

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Айгюн Кемал Фаик

Механизми на отговор на фотосинтетичния апарат на висши растения на комбиниран температурен и светлинен стрес

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

София, 2018 г.

Дисертационния труд е обсъден на разширен научен семинар на секция „Фотовъзбудими мембрани“ на ИБФБМИ – БАН, проведен на 25.04.2018 г. и насочен за защита.

Дисертационния труд съдържа страници, включващи текст, 58 фигури (от тях: 46 фигури и 8 таблици в раздел „Резултати“), цитирани са литературни източници. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 3 научни публикации. Забелязани са две независими цитирания.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2018 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 интересувашите се в канцеларията на ИБФБМИ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 105, София.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Айгюн Кемал Фаик

Механизми на отговор на фотосинтетичния апарат на висши растения на комбиниран температурен и светлинен стрес

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

София, 2018 г.

Списък на използваните съкращения

BQ	бензохинон
DCMU	N' - (3,4 - дихлорфенил) - N,N - диметилкарбамид (диурон)
DCPIP	дихлорфенолиндифенил
HT-HL	висока температура и висок светлинен интензитет
HT-NL	висока температура и оптимален светлинен интензитет
LT-HL	субоптимална температура и висок светлинен интензитет
LT-NL	субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет
MV	метилвиологен
NT-HL	оптимална температура и висок светлинен интензитет
NT-NL	оптимална температура и оптимален светлинен интензитет
SDS-PAGE	натриев додецил сулфат – полиакриламидна гел електрофореза
SE	стандартна грешка
Y ₃	амплитуда на кислородно отделяне след третата светкавица
АТФ	аденозинтрифосфат
В	възстановяване
ЕТВ	електрон-транспортна верига
Кар	каротеноиди
КОС	кислород-отделяща система
НАДФН	никотинамидадениндинуклеотидфосфат дехидрогеназа
ОС	околна среда
ПБК	пигмент-белтъчен комплекс
ССКІ	светосъбиращ комплекс на ФСІ
ССКІІ	светосъбиращ комплекс на ФСІІ
ТМ	тилакоидна мембрана
ФСІ	фотосистема І
ФСІІ	фотосистема ІІ
Хл <i>a</i>	хлорофил <i>a</i>
Хл <i>б</i>	хлорофил <i>б</i>

УВОД

Фотосинтетичният апарат на висшите растения, разположен в тилакоидните мембрани на хлоропластите е мястото, където протичат всички първични реакции на фотосинтезата – от поглъщането на светлинните кванти и отделянето на кислород до синтеза на НАДФН и АТФ, които се използват по-нататък в тъмнинната фаза на фотосинтезата за създаване на органични съединения.

В природата фотосинтетичните организми биват подложени на постоянни промени по отношение на температурата и количеството и качеството на светлината и съответно трябва да регулират фотосинтетичния си електронен транспорт. Молекулярните механизми, стоящи в основата на реакциите на фотосинтетичната ЕТВ към тези промени в околната среда и тяхното регулиране, са изследвани интензивно през последните години и са обект на настоящата дисертация.

В рамките на настоящата работа е проведен детайлен анализ на функционалната активност на фотосинтетичния апарат на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, различаващи се по своята термочувствителност, по отношение на отговора им към висок светлинен интензитет при висока и при субоптимална температура. За да се анализират промените в активността на двете фотосистеми, кислородното отделяне и енергетичното взаимодействие между тях, за третиране бяха избрани стойности на светлинния интензитет и съответно високи и субоптимални температури, които не са екстремни и съответстват на термочувствителността на избраните два вида растения. Това позволява да се проследи аклиматизацията към тези условия и да се провери до каква степен отглеждането при такива условия повишава толерантността на *Solanum lycopersicum* към фороинхибиране *in vitro*.

ЦЕЛ и ЗАДАЧИ

Фотосинтетичният апарат с неговите пигмент-белтъчни комплекси и подвижни електронни преносители е особено чувствителен към промени в околната среда и механизмите на отговор към стресови фактори включват изменения както в организацията на тилакоидните мембрани, така и в съдържанието, структурата и взаимодействието на ПБК на двете фотосистеми и техните антени.

Целта на настоящата дисертация е да се изследват механизмите на отговор на фотосинтетичния апарат на ниво ТМ в *Solanum lycopersicum* и в *Arabidopsis thaliana* към продължително въздействие с висок светлинен интензитет в комбинация с висока или субоптимална температура.

За постигането на тази цел бяха поставени следните конкретни задачи:

1. Да се характеризират промените във фотохимичната активност на двете фотосистеми в ТМ, изолирани от растения *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, подложени на продължително (6 дневно) въздействие с висок светлинен интензитет в комбинация с висока и субоптимална температура;

2. Да се проследят промените в разпределението на енергията между двете фотосистеми и енергетичното взаимодействие между тях в резултат на няколкодневно третиране на растения *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana* с висок светлинен интензитет при висока и субоптимална температура;

3. Да се характеризират промените в кислород-отделящата система, като се определят параметрите на светкавичните кислородни добиви и първоначалното кислородно избухване в ТМ от растения *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, подложени на третиране с висок светлинен интензитет при висока и субоптимална температура;

4. Да се сравнят промените в белтъчната компонента на реакционните центрове на двете фотосистеми от *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, индуцирани от продължителното въздействие на висок светлинен интензитет при висока и субоптимална температура;

5. Да се установи до каква степен продължителното въздействие с висок светлинен интензитет на растения *Solanum lycopersicum* и при какви температури може да доведе до развитие на толерантност към фотоинхибиране *in vitro*.

МАТЕРИАЛИ и МЕТОДИ

1. Растителен материал и условия на третиране

1.1. Отглеждане на домати растения

В настоящата работа основен обект на изследване са домати растения (*Solanum lycopersicum* cv. M82). След пресаждането домати растения са отглеждани в камери (*Fytoscope 130, PSI, Brno, Czech Republic*) при оптимални за тяхното развитие условия: 16/8 часа ден/нощ фотопериод, светлинен интензитет $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR, температура 22/20°C и относителна влажност на въздуха 70%.

1.2. Третиране на домати растения

Третирания с различни комбинации от температура и светлинен интензитет (Табл. 1) са проведени с развити (5^{ти} лист) домати растения в продължение на 6 дни. Контролните растения (NT-NL) са отглеждани при оптимална температура 22/20°C и светлинен интензитет $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ до края на периода на анализа.

Табл. 1. Видове и условия на третиране на домати растения (*Solanum lycopersicum* cv. M82).

Вид третиране	Температура [°C]	Светлинен интензитет [$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$]
NT-NL	22/20	250
HT-NL	38/29	250
HT-HL	38/29	800
LT-NL	12/10	250
LT-HL	12/10	800

1.3. Отглеждане на *Arabidopsis thaliana*

Изследвания са проведени и с растения *Arabidopsis thaliana* (Col-0), които се определят като по-студенолюбиви видове в сравнение с домати. След пресаждането на *Arabidopsis*, растенията са преместени в камери за отглеждане, поддържащи оптимални условия: 16/8 часа фотопериод, светлинен интензитет $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR, температура 21/18°C и относителна влажност на въздуха 70%.

1.4. Третиране на *Arabidopsis thaliana*

След като са развили розетка (около 35-40 дни), една част от *Arabidopsis thaliana* са подложени на третиране с различни комбинации от светлинен интензитет и температура (Табл. 2), а друга част са оставени да се развиват при оптимални условия – $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR и температура 21/18°C (контрола, NT-NL).

Табл. 2. Видове и условия на третиране на *Arabidopsis thaliana*.

Вид третиране	Температура [°C]	Светлинен интензитет [$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$]
NT-NL	21/18	150
HT-NL	32/29	150
HT-HL	32/29	500
LT-NL	12/10	150
LT-HL	12/10	500

След 6 дни на третиране, растенията се връщат към оптималните им условия на развитие (NT-NL) и се възстановят в продължение на 5 дни (В-възстановяване). Листен материал за изолиране на ТМ от контролни и третирани растения се взимат в началото на всеки един експеримент (0 ден), на 2 и на 6 ден на третиране и след 5 дни на възстановяване (т.е. на 11-ден).

2. Използвани методи

2.1. Изолиране на тилакоидни мембрани

Изолирането на ТМ от листа на контролни и третирани растения (*Solanum lycopersicum* cv. M82 и *Arabidopsis thaliana* – Col-0) се провежда по метода, описан от Velitchkova и Popova (2005).

2.2. Определяне на хлорофилна концентрация

Концентрацията на Хл ($a+b$) и Кар се определя по метода на Lichtenthaler (1987), използвайки спектрофотометър Specord 210 Plus (Analytic Jena-Germany).

2.3. Определяне на фотохимичната активност на ФСII

Фотохимичната активност на ФСII се определя полярографски чрез измерване на кислородното отделяне при реакцията на Хил с помощта на Clark-електрод (модел DW1, Hansatech Instruments). Активността се определя в присъствие на екзогенен електронен акцептор 1,4-BQ.

2.4. Измерване на скоростта на електронния транспорт през ФСІ

Скоростта на електронния транспорт през ФСІ на изолирани ТМ от контролни и третирани растения е определяна чрез измерване на кислородното поглъщане при реакцията на Мелер в присъствие на екзогенни донори и акцептори.

2.5. Измерване на светкавични кислородни добиви и кислородно избухване при постоянно осветяване

Светкавичните кислородни добиви и кислородното избухване при постоянно осветяване са регистрирани с помощта на конструиран в лабораторията скоростен кислороден електрод тип – Joliot (Zeinalov 2002) и прилагане на светкавици (4J) и съответно бяла светлина с интензитет $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.6. Нискотемпературна (77K) хлорофилна флуоресценция

Спектрите на емисия и на възбуждане на хлорофилната флуоресценция на изолирани ТМ са записани с помощта на спектрофлуориметър Jobin Yvon JY3 (Division d'Instruments S.A., Longjumeau, France), снабден с приспособление за измервания в течен азот. Спектрите са обработвани с Origin 6.0.

2.7. SDS-PAGE електрофореза и Western blot

Промените в полипептидното съдържание на изолирани ТМ от контролни и третирани растения *Solanum lycopersicum* cv. M82 и *Arabidopsis thaliana* са анализирани чрез денатурираща електрофореза, проведена според Laemmli (1970) SDS-PAGE система (модифициран чрез добавянето на 4 М уреа в разделящия гел), като е използван апарат за вертикална електрофореза Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, CA). Проявените мембрани се сканират, записват се в TIFF формат и математически интерпретират (%) чрез денситометричен анализ с помощта на Phoretix софтуер (Phoretix International, Newcastle upon Tyne, UK).

2.8. Фотоинхибиране in vitro

Фотоинхибирането на изолирани ТМ от контролни (NT-NL) и третирани (в период от 6 дни) домати растения (NT-HL, HT-NL, HT-HL) с висок светлинен интензитет, се провежда при стайна температура (22°C). Повърхността на суспензия от изолирани ТМ в буфер се осветява с бяла светлина $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ при непрекъснато разбъркване в продължение на 1 ч. Като източник на светлина са използвани LED диоди. Проби за анализ са взимани на 0, 20, 40 и 60 мин на експеримента и се измерват веднага след третирането.

2.9. Статистическа обработка на резултатите

Данните от проведените изследвания са представени като средна стойност $\pm$ стандартната грешка (SE) от поне три независими експеримента с няколко повторения. За оценка на статистическата достоверност на наблюдаваните разлики между сравняваните стойности е използван Student *t* – test. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$).

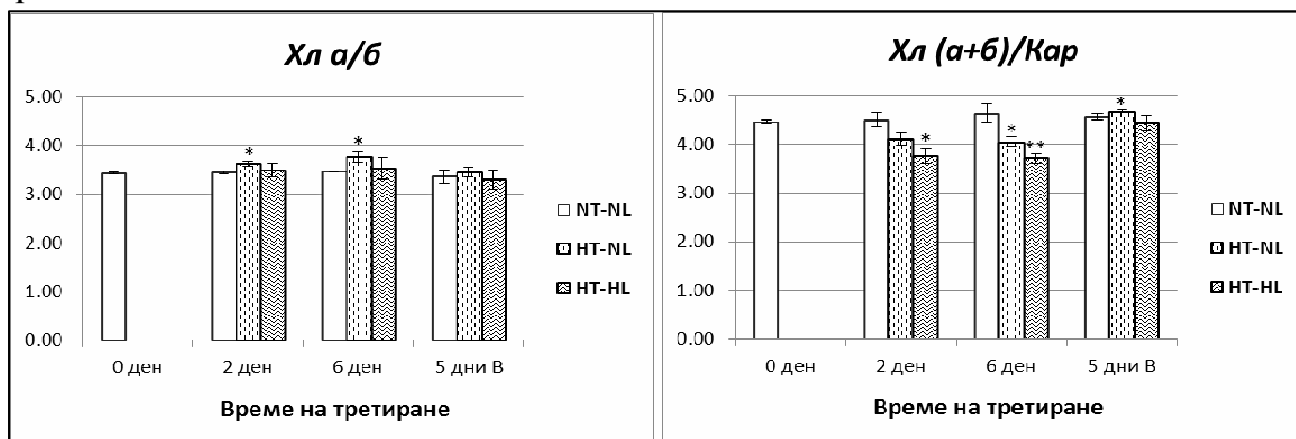
РЕЗУЛТАТИ

1. Отговор на фотосинтетичния апарат на *Solanum lycopersicum* към комбинирано въздействие на висок светлинен интензитет и висока или субоптимална температура

1.1. Промени във функционалната активност, енергетичното разпределение и белтъчния профил на двете фотосистеми при висока температура и при комбиниране на високия светлинен интензитет с висока температура

1.1.1. Промени в пигментния състав

При домати растения, третирани с висока температура (38/29°C) в продължение на 6 дни, се регистрира слабо увеличение на отношението Хл *a/b* (поради по-изявено намаление на Хл *b*), докато комбинираното действие на високия светлинен интензитет (800 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) с висока температура (38/29°C) не води до съществени промени в това отношение в периода на третиране (Фиг. 1). На същата фигура са представени и регистрираните промени в общото съдържание на хлорофилите спрямо каротеноидите за контролни и третирани домати растения. Данните показват, че съществено намаление в отношението Хл (*a+b*)/Кар се наблюдава при растения, отглеждани при висок светлинен интензитет и висока температура, поради по-голямото намаление на общото съдържание на Хл и предимно на Хл *b*, като тези стойности се връщат до стойността на 0 ден след периода на възстановяване.

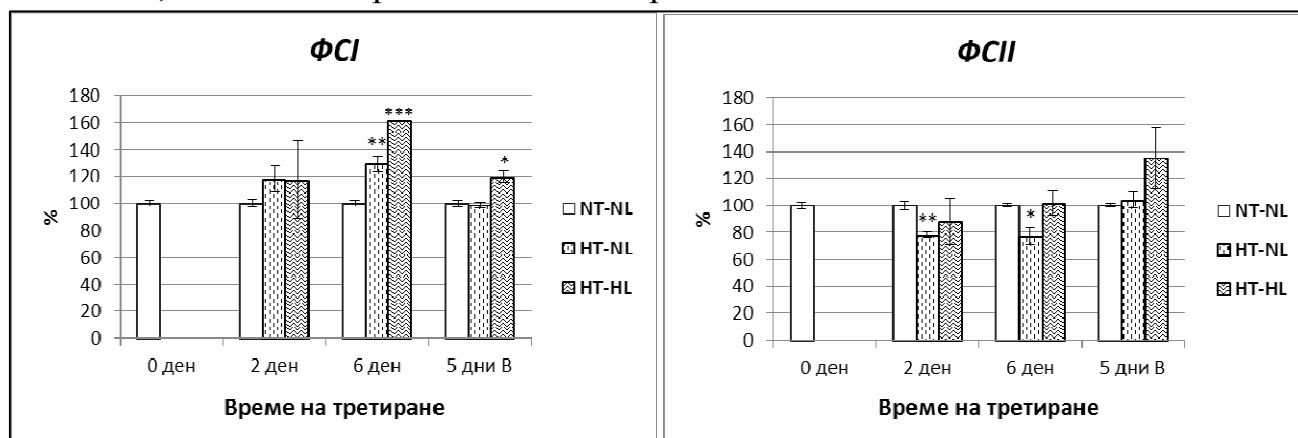


Фиг. 1. Влияние на високата температура (НТ) самостоятелно и на високата температура, съчетана с висок светлинен интензитет (НТ-НЛ) върху отношението Хл *a/b* и на общия хлорофил/каротеноиди.

1.1.2. Фотохимична активност на двете фотосистеми

Представените данни на фиг. 2 показват, че независимо дали доматените растения са отглеждани само под влиянието на НТ или под комбинираното действие на висока температура и висока светлина, ФСІ се стимулира значително (с около 30% за НТ-НЛ и 60% за НТ-НЛ на 6-ти ден). Това стимулиране е по-изявено на 6 ден при НТ-НЛ. Както може да се очаква, инхибиране се наблюдава при активността

на ФСII (Фиг. 2), която е особено чувствителна към високи температури, но трябва да се отбележи, че при третиране с висока температура и висок светлинен интензитет, това инхибиране се компенсира почти напълно на 6-ти ден.



