

### **БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ** ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Екатерина Калинова Йоцова

## Чувствителност, инхибиране и защита на фотосинтетичния апарат в условия на кадмиев стрес

## ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

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

Научен ръководител: проф. д-р Емилия Апостолова Научен консултант: доц. д-р Анелия Добрикова

София, 2020 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на 26.05.2020 г. от разширен семинар на секция "Фотовъзбудими мембрани" към Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, Българска академия на науките.

Дисертационният труд съдържа 124 страници, включващи текст (9 глави), 24 фигури и 18 таблици (от тях: 14 фигури и 18 таблици в глава "Резултати"), цитирани са 438 литературни източника. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 3 научни публикации. Забелязани са 19 независими цитирания.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на . .2020 г. от . . часа в заседателната зала на ИФРГ - БАН, София 1113, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 21, ет. 2.

Материалите свързани със защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ - БАН, София 1113, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 105.



## **БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ** ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Екатерина Калинова Йоцова

## Чувствителност, инхибиране и защита на фотосинтетичния апарат в условия на кадмиев стрес

## ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

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

Научен ръководител: проф. д-р Емилия Апостолова Научен консултант: доц. д-р Анелия Добрикова

София, 2020 г.

### Използвани съкращения

$A_0$	първичен електронен акцептор
A <sub>1</sub>	вторичен електронен акцептор
ABA	абсцисиева киселина
APX	аскорбат пероксидаза
BO	бензохинон
Car	каротиноили
CAT	каталаза
Cd	калмий
Chl	хлорофил
DCMU	N <sup>-</sup> -(3 4-лихпорфенил)-N N-лиметилкарбамил (лиурон)
DCPIP	лих порфенолиндофенол
DGDG	
DW	CUXO TECHO
FTR	
EIK E/Eo	отношение на фотохимищите кам нефотохимищите процеси в $\Phi C^2$
F/E	отношение на фотохимичните към нефотохимичните процеси в $\Phi C^2$
T'v/T'm	максимален квантов добив на $\Psi C2$
UA CD	Гиберелинова киселина
GK	глутатион редуктаза
$H_2O_2$	водороден пероксид
KD	скоростна константа на възбудените Si състояния
MGDG	моногалактозил диацилглицерол
NPQ	нефотохимично гасене
P680	фотохимичен РЦ на ФС2
P <sub>700</sub>	фотохимичен РЦ на ФС1
PC	пластоцианин
PG	фосфатидилглицерол
POD	пероксидаза
PQ	пластохинон
QB	вторичен хинонов акцептор на електрони във ФС2
q <sub>N</sub>	коефициент на нефотохимично гасене
qР	коефициент на фотохимично гасене
QA	първичен хинонов акцептор на електрони във ФС2
R <sub>Fd</sub>	флуоресцентно хлорофилно отношение
ROS	активни форми на кислорода
<b>S</b> <sub>0</sub>	$\Phi C2$ центровете в състоянието S <sub>0</sub> на тъмно
SA	салицилова киселина
SB	количество на блокираните ФС2 центрове
SE	стандартна грешка
SL	сулфолипиди
SOD	супероксид дисмутаза
SQDG	сулфохиновозил диацилглицерол
TF	фактор на транслокация
Y	амплитула на кислоролно отлеляне слел третата светкавина
Yz	тирозинов остатък
α	загуби
ß	лвойни попаления
r Øpsii	ефективен квантов лобив на ФС2 фотохимията
A	
АТФ	аленозин трифосфат
KOC	KUCHOMOH-OTHERSHIP CUCTEMP
NUC	кнолород-отделяща спотема

ЛЕТ	линеен електронен транспорт
МДА	малондиалдехид
НАДФН	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
РАМ хлорофилна	импулсно-амплитудно модулирана хлорофилна
флуоресценция	флуоресценция
РЦ	реакционен център
CCK1	светлосъбиращ комплекс на ФС1
CCK2	светлосъбиращ комплекс на ФС2
ТБК	тиобарбитурова киселина
ТМ	тилакоидна мембрана
TXO	трихлороцетна киселина
Фео	феофитин
ФС1	фотосистема 1
ФС2	фотосистема 2
ЦЕТ	цикличен електронен транспорт
цит. <i>b6f</i>	цитохром <i>b6f</i>

### Увод

Замърсяването на околната среда с тежки метали е един от най-значимите екологични проблеми в световен мащаб. Процесът на тяхното отстраняване е труден и продължителен, тъй като те не са биоразградими и остават в почвата за продължителен период от време. Тежките метали са особено токсични елементи, които в достатъчно високи количества увреждат растенията и намаляват растителната продукция. Попадайки в хранителната верига те застрашават здравето и живота на всички живи организми, включително и на хората.

Кадмият е един от най-токсичните тежки метали и е един от основните метални замърсители. Той се използва в производството на батерии, проводници, метални плоскости и детайли. Освен това, кадмият е вторичен продукт от рудодобивната дейност и промишленото производство на желязо, никел и други метали. Завишените количества на този тежък метал в околната среда най-често се дължат на замърсяване на водоемите от минната дейност и промишлеността. Високата разтворимост на кадмия във вода и лесната му абсорбция от корените на растенията води до натрупването му в тъканите на селскостопанските култури, което от своя страна може да доведе до натравяне с кадмий.

При растенията токсичното действие на кадмия се изразява в инхибиране на растежа и намаляване ефективността на фотосинтезата, активиране или инхибиране на различни ензими, нарушен воден баланс и йонен метаболизъм, както и формиране на свободни радикали.

Кадмиевите йони взаимодействат и променят фотосинтетичния апарат на различни нива, причинявайки структурни и функционални модификации в тилакоидните мембрани като по този начин инхибират техните функции. Тези йони оказват влияние и върху биосинтезата на хлорофила, липидния състав и организацията на пигмент-белтъчните комплекси на тилакоидните мембрани. Причинените, под действието на кадмиевите йони, увреждания на фотосинтетичния апарат значително повлияват цялостния фотосинтетичен капацитет на растенията, като тези промени зависят от растителния вид, генотип и екотип.

