цикъл (ФНО). Значителна промяна се наблюдава при домати растения, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет на втория ден от третирането, увеличение с 31% спрямо 0 ден.



Фиг. 33. Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на зеаксантиновия цикъл (ФНО). Измерванията са направени върху листа от домати растения, отглеждани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения изразени в проценти. 100% отговарят на 0.26.

3.1.5. Активност на PSI

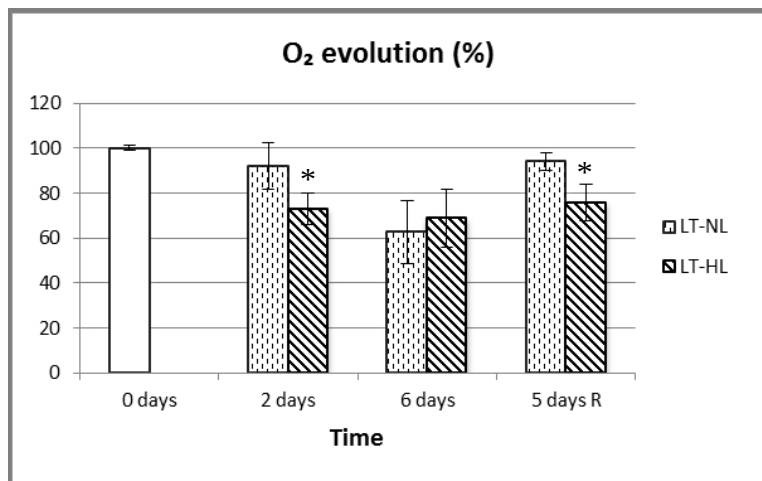
Стойностите за активността на PSI на растения, третирани с LT-NL и LT-HL са представени на фиг. 34. Активността на PSI се повлиява от ниската температура както при оптимален интензитет на светлината, така и при комбинация с висок светлинен интензитет. На 2-рия и 6-тия ден след третирането, активността на PSI намалява с 38% и 32% при растения, третирани с ниска температура и нормален интензитет на светлината, а при растения, третирани с ниска температура и висока светлина намалява с 29% (за 2-ри ден) и с 40% (за 6-ти ден) сравнено спрямо 0 ден.



Фиг. 34. Активност на PSI при домати растения на 0, 2-ри и 6-ти ден, третирани с ниска температура (LT-NL) и такива, в комбинация с висок светлинен интензитет (LT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента, всеки с четири повторения, представени в проценти. 100% отговарят на 14.70.

3.1.6. Кислородно отделяне *in vivo*

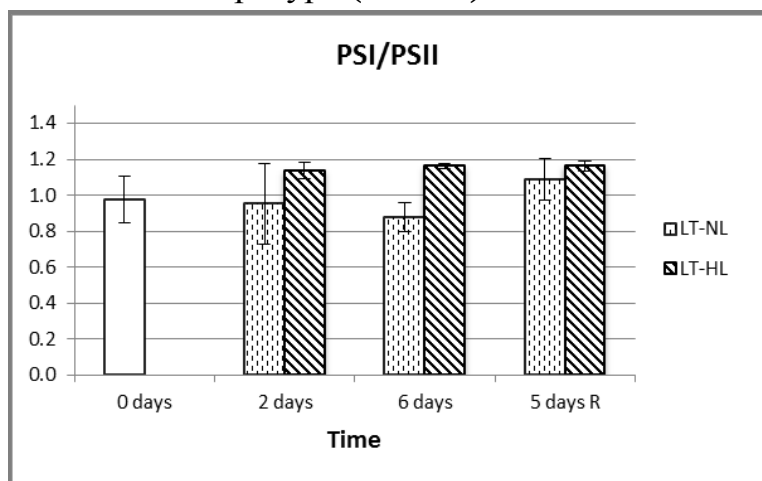
Активността на кислородно отделяне, измерена на листа от домати растения, третирани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) показва намаление с 8% на 2-ри ден и с 37% за 6-ти ден, а след възстановяване достига стойности, близки до тези за 0 ден. Инхибирането на кислородното отделяне при LT-HL е по-силно изразено и не се възстановява напълно.



Фиг.35. Кислородно отделяне на листа от домати растения, третирани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири повторения. 100% отговарят на $9.843 \mu\text{mol O}_2/\text{m}^2.\text{s}$.

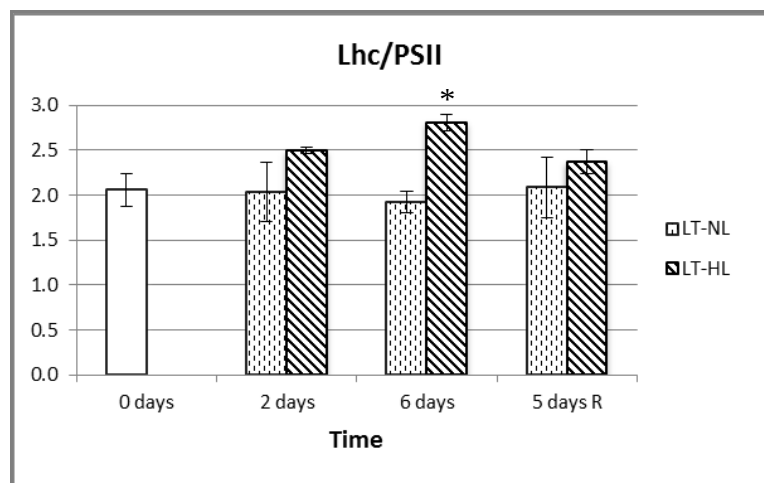
3.1.7. Промени в белтъчния състав на двете фотосистеми при домати растения

На фиг. 36 са представени данните за промяната в отношението на PSI/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, определено след провеждане на първо направление на BN-PAGE при растения третирани при LT-NL и такива, третирани при LT-HL. При LT-NL на втория ден няма значими промени, а на 6 ден се регистрира слабо намаление. Добавянето на висок светлинен интензитет към ниската температура (LT-HL) води до повишение на това отношение.



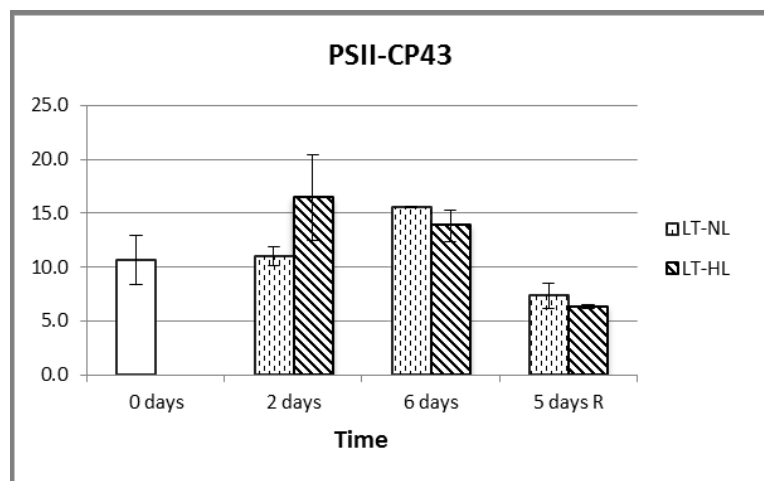
Фиг. 36. Промени в отношението на PSI/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, третирани с ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

Почти не се наблюдават промени в отношението на Lhc/PSII, измерено на листа от домати растения третирани с ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL). Повишение на това отношение се забелязва при LT-HL, като най-значително е на 6-ти ден след третирането, а след 5 дни при нормални условия се възстановяват, но не напълно (фиг. 37).



Фиг. 37. Промяна в отношението на Lhc/PSII на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, третирани с ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две паралелни повторения.

