

Константин Владимиров Добрев

**Промени в ефективността на фотосинтетичните процеси в
Arabidopsis thaliana в отсъствието на лютеин и при въздействие с
висок светлинен интензитет**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научната и образователна степен „доктор”
професионално направление 4.3. „Биологически науки”
научна специалност „Биофизика”

Научен ръководител проф. д-р Антоанета Попова
Научен консултант проф. д-р Мая Величкова

София, 2018г.

Дисертационният труд е обсъден на разширен научен семинар на секция „Фотовъзбудими мембрани” на ИБФБМИ-БАН, проведен на 24.10.2018г.

Дисертационният труд съдържа _____ страници, 61 фигури и 3 таблици. Цитирани са 133 литературни източника. Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в 3 научни публикации. Забелязан е 1 цитат.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2018г. отчаса в залата на Институт по физиология на растенията и генетика-БАН, който се намира на ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21, 1113 София, ет. 2. Материалите, свързани със защитата са на разположение на интересувашите се в канцеларията на ИБФБМИ-БАМ, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 105, 1113 София.

Брой представени фигури – 37

Брой представени таблици – 3

Списък на използваните съкращения

АКФ – Активни Кислородни Форми

ССК2 – Светосъбиращ комплекс на фотосистема 2

ФС1 – Фотосистема 1

ФС2 – Фотосистема 2

BQ – Бензохинон

Chl – Хлорофил

F_0 - Минимално ниво на флуоресценцията при отворени ФС2 центрове

F_0' - Минимална флуоресценция при светлинно адаптирано състояние

F_m - Максимална флуоресценция при тъмнинно адаптирано състояние

F_m' - Максимална флуоресценция при светлинно адаптирано състояние

F_s - Стационарна флуоресценция при светлинно адаптирано състояние,

LCP – Точка на светлинна компенсация

LT – Ниска температура

NPQ – Нефотохимично гасене

P700 – Реакционен център на ФС1

$P700^+$ – Окислена форма на реакционен център на ФС1

РАМ - Импулсно Амплитудно Модулиран флуорометър

PI – Фотоинхибиране

qP – Фотохимично гасене

1-qP – Енергетичен натиск върху ФС2

RT – Стайна температура

Y3 – Амплитуда на кислородния добив от третата светкавица при светкавичните кислородни добиви

Φ_{NO} – Квантов добив на нефотохимично гасене по ксантофил независим механизъм

Φ_{NPQ} – Квантов добив на нефотохимичното гасене

Φ_{PSII} – Квантов добив на Фотосистема 2

wt- Див тип

Увод

Въпреки че светлината е движещият енергиен източник в процеса на фотосинтезата, растенията имат само ограничена способност да я възприемат и прекомерно високата светлина може да предизвика странични химични реакции, свързани с формиране на активни кислородни форми (АКФ), които атакуват ДНК, белтъците и мембранните липиди на фотосинтетичния апарат и по този начин оказват негативно въздействие

върху функционирането му. Количеството слънчева светлина досигаща до растенията значително варира в зависимост от различни фактори на околната среда и често се променя бързо. В отговор на неблагоприятните въздействия висшите растения са развили различни протективни механизми, които регулират фотохимичната активност на фотосинтетичните процеси и излишната абсорбирана светлинна енергия да бъде обезвредена под формата на топлина. Тези механизми включват различни ензимно-катализиращи процеси, които обезвреждат излишната погълната светлина и участието на множество спомагателни фотосинтетични пигменти, които обезвреждат АКФ, както и водо- и липо- разтворими антиоксидантни системи. От фотосинтетичните пигменти, които участват в обезвреждането на излишната погълната светлина и обезвреждането на АКФ с най-голямо значение са каротеноидите, разнообразна група от пигментни съединения, които имат и много други функции свързани със структурната организация на пигмент-белтъчните комплекси и процесите протичащи във фотосинтетичния апарат. Най-голямо значение в тези процеси имат ксантофилите, които са свързани с протеините на светосъбиращите комплекси на фотосинтетичния апарат. Освен високият светлинен интензитет и температурата, ниска или висока, също оказва влияние върху промените във фотосинтетичната активност на висшите растения.

Цел и задачи

Целта на настоящото изследване е да се изясни ролята на каротеноидите и най-вече на най-разпространения каротеноид лютеин, чиято основна роля е да обезврежда излишната погълната светлинна енергия чрез гасенето на триплетните форми на хлорофила и активните кислородни форми, за (1) устойчивостта на фотосинтетичния апарат на висши растения към условията на абиотичен стрес – силна светлина при стайна или ниска температура и (2) за организацията на пигмент-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани в условията на висок светлинен интензитет.

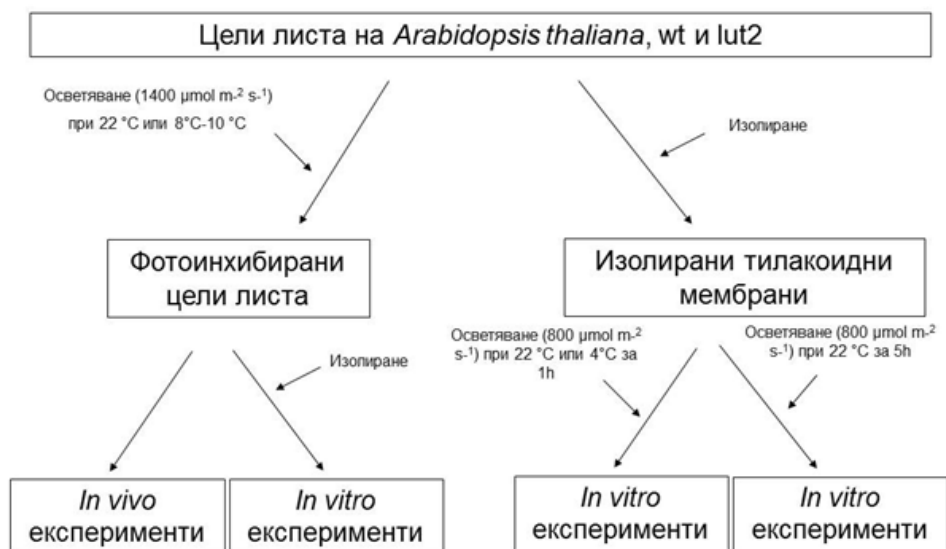
Поставени задачи

1. Да се проследят промените във фотосинтетичната активност и да се установи ролята на лютеина при фотоинхибиране *in vivo* при стайна и при ниска температура на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2.
2. Да се характеризира промяната в активността на ФС1 и ФС2, енергетичното взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси и белтъчния профил на фотосинтетичните комплекси в резултат на третиране с висок светлинен интензитет на изолирани тилакоидни мембрани на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна и ниска температура.

3. Да се проследи степента на светлинно-индуцираното обезцветяване на фотосинтетичните пигменти и степента на деградация на компонентите на светосъбиращите комплекси на ФС1 и ФС2 в изолирани тилакоидни мембрани на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна температура и да се установи ролята на лютеина за тези процеси

1. Материали и методи

Схема на изследванията



Фиг 1 Схема на експерименталната работа.

1.1. Обект на изследване

Обект на изследванията беше *Arabidopsis thaliana* див тип (Col-0) и мутант lut2, при който е неактивен генът за синтеза на α -каротин, ликопен ϵ -циклаза, в следствие на което не се синтезира лютеин.

1.2. Отглеждане на растенията

Растенията бяха отглеждани на почва при контролирани условия (фотопериод 12 часа, осветяване с интензитет $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ при $20^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ дневна/нощна температура) до развитието на четири листа и след това бяха разсадени по две-три в саксия. За експериментите бяха използвани напълно развити растения, преди появата на цветни стъбла, след среден период на растеж от 3-4 седмици.

1.3. Изолиране на тилакоидни мембрани:

Изолирането на тилакоидни мембрани беше извършено по метода, описан в [Velitchkova и Popova, 2005].

1.4. Определяне на пигментното съдържание в тилакоидни мембрани.

Концентрацията на фотосинтетичните пигменти в изолирани тилакоидни мембрани беше определена след добавяне на мембраните в 80% разтвор на ацетон по метода на Lichtenthaler [Lichtenthaler, 1987]

1.5 Определяне на пигментно съдържание в цели листа

Концентрацията на фотосинтетичните пигменти в цели листа беше определена в ацетонов извлек по метода като при изолираните тилакоидни мембрани.

1.6. Третиране с висок светлинен интензитет

1.6.1. Третиране на цели листа с висок светлинен интензитет (*in vivo*)

Напълно развити цели листа на *Arabidopsis thaliana*, див тип и мутант *lut2*, бяха осветявани с бяла светлина от лампа с 16 LED с интензитет $1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, за различни периоди от време: 0, 1.5 ч, 3 ч и 4.5 ч. Осветяването беше проведено при стайна (22°C) или при ниска температура ($8-10^{\circ}\text{C}$).

1.6.2. Третиране на тилакоидни мембрани с висок светлинен интензитет (*in vitro*)

Изолирани тилакоидни мембрани от *Arabidopsis thaliana*, wt и *lut2*, бяха осветявани с бяла светлина с интензитет $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ в продължение на един час при стайна (22°C) или ниска (4°C) температура.

1.6.3. Фотообезцветяване на фотосинтетични пигменти в изолирани тилакоидни мембрани

Експериментите бяха проведени с изолирани тилакоидни мембрани от *Arabidopsis thaliana*, wt и *lut2*, суспендирани в буфер. Осветяването беше осъществено с бяла светлина с интензитет $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ в продължение на пет часа при стайна (22°C) температура.

1.7. Абсорбционни спектри

Абсорбционните спектри бяха измерени в спектрален диапазон 350-800 nm, използвайки спектрометър Specord 210 Plus, Analytic Jena, Jena, Germany.

1.8. Измерване на фотохимичната активност на ФС2 и ФС1.

Фотохимичната активност на ФС2 и ФС1 в изолирани тилакоидни мембрани беше измерена с Кларков електрод за течни проби с помощта на екзогенни електронни донори и акцептори при крайна концентрация на тилакоидните мембрани 0.025 mg Chl/ml при стайна температура (22°C) (Порова и съавт. 2007).

1.9. Определяне на кислородното отделяне при цели листа

Кислородното отделяне от цели листа беше определено на листни дискове с помощта на Кларков електрод снабден с LD1/2 камера за листни дискове. Измерванията бяха проведени при стайна температура (22°C) като се използваха 8 листни диска с обща площ 10 cm² в атмосфера, наситена с CO₂, осигурено от 200 ml 1 M NaHCO₃.

1.10. Нискотемпературна (77K) флуоресценция

Нискотемпературните флуоресцентни спектри бяха измерени с помощта на Jobin Yvon JY3 спектрофлуорометър, снабден с приставка за нискотемпературни измервания и фотоумножител, чувствителен в червената област. Емисионните спектри бяха измерени при възбуждане с 436 nm или с 472 nm в спектралната област 660-780 nm. Спектрите на възбуждане бяха регистрирани при емисия 685 nm (флуоресценция излъчвана от реакционния център на ФС2) при възбуждане в спектрална област 500-410 nm и при емисия 735 nm (флуоресценция излъчвана от комплекса на ФС1) при възбуждане в спектрална област 500-410 nm или 700-610 nm.

1.11. Светкавични кислородни добиви и първоначално кислородно избухване при постоянно осветяване на изолирани тилакоидни мембрани

Измерванията на светкавичните кислородни добиви бяха проведени с изолирани тилакоидни мембрани от контролни и третиран с висок светлинен интензитет за 4.5 ч. цели листа на wt и lut2, а също така и на контролни и светлинно третирани тилакоидни мембрани за различен период от време (20, 40 и 60 мин). Измерването беше направено по метода, описан в [Ророва и съавт., 2007].

1.12. Измерване на хлорофилната флуоресценция с помощта на РАМ (pulse amplitude modulated) флуорометър

1.12.1 Определяне параметрите на активността на ФС2 на цели листа.

Бяха проведени измервания на цели листа, контролни и осветявани за различен период от време (1.5, 3 и 4.5 ч.) при две различни температури, стайна (22°C) и ниска (8-10°C), като бяха определени следните основни флуоресцентни параметъра: F_0 - минимално ниво на флуоресценцията при тъмнинно адаптирано състояние, F_0' - минимална флуоресценция при светлинно адаптирано състояние, F_m - максимална флуоресценция при тъмнинно адаптирано състояние, F_m' - максималната флуоресценция при светлинно адаптирано състояние и F_s - стационарна флуоресценция при светлинно адаптирано състояние.

Основните фотосинтетични показатели бяха изчислени по формулите, описани в [Maxwell и Johnson, 2000]:

Максимален квантов добив на ФС2 в тъмнинно адаптирано състояние: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$

Фотохимично гасене: $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$

Енергетичен натиск върху ФС2: $1 - qP = 1 - (F_m' - F)/(F_m' - F_0')$

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

Квантов добив на електронен транспорт през ФСII: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$

Квантов добив на нефотохимично гасене (NPQ): $\Phi_{NPQ} = (F_s/F_m' - F_s/F_m)$

Квантов добив на гасенето на флуоресценцията по независим от ксантофиловия цикъл механизъм: $\Phi_{NO} = F_s/F_m$

1.12.2. Измерване на максималната квантова ефективност на ФС2 при изолирани тилакоидни мембрани

Измененията в максималната квантова ефективност на ФС2 (F_v/F_m) бяха проследени в контролни и в осветени с висок светлинен интензитет тилакоидни мембрани за различен период от време – 0, 20, 40 и 60 мин.

1.12.3. Определяне на окислително-редукционното състояние на ФС1 в цели листа.

Окислително-редукционната кинетика на P700 беше измерена с флуорометър PAM-101/103 (Walz, Effeltrich, Germany) и емитер-детекторната система ED-800T. Измерванията бяха проведени при стайна температура.

Редокс състоянието на P700 беше определено от промяната на индуцираната от червена светлина промяна на абсорбцията в областта на 820 nm. Цикличният електронен транспорт около ФС1 беше оценен чрез регистриране на времето на полуспад на флуоресценцията при ре-редукцията на $P700^+$ след изключване на червената светлина [Ivanov и съавт., 1998].

1.13. Електрофореза и имунодетекция

Измененията в белтъчния профил в тилакоидни мембрани, изолирани от контролни и осветени в продължение на 4.5 ч. при стайна или ниска температура цели листа от дивия тип и мутанта и от контролни и осветени за 3 и 5 ч. при стайна температура с $800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ изолирани тилакоидни мембрани бяха анализирани с помощта на SDS-PAGE електрофореза, модифицирана с добавяне на 4М урея в разделящия гел по метода Laemmli [Laemmli, 1970]. След трансфер на белтъците от гела върху PVDF мембрана и блокирането ѝ, беше проведена имунодетекция с използване на антитела за Lhca1 (компонент на светосъбиращия комплекс на ФС1), Lhcb2 (компонент на светосъбиращия комплекс на ФС2), PsbS (белтък, принадлежащ към комплекса на ФС2, за който се предполага, че е свързан с процеса на нефотохимично гасене), PsbA

(D1 протеина на ФС2) и PsbV (реакционен център на ФС1). Денситометричния анализ беше извършен с помощта на програмата Phoretix (Phoretix International, Newcastle upon Tyne, UK) и резултатите бяха представени като процент от сигналите от съответните контролни проби.

1.14. Статистическа обработка на резултатите

Данните от проведените изследвания са представени като средни стойности от поне 3 независими експеримента с поне 2 паралелни измервания. Статистически значимите разлики са обозначени след оценка с Т тест и са отбелязани със звезда (* - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, *** - $P < 0.001$).

2. Резултати

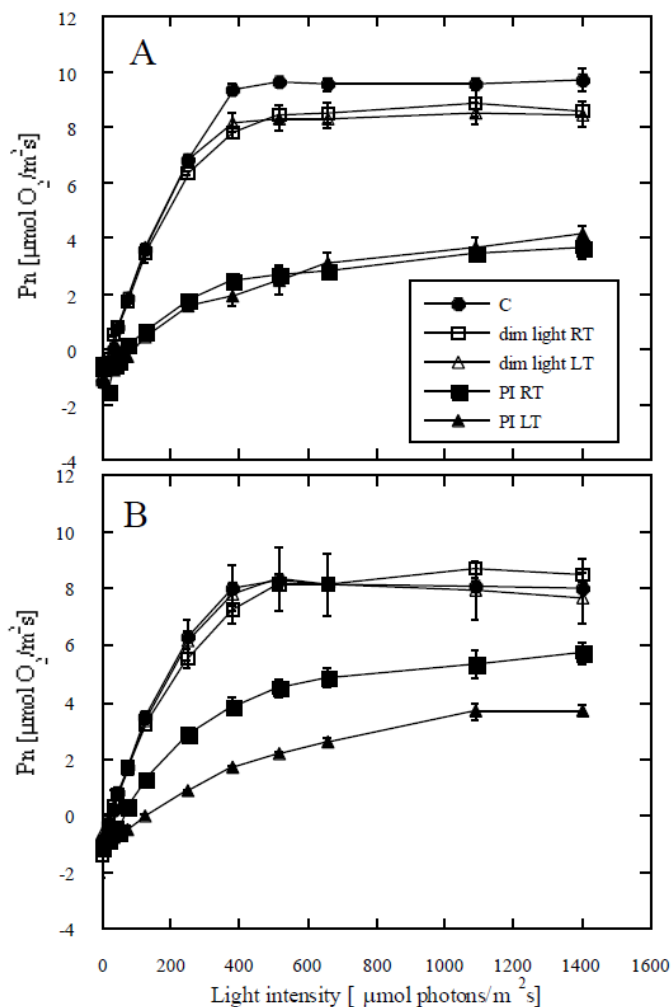
2.1. Промени във фотосинтетичната активност на цели листа, от *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, третирани *in vivo* с висок светлинен интензитет при стайна (22°C) и ниска (8-10°C) температура.