В процеса на еволюцията растенията са развили редица защитни механизми за преодоляване на стрес факторите на околната среда в това число и неблагоприятното действие на тежките метали. Въпреки множеството изследвания за инхибирането и защитата на растенията в условия на кадмиев стрес, молекулните механизми на тези процеси не са напълно изяснени. В настоящия дисертационен труд са изследвани промените, настъпващи в два стопански значими растителни вида: ориз (*Oryza sativa* L.) и пшеница (*Triticum aestivum* L.) в условия на кадмиев стрес, както и защитните механизми на тези растения при въздействие с този тежък метал. Посредством различни биохимични и биофизични методи са установени промените в пигментния състав, нивото на стрес маркерите и функционалната активност на фотосинтетичния апарат, както и защитното влияние на салициловата киселина, DELLA белтъците и зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris*. Изследванията в настоящия на растенията към неблагоприятните фактори на околната среда, както и възможностите за екзогенно приложение на салициловата киселина или *Chlorella vulgaris* за намаляване на вредното действие на тежките метали.

### Цел и задачи

Замърсяването на околната среда с тежки метали е актуален екологичен проблем както в световен мащаб, така и в нашата страна. Високи количества от тези метали увреждат растенията и намаляват техните добиви, а попадайки в хранителната верига могат да бъдат опасни за всички живи организми, включително и за хората. Кадмият е един от най-токсичните тежки метали.

За преодоляване на стрес факторите на околната среда, в това число и неблагоприятното действие на тежките метали, при растенията се активират редица защитни механизми. Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследват промените, настъпващи при ориз (*Oryza sativa* L.) и пшеница (*Triticum aestivum* L.) в условия на кадмиев стрес, както и да се изяснят защитните функции на салициловата киселина, зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* и на DELLA белтъците.

За осъществяване на тази цел бяха проследени промените в пигментния състав на листата, растежните параметри, нивото на стрес маркерите и функционалната активност на фотосинтетичния апарат. Поставени бяха следните конкретни задачи:

**1.** Да се изследва влиянието на различни концентрации салицилова киселина, приложени чрез корените, върху оризови растения, за да се избере оптимална концентрация на салициловата киселина за приложението й в условия на кадмиев стрес.

**2.** Да се изследва влиянието на кадмиевия стрес върху оризови растения в присъствието на оптималната концентрация на салицилова киселина, добавена към хранителната следа.

**3.** Да се изследва влиянието на кадмиевия стрес върху оризови растения в присъствието на зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris*, добавено към хранителната среда.

**4.** Да се изследва ролята на DELLA белтъците в условия на кадмиев стрес, използвайки два генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип) и *Rht-B1c* (мутант с високи нива на DELLA белтъци).

### Материали и методи

### 1. Условия на отглеждане и третиране на растенията

### 1.1. Условия на отглеждане и третиране на оризови растения

Семената на ориз (*Oryza sativa* L. Galileo) са предоставени от ЕКОПРИМ ЕООД, България за целите на изследването. Покълването на семената е извършено върху мокра филтърна хартия на тъмно за период от 5-6 дни при температура от 28 °C. След покълването младите растения са разделени на групи от около 60 растения и са отглеждани хидропонно в пластмасови кутии, съдържащи 1 литър хранителен разтвор на Hoagland с модификации: 2.5 mM KNO<sub>3</sub>, 2.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 23 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4.5 µM MnCl<sub>2</sub>, 0.4 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.25 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 20 µM Fe-EDTA (pH 6.0). Хранителният разтвор се сменя на всеки 4 дни. Растенията се отглеждат при контролирани условия: светлинен интензитет от 150 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> и 12-часов фотопериод при дневна/нощна температура 26/20 °C. Изследванията са извършени след третиране на растенията в продължение на 14 дни.

За третиране със салицилова киселина към хранителния разтвор на различните групи растения е добавяно различно количество от сток разтвор на SA до получаване на крайна концентрация от 10, 50 или 100 µM SA в разтвора.

За третиране със салицилова киселина и кадмий към хранителния разтвор на различните групи растения е добавяно различно количество от сток разтворите на SA и/или CdCl<sub>2</sub> до получаване на крайните концентрации от 10  $\mu$ M SA и 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в разтвора. Третирането е проведено за 14 дни с ежедневно аериране като разтвора се сменя на всеки 4 дни. Като се има предвид предположението за образуването на комплекс между Cd и SA, използвахме програмата GEOCHEM-EZ (Shaff et al. 2010), за да изчислим свободния Cd<sup>2+</sup> в хранителния разтвор с добавена 10  $\mu$ M SA. Резултатите разкриха, че 88,96% от добавения Cd е наличен като свободен метален йон. Концентацията на CdCl<sub>2</sub> е определена след проведени предварителни

опити. Избрана е концентрацията на CdCl<sub>2</sub>, която повлиява изследваните параметри, но намалението им не е повече от 50%.

За отглеждане на растенията в присъствие на *Chlorella vulgaris* и кадмий към хранителния разтвор на различните групи растения е добавяна клетъчната суспензия на *Chlorella vulgaris* до получаване на оптическа плътност  $OD_{760}=1.2$  и/или от сток разтвор на CdCl<sub>2</sub> до получаване на крайна концентрация от 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> за 14 дни с ежедневно аериране като разтвора се сменя на всеки 4 дни. След проведени предварителни експерименти е установено, че това количество от зеленото водорасло е оптимално за растежа и развитието на растенията.

### 1.2. Условия на отглеждане и третиране с кадмий на два генотипа пшеница

За целите на изследването са използвани две близко-изогенни линии пшеница (Triticum aestivum L., cv. April Bearded) с разлика в Rht-B1 локуса: Rht-B1a (високи растения, див тип алел, WT) and Rht-B1c (джуджета, мутантен алел, Mut). Семената са предоставени от Лайбниц Институт по растителна генетика и изследване на културните растения, Гатерслебен, Германия и са поддържани в ИФРГ- БАН. Мутантният алел -B1c отговаря за изменения на голям брой белези, свързани с морфологията на клетките и растенията, включително и фотосинтезата (Flintham & Gale,1982; Flintham et al.,1997; Wen et al., 2013). Семената на пшеницата са поставени за покълване върху мокра филтърна хартия на тъмно за период от 3-4 дни. След покълването младите растения са разделени на групи от около 60 растения и са отглеждани хидропонно в пластмасови кутии, съдържащи 1 литър хранителен разтвор на Hoagland с модификации: 2.5 mM KNO<sub>3</sub>, 2.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 23 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4.5 µM MnCl<sub>2</sub>, 0.4 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.25 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 20 µM Fe-EDTA, (pH 6.0). Хранителният разтвор се сменя на всеки 4 дни като се аерира ежедневно. Растенията са отглеждани при контролирани условия: светлинен интензитет от 150-180 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> и 12-часов фотопериод и дневна/нощна температура от порядъка на 24/19 °C. Изследванията са извършени върху растения, изложени на токсичното действия на тежкия метал (Cd) в продължение на 10 дни. За третиране, към хранителната среда е добавен CdCI2 от сток разтвор до крайна концентрация от 100 µM като разтвора се сменя на всеки 4 дни. По-ниската концентрация на CdCl<sub>2</sub> и по-краткото време на третиране при пшеницата бяха избрани след проведени предварителни експерименти и литературни данни, тъй като пшеницата е по-чувствителна от ориза в условия на кадмиев стрес. Концентрацията беше избрана, така че Cd-индуцираните ефекти върху изследваните параметри да са сходни с тези при оризови растения.