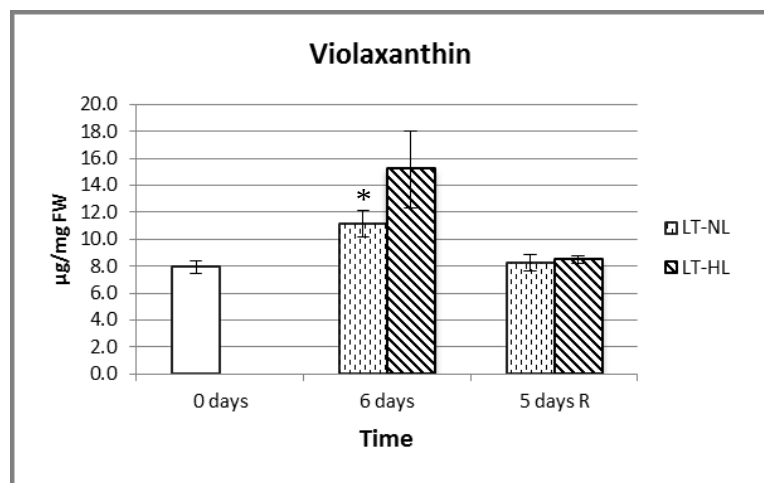
Промените в цикъла повреда-реасемблиране на комплекса на PSII бяха проследени по наличието на междинния комплекс PSII-CP43. При домати растения, отглеждани при ниска температура в комбинация с висок светлинен интензитет се наблюдава повишение на количествата на PSII-CP43 на 2-ри и 6-ти ден след третирането. При третираните растения с LT-NL, увеличение се наблюдава само на 6-ти ден (фиг. 38).



Фиг. 38. Промяна в количеството на PSII-CP43 на тилакоидни мембрани от листа на домати растения, третирани с ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SD са изчислени от два независими експеримента с две повторения.

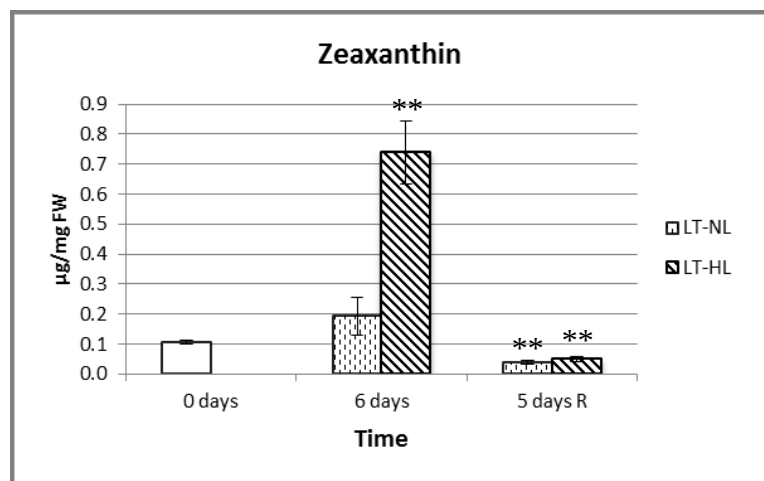
3.1.8. Определяне съдържанието на каротеноиди при домати растения

На фиг. 39 са представени данни за съдържанието на виолаксантин в листа от домати растения, отглеждани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Съдържанието на виолаксантин и при двата вида растения се увеличава на 6-ти ден след третирането с 40% за LT-NL и с 92% за LT-HL сравнени с 0 ден. Отглеждането за 5 дни при оптимални условия води до пълно възстановяване до стойностите за 0 ден.



Фиг. 39. Промени в съдържанието на виолаксантин на листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Съдържанието е изчислено в $\mu\text{g/mg FW}$. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от два независими експеримента с пет паралелни повторения.

Съдържанието на зеаксантин при растения, третирани с ниска температура и нормален светлинен интензитет нараства на 6 ден с 82%, а след 5 дни на възстановяване се регистрира значително намаление с 63% спрямо 0 ден (фиг. 40). При LT-HL се наблюдава значително увеличение на 6 ден, а след възстановителния период при оптимални условия се регистрира намаление спрямо нулевия ден.



Фиг. 40. Промени в съдържанието на зеаксантина на листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Съдържанието е изчислено в $\mu\text{g/mg FW}$. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от два независими експеримента с пет паралелни повторения.

Таблица 2. Съдържание на неоксантин, лютеин и β -каротин при листа от домати растения, отглеждани за 6 дни при ниска температура и нормален светлинен интензитет и при ниска температура и висок светлинен интензитет и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислявани от два независими експеримента с пет паралелни повторения.

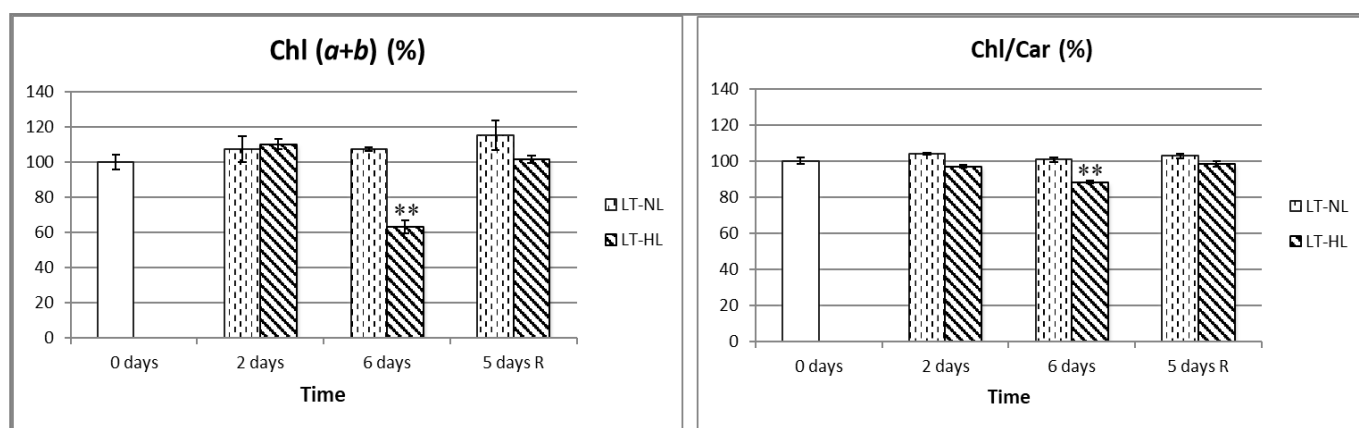
Каротеноиди $\mu\text{g/mg FW}$	Време (дни)	Третиране	
		LT-NL	LT-HL
Неоксантин	0 ден	2.541 ± 0.324	2.541 ± 0.324
	6 ден	2.383 ± 0.256	2.369 ± 0.396
	5 дни на възстановяване	2.670 ± 0.211	2.783 ± 0.089
Лютеин	0 ден	9.867 ± 1.274	9.867 ± 1.274
	6 ден	10.859 ± 1.005	12.776 ± 1.560
	5 дни на възстановяване	10.421 ± 0.781	10.168 ± 0.288
β -каротин	0 ден	6.573 ± 0.346	6.573 ± 0.346
	6 ден	5.444 ± 0.480	5.819 ± 1.003
	5 дни на възстановяване	6.364 ± 0.441	6.183 ± 0.254

На таблица 2 са представени данните за съдържанието на неоксантин, лютеин и β -каротин в листа от домати растения, отглеждани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Неоксантинът и при двата вида растения не се променя. Съдържанието на лютеин при LT-NL леко се повишава на 6 ден и след 5 дни на възстановяване, докато при LT-HL на 6 ден нарастването е по-значително. Съдържанието на β -каротин и при двете третираня намалява слабо на 6 ден.

3.2. *Arabidopsis thaliana*

3.2.1. Промени в пигментния състав

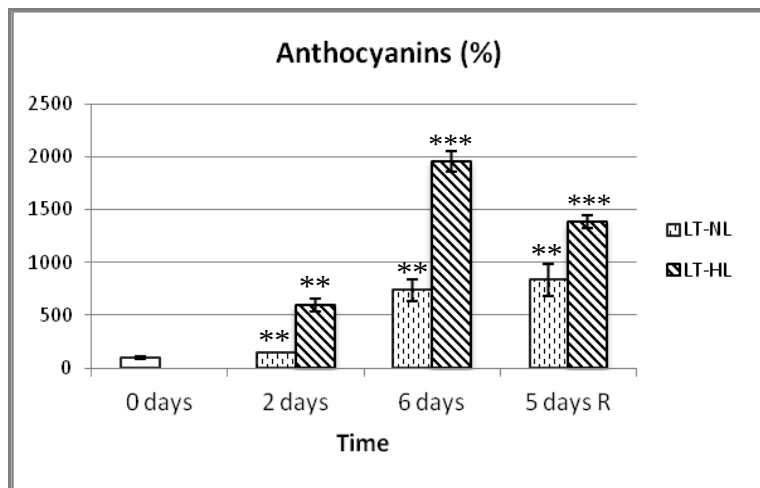
На фиг. 41 са представени данни за пигментното съдържание в листа от *Arabidopsis thaliana*, третирани с ниска температура (LT-NL) и при ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). При растения, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет, на 6 ден се наблюдава намаление на Chl (a+b) с 37% и на Car с 27% и съответно намаление в отношението Chl/Car с 12%. Намаление в отношението Chl a/b се наблюдава и при двата вида третираня.