Фиг. 2. Данни за фотохимичната активност на ФСI и ФСII при контролни (NT-NL) и третирани домати растения M82 (HT-NL, HT-HL). Резултатите са изразени като процент от стойността в началото на всички експерименти. 100% за ФСI отговарят на $503.248 \mu\text{molO}_2 \text{mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{h}^{-1}$. 100% за ФСII отговарят на $98.355 \mu\text{molO}_2 \text{mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{h}^{-1}$.

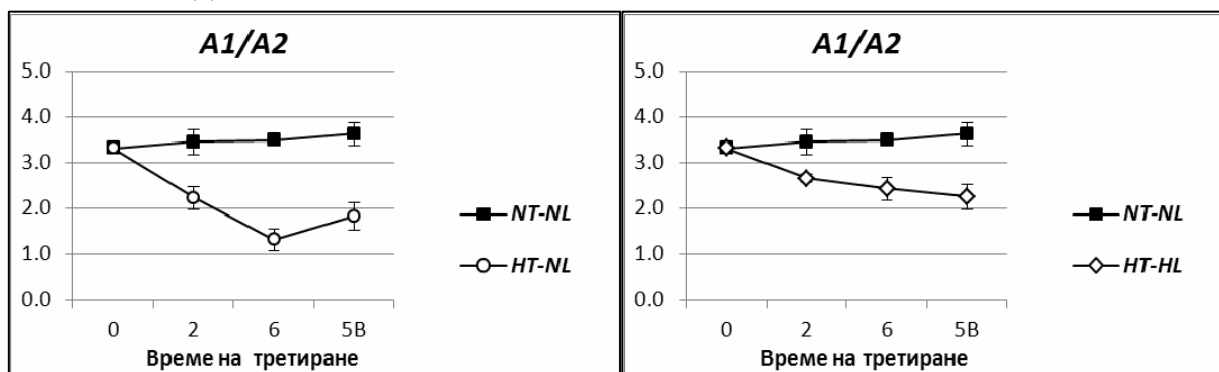
1.1.3. Промени във функционалността на кислород-отделящата система

При доматените растения, отглеждани при оптимални условия, стойностите на светкавичните кислородни добиви, на α и β се запазват в шестдневния период и последващото възстановяване. Стойностите за Y_3 (%) намаляват за ТМ, изолирани от третирани с НТ и НТ-НЛ *Solanum lycopersicum*. Тук трябва да се отбележи, че за растенията при НТ-НЛ инхибирането както на 2 ден, така и на 6 ден, е по-слабо изразено в сравнение с растения, третирани при висока температура и оптимален светлинен интензитет – НТ-НЛ. След 5В при третираните домати растения има повишение в стойностите за Y_3 , по-силно изразено за тези, които са отглеждани при НТ-НЛ (Табл. 3).

Табл. 3. Параметри на КОС за домати растения M82, отглеждани при NT-NL, HT-NL и HT-HL.

<i>Solanum lycopersicum</i>					
		Дни на третиране			
Вид третиране	Параметри	0	2	6	5В
NT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 1.05	99.12 ± 1.23	102.97 ± 2.55	105.95 ± 2.98
	α	0.337 ± 0.062	0.360 ± 0.027	0.385 ± 0.013	0.335 ± 0.031
	β	0.042 ± 0.014	0.029 ± 0.008	0.036 ± 0.010	0.050 ± 0.011
HT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 1.05	64.40 ± 4.21 **	54.51 ± 3.98 ***	79.85 ± 5.24 *
	α	0.337 ± 0.062	0.493 ± 0.050	0.626 ± 0.023 *	0.421 ± 0.082
	β	0.042 ± 0.014	0.101 ± 0.019	0.155 ± 0.063	0.137 ± 0.031 *
HT-HL	Y_3 (%)	100.00 ± 1.05	76.99 ± 3.71 **	78.27 ± 1.38 ***	88.49 ± 2.83 *
	α	0.337 ± 0.062	0.452 ± 0.018	0.437 ± 0.044	0.400 ± 0.015
	β	0.042 ± 0.014	0.095 ± 0.030	0.102 ± 0.027	0.081 ± 0.034

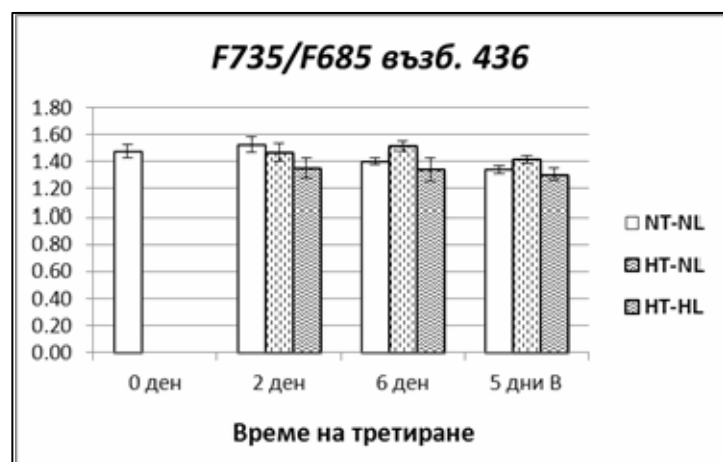
На фиг. 3 са представени отношенията на амплитудите A_1/A_2 , съответно на бързата спрямо бавната компонента. Това отношение дава информация за относителното участие на бързи и бавни центрове в регистрираното кислородно избухване и съответно за инхибирането на повече или по-малко на едните или другите центрове при прилаганите третираня. Намалването на отношението е най-силно изразено на 6 ден при домати растения, третирани само с висока температура, което показва преференциално инхибиране на ФСIIα центровете и/или модифицирането им, при което те работят по-бавно. След 5 дни при оптимални условия се наблюдава слабо възстановяване.



Фиг. 3. Отношението на амплитудите на бързата и бавната компоненти от контролни (NT-NL) и третирани с висока температура (HT), и с комбинираното действие на висока температура и висока светлина (HT-HL) домати растения М82. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експерименти, всеки в четири повторения.

1.1.4. Промени в разпределението на възбуждащата енергия и енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми

На базата на анализ на флуоресцентните спектри при 77K бяха изчислени отношенията $F735/F685$, даващи информация за енергетичното разпределение между двете фотосистеми и взаимодействието между тях. Представените данни на фиг. 4 са за флуоресцентните отношения $F735/F685$ при възбуждане с $\lambda=436$ нм (възбуждащи преимуществено Хл а).

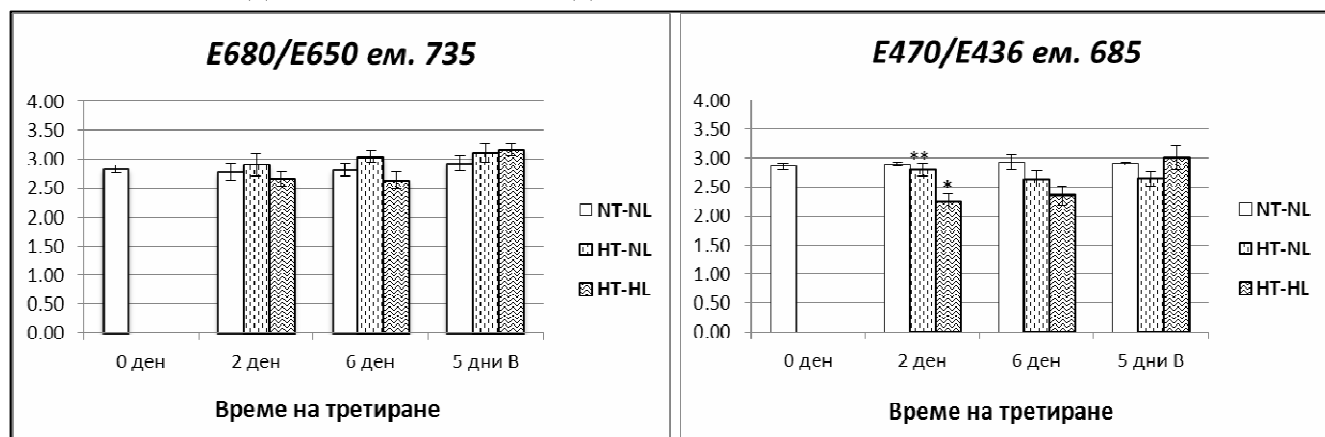


Фиг. 4. Стойностите на отношението $F735/F685$ при възбуждане с $\lambda=436$ нм за ТМ, изолирани от контролни (NT-NL) и третирани домати растения: само с висока температура (HT-NL) и такива, които са третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения.

Данните показват, че промените в енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми са минимизирани при комбинирането на висока температура с висок светлинен интензитет.

Спектрите на възбуждане на флуоресценцията при 735 нм и 685 нм бяха анализирани, за да се прецени участието на Хл *a* и Хл *b* в енергетичното снабдяване на ФСI и ФСII. На фиг. 5 са показани стойностите на отношението E680/E650 при 735 нм и E470/E436 при 685 нм за контролни NT-NL и третирани домати растения, съответно при HT-NL и HT-HL. При растения, отглеждани при висока температура, се регистрира слабо повишение на отношението E680/E650 на 2, 6 ден и след 5 дни на възстановяване, докато при действието на двата стрес фактора (HT-HL) има леко намаление на 2 и 6 ден, което не е статистически достоверно, въпреки че се запазва като тенденция при всички експерименти.

Отношението E470/E436 при емисия 685 (Фиг. 5) намалява за *Solanum lycopersicum* и при двата третирания, което е признак за относително намаляване на участието на молекулите Хл *b* в енергетичното обезпечаване на ФСII в сравнение с Хл *a*. Намалението в отношението е много по-значително за растенията, отглеждани при HT-HL в сравнение с растенията при HT-NL. Въпреки това стойностите за растенията, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет, достигат възстановяване до стойностите от 0 ден.

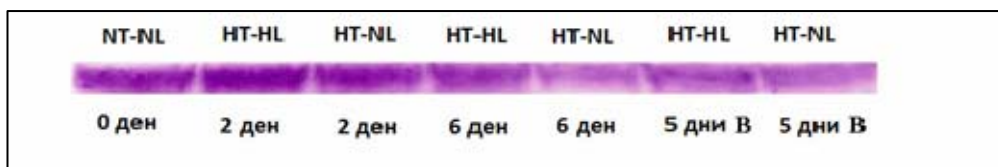


Фиг. 5. Стойностите на отношението E680/E650 при 735 нм (флуоресценция, излъчвана от ФСI) и E470/E436 при 685 нм (флуоресценция, излъчвана от ФСII) за контролни (NT-NL) и третирани съответно с висока температура (HT-NL), и с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL) домати растения.

1.1.5. Анализ на белтъчната компонента на реакционните центрове на двете фотосистеми

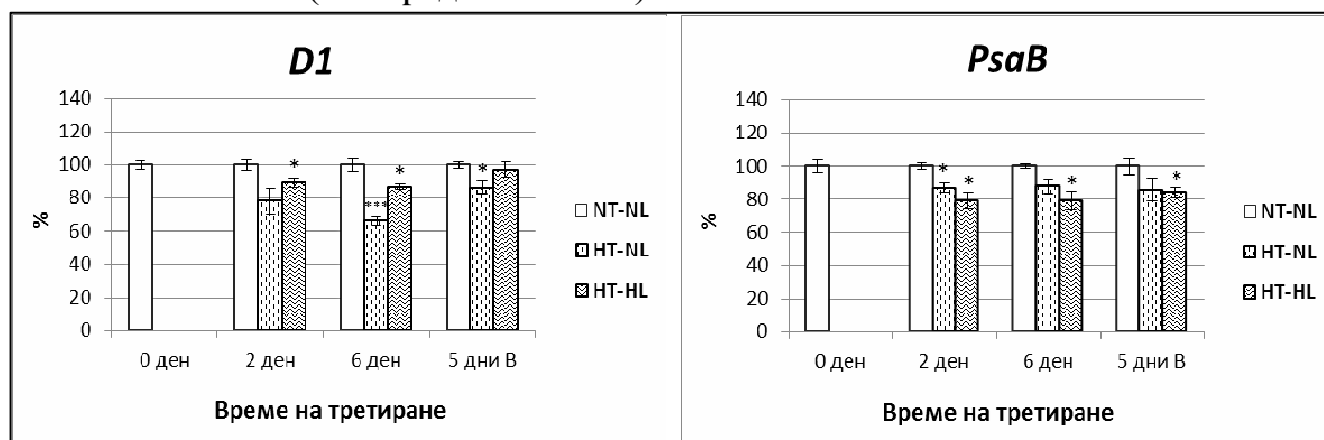
За да проверим дали и до каква степен няколкодневното отглеждане на *Solanum lycopersicum* при висока температура и при висока температура с висок светлинен интензитет повлиява популациите от двете фотосистеми, бяха проведени изследвания върху съдържанието на избрани белтъци от реакционните центрове на двете фотосистеми. За целта използвахме антитела за следните белтъци – D1 на ФСII и PsbV на ФСI.

Данните за промените в количеството на D1 и PsaB са представени на фиг. 7. При растения, третирани с висока температура, се наблюдава намаление на D1 на 2 ден (22%), което се запазва и на 6 ден (34%). Намалението на D1 за растения, отглеждани при HT-NL е сравнително по-малко (около 13% на 6 ден), а след пет дни на възстановяване при оптимални условия се регистрират стойности, близки до тези на контролните растения.



Фиг. 6. Промени в количеството на белтъците D1 при домати растения M82 под влияние на високата температура на отглеждане (HT-NL) и при комбинираното действие на висока температура и висока светлина (HT-HL) в период от 6 дни. На стартовете са нанесени равни обеми (20 μ l) от тилакоидните мембрани, еквивалентни на 4.5 μ g/ml хлорофил.

Съдържанието на PsaB в ТМ, изолирани от домати растения, отглеждани при HT-NL е с около 14% по-малко на 2 ден и с около 12% по-малко на 6 ден. При растения, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL), се наблюдава същата тенденция на намаляване на количеството на PsaB (Фиг. 7), но в по-голяма степен (от порядъка на 20%).



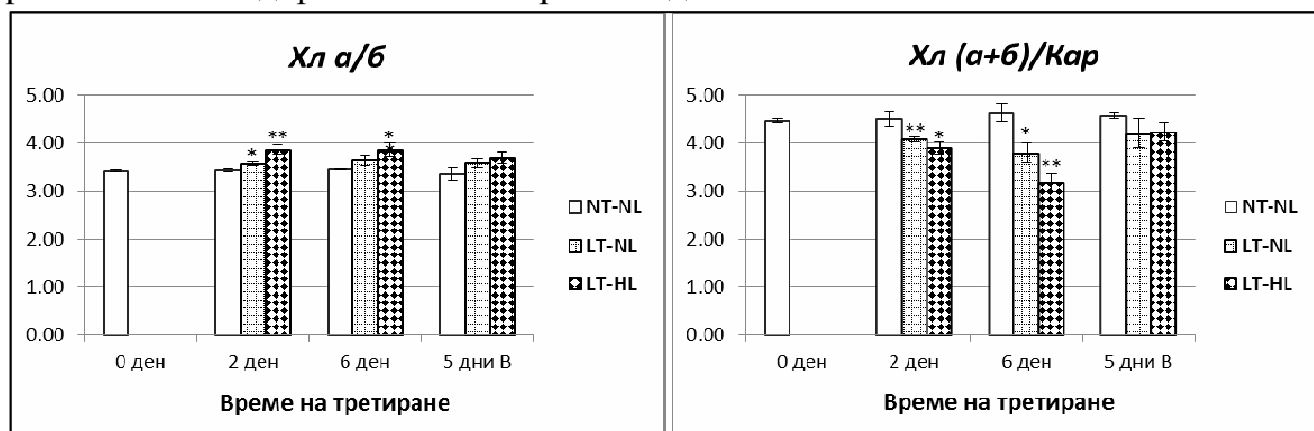
Фиг. 7. Промени в количеството на белтъците D1 и PsaB при домати растения M82 под влияние на високата температура на отглеждане (HT-NL) и при комбинираното действие на висока температура и висока светлина (HT-HL) в период от 6 дни и последващо възстановяване. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 3 паралелни повторения. За 100% е приета стойността при тилакоидните мембрани, изолирани от контролните растения – NT-NL.