### 1.3. Условия на отглеждане на Chlorella vulgaris

Едноклетъчното зелено микроводорасло *C. vulgaris* е предоставено от секция алгология към ИФРГ-БАН. Клетъчната суспензия е отглеждана при осветяване с интензитет от 80 µmol  $m^{-2} s^{-1}$ , при температура 30 °C и при непрекъснато аериране с 2% CO<sub>2</sub> (100 l  $m^{-3}h^{-1}$ ). Растежът на клетъчната културата е следен чрез спектрофотометрично измерване на оптичната плътност на суспензията. Суспензията от зеленото микроводорасло *C. vulgaris* е добавяна към хранителния разтвор на оризовите растения до получаване на OD<sub>760</sub>=1.2 в хранителния разтвор.

### 2. Изолиране на тилакоидни мембрани

Тилакоидните мембрани са изолирани по методите на Harrison & Mellis (1992) с модификации. Листата на растенията се хомогенизират в буфер със състав: 50 mM Tricine (pH 7.8), 0.4 M захароза, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl. Хомогенатът се филтрува и се центрофугира за 5 min при 4000 g. Утайката се ресуспендира в буфер, съдържащ 50 mM Tricine (pH 7.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, при което се лизират хлоропластите. Хомогенатът отново се центрофугира за 10 min при 6000 g на центрофуга K23 "Janetzki". Утайката се ресуспендира в буфер, съдържащ 40 mM Hepes (pH 7.6), 0.4 M захароза, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Всички процедури се провеждат при температура 0-4 °C.

### 3. Растежни параметри

Растежните параметри са определяни чрез измерване на дължините на корените и на надземната част на растението в сантиметри (см) след приключване на съответното третиране. Надземната част на растенията за по-кратко в дисертационния труд ще бъде наричана стъбло.

### 4. Определяне на пигментното съдържание

Пигментното съдържание на тилакоидните мембрани се определя като част от пробата се разрежда в обемно отношение 1:100 в 80% (v/v) ацетон, по този начин пигментите се екстрахират от мембраните. За определяне на пигментното съдържание в листата, те се стриват в ледено студен 80% (v/v) ацетон и се центрофугират при 5000 x g в продължение на 5 min при 4 °C След това се определя пигментното съдържание в супернатантата.

Съдържанието на общия хлорофил, Chl *a*, Chl *b* и каротиноидите (Car) е измерено с двойно-лъчев спектрофотометър (SPECORD 210 PLUS, Edition 2010, Analytik-Jena AG, Германия) по метода на Lichtenthaler (1987). Измерва се абсорбцията на растителния екстракт при 470 nm, 646.8 nm и 663.2 nm. Съдържанието на пигментите в листата е изчислено към грам свежо тегло (g FW).

Концентрацията на хлорофила и каротиноидите са определени по формулите: Chl  $a = 12.25.A_{663.2} - 2.79.A_{646.8}$ Chl  $b = 21.50.A_{646.8} - 5.10.A_{663.2}$ Chl  $(a+b) = 7.15.A_{663.2} + 18.71.A_{646.8}$ Car =  $(1000.A_{470} - 1.82.(Chl a) - 85.02.(Chlb))/198$ 

### 5. Определяне на съдържанието на кадмий

Измерванията на съдържанието на кадмий (Cd) е извършено от специализираната лаборатория на Лесотехническия университет, София (EN ISO 6869). Изсушените проби от надземната част на растенията и корените са смлени и след това изгорени при 450 °C. Впоследствие пробите са обработени с 20% HCl при 200 °C. Количеството на Cd е определено чрез атомно-абсорбционна спектрометрия (Perkin Elmer 5000, USA) при 228.8 nm. Натрупването на Cd в надземните части на растенията и корените е изчислено на грам сухо тегло (DW) (Mesnoua et al., 2016). Резултатите са осреднени от три независими експеримента. Коефициентът на транслокация (TF = [Cd] надземна част / [Cd] корен) е изчислени както е описано в Mesnoua et al. (2016).

### 6. Определяне на маркери на оксидативен стрес при оризови растения 6.1. Водороден пероксид

Съдържанието на водородния пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в листа е определено по метода на Alexieva et al. (2001) с малки модификации. Нарязаните на ситно листа (100 mg средна проба) се стриват с 3 ml 1% трихлороцетна киселина (TXO) при 4 °C до получаване на хомогенна суспензия, след което се центрофугират на 14 000 g за 20 min. Приготвя се реакционна смес, съдържаща 0.5 ml от супернатантата от листния екстракт с 1% TXO, 0.5 ml от 100 mM Na–Kфосфатен буфер (pH 7.6) и 1 ml 1 M KI w/v в д.Н<sub>2</sub>O. Приготвя се и празна проба с 1% TXO, която не съдържа листен екстракт. Реакцията протича за 1 час на тъмно, след което абсорбцията е измерена при 390 nm. Количеството H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> е изчислено чрез моларния му екстинкционен коефициент (0.28  $\mu$ M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) и изразен като nmol на грам свежо тегло (FW).