Ефектът на отсъствието на лютеин върху фотосинтетичните процеси беше изследван по отношение на максималния квантов добив на ФС2 (F_v/F_m), енергетичният натиск върху ФС2 ($1-q_P$), и на квантовите добиви на отделните процеси на обезвреждане на излишната погълната светлинна енергия - на нефотохимичното гасене (NPQ) и на нефотохимично гасене независимо от ксантофиловия цикъл, енергетичното взаимодействие на основните пигмент-белтъчни комплекси и на кислород отделящата активност на листа от висшето растение *Arabidopsis thaliana* при осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) при две различни температури - стайна (22°C) и ниска (8-10°C) температура. За тази цел бяха използвани растения на *Arabidopsis thaliana* - див тип (wt) и мутант lut2. Измерванията с РАМ флуорометър на цели листа бяха проведени на контролни, неосветявани, и фотоинхибирани за различен период от време (1.5, 3 и 4.5 ч.) цели листа. Промените във фотохимичната активност на двете фотосистеми, енергетичното взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси и активността на кислород отделящата система бяха проведени на изолирани тилакоидни мембрани от контролни и фотоинхибирани за 4.5 ч. при двете температури на напълно развити цели листа.

2.1.1. Промени в активността на кислородно отделяние *in vivo* на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при третиране с висок светлинен интензитет.

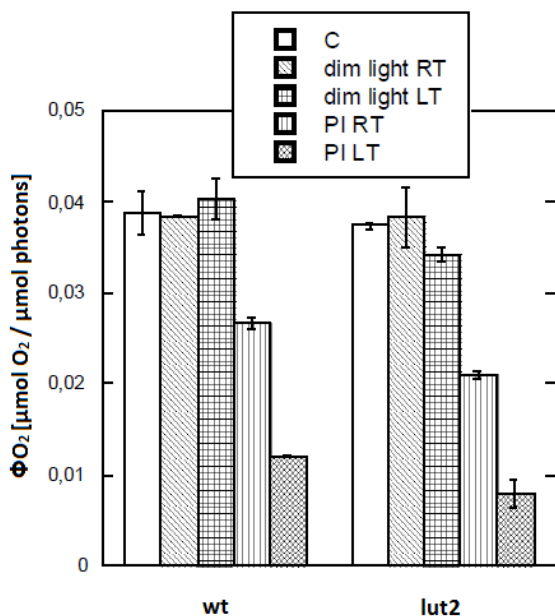
Ефективността на фотосинтетичните процеси беше определена по количеството отделен кислород от листни дискове от контролни, инкубирани при разсеяна светлина за 4.5 ч. при стайна (22°C) и ниска (8-10°C) температура и фотоинхибирани за 4.5 ч. при двете температури, чрез регистриране на количеството кислород отделен при

осветяване с нарастващ интензитет на светлината. На Фиг. 2 е представена зависимостта на кислородното отделяне от интензитета на светлината (светлинни криви) при див тип (A) и мутант *lut2* (B).



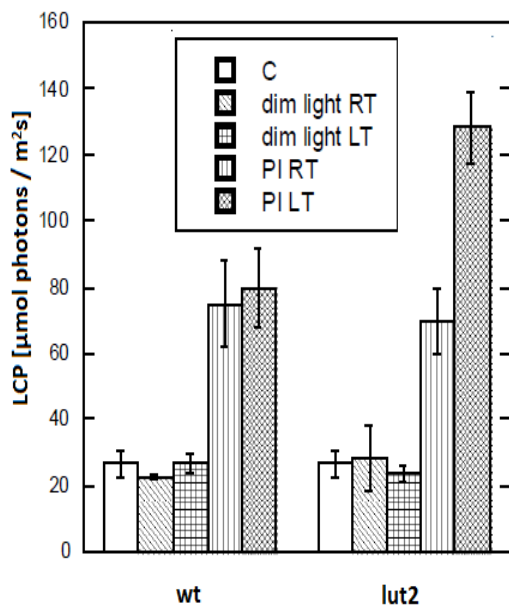
Фиг. 2 Зависимост на кислородното отделяне при листни дискове от цели листа на wt (A) и *lut2* (B) от интензитета на светлината (светлинни криви). Листните дискове са от контролни (неосветени) листа, от листа инкубирани 4.5 ч. при разсеяна светлина при стайна или при ниска температура и от фотоинхибирани с $1400 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ цели листа при стайна или при ниска температура. Кислородното отделяне беше отчетено при осветяване с 650 nm и увеличаващ се интензитет. Представени са средните стойности $\pm$ std, изчислени от три независими експеримента с три паралелни проби за всяка точка.

Стойностите на квантовата ефективност на кислородното отделяне (ΦO_2) (фиг. 3), изчислен от наклона на светлинната крива при нисък интензитет на светлината (фиг. 2) намаляват при осветяване с висока светлина, като това е по-силно изразено при *lut2*. Намалението е зависимо от температурата, при която се осъществява третирането, като стойностите на ΦO_2 намаляват с 30% и 45% съответно при wt и *lut2* при стайна температура и 70% и 80% при ниска температура.



Фиг. 3 Квантова ефективност на кислородното отделяне (ΦO_2) при контролни, инкубирани при разсеяна светлина и фотоинхибирани за 4.5ч. с интензитет $1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ при стайна и ниска температура цели листа, изчислена от светлинните криви на фиг. 3. Всяка стойност е изчислена от три независими експеримента, с изчислена стандартна грешка.

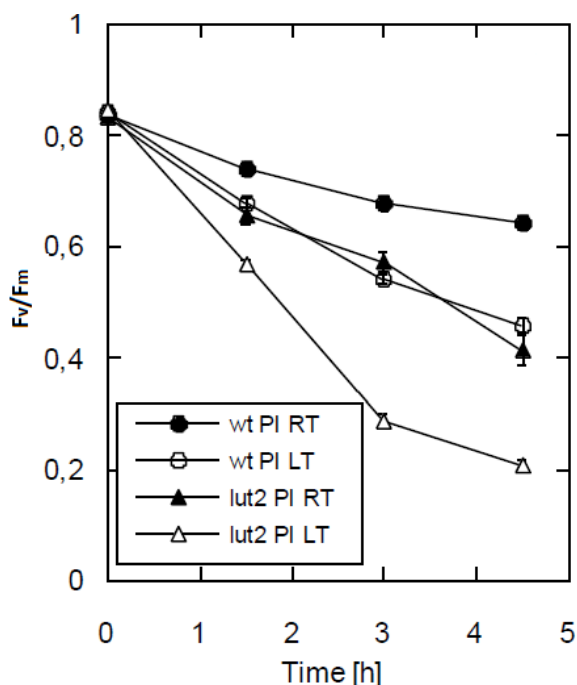
Стойностите на точката на светлинна компенсация (LCP) (параметър свързан с увеличението на тъмнинната респирация и показваща точката, при която се изравнява кислородното отделяне и поглъщане) са представени на фиг. 4. LCP значително нараства при фотоинхибиране на листа от wt и lut2, като този процес е температурно зависим при lut2. За wt и lut2 стойностите на този параметър са подобни при контролните и инкубираните при разсеяна светлина листа (между 23 и $28 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), като при фотоинхибиране тази величина е увеличена до три пъти за wt при стайна и ниска температура и за lut2 при ниска температура (съответно 75 , 80 и $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) и до шест пъти за lut2 при ниска температура – $128 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.



Фиг. 43 Точка на светлинна компенсация (LCP) на контролни, инкубирани при разсеяна светлина и фотоинхибирани (с интензитет $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) при стайна или ниска температура цели листа на див тип и мутант lut2, изчислени от светлинните криви на фиг. 3. Всяка стойност е изчислена от три независими експеримента, с изчислена стандартна грешка.

2.1.2. Промени във фотосинтетичните параметри на ФС2, при осветяване на цели листа с висок светлинен интензитет.

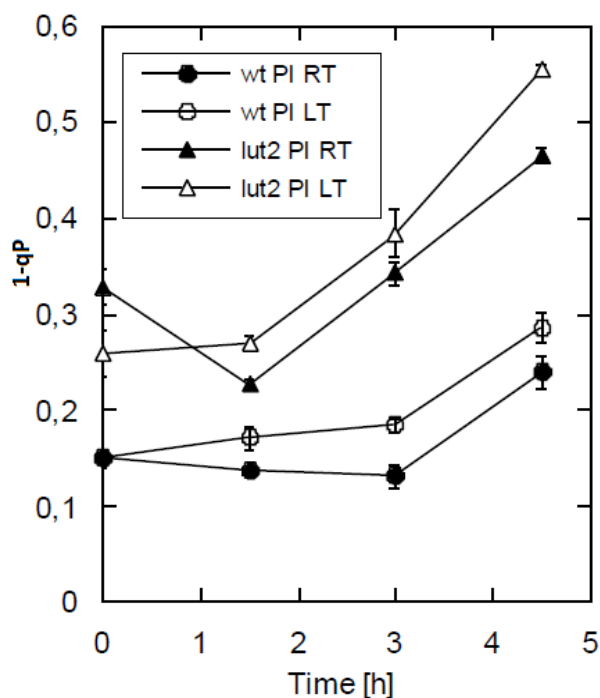
С помощта на РАМ флуорометър бяха регистрирани промените в параметрите, характеризиращи активността на ФС2 на цели листа на *Abidopsis thaliana*, wt и lut2, вследствие на осветяване с висок светлинен интензитет за различни периоди от време при стайна или при ниска температура. F_v/F_m за неосветените листа е много сходен при wt и lut2, което корелира с данни от литературата [Niyogi и съавт., 2001]. Зависимостта на F_v/F_m от времето на осветяване с висока светлина за wt и lut2 е представена на фиг. 5. Стойността на F_v/F_m постепенно намалява с увеличаване времето на осветяване при wt и lut2, но в различна степен. При wt намалението е до 77% от първоначалната стойност, а при lut2 наблюдаваното намаление е по-интензивно, достигайки до 50% от първоначалната стойност след 3ч. При провеждане на осветяването при ниска температура, намаляването на F_v/F_m протича значително по-бързо отколкото при стайна температура, като кривата на намаление при wt при ниска температура е сходна с тази за lut2 при стайна температура. За wt и за lut2 се наблюдава 25% по-ниска стойност за F_v/F_m в края на периода на осветяване в сравнение със стойностите, измерени при стайна температура.



Фиг. 5 Промяна в максималния квантов добив на ФС2 (F_v/F_m) в зависимост от времето на осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) на цели листа от wt и lut2 при стайна (22°C) (RT) или ниска ($8-10^\circ\text{C}$) (LT) температура. Представени са средните стойности, изчислени от 8 независими експерименти с 4 паралелни измервания $\pm$ стандартната грешка (SE).

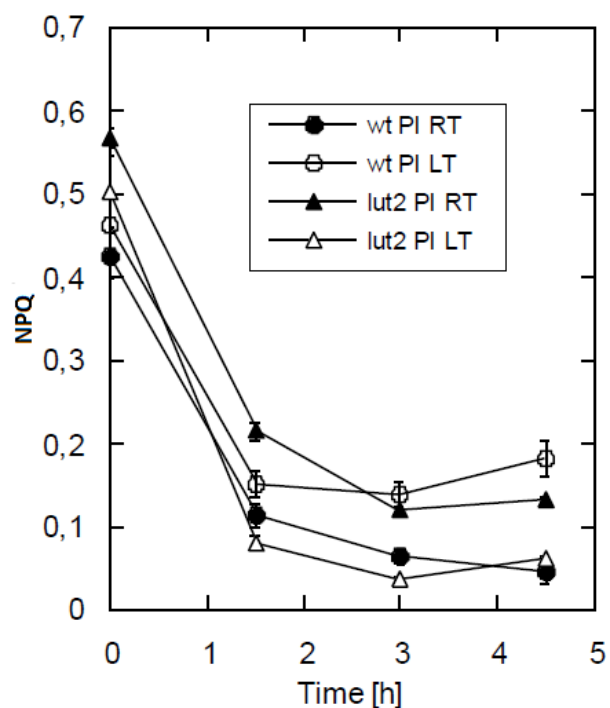
При измерване на енергетичният натиск върху ФС2 (1-qP) (фиг. 5) се наблюдава умерено нарастване на тази стойност при wt, като се наблюдава значително увеличение едва след 3ч осветяване, по-силно изразено при ниска температура. За lut2

се наблюдава много по-значително увеличение, и то още след 1.5ч на осветяване. Тук също увеличението е по-силно изразено при ниска температура.



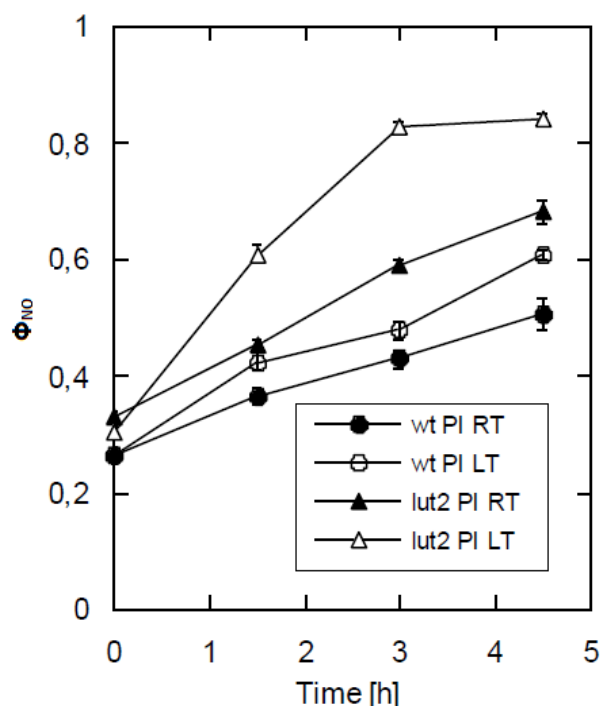
Фиг. 7 Промяна на енергетичният натиск върху ФС2 (1-qP) в зависимост от времето на осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) на цели листа от wt и lut2 при стайна (22°C) (RT) или ниска ($8-10^{\circ}\text{C}$) (LT) температура. Представените средни стойности $\pm$ стандартната грешка (SE) са получени от 8 независими експерименти с 4 паралелни измервания.

Способността на фотосинтетичния апарат да обезврежда излишната абсорбирана светлинна енергия беше регистрирана с промените в нефотохимичното гасене (NPQ) при стайна и при ниска температура (фиг. 7). Процесът на (NPQ) зависи от формирането на ΔpH и на функционирането на ксантофиловия цикъл. След 1.5ч осветяване се наблюдава силно намаление на нивото на NPQ, което не се променя съществено до края на периода на осветяване. Наблюдаваните промени са сходни при wt и lut2 и не зависят от температурата при която се осъществява осветяването.



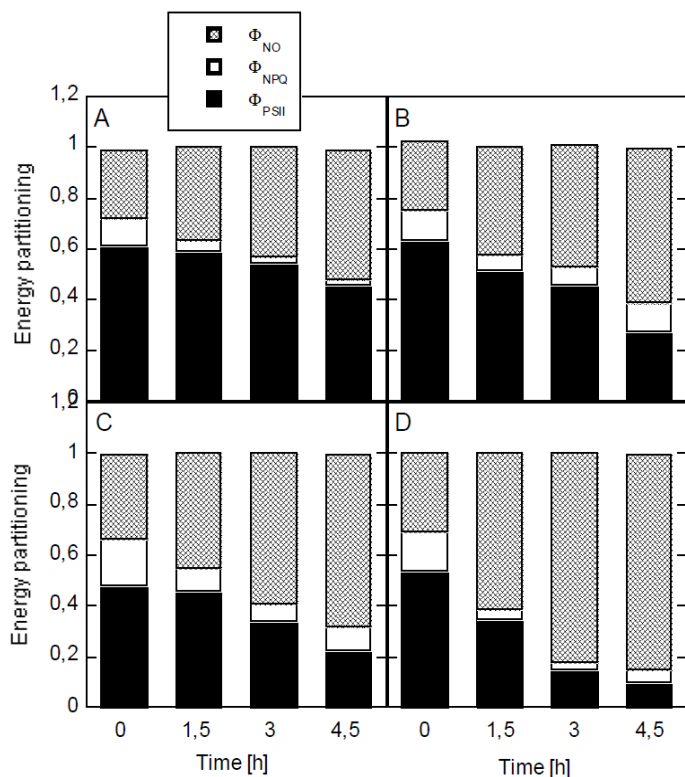
Фиг. 7 Промяна на нефотохимичното гасене (NPQ) в зависимост от времето на осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) на цели листа от wt и lut2 при стайна (RT) - 22°C и ниска (LT) температура - $8-10^{\circ}\text{C}$. Представените средни стойности $\pm$ стандартната грешка (SE) са получени от 8 независими експерименти с 4 паралелни измервания.

Бяха анализирани и промените в обезвреждането на излишната абсорбирана светлинна енергия чрез сравняване на промяната в нефотохимичното гасене на енергията по механизъм, който не зависи от функционирането на виолаксантиновия цикъл (Φ_{NO}). Резултатите са представени във фиг. 8. Докато при контролите не се наблюдават значителни различия между wt и lut2 с увеличаване на времето на осветяване с висок светлинен интензитет квантовата ефективност на обезвреждане на излишната погълната енергия по механизми, независещи от активността на виолаксантиновия цикъл (Φ_{NO}) нараства, като това е по-силно изразено при мутанта в сравнение с дивия тип. Освен това при осветяване при ниска температура се ускорява степента на нарастване на Φ_{NO} при wt и lut2 в сравнение с осветяване при стайна температура. Това може да се оцени от стойността на Φ_{NO} в края на измервания период при lut2 осветен при ниска температура - 0.82, в сравнение с 0.60 при wt при ниска температура.



Фиг. 8 Промяна на квантов добив на Φ_{NO} в зависимост от времето на осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) на цели листа от wt и lut2 при стайна (RT) - 22°C и ниска (LT) температура - $8-10^{\circ}\text{C}$. Представените средни стойности $\pm$ стандартната грешка (SE) са получени от 8 независими експерименти с 4 паралелни измервания.