1.2. Промени във функционалната активност, енергетичното разпределение и белтъчния профил на двете фотосистеми при субоптимална температура и при комбиниране на високия светлинен интензитет със субоптимална температура

1.2.1. Промени в пигментния състав

На фиг. 8 са представени данните за отношенията Хл а/б и на общия хлорофил спрямо каротеноиди. Данните показват увеличение на отношението Хл а/б и при

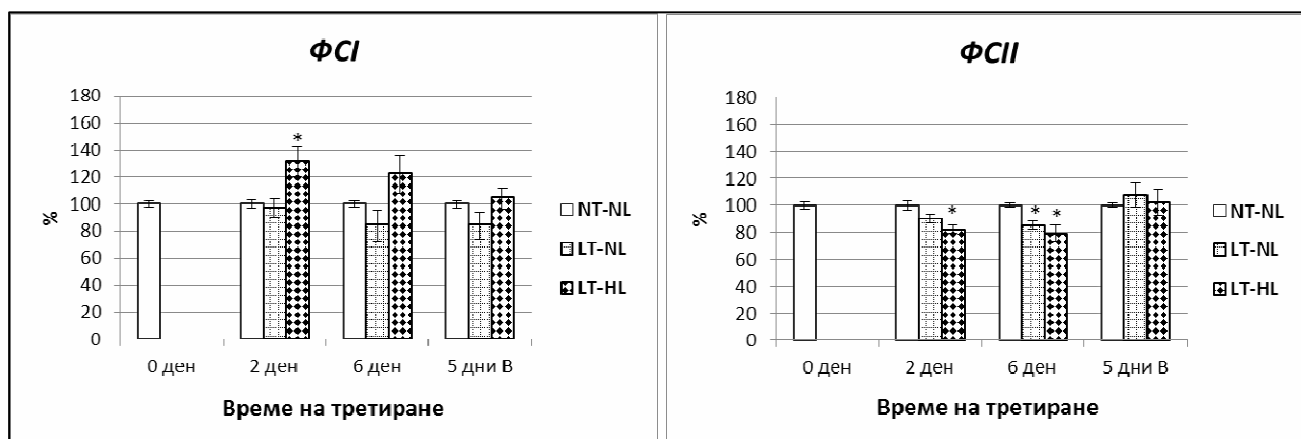
двете третириания (LT-NL, LT-HL), което е по-силно изразено при двойния стрес. Отношението $X_l a/b$ нараства поради относително по-значимо намаление на $X_l b$ в сравнение с $X_l a$. При LT-HL отношението $X_l (a+b)/\text{Кар}$ е по-ниско на шестия ден, което е свързано с по-съществено намаление на количеството на хлорофилите в сравнение със съдържанието на каротеноидите.



Фиг. 8. Промени в пигментното съдържание на ТМ от домати растения М82, третириани при субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет и при субоптимална температура и висок светлинен интензитет, в продължение на 6 дни и след 5В при оптимални условия.

1.2.2. Фотохимична активност на двете фотосистеми

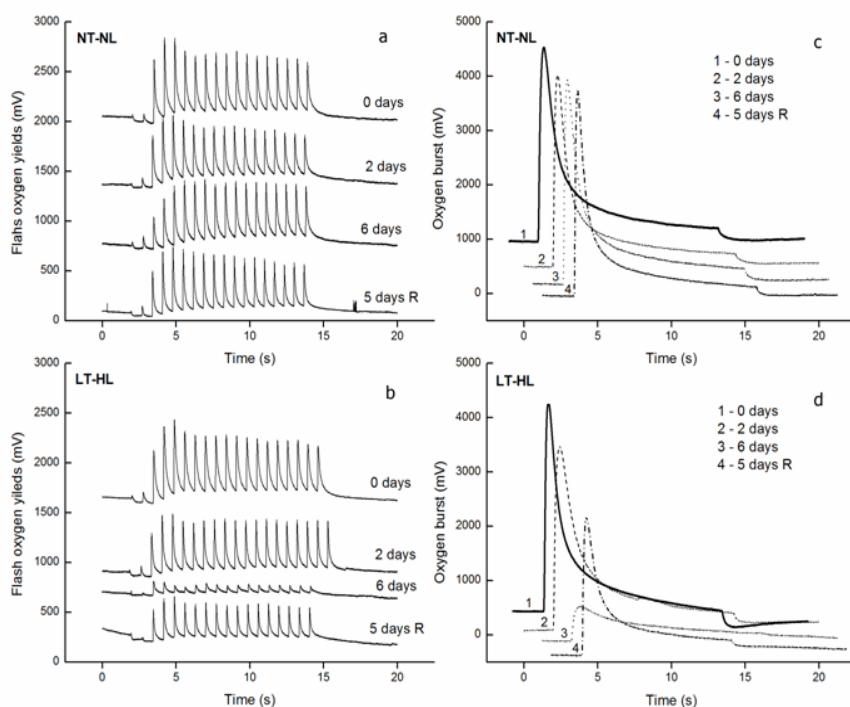
На фиг. 9 са представени данни за фотохимичната активност на ФСІ и ФСІІ на домати растения, отглеждани при LT-NL и при LT-HL. Скоростта на електронния поток през ФСІ намалява след 6 дни при субоптимална температура (LT), докато при LT-HL се наблюдава по-висока активност на ФСІ. Комбинираното действие на LT с HL води до инхибиране на електронния транспорт през ФСІІ (с около 20% на 2-рия и 6-тия ден). Данните показват, че след 5В, активността на ФСІ при LT-NL не се възстановява напълно, докато активността на ФСІІ и при двата вида третириани растения достига стойности, характерни за растения, отглеждани при оптимални условия.



Фиг. 9. Фотохимична активност на ФСІ и ФСІІ при домати растения М82 на 0, 2-ри и 6-ти ден, третириани със субоптимална температура (LT-NL) и такива, които са третириани в комбинация с висок светлинен интензитет (LT-HL) и след 5В при оптимални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента, всеки с четири повторения, представени в проценти. 100% за ФСІ отговарят на $503.248 \mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{ h}^{-1}$. 100% за ФСІІ отговарят на $98.355 \mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{ h}^{-1}$.

1.2.3. Промени във функционалността на кислород-отделящата система

За определяне измененията в кислород-отделящата система в тилакоидни мембрани, изолирани от листа на растения, отглеждани 2 и 6 дни при субоптимална температура и в комбинация с висок светлинен интензитет, бяха определени светкавичните кислородни добиви и параметрите на кислородното избухване при постоянно осветяване в отсъствие на екзогенни електронни донори. На фиг. 10 са показани типични записи на добивите от светкавици и на постоянно осветяване.



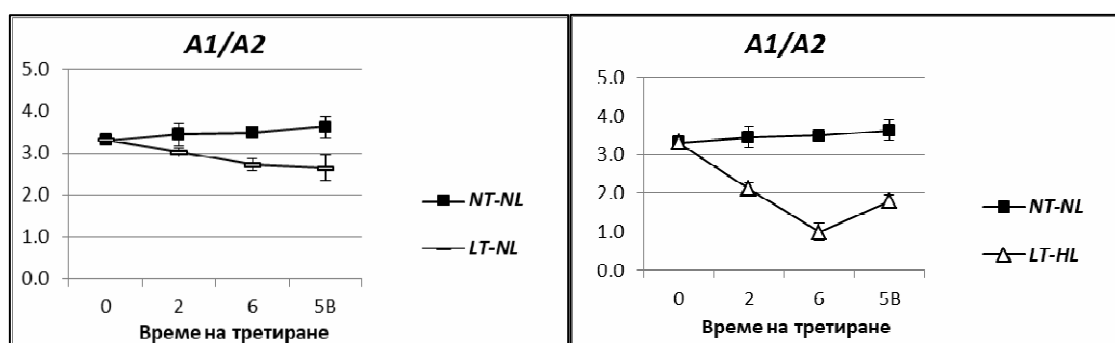
Фиг. 10. Експериментални трасета на светкавични кислородни добиви (a и b) и на кислородно избухване при постоянно осветяване (c и d) на изолирани тилакоидни мембрани от растения, отглеждани при NT-NL (a и c) и при LT-HL (b и d).

При проведените експерименти установихме, че отглеждането на растенията при субоптимална температура (12/10°C) води до намалението на светкавичните кислородни добиви (Табл. 4 – с около 18% за 2-ри ден и с 15% на 6-ти ден). Най-голямо намаление на Y_3 (%) обаче се наблюдава при субоптимална температура в комбинация с висок светлинен интензитет (800 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) на шестия ден (около 41%) при третираните растения (LT-HL). При условия на LT-NL и LT-HL стойностите на пропуснатите и двойните удари показват тенденция към нарастване. И при двата вида растения не се достига възстановяване до стойностите от 0 ден.

Намаляването на отношението A_1/A_2 (Фиг. 11) показва, че бавните компоненти се увеличават за сметка на бързите в хода на третирането със субоптимална температура и висок светлинен интензитет, което корелира с по-високата чувствителност на бързите кислород-отделящи центрове, разположени в граните, което се вижда от силното инхибиране на светкавичните добиви (Фиг. 10).

Табл. 4. Параметри на КОС за домати растения М82, отглеждани при субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет (LT-NL) и при комбинирането на субоптимална температура и висока светлина (LT-HL). Кислородните добиви са изчислени в проценти спрямо контролните проби от 0 ден. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$).

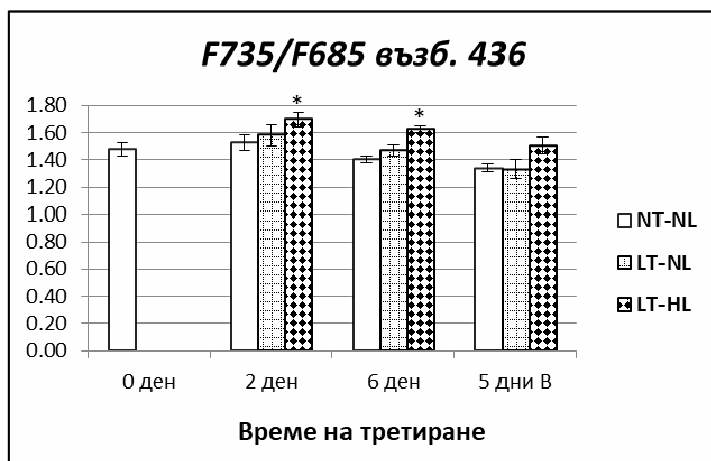
<i>Solanum lycopersicum</i>					
		Дни на третиране			
Вид третиране	Параметри	0	2	6	5В
NT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 1.05	99.12 ± 1.23	102.97 ± 2.55	105.95 ± 2.98
	α	0.337 ± 0.062	0.360 ± 0.027	0.385 ± 0.013	0.335 ± 0.031
	β	0.042 ± 0.014	0.029 ± 0.008	0.036 ± 0.010	0.050 ± 0.011
LT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 1.05	82.05 ± 6.16 *	84.72 ± 2.44 **	90.81 ± 2.28 *
	α	0.337 ± 0.062	0.370 ± 0.055	0.416 ± 0.086	0.279 ± 0.080
	β	0.042 ± 0.014	0.065 ± 0.028	0.103 ± 0.042	0.082 ± 0.033
LT-HL	Y_3 (%)	100.00 ± 1.05	73.31 ± 1.54 ***	50.93 ± 4.43 ***	67.96 ± 4.71 **
	α	0.337 ± 0.062	0.425 ± 0.053	0.548 ± 1.150	0.460 ± 0.044
	β	0.042 ± 0.014	0.099 ± 0.034	0.136 ± 0.040	0.106 ± 0.025



Фиг. 11. Отношението на амплитудите на бързата и бавната компоненти от контролни (NT-NL) и третирани със субоптимална температура (LT), и с комбинираното действие на субоптимална температура и висока светлина (LT-HL) домати растения М82. Средните стойности ± SE са изчислени от 3 независими експеримента с 4 паралелни повторения.

1.2.4. Промени в разпределението на възбуждащата енергия и енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми

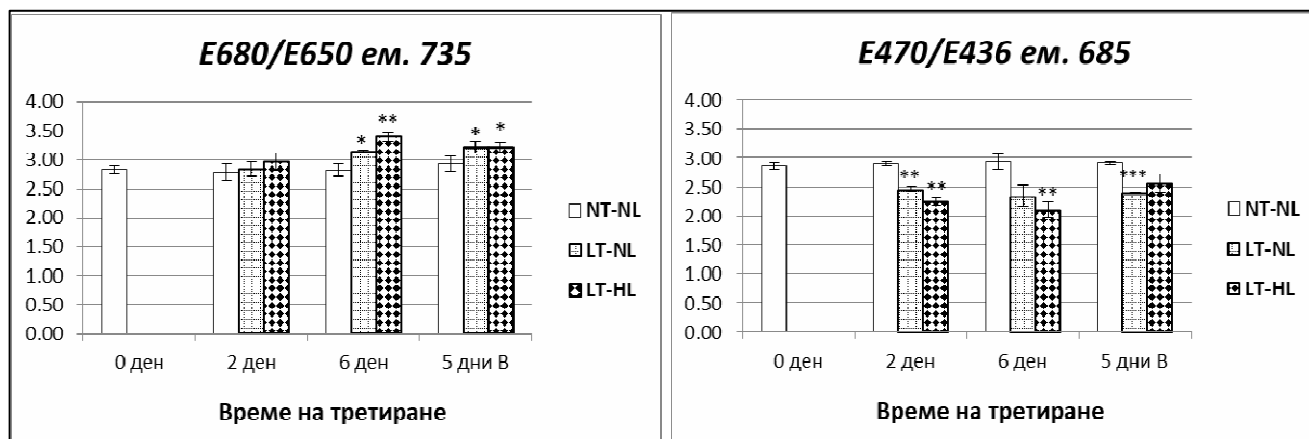
На фиг. 12 са представени данни за отношенията F735/F685, при възбуждане с дължина на вълната $\lambda=436$ нм, на изолирани ТМ от домати растения, третирани със субоптимална температура в комбинация с оптимален и с висок светлинен интензитет. При LT-HL отношението F735/F685 се покачва, което показва, че има преразпределение на възбуждащата енергия към ФСІ. Тази промяна отразява или по-високо енергетично снабдяване на ФСІ и/или гасене на флуоресценцията при 685 нм, тъй като инхибирани центрове на ФСІІ могат да действат като гасители. След 5В при оптимални условия данните на F735/F685 при домати, третирани с LT имат стойности, близки до тези на контролните растения, докато при LT-HL отношението остава по-високо.



Фиг. 12. Стойностите на отношението $F735/F685$ при възбуждане с $\lambda=436$ нм за ТМ, изолирани от контролни (NT-NL) и третирани само със субоптимална температура (LT-NL), и с едновременно действие на субоптимална температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) домати растения M82.

На фиг. 13 са представени стойностите на отношението $E680/E650$ при 735 нм и $E470/E436$ при 685 нм за контролни NT-NL и третирани домати растения, съответно при LT-NL и LT-HL. Отношението $E680/E650$ при емисия 735 се увеличава и при двете третирания (от 2.83 на 0-вия ден до 3.13 на 6-тия ден при LT-NL и до 3.40 на 6-тия ден при LT-HL), което отразява намалено участие на молекули Хл *b* в енергетичното снабдяване на ФСІ, най-вероятно свързано с намаление на антената и/или намален пренос на енергия от ССКІІ към ФСІ.

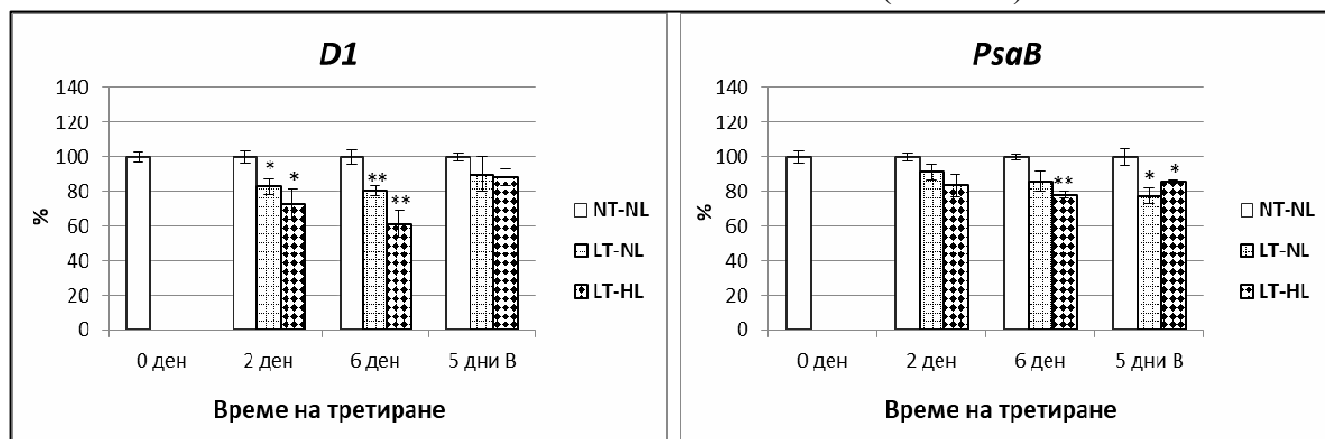
За емисия при 685 нм отношението $E470/E436$ намалява (от 2.85 на 0-вия ден до 2.34 на 6-тия ден при LT-NL и до 2.10 на 6-тия ден при LT-HL), което също отразява намалено участие на Хл *b*, но този път във възбуждането на ФСІІ. Промените в тези отношения са признак за намаляване на капацитета на светосъбиране на фотосинтетичния апарат при силен стрес.



Фиг. 13. Стойностите на отношението $E680/E650$ при 735 нм (флуоресценция, излъчвана от ФСІ) и на отношението $E470/E436$ при 685 нм (флуоресценция, излъчвана от ФСІІ) за контролни (NT-NL) и третирани съответно със субоптимална температура (LT-NL), и субоптимална температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) домати растения. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$).

1.2.5. Анализ на белтъчната компонента на реакционните центрове на двете фотосистеми

Чрез електрофореза и последващ Western blot бяха проследени промените в белтъците на реакционните центрове на ФСІ (PsaB) и ФСІІ (D1). При ТМ от растения, отглеждани при LT-NL, D1 намалява с около 18% на 6 ден, а при комбинираното действие на LT с HL – с около 39% на 6 ден. В периода на 5В съдържанието на D1 до голяма степен се възстановява. При количеството на PsaB се регистрира известно намаление и при двата вида третирания, но в по-малка степен. Този белтък от реакционния център на ФСІ не се възстановява напълно след 5 дни при оптимални условия, което отговаря на схващането, че повредите във ФСІ се възстановяват много по-бавно и почти никога напълно (Фиг. 14).