### 6.2. Малондиалдехид

Степента на прекисно окисление на липидите е определена чрез измерване съдържанието на малондиалдехид (МДА) чрез реакция с тиобарбитуровата киселина (ТБК) по метода на Heath & Packer (1968). МДА е вторичен продукт от прекисното окисление на полиненаситените мастни киселини на мембранните липиди. Нарязаните на ситно листа (100 mg средна проба) се стриват с 3 ml 1% ТХО при 4 °C до получаване на хомогенна суспензия, след което се центрофугират на 14 000 g за 20 min. Реакционната смес съдържа 0.5 ml от супернатантата от листния екстракт с 1% ТХО, 0.5 ml от 100 mM Na–K-фосфатен буфер (pH

7.6) и 1 ml TXO с ТБК (20% (w/v) TXO, съдържащо 0.5% (w/v) ТБК). Празната проба съдържа изброените реагенти, но вместо от супернатантата се добавят 0.5 ml 1% TXO, която не съдържа листен екстракт. Реакционната смес се нагрява на водна баня при 95 °C за 30 min, след което се охлажда в лед, за да спре реакцията. Измерва се абсорбцията при 532 nm. Концентрацията на МДА е определена чрез моларния му екстинкционен коефициент (0.155  $\mu$ M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) и изразена като nmol на грам свежо тегло (FW) (Heath & Packer, 1968).

### 6.3. Пролин

Съдържанието на аминокиселината пролин в листа е определено по метода на Bates et al. (1973) с модификации. Нарязаните на ситно листа (100 mg средна проба) се стриват с 3 ml 3% сулфосалицилова киселина при 4 °C до получаване на хомогенна суспензия, след което се филтрират през филтърна хартия (Grade 601 Qualitative Filter Paper). Реакционната смес съдържа 1 ml растителен екстракт и 1 ml ледена оцетна киселина, и 1 ml реагент нинхидрин (500 mg нинхидрин се разтварят в 12 ml ледена оцетна киселина и 8 ml 6 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Пробите се инкубират при 95 °C за 1 час, след което се охлаждат в лед, за да спре реакцията. Пробите се оставят да се темперират до стайна температура и се добавя по 2 ml толуен. Разбъркват се на вортекс и се оставят да се разделят двата слоя. Измерва се екстинкцията на горния, оцветен в розово толуенов слой при дължина на вълната 520 nm. Количественото съдържание на пролина се изчислява по стандартна крива и се изразява като nmol на грам свежо тегло (FW).

### 7. Импулсно-амплитудно модулирана (РАМ) хлорофилна флуоресценция

Импулсно амплитудно модулираната хлорофилна флуоресценция е измерена на

листа при стайна температура с флуориметър PAM 101-103 (Walz, Effeltrich, Germany). Листата са тъмнинно адаптирани за 30 min преди измерванията. Минималната флуоресценция  $F_0$  е определена чрез подаване на светлина (660 nm) с много нисък интензитет от 0.020  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>, подаван от LED емитер (РАМ 101 ED). Максималната флуоресценция в тъмнинно адаптирано състояние F<sub>m</sub> и светлинно адаптираното състояние F<sub>m</sub> са определени чрез въздействие с кратки насищащи импулси с висок интензитет от 2500 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> с продължителност 0.8 sec, подавани от Schott lamp KL 1500 (Schott Glaswerke, Mainz, Germany). Актиничната светлина (150 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) е прилагана в продължение на 6 min в комбинация с един насищащ импулс (2500  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) на минута. Изчислени са следните параметри: F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> – максимален квантов добив на ФС2 (Kitajima & Butler, 1975); F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> – отношение на фотохимичните към нефотохимичните процеси в  $\Phi$ C2 (Rohacek, 2002);  $\phi_{PSII} = \Delta F/F_m' = (F_m')$ F<sub>s</sub>)/F<sub>m</sub>' - ефективен квантов добив на фотохимичното преобразуване на енергията във ФС2 (Rohacek, 2002); q<sub>P</sub> = ( $F_m$  -  $F_s$ )/( $F_m$  -  $F_0$ ) - коефициент на фотохимично гасене (Schreiber et al., 1986); ETR =  $\Phi_{PSII}$  x PFD x 0.5 - скорост на линейния електронен транспорт (Genty et al., 1989). Определено е отношението R<sub>Fd</sub> измерено в условия на насищаща продължителна светлина - R<sub>Fd</sub> = F<sub>d</sub>/(F<sub>m</sub> - F<sub>d</sub>) - флуоресцентно хлорофилно отношение, корелиращо със скоростта на фотосинтезата, където Fd е намалението на хлорофилната флуоресценция от Fm до стационарно ниво (Lichtenthaler et al. 2005).

### 8. Окислително-редукционни свойства на Р700

Окислително-редукционните процеси във ФС1, които са резултат от фотоокислението на Р<sub>700</sub> (Р<sub>700<sup>+</sup></sub>), са изследвани чрез анализ на промените в абсорбцията при облъчване с дълговълнова червена светлина (830 nm) на листа при стайна температура след 20 минутна тъмнинна адаптация (Klughammer & Schreiber, 1994). Изследвани са измененията в относителните амплитуди (отношението  $\Delta A/A$ ) и кинетиките на тъмнинната редукция на Р<sub>700<sup>+</sup></sub>, които се характеризират с 2 експоненти (бърза и бавна), с полувремена  $t_1$  (за бързата компонента) и  $t_2$  (за бавната компонента). Измерванията са направени *in vivo* при стайна температура на флуориметър РАМ-101/103 (Walz, Effeltrich, Германия), оборудван с ED-800T емитер-детекторна система.

### 9. Фотохимични активности на фотосистема 1 и фотосистема 2

Измерванията са проведени на изолирани тилакоидни мембрани в присъствие на различни донори и акцептори.

Фотосистема 2 - зависимият електронен транспорт (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ) е използван за оценка на фотохимичната активност на ФС2 и е определен полярографски чрез измерване на кислородното отделяне при реакцията на Хил посредством Clark-тип електрод (Model DW1, Hansatech, UK) на суспенсия от 2 ml при контролирана температура от 20° C и осветяване с наситена бяла светлина (600 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Тилакоидните мембрани са ресуспендирани в буфер, съдържащ: 20 mM MES (pH 6.5), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM захароза и екзогенен акцептор 1,4-бензохинон (0.4 mM BQ). Концентрацията на хлорофила е 25 µg ml<sup>-1</sup>.