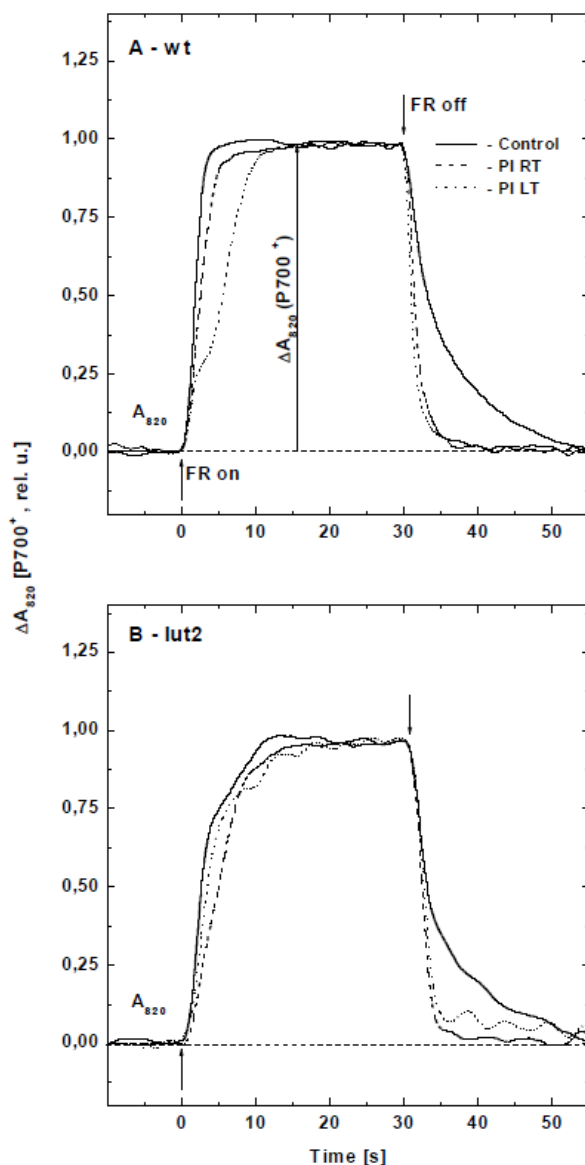
Беше направена графика на квантовата ефективност на отделните процеси на гасене на погълната светлинната енергия и на тази, която се оползотворява във фотосинтетичния процес: Φ_{PSII} отговаряща на квантовата ефективност на ФС2, Φ_{NPQ} квантовата ефективност на NPQ и Φ_{NO} - на обезвреждането по механизъм независещ от функционирането на ксантофиловия цикъл (фиг. 9). При lut2 се наблюдават 20% по-ниски стойности за Φ_{PSII} в сравнение с wt при контролите. Във всички случаи се наблюдава нарастване на Φ_{NO} , и съответно намаляване на Φ_{PSII} като това е по силно изразено за lut2, отколкото за wt. Тенденцията при осветяване при ниска температура е аналогична, но изразена в по-голяма степен както за wt, така и за lut2.



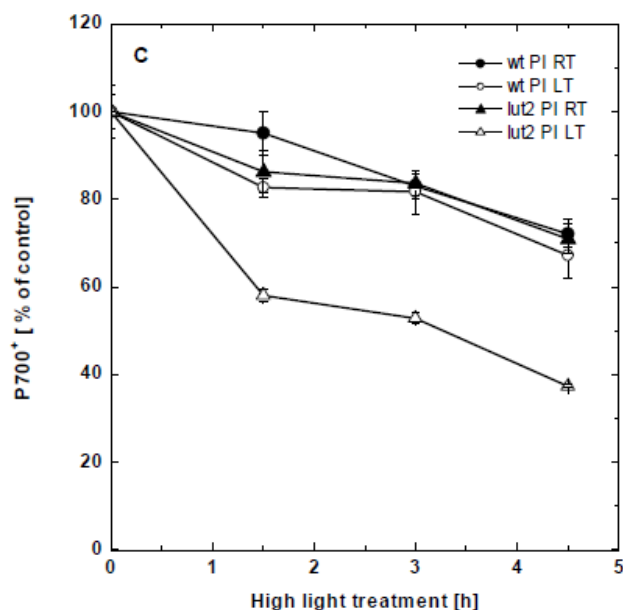
Фиг. 9 Промени в разпределението на погълнатата светлинна енергия между Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} и Φ_{NO} в зависимост от времето на осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) на цели листа от wt (A и B) и lut2 (C и D) при стайна (A и C) и ниска температура (B и D). Представените средни стойности $\pm$ стандартната грешка (SE) са получени от 8 независими експерименти с 4 паралелни измервания.

2.1.3. Промени в редокс състоянието на P700 при осветяване на цели листа с висок светлинен интензитет

Промените в редокс състоянието на P700 в резултат на осветяване с висок светлинен интензитет при различна температура бяха оценени след осветяване с дълговълнова червена светлина (715 nm) на тъмнинно адаптирани цели листа от wt и lut2. На фиг. 10 са показани нормирани записи на окислението и ре-редукцията на $P700^{+}$ в контролни и осветявани с висок светлинен интензитет при стайна или ниска температура листа на wt (A) и lut2 (B). На фиг. 11 са показани редокс състоянието като процент от първоначалната стойност за wt и lut2 при стайна или ниска температура.



Фиг. 10 Редокс състояние на P700 при контролни (плътна линия) и фотоинхибирани за 4.5 ч. цели листа (пунктирани линии) при стайна или ниска температура, wt (A) и lut2 (B), при осветяване с инфрачервена светлина (715 nm). Със стрелки е показано последователното включване и изключване на инфрачервената светлина



Фиг. 11 Светлинно-индуцирано окисление на P700 в зависимост от времето на осветяване с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) при стайна или ниска температура на wt и lut2 цели листа, представено като процент от стойността на P700+ при неосветени контролни листа. Средните стойности са получени от 3 независими експеримента с по 4 повторения за всяка точка, с изчислена стандартна грешка.

С увеличаване времето на осветяване нивото на окисление на P700 намалява, като това намаление е в еднаква степен за wt при стайна и при ниска температура и съизмеримо при листа на lut2, осветявани при стайна температура. За lut2 при ниска температура се наблюдава значително по-голямо намаление с увеличаване времето на осветяване. След изключване на осветяването с дълговълнова червена светлина P700⁺ се редуцира. От трасето на редукция на P700⁺ може да се определи полувремето на спада ($t_{1/2}$), което се счита, че е индикация за ефективността на цикличния електронен транспорт около ФС1 (Maxwell и Biggins, 1976; Millaleo и съавт., 2013). Получените стойности са представени в Таблица 1. Стойността на полуспад при неосветени листа е по-ниска при lut2 отколкото за wt, което показва, че цикличния електронен транспорт около ФС1 протича по-бързо при мутанта lut2. С увеличаване времето на осветяване времето за полуспад намалява, по-бързо при wt в сравнение с lut2, както при стайна така и при ниска температура. За максималния период на осветяване, 4.5ч., не се наблюдават значителни различия между wt и lut2.

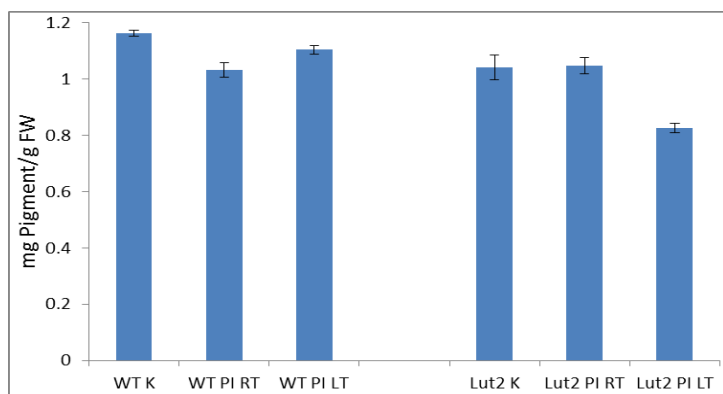
Таблица 1. Стойности на времето за полуспад на ре-редукцията на P700⁺ при контролни и осветявани с висок светлинен интензитет листа на wt и lut2 при стайна или ниска температура за различен период от време. Статистически значими изменения между контролни и третирани листа са отбелязани със звезда (*- P<0.05, ** - P<0.01, *** - P<0.001), докато с плюс са отбелязани статистически значителните различия между неосветените wt и lut2 листа (+- P<0.05, ++ - P<0.01, +++ - P<0.001). Резултатите са получени от 4 независими експеримента с 4 паралелни измервания и е изчислена стандартната грешка.

Time of treatment [h]	$t_{1/2}$ [s]			
	wt		lut2	
	HL RT	HL LT	HL RT	HL LT
0	2,194 ± 0,085	2,067 ± 0,042	1,438 ± 0,101 ++	1,163 ± 0,095 ++
1.5	1,485 ± 0,043 ***	1,125 ± 0,034 ***	1,342 ± 0,142	0,942 ± 0,137
3	1,408 ± 0,065 ***	0,902 ± 0,020 ***	0,986 ± 0,012 **	0,817 ± 0,015 *
4.5	0,953 ± 0,028 ***	0,780 ± 0,045 ***	0,983 ± 0,127 *	0,819 ± 0,127 *

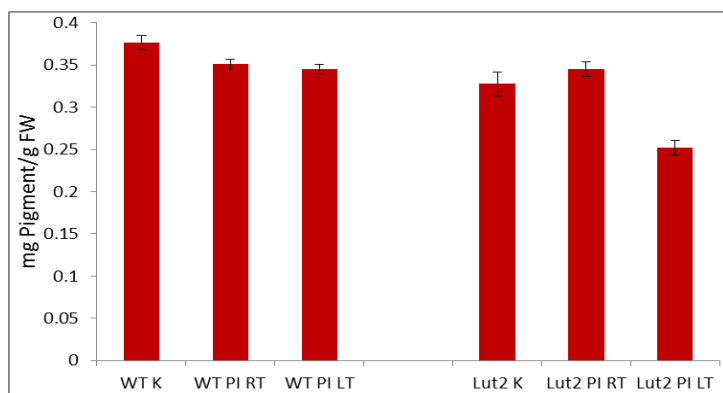
2.1.4.

Промените в концентрацията на фотосинтетичните пигменти при третиране на цели листа на *Arabidopsis thaliana*, див тип и мутант lut2, с висок светлинен интензитет

Промените в концентрацията на фотосинтетичните пигменти (обща концентрация на хлорофил а и б и концентрацията на каротеноиди) бяха определени в цели листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, неосветени контроли и листа, осветени с висок светлинен интензитет в продължение на 4.5 ч. Резултатите са представени във фиг. 12 (хлорофил а+б) и фиг. 3 (каротеноиди).



Фиг. 12 Концентрация на хлорофил а+б (mg пигменти на грам свежо тегло) при контролни (K) и фотоинхибирани (PI) цели листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна и при ниска температура.



Фиг. 13 Концентрация на общото количество на каротеноидите (mg пигменти на грам свежо тегло) при контролни (K) и фотоинхибирани (PI) цели листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна и при ниска температура. Средните стойности са получени от 3 независими експеримента с по 3 повторения за всяка точка, с изчислена стандартна грешка.

При неосветени листа се наблюдават различия в пигментния състав на wt и lut2, като при lut2 се наблюдава по-ниска обща концентрация на общия хлорофил и на каротеноидите. При фотоинхибиране при стайна температура няма значителни изменения при lut2 и само малко намаление при wt – със 12% и 7% съответно на общата концентрация на хлорофил и на каротеноидите. При wt се наблюдават подобни изменения и при фотоинхибиране при ниска температура, докато при lut2 при фотоинхибиране при ниска температура се наблюдава значително намаляване на концентрацията на пигментите - с 30% на общата хлорофилна концентрация и с 33% на концентрацията на каротеноидите, което е най-вероятно свързано с по-голямата уязвимост към фотообезцветяване на пигментите.

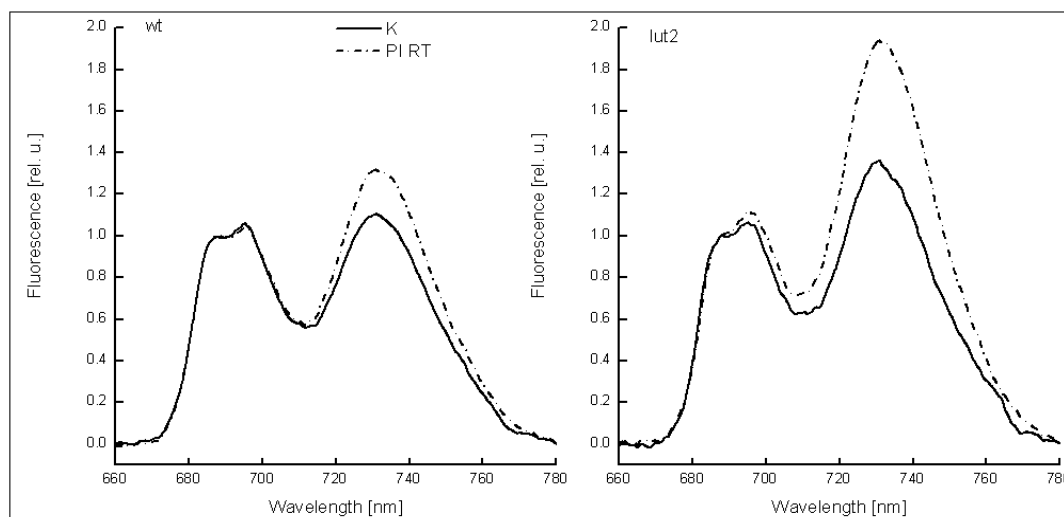
2.1.5. Промени във фотосинтетичната активност на тилакоидни мембрани, изолирани от листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, третирани с висок светлинен интензитет.

2.1.5.1. Енергетично взаимодействие между основните пигмент белтъчни комплекси в изолирани тилакоидни мембрани от контролни и фотоинхибирани цели листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2.

За да бъдат изследвани промените в енергетичното взаимодействие между светосъбиращия комплекс на ФС2 и реакционния център на ФС2, както и

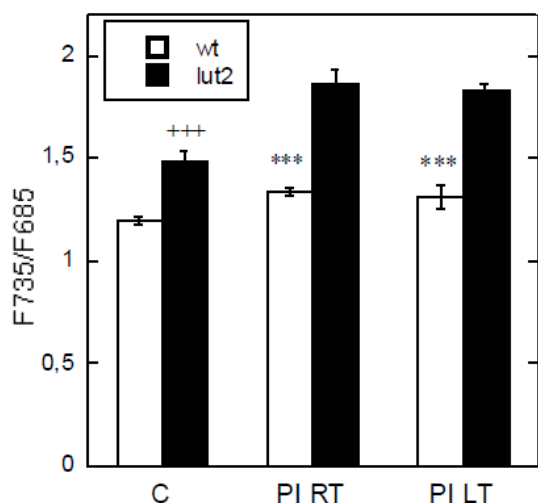
разпределението на енергия между ФС2 и ФС1 в wt и lut2 при фотоинхибиране на цели листа за 4.5 ч. бяха измерени ниско-температурните (77K) флуоресцентни спектри на изолирани тилакоидни мембрани от контролни листа и от листа, осветени с висок светлинен интензитет за 4.5ч. при стайна и при ниска температура .

При емисионните спектри се наблюдават три основни пика в областта 660 - 780 nm - при 685, 695 и 735 nm. Пиковите при 685 и 695 nm се приписват съответно на реакционния център на ФС2 и на компонента на коровата антена на ФС2 - CP47, съответно, докато флуоресценцията при 735 nm се излъчва от комплекса на ФС1. Промените в енергетичните взаимодействия в пигмент-белтъчния комплекс на ФС2, както и разпределението на енергията между ФС2 и ФС1 водят до промени на относителните стойности на трите основни флуоресцентни пика и съответно отношенията F685/F695 и F735/F685 могат да бъдат използвани за анализ. Емисионните спектри бяха записани при възбуждане с 436 nm (възбуждане на хлорофил а, и с 472 nm (възбуждане на хлорофил б). На фиг. 14 са представени емисионните спектри при възбуждане с 436 nm на тилакоидни мембрани изолирани от контролни и фотоинхибирани при стайна температура листа на wt и lut2 (зависимостите при ниска температура не се различават съществено от тези при стайна температура). Осветяването с висок светлинен интензитет води до намаляване на излъчената флуоресценция, изразено в намаляване на площта под флуоресцентния спектър. Пика при 735 nm е относително по-висок при lut2 отколкото при wt при тилакоидните мембрани, изолирани от неосветените листа, като при фотоинхибиране относителната стойност на този пик се увеличава, като това е по-силно изразено при lut2.



Фиг. 14 Нискотемпературни емисионни флуоресцентни спектри на изолирани тилакоидни мембрани от контролни и осветени при стайна температура за 4.5 ч. цели листа от wt и lut2 при възбуждане на флуоресценцията с 436 nm. Спектрите са нормализирани при 685 nm след изваждане на тъмнинното ниво. Концентрацията на хлорофила беше 15 $\mu\text{g Chl/ml}$.

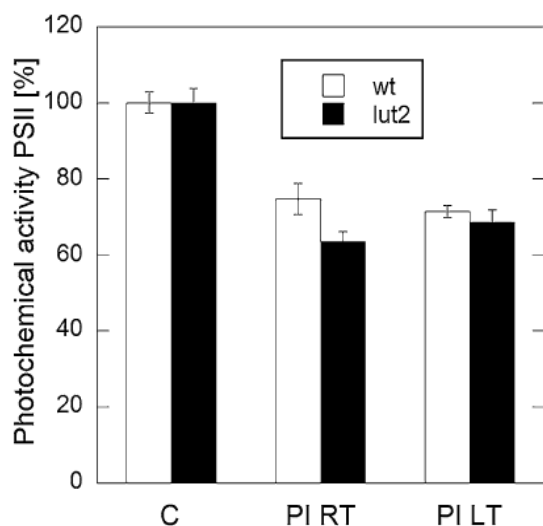
Под въздействието на третиране с висока светлина, ниска температура и други стресови фактори настъпва реорганизация на пигмент-белтъчните комплекси и тяхната стехиометрия, водещи до промени във флуоресцентните отношения. Вследствие на фотоинхибиращото третиране се увеличава относителното ниво на флуоресценцията при 735 nm и се наблюдава съответно увеличение на отношението F735/F685 (Фиг. 15) което може да се дължи или на растиковане на тилакоидните мембрани и мигриране на светосъбиращите комплекси на ФС2 към разположените в стромалните участъци на тилакоидните мембрани ФС1, което е механизъм за защита на по-уязвимите към висока светлина ФС2 комплекси и/или поради намаляване на флуоресценцията от реакционния център на ФС2 поради гасене на флуоресценцията [Bruse и съавт., 1997; Horton и Ruban, 1992]. Показано е, че в *in-vitro* системи (изолирани тилакоидни мембрани) е наблюдавано формиране на гасител на флуоресценцията в донорната страна на реакционния център (Chl 680⁺). При тилакоидни мембрани, изолирани от неосветени wt и lut2 листа флуоресцентното отношение F735/F685 при lut2 е по-високо от това на дивия тип което най-вероятно е свързано с по-голяма популация на ФС1 комплекси, или на по-голям брой стромали участъци или на повече енергия насочена към комплексите на ФС1. В резултат на осветяване с висок светлинен интензитет за 4.5ч. отношението F735/F685 се увеличава при wt от 1.192 до 1.336 и 1.308, съответно, при стайна и при ниска температура (съответно 10% и 12% увеличение) и от 1.48 до 1.865 и 1.830, съответно, при стайна и при ниска температура – 26% и 24% увеличение, за lut2, което показва, че процесите, стоящи в основата на механизма на това увеличение - растиковане на тилакоидните мембрани или образуване на флуоресцентен гасител във ФС2, са подобни, но се осъществяват в по-голяма степен при мутанта. При възбуждане на хлорофил б (възбуждане с 472nm), който се намира само в светосъбиращите комплекси се наблюдават подобни промени в отношението F735/F685.