Фиг. 41. Промени в пигментното съдържание при *Arabidopsis thaliana* Col-0, отглеждан при ниска температура и нормална светлина (LT-NL) или при ниска температура и висока светлина (LT-HL) за различни периоди от време и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Резултатите са представени като процент от съдържанието на пигментите спрямо нулевия ден от всички експерименти. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения. 100% отговарят на: 0.938 mg/g FW за Chl (a+b) и 2.987 за Chl/Car.

3.2.2. Защитни вещества

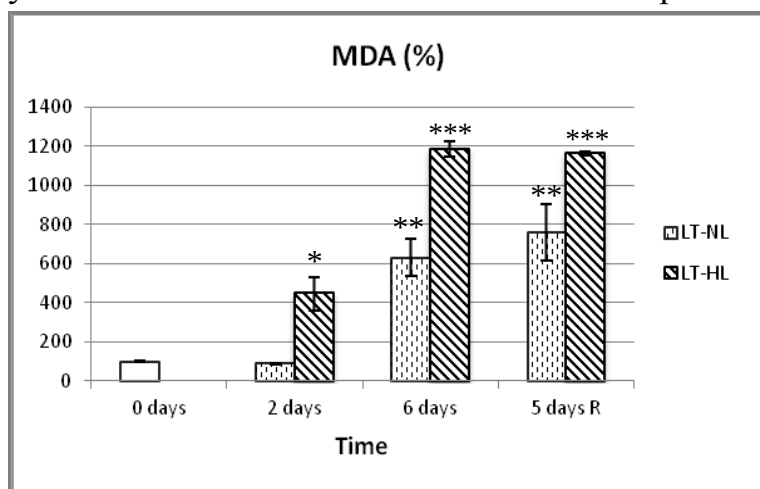
Анализът, проведен с листа от *Arabidopsis thaliana*, третирани с ниска температура, показват, че съдържанието на антоциани се увеличава на втория и шестия ден след третирането, като на шестия ден това увеличение е значително. След 5 дни на възстановяване при нормални условия, при растенията, третирани с LT-NL, съдържанието на антоциани е увеличено, не спада до нивата отпреди третирането. При растения, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL), се наблюдава същата тенденция на нарастване на количеството на синтезирани антоциани, но в много по-голяма степен.



Фиг. 42. Съдържание на антоциани в листа от *Arabidopsis thaliana*, третирани с ниска температура (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) при нулев, втори и шести ден от третирането и след пет дни на възстановяване. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири независими повторения на всеки етап от експеримента и са изразени като процент от стойността в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 0.044.

3.2.3. Липидна пероксидация

На фиг. 43 са представени данни за съдържанието на MDA, който е маркер за липидната пероксидация, при растения от *Arabidopsis thaliana*, третирани с ниска температура (LT-NL) и за такива, третирани едновременно с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Резултатите показват, че на 2-ри и 6-ти ден при комбинираното третиране (LT-HL) липидната пероксидация прогресивно нараства, като през 5 дневния период на възстановяване не се редуцира. При растенията, третирани само с ниска температура (LT-NL), наблюдаваното увеличение на MDA е много по-слабо изразено.



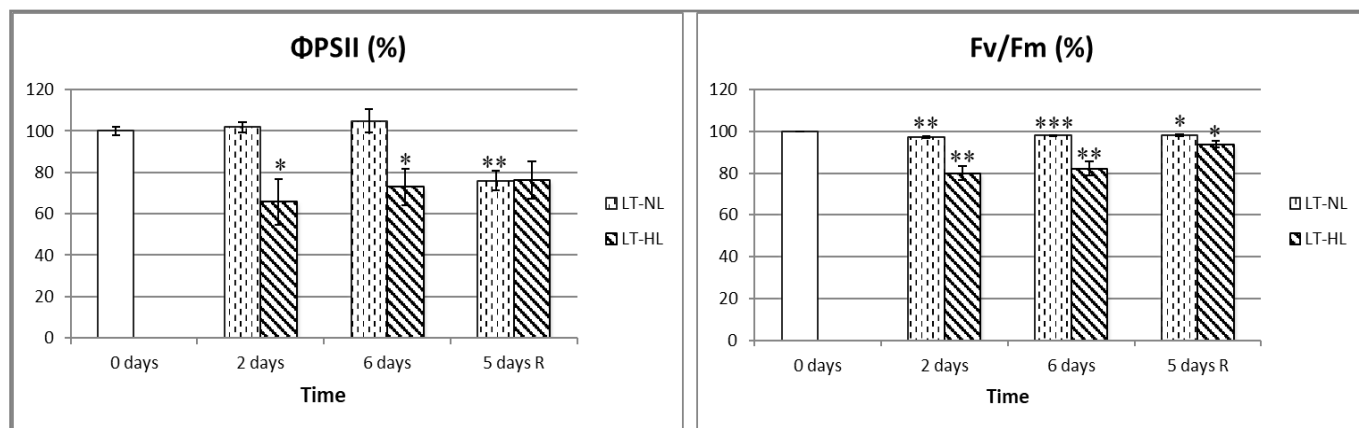
Фиг. 43. Степен на липидна пероксидация при растения от *Arabidopsis thaliana*, третирани с ниска температура и с ниска температура и висок светлинен интензитет. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 4 паралелни повторения на всеки етап от експеримента и са изразени като процент от стойностите в началото на всички експерименти. 100% отговарят на 28.799 nmol MDA/g FW.

3.2.4. Квантова ефективност на PSII, NPQ, qP, Fv/Fm, ΦNO

За растения от *Arabidopsis thaliana* третирани при LT-NL и LT-HL бяха определени квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние ($\Phi PSII$) нефотохимичното гасене (NPQ), фотохимично гасене (qP) и максималната ефективност на PSII (Fv/Fm).

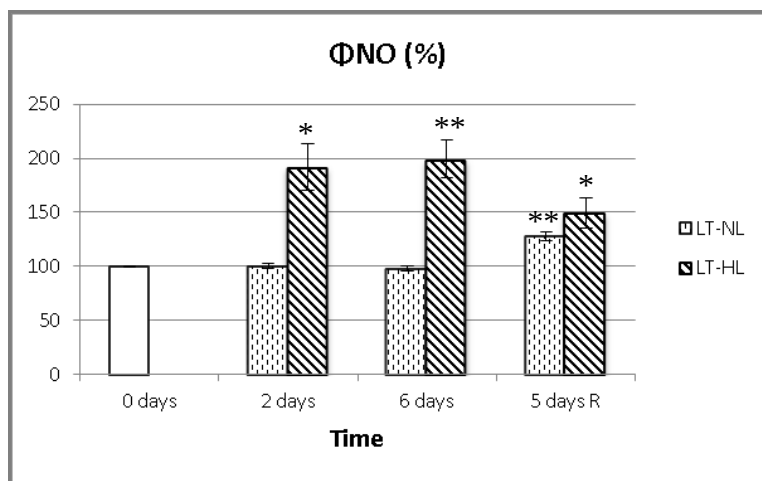
При растения, подложени на ниски температури за шест дни, не се наблюдават значителни промени. При третиране с LT-HL квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние, фотохимично гасене (qP) и максималната ефективност на PSII (Fv/Fm) намаляват до шестия ден и не се

възстановяват напълно след 5 дни на развитие при оптимални условия (в автореферата са показани данни само за $\Phi PSII$ и Fv/Fm). Промени се наблюдават при растения, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет, най-силно изразено е намалението на нефотохимичното гасене на втори и шести ден, съответно с 61% и 78% след третирането, като стойността му не се възстановява напълно след 5 дни при нормални условия.