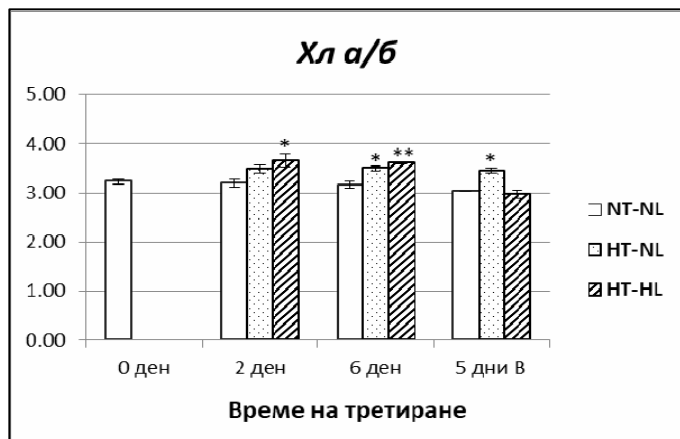
Фиг. 14. Промени в количеството на белтъците D1 и PsaB при ТМ, изолирани от домати растения М82, отглеждани за 6 дни при LT-NL и при LT-HL и след 5 дни на възстановяване при оптимални условия. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 3 паралелни повторения. За 100% е приета стойността при ТМ, изолирани от контролни домати растения – NT-NL.

2. Отговор на фотосинтетичния апарат на *Arabidopsis thaliana* на комбинирано въздействие на температурен и светлинен стрес

2.1. Промени във функционалната активност, енергетичното разпределение и белтъчния профил на двете фотосистеми при висока температура и при комбиниране на високия светлинен интензитет с висока температура

2.1.1. Промени в пигментния състав

Отношението Хл *a/b* на 2-рия и 6-тия ден при NT-NL и NT-HL се увеличава, като това увеличение е по-значително при двойния стрес (Фиг.15). Нарастването на отношението Хл *a/b* при третираните растения *Arabidopsis thaliana* се дължи на по-голямото намаление в количеството на Хл *b* в сравнение с количеството на Хл *a*. При третираните само с висока температура растения, след 5 дни на възстановяване, отношението Хл *a/b* остава по-високо спрямо 0 ден. За сравнение, същото отношение за растения, които са отглеждани при наличието на висока температура и висок светлинен интензитет, се възстановява напълно.

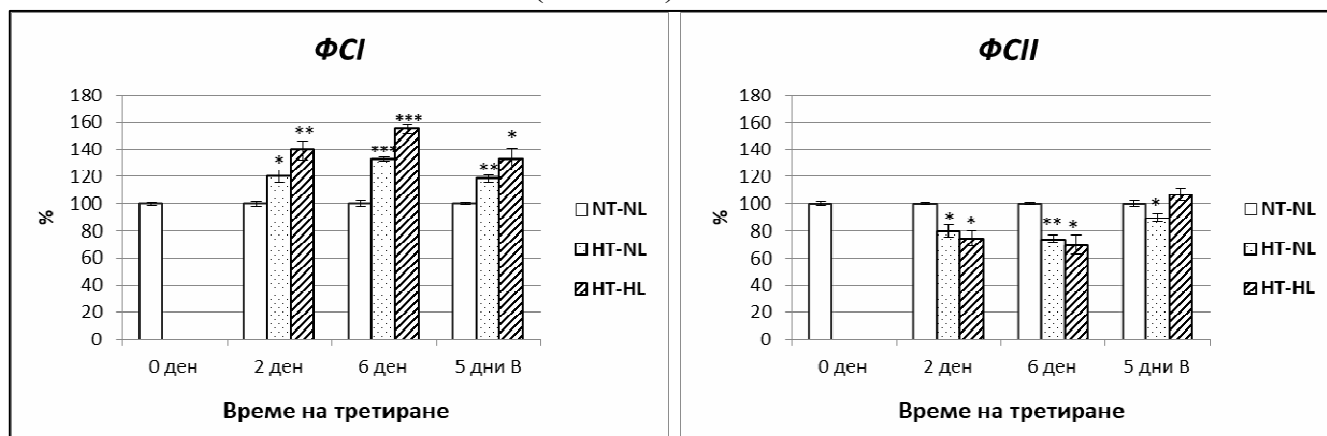


Фиг. 15. Промени в пигментното съдържание на ТМ от *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при HT-NL и HT-HL за 6 дни на третиране и след 5В при оптимални условия (NT-NL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от три независими експеримента с четири паралелни повторения. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$).

2.1.2. Фотохимична активност на двете фотосистеми

В отговор на третирането на растенията *Arabidopsis thaliana* с HT-NL и HT-HL активността на ФСІ се повишава съществено, подобно на доматените растения, като това повишение при HT-HL е с около на 40% на втория ден и около 55% на шестия ден (Фиг. 16). След 5 дни на възстановяване при оптимални условия, при растения, третирани с HT-NL, активността на ФСІ намалява (от 133% на 6-тия ден до 118% след 5В), но не спада до нивата отпреди третирането. При растения, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL), се наблюдава същата тенденция, като скоростта на електронния транспорт през ФСІ след 5В остава по-голяма (132%) спрямо тази на HT-NL (118%).

При отглеждане на *Arabidopsis thaliana* при висока температура и при комбинираното действие на висока температура и висока светлина, ФСІІ се инхибира значително на 6-тия ден, с около 26% при HT-NL и с около 30% при HT-HL. След пет дни на възстановяване при оптимални условия, за растения, третирани с HT-HL, се регистрират стойности на ФСІІ, близки до тези на контролните растения, докато за растения *Arabidopsis thaliana*, третирани при HT-NL, стойностите на ФСІІ са по-ниски (Фиг. 16).



Фиг. 16. Данни за фотохимичната активност на ФСІ и ФСІІ при контролни (NT-NL) и третирани растения *Arabidopsis thaliana* (HT-NL, HT-HL). Данните са изразени като процент от средната стойност на нулевите дни при контролните растения. 100% за ФСІ отговарят на $288.351 \mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{ h}^{-1}$. 100% за ФСІІ отговарят на $62.404 \mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{ h}^{-1}$.

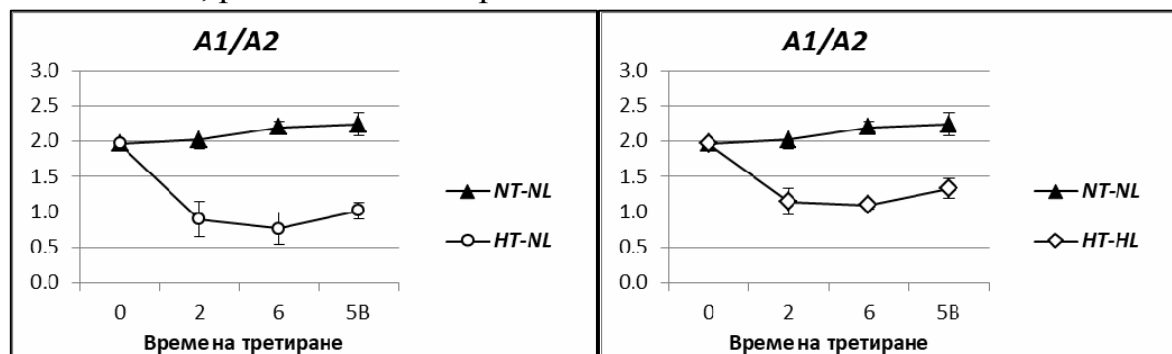
2.1.3. Промени във функционалността на кислород-отделящата система

В табл. 5 са представени стойностите на светкавичните кислородни добиви, изчислени в проценти спрямо контролните проби, и стойностите на пропуснатите и двойните удари, при третиране на растенията *Arabidopsis thaliana* с висока температура (HT-NL), и с висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL).

Табл. 5. Параметри на КОС за *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при контролни условия (NT-NL), висока температура (HT-NL) и при висока температура и висок светлинен интензитет (HT-HL).

<i>Arabidopsis thaliana</i>					
Вид третиране	Параметри	Дни на третиране			
		0	2	6	5B
NT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 0.71	104.11 ± 1.85	103.71 ± 2.67	101.92 ± 3.93
	α	0.400 ± 0.023	0.363 ± 0.025	0.404 ± 0.002	0.359 ± 0.041
	β	0.022 ± 0.001	0.045 ± 0.028	0.052 ± 0.011	0.030 ± 0.013
HT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 0.71	67.89 ± 6.05 **	42.30 ± 3.78 ***	72.91 ± 3.14 **
	α	0.400 ± 0.023	0.477 ± 0.040	0.490 ± 0.047	0.516 ± 0.017 *
	β	0.022 ± 0.001	0.102 ± 0.031	0.161 ± 0.055	0.116 ± 0.025 *
HT-HL	Y_3 (%)	100.00 ± 0.71	63.68 ± 2.24 ***	51.63 ± 5.86 **	78.63 ± 0.29 ***
	α	0.400 ± 0.023	0.455 ± 0.040	0.485 ± 0.013 *	0.485 ± 0.030
	β	0.022 ± 0.001	0.104 ± 0.030	0.139 ± 0.038 *	0.092 ± 0.032

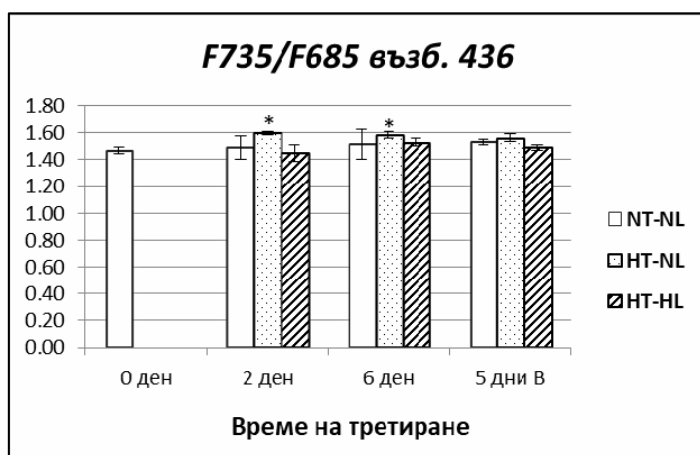
На фиг. 17 са представени промените, които настъпват в отношенията на амплитудите A_1/A_2 при растения *Arabidopsis thaliana*, третирани с висока температура и такива, третирани с комбинация на висока температура с висок светлинен интензитет. При двата вида третирания отношенията на амплитудите на бързата спрямо бавната компонента намаляват с дните на третиране, като това намаление е по-силно изразено при растения, третирани само с висока температура (HT-NL), което показва по-силно инхибиране и/или модифициране на по-бързите центрове ФСII α , разположени в граните.



Фиг. 17. Отношението на амплитудите на бързата и бавната компоненти от контролни (NT-NL) и третирани с висока температура (HT), и с комбинираното действие на висока температура и висока светлина (HT-HL) растения на *Arabidopsis thaliana*.

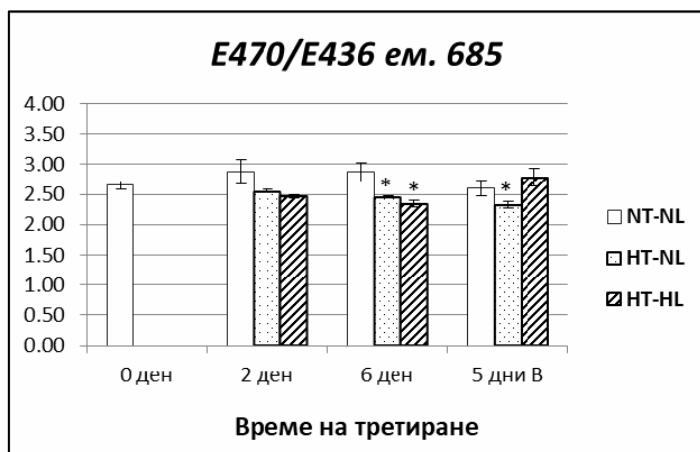
2.1.4. Промени в разпределението на възбуждащата енергия и енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми

На фиг. 18 са представени стойностите на флуоресцентните отношения $F735/F685$ за ТМ, изолирани от *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при висока температура и оптимален светлинен интензитет (НТ-NL) и такива, третирани с висока температура и висок светлинен интензитет (НТ-HL). По отношение на действието само на високата температура, получените резултати за *Arabidopsis thaliana* показват различия в сравнение с тези при доматените растения, третирани по аналогичен начин. При *Arabidopsis thaliana* се наблюдава съществено повишение на отношението $F735/F685$ на 2-рия и 6-тия ден на третиране при условия на НТ-NL спрямо стойността на контролните растения (0 ден), което по време на 5В се възстановява. Данните от $F735/F685$ за *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при комбинираното действие на висока температура и висока светлина в период от 6 дни показват, че не се наблюдават значителни промени в разпределението на енергията между двете фотосистеми.



Фиг. 18. Стойностите на отношението $F735/F685$ при възбуждане с $\lambda=436$ нм за тилакоидни мембрани, изолирани от контролни (NT-NL) и третирани растения *Arabidopsis thaliana* – в условия НТ-NL или НТ-HL.

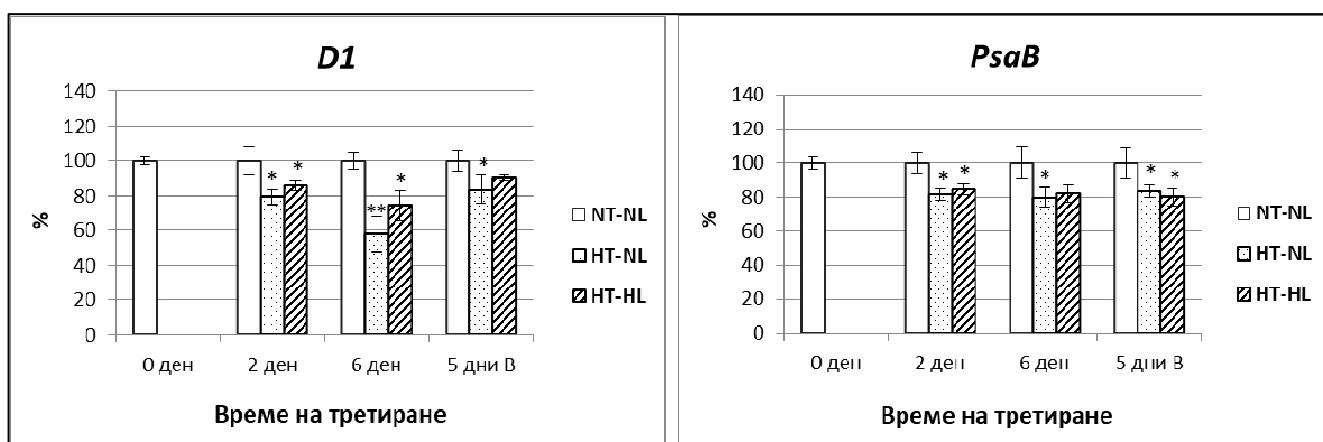
Отношението $E470/E436$ при емисия 685 (ФСII) намалява при НТ-NL и НТ-HL, както на втория, така и на шестия ден на третирането, като при НТ-HL след 5 дни при оптимални условия се наблюдават стойности, съответстващи на контролните растения на 0 ден (Фиг. 19).



Фиг. 19. Стойностите на отношението $E470/E436$ при 685 нм (флуоресценция, излъчвана от ФСII) за контролни (NT-NL) и третирани съответно с висока температура (НТ-NL), и с висока температура и висок светлинен интензитет (НТ-HL) растения *Arabidopsis thaliana*.

2.1.5. Анализ на белтъчната компонента на реакционните центрове на двете фотосистеми

На фиг. 20 са представени промените в съдържанието на белтъците D1 и PsaB в растения *Arabidopsis thaliana* при действието на висока температура и при растения, третирани с висока температура в комбинация с висок светлинен интензитет. При двата вида стрес по време на третиране D1 белтъка намалява, най-драстично при HT-NL – с около 40% на шестия ден, а след 5 дни при оптимални условия се наблюдава известно възстановяване, но не напълно. Трябва да се отбележи, че намалението на D1 е по-малко при растенията, третирани с висока температура в комбинация с висок светлинен интензитет. Съдържанието на PsaB намалява и при двата вида третирани растения *Arabidopsis thaliana*, но това намаление е по-малко в сравнение с D1, еднакво за 2 и 6 ден и не се наблюдава възстановяване.



Фиг. 20. Промени в количеството на белтъците D1 и PsaB при растения *Arabidopsis thaliana* под влияние на HT-NL и при комбинираното действие на двата фактора - HT-HL в период от 6 дни и последващо възстановяване. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 3 паралелни повторения. За 100% е приета стойността при тилакоидните мембрани, изолирани от контролните растения – NT-NL.