Фиг. 15 Флуоресцентното отношение F735/F685 при емисионни спектри от изолирани тилакоидни мембрани на контролни и фотоинхибирани цели листа, wt и lut2 при стайна и ниска температура за 4.5 ч. Резултатите са получени от 3 независими експеримента с по 2 паралелни измервания, с изчислена стандартна грешка. Статистически значими изменения между контролните и третирани листа са отбелязани със звезда (* - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, *** - $P < 0.001$). С плюс са отбелязани статистически значимите различия между тилакоидните мембрани от неосветените wt и lut2 листа (+ - $P < 0.05$, ++ - $P < 0.01$, +++ - $P < 0.001$).

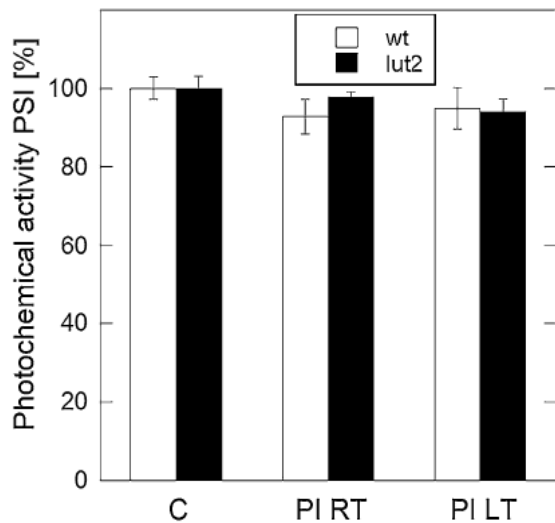
2.1.5.2. Фотохимична активност на ФС2 и ФС1

За по-подробно изследване на промените настъпващи в активността на двете фотосистеми беше проследена промяната във фотохимичната активност на ФС2 и ФС1 в тилакоидни мембрани, изолирани от контролни и фотоинхибирани при стайна или ниска температура цели листа за 4.5ч. на wt и lut2. Промените във фотохимичната активност на ФС2 и ФС1 бяха проследени с помощта на изкуствени електронни донори и акцептори. Фотохимичната активност на ФС2 (фиг. 15) при тилакоидни мембрани изолирани от контролни, неосветени, листа е с 30% по ниска при lut2 в сравнение с wt, което показва, че е възможно количеството на функциониращите ФС2 или тяхната относителна активност да е по-висока при wt. Фотохимичната активност на ФС1 (фиг. 16) за неосветените контроли при wt е с 20% по-ниска в сравнение с тази при lut2, което показва, че за lut2 е възможно да се наблюдава повече стромални участъци и съответно повече ФС1 комплекси. Тези резултати са в съгласие с публикуваните данни [Hundal и съавт., 1990]. Електронният транспорт през ФС2, определена в присъствието на електронен акцептор (1,4-BQ), е намалена при тилакоидни мембрани, изолирани от фотоинхибирани в продължение на 4.5ч. на wt и lut2. В процеса на осветяването със силна светлина фотохимичната активност на ФС2 при wt намалява с около 30% в сравнение с мембраните, изолирани от неосветени листа, и с 40% за тилакоидните мембрани изолирани от фотоинхибираните lut2 листа. При wt и lut2 индуцираното от осветяване с висока светлина намаление на фотохимичната активност на ФС2 не се влияе съществено от температурата при която е осъществено осветяването.



Фиг. 16 Фотохимична активност на ФС2 при изолирани тилакоидни мембрани от контролни и фотоинхибирани цели листа, wt и lut2, при стайна или ниска температура за 4.5 ч. в присъствието на електронен акцептор 1-4 BQ, като процент от стойностите измерени за тилакоидни мембрани от контролни, неосветени листа (за wt – 100%=24.08±1.51 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$ а за lut2 – 100%=16.01±0.53 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$). Средните стойности са изчислени от 3 независими експерименти с 2 паралелни измервания проби, с изчислена стандартна грешка.

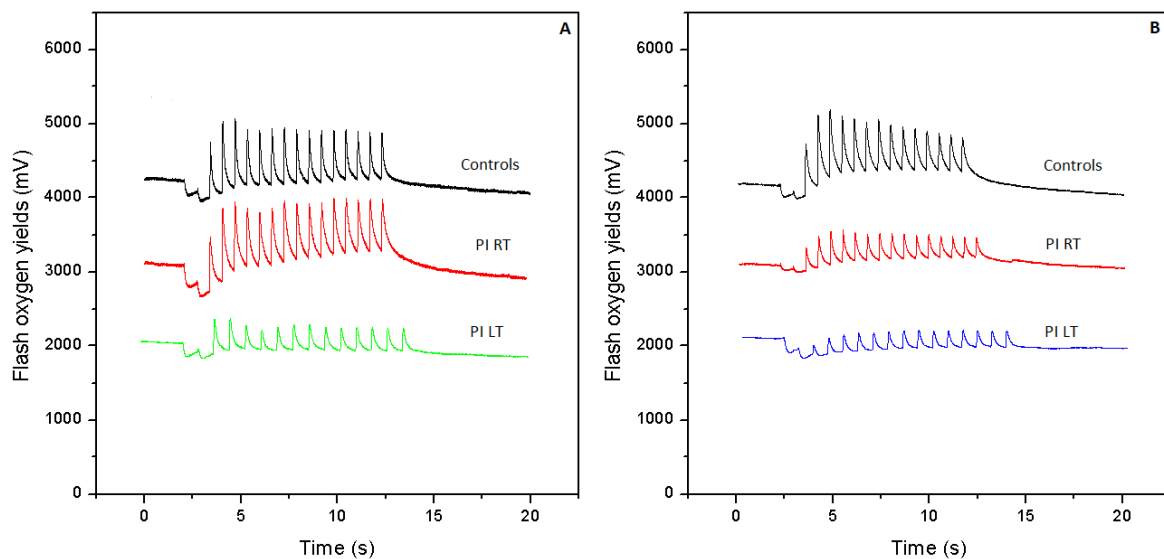
При фотохимичната активност на ФС1, определена с помощта на изкуствени електронни донори и акцептори, (фиг. 17) не се наблюдават значителни изменения, което е валидно и за wt, така и за lut2.



Фиг. 17 Фотохимична активност на ФС1 при изолирани тилакоидни мембрани на контролни и фотоинхибирани цели листа, wt и lut2, при стайна и ниска температура за 4.5ч. в присъствието на електронен донор дихлорфенолиндифенол редуциран с 4 mM Na аскорбат и електронен акцептор метилвиологен, като процент от стойностите измерени за неосветени листа (за wt – 100%=98.72±16.51 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$, а за lut2 – 100%=119.11±6.12 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$). Резултатите са получени от 3 независими експерименти с 2 отделни проби, с изчислена стандартна грешка.

2.1.5.3. Активност на кислород-отделящата система – светкавични кислородни добиви и кислородно избухване при постоянно осветяване.

Като се има предвид, че осветяването с висок светлинен интензитет води до инхибиране на основните фотосинтетични процеси, като в най-голяма степен се засяга ФС2, беше изследвана активността на кислород отделящата система, свързана откъм лумена към ФС2, която е най-уязвима към стресови въздействия. Беше изследвана промяната в активността на кислород отделящата система в изолирани тилакоидни мембрани от контролни и фотоинхибирани за 4.5ч. при стайна или ниска температура листа на wt и lut2, чрез измерване на светкавични кислородни добиви без наличието на електронен акцептор (фиг. 18).

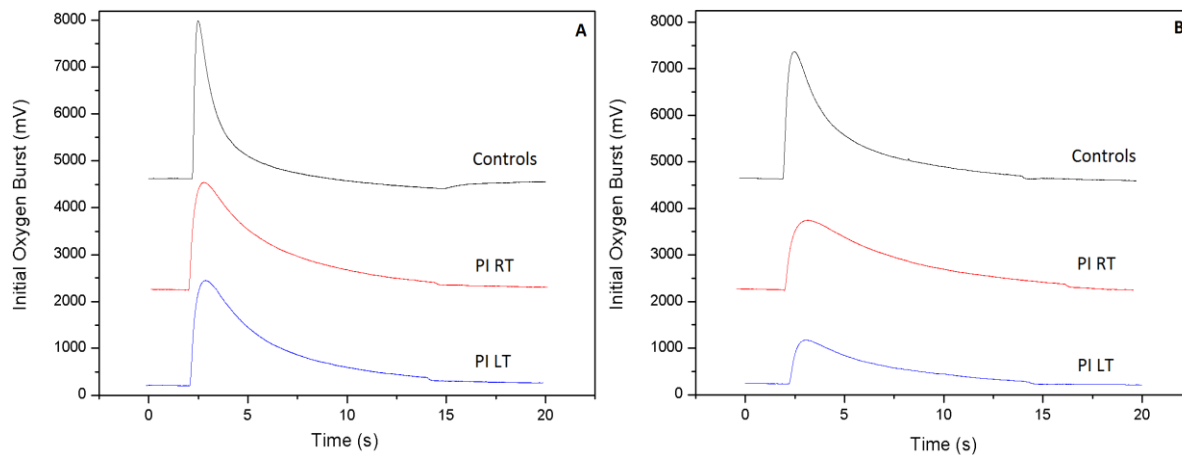


Фиг. 18 Светкавични кислородни добиви, регистрирани в тилакоидни мембрани, изолирани от контролни и фотоинхибирани за 4.5ч. цели листа на wt (A) и lut2 (B) при стайна (PI RT) и ниска температура (PI LT).

Тъмнино адаптираните тилакоидни мембрани изолирани от контролни или осветени с висок светлинен интензитет листа с краткотрайни насищащи импулси води до формиране на периодични светкавични кислородни добиви, които характеризират активността на кислород отделящата система в комплексите на ФС2 разположени в граните (ФС2 α), които отделят кислород по некооперативния модел на Kok [Kok и съавт., 1970].

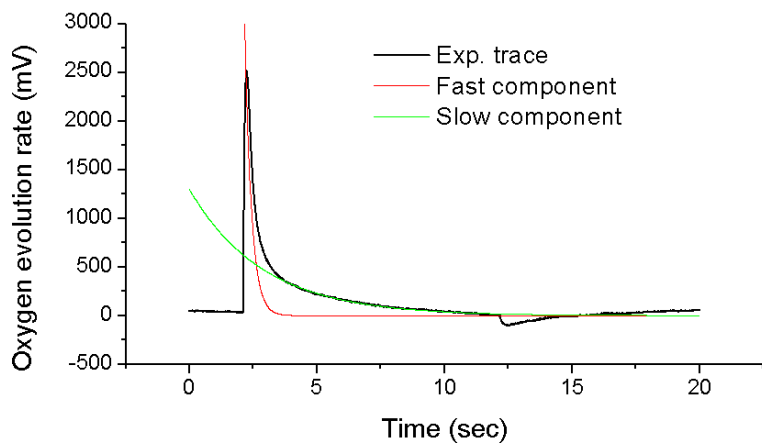
Получените данни за светкавичните кислородни добиви показват, че при стайна температура за wt и lut2 се запазва периодичността на осцилацията на светкавичните добиви, но амплитудите на тези добиви при тилакоидни мембрани от фотоинхибирани цели листа от wt са само малко по-ниски от съответните контроли, докато при lut2 получените добиви са два пъти по-ниски от съответните контроли. От това може да се заключи, че фотоинхибирането при стайна температура при lut2 се намаляват активните ФС2 α реакционни центрове, но не се нарушава съществено механизма на отделяне на кислород по некооперативния модел на Kok от останалите активни центрове. Фотоинхибирането при ниска температура при wt води до много по-значително намаление на добивите както при wt, така и при lut2, като при мутанта също така се нарушава периодичността на светкавичните добиви, което показва, че за lut2 при ниска температура настъпва промяна в периодичността на кислородното отделяне.

Беше измерено също така кислородното избухване при постоянно осветяване (фиг. 19) което е информативно за активността на реакционните центрове на ФС2 разположени в граналните тилакоиди (ФС2 α), отделящи кислород по бързия, некооперативен механизъм, и ФС2 β -реакционните центрове, разположени в стромалните участъци на тилакоидните мембрани, които отделят кислород по бавния кооперативен механизъм. Кривата на затихване след кислородното избухване може да бъде разложена на две компоненти (фиг. 20), с амплитуди и времеконстанти – A1 и A2 и съответно t1 и t2, отговарящи съответно на активността на кислород отделящата система към двете популации на ФС2 комплексите, бързите (ФС2 α) и на бавните (ФС2 β), отделящи кислород по некооперативния и кооперативен механизъм, съответно.



Фиг. 19 Кислородното избухване при постоянно осветяване, регистрирано в тилакоидни мембрани, изолирани от контролни и фотоинхибирани за 4.5ч. цели листа на wt (A) и lut2 (B) при стайна и ниска температура.

Времеконстантата на бързата (t_1) и бавната (t_2) компонента и отношението A_1/A_2 , отговарящо на отношението на амплитудите на бързата и бавната компонента, са представени в таблица 2. При осветяване със светлина с висок интензитет при wt се увеличава както t_1 така и t_2 , по-силно изразено за t_2 , в същата степен при стайна и при ниска температура, което показва забавяне на отделянето на кислород и от двата вида центрове вследствие на фотоинхибиране. При lut2 се наблюдават подобна тенденция, но по-силно изразени при стайна температура. Отношението A_1/A_2 също се променя значително при осветяване със светлина с висок интензитет, като при wt намалението е по-силно изразено при ниска температура сравнено със стайна температура (съответно с 50% и 37% намаление в сравнение с контролите) и в по-значителна степен при мутанта lut2 (58% при стайна и 66% при ниска температура). Получените резултати показват, че относителния принос на граналните ФС2 реакционни центрове в първоначалното кислородно избухване при постоянно осветяване намалява, което е по-силно изразено при lut2



Фиг. 20 Разлагане на кривата на затихване след кислородно избухване при постоянно осветяване на две компоненти - бърза и бавна компонента.

Таблица 2. Времекостанти на бързата (t_1) и бавната (t_2) компонента и отношение на амплитудите на бързата и бавната компонента (A_1/A_2) на кислородно отделяне при изолирани тилакоидни мембрани. Статистически значими изменения между контролни и третирани листа са отбелязани със звезда (*- $P<0.05$, **- $P<0.01$, ***- $P<0.001$), докато с плюс са отбелязани статистически значителните различия между неосветените wt и lut2 (+- $P<0.05$, ++- $P<0.01$, +++- $P<0.001$). Средните стойности са получени от 4 независими експерименти с по 2 паралелни измервания и с изчислена стандартна грешка.

		wt C	wt HL	lut2 C	lut2 HL
RT	t_1 [s]	$0,92 \pm 0,10$	$2,27 \pm 0,05$ ***	$1,04 \pm 0,13$	$3,16 \pm 0,73$ *
	t_2 [s]	$5,23 \pm 0,57$	$8,00 \pm 0,54$ **	$7,20 \pm 0,68$	$9,02 \pm 1,43$
	A_1/A_2	$1,97 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,08$ ***	$1,47 \pm 0,05$ +++	$0,62 \pm 0,02$ ***
LT	t_1 [s]	$1,02 \pm 0,04$	$2,53 \pm 0,28$ **	$0,99 \pm 0,04$	$2,04 \pm 0,13$ ***
	t_2 [s]	$7,39 \pm 0,97$	$8,18 \pm 0,95$	$8,40 \pm 0,22$	$8,27 \pm 0,35$
	A_1/A_2	$1,45 \pm 0,22$	$0,71 \pm 0,22$	$1,89 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,12$ ***

2.1.5. Обсъждане

Общата концентрация на хлорофили и каротеноиди не се променя при фотоинхибиране на цели листа от wt, докато при lut2 концентрацията на фотосинтетичните пигменти намалява поради разграждане на пигментите или поради забавянето на синтезирането им.

Степента на фотоинхибиране е зависима от времето на осветяване със силна светлина и е по-силно изразена при lut2 в сравнение с wt, като наблюдаваните промени са по-силно изразени при ниска температура (фиг. 3 и фиг.6). Намалената фотосинетична активност на ФС2 води до инхибиране на електронния транспорт (фиг. 5), както и до повишение на стойността на точката на светлинна компенсация (фиг. 4).

Засиленото енергетичният натиск на ФС2 под влияние на високата светлина инициира различни механизми, които участват в процеса на обезвреждане на излишната погълната светлина. Един от основните механизми е функционирането на ксантофиловия цикъл в ССК2. Ксантофилите, локализирани в ССК2 не само участват в поглъщането и предаването на енергия към реакционния център на ФС2, но също така участват в процеса на обезвреждането на излишната погълната светлина енергия чрез процеса на (NPQ) [Derks и съавт., 2015]. Има данни, че само 50% от излишната погълната светлинната енергия се обезврежда чрез NPQ [Gilmore, 1997], а част от енергията бива обезвредена по механизъм който също протича в ССК2, но не е ΔpH - и зеаксантин-зависим [Szyszka и съавт., 2007]. Получените резултати показват, че се засяга не само квантовата ефективност (F_v/F_m , фиг. 3), но също така и ефективността на нефотохимичното гасене (фиг. 7 и фиг. 9). Намаляването на NPQ може да се обясни като следствие на инхибирането на ФС2 и съответно намаление на ΔpH [Tjus и Andersson, 1993], който е основен активатор на NPQ.

Наличието на ΔpH независим механизъм се доказва от времево зависимото увеличаване на Φ_{NO} (фиг. 8 и фиг.9). Това, че този механизъм функционира в по-голяма степен при ниска температура показва, че най-вероятно неговото действие не е свързано с действието на ензими.