Фиг. 44. Ефект на третирането с ниска температура при оптимален и висок светлинен интензитет върху функционалните характеристики на фотосинтетичния апарат при *Arabidopsis thaliana*. Данните показват квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние ($\Phi PSII$) и максималната ефективност на PSII (Fv/Fm). Средните стойности $\pm SE$ са изчислени от три независими експеримента с четири независими повторения изразени в проценти. 100% отговарят на: 0.491 за $\Phi PSII$ и 0.861 за Fv/Fm .

Данните на фиг. 45 показват съществено увеличение на ΦNO при растенията, третирани с ниска температура в комбинация с висок светлинен интензитет. Тези високи стойности се наблюдават както на втория, така и на шестия ден след третирането и въпреки че намаляват, не достигат стойности от 0 ден след 5 дни при оптимални условия.

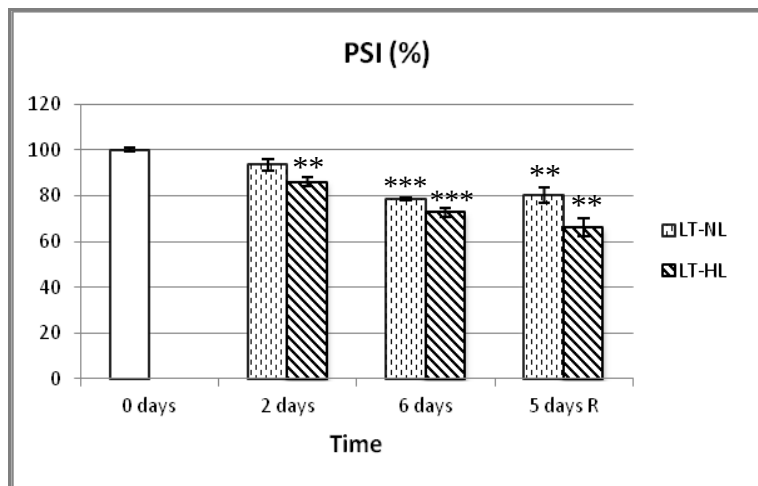


Фиг. 45. Квантов добив на гасенето на излишната погълната енергия, обезвредена по механизъм, независим от функционирането на зеаксантиновия цикъл (ΦNO). Измерванията са направени върху листа от *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при ниска температура и нормален светлинен интензитет (LT-NL) и такива, третирани с ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm SE$ са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения изразени в проценти. 100% отговарят на 0.28.

3.2.5. Активност на PSI

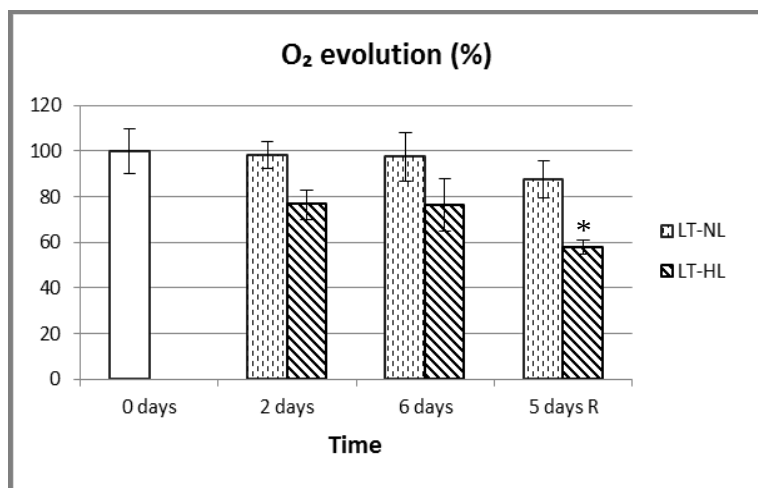
На фиг. 46 са представени данните за стойности на активността на PSI при растения от *Arabidopsis thaliana*, третирани с ниска температура (LT-NL) и ниска температура и висок светлинен интензитет (LT-HL). Активността намалява на втори и в по-голяма степен на шестия ден от третирането, като това редуциране е изразено

по-силно при LT-HL. Но това инхибиране е много по-слабо изразено в сравнение с регистрираното при домати растения. И при двата вида третирувания не се наблюдава възстановяване на активността на PSI.



Фиг. 46. Активност на PSI при *Arabidopsis thaliana*. Данните са изразени като процент от средната стойност на нулевите дни при растения, третирувани с ниска температура (LT-NL) и ниска температура с висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 4 независими проби. 100% отговарят на 5.63.

3.2.6. Кислородно отделяне *in vivo*



Фиг. 47. Кислородно отделяне от листни дискове от растения *Arabidopsis thaliana*, третирувани с ниска температура и нормална светлина (LT-NL) и ниска температура с висок светлинен интензитет (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения. 100% отговарят на 8.375 $\mu\text{mol O}_2/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

При растения, третирувани с ниска температура и нормална светлина (LT-NL), не се наблюдава инхибиране на кислородното отделяне от листа, но при комбинираното действие на двата фактора - ниска температура и висок светлинен интензитет кислородното отделяне е инхибирано на втори ден с 23% и на шести ден с 24% и не се възстановява при оптимални условия за 5 дни.

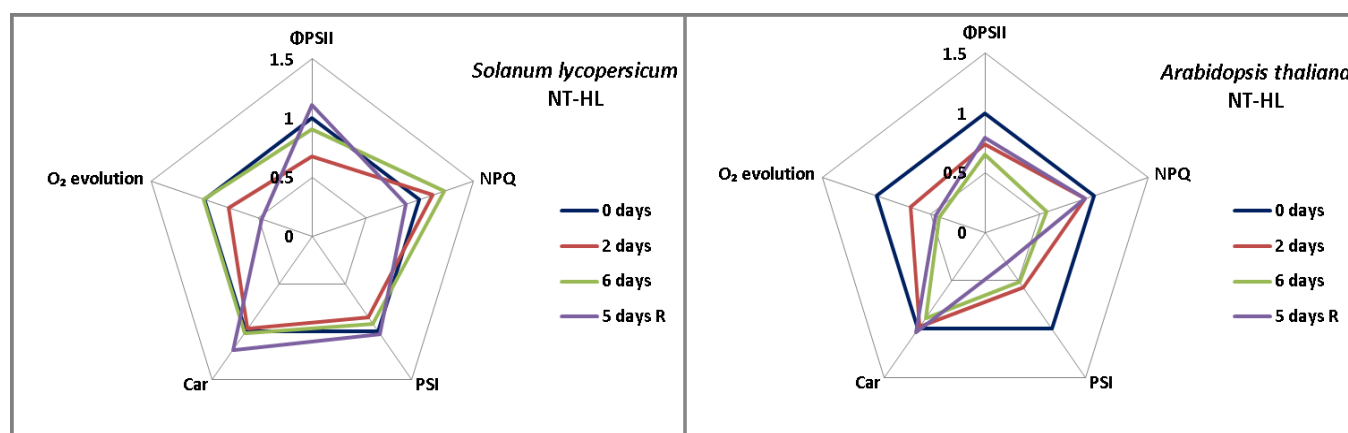
ОБСЪЖДАНЕ

Представените в дисертационния труд резултати включват информация относно промените в съдържанието на каротеноиди и хлорофили, в максималната квантова ефективност и квантовия добив на фотосистема 2, активността на фотосистема 1 и нефотохимичното гасене, промени в организацията и състава в пигмент-белтъчните комплекси в резултатът на няколкодневно третиране на растенията с висок светлинен интензитет съответно при оптимална, ниска и висока температура. Заедно с това са проследени промените в окислението на мембранните липиди и синтеза на антоциани.

Изследванията включваха анализ на настъпилите изменения на двете фотосистеми в зависимост от продължителността на действие на стресовите фактори, обратимостта на наблюдаваните промени, както и оценка на способността на двете растения да се аклиматизират към приложените въздействия. Специално внимание беше обърнато на способността на растенията да се аклиматизират към едновременното действие на двата стресови фактора.