2.2. Промени във функционалната активност, енергетичното разпределение и белтъчния профил на двете фотосистеми при субоптимална температура и при комбиниране на високия светлинен интензитет със субоптимална температура

2.2.1. Промени в пигментния състав

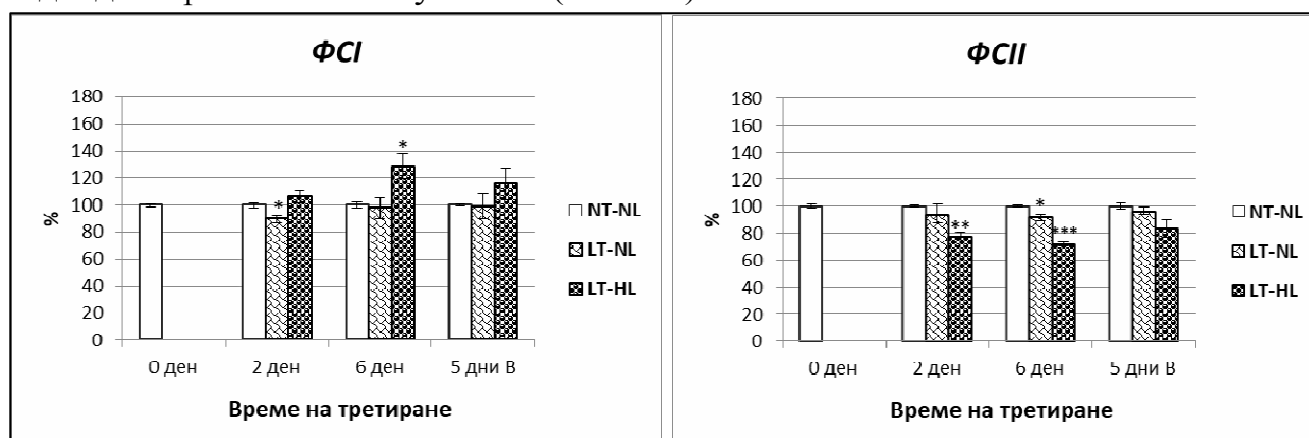
Arabidopsis thaliana са по-толерантни към по-ниски температури и вероятно поради това в периода на третиране със субоптимална температура (LT-NL) стойностите на отношенията Хл a/b и Хл $(a+b)/\text{Кар}$ остават сравнително близки до тези на контролните растения. В условия на субоптимална температура, комбинирана с висок интензитет на светлината, се наблюдават значими промени в пигментното съдържание на ТМ, като отношението Хл a/b нараства, а отношението Хл $(a+b)/\text{Кар}$ намалява. Първото се дължи на по-силното намаление на Хл b за

сметка на Хл *a*, докато намаляването на второто отношение е резултат от по-силното редуциране на общото съдържание на хлорофили (*a+b*) в сравнение с общото съдържание на каротеноиди.

2.2.2. Фотохимична активност на двете фотосистеми

Активността на ФСI, измерена от ТМ на *Arabidopsis thaliana*, третирани при субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет, почти не се повлиява (с изключение на 2-рия ден, когато намалява с 11%). Подобно на доматиените растения, при LT-NL се наблюдава стимулиране на електронния транспорт през ФСI – с около 28% на 6-тия ден (Фиг. 21).

Данните за активността на кислородното отделяне, което отразява фотохимичната активност на ФСII, при растения *Arabidopsis thaliana*, третирани със субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет (LT-NL) показват статистическо значимо намаление само на шестия ден (с 10%), а след възстановителния период от 5 дни при оптимални условия се достигат стойности, близки до тези за 0 ден. Инхибирането на ФСII при LT-NL е по-силно изразено (с около 23% на 2-рия ден и около 29% на 6-тия ден) и не се възстановява напълно след 5 дни при оптимални условия (Фиг. 21).



Фиг. 21. Данни за фотохимичната активност на ФСI и ФСII при контролни (NT-NL) и третирани растения *Arabidopsis thaliana* (LT-NL, LT-HL). Данните са изразени като процент от средната стойност на нулевите дни при контролните растения. 100% за ФСI отговарят на $288.351 \mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{ h}^{-1}$. 100% за ФСII отговарят на $62.404 \mu\text{molO}_2 \text{ mg}^{-1}(\text{Chl}) \text{ h}^{-1}$. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$).

2.2.3. Промени във функционалността на кислород-отделящата система

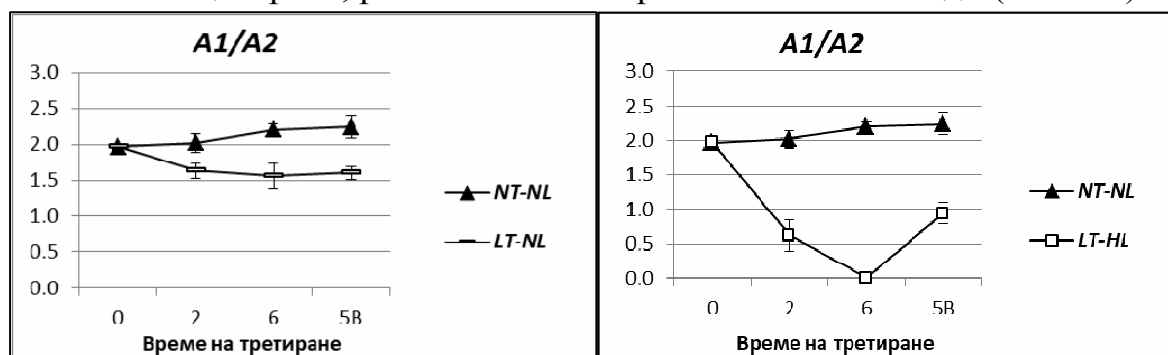
В табл. 6 са представени данните за светкавичните кислородни добиви и стойностите на загубите и двойните попадения на ТМ, изолирани от контролни растения на *Arabidopsis thaliana* и такива, третирани при LT-NL и LT-HL. Под въздействие на двата фактора добивите са силно редуцирани (с около 50% на втория ден и 55% на шестия ден). Инхибирането на кислородното отделяне при LT-HL е съпроводено и с увеличение на загубите (α) и двойните попадения (β) (Табл. 6). При

Arabidopsis thaliana, третирани само с LT, параметрите на КОС са по-слабо засегнати, в сравнение с растения, отглеждани при LT-HL.

Табл. 6. Параметри на КОС за *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при контролни условия (NT-NL), субоптимална температура (LT-NL) и при субоптимална температура и висок светлинен интензитет (LT-HL).

<i>Arabidopsis thaliana</i>					
Вид третиране	Параметри	Дни на третиране			
		0	2	6	5B
NT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 0.71	104.11 ± 1.85	103.71 ± 2.67	101.92 ± 3.93
	α	0.400 ± 0.023	0.363 ± 0.025	0.404 ± 0.002	0.359 ± 0.041
	β	0.022 ± 0.001	0.045 ± 0.028	0.052 ± 0.011	0.030 ± 0.013
LT-NL	Y_3 (%)	100.00 ± 0.71	93.33 ± 1.90 *	89.01 ± 2.19 **	92.72 ± 3.36
	α	0.400 ± 0.023	0.355 ± 0.016	0.444 ± 0.014	0.409 ± 0.020
	β	0.022 ± 0.001	0.036 ± 0.005	0.100 ± 0.017 *	0.104 ± 0.021 *
LT-HL	Y_3 (%)	100.00 ± 0.71	49.83 ± 4.16 ***	44.46 ± 1.12 ***	67.38 ± 0.80 ***
	α	0.400 ± 0.023	0.388 ± 0.033	0.407 ± 0.011	0.495 ± 0.040
	β	0.022 ± 0.001	0.113 ± 0.011 **	0.125 ± 0.016 **	0.127 ± 0.010 ***

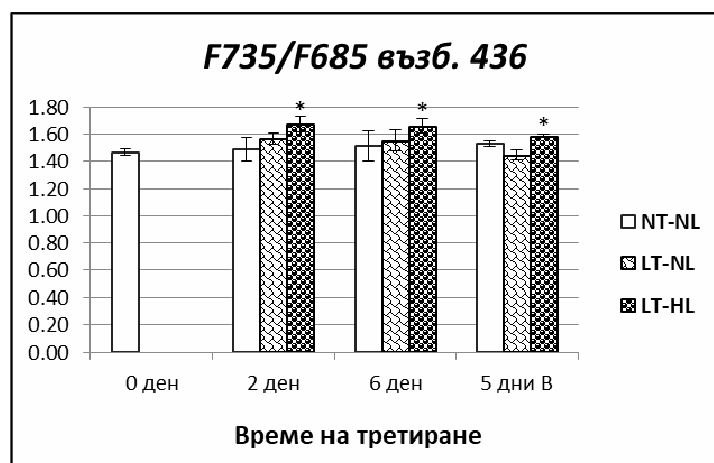
Не са регистрират съществени промени по време на третиране във време константите на бързата и бавната компоненти при *Arabidopsis thaliana*, отглеждани при субоптимална температура и оптимална светлина (LT-NL), с изключение на 6-тия ден, когато нараства времеконстантата на бързата компонента (данните не са показани). Същественото намаляване на отношението A_1/A_2 за ТМ, изолирани от *Arabidopsis thaliana* се дължи най-вече на редуциране на амплитудата на бързата компонента на кислородно избухване, което потвърждава инактивацията на кислородното отделяне в условия на LT-HL. Важно е да се отбележи, че кислород-отделящите центрове, разположени в граналните участъци на ТМ се инхибират по-бързо от бавните центрове, разположени в стромалните тилакоиди (Фиг. 22).



Фиг. 22. Отношението на амплитудите на бързата и бавната компоненти от контролни (NT-NL) и третирани със субоптимална температура (LT), и с комбинираното действие на субоптимална температура и висока светлина (LT-HL) растения на *Arabidopsis thaliana*. Средните стойности ± SE са изчислени от три независими експерименти, всеки с четири повторения.

2.2.4. Промени в разпределението на възбуждащата енергия и енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми

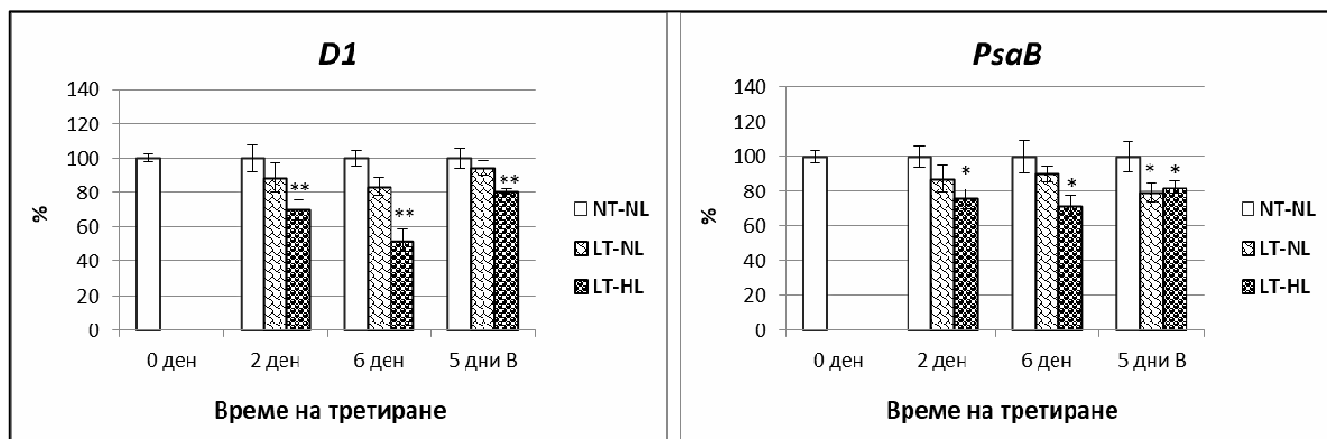
На фиг. 23 са представени флуоресцентните отношения F735/F685 при 77K на изолирани ТМ от контролни и третирани растения *Arabidopsis thaliana*. Флуоресценцията е възбудена със светлина с дължина на вълната $\lambda=436$ нм. Тези резултати показват, че при LT-NL има значителна промяна в емисията от двете фотосистеми (отношението F735/F685 нараства от 1.47 на 0 ден до 1.68 на 2 ден и до 1.66 на 6 ден). Промяната на това отношение предполага преразпределение на възбуждащата към ФСІ и/или повече гасене на флуоресценцията във ФСІІ, вследствие на повече инхибирани центрове. Не трябва да се изключва и възможността в тези ситуации ССКІІ да мигрира към ФСІ. Стойностите на отношението F735/F685 не се променят значително при растения *Arabidopsis thaliana*, отглеждани за 6 дни при субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет.



Фиг. 23. Стойностите на отношението F735/F685 при възбуждане с $\lambda=436$ нм за ТМ, изолирани от контролни (NT-NL) и третирани растения от *Arabidopsis thaliana* – в условия на субоптимална температура, комбинирана с оптимален (LT-NL) или с висок интензитет на светлината (LT-HL).

2.2.5. Анализ на белтъчната компонента на реакционните центрове на двете фотосистеми

Промените за D1 и PsbA белтъците от ТМ, изолирани от *Arabidopsis thaliana*, са най-силно проявени при комбинираното третиране на субоптимална температура с висока светлина и не се възстановяват напълно след 5 дни при оптимални условия. Прави впечатление, че стойностите на PsbA (представени като процент от стойността при ТМ, изолирани от контролни растения) не се променят значително по време на третиране с LT-NL (за 6 дни), но по време на възстановителния период намаляват (Фиг. 24). Тази тенденция се наблюдава и за съдържанието на PsbA при доматените растения, третирани с LT-NL.



Фиг. 24. Промени в количеството на белтъците D1 и PsbA при растения на *Arabidopsis thaliana* под влияние на LT-NL и при комбинираното действие на двата фактора LT-HL в период от 6 дни и последващо възстановяване. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с 3 паралелни повторения. За 100% е приета стойността при тилакоидните мембрани, изолирани от контролните растения – NT-NL. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$).

3. Кинетика на фотоинхибиране *in vitro* на изолирани тилакоидни мембрани от растения *Solanum lycopersicum*, отглеждани при комбиниране на висок светлинен интензитет с висока и оптимална температура

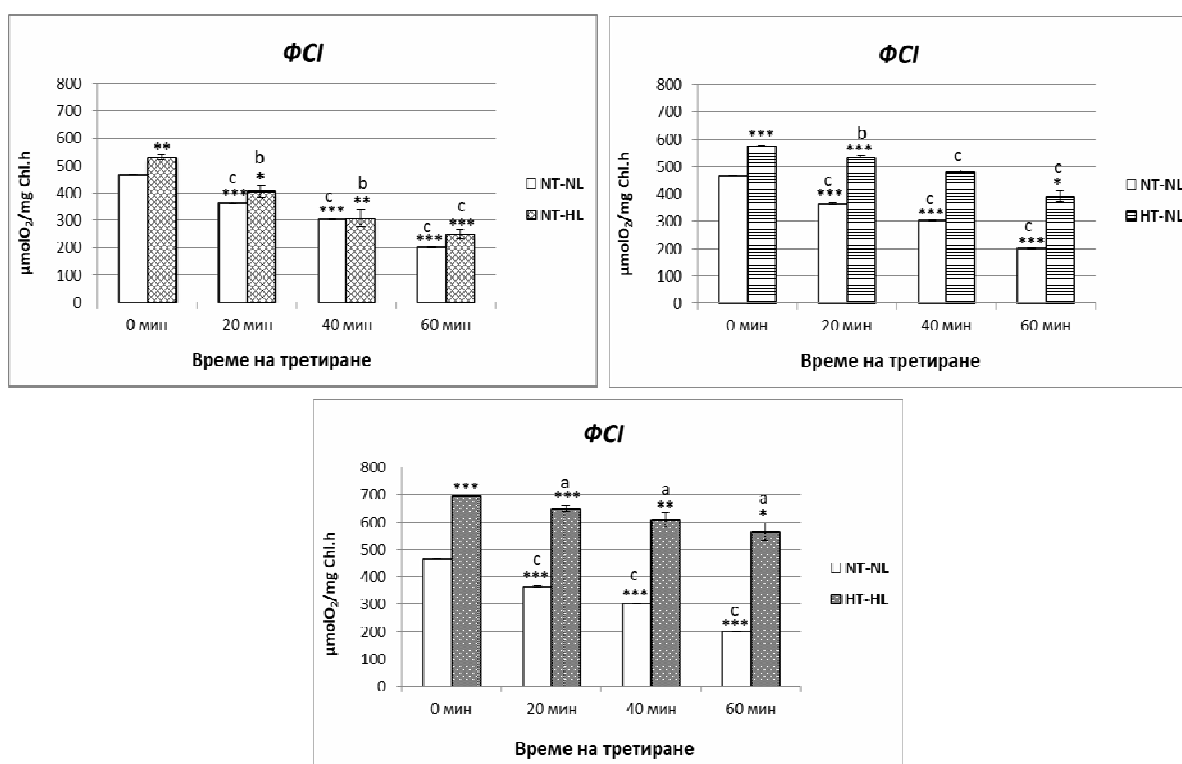
В третата част на дисертацията ние изследвахме до каква степен промените в организацията на фотосинтетичния апарат на *Solanum lycopersicum* при 6 дневното третиране с висок светлинен интензитет с или без комбиниране с висока температура повлияват кинетиката на фотоинхибиране *in vitro* на изолирани тилакоидни мембрани. Изследвахме влиянието на кратковременния (1 час) светлинен стрес върху фотохимичната активност и върху разпределението на възбуждащата енергия между двете фотосистеми при изолирани ТМ от листа на домати растения М82, които преди фотоинхибирането бяха подложени на 6 дневно третиране с висока светлина, висока температура и НТ-НЛ. Фотоинхибирането на изолирани ТМ от контролни (NT-NL) и третирани (в период от 6 дни) домати растения (NT-HL, НТ-NL, НТ-HL) с висок светлинен интензитет ($1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), се провежда при стайна температура (22°C) и при непрекъснато разбъркване в продължение на 1 ч. Проби за анализ са взимани на 0, 20, 40 и 60 мин на експеримента и се измерват веднага след третирането.