Кинетиката на окисление на P700 е по-бавна за *lut2* в неосветените листа (фиг. 10). При осветяване с висок светлинен интензитет на листа от дивия тип скоростта на окисление на P700 се забавя, по-силно изразено при осветяване при ниска температура в сравнение със стайна температура (фиг. 10А). При листа на *lut2* забавянето на окислението на P700 при осветяване и при двете температури не е толкова силно изразено (фиг. 10В). Резултатите показват, че при осветяване с висок светлинен интензитет скоростта на ре-редукция на $P700^{+}$ се ускорява, особено при ниска температура, което е свързано със стимулирането на цикличния електронен транспорт около ФС1 [Munekage и съавт., 2004; Ivanov и съавт., 2012].

При третиране с висок светлинен интензитет настъпва намаление на фотохимичната активност на ФС2 (фиг. 16) по-силно изразено при ниска температура при тилакоидни мембрани на дивия тип, докато при мутанта намалението е в сходна степен и при двете температури. Това може да се дължи на светлинно-индуцираното увреждане на белтъка D1 и/или от кислород-отделящата система, донорът на електрони за реакционния център на ФС2.

Анализът на кинетиката на затихването на първоначалното кислородно избухване в изолирани тилакоидни мембрани на контролни и фотоинхибирани за 4.5ч при двете температури показват, че осветяването с висока светлина забавя кислородното отделяне за двата типа ФС2 реакционни центрове – на „бързите“ ФС2 α и „бавните“ ФС2 β , като забавянето е по-изразено при ФС2 α (таблица 2). Осветяването при стайна температура води до по-голямо забавяне на бързата компонента (t_1) на кислородното отделяне при *lut2* в сравнение с *wt*, докато при ниска температура тилакоидите на *wt* са засегнати в по-голяма степен от *lut2*.

Наблюдаваното намаление на отношението $A1/A2$ в осветени с висока светлина листа показва, че в резултат на фотоинхибиращото третиране относителния принос на бавните ФС2 реакционни центрове нараства, като това е по-силно изразено при *lut2*.

Получените резултати, свързани с промените във фотохимичната активност на ФС2 и кислород отделящия комплекс са в съзвучие с предложената схема на фотоинхибиране [Ohnishi и съавт., 2005; Nakala и съавт., 2005], според която фотоинхибирането на ФС2 протича на две стъпки - увреждане на мангановия клъстер на кислород отделящия комплекс и инактивиране на реакционния център от погълнатата светлина. В същото време, фотохимичната активност на ФС1 не се засяга значително при осветяване с висока светлина (фиг. 17).

Анализът на ниско-температурните емисионни спектри показват, че осветяването с висока светлина засяга енергетичното взаимодействие и пренос на енергия между основните пигмент белтъчни комплекси. Не се наблюдават промени в спектрите по отношение на позициите на флуоресцентните пикове, но се наблюдават промени на относителният им интензитет. Отношението F735/F685 се увеличава при осветяване с висока светлина (фиг. 14, фиг. 15) което може да се дължи на различни причини, включително промени в поглъщането и доставянето на енергия от ФС2 на ФС1 както и в енергетичното взаимодействие между тях и различна степен на гасене на енергията от гасител в ФС2. Освен директното увеличение на енергетичния пренос към ФС1, вероятно се наблюдава и пренос на енергия чрез миграцията на ССК2 към стромалната област на тилакоидите. Този тип миграция се счита за протективен механизъм за защита на ФС2 от прекомерната светлина [Hundal и съавт., 1990] и за намаляване на енергетичния натиск върху ФС2 [Derks и съавт., 2015]. Измерванията на флуоресценцията при *Arabidopsis thaliana* са показали, че светосъбиращата функция на ССК2 е по-ефективна когато комплексът е асоцииран с ФС1 в сравнение с ФС2 [Wientjes и съавт., 2013]. Също така е възможно наличието на гасител на флуоресценцията при 685 nm в реакционния център на ФС2 [Hundal и съавт., 1990; Velitchkova и Ророва, 2005], най-вероятно P680⁺. Светлинно индуцираното преустройство на фотосинтетичните комплекси, водещо до увеличение на преноса на енергия в полза на ФС1 се наблюдава в значително по-голяма степен при lut2 в сравнение с wt (съответно отношение F735/F685 1.48 и 1.19, фиг. 15). Това се дължи или на по-малката антена на ФС2 при мутанта [Pogson и съавт., 1996; Niyogi и съавт., 2001] или на по-голямата популация на ФС1-ССК1 комплекси поради преобладаване на стромалните тилакоиди при lut2 [Niyogi и съавт., 2001].

Може да се предположи, че по-малката антена на ФС2 в lut2 не влияе на енергетичното взаимодействие в комплекса на ФС2, но повишеният светлинно-индуциран енергетичен пренос от ФС2 към ФС1 е по-силно изразен при lut2 в сравнение с wt.

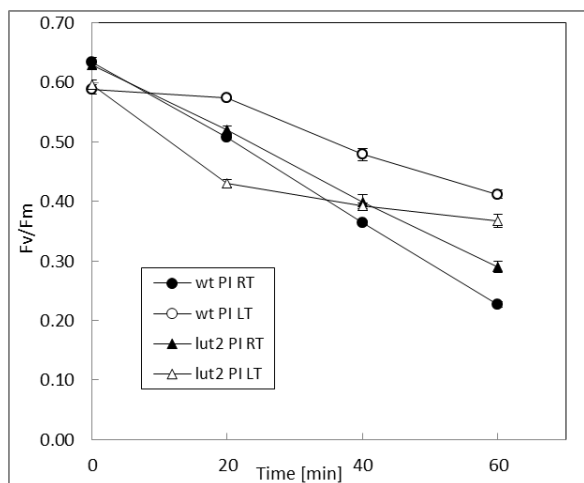
2.2 Промени във фотосинтетичната активност на тилакоидни мембрани, изолирани от *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2 и третирани с висок светлинен интензитет при стайна (22°C) и ниска (4°C) температура.

2.2.1. Максимална квантова ефективност

За целта на експеримента бяха отгледани висшите растения *Arabidopsis thaliana*, див тип (wt) (Col-O) и мутант несъдържащ лютеин (lut2), от които бяха изолирани тилакоидни мембрани. Бяха проведени четири експеримента, при което изолирани тилакоидни мембрани бяха осветени при стайна (22°C) и ниска температура (4°C) с интензитет 800 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ в продължение 1 час, като бяха взимани проби след 20, 40 и

60 минути осветяване, както и от неосветени контроли. Бяха измерени следните параметри: максимален квантов добив на ФС2 (Fv/Fm), фотохимичната активност на ФС2 и ФС1 с Кларков електрод в присъствието на екзогенни донори и акцептори на електрони, нискотемпературни флуоресцентни спектри – емисионни спектри и спектри на възбуждане, светкавични кислородни добиви и измерване на кислородно избухване при постоянно осветяване в отсъствието на електронен акцептор.

Резултатите за стойностите на максималния квантов добив на ФС2 (Fv/Fm) получени по метода на РАМ флуоресценция (фиг. 21) показват прогресивно намаляване с увеличаване времето на осветяване достигащо до намаление с около 50% след 60 мин осветяване при стайна температура. При осветяване при ниска температура максималната квантова ефективност на ФС2 намалява с увеличаване времето на третиране на тилакоидните мембрани, както при wt, така и при мутанта, но намалението е по-слабо изразено в сравнение с това при стайна температура, което най-вероятно е свързано с ускоряване на процесите на фотоинхибиране при стайна температура и отсъствието на репарационни процеси при изолираните тилакоидни мембрани, за разлика от фотоинхибирането при цели листа.

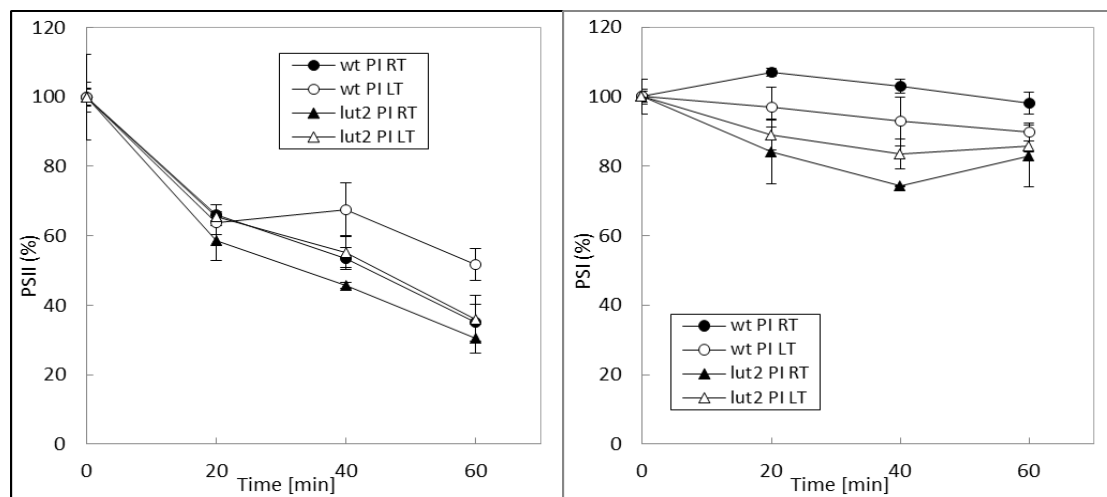


Фиг. 21 Максимален квантов добив на ФС2 при стайна (RT) и ниска (LT) температура на контролни и осветени за 1ч с висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) изолирани тилакоидни мембрани от wt и lut2. Средните стойности $\pm$ средна грешка са изчислени от 3 независими експеримента с по 2 повторения за всяка точка.

2.2.2. Промени във фотохимичната активност на ФС2 и ФС1 в изолирани тилакоидни мембрани на див тип и lut2

Резултати за фотохимичната активност на ФС2 (фиг. 22 А) в резултат на осветяване с висок светлинен интензитет, определена чрез отделянето на кислород в присъствието на електронен акцептор (1-4 BQ) показват прогресивно намаляване на активността на ФС2 в сравнение с неосветените тилакоиди, което в сходна степен както при wt, така и при lut2, и при двете температури. Активността на ФС1 (фиг. 22 В) (измерена чрез степента на поглъщане на кислород в присъствието на изкуствени донори и акцептори на електрони) се засяга в по-малка степен в сравнение с наблюдаваните промени във

фотохимичната активност на ФС2 и при двата вида тилакоидни мембрани, което потвърждава известните до сега данни, че ФС2 се засяга в много по-голяма степен от ФС1 при стресови въздействия .

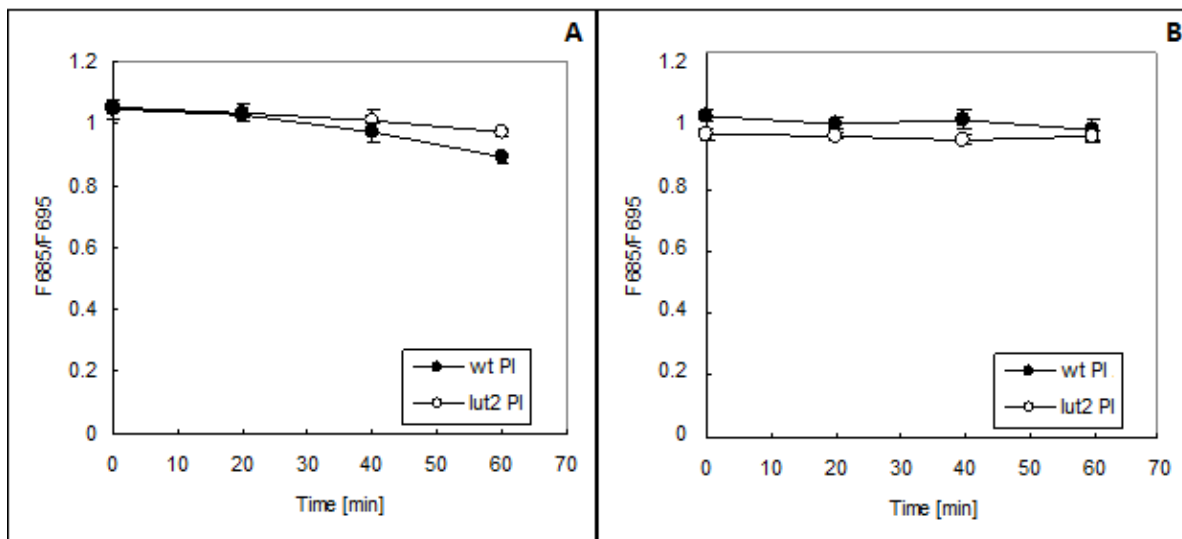


Фиг. 22 Зависимост на фотохимична активност на ФС2 (А) и ФС1 (В) в изолирани тилакоидни мембрани от времето на осветяване с висок светлинен интензитет при стайна (PI RT) и ниска (PI LT) температура. Данните са представени като процент от активността на неосветени контролни мембрани. Резултатите са получени от три независими експерименти с две паралелни измервания и са изчислени стандартните грешки.

2.2.3. Енергетично взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси в изолирани тилакоидни мембрани от див тип и мутант *lut2*

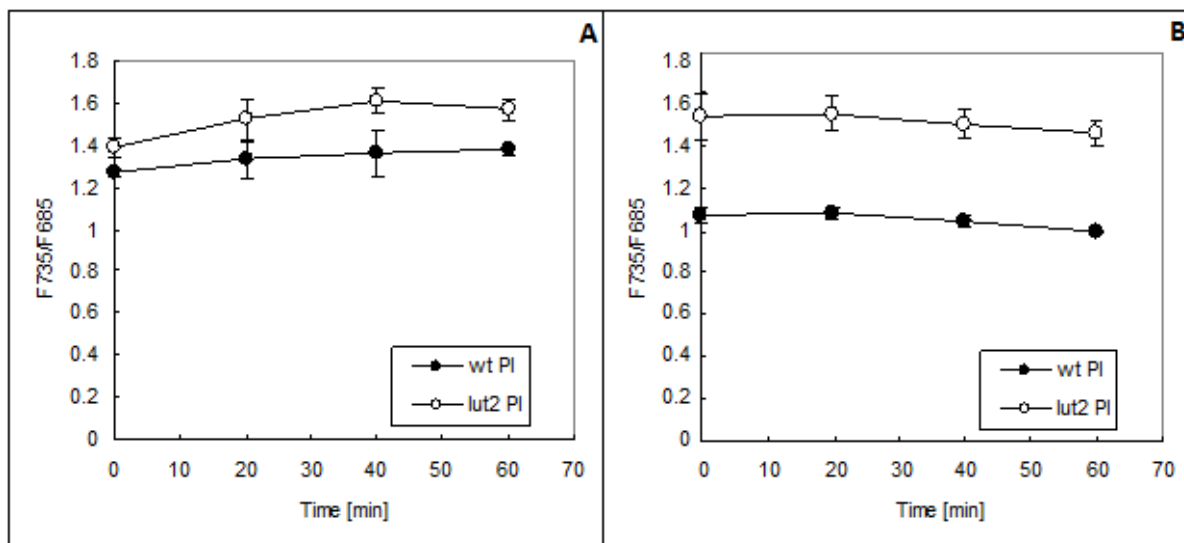
Бяха регистрирани нискотемпературни флуоресцентни спектри на възбуждане при 436 и 472 nm в областта 660-780 nm. Бяха отчетени стойностите на максимумите 685 nm (емитиран от реакционния център на ФС2 и CP43), на рамото при 695 nm, свързано с флуоресценцията на CP47 от вътрешната антена на ФС2 и на максимума при 735 nm, който се дължи на флуоресценцията, емитирана от комплекса на ФС1. Промяната в отношенията F735/F685 и F685/F695 при отделните спектри е свързано съответно с разпределението на енергията между комплексите на ФС2 и ФС1 и енергетичното взаимодействие в комплекса на ФС2. При осветяване при стайна температура се наблюдава намаление на отношението F685/F695 (фиг. 23 А) с увеличаване времето на осветяване, което е в по-малка степен при тилакоидите на *lut2*, което е индикация за нарушен енергетичен пренос в комплекса на ФС2, нарушаване връзката между реакционния център на ФС2 и близката му антена. Може да се предположи, че по-малката антена на мутанта способства за по-слабо изразено нарушение на връзката между реакционния център и близката антена на ФС2. При осветяване при ниска

температура не се наблюдават статистически значими време-зависими разлики в енергетичното взаимодействие в комплекса на ФС2, както за дивия тип, така и при мутанта (фиг. 23 В).



Фиг. 23. 77K флуоресцентно отношение F685/F695 в изолирани тилакоидни мембрани от wt и lut2, фотоинхибирани с висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) при стайна (A) и ниска (B) температура. Флуоресценцията е възбудена с 436 nm. Представени са средни стойности и стандартна грешка от 3 независими експеримента с по две паралелни проби.

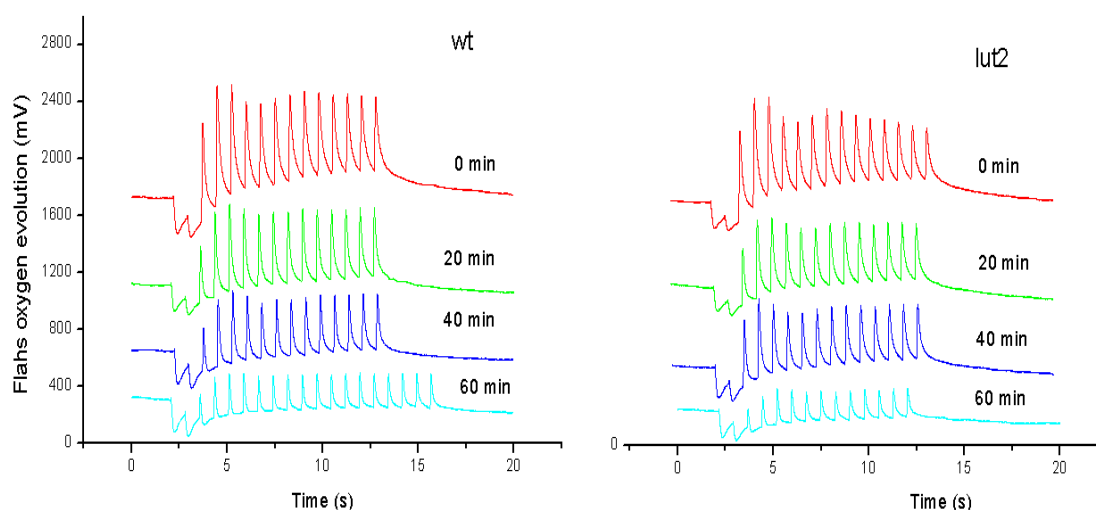
Отношението F735/F685 (фиг. 24) е по-високо при неосветени тилакоидни мембрани на lut2 в сравнение с неосветените тилакоиди на wt, което най-вероятно е свързано или с по-голям дял на стромалните участъци в тилакоидите мембрани и/или на по-голямото количество ФС1 комплекси при lut2. При осветяване с висок светлинен интензитет при стайна температура отношението F735/F685 нараства с увеличаване времето на третиране, като този процес е по-силно изразен при тилакоидите на lut2 (фиг. 24 A). Увеличаване на флуоресцентното отношение F735/F685 е индикация, че пикът при 735 nm се увеличава с увеличаване времето на осветяване в резултат на насочване на повече енергия към ФС1 в резултат на известно разстиковане на тилакоидните мембрани и/или повече флуоресцентни гасители в реакционния център на ФС2 т.е. повече инактовирани ФС2 центрове. При осветяване при ниска температура с увеличаване времето на осветяване почти не се наблюдават промени в отношението F735/F685, както при дивия тип, така и при мутанта,



Фиг. 24 Зависимост на флуоресцентното отношение F735/F685 в изолирани тилакоидни мембрани от wt и lut2 от времето на осветяване с висок светлинен интензитет при стайна (A) и ниска (B) температура. Флуоресценцията е възбудена с 436 nm. Представени са средни стойности и стандартна грешка от 3 независими експеримента с по две паралелни проби.