Много растения използват различни подходи за аклиматизация, включваща молекулярни реорганизации на ниво на хлоропластния състав, за които се смята, че дават възможност на растението да постигне баланс между нуждите за ефективно улавяне и използване на светлината и за избягване на потенциално вредните ефекти при излишък от възбуждаща енергия. Тези отговори са добре документирани за много растителни видове (Anderson и съавт., 1995) и включват корекции в стехиометрията на реакционните центрове (Chow и съавт., 1990; Walters и Horton 1994; Bailey и съавт., 2001), променен размер на антената (Leong и Anderson 1984; Bailey и съавт., 2001) и променени нива на Rubisco (Seemann и съат., 1987; de la Torre и Burkey 1990; Walters и Horton 1994; Bailey и съавт., 2001). Такава аклиматизация лесно се следи чрез последващите промени в съотношението на хлорофил *a* към хлорофил *b* (Chl *a/b*). Количеството на Chl *a* намалява, което води до намаление на отношението Chl *a/b*. При домати растения и растения *Arabidopsis*, подложени на висок светлинен интензитет при нормална температура, се наблюдава намаление на отношението Chl *a/b* на 6-ти ден след третирането и промяната е необратима след възстановяване. Когато погълната светлина надхвърля капацитета на фотосинтезата, настъпва намаляване на фотохимичната активност на PSII и може да настъпи фотоинхибиране (Bailey и съавт., 2001; Murata и съавт., 2007). Чувствителността на растенията към фотоинхибирането зависи от вида на растението и от светлинните условия на отглеждане. Нашите данни показват фотоинхибиране на PSII както при домати растения, така и при *Arabidopsis thaliana*, третирани с висок светлинен интензитет при оптимална температура. По-значими промени се наблюдават при *Arabidopsis thaliana*. Растенията се

аклиматизират към висок светлинен интензитет, използвайки различни механизми за защита. От съществено значение е функционирането на ксантофиловия цикъл за обезвреждане на излишната погълната светлина (Demmig-Adams и Adams, 1996). Нашите данни показват, че имаме значително увеличение на съдържанието на виоаксанти и зеаксанти при домати растения (фиг. 10 и 11). Процесът на аклиматизацията на домати растения към по-високия светлинен интензитет включва и промени в стехиометрията на основните пигмент-белтъчни комплекси, участващи в първичните процеси на фотосинтезата. Представените данни показват промени в съотношението на PSI/PSII, Lhc/PSII и в количеството на PSII-CP43 (фиг. 7, 8 и 9). Както на втория, така и на шестия ден регистрираме намаление на отношението PSI/PSII и на отношението Lhc/PSII. За избягване на дисбаланса във възбуждането на двете фотосистеми, когато в резултат на промените в светлинните условия настъпи промяна в антенните комплекси на фотосистемите, настъпват и промени в стехиометрията на двете фотосистеми. Едновременно регулация на размера на антенния комплекс на PSII и на отношението PSI/PSII беше показано, като при нарастване на антенния комплекс на PSII отношението PSI/PSII се повишава (Jia и съавт., 2016). При повишен интензитет на светлината, при която се развиват растенията, антената на PSII намалява, за да предпази фотосистемата от прекомерно възбуждане и балансът на енергетичното разпределение и регулация на електронния транспорт се поддържа при по-ниско съотношение на PSI/PSII, което наблюдаваме в нашите експерименти. Трябва да отбележим нарастването на количеството на PSII-CP43 (комплекс на PSII, от който е дисоциирал белтъка CP43). Този комплекс е свързан с цикъла на „поправка“ на PSII, свързано с разграждането и повторно инкорпориране на D1 и най-вероятно значителното му нарастване говори за един интензивен процес на възстановяване на повредената PSII в условия на висок светлинен интензитет.



Фиг. 48. Сравнение на ефекта на HL върху *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, по отношение на следните параметри: квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние (F_v/F_m), нефотохимичното гасене (NPQ), фотоокисление на PSI, съдържание на каротеноиди, кислородно отделяне измерени върху откъснати листа от *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, третирани с

висок светлинен интензитет при оптимална температура (NT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения.

Антоцианите са най-важен клас от вторичните метаболити, извършващи множество функции в растителния отговор към абиотичен стрес (Landi и съавт., 2015). Представените резултати показват, че в листата на домати растения и *Arabidopsis* имат силно натрупване на антоциани под действието на високия светлинен интензитет, като при *Arabidopsis thaliana* натрупването на антоциани е много по-силно изразено, особено на шестия ден (фиг. 2 и 12).

Сравнението на двата растителни вида показва, че по отношение на характеристиките ФPSII, PSI, O₂ отделяне, *Solanum lycopersicum* се аклиматизира по-добре към условия на висок светлинен интензитет, като на шестия ден тези характеристики са възстановени, докато при *Arabidopsis thaliana* инхибирането продължава с времето на третиране. Това е особено добре изразено при NPQ и кислородното отделяне (фиг. 48).

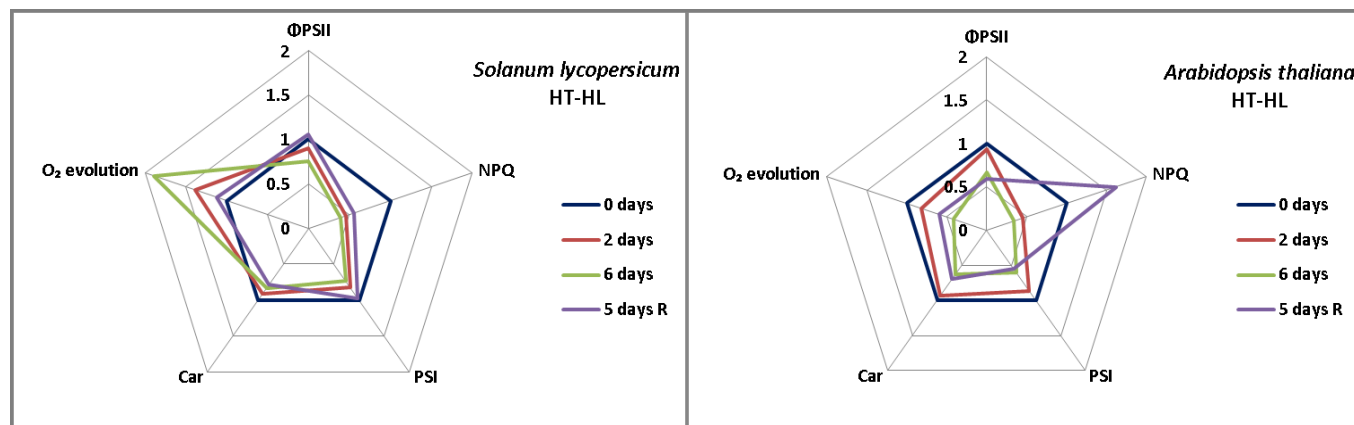
Документирано е, че в растенията, изложени на висока температура, се наблюдава намаляване на съдържанието на хлорофила (Balouchi, 2010; Reda и Mandoura, 2011), което е свързано или с нарушена хлорофилна синтеза, поради инхибиране на различни ензими, отговорни за биосинтеза (Dutta и съавт., 2009), и/или ускорено хлорофилно разграждане. Увеличаването на Chl *a/b* е описано в термотолерантен домати див тип *Nagcarlang* след топлинен стрес в продължение на 2 часа при 45 °C, докато в термочувствителен var. *Campbell* не се установява промяна на съотношението, дори се наблюдава намаление (Camejo и съавт., 2005). При нашите експериментални условия установихме постепенно и значително намаляване на общия хлорофил при комбинираното действие на NT-HL, като настъпилите промени са необратими след периода на възстановяване. Спадът в съдържанието на хлорофил при NT-NL може да бъде свързано с инхибиране на отговорните ензими за хлорофилния синтез, както е докладвано по-рано (Dutta и съавт., 2009), докато при NT-HL може да се дължи на разграждане на хлорофилните молекули.