3.1. Фотохимична активност на двете фотосистеми

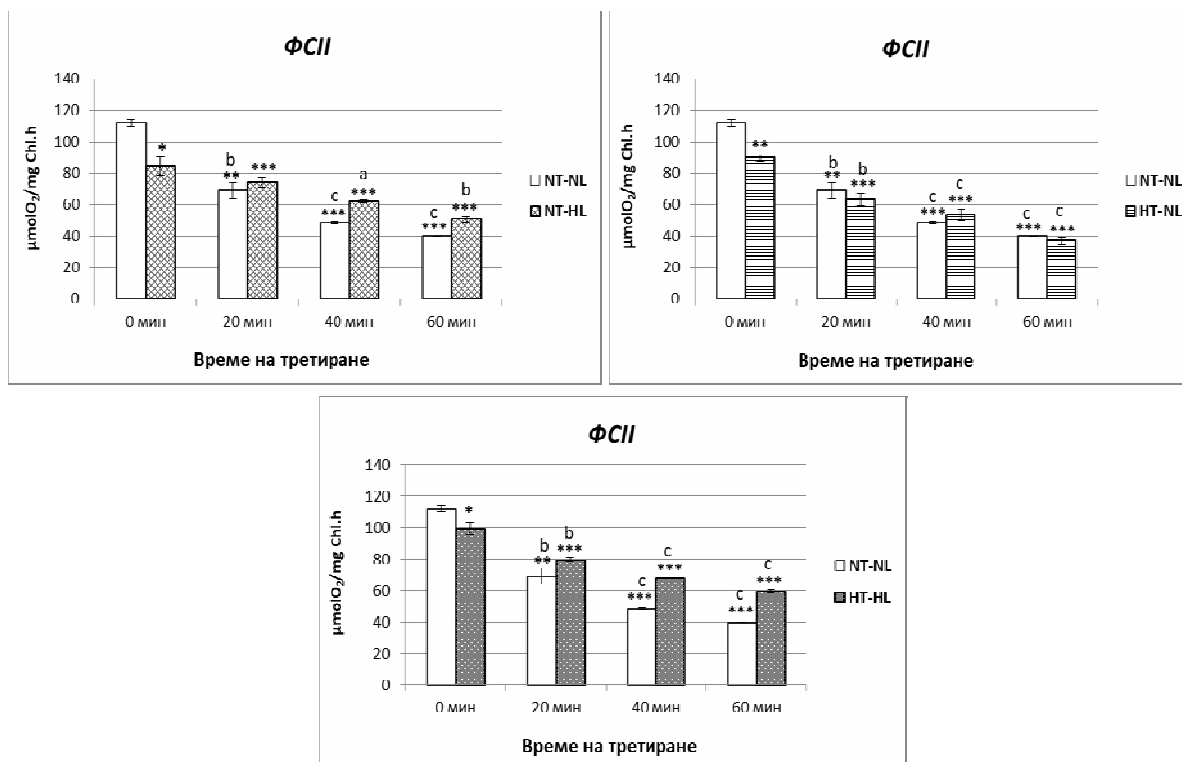
На фиг. 25 са представени стойностите за активността на ФСІ при фотоинхибиране на изолирани ТМ от контролни и третирани за 6 дни при висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), висока температура ($38/29^\circ\text{C}$) и НТ-НЛ домати растения М82. Получените резултати показват, че кратковременният светлинен стрес ($1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) за 1 ч. води до постепенно инхибиране на

активността на ФСІ, което обаче протича с различна кинетика при мембраните, изолирани от контролни и третирані растения. Преди всичко трябва да се отбележи повишената активност на ФСІ особено в мембраните от растения, третирани с НТ-НІ. Инхибирането на фотохимичната активност на ФСІ в тилакоиди от растения NT-NL, НТ-НІ и НТ-НІ е сравнено с това на NT-NL. Както при НТ-НІ, така и при НТ-НІ ясно се проявява забавено инхибиране, като при последните дори след 1 час активността е редуцирана с около 20%, докато при NT-NL инхибирането след 1 час е около 50%.

По време на фотоинхибирането активността на ФСІІ, измерена от ТМ, изолирани от контролни и третирани домати растения намалява, като това намаление (спрямо 0 мин) е най-силно изразено за контролните растения (от 112.11 $\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl.h}$ на 0 мин до 39.97 $\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl.h}$ на 60 мин) (Фиг.26). По отношение на третираните домати растения, активността на ФСІІ се инхибира най- съществено при ТМ, изолирани от *Solanum lycopersicum*, третирани за 6 дни при НТ-НІ(стойностите за активността на ФСІІ на 60 мин от фотоинхибирането за NT-NL – 50.86 $\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl.h}$, за НТ-НІ – 37.18 $\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl.h}$, за НТ-НІ – 59.37 $\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl.h}$).



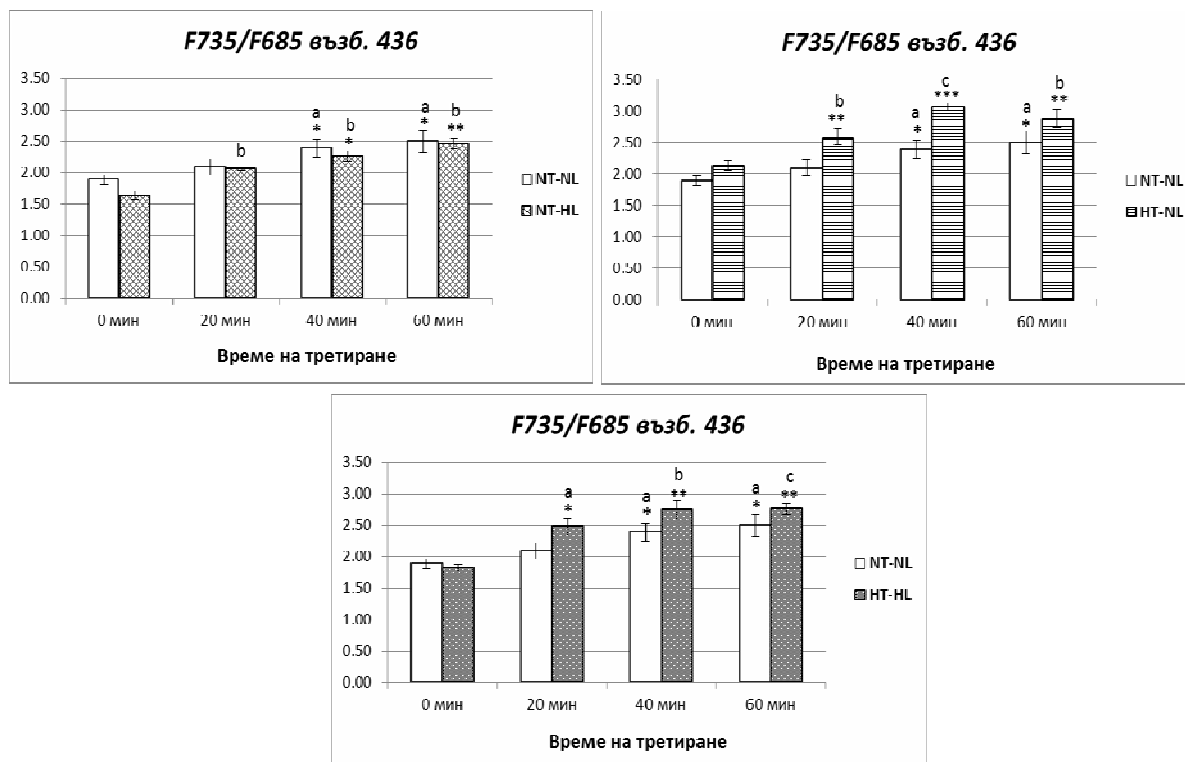
Фиг. 25. Фотохимичната активност на ФСІ от фотоинхибирането на ТМ от контролни и предварително третирани домати растения М82 (NT-NL, НТ-НІ, НТ-НІ). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 3 паралелни измервания. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$). Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 мин за съответното третиране, са отбелязани с латински букви (a - $p < 0.05$; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$).



Фиг. 26. Фотохимичната активност на ФСИ от фотоинхибирането на ТМ от контролни и предварително третиращи домати растения М82 (NT-NL, HT-NL, HT-NL). Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 3 паралелни измервания. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$). Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 мин за съответното третиране, са отбелязани с латински букви (a - $p < 0.05$; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$).

3.2. Промени в разпределението на възбуждащата енергия и енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми

На фиг. 27 са представени резултатите от изследванията при 77K, свързани с установяването на промените в разпределението на възбуждащата енергия и преноса на енергия между двете фотосистеми, предизвикани от кратковременното светлинно третиране. По време на фотоинхибирането стойностите на отношението F735/F685 за ТМ, изолирани от предварително третиращи с висока светлина домати растения (NT-NL), са много близки до стойностите на ТМ от контролните растения. Най-значими промени в F735/F685, показващи преразпределение на възбуждащата енергия в полза на ФCI, настъпват при осветяването с висока светлина на ТМ, изолирани от *Solanum lycopersicum*, отглеждани при висока температура (HT-NL). Трябва да се отбележи, че стойностите на F735/F685 при фотоинхибиране на ТМ, изолирани от растения, отглеждани при комбинираното действие на висока температура и висок светлинен интензитет (HT-NL) за 6 дни, остават по-ниски през цялото време на третиране (1 ч) от тези ТМ от растения, отглеждани при HT-NL.



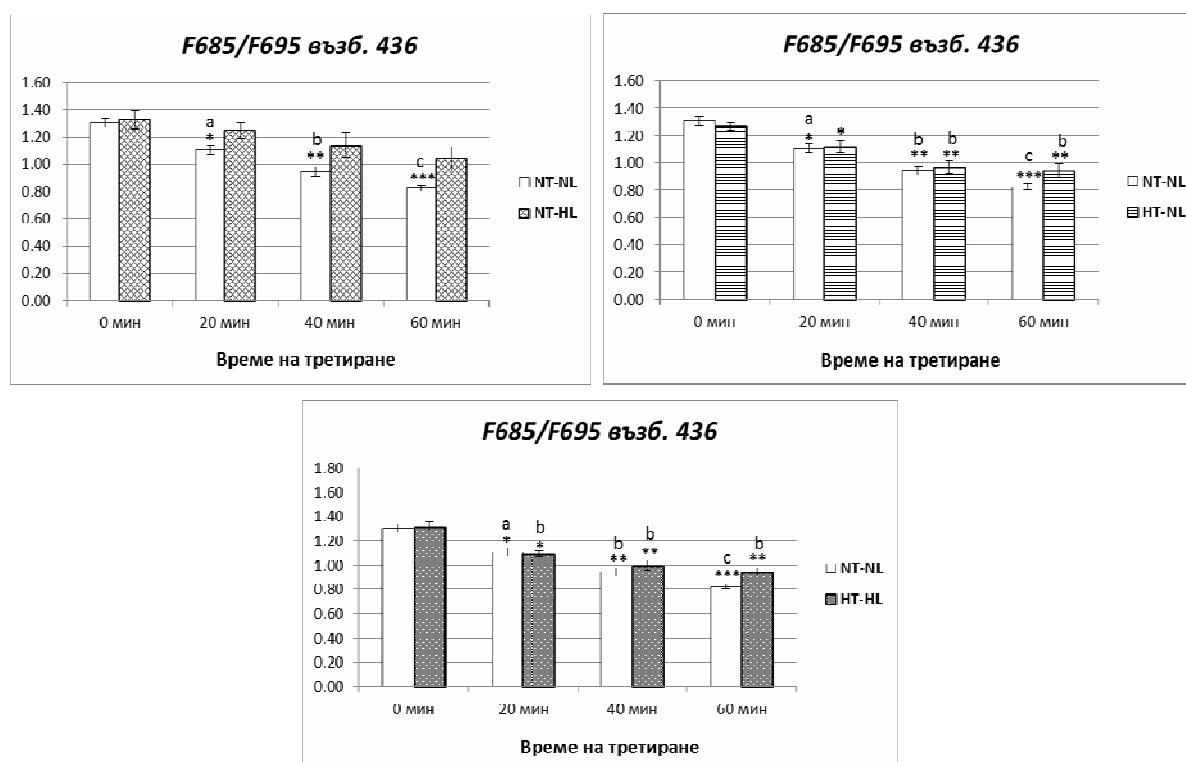
Фиг. 27. Данни за отношението $F735/F685$ при възбуждане с дължина на вълната $\lambda=436$ нм от фотоинхибирането ТН от контролни и предварително третирани (NT-NL, HT-NL, HT-HL) в период от 6 дни доматени растения М82. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 3 паралелни измервания. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$). Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 мин за съответното третиране, са отбелязани с латински букви (a - $p < 0.05$; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$).

Отношението $F685/F695$ отразява преноса на енергия между пигмент-белтъчните комплекси във ФСII. Статистически значими промени за $F685/F695$ настъпват при фотоинхибирането на ТМ, изолирани от доматени растения, третирани при HT-NL и HT-HL (Фиг. 28), като най-голямо намаление (от 1.30 на 0 мин до 0.82 на 60 мин) се установява при фотоинхибирането на ТМ от контролни растения (NT-NL).

ОБСЪЖДАНЕ

В природата растенията са изложени на непрекъснати промени по отношение на светлината и температурата и тъй като нямат възможност да се преместят в по-благоприятна среда, те са развили различни механизми на аклиматизация. Изследването на отговора на изолирани тилакоидни мембрани от третирани при различни комбинации от температура и светлинен интензитет висши растения (*Solanum lycopersicum* cv. M82 и *Arabidopsis thaliana* – Col-0), е съществено за разбирането на тези механизми на аклиматизация. Влиянието на високата температура върху растежа и производителността на растенията е широко изследван както за устойчиви на висока температура, така и за термочувствителни растения

(Wahid *et al.* 2007, Mathur *et al.* 2014). Подробно разглеждани са и отрицателните последици от действието на високите светлинни интензитети върху фотосинтетичните процеси и върху структурата и ефективността на фотосинтетичния апарат (Powles 1984, Aro *et al.* 1993).



Фиг. 28. Данни за отношението $F685/F695$ при възбуждане с дължина на вълната $\lambda=436$ nm от фотоинхибирането на ТМ от контролни и предварително третиранни (NT-HL, HT-NL, HT-HL) в период от 6 дни домати растения М82. Средните стойности $\pm$ SE са изчислени от 3 независими експеримента с по 3 паралелни измервания. Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 ден, са отбелязани със звездички (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$). Статистически значимите разлики на всяка проба, сравнени с контролата на 0 мин за съответното третиране, са отбелязани с латински букви (a - $p < 0.05$; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$).

Оскъдна е информацията обаче относно комбинираното действие на два или повече стресови фактори от ОС върху развитието на растенията и ефективността на фотосинтезата.

Доматите (*Solanum lycopersicum* cv. M82) са топлолюбиви растения, като се развиват добре и при температури между 25-30°C (Zhang *et al.* 2014). Излагането на домати растения на умерено висока температура, 38/29°C по време на дневен/нощен цикъл, е с цел проследяване на способността им към аклиматизиране към тези промени на средата.

Анализирайки ефекта от отглеждането на домати растения при висока температура и при комбинирането на висока температура и висок светлинен интензитет за 6 дни, установихме, че по време на третиране общото съдържание на Хл намалява (Фиг. 1), вследствие на по-силното намаление на Хл б за сметка на Хл а (данните не са представени). Подобни данни за намалено съдържание на Хл са

докладвани за пшеница (Mohanty *et al.* 2006) и разсад от краставици (Tewari and Tripathy 1998). Намаленото съдържание на Хл при наличието на висока температура най-вероятно се дължи на нарушен синтез на Хл молекули или на тяхното ускорено разграждане, или комбинация от двата процеса. Инхибирането на Хл биосинтеза при високи температурни режими е резултат от нарушаването на дейността на множество ензими, които вземат участие в самата синтеза (Dutta *et al.* 2009, Reda and Mandoura 2011).

Нашите резултати показват, че фотосинтетичният отговор на ТМ, изолирани от отглеждани за шест дни при висока температура домати растения, включва инхибиране на скоростта на електронния транспорт през ФСII, а активността на ФСI е стимулирана (Фиг. 2). За сравнение, активността на ФСII, измерена от ТМ, изолирани от НТ-НЛ растения, се запазва по време на третиране и почти не се инхибира (Фиг. 2). По-ниската активност на ФСII, измерена за ТМ от домати растения, третирани при условия на НТ-НЛ е в синхрон както с по-сериозните топлинно-индуцирани промени на КОС (Табл. 3), така и с по-голямото увреждане на D1 при висока температура и оптимален светлинен интензитет (Фиг. 7). Murata и съавт. (2007) определят КОС като най-уязвимият тилакоиден компонент спрямо топлинно манипулиране. Интересното е, че при едновременното действие на висока температура с висок светлинен интензитет стойностите за ФСII (Фиг. 2), Y_3 (Табл. 3) и D1 (Фиг. 7) остават по-високи през цялото време на третиране (6 дни) от тези за растенията, отглеждани при НТ-НЛ.