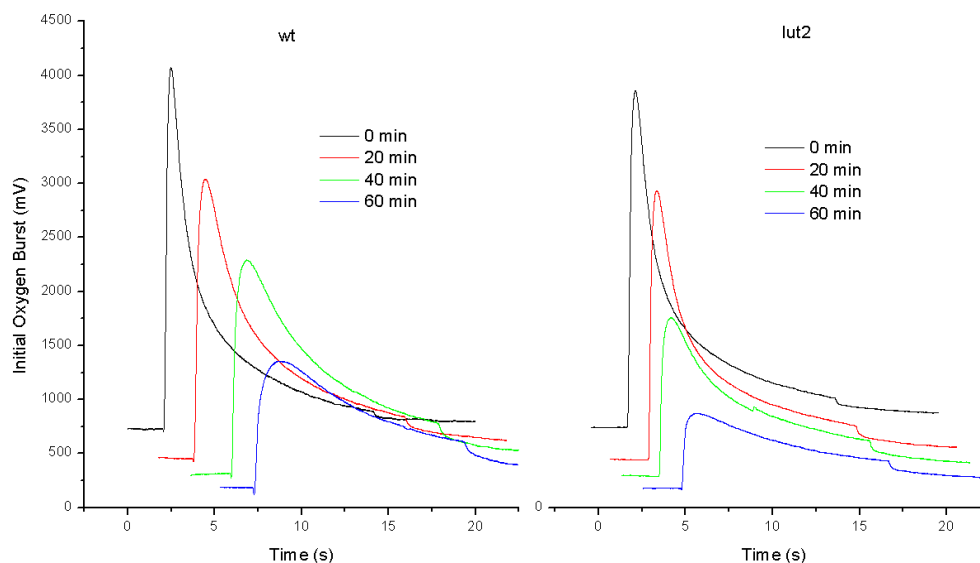
2.2.4. Изменения в активността на кислород-отделящата система в изолирани тилакоидни мембрани от див тип и мутант lut2

Изследвани са и светкавичните кислородни добиви в контролни и третирани с висок светлинен интензитет изолирани тилакоидни мембрани от дивия тип и мутанта за различен период от време при двете температури. На фиг. 24 са представени оригиналните трасета на кислородно отделяне.

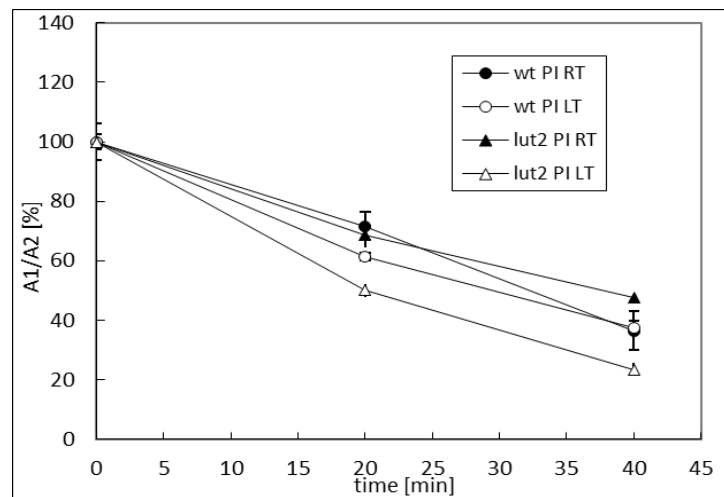


Фиг. 25 Оригинални трасета на светкавичните кислородни добиви, регистрирани в тилакоидни мембрани от wt и lut2, контролни и фотоинхибирани за различни периоди на време при стайна температура.

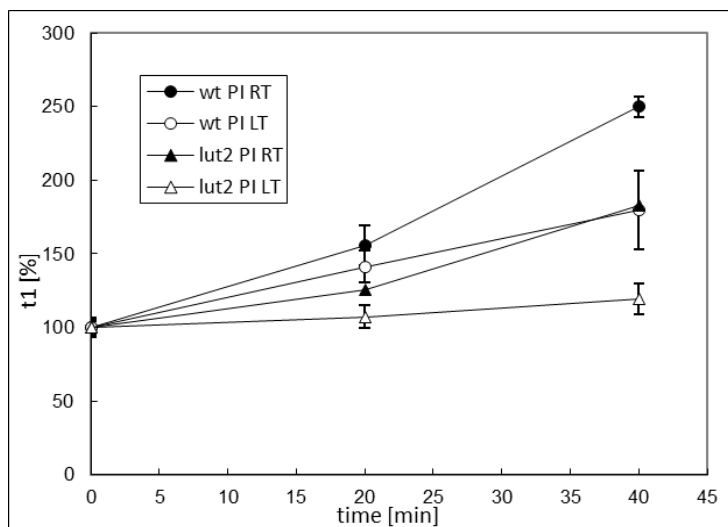
Беше измерено кислородното избухване при постоянно осветяване и регистрирана крива на затихване (фиг. 26). Бяха изчислени времеконстантите на бързата и бавната компонента и отношението $A1/A2$ (отношение на амплитудите на бързата и бавната компонента). Това отношение (фиг. 27) намалява значително при осветяване със светлина с висок интензитет. При стайна температура не се наблюдават значителни различия в параметрите на кислородното избухване между wt и lut2, докато при ниска температура това намаление е по-силно изразено при wt в сравнение с lut2 (съответно 70% и 60%). При осветяване със светлина с висок интензитет и при wt и lut2 се увеличава $t1$ (фиг. 28), като това е по-силно изразено при wt при стайна температура, докато при lut2 при ниска температура почти няма изменения спрямо изходното състояние.



Фиг. 26 Криви на кислородно избухване при постоянно осветяване регистрирани в тилакоидни мембрани, контролни и фотоинхибирани за различни периоди на време wt и lut2 при стайна температура.



Фиг.27 Зависимост на отношението $A1/A2$ от времето на осветяване с висок светлинен интензитет при стайна и ниска температура на изолирани тилакоидни мембрани от wt и lut2. Средните стойности и стандартните грешки са изчислени от 3 независими експеримента.



Фиг. 28 Зависимост на времекоптантата на бързата компонента на затихването на кислородното избухване от времето на осветяване с висок светлинен интензитет при стайна и ниска температура на изолирани тилакоидни мембрани от wt и lut2. Средните стойности и стандартните грешки са изчислени от 3 независими експеримента. Резултати са дадени само до 40 минути, тъй като при 60 минути не се получават криви, които да могат да бъдат използвани за анализиране.

2.2.5. Обсъждане

Осветяването с висок светлинен интензитет на изолирани тилакоидни мембрани от цели листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, води до намаляване активността на ФС2, отчетено чрез максималния квантов добив на ФС2 (F_v/F_m) и чрез фотохимичната активност на ФС2, измерена с помощта на екзогенен електронен акцептор. Наблюдаваните промените във фотохимичната активност на ФС1, измерена с помощта на екзогенни донори и акцептори, показват, че активността на ФС2 е по-силно засегната при lut2. Нашите резултати показват, че степента на фотоинхибиране зависи от температурата, като тя е по-висока при стайна температура. Това е в съгласие с публикувани изследвания за тилакоидни мембрани от спанак и грах [Aro и съавт., 1990; Velitchkova и Pirova, 2005]. Изследванията на разпределение на енергия между ФС2 и ФС1, отчетено чрез флуоресцентното отношение F_{735}/F_{685} при неосветените мембрани показва по-висока стойност за lut2 в сравнение с wt, което вероятно се дължи или на по-голям дял на стромалните участъци на тилакоидите или на по-голямото количество ФС1 при lut2. В процеса на осветяване, подобно на резултатите измерени при фотоинхибиране на цели лист, се наблюдават по-висока стойност на lut2 в сравнение с wt. Това най-вероятно свързано с растковането на граналните тилакоидни мембрани, изменение структурата на комплексите на ФС2 и миграция на част от светосъбираещия комплекс на ФС2 към ФС1.

В процеса на фотоинхибиране на тилакоидни мембрани разположените в граните ФС2 α комплекси се засягат в по-голяма степен от стромалните ФС2 α комплекси.

2.3. Фотообезцветяване на фотосинтетични пигменти и разграждане на белтъците на светосъбиращите комплекси в изолирани тилакоидни мембрани от *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна температура.

За изясняване ролята на лютеина в процеса на обезцветяване на фотосинтетичните пигменти в изолирани тилакоидни мембрани от листа на *Arabidopsis thaliana*, див тип и мутант lut2, отгледани при оптимални условия. Тилакоидните мембрани бяха подложени на третиране с висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) в продължение на 5ч. при стайна (22°C) температура. Тилакоидните мембрани с концентрация 0.15 mg Chl/ml бяха суспендирани в буфер съдържащ $0,33 \text{ M}$ захароза, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl и 20 mM Tricine (pH 7.5). На всеки етап на експеримента (0, 1, 2, 3 4 и 5 часа) бяха взимани проби за регистрация на абсорбционните спектри в буфер, определяне на пигментното съдържание, енергетичния пренос и взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси и за определяне на белтъчния профил на компонентите на светосъбиращите комплекси на ФС1 и ФС2.

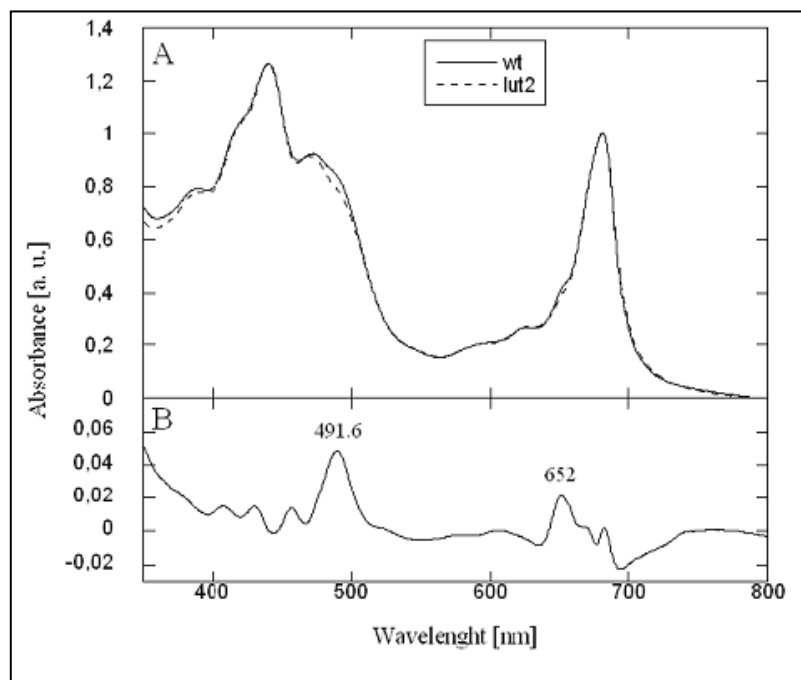
2.3.1. Промени в абсорбционните спектри на тилакоидни мембрани от *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при осветяване с висок светлинен интензитет.

Ролята на лютеин за първичните фотосинтетични процеси и защитата от висок светлинен интензитет беше характеризирана чрез изследване на абсорбционните свойства на тилакоидните мембрани от *Arabidopsis thaliana*, див тип и мутант lut2, и устойчивостта на пигментите към фотообезцветяване. За тази цел бяха записани абсорбционните спектри в буфер за да се проследи промяната в абсорбцията на фотосинтетичните пигменти в нормалното им белтъчно обкръжение. На фиг. 29 са представени абсорбционните спектри на неосветени тилакоидни мембрани от дивия тип и мутанта lut2. Спектрите са нормирани при 681 nm , абсорбционният максимум на хлорофил а в червената област. Вижда се, че двата спектъра в буфер, на wt и lut2, са еднакви по отношение на двата основни максимума на поглъщане на хлорофил а - 440 nm и 681 nm , но спектърът на тилакоидни мембрани от lut2 има две области на по-ниска абсорбция в сравнение с дивия тип - в синята област (между 470 и 500 nm), където се намират абсорбционните максимуми на хлорофил б и каротеноидите, както и в областта, където се разполага червеният максимум на поглъщане на хлорофил б (около 650 nm) (фиг. 29 А). Тези резултати показват понижена концентрация на каротеноидите и в по-малка степен на хлорофил б при lut2. За да се прецени по-точно кои от пигментите са в по-ниска концентрация при lut2 е представен диференциален абсорбционен спектър на wt и lut2 (wt-lut2) (фиг. 29 В). Диференциалният спектър има пик при 491.6 nm , което показва, че абсорбцията при тилакоидните мембрани от lut2 е по-ниска в тази област. Този пик се позиционира между двата пика на поглъщане на лютеин в синята област (489 и 495 nm),

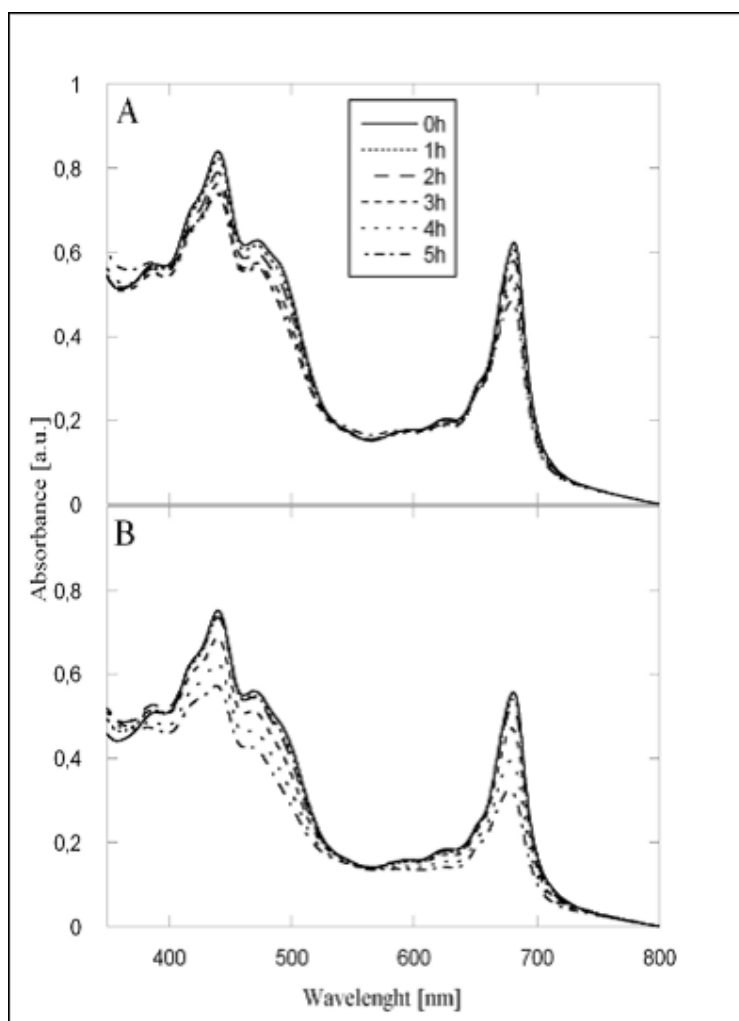
съответстващи на лютеина, свързан с белтъците на светосъбиращите комплекси на ФС2 на двете си специфични места на свързване, L1 и L2 [Crocce и съавт., 2000, Ruban и съавт., 2000]. Този резултат показва, че абсорбционните спектри вярно отразяват липсата на лютеин.

Концентрацията на общия хлорофил в тилакоидните мембрани в началото на всеки експеримент беше 0.15 mgChl/ml. С увеличаване времето на осветяване се наблюдава намаление на абсорбционните максимуми на фотосинтетичните пигменти в синята и в червената област, което е индикация, че с увеличаване времето на осветяване протича прогресивно фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти. На фиг. 30 А се вижда, че при дивия тип има само лек спад в абсорбцията в червената и в синята област през първия час на осветяване, което се увеличава прогресивно с увеличаване времето на осветяване.

За тилакоидните мембрани на *lut2* (фиг. 30 В) се наблюдава сходна тенденция на намаляване на абсорбцията с увеличаване времето на осветяване, което е изразено в по-голяма степен, отколкото при тилакоидните мембрани на *wt*. Намалението на абсорбцията е силно изразено при максимума в червената област (681 nm) - с 30% при *wt* и с 42% при *lut2* в сравнение с неосветяваните мембрани и в по-малка степен в синята област – с 17% за *wt* и с 24% за *lut2*. Освен това с увеличаване времето на осветяване се наблюдава отместване към синята област на пиковите на абсорбция на хлорофил а при 440 и 681 nm.