Доматените растения са известни като култура от умерен климат, оптималната температура за тяхното развитие е 25-30 °C по време на светлия период. Повишената температура, 38/29 °C по време на дневен/нощен цикъл, е умерено висока за растенията и те трябва да се аклиматизират към тези променени на средата, но тази температура не се очаква да доведе до значително инхибиране на PSII. Квантовият добив на PSII (ФPSII) и коефициентът на фотохимично гасене (qP) са намалени значително при висок интензитет на светлината при двудневно третиране, което показва, че първоначалната аклиматизация на домати растения протича с намаляване на броя на отворени PSII центрове и спад на дела на

енергията, използвана за фотохимия. Подобен ефект на високия интензитет на светлината върху qP и ФPSII беше докладван (Backhausen и съавт., 2005) и показва, че един от механизмите за справяне с неблагоприятните условия на средата е да се ограничи използването на възбуждащата енергия и да се намали скоростта на електронния транспорт. Комбинация от двата фактора води до известно намаляване на светлинно-индицираното инхибиране на qP и ФPSII на втория ден след началото на третирането. Buchner и съавт., (2015) докладваха защитен ефект на облъчване по време на излагане на алпийски растения на топлинен стрес, като беше предположено, че механизмът на защита включва взаимодействието между няколко процеса - активиране на Rubisco, активиране на гасенето на ROS и индукция на топлинни шокови белтъци. Нашите резултати показват, че развитието на домати растения при повишена температура помага на растенията по-ефективно да се аклиматизират към високия светлинен интензитет и да намалят светлинно-индуцираното инхибиране. Активирането на система за преодоляването на един стресов фактор е от полза за растенията да се справят с неблагоприятното действие на втори стрес и може да се предполага, че това е един възможен механизъм за дългосрочна аклиматизация. Прилагането на топлинен стрес води до значително увеличение на активността на ксантофиловия цикъл (Yin и съавт., 2010; Dongsansuk и съавт., 2013). Подобни данни за засилена ксантофилова активност са докладвани за листа от *Ra glacialis* третирани при 38 °C (Streb и съавт., 2003).

При нашите експерименти наблюдавахме повишена липидна пероксидация, която се засилва при продължително третиране с висок светлинен интензитет (NT-HL), което е очаквано, имайки предвид, че при излишък на възбуждаща енергия се акумулират редуцирани електронни преносители и нараства генерирането на реактивни форми. При едновременното прилагане на висока температура и висока светлина (HT-HL) се наблюдава незначително увеличение на липидна пероксидация на 6 ден след третирането, но в много по-малка степен в сравнение с NT-HL. Фенолните вещества, включително антоцианини, са важен клас от вторичните метаболити, имащи множество функции в отговор на растенията към абиотичен стрес (Landi и съавт., 2015). Антиоксидантната активност на антоцианините е няколко пъти по-висока от аскорбинова киселина и витамин Е (Gould и съавт., 2002). Беше показано, че листа с високо съдържание на антоциани страдат по-малко при фотоинхибиране и се възстановяват по-бързо при излишък на светлина (Pierini и съавт., 2002; Steyn и съавт., 2002). Представените резултати показват, че в домати растения при условия на един стресов фактор, висока температура или висока светлина, се индуцира високо натрупване на антоциани, докато в растения, подложени на комбинираното действие на двата фактора, нивото на антоцианите е сравнимо с тези на нетретираните растения. При *Arabidopsis thaliana* натрупване на

антоциани и то в големи количества се наблюдава при растения, третирани с висок светлинен интензитет при оптимална температура.



Фиг. 49. Сравнение на ефекта на HT-HL върху *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, по отношение на следните параметри: квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние (ФPSII), нефотохимичното гасене (NPQ), фотоокисление на PSI, съдържание на каротеноиди, кислородно отделяне измерени върху откъснати листа от *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, третирани с висок светлинен интензитет в комбинация с висока температура (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения.

Резултатите за активността на кислородно отделяне при домати листа показва, че при висока температура в комбинация или с нормален или висок светлинен интензитет, стимулиране се наблюдава на втория ден от третирането. На 6-тия ден при комбинираното третиране с повишена температура и с висок интензитет на светлината активността на кислородното отделяне е почти два пъти по-висока, отколкото в листа на растения, отглеждани за същия период от време при нормални условия. Последните проучвания сочат, че отговорът на растенията към комбиниран стресови фактори се различават от тези при единичен стрес (Prasch и Sonnewald, 2015). Беше показано, че комбинацията от светлина и топлина повлиява положително толерантността към тези два фактора на различни растения (Backhausen и съавт., 2005; Buchner и съавт., 2015; Krause и съавт., 2015).

При *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, третирани с висок светлинен интензитет в комбинация с висока температура в продължение на 2 и 6 дни се наблюдава инхибиране на ФPSII и PSI, по-силно изразено при *Arabidopsis*. Доматените растения се аклиматизират по-добре към тези условия (HT-HL), в сравнение с *Arabidopsis* (фиг. 49).

При домати растения, подложени на висока температура при оптимален и висок светлинен интензитет, се наблюдават промени в стехиометрията на основните пигмент-белтъчни комплекси, участващи в първичните процеси на фотосинтезата. Нашите данни показват промени в съотношението на PSI/PSII, Lhc/PSII и в количеството на PSII-CP43. Както на втория, така и на шестия ден, регистрираме намаление на отношението PSI/PSII при HT-HL и на отношението Lhc/PSII при двата вида третираня (фиг. 21 и 22). Количеството на PSII-CP43 нараства при HT-

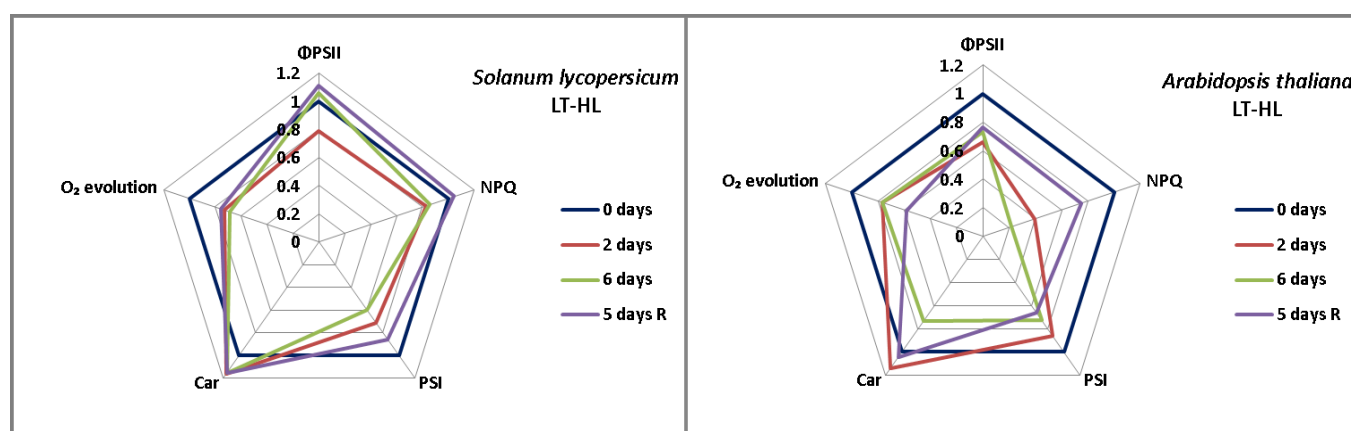
NL и HT-NL на 2 и 6 ден (фиг. 23). Толерантността на растенията към ниски температури зависи от техния вид, силата на температурния стрес и неговата продължителност. При екстремни въздействия растенията не са в състояние да реализират защитните си механизми и загиват, докато при постепенно понижаване на температурата се аклиматизират чрез различни механизми.

Температурите, които са по-ниски от оптималните, оказват неблагоприятно въздействие върху редица биохимични процеси, протичащи в хлоропласта, което води до дисбаланс между фотохимията и метаболизма (Ensminger и съавт., 2006; Stitt и Hurrey, 2002; Hurrey и съавт., 1998).

Когато растенията са изложени на нискотемпературен стрес, биосинтезата на хлорофила е засегната (Tewari и Tripathy, 1998). Отговорът на растенията *Arabidopsis thaliana*, подложени на дългосрочно (6 дни) приложение на ниска температура и висок интензитет на светлината, включва промени в съдържанието на фотосинтетичните пигменти Chl (*a+b*) и общи каротеноиди, като вторите са по-слабо засегнати. В резултат съотношението Chl/Car се понижава след 6 дни при LT-NL. Най-вероятно намаляването на фотосинтетично компетентните пигменти е свързано с опита на растенията да намалят енергията на възбуждане, достигаща до двете фотосистеми чрез намаляване на абсорбционния капацитет. Получените данни за доматени растения показват намаление на Chl (*a+b*) при третиране с ниска температура и оптимална светлина, докато при комбинираното действие на LT-NL редуцирането както на Chl (*a+b*) и на Car е по-слабо изразено. Тази разлика вероятно е свързана с видовото различие между двете растения, имайки предвид че *Arabidopsis thaliana* е по-толерантно към ниски температури. Дори при тези много неблагоприятни условия растенията поддържат относително по-високи стойности на Fv/Fm, но капацитетът на NPQ е силно намален, което означава, че при тези условия се включват алтернативни пътища за защита.