Фотосистема 1 - зависимият електронен транспорт (DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV) е използван за оценка на фотохимичната активност на ФС1 и е определен чрез измерване на кислородното поглъщане при реакцията на Мелер в реакционна смес, съдържаща: 40 mM Hepes (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM захароза в присъствието на 20  $\mu$ M DCMU, 6 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM MV, 5 mM натриев аскорбат и 0.5 mM DCPIP. Концентрацията на хлорофила е 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

# 10. Кислородно отделяне при въздействие със светкавици и непрекъснато осветяване. Кинетични параметри

Функционалните промени в КОС са изследвани посредством измерване на светкавичните кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване, които са измерени на суспензия от изолирани тилакоидни мембрани с Joliot-тип скоростен полярографски електрод (Joliot & Joliot, 1968; Zeinalov, 2002). Суспензията от тилакоидни мембрани с концентрация на хлорофила 300  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> и обем 100  $\mu$ l образува тънък слой върху платинения електрод. Реакционната смес съдържа: 40 mM HEPES (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 400 mM захароза, без екзогенен електронен акцептор. Пробите са тъмнинно адаптирани за 10 минути върху електрода, непосредствено преди измерванията. Светкавичните кислородни добиви са индуцирани чрез осветяване с насищащи (4J) и кратки (t<sub>1/2</sub> =10  $\mu$ s) светкавици, подавани периодично през интервали от 0.7 s. Записите на светкавичните кислородни добиви показват максимално отделяне на кислород след третата светкавица. Амплитуда след третата светкавица (Y) беше определяна и се използва за характеризиране на кислородното отделяне при въздействие със светкавици.

Определено беше и кислородното отделяне при непрекъснато осветява с бяла светлина (400  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), което се характеризира с амплитуда на първоначално силно кислородно избухване (*A*).

Кинетичните параметри на кислородното отделяне са определени, анализирайки осцилациите на светкавичните кислородни добиви и използвайки модела на Кок (Kok et al., 1970) и неговия разширен кинетичен модел с компютърна програма (Zeinalov, 2010). Определени бяха следните кинетични параметри на кислородното отделяне: S<sub>0</sub> -  $\Phi$ C2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно (S<sub>1</sub> = 1- S<sub>0</sub>), K<sub>D</sub> - скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на превъртане "turn over" на кислород-отделящите центрове), S<sub>B</sub> - количеството на блокираните  $\Phi$ C2 центрове,  $\alpha$  - загубите и  $\beta$  - двойните попадения. Параметрите S<sub>B</sub> и K<sub>D</sub> са определени чрез разширения кинетичен модел на Кок (Zeinalov, 2010), чрез вариране на интервала между светкавиците (1.0 s, 0.7 s и 0.5 s).

### 11. Нискотемпературна хлорофилна флуоресценция

Измерванията на спектрите на нискотемпературната (77К) хлорофилна флуоресценция са направени на тилакоидни мембрани (концентрацията на хлорофила е 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) със спектрофлуориметър Jobin-Yvon (JY3), оборудван с приставка за измерване с течен азот. Пробите бяха бързо замразени в цилиндрична кварцова кювета чрез потапяне в течен азот. Спектрите на хлорофилна флуоресценция са измерени при възбуждане на Chl *a* (436 nm) и са записани от 650 nm до 780 nm с ширина на процепа от 4 nm. Флуоресцентните емисионни спектри на изследваните растителни видове се характеризират с флуоресцентни ивици при 685 nm, 695 nm и една дълговълнова (735 nm или 744 nm). Максимумът при 735 nm е характерен за пшеницата, а този при 744 nm за ориз. Флуоресцентните ивици при 685 nm и 695 nm са от

флуоресценцията на ФС2, докато дълговълновата ивица (при 735 или 744 nm) е от флуоресценцията на ФС1 (Krause & Weis, 1991). От спектрите е изчислено отношението F744/F685 (за ориз) и F735/F685 (за пшеница), характеризиращо преразпределението на възбуждащата енергия между двете фотосистеми.

### 12. Статистическа обработка на резултатите

Резултатите от изследванията са представени като средна стойност ± стандартната грешка (SE) от поне 5 независими експеримента с поне 3 повторения. Статистическата достоверност на наблюдаваните разлики между всяка от сравняваните стойности е оценена чрез ANOVA тест (VassarStats). Разлики с P < 0.05 са приети за статистически достоверни.

### Резултати

## 1. Влияние на салициловата киселина върху оризови растения 1.1. Растежни параметри и пигментен състав

Изследвано е влиянието на различни концентрации салицилова киселина (10, 50 и 100  $\mu$ M), добавени към хранителния разтвор, върху растежните параметри и пигментното съдържание в листата на оризови растения (Табл. 1). Данните показват нарастване на корените и стъблата на растенията при най-ниската изследвана концентрация от 10  $\mu$ M SA (с 45% при стъблата и с 20% при корените), докато при 50  $\mu$ M SA няма разлика в дължината на корените на растенията спрямо контролата. При най-високата изследвана концентрация от 100  $\mu$ M SA се наблюдава намаление на корените спрямо контролата с 17%, а при стъблата с 32%. Общото хлорофилно (Chl) съдържание нараства в сравнение с контролата при най-ниската изследвана концентрацията на SA (с 29%). Между контролата и най-ниската приложена концентрация SA не се наблюдава статистически достоверна разлика в каротиноидното съдържание, което намалява при по-високите изследвани концентрации и най-много при 100  $\mu$ M SA (с 28%). Третирането със SA в изследвания концентрационен интервал не води до промени в отношението Chl *a/b*.

**Таблица 1.** Влияние на различни концентрации SA (10, 50 и 100  $\mu$ M) върху растежните параметри и пигментното съдържание на оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	10 µM SA	50 µM SA	100 µM SA
Корени (ст)	$9.31 \pm 0.03$ <sup>b</sup>	$11.22 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$9.70 \pm 0.03$ <sup>b</sup>	$7.7\pm0.02~^{\rm c}$
Стъбла (ст)	$19.22\pm0.03~^{b}$	$27.80\pm0.08~^a$	$16.6\pm0.02$ $^{\rm c}$	$13.0\pm0.03$ $^{d}$
Chl (mg g <sup>-1</sup> FW)	$3.48\pm0.02^{\text{ b}}$	$3.72{\pm}0.03~^a$	$2.88\pm0.02~^{c}$	$2.46\pm0.03~^{\text{d}}$
Car (mg g <sup>-1</sup> FW)	$0.76\pm0.01~^a$	$0.78\pm0.02$ $^a$	$0.63\pm0.01$ $^{b}$	$0.55\pm0.01$ $^{\rm c}$
Chl <i>a/b</i>	$4.12\pm0.02~^{a}$	$4.08\pm0.02~^a$	$4.14\pm0.02$ $^{a}$	$4.23\pm0.05~^a$