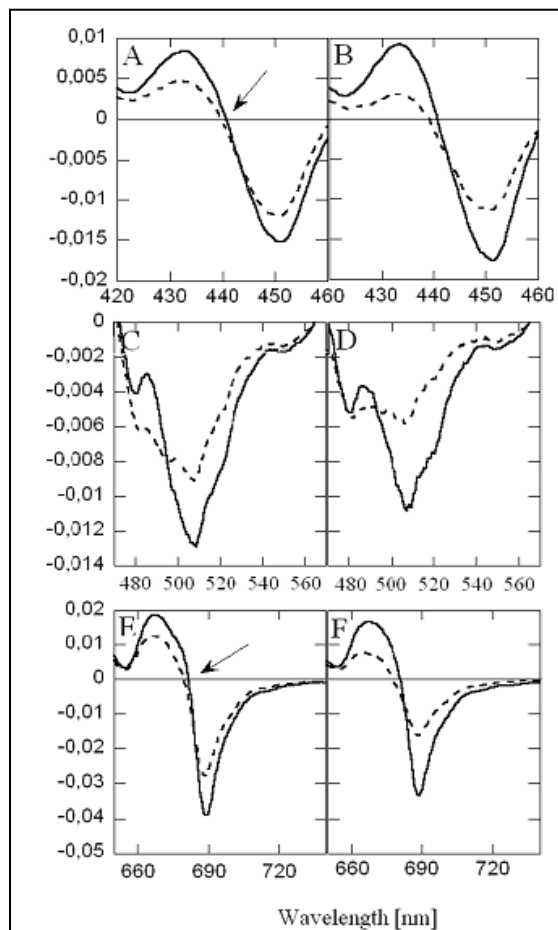


Фиг. 29 Абсорбционни спектри в буфер на неосветени тилакоидни мембрани (*wt* – плътна линия, *lut2* – пунктирна линия), нормализирани при 681 nm (A). (B) – диференциален абсорбционен спектър (*wt-lut2*).



Фиг. 30 Абсорбционни спектри в буфер на изолирани тилакоидни мембрани на wt (A) и lut2 (B) на контролни и осветявани с $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ за различен период от време.

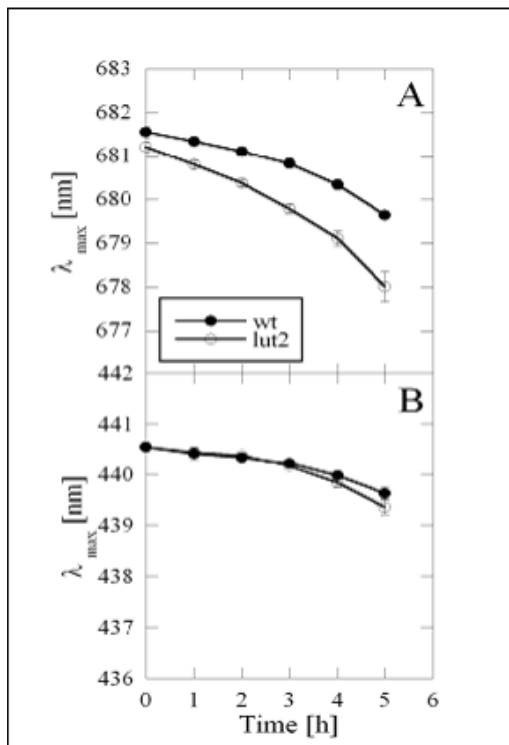
За да се анализира по-подробно различната степен на фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти при тилакоидни мембрани от wt и lut2 бяха изчислени първите производни на абсорбционните спектри, на контролните (неосветени) и на тилакоидни мембрани, осветени с висок светлинен интензитет в продължение на 5 часа за wt (A, C и E) и за lut2 (B, D и F) в синята област – 420-460 nm (A, B), в областта на каротеноидите – 470-570 nm (C, D) и в червената област – 650-750 nm (E, F) които са представени на фиг. 31.



Фиг. 31 Първи производни на абсорбционни спектри в буфер на изолирани тилакоидни мембрани от контролни и осветявани в продължение на 5 часа тилакоидни мембрани от wt (A, C и E) и lut2 (B, D и F) в синята област (A и B), в областта на каротеноидите (C и D) и в червената област (E и F). Със стрелки са показани отместванията към синята област

Отместването на абсорбционните максимуми при 440 nm и при 681 nm е показано със стрелки. От производните на абсорбционните спектри бяха определени амплитудите на минимумите в абсорбционните спектри при 440 и 681 nm, като позициите и динамиката на промяната с увеличаване времето на осветяване са показани на фиг. 32- за 681 nm (A) и за 440 nm (B). При контролните, неосветени тилакоидни мембрани на wt и lut2, позициите на пикове в синята и в червената област са много близки. При осветяване се наблюдава синьо отместване на максимума при 681 nm, като след 5 часа то е 1.5 nm за wt и 3.5 nm за lut2. При максимума при 440 nm се наблюдава значително по-малко отместване – с около 1 nm при wt и малко по-силно изразено при мутанта. По отношение на каротеноидите и при wt и при lut2 се наблюдава спад в абсорбционните спектри в областта между 450 и 520 nm и намаляване на мимимума на първите производни на абсорбционните спектри при 507 nm, като това е по-силно изразено при lut2, което показва, че концентрацията на каротеноидите намалява при осветяване, по-силно изразено при lut2. И каротеноидите и хлорофил б имат пикове на абсорбция в областта между 470 и 540 nm, но намаляването при 650 nm, отговарящо на хлорофил б не е значително, а минимумът при 507 nm е твърде висок за да бъде свързан с

хлорофил б, поради което намаляването най-вероятно се дължи на каротеноидите, а не на хлорофил б.

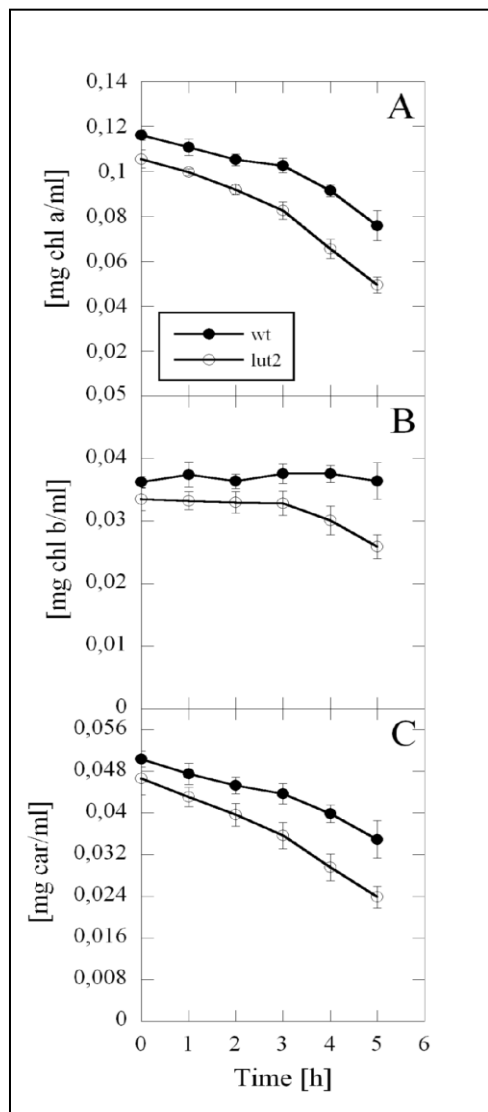


Фиг. 32 Зависимост на отместването на максимумите на абсорбционните спектри в резултат на различното време на осветяване с висок светлинен интензитет на тилакоидни мембрани от wt и lut2 в червената (A) и синята област (B). Средните стойности и стандартна грешка са изчислени от 3 независими експеримента с по 3 паралелни измервания.

2.3.2. Промени в пигментния състав на тилакоидни мембрани от wt и lut2 в резултат на осветяване с висок светлинен интензитет.

За да се проследи степента на светлинно-индуцираното обезцветяване на хлорофил а и б и на общото количество на каротеноидите бяха измерени концентрациите на пигментите в контролните и осветени за различен период от време (1, 2, 3, 4 и 5 ч.) тилакоидни мембрани от wt и lut2 чрез спектрофотометрично определяне в 80% ацетонен извлек използвайки формулите на Lichtentaler (1987). Резултатите са представени във фиг. 33. Концентрацията на хлорофил а намалява при wt (фиг. 33 A) като кривата на намаление е бифазна, с постепенно намаляване до третия час на осветяване и по-бързо след това, като намалението на концентрацията на петия час е с 35% от първоначалната стойност. При lut2 кривата е подобна, но е с по-силно изразено намаление (с 53% след 5 часа). Концентрацията на хлорофил б не намалява през периода на осветяване при wt, а при lut2 намалява едва след третия час на осветяване, като при петия час се наблюдава 25% намаление на концентрацията на хлорофил б в сравнение с неосветените тилакоидни мембрани (фиг 33 B). Кривата и степента на намаляване на концентрацията на каротеноидите (фиг. 33 C) по време на осветяване е подобна на тази на хлорофил а, като степента на намаляване в концентрацията на

каротеноидите при *lut2* е по-силно изразено – с 40%, сравнено с 30% намаление при *wt*. Тези резултати показват, че липсата на лютеин увеличава степента на фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти, най-силно изразено при хлорофил а, следвана от каротеноидите. При хлорофил б се наблюдава намаление концентрацията само при *lut2* и то при по-продължително осветяване.

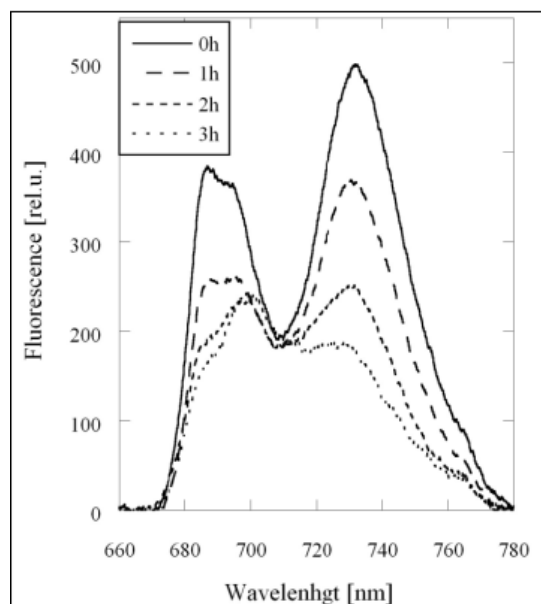


Фиг. 33 Зависимост на намаляването на концентрацията на фотосинтетичните пигменти - хлорофил а (А), хлорофил б (В) и каротеноидите (С) от увеличаване времето на осветяване с висок светлинен интензитет на тилакоидни мембрани от *wt* и *lut2*. Средните стойности и стандартна грешка са изчислени от 3 независими експерименти с по 3 паралелни измервания.

2.3.3. Промени в енергетичното взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси при осветяване на тилакоидни мембрани от *wt* и *lut2* с висок светлинен интензитет.

Бяха записани и анализирани ниско температурните (77K) флуоресцентни емисионни спектри и спектри на възбуждане след 1, 2 и 3 часа осветяване с висок светлинен интензитет. След три часа осветяване беше наблюдавана загуба на типичната форма на спектрите, вероятно свързана със загуба на организацията на фотосинтетичния апарат.

За да се изследва разпределението на енергия между ФС2 и ФС1 и енергетичното взаимодействие в комплекса на фотосистема 2 бяха измерени емисионните спектри при възбуждане с 436 nm и 472 nm, отговарящи на максимумите на поглъщане съответно на хлорофил а и б. На фиг. 34 са представени емисионните флуоресцентни спектри на контролни и осветени тилакоидни мембрани на wt при възбуждане с 472 nm.



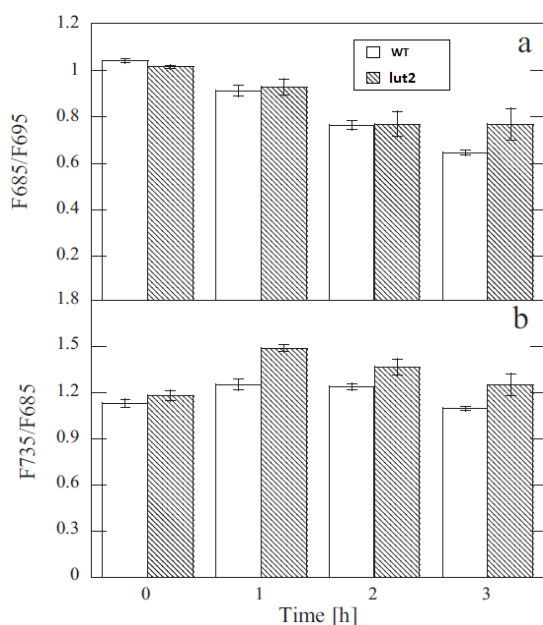
Фиг. 34 Нискотемпературни (77K) емисионни флуоресцентни спектри на контролни и осветени в продължение на 1, 2 и 3 часа тилакоидни мембрани на wt при възбуждане с 472 nm в областта 660-780 nm.

В емисионния флуоресцентен спектър при осветяването с висок светлинен интензитет се наблюдава намаляване на флуоресценцията, изразено чрез намаляване на площта под флуоресцентния спектър - до 50% за wt и за lut2 при 3 часа осветяване. Емисионният спектър беше разложен на съставни компоненти и беше измерена площта на съответните компонентни пикове. Площта на компонентния пик с максимум 735 nm (отговарящ на комплекса на ФС1) намалява в по-голяма степен (от 41.46% до 32.60% при wt и от 44.40% до 35.96% при lut2) от площта на компонентния пик при 685 nm, отговарящ на реакционния център на ФС2 (от 13.36% до 9.16% при wt и от 11.38% до 9.1% при lut2). За сметка на това се увеличава площта на компонента отговарящ на коровата антена при 695 nm и на агрегатите на ССК2 при 700 nm (при F695 - от 13.95% до 16.34% за wt и 12.45 до 15.02% за lut2, при F700 - от 8.19% до 18.72% за wt и от 8.16 до 15.15% за lut2). В процеса на осветяване също така се наблюдава отместване на пика при 695 nm с 8 nm към червената област и същевременно отместване на пика 735 nm с 4 nm към синята област. От изместването на пика при 735 nm и рязкото намаляване на площта под този пик може да се предположи, че намалява флуоресценцията на светосъбиращия комплекс на ФС1,

докато реакционният център на ФС1 (асоцииран с F720 и частично припокриващ се с флуоресценцията при F735) не е значително засегнат.

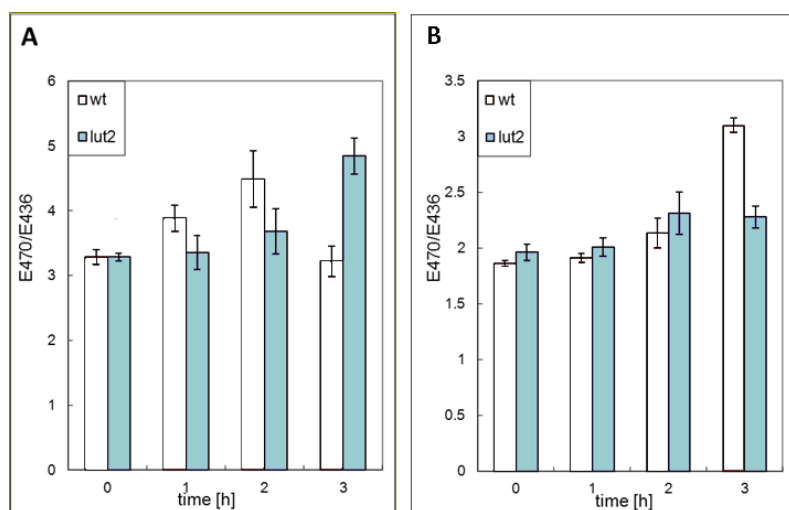
Бяха определени интензитетите на флуоресцентните максимуми при 685 nm 695 nm и 735 nm и бяха изчислени отношенията F735/F685 и F685/F695 при възбуждане с 472 nm (фиг. 35). Стойността на F735/F865 (фиг. 35 B) при неосветените тилакоидни мембрани е по-висока при lut2 в сравнение с wt (съответно 1.2 и 1). При осветяване отношението нараства при wt и при lut2 до първия час на осветяване, в по-голяма степен при lut2. След първия час на осветяване се наблюдава намаляване на отношението F735/F865, като това е по-значително при lut2. Обяснение за увеличаване на отношението F735/F865 през първия час на осветяване е свързано с различната степен на обезцветяване на пигментите на ФС2 и ФС1 и разграждане на белтъка D1 [Hundal и съавт., 1990] и същевременно с това преобразуване на комплекса на ФС2 и мигриране на светосъбиращия комплекс на ФС2 към ФС1 [Velitchkova и Poroova, 2005]. Намалението на това отношение след първия час вероятно е свързано със засягането в по-голяма степен в процеса на фотообезцветяване на дълговълновите хлорофили в комплекса на ФС1.

Получените резултати по отношение на отношението F685/F695, показват, че F685/F695 (фиг. 35 A) намалява при осветяване със силна светлина при wt от 1.03 до 0.62 след три часа осветяване, което вероятно е свързано с увеличаване на относителния дял на флуоресценцията излъчвана от вътрешната антена на ФС2 (CP47, F695). При lut2 се наблюдава аналогична тенденция, но само до втория час на осветяване, след което не се наблюдават значителни изменения. Тези резултати показват, че в процеса на осветяване с висока светлина, най-вероятно се нарушава ефективния пренос на енергия от CP47 към реакционния център на ФС2, с последващо увеличение на флуоресценцията на CP47 или настъпват структурни изменения в комплекса [Horton и съавт., 1994].



Фиг. 35 Промени във флуоресцентните отношения F685/F695 (a) и F735/F685 (b) при възбуждане с 472 nm, изчислени от емисионните спектри на тилакоидни мембрани от wt и lut2, с увеличаване времето на осветяване с висок светлинен интензитет. Резултатите са получени от 3 независими експерименти с 2 отделни проби, с изчислена стандартна грешка.