Топлинният стрес причинява увреждане и разстиковане на ТМ и по този начин потиска дейността на мембранно-асоциираните електронни преносители и ензими, което в крайна сметка води до намаляване скоростта на фотосинтетичния процес (Ristic *et al.* 2008, Rexroth *et al.* 2011).

Според различни изследвания умерено високите температури не причинят сериозно увреждане на ФСII, а по-скоро затруднява процеса на възстановяване на ФСII, който включва регенериране на протеини, най-вече на D1 белтъка, след увреждане от АКФ. В резултат се забавя фиксацията на въглерод и се нарушава линейният електронен поток (Allakhverdiev *et al.* 2008, Islam 2011, Xie *et al.* 2011).

Представените данни на фиг. 2 показват, че отглеждането на домати растения при температура над оптималната им температура на растеж при оптимален ($250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) и висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) води до стимулиране на активността на ФСI, по-силно проявено при НТ-НЛ. Тези данни са в съгласие с докладваната по-рано ниска чувствителност на ФСI спрямо действието на високи температури (Allakhverdiev *et al.* 2008, Mathur *et al.* 2014).

Нарастването на активността на ФСI при НТ-НЛ може да се дължи или на по-голямата популация на ФСI центровете и/или на стимулираната дейност на вече съществуващите ФСI центрове. Въз основа на данните, измерени при 77K за

доматените растения, възможността от нарастване на ФСІ центровете или топлинно-индуцирано преразпределение на възбуждащата енергия в полза на ФСІ (или мигриране на комплекси на ФСІІ към обогатени на ФСІ области), едва ли може да обясни наблюдаваното стимулиране, тъй като не регистрираме нарастване на отношението F735/F685 (Фиг. 4). Повишение се наблюдава само на 6 ден за растенията при НТ-NL. Редица изследвания описват активирането на цикличен електронен поток около ФСІ, както за осигуряване на оптимален енергиен градиент през ТМ, така и за поддържане на постоянни нива на АТФ, с цел предотвратяване на необратимо увреждане при високо температурни режими (Sharkey and Zhang 2010, Agrawal *et al.* 2016, Aihara *et al.* 2016).

За разлика от доматените растения, при комбинирането на НТ с НL при *Arabidopsis thaliana* настъпва инхибиране на активността на ФСІІ, която обаче се възстановява до стойностите на 0 ден при оптимални условия след 5В, докато при растения, третирани с НТ-NL, активността на ФСІІ не се възстановява напълно (Фиг. 16). Установеното стимулиране на електронния пренос през ФСІ при *Solanum lycopersicum* (Фиг. 2), се наблюдава и при ТМ, изолирани от растения на *Arabidopsis thaliana*, третирани при висока температура (32/29°C) при оптимален ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) и висок светлинен интензитет ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Фиг. 16). Редица изследвания докладват за значително повишаване на ФСІ-медириания електронен транспорт в изолирани хлоропласти от различни висши растения в температурен диапазон, в който успоредно се предизвикват топлинно индуцирани увреждания в организацията на хлоропластите и инхибиране на активността на ФСІІ (Sayed *et al.* 1994, Neckathorn *et al.* 1998, Ivanov *et al.* 2017).

Очаквано, отглеждането на *Arabidopsis thaliana* при висока температура и НТ-NL води до по-голямо намаление на светкавичните кислородни добиви и до съществени промени в параметрите на КОС (Табл. 5), тъй като тези растения са по-студенолюбиви в сравнение с доматените растения. Но трябва да се отбележи, че въздействието на НТ и НL не води до по-голямо инхибиране на фотосинтетичния апарат на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*. Едновременно действие на двата фактора не индуцира такива промени, както действието само на високата температура. Това най-добре се вижда от данните, представени на фиг. 18, където се забелязва тенденция на нарастване на отношението F735/F685 при възбуждане с $\lambda=436$ нм за ТМ, изолирани от *Arabidopsis thaliana*, отглеждани в условия на висока температура, докато при растения, третирани в условия на комбиниран стрес (НТ-NL), отношението почти не се променя.

Високата температура компенсира инхибиращия ефект на високия светлинен интензитет и *vice versa*. Редица изследвания показват, че излагането на растенията на по-високи температури от оптималната им температура на растеж, осигурява предимство за аклиматизацията на тези растения към силна светлина (Navaux 1993,

Kreslavski *et al.* 2008). Беше съобщено за повишена толерантност към високи температури при осветяване в сравнение с листа на тъмно за някои тропически растения (Krause *et al.* 2015), както и за положителен ефект на осветяването върху термотолерантността на някои алпийски растения (Buchner *et al.* 2015). Този тип устойчивост към стресови фактори се нарича „кръстосана толерантност“, като механизмът ѝ на действие не е напълно изяснен (Pastori and Foyer 2002). Резултатите от нашите изследвания позволяват да предположим, че на ниво тилакоидни мембрани и фотосинтетичен апарат, механизмите на тази по-висока толерантност към високия светлинен интензитет при висока температура, включват по-висока стабилност на мембраните и активно регулиране на енергетичното снабдяване на ФСII, което може да се осъществява чрез намаление на антената и дисоциация на част от ССКII. Наскоро беше съобщено, че за поддържане на активността на растения, отглеждани при HT-HL условия, определяща роля има α -токоферола, който освен антиоксидантната си роля, повишава стабилността на ТМ чрез редуциращия си ефект върху техния флуидитет (Aroa *et al.* 2000, Wang and Quin 2000, Spicher *et al.* 2018).

Подобно на високата температура и ниската температура е лимитиращ фактор, който може да ограничи растежа, производителността и географското разпределение на много растителни видове. Толерантността на растенията към ниски температури е генетично детерминирано свойство, като механизмите му за реализация силно зависят от условията на средата, степента на температурния стрес и неговата продължителност (John *et al.* 2016).

Въз основа на получени данни от редица изследвания е установено, че растения, които са третирани с ниски температури, се характеризират с понижена фотосинтетична активност и намалено съдържание на Хл *a* и Хл *b* (Gartska *et al.* 2007). Отговорът на доматените растения, подложени на дългосрочно (6 дни) третиране при субоптимална температура (12/10°C, LT) и оптимален светлинен интензитет (250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, NL), включва промени в съдържанието на фотосинтетичните пигменти Хл *a*, Хл *b*, общо съдържание на Хл (*a+b*) и каротеноиди, като последните остават по-слабо засегнати (Фиг. 8). Включването на действието на висок светлинен интензитет (800 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, HL) към този на субоптималната температура води до още по-съществено намаление на Хл (*a+b*) и най-вече на Хл *b* (данните не са представени), който се съдържа преди всичко в светосъбиращия комплекс. Поддържането на относително постоянно каротеноидно съдържание по време на третирането би помогнало на растенията да преодолеят нискотемпературния стрес, без да бъдат оксидативно увреждани (Martínez-Peñalver *et al.* 2012). За разлика от доматените растения, третирането на *Arabidopsis thaliana* при субоптимална температура (12/10°C, LT) и оптимален светлинен интензитет (150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, NL), не води до съществени промени в съдържанието на

фотосинтетичните пигменти, като най-вероятно това е свързано с видовото различие между двете растения, имайки предвид че *Arabidopsis thaliana* е по-толерантно към ниски температури. При комбиниране на действието на субоптимална температура (LT) и висок светлинен интензитет ($500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, HL) за растенията *Arabidopsis thaliana*, съдържанието на Хл (a+b) намалява на 2-рия и 6-тия ден на третиране.

Отглеждането на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana* при условия на субоптимална температура и висок светлинен интензитет (LT-HL) за 6 дни води до инхибиране на активността на ФСII и значително стимулиране на електронния поток през ФСI (Фиг. 9 и фиг. 21). Предполага се, че цикличният електронен транспорт се активира с цел да се осигури допълнително АТФ, необходим за синтезата на протеини и предпазване на ФСII от фотоинхибиране (Navaux *et al.* 1991, Miyake и Okamura 2003, Allakhverdiev *et al.* 2005).

Както беше описано по-рано в литературния обзор, светлинният стрес уврежда основно комплекса на ФСII, като ефектът на фотоинхибирането се изразява в нарушаване на фотосинтетичния електронен транспорт и намаляване на ефективността на ФСII (Yamamoto *et al.* 2013). Фотоинхибирането на електронния транспорт може да бъде индуцирано по два различни механизма: единият е специфичен за акцепторната страна, а другият за донорната страна на ФСII (Ballottari *et al.* 2007, Allahverdiyeva and Aro 2012).

Трябва да се отбележи, че при комбинирането на отрицателното действие на високия светлинен интензитет с този на субоптималната температура (LT-HL), параметрите на КОС, измерени от ТМ, изолирани и от двата вида растения (*Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*) са по-засегнати през цялото време на третиране (6 дни) и след 5 дни при оптимални условия (Табл. 4 и табл. 6) в сравнение със стойностите, получени от ТМ на същите растения, отглеждани при НТ-HL (Табл. 3 и табл. 5). Очевидно, при комбинирането на LT-HL поради увеличението на т.н. „екситонно налягане” (Gray *et al.* 1996) върху ФСII, настъпва по-силно изразено инхибиране и/или модифициране на функционално активни ФСII центрове, при което се регистрира и по-голямо намаление амплитудата на кислородно отделяне при непрекъснато осветяване. Прилагането на висок светлинен интензитет в комбинация с ниска температура води до сериозен дисбаланс между независимите от температурата процеси на поглъщане и трансформиране на светлинната енергия и метаболитните процеси, които се забавят при субоптимални температури (Gray *et al.* 1996, Ensminger *et al.* 2006).

Анализът на параметрите на кислородното отделяне – светкавични добиви и кислородно избухване при непрекъснато осветяване, дава възможност да се прецени инхибирането на центрите на ФСII, разположени в различните участъци на мембраните. ФСIIa реакционните центрове са разположени в граналните тилакоиди

и функционират чрез рекомбиниране на четири кислородни прекурсора, получени в близост на всеки център по схемата, описана от Кок и съавт. (1970), поради което отделят кислород с голяма ефективност. ФСII β центровете, намиращи се главно в тилакоидите на стромата, отделят кислород по кооперативен механизъм (Zeinalov 2010). Много на брой научни работи докладват, че пластичността на архитектурата на ТМ, изразяваща се в модификации на отношението апресирани към неапресирани мембрани, е ключов механизъм за оптимизиране на фотосинтетичния процес при променени условия на средата (Sundby *et al.* 1986, Maenpra *et al.* 1988).

Отношението на амплитудите A_1/A_2 , съответно на бързата спрямо бавната компонента, дава информация за относителното участие на бързи и бавни центрове в регистрираното кислородно избухване и за инхибирането на едните или другите центрове при прилаганите третириания (НТ-NL, НТ-HL, LT-NL, LT-HL). В хода на нашите експерименти, установихме, че намаляването на отношението A_1/A_2 при доматени растения и *Arabidopsis thaliana*, е резултат от преференциално инхибиране на ФСII α центровете и/или модифицирането им, т.е. превръщането на ФСII α във ФСII β . Най-вероятно, запазването и/или активирането на ФСII β центровете има особено значение в „gerarig“ цикъла на ФСII, тъй като синтезата на новите белтъци на РЦ става в стромалните области на хлоропластните мембрани и след което се осъществява придвижването им към граналните участъци (Guenther and Melis 1990). Намаляването в скоростта на електронния транспорт може да бъде частично компенсирано от повишеното участие на допълнителния кооперативен механизъм за кислородна продукция, който макар и с по-ниска ефективност, е по-устойчив към стресови въздействия (Масленкова 2009).

В условия на субоптимална температура енергията дори и на ниския светлинен интензитет може да се окаже висок за растенията и да активира механизмите на релокация и миграция на хлорофил-белтъчните комплекси на ССКII и ФСII с цел да се намали енергийният поток от антената към РЦ на ФСII (Ballottari *et al.* 2007). Редица изследвания относно студово третириани доматени растения докладват за намаляването на връзките между отделните ФСII единици в граналните тилакоиди и преразпределение на възбуждащата енергия към ФСI (Kirchhoff *et al.* 2004b, Garstka *et al.* 2007, John *et al.* 2016).

На фиг. 12 и фиг. 23 са представени промените относно F735/F685 при възбуждане с $\lambda=436$ нм за ТМ, изолирани съответно от *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, отглеждани в условия на субоптимална температура с висока светлина (LT-HL). Причините за регистрираното увеличение на отношението F735/F685 включват редуциране на емисията при 685 нм поради на инхибиране на центрове на ФСII, които играят ролята на гасители и/или по-висока енергетична обезпеченост на ФСI в сравнение с ФСII, вследствие на преразпределение на възбуждащата енергия към ФСI.

Намаляване на участието на Хл *b* в енергетичното снабдяване на двете фотосистеми се наблюдава най-вече при третиране в условия на LT-NL растения – *Solanum lycopersicum* (Фиг. 13) и *Arabidopsis thaliana* (Фиг. 50 от дисертацията), най-вероятно свързано с намаление на антенните комплекси с цел редуциране на възбуждащата енергия.

Неправилното функциониране на кислород-отделящата система на ФСII под действие на високата светлина предизвиква натрупването на АКФ в големи количества (Pospisil 2009). Тези АКФ могат да реагират с близко разположените до тях белтъци откъм донорната страна на ФСII и да изиграят важна роля в нарушаването на техните функции (Blubaugh and Cheniae 1990, Klimov *et al.* 1990, Yamamoto *et al.* 2008).

В резултат от действието на ниските температури, процесите на деградация на увредени D1 белтъци и тяхното заменяне с новосинтезирани в цикъла на поправка/възстановяване на D1 са силно забавени (Aro *et al.* 1993). Счита се, че увреждащите ефекти на стресовите фактори върху ФСIIα центровете са локализирани върху D1 белтъка, където се извършва електронния транспорт от първичния донор на електрони, Tyr_Z, до вторичния акцептор на електрони, Q_B (Giardy *et al.* 1996).

Стойностите на PsaB (представени като процент от стойността при ТМ, изолирани от контролните растения *Arabidopsis thaliana*) не се променят статистически значимо по време на третиране с LT-NL (за 6 дни), но по време на възстановителния период намаляват (Фиг. 24). Тази тенденция се наблюдава и за съдържанието на PsaB при доматени растения, третирани при субоптимална температура и оптимален светлинен интензитет, LT-NL (Фиг. 14). По-бавното разграждане и *de novo* синтезата на PsaB белтъци от ТМ на *Arabidopsis thaliana* при ниски температури се докладва и от работата на Zhang и Scheller (2004), което за пореден път потвърждава по-бавния процес на възстановяване при ФСI.

Високата температура заедно с високия светлинен интензитет имат синергично действие, т. е. прилагането на един стресов фактор води до активирането на система за преодоляване на неблагоприятното действие на втория стресов фактор (Camejo *et al.* 2005, Allahverdiyeva and Aro 2012). В настоящата работа използваните температура и светлинен интензитет за дълговременно третиране са по-високи от оптималните, но са физиологични и не водят до загиване на растенията. Третирането с HT-NL не води до инхибирането на фотосинтетичния апарат на висшите растения, а по-скоро улеснява аклиматизацията им към променените условия на ОС.

Това аклиматизиране има съществен ефект и върху степента и кинетиката на фотоинхибиране на ТМ, изолирани от контролни и третирани в продължение на 6 дни с NT-NL, HT-NL и HT-NL растения на *Solanum lycopersicum*. В настоящата

работа проследихме дали и до каква степен дългосрочната аклиматизация към висока светлина заедно с умерено високата температура би допринесла за повишаване на устойчивостта на изолирани ТМ към фотоинхибиране при много висок светлинен интензитет. Кинетиката на фотоинхибиране беше изследвана в тилакоиди при стайна температура и интензитет на светлината $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ в рамките на 1 ч.

Тилакоидните мембрани, изолирани от домати растения, третирани при НТ за 6 дни, показват значително по-висока скорост на електронния транспорт през ФСІ. По време на фотоинхибирането активността на ФСІ намалява при всички ТМ, изолирани от контролни (NT-NL) и различно третирани растения (NT-HL, HT-NL, HT-HL), като това намаление протича най-бавно при HT-HL третираните растения, а най-бързо при контролните и NT-HL третираните растения (Фиг. 25). Предполага се, че стимулираният пренос на електрони през ФСІ се проявява с цел предпазване на ФСІІ от фотоинхибиране. Ефектът на стимулираната активност на ФСІ при високотемпературно третиране на растенията се докладва по-рано и от други автори (Mathur *et al.* 2014, Ivanov *et al.* 2017).

Данните от измерванията на активността ФСІІ при фотоинхибирането на ТМ, изолирани от предварително третирани с различни комбинации от температура и светлинен интензитет растения, показват, че активността на ФСІІ се запазва най-висока за ТМ, изолирани от домати растения, отглеждани при HT-HL. Най-голяма чувствителност проявяват тилакоидните мембрани, изолирани от *Solanum lycopersicum*, третирани само при висока температура (Фиг. 26).