### 1.2. Параметри на РАМ хлорофилна флуоресценция

Експерименталните резултати показват, че третирането със SA повлиява параметрите на PAM хлорофилната флуоресценция. Най-ниската изследвана концентрация на SA (10  $\mu$ M) води до нарастване на отношението на фотохимичните към нефотохимичните процеси във ФС2 (F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>, с 20%), ефективния квантов добив на ФС2 фотохимията (Ф<sub>PSII</sub>, с 8%), както и нарастване на фотохимично гасене (q<sub>P</sub>, с 7%), скоростта на електронния транспорт (ETR, с 8%) и на отношението R<sub>Fd</sub>, корелиращо със скоростта на фотосинтезата, с 11% (Фиг. 1 A и B). Параметрите Ф<sub>PSII</sub>, q<sub>P</sub>, ETR и отношението R<sub>Fd</sub> по-слабо нарастват при 50  $\mu$ M SA (с 6%). Параметърът F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> намалява (7%) при най-високата приложена концентрация от 100  $\mu$ M SA, докато при останалите изследвани параметри (ф<sub>PSII</sub>, q<sub>P</sub>, ETR, R<sub>Fd</sub>) на хлорофилната флуоресценция не са установени достоверни разлики в сравнение с контролата. Максимална

квантова ефективност на ФС2 фотохимията (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) не се променя спрямо контролата в изследвания концентрационен интервал (Фиг. 1 А).



**Фигура 1.** Влияние на различни концентрации SA (10, 50 и 100  $\mu$ M) върху параметрите на PAM хлорофилната флуоресценция в листа от оризови растения. А.  $F_v/F_m$  – максимална квантова ефективност на ФС2 фотохимията,  $F_v/F_0$  – отношение на фотохимичните към нефотохимичните процеси във ФС2,  $\Phi_{PSII}$  – ефективен квантов добив на ФС2 фотохимията; **B.**  $q_P$  – коефициент на фотохимично гасене, ETR – скорост на линеен електронен транспорт,  $R_{Fd}$  – хлорофил-флуоресцентно отношение. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър. Стойностите за контролата за отделните параметри са:  $F_v/F_m=0.83\pm0.04$ ;  $F_v/F_0=4.49\pm0.02$ ;  $\phi_{PSII}=0.59\pm0.01$ ;  $q_P=0.79\pm0.01$ ; ETR=36.6±0.04;  $R_{Fd}=4.21\pm0.02$ .

### 1.3. Окислително-редукционни свойства на Р700

Влиянието на SA върху окислително-редукционните процеси във ФС1 е изследвано чрез анализ на промените в абсорбцията при 830 nm (ΔA) при облъчване с дълговълнова червена светлина на листа при стайна температура, които са резултат от фотоокислението на Р<sub>700</sub> (Klughammer & Schreiber, 1994). Изследвани са и кинетиките на тъмнинната редукция на Р<sub>700<sup>+</sup></sub>, които се характеризират с 2 експоненти (бърза и бавна) с полувремена t<sub>1</sub> (за бързата компонента) и  $t_2$  (за бавната компонента). Измененията на отношението  $\Delta A/A$ , характеризиращо фотоокислението на P<sub>700</sub> и стойностите за полувремената t<sub>1</sub> и t<sub>2</sub> са представени в Табл. 2. Отношението  $\Delta A/A$  нараства спрямо контролата само при най-ниската изследвана концентрация от 10 µM SA, докато с увеличаване на концентрацията това отношение намалява. Измерванията показват увеличаване на скоростта на редукция на Р700<sup>+</sup>, изразена чрез намаляване на полувремената  $t_1$  и  $t_2$ , при всички изследвани концентрации на SA, с изключение на  $t_1$  при 10  $\mu$ M SA. При най-високата изследвана концентрация от 100  $\mu$ M SA,  $t_1$ намалява с 60%, а t<sub>2</sub> с 64% в сравнение с контролата, което вероятно е резултат от промени в двете субпопулации на  $\Phi$ C1 (бързата и бавната, Bukhov et al., 2002). Намалението на  $t_1$ предполага стимулиране на цикличния електронен транспорт около ФС1 спрямо нетретираната контролна група оризови растения при третиране с високи концентрации на SA (Maxwell & Biggins, 1976).

**Таблица 2.** Влияние на различните концентрации SA (10, 50 и 100 µМ) върху фотоокислението на P<sub>700</sub> при осветяване с дълговълнова червената светлина, 830 nm (100 %  $\Delta$ A/A = (7.96±0.36) x 10<sup>-3</sup>) и кинетиките на тъмнинната редукция на P<sub>700</sub><sup>+</sup> (полувремена,  $t_1$  и  $t_2$ ), измерени на листа от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	10 µM SA	50 µM SA	100 µM SA
ΔA/A (%)	$100 \pm 1.20$ <sup>b</sup>	$109.90 \pm 1.07$ <sup>a</sup>	80.30 ± 2.81 °	$71.80 \pm 5.61$ <sup>c</sup>
<i>t</i> <sub>1</sub> (s)	$1.62\pm0.12$ $^{a}$	$1.35\pm0.17$ $^{a}$	$0.84\pm0.02~^{\text{b}}$	$0.65\pm0.01^{c}$
<i>t</i> <sub>2</sub> (s)	$9.12\pm0.06$ $^{\rm a}$	$6.79\pm0.03~^{\text{b}}$	$4.22\pm0.02$ $^{\rm c}$	$3.28\pm0.03~^{d}$

### 1.4. Фотохимични активности на фотосистема 2 и фотосистема 1

Фотохимичната активност на двете фотосистеми е оценена по  $\Phi$ C2- (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ) и  $\Phi$ C1зависимият електронен транспорт (DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV). Данните показват, че изследваните концентрации на SA (10, 50 и 100 µM) повлияват фотохимичните активности на двете фотосистеми (Фиг. 2). Третирането с 10 и 50 µM SA стимулират фотохимичната активност на  $\Phi$ C2, което е по-силно изразено при 10 µM (до 30%). Данните показват също така, че ниските концентрации SA (10 и 50 µM) имат силно изразен стимулиращ ефект и върху фотохимичната активност на  $\Phi$ C1 (с 70% при 10 µM и 46% при 50 µM). Най-високата изследвана концентрация SA (100 µM) има инхибиращо действие върху  $\Phi$ C2 (с 25%), но не повлиява активността на  $\Phi$ C1.