За да се установи относителния принос на хлорофил а и б в снабдяването с енергия на ФС2 и ФС1 бяха измерени спектрите на възбуждане при емисия 685 nm (фиг. 36 А) и при емисия 735 nm (фиг. 36 В) в синята област (500 - 410 nm). Бяха изчислени отношенията E470/E436 за емисията при 685 nm и 735 nm. По отношение на спектрите на възбуждане при емисия 685 nm и 735 nm отношението E470/E436 не се различава значително между wt и lut2 при неосветени тилакоидни мембрани, което означава, че приносът на хлорофил а и б за енергетичното снабдяване на ФС2 и ФС1 не се различава при wt и lut2. При продължително осветяване отношението E470/E436 при емисия 685 nm се увеличава в по-голяма степен при дивия тив, докато при мутанта това нарастване е много по-слабо изразено. При емисия при 735 nm нарастването на отношението E470/E436, както при дивия тип така и при мутанта, е много по-слабо изразено. Тези резултати показват, че при осветяване с висок светлинен интензитет увеличението на приноса на хлорофил б (или намаляване приноса на хлорофил а) в енергетичното снабдяване на ФС2 при дивия тип е по-силно изразено в сравнение с това при мутанта. За енергетичното снабдяване на ФС1 приносът на хлорофил а също нараства с продължителното осветяване, но в много по-малка степен.

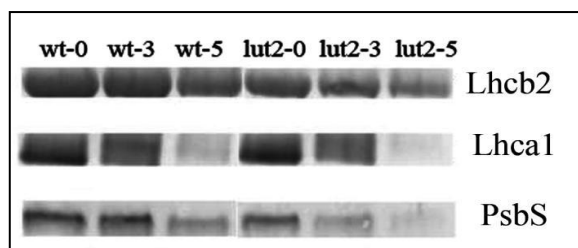


Фиг. 36 Промени в емисионното отношение E470/E436 при емисия на флуоресценцията при 685nm (А) и (В) при флуоресценция при 735 nm, изчислени от спектри на възбуждане на тилакоидни мембрани от wt и lut2, с увеличаване времето на осветяване с висок светлинен интензитет. Резултатите са получени от 3 независими експерименти с 2 паралелни проби, с изчислено стандартно отклонение.

2.3.4. Ефект на осветяване с висок светлинен интензитет върху популацията на белтъците на светосъбиращите комплекси при тилакоидни мембрани от wt и lut2

Белтъчният профил на светосъбиращите комплекси на ФС1 и ФС2 беше проследен при осветяване на тилакоидни мембрани от wt и lut2 с висок светлинен интензитет за 3 и 5 часа при стайна температура. Бяха изследвани Lhcb2 (компонент на главния светосъбиращ комплекс на ФС2), Lhca1 (компонент на светосъбиращия комплекс на ФС1) и PsbS (белтък, принадлежащ към светосъбиращия комплекс на ФС2, за който се предполага, че е свързан с процеса на нефотохимично гасене). И при двата типа тилакоиди се наблюдава намаляване количеството на Lhcb2, Lhca1 и PsbS, по-силно

изразен при лутеиновия мутант. Процесът на разграждане на Lhcb2, Lhca1 и PsbS [Dong и съавт., 2015] беше изследван с метода на Western Blot на неосветени тилакоидни мембрани и на тилакоидни мембрани осветявани за 3 и 5ч. (фиг. 37). Осветяването води до намаление на асоциираните с Lhcb2 ивици, и при wt и при lut2, в по-голяма степен изразено при lut2. Намалението до третия час за дивия тип не е значително (намаляване на съответната ивица до 91% от първоначалната), а за lut2 е в по-голяма степен (до 80% след третия час), като след петия час се наблюдава намаляване до 76% и 74% съответно за wt и lut2. Белтъците Lhca1 и PsbS се засягат в много по-голяма степен при осветяване с висок светлинен интензитет, но едва след третия час на осветяване (намаление след 5ч до 26% при wt и 11% при lut2).



Фиг. 37 Western blot анализ на контролни и осветявани с висок светлинен интензитет за 3 и 5 часа тилакоидни мембрани на wt и lut2.

2.3.5. Обсъждане

Въпреки заместването на лутеин с други ксантофили от β -каротин клона на синтезиране от ликопен, отсъствието на лутеин увеличава въздействието на високия светлинен интензитет върху пигментния състав и структурната организация на изолирани тилакоидни мембрани. При осветяването на тилакоидни мембрани, изолирани от wt и lut2, се наблюдава постепенно фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти като засяга по подобен начин различните пигменти - хлорофил а и каротеноидите са уязвими в най-голяма степен, а хлорофил б се засяга в много по-малка степен. При тилакоидните мембрани на wt не се наблюдава обезцветяване за целия изследван период, а при мембраните на lut2 обезцветяване се наблюдава при най-продължителното осветяване. Получените резултати показват по-голямата уязвимост на фотосинтетичните пигменти в изолираните тилакоидни мембрани от lut2 мутанта по отношение на хлорофил а и каротеноидите. Хлорофил а се обезцветява в по-голяма степен от хлорофил б поради това че поглъща при по-голяма дължина на вълната в червената област и поради това се явява краен акцептор на енергия. По-голямата уязвимост на каротеноидите от хлорофил б, въпреки това, че каротеноидите не поглъщат в червената област, се обяснява с функцията им на гасител на трипетни форми на хлорофил и на активни кислородни форми, индуцирани от осветяването с висок светлинен интензитет.

Светлинно-индуцираното фотообезцветяване води и до промени в структурата и организацията на основните фотосинтетични комплекси, които могат да се проследят с

промените в нискотемпературните флуоресцентни спектри, както по отношенията, изчислени от флуоресцентните спектри, така и по позициите на пиковите на флуоресценция. Разлагането на флуоресцентните спектри на съставните им компонентни пикове в областта между 695 и 700 nm на третия час на осветяване показва, че наблюдавания пик при 700 nm е в резултат на припокриване на отместения пик F695 към червената област, дължащ се на откъсване на коровата антена от реакционния център на ФС2, и F700, асоцииран с агрегатите на ССК2 тримерите. Светлинно индуцираното намаляване на флуоресценцията в областта 685-695 nm, а и също така и при 735 nm, както и промените в отношението F735/F685 могат да се обяснят с намаляването на концентрацията на хлорофил, промени в снабдяването с енергия на ФС2 и ФС1 и с наличието на флуоресцентен гасител в ФС2. Първоначалното нарастване на флуоресцентното отношение F735/F685 до първия час на осветяване вероятно е свързано с диференциално фотообезцветяване на пигментите асоциирани и с двата комплекса, с деградация на D1 белтъка в реакционния център на ФС2 и с промяна в структурата на ФС2, последвано от миграция на светосъбиращия комплекс на ФС2 към ФС1 [Lazarova и съавт., 2014]. Възможно е и наличие на флуоресцентен гасител в реакционния център на ФС2, най-вероятно P680+, което води до намаление на флуоресценцията при 685 nm [Bruse и съавт., 1997]. При емисионни спектри се наблюдава по-голяма стойност на отношението F735/F685 при lut2 в сравнение с wt, което е най-вероятно свързано с по-малката антена наблюдавана при lut2 или по-малко количество на граналните тилакоиди. Фотообезцветяването на дълговълновите хлорофил а молекули (поради това, че те имат ролята на крайни акцептори на енергия), компоненти на ФС1 и антената на ФС1 [Gobets и Grondelle, 2001] се демонстрира от отместване на пика при F735 към синята област.

Светлинно индуцираното обезцветяване води и до изменения в комплекса на ФС2, което се изразява в промените в разположението на пиковите в областта 685-895 nm и отношението F685/F695. Пикът при F695 се отмества с 8 nm към червената област, най-вероятно поради миграция на светосъбиращия комплекс на ФС2 към ФС1 и/или припокриване на пиковите при F695 и F700. Отношението F685/F695 намалява до втория час на осветяване, в еднаква степен за wt и lut2, което може би е свързано с нарушаване на енергетичното взаимодействие между коровата антена на ФС2 и реакционния център и с промяна в структурата на комплекса. След втория час на осветяване се наблюдава допълнително намаление на F685/F695 при wt, но не и при мутанта.

При продължително осветяване настъпва и разграждане на белтъците на светосъбиращия комплекс, като това протича по-интензивно при lut2. Сравнението между изследваните Lhca1 и Lhcb2, съответно компоненти на ФС1 и ФС2, се вижда че Lhca1 е по-чувствителен към ефектите на висок светлинен интензитет. По-голямата

уязвимост на Lhca1 се обяснява с това, че ФС1 съдържа по-дълговълнови хлорофили в сравнение с ФС2, които като крайни акцептори на енергия са по-уязвими към висок светлинен интензитет [Alboresi и съавт., 2009]. Белтъкът PsbS, който е част от светосъбиращия комплекс на ФС2 и за който се предполага, че играе роля в процеса на нефотохимично гасене, е също засегнат от високата светлина, независимо, че не съдържа пигменти. Отсъствието на лютеин също така влияе върху реорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси причинен от въздействието на високия светлинен интензитет.

3. Заключение

В настоящата работа е представено детайлна характеристика на каротеноидния мутант lut2 на *Arabidopsis thaliana*, който не синтезира лютеин, и е изследван отговора му на третиране с висок светлинен интензитет при стайна и ниска температура както *in vivo* така и *in vitro*.

Показано е, че при нормални условия мутантът на *Arabidopsis thaliana* lut2 се характеризира с по-ниско ниво на кислородно отделяне и усвояването на енергията от ФС2 в сравнение с дивия тип, а енергетичният натиск върху ФС2 е по-висок, цикличният електронен транспорт около ФС1 е по-бърз. Преносът на енергия от ФС2 към ФС1 е по-силно изразен, което най-вероятно се дължи на по-голям процент стромални участъци и/или по-голяма популация на комплексите на ФС1.

Чувствителността на комплекса на ФС2 към фотоинхибиторно третиране *in vivo* и *in vitro* по отношение на електронния транспорт, ефективността на кислородното отделяне и максималната квантова ефективност е по-силно изразена при липсата на лютеин. При осветяване *in vivo* количеството на активните ФС2 центрове, разположени в граналните участъци на тилакоидните мембрани е намалено, но активността на незасегнатите центрове се запазва по отношение на светкавичните кислородни добиви при липсата на лютеин, докато промените в дивия тип са по-слабо изразени. В резултат на светлинно-индуцирана реорганизация на пигмент-белтъчните комплекси се наблюдават промени в енергетичното взаимодействие между ФС2 и ФС1, изразено в пренасочване на повече енергия към ФС1 (spillover). Енергетичният натиск върху ФС2 в процеса на осветяване е по-висок и цикличният електрон транспорт около ФС1 е по-бърз при липсата на лютеин в сравнение с дивия тип.

При осветяване с висок светлинен интензитет *in vivo* значителна част от излишната погълната енергия се обезврежда по механизъм, който не зависи от функционирането на ксантофиловия цикъл, като приносът му е по-силно изразен при липсата на лютеин. Наблюдаваните *in vivo* светлинно-индуцирани промени в активността на фотосинтетичния апарат на *Arabidopsis thaliana* са по-ясно изразени при третиране при ниска температура.

Показано е, че липсата на лютеин ускорява процесите на обезцветяване на фотосинтетичните пигменти като най-засегнати са хлорофил а и каротеноидите. Засегната е и стабилността на протеините на светосъбиращите комплекси. Това потвърждава значителната роля на лютеина в обезвреждането на светлинно-индуцираните активни кислородни форми

4. Изводи

1. Мутантът на *Arabidopsis thaliana* lut2, който не синтезира лютеин, се характеризира с по-ниско ниво на кислородно отделяне и усвояването на енергия от ФС2 в сравнение с дивия тип, а енергетичният натиск върху ФС2 е по-висок, цикличният електронен транспорт около ФС1 е по-бърз и преносът на енергия към ФС1 е по-силно изразен.
2. При фотоинхибиторно третиране *in vivo* на *Arabidopsis thaliana* липсата на лютеин повишава чувствителността на ФС2 по отношение на електронния транспорт, ефективността на кислородното отделяне и максималната квантова ефективност. Наблюдаваните промени са по-силно изразени при третиране при ниска температура.
3. При осветяване с висок светлинен интензитет на цели листа от *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, пигментното съдържание в дивия тип не се променя значително, докато при мутанта се наблюдава намаление в количеството на каротеноидите.
4. При фотоинхибиране *in vivo* и *in vitro* настъпват промени в енергетичното взаимодействие между ФС2 и ФС1, изразено в пренасочване на повече енергия към ФС1 (spillover), като наблюдаваните промени са по-силно изразени при мутанта, който не синтезира лютеин, най-вероятно свързани с по-значимо реорганизиране на пигмент-белтъчните комплекси.
5. Фотоинхибиращото третиране на цели листа от lut2 води до намаляване на активните ФС2 центрове, разположени в граналните участъци на тилакоидните мембрани, като активността на незасегнатите центрове се запазва по отношение на кислородните светкавични добиви. Наблюдаваните промени при фотоинхибирани листа на дивия тип са много по-слабо изразени.
6. Значителна част от излишната погълната светлинна енергия от цели листа на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, се обезврежда по механизъм, който не зависи от функционирането на ксантофиловия цикъл като този механизъм има по-голям принос при гасенето на енергията при мутанта.
7. При фотоинхибиращо третиране *in vivo* увеличението на енергетичния натиск върху ФС2, обезвреждането на излишната погълната светлинна енергия по независимия от ксантофиловия цикъл механизъм и цикличният електронен транспорт около ФС1 са по-силно изразени при липсата на лютеин. Светлинно-индуцираните промени при wt и lut2 са по-силно изразени при ниска температура.

8. Липсата на лютеин увеличава степента и кинетиката на фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти в тилакоидни мембрани на *Arabidopsis thaliana* при осветяване с висок светлинен интензитет. Най-интензивно обезцветяване се наблюдава при хлорофил а и картеноидите.

9. При въздействие с висок светлинен интензитет на тилакоидни мембрани от *Arabidopsis thaliana* обезцветяването на фотосинтетичните пигменти е съпътсвано от разграждане на белтъците на антенните комплекси на двете фотосистеми, по-силно изразено при липсата на лютеин.

5. Приноси

1. Проведен е детайлен анализ на фотосинтетичната активност на мутанта *lut2* на *Arabidopsis thaliana*, който не синтезира лютеин, по отношение на чувствителността му към осветяване с висок светлинен интензитет при нормална и ниска температура.

2. Показано е, че липсата на лютеин ускорява процесите на инактивация на фотосинтетичния апарат (ФС2 и ФС1) в резултат на фотоинхибиращо третиране *in vivo*. Наблюдаваните промени са по-силно изразени при осветяване при ниска температура.

3. Установено е, че значителна част от излишната погълната светлинна енергия се обезврежда по механизъм, който не зависи от функционирането на ксантофиловия цикъл.

4. За първи път е показано, че липсата на лютеин ускорява процеса на обезвреждане на излишната погълната светлинна енергия по независимия от ксантофиловия цикъл механизъм и ускорява цикличния електронен транспорт около ФС1.

5. За първи път е показано, че липсата на лютеин ускорява обезцветяването на фотосинтетичните пигменти и разграждането на белтъците на светосъбиращите комплекси, което е индикация, че лютеинът играе съществена роля при обезвреждане на светлинно-индуцираните активни кислородни форми.

6. Публикации

1. Dobrev K., Stanoeva D., Velitchkova M., Popova A.V., 2015, Alterations in primary photosynthetic reactions of *Arabidopsis thaliana*, wt and *lut2* under photoinhibition *in vivo*, *Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences*, 68 (5) 601-608.

2. Dobrev K., Stanoeva D., Velitchkova M., Popova A.V., 2016, The lack of Lutein Accelerates the Extent of Light-induced Bleaching of Photosynthetic pPigments in Thylakoid Membranes of *Arabidopsis thaliana*, *Photochemistry and Photobiology*, 92, 436–445.

3. Popova A.V., Dobrev K., Velitchkova M., Ivanov A.G., 2018, Differential temperature effects on dissipation of excess light energy and energy partitioning in *lut2* mutant of

Arabidopsis thaliana under photoinhibitory conditions, Photosynthesis research, doi.org/10.1007/s11120-018-0511-2, in press.

7. Забелязани цитирания

Wang R., Zhou H., Ding S., An K., Ou S., 2018, Post-effects of high hydrostatic pressure on chlorophylls and chlorophyll–protein complexes in spinach during storage, 12(2):1316-1324

8. Участия в научни форуми

1. Младежка научна конференция с международно участие „Биологията - развитие и нови възможности - Климентови дни 2013“, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, постер на тема „Effect of low growth temperature on photosynthetic parameters of tomato plants in vivo“, K. Dobrev, D. Stanoeva, A. Popova, 20-22 Ноември 2013.
2. Научна сесия “Биомедицина и качество на живота”, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН, презентация на тема „Промени във фотосинтетичната активност на *Arabidopsis thaliana* при осветяване с висок светлинен интензитет“, автори: K. Dobrev, D. Stanoeva, M. Velitchkova, A. Popova, 2 Октомври 2014.
3. Младежка научна конференция „Климентови дни 2014“, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, постер на тема „High light induced alterations in the photosynthetic activity of *Arabidopsis thaliana*, wt and mutant lut2, in vivo“, автори: K. Dobrev, D. Stanoeva, M. Velitchkova, A. Popova 17-18 Октомври 2014.
4. Семинар по екология при Институт по Екология, БАН, постер и презентация на постера на тема „High light induced photobleaching of photosynthetic pigments in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes, wt and lutein deficient mutant lut2“, автори: K. Dobrev, D. Stanoeva, A. Popova 23-24 Април 2015.
5. Младежка научна конференция „Климентови дни 2016“, постер на тема „Photoinhibition of Photosystem II related reactions in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*, wt and mutant lut2, at room temperature“, автори: K. Dobrev, G. Petrova, D. Stanoeva, M. Velitchkova, A. Popova, 17-18 Ноември 2016, с получена награда за най-добър постер.
6. Участие с презентация в Научна сесия ”Биомедицина и качество на живот – Младите в науката”, 26-27 юни 2017 – K. Dobrev, D. Stanoeva, M. Velitchkova, A. Popova, Photoinhibition of photosystems in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*, wt and mutant lut2 at low temperature.

9. Участия в проекти

Два научно-изследователски проекта към БАН:

- Ефект на пониженото каротеноидно съдържание за устойчивостта на фотосинтетичния апарат към висок светлинен интензитет на *Arabidopsis thaliana*. Изследване in vivo, 2015-2017г.
- Характеризиране процеса на обезцветяване на фотосинтетичните пигменти в тилакоидни мембрани на *Arabidopsis thaliana*, див тип (wt) и мутант lut2 при осветяване с висок светлинен интензитет, 2015-2017г.

Ръководител на проект ДФНП-134, по Програма за подпомагане на младите учени, финансирана от БАН, 2016, „Роля на каротеноидите за устойчивостта на фотосинтетичния апарат на тилакоидни мембрани на висши растения към висок светлинен интензитет”