Промените в отношението F735/F685, индуцирани от фотоинхибирането отразяват промените в преноса на възбуждащата енергия от антенните хлорофили на ФСІІ към комплекса на ФСІ (т. нар. спилувър) или промените в разпределението на абсорбираната светлинна енергия между ФСІ и ФСІІ. Получените резултати ясно показват, че кратковременният светлинен стрес за 1 ч. води до преразпределение на възбуждащата енергия в полза на ФСІ при всички ТМ, като този ефект най-съществено се проявява при ТМ от домати растения, третирани с висока температура при оптимален интензитет на светлината (Фиг. 27). По-рано беше установено, че топлинният и светлинният стрес водят до разстиковане на граналните тилакоиди. Този процес е последван от реорганизация на ПБК в мембраната (Ivanov *et al.* 1990, Ivanov *et al.* 2017). Нашите данни недвумислено показват, че няколкодневното акклимиране към HT-HL има за резултат повишаване на устойчивостта към фотоинхибиране на изолирани ТМ по отношение на активността на двете фотосистеми.

Получените данни за флуоресцентното отношение F695/F685 показват, че в ТМ от растения, предварително третирани с висок светлинен интензитет, промените в енергетичното взаимодействие вътре в комплекса на ФСІІ са по-слабо изразени в

сравнение с ТМ от контролните растения (Фиг. 28), което показва, че вследствие от аклиматизирането към висок интензитет на светлината в продължение на 6 дни структурната реорганизация във ФСII благоприятства толерантността към фотоинхибиране.

Анализът на нискотемпературните (77K) флуоресцентни спектри на възбуждане при 735 нм (E680/E650) при ТМ, изолирани от НТ-NL домати растения, показват слабо редуциране на участието на Хл *b* в енергетичното снабдяване на ФСI с времето на осветяване с $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Аналогично, данните от флуоресцентните спектри на възбуждане при 685 нм (E470/E436) за фотоинхибираните ТМ, изолирани НТ-NL третирани растения, показват че отношението E470/E436 намалява. Това най-вероятно е свързано със светлинно-индуцирана дисоциация на части от антенните комплекси на ФСI и ФСII, а не може да се изключи и вероятността за нарушена енергетична връзка между ФСI и ССКII по време на фотоинхибирането. Комплексът ФСI-ССКII има съществено значение при аклиматизирането на растенията към променените условия на ОС (Zhang and Scheller 2004, Wientjes et al. 2013, Marutani et al. 2017), тъй като се предполага, че съществуването на подобни комплекси е характерно явление при действието на висока температура и висока светлина.

Изследването на фотосинтетичните първични реакции в дългосрочен план е важен за разбирането на механизмите на толерантност и аклиматизация на фотосинтетичния апарат към различни стресови състояния на околната среда.

ИЗВОДИ

1. Продължителното третиране (6 дни) на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana* с висока температура има стимулиращ ефект върху скоростта на електронен транспорт през ФСI, като комбинирането с висок светлинен интензитет засилва това стимулиране. Високата температура инхибира фотохимичната активност на ФСII, като този инхибиращ ефект при *Solanum lycopersicum* се компенсира при комбиниране с висок светлинен интензитет, а при *Arabidopsis thaliana* се усилва.
2. Аклиматизирането към висока температура включва промени в енергетичното взаимодействие между двете фотосистеми, като тези промени до голяма степен са минимизирани при комбинирането на високата температура с висок светлинен интензитет.
3. Субоптималната температура на отглеждане води до инхибиране на светкавичните кислородни добиви и скоростта на електронен транспорт през ФСII при *Solanum lycopersicum*, като комбинирането с висок светлинен интензитет засилва инхибиращия ефект, най-силно изразен за ФСIIa центровете.

4. Високотемпературното третиране на *Solanum lycopersicum* при оптимален и висок светлинен интензитет оказва по-голямо влияние върху относителното участие на хлорофил *a* и *b* в енергетичното снабдяване на ФСII, а антената на ФСI е по-слабо засегната.
5. При третиране на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana* със субоптимална температура за два и шест дни и при комбинирането ѝ с висок светлинен интензитет настъпва преразпределение на енергията в полза на ФСI, отразяващо намаление на антената на ФСII и/или инхибиране на центровете на ФСII.
6. Най-висока устойчивост по отношение на фотохимичната активност на ФСII при фотоинхибиране *in vitro* показват тилакоидните мембрани, изолирани от растения *Solanum lycopersicum*, подложени на комбинирано въздействие на висока температура и висок светлинен интензитет, докато най-голяма чувствителност проявяват тилакоидните мембрани, изолирани от растения, третирани само при висока температура.
7. Активността на ФСI при фотоинхибиране *in vitro* е най-слабо повлияна при тилакоидните мембрани, изолирани от растения *Solanum lycopersicum*, аклимирани към висока температура и висок светлинен интензитет, докато при мембраните, изолирани от растения, третирани само с висок светлинен интензитет, кинетиката на фотоинхибиране на ФСI е както при неаклимираните растения.
8. Фотоинхибирането на изолирани тилакоидни мембрани от растения, третирани при висока температура, води до изразено преразпределение на възбуждащата енергия в полза на ФСI, докато фотоиндуцираните промени в енергетичното взаимодействие вътре в комплекса на ФСII са по-слабо изразени в мембрани от растения, аклимирани към висок светлинен интензитет.

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

1. Показан е защитният ефект на високия светлинен интензитет върху индуцираните от високата температура на отглеждане промени в активността на двете фотосистеми, като при ФСI той се проявява като усилване на стимулирането на фотохимичната активност, а при ФСII като компенсиране на инхибирането, индуцирани от високата температура.
2. Установено е, че механизмът на аклиматизация към висок светлинен интензитет при висока или субоптимална температура включва в по-висока степен регулация на антената на ФСII в сравнение с антената на ФСI.

3. Показан е кумулативният инхибиращ ефект на високия светлинен интензитет и субоптималната температура по отношение на кислород-отделящата система както при *Solanum lycopersicum*, така и при *Arabidopsis thaliana*.
4. Доказано е, че аклиматизирането на растенията *Solanum lycopersicum* към висок светлинен интензитет и висока температура повишава в по-голяма степен толерантността на фотохимичната активност на двете фотосистеми към фотоинхибиране *in vitro*, отколкото аклиматизирането само към висок светлинен интензитет.
5. За първи път е показана по-високата устойчивост на ФСII β центровете към комбиниран светлинен и температурен стрес като съществен механизъм при аклиматизирането на фотосинтетичния апарат към неблагоприятни условия.

ЛИТЕРАТУРА

- Agrawal D.**, Allakhverdiev S.I., Jajoo A. (2016) Russ J Plant Physiol 63: 210–215.
- Aihara Y.**, Takahashi S., Minagawa J. (2016) Plant Physiol 171: 522–529.
- Allahverdiyeva Y.** and Eva-Mari Aro (2012) In: Advances in Photosynthesis and Respiration v. 34, pp. 275–297.
- Allakhverdiev S.I.**, Nishiyama Y., Takahashi S., Miyairi S., Suzuki I., Murata N. (2005) Plant Physiol 137: 263–273.
- Allakhverdiev S.I.**, Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. (2008) Photosynth Res 98: 541–550.
- Aro E. M.**, Virgin I., and Andersson B. (1993) Biochim. Biophys. Acta 1143: 113–134.
- Arora A.**, Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M. (2000) Arch. Biochem. Biophys. 373: 102–109.
- Ballottari M.**, Dall'Osto L., Morosinotto T. and Bassi R. (2007) J Biol Chem 282: 8947–8958.
- Blubaugh D. J.** and Cheniae G. M. (1990) Biochemistry 29: 5109–5118.
- Buchner O.**, Stoll M., Karadar M. *et al.* (2015) Plant Cell Environ. 38: 812–826.
- Camejo D.**, Rodríguez P., Angeles Morales M. *et al.* (2005) J. Plant Physiol. 162: 281–289.
- Dutta S.**, Mohanty S., Tripathy B.C. (2009) Plant Physiol. 150: 1050–1061.
- Ensmiger I.**, Busch F., Huner N.P.A. (2006) Physiol Plant 126:28–44.
- Garstka M.**, Venema J.H., Rumak I., Gieczewska K., Rosiak M., Koziol-Lipinska J., Kierdaszuk B., Vredenberg W.J., Mostowska A. (2007) Planta 226: 1165–1181.
- Giardi M.T.**, Cona A., Geiken B., Kuera T., Masojídek J. and Mattoo A K. (1996) Planta 199: 118–125.
- Gray C.R.**, Savitch L.V., Ivanov A.G., Huner N.P.A. (1996) Plant Physiol 110: 61–71.

- Guenther J.**, Nemson J. and A. Melis (1990) Photosynth. Res. 24: 35–46.
- Havaux M.** (1993) Plant Cell Environ 16: 461–467.
- Havaux M.**, Greppin H., Strasser R.J. (1991) Planta 186: 88–98.
- Heckathorn S.A.**, Downs C.A., Sharkey T.D., Coleman J.S. (1998) Plant Physiol 116: 439–444.
- Islam M.T.** (2011) Int. J. Sustain. Crop Prod. 6: 14–16.
- Ivanov A.G.**, Velitchkova M.Y. (1990) J Photochem Photobiol B 4: 301–320.
- Ivanov A.G.**, Velitchkova M.Y., Allakhverdiev S.I., Huner N.P.A. (2017) Photosynth Res, doi 10.1007/s11120-017-0383-x.
- John R.**, Anjum N.A., Sopory S.K., Akram N.A, Ashraf M. (2016) Biologia Plantarum 60 (4): 603–618.
- Kirchhoff H.**, Borinski, M., Lenhert, S., Chi, L., Büchel, C. (2004) Biochemistry 43: 14508–14516.
- Kok B.**, Forbush B., McGloin M. (1970) Photochem. Photobiol. 11: 457–475.
- Krause G.H.**, Winter K., Krause B., Virgo A. (2015) Funct. Plant Biol. 42: 42–51.
- Kreslavski V.**, Tatarinzev N., Shabnova N., Semenova G., Kosobrukhov A. (2008) J Plant Physiol. 165: 1592–1600.
- Laemmli U.K.** (1970) Nature 227: 680–685.
- Lichtenthaler H.K.** (1987) Meth. Enzymol. 148: 350–382.
- Maenpaa P.**, Aro E-M., Somersalo S. and Tyystjarvi E. (1988) Plant Physiol 87: 762–766.
- Martínez-Peñalver A.**, Graña E., Reigosa M.J. *et al.* (2012) Russ J Plant Physiol 59: 640.
- Marutani Y.** (2017) Photosynth. Res 131(1): 41–50.
- Mathur S.**, Agrawal D., Jajoo A. (2014) J. Photoch. Photobio. B 137: 116–126.
- Miyake C.**, Okamura M. (2003), Plant Cell Physiol 44: 457–462.
- Mohanty S.**, Grimm B., Tripathy B.C. (2006) Planta. 224 (3): 692–9.
- Murata N.**, Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. (2007) Biochim Biophys Acta 1767:414–421.
- Pastori G.M.**, Foyer C.H. (2002) Plant Physiology 129: 460–468.
- Pospisil P.** (2009) Biochim. Biophys. Acta 1787: 1151–1160.
- Powles S.B.** (1984) Annu Rev Plant Physiol 35: 15–44.
- Reda F.**, Mandoura H.M.H. (2011) Int. J. Acad. Res. 3: 108–115.
- Rexroth S.**, Mullineaux C.W., Ellinger D. *et al.* (2011) Plant Cell 23: 2379–2390.

- Ristic Z.**, Bukovnik U., Momčilović I. *et al.* (2008) J. Plant Physiol. 165: 192–202.
- Sayed O.H.**, Earnshaw M.J., Emes M.J. (1994) Acta Bot Neerl 43: 137–143.
- Sharkey T.D.**, Zhang R. (2010) J Integr, Plant Biol. 52: 712–722.
- Spicher L.**, Almeida J., Gutbrod K., Pipitone R., Dörmann P., Glauser G., Rossi M., Kessler F. (2018) Journ of Experim Botany 68: 21–22.
- Sundby C.**, Melis A., Maenpaa P. and B. Andersson (1986) Biochim Biophys Acta 851: 475–483.
- Tewari A.K.**, Tripathy B.Ch. (1998) Plant Physiol. 117(3): 851–858.
- Velitchkova M.**, Popova A. (2005) Bioelectrochem. 67: 81–90.
- Wahid A.**, Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. (2007) Environ. Exp. Bot. 61: 199–223.
- Wang X.**, Quinn P.J. (2000) Molecular Membrane Biology 17: 143–156.
- Wientjes E.**, van Amerongen H., Croce R. (2013) Biochim Biophys Acta. 1827 (3): 420–6.
- Xie X.J.**, Shen S.H.H., Li Y.X. *et al.* (2011), Afr. J. Agr. Res. 6: 1931–1940.
- Yamamoto Y.**, Aminaka R., Yoshioka M., Khatoon M., Komayama K., Takenaka D., Yamashita A., Nijo N., Inagawa K., Morita N., Sasaki T., Yamamoto Y. (2008) Photosynth. Res. 98: 589–608.
- Yamamoto Y.**, Hori H., Kai S., Ishikawa T., Ohnishi A., Tsumura N., *et al.* (2013) Front. Plant Sci. 4: 433.
- Zeinalov Y.** (2002) Bulg. J. Plant Physiol. 28: 57–67.
- Zeinalov Y.** (2010) Photosynthesis – Behind the Fundamental Concepts. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany.
- Zhang J.**, Jiang X.D, Li T.L, and X.J. CAO (2014) Photosynthetica 52 (3): 430–436.
- Zhang S.**, Scheller H.V. (2004) Plant Cell Physiol 45: 1595–1602.
- Масленкова** (2009) Дисертация за присъждане д.б.н.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации:

1. Faik A., Popova A. V., Velitchkova M. (2016) *Effects of long-term action of high temperature and high light on the activity and energy interaction of both photosystems in tomato plants*, **Photosynthetica** 54: 611–619.
2. Faik A., Vasilev D., Stanoeva D., Velitchkova M. (2017) *Suboptimal growth temperature and light intensity effects on Photosystem II activity and oxygen evolution of tomato (*Solanum lycopersicum*)*, **C. R. Bulg Acad. Sci.** 70 (9): 1247–1254.
3. Faik A., Stanoeva D., Velitchkova M. (2018) *High light enhances the inhibitory effect of suboptimal temperatures on the oxygen evolving reactions in *Arabidopsis thaliana**, **C. R. Bulg Acad. Sci.** 71 (2): 211–219.

Забелязани цитирания:

Faik A., Popova A. V., Velitchkova M. (2016) Effects of long-term action of high temperature and high light on the activity and energy interaction of both photosystems in tomato plants, **Photosynthetica** 54: 611–619.

1. Spicher L., Almeida J., Gutbrod K., Pipitone R., Dörmann P., Glauser G., Rossi M., Kessler F. (2017) Essential role for phytol kinase and tocopherol in tolerance to combined light and temperature stress in tomato, **J Exp. Bot.** 68 (21-22): 5845–5856, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx356>.
2. Ren C., Wu Y., Zha T., Jia X., Tian Y., Bai Y., Bourque C.P.A., Ma J., Feng W. (2018) Seasonal changes in photosynthetic energy utilization in a desert shrub (*Artemisia ordosica* Krasch.) during its different phenophases, **Forests** 9: 176, doi:10.3390/f9040176.

Участия в научни форуми:

1. Aygyun Faik, Milena Gerganova, Maya Velitchkova (2013) *Changes in energy distribution and photochemical activity of Photosystem I and PhotosystemII of tomato plants grown under different light intensities*. Международна конференция „BIOSCIENCE – DEVELOPMENT AND NEW OPPORTUNITIES” – KLIMENT’S DAYS, 20-22.09.2013г., Биологически факултет на СУ “Св. Климент Охридски”, София –постер.
2. Айгюн Фаик, М. Василев, М. Величкова (2014) *Преразпределение на светлинната енергия и промени във фотохимичната активност на двете фотосистеми при комбиниран светлинен и температурен стрес*. Научна сесия за докторанти и млади учени „Биомедицина и качество на живот” по случай 145 години БАН, организирана от ИБФБМИ-БАН, 02.10.2014 г. – доклад.

3. A. Faik, M. Gerganova, M. Velitchkova (2016) ***The role of elevated temperature in photoinhibition and recovery of photosystem II in thylakoid membranes from Arabidopsis thaliana.*** 41 Congress of FEBS (Efes-Kushadasa, 3-8 September, 2016). Отпечатано резюме FEBS J., 283, P-02.08.05-067 (Поради независещи от нас причини конгресът беше отменен).
4. A. Faik, D. Vasilev, D. Stanoeva, M. Velitchkova (2016) ***Suboptimal growth temperature and light intensity effects on Photosystem II activity and oxygen evolution of tomato (Solanum lycopersicum).*** 3-ТИ КОНГРЕС ПО ФИЗИЧЕСКИ НАУКИ, 29 септември - 2 октомври 2016, София –постер.
5. Aygyun Faik, Milena Gerganova, Gabriela Petrova, Maya Velitchkova (2016) ***Comparison of photoinhibition kinetics of thylakoid membranes isolated from control and high temperature acclimated tomato plants.*** МЛАДЕЖКА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ “КЛИМЕНТОВИ ДНИ”, 17 – 18 ноември 2016 г., Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”.
6. Aygyun Faik, Gabriela Petrova, Milena Gerganova, Maya Velitchkova (2017) ***Dependence of photoinhibition extent on acclimation of tomato plants to different light and temperature conditions.*** Научна сесия „Биомедицина и качество на живот-младите в науката”. 26-27 юни 2017 г. По случай 50 годишния юбилей на ИБФБМИ-БАН. – доклад.