**Фигура 2.** Влияние на различни концентрации SA (10, 50 и 100  $\mu$ M) върху фотохимичните активности на  $\Phi$ C2 (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ) и  $\Phi$ C1 (DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV), измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър. Стойностите за контролата са:  $\Phi$ C2 = 46.70±1.07  $\mu$ moles O<sub>2</sub>. mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> и  $\Phi$ C1 = 175.30±8.77  $\mu$ moles O<sub>2</sub>.mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>.

# 1.5. Светкавични кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване

Функционалните промени в КОС под влиянието на различни концентрации SA бяха изследвани на изолирани тилакоидни мембрани, посредством скоростен полярографски електрод, чрез измерване на светкавичните кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване без добавяне на външни акцептори. Определени бяха максималната амплитуда на кислородното отделяне след третата светкавица (Y) и амплитудата на кислородното избухване при непрекъснато осветяване (A). Параметърът A корелира с количеството на всички функционално активни реакционни центрове на  $\Phi$ C2 (бързи,  $\Phi$ C2 $\alpha$  и

бавни, ΦС2β центрове), докато параметърът *Y* характеризира основно бързите ΦС2α центрове, намиращи се в граните (Zeinalov & Maslenkova, 1996; Zeinalov, 2005; Apostolova et al. 2006).

Данните показват, че най-ниската изследвана концентрация от 10  $\mu$ M SA има стимулиращ ефект върху кислородното отделяне (Фиг. 3). Прилагането на 10  $\mu$ M SA води до нарастване на параметрите Y (с 45%) и A (с 21%), докато концентрацията от 50  $\mu$ M SA има стимулиращ ефект само върху праметъра Y (с 12%). Най-високата изследвана концентрация от 100  $\mu$ M SA има инхибиращо действие върху светкавичните кислородни добиви (Y намалява с 29%) и кислородното отделяне при непрекъднато осветяване (A намалява с 40%).



**Фигура 3.** Влияние на различни концентрации SA (10, 50 и 100  $\mu$ M) върху светкавичните кислородни добиви след третата светкавица (*Y*) и амплитудата на кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (*A*), измерени на тилакоидни мембрани. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

### 1.6. Кинетични параметри на кислородното отделяне

Кинетичните параметри на кислородното отделяне са показател за изменения в Мп клъстер на КОС (Rashkov et al., 2012; Dobrikova et al., 2013). Анализът на осцилациите на светкавичните кислородни добиви е направен, използвайки модела на Кок (Kok et al., 1970) и неговия разширен модел (Zeinalov, 2010). Стойностите на ФС2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно, загубите ( $\alpha$ ) и двойните попадения ( $\beta$ ), количеството на блокираните  $\Phi$ C2 центрове (S<sub>B</sub>) и скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на "turnover" на кислород-отделящите центрове, К<sub>D</sub>) са представени в Табл. 3. Резултатите показват, че ФС2 центровете в състоянието S0 на тъмно намаляват спрямо контролата при 10 µM SA и нарастват при 100 µM SA, докато при 50 µM SA няма разлика в сравнение с контролата. При третиране с най-ниската изследвана концентрация от 10 µM SA, силно нараства скоростната константа К<sub>D</sub> (с 43%) спрямо контролата и значително по-слабо при 50 µM SA (с 16%), докато при найвисоката изследвана концентрация от 100 µM SA, К<sub>D</sub> намалява с 15%. Не е установена разлика в количеството на блокираните ФС2 центрове (S<sub>B</sub>) в сравнение с контролата при третиране с 10 µM SA, докато при по-високите изследвани концентрации има значително нарастване на този параметър в сравнение с нетретираните растения (с 84%). Двойните попадения ( $\beta$ ) нарастват слабо само при най-високата приложена концентрация SA (100 µM), а между другите две изследвани концентрации (10 и 50 µM SA) и контролата няма установени разлики в този параметър. Загубите ( $\alpha$ ) слабо намаляват при третиране с 10 µM SA, докато при 100 µM SA те нарастват. Прилагането на концентрация от 50 µM SA не променя този параметър спрямо контролата.

**Таблица 3.** Влияние на различните концентрации SA (10, 50 и 100  $\mu$ M) върху кинетичните параметри на кислородното отделяне на изолирани тилакоидни мембрани от оризови растения. S<sub>0</sub> -  $\Phi$ C2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно, K<sub>D</sub> - скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на "turn over" на кислород-отделящите центрове), S<sub>B</sub> - количеството на блокираните  $\Phi$ C2 центрове,  $\alpha$  - загубите и  $\beta$  - двойните попадения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	10 µM SA	50 µM SA	100 µM SA
<b>S</b> <sub>0</sub> (%)	$25.98 \pm 0.05^{b}$	$20.01 \pm 0.09^{\circ}$	$27.60 \pm 1.04^{b}$	$32.60 \pm 0.09^{a}$
S <sub>B</sub> (a.u.)	$1.35 \pm 0.07$ <sup>b</sup>	$1.61 \pm 0.15^{b}$	$2.23 \pm 0.02^{a}$	$2.48 \pm 0.22^{a}$
$K_{D}(s^{-1})$	$1.95 \pm 0.02^{\circ}$	$2.80 \pm 0.04^{a}$	$2.27 \pm 0.05^{b}$	$1.66 \pm 0.01^{d}$
$\alpha$ (%)	$27.80 \pm 1.02^{b}$	$23.10 \pm 1.02^{\circ}$	$28.20 \pm 1.03^{b}$	$32.70 \pm 0.07^{a}$
β (%)	$4.73 \pm 0.03^{b}$	$4.70 \pm 0.03^{b}$	$4.60 \pm 0.04^{b}$	$5.80 \pm 0.04^{a}$

### 1.7. Нискотемпературна (77К) хлорофилна флуоресценция

Влиянието на SA върху преноса на енергия между хлорофил-белтъчните комплекси е определено с помощта на нискотемпературна хлорофилна флуоресценция. Определено е отношението F744/F685, което е критерий за преразпределението на възбуждащата енергия между двете фотосистеми. Експерименталните резултати показват, че кореновото третиране на оризови растения с различни концентрации SA (10, 50 и 100 µM) не повлиява отношението F744/F685, т.е. преразпределението на възбуждащата енергия между двете фотосистеми не се повлиява дори при най-високата приложена концентрация от 100 µM SA (Табл. 4).