В литературата има данни, показващи че фотоинхибиране на PSI при слаба светлина и ниска температура настъпва както в студо-чувствителни растения - краставици и картофи (Sonoike, 1996) и в студо-толерантни растения като ечемик (Tjus и съавт., 1998), зимна ръж (Ivanov и съавт., 1998) и *Arabidopsis thaliana* (Zhang и Scheller, 2004). Разликите в PSI активността в различни растения зависи от ензимния капацитет за обезвреждане на ROS и от способността им да се справят с прекомерената светлина (Tjus и съавт., 2001). Нашите данни показват инхибиране на PSI при ниска температура, но в по-голяма степен това инхибиране е изразено в студо-чувствителното растение – домати и в по-малка степен при студо-толерантното растение – *Arabidopsis*. При доматените растения индуцираното от ниската температура инхибиране на PSI е почти същото и при LT-NL, докато при *Arabidopsis thaliana* добавянето на висок светлинен интензитет води до по-силно изразено инхибиране (фиг 50).

По-високата чувствителност на доматиените растения към субоптимални температури при висок светлинен интензитет е особено изразено в акумулирането на антоциани - докато при тях има почти четирикратно нарастване на антоцианите след 6 дни при LT-HL, то при *Arabidopsis thaliana* повишението е два пъти. Тази по-висока чувствителност на *Solanum lycopersicum* към нискотемпературно фотоинхибиране се проявява особено при кислородното отделяне, измерено на лист, като на шестия ден третиране при LT то е редуцирано с 40% (фиг. 35). Докато след двудневно третиране при субоптимална температура не се наблюдават значими промени в стехиометрията на пигмент-белтъчните комплекси, то след третиране на доматиените растения с LT-HL промените са по-ясно изразени. Нашите данни показват увеличение на съотношението на PSI/PSII, Lhc/PSII и в количеството на PSII-CP43 на 2 и 6 ден от третирането (фиг. 36, 37 и 38).



Фиг. 50. Сравнение на ефекта на LT-HL върху *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, по отношение на следните параметри: квантовата ефективност на PSII в светлинно-адаптирано състояние (ΦPSII), нефотохимичното гасене (NPQ), фотоокисление на PSI, съдържание на каротеноиди, кислородно отделяне измерени върху откъснати листа от *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, третирани с висок светлинен интензитет в комбинация с ниска температура (LT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения.

Цикълът на ксантофилите е пътът, по който виолаксантинът бързо и обратимо се окислява в зеаксантин чрез междинния антераксантин. В отговор на ниската температура се наблюдава увеличаване на зеаксантина (Krol и съавт., 1988). Ксантофилите имат съществена антиоксидантна активност. За сравнение, антиоксидантната активност на зеаксантина е по-висока от тази на виолаксантина (Nap и съавт., 2010). Тази антиоксидантна активност играе ключова роля по време на въздействие на субоптимални температури.

При ечемик (*Hordeum vulgare* L.) при висока светлина и ниска температура или в комбинация от двете има малък ефект върху общия ксантофилов цикъл. Ниската температура и високата светлина, приложени заедно, индуцират подобряване на общите ксантофили - сборът антераксантин и зеаксантин е от 4 до 5 пъти по-висок при 5 °C отколкото при 25 °C (Adam и Murthy, 2013). Нашите данни показват, че при *Solanum lycopersicum* в условия LT-HL нефотохимичното гасене е

по-слабо засегнато, докато при *Arabidopsis thaliana* NPQ намалява прогресивно на 2 и 6 ден. За сметка на това, при *Arabidopsis thaliana* се наблюдава нарастване на ФНО (фиг. 45), който механизъм на гасене на излишната енергия играе определяща роля за предпазване на растенията от комбинирания стрес.

ИЗВОДИ

1. Отговорът и аклиматизацията на *Solanum lycopersicum* към висок светлинен интензитет при оптимална температура включва повишение в съдържанието на каротеноидите, участващи в ксантофиловия цикъл, докато съдържанието на β -каротин, лютеин и неоксантин не се променя.
2. Промените в каротеноидното съдържание при третиране с висок светлинен интензитет на *Solanum lycopersicum* при ниска температура включват не само повишение на количеството на виолаксантина и зеаксантина, но и на лютеина.
3. След двудневно третиране с висок светлинен интензитет аклиматизирането на *Solanum lycopersicum*, оценено по коефициента на фотохимично гасене и квантова ефективност на PSII, протича по-ефективно, когато високият светлинен интензитет се прилага при висока температура.
4. Аклиматизирането на *Solanum lycopersicum* към висок светлинен интензитет при различна температура включва и промени в популациите на двете фотосистеми, тъй като отношението PSI/PSII намалява при висока температура както на втория, така и на шестия ден, докато при субоптимална температура се наблюдава обратна тенденция - отношението PSI/PSII нараства.
5. Отговорът и защитата на фотосинтетичния апарат на *Solanum lycopersicum* към действието на двата фактора включва по-интензивен процес на реасемблиране на фотосистема 2, като количеството на PSII-CP43 нараства при комбинираното действие на висок светлинен интензитет с висока или с ниска температура.
6. Комбинирането на висок светлинен интензитет с висока температура намалява увреждащия ефект на светлинния интензитет върху *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, като синтеза на антоциани и степента на липидното окисление са по-слабо изразени в сравнение с растенията, подложени само на висок светлинен интензитет.
7. Ниската температура засилва увреждащия ефект на високия светлинен интензитет при *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, като степента на липидно окисление и синтезът на антоциани са значително по-високи при

едновременното действие на двата стресови фактора, а кислородното отделяне е инхибирано.

8. Различната толерантност на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana* към ниска температура се проявява по отношение на активността на PSI, като ефектът не се променя съществено при комбинираното действие с висок светлинен интензитет, докато различната им толерантност към висока температура се демонстрира по отношение на ефективния квантов добив на PSII.
9. Отговорът и аклиматизацията на *Arabidopsis thaliana* към висок светлинен интензитет при ниска температура включва в много по-голяма степен нерегулираното нефотохимично гасене (FNO) отколкото при *Solanum lycopersicum*.

ПРИНОСИ

1. Проведен е детайлен паралелен анализ на функционалната активност на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, различаващи се по своята термочувствителност, по отношение на отговора им към висок светлинен интензитет при субоптимална и при висока температура.
2. Установена е по-висока стабилност на каротеноидите в сравнение с хлорофилите при няколкодневно третиране на *Solanum lycopersicum* с висок светлинен интензитет при висока и субоптимална температура.
3. Показано е, че в кратковременен период *Solanum lycopersicum* се аклиматизира по-добре към висок светлинен интензитет при по-висока температура.
4. За първи път е показано, че при третиране на *Solanum lycopersicum* с висок светлинен интензитет и субоптимална температура промяната в популацията от антенните белтъци на фотосистема 2 е съпътствана с промяна в стехиометрията на двете фотосистеми.
5. Показан е различният принос на ксантофил-зависимото нефотохимично гасене (NPQ) и на гасенето по механизъм, независим от функционирането на ксантофиловия цикъл (FNO), при отговора на *Solanum lycopersicum* и на *Arabidopsis thaliana* към висок светлинен интензитет при ниска температура.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации:

1. **Gerganova M.**, Popova A.V., Stanoeva D., Velitchkova M. (2016) Tomato plants acclimate better to elevated temperature and high light than to treatment with each factor separately. **Plant Physiol. Biochem.**, 104, 234–241.

2. **Gerganova M.**, Stanoeva D., Popova A.V., Velitchkova M. (2016) Pigment content and oxygen evolution of tomato plants as affected by long term treatment at suboptimal temperature. **C. R. Bulg Acad. Sci.**, 69, 1429–1436.

3. **Gerganova M.**, Stanoeva D., Popova A.V., Velitchkova M. (2017) Alterations in pigment content and photosynthetic performance of *Arabidopsis thaliana* plants under combined action of low temperature and high light. **C. R. Bulg Acad. Sci.**, 70, 1255–1262.

Цитати:

Gerganova M., Popova A.V., Stanoeva D., Velitchkova M. (2016) Tomato plants acclimate better to elevated temperature and high light than to treatment with each factor separately. **Plant Physiol. Biochem.**, 104, 234–241.