**Таблица 4.** Влияние на различни концентрации SA (10, 50 и 100  $\mu$ M) върху стойностите на отношението F744/F685 при възбуждане с дължина на вълната  $\lambda$ =436 nm на изолирани тилакоидни мембрани от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	10 µM SA	50 µM SA	100 µM SA
F744/F685	$1.07\pm0.10$ $^a$	$1.16\pm0.05~^a$	$1.18\pm0.06~^a$	$1.07\pm0.05~^a$

# 2. Влияние на кадмиевия стрес върху оризови растения в присъствието на салицилова киселина или *Chlorella vulgaris*

В предишната глава (1.1.) беше показано влиянието на различни концентрации SA върху оризови растения. Установено беше, че най-ниската изследвана концентрация (10  $\mu$ M SA) има стимулиращо действие върху функциите на фотосинтетичния апарат, растежните параметри и води до нарастване на хлорофилното съдържание. Тази концентрация беше избрана за изследване нейното влияние в условия на кадмиев стрес (150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> за 14 дни). Стойностите за съответните параметри при третиране само със SA, са дадени за по-ясно разбиране ефекта на кадмиевия (Cd) стрес. Отделните експерименти със SA и *Chlorella vulgaris* при кадмиев стрес са провеждани независимо като стойностите на параметрите за контролните растения и тези при кадмиев стрес са определяни при всеки отделен експеримент за сравнение.

### 2.1. Растежни параметри и пигментно съдържание

Влиянието на SA в условия на кадмиев стрес върху растежните параметри и пигментното съдържание са представени в Табл. 5. Третирането на оризови растения с 150 µM CdCl<sub>2</sub> за период от 14 дни води до значително инхибиране на растежа на корените и стъблата (с 55% и с 72% съответно), както и до намаление на пигментното съдържание в листата. Съдържанието на общия хлорофил и каротиноидите при третираните с Cd растения намаляват с близо 40% в сравнение с контролата, а отношението Chl *a/b* нараства с 8%. Инхибиращото действие на Cd върху растежните параметри и пигментното съдържание е значително по-слабо изразено при растенията, отглеждани съвместно със SA и CdCl<sub>2</sub>, като хлорофилът и

каротиноидите намаляват с 17-18%, корените с 38% и стъблата с 56%, а отношението Chl a/b не се различава от контролата (Табл. 5).

Подобно на салициловата киселина (раздел 5.1.) присъствието на зеленото микроводорасло *C. vulgaris* в хранителния разтвор повлиява пигментното съдържание и растежните параметри (Табл. 6). При растенията отглеждани в присъствието на *C. vulgaris* се наблюдава значително нарастване на дължината на корените (с 56%) в сравнение с контролната група растения, докато стъблата нарастват само с 8%. Експерименталните резултати показват също така, че общото хлорофилно съдържание е слабо повишено (с 7%), докато при каротиноидите и отношението Chl a/b не са установени различия спрямо контролната група растения (Табл. 6).

Експерименталните резултати показват също така, че при оризовите растения, отглеждани в присъствието на CdCl<sub>2</sub> и *C. vulgaris*, инхибирането на растежа на корените и стъблата спрямо контролните растения е по-слабо изразено (с 18% и с 42%, съответно) в сравнение с това при третиране само с CdCl<sub>2</sub> или с SA и CdCl<sub>2</sub>. Кадмий-индуцираните промени в пигментното съдържание също са значително по-слабо изразено при отглежданите на оризовите растения с *C. vulgaris* и CdCl<sub>2</sub>, като общото хлорофилно съдържание намалява с 9%, а каротиноидите с 14%, докато отношението Chl *a/b* не се променя спрямо нетретираните оризови растения (Табл. 6).

**Таблица 5.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху растежните параметри и пигментното съдържание на оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	SA	CdCl <sub>2</sub>	SA & CdCl <sub>2</sub>
Корени (ст)	$9.29\pm0.03~^{\text{b}}$	$11.19 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$4.20\pm0.02~^{d}$	$5.8\pm0.02$ <sup>c</sup>
Стъбла (ст)	$19.20\pm0.03~^{b}$	$27.83\pm0.08~^a$	$5.50\pm0.02~^{d}$	$8.4\pm0.03$ $^{\rm c}$
Chl (mg g <sup>-1</sup> FW)	$3.50\pm0.02~^{b}$	$3.74 \pm 0.03^{a}$	$2.12\pm0.02~^{\text{d}}$	$2.92\pm0.04$ $^{\circ}$
Car (mg g <sup>-1</sup> FW)	$0.78\pm0.02$ $^a$	$0.77\pm0.03$ $^{a}$	$0.46\pm0.02$ $^{\rm c}$	$0.64\pm0.01^{\ b}$
Chl <i>a/b</i>	$4.14\pm0.02~^{c}$	$4.10\pm0.02~^{c}$	$4.47\pm0.04~^a$	$4.20\pm0.02~^{\text{b}}$

**Таблица 6.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на *C. vulgaris* върху растежните параметри и пигментното съдържание на оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) на съответния параметър.

Параметри	Контрола	C.vulgaris	CdCl <sub>2</sub>	C.vulgaris & CdCl <sub>2</sub>
Корени (ст)	$9.27\pm0.04$ $^{b}$	$14.50\pm0.50$ $^{\rm a}$	$4.22\pm0.02~^{\text{d}}$	$7.60\pm0.02\ensuremath{^{\circ}}$ $^{\circ}$
Стъбла (ст)	$19.18\pm0.02^{\text{ b}}$	$20.85 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$5.53\pm0.02~^{d}$	$11.10\pm0.04$ $^{\rm c}$
Chl (mg g <sup>-1</sup> FW)	$3.49\pm0.02~^{\text{b}}$	$3.75{\pm}0.04~^a$	$2.10\pm0.03~^{\text{d}}$	$3.20\pm0.05$ $^{\rm c}$
Car (mg g <sup>-1</sup> FW)	