1. Bettini P.P., Marvasi M., Fani F., Lazzara L., Cosi S., Melani L., Mauro M.L. (2016) *Agrobacterium rhizogenes* rolB gene affects photosynthesis and chlorophyll content in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. **J Plant Physiol.**, 204, 27-35.

2. Lu T., Meng Z., Zhang G., Qi M., Sun Z., Liu Y., Li T. (2017) Sub-high Temperature and High Light Intensity Induced Irreversible Inhibition on Photosynthesis System of Tomato Plant (*Solanum lycopersicum* L.) **Plant Sci.**; 8: 365. Published online 2017 Mar 16. DOI: 10.3389/fpls.2017.00365.

Участия в научни форуми:

1. Gerganova M., Vasilev D., Faik A., Velitchkova M. (2013) Effect of low growth temperature on oxygen evolution reactions in tomato and *Arabidopsis thaliana* plants. Международна конференция „Biosciense – development and new opportunities” – Kliment’s days, 20-22.09.2013 г. СУ „Св.Климент Охридски”, Постер.

2. Герганова М., Попова А., Станоева Д., Величкова М. (2014) Ефект на температурата при адаптацията на фотосинтетичния апарат към високи светлинни интензитети. Сесия за докторанти и млади учени „Биомедицина и качество на живот” по случай 145 години БАН, ИБФБМИ-БАН, 02.10.2014 г., Доклад.

3. Gerganova M., Faik A., Velitchkova M., Sarvari E. (2016) Reorganization of the main pigment-protein complexes in thylakoid membranes from tomato (*Solanum lycopersicum*) during long term exposure to elevated temperature. 41 конгрес на

FEBS в Турция (Ефес, Кушадъс, 3-8 септември 2016 г.), Отпечатано резюме, FEBS J. 283, P-02.08.05-068. *Заб. Поради независещи от нас обстоятелства конгресът беше отменен.*

4. Gerganova M., Stanoeva D., Popova A.V., Velitchkova M. (2016) Alterations in pigment content and photosynthetic performance of *Arabidopsis thaliana* plants under combined action of low temperature and high light. III национален конгрес по Физически науки – 29.09. – 02.10.2016, София, Постер.
5. Gerganova M., Faik A., Sarvari E., Velitchkova M. (2016) Photoinhibition-induced damages of photosynthetic apparatus of tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv M82). Младежка конференция “Климентови дни - 2016”- Софийски университет „Св. Кл. Охридски”- 18-19 ноември 2016, София, Постер.
6. Gerganova M., Faik A., Velitchkova M. (2017) High light- and heat-induced alterations in stoichiometry and organization of photosynthetic pigment protein complexes in tomato plants. Международна конференция: The International Conference “Plant Molecular Physiology” in Vienna, Austria. February 23-24, 2017, Постер.
7. Gerganova M., Spisher L., Kessler F., Velitchkova M. (2017) Photosynthetic performance, lipid composition and production of antioxidants in *Solanum lycopersicum* as affected by high light at low temperature. Научна сесия „Биомедицина и качество на – младите в науката“, проведена на 26-27 юни 2017 г. по случай 50 годишния юбилей на ИБФБМИ-БАН, Доклад.

ЛИТЕРАТУРА

- Adam S., Murthy S.D.S., (2013). Gaur R.K. and Sharma P. (eds.), Approaches to Plant Stress and their Management, Springer India 2014, 219–226.
- Anderson J.M., Chow W.S., Park Y.I., (1995). Photosynth. Res., 46, 129–139.
- Backhausen J.E., Klein M., Jung S., Scheibe R., (2005). Plant Sci., 169, 229–237.
- Bailey S., Walters R.G., Jansson S., Horton P., (2001). Planta, 213, 794–801.
- Balouchi H.R., (2010). Int. J. Biol. Life Sci., 7, 56–66.
- Buchner O., Stoll M., Karadar M., Kranner I., Neuner G., (2015). Plant Cell Environ., 38, 812–826.
- Camejo D., Morales M.A., Dell'Amico J.M., Torrecillas A., Alarcon J.J., (2005). J. Plant Physiol., 162, 281–289.
- Chow W.S., Melis A., Anderson J.M., (1990). Proc Natl Acad Sci USA, 87, 7502–7506.

- Demmig-Adams B., Adams III W.W., (1996). *Trends Plant Sci.*, 1, 21–26.
- Dongsansuk A., Lütz C., Neuner G., (2013). *Photosynthetica*, 51, 13–21.
- Dutta S., Mohanty S., Tripathy B.C., (2009). *Plant Physiol.*, 150, 1050–1061.
- Ensminger I., Bosch F., Huner N.P.A., (2006). *Physiol Plant.*, 126, 28–44.
- Esterbauer H., Cheeseman K.H., (1990). *Meth. Enzymol.*, 186, 407–421.
- Gould K.S., McKelvie J., Markham K.R., (2002). *Plant Cell Environ.*, 25, 1261–1269.
- Han H., Gao S., Li B., Dong X.Ch., Feng H.L., Meng Q.W., (2010). *Journal of Plant Physiol.*, 167, 176–183.
- Huner N.P.A., Oquist G., Sarhan F., (1998). *Trends Plant Sci.*, 3, 224–230.
- Ivanov A.G., Morgan R.M., Gray G.R., Velitchkova M.Y., Huner N.P., (1998). *FEBS Lett*, 430(3), 288–292.
- Jia T., Ito H., Tanaka A., (2016). *Planta*, 244, 1041–1063.
- Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E., (2004). *Photosynth. Res.*, 79, 209–218.
- Krause G.H., Winter K., Krause B., Virgo A., (2015). *Funct. Plant Biol.*, 42, 42–51.
- Krol M., Huner N.P.A., Mac Intosh A., (1988). *Photosynth Res.*, 14, 97–112.
- Laemmli U.K., (1970). *Nature*, 227, 680–685.
- Landi M., Tattini M., Gould K.S., (2015). *Environ. Exp. Bot.*, 119, 4–17.
- Leong T.Y., Anderson J.M., (1984). *Photosynth Res.*, 5:105–115.
- Lichtenthaler H.K., (1987). *Meth. Enzymol.*, 148, 350–382.
- Martinis J., Glauser G., Valimareanu S., Kessler F., (2013). *Plant Physiol.*, 162, 652–662.
- Murray J.R., Hackett W.P., (1991). *Plant Physiol.*, 97, 343–351.
- Pierini F., Iannelli M.A., Massacci A., (2002). *Plant Cell Environ.*, 25, 1251–1259.
- Prasch ChM., Sonnewald U., (2015). *Environ. Exp. Bot.*, 114, 4–14.
- Quadrana L., Almeida J., Otaiza S.N., Rossi M., (2013). *Plant Mol. Biol.*, 81, 309–325.
- Reda F., Mandoura H.M.H., (2011). *Int. J. Acad. Res.*, 3, 108–115.
- Seemann J.R., Sharkey T.D., Wang J.L., Osmond C.B., (1987). *Plant Physiol.*, 84, 796–802.
- Sonoike K., (1996). *Plant and Cell Physiology*, 37, 239–247.
- Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G., (2002). *New Phytol.*, 155, 349–361.
- Stitt M., Hurry V., (2002). *Curr Opin Plant Biol.*, 5(3), 199–206.
- Streb P., Aubert S., Bligny R., (2003). *Plant Biol.*, 5, 432–440.

- Tewari A.K., Tripathy B.Ch., (1998). *Plant Physiol.*, 117(3), 851–858.
- Tjus S.E., Moller B.L., Scheller H.V., (1998). *Plant Physiol.*, 116(2), 755–764.
- Tjus S.E., Scheller H.V., Andersson B., Moller B.L., (2001). *Plant Physiol.*, 125(4), 2007–2015.
- Torre W.R., Burkey K.O., (1990). *Photosynth Res.*, 24:127–136.
- Van Kooten O., Snell J.F.H., (1990). *Photosynth. Res.*, 25, 147–150.
- Velitchkova M., Popova A., (2005). *Bioelectrochem.*, 67, 81–90.
- Walters R.G., Horton P., (1994). *Planta*, 195, 248–256.
- Wanner L.A., Junttila O., (1999). *Plant Physiol.*, 120(2), 391–400.
- Yin Y., Li S., Liao W., Lu Q., Wen X., Lu C., (2010). *J. Plant Physiol.*, 167, 959–966.
- Zhang S., Scheller H.V., (2004). *J. Biol. Chem.*, 279, 3180–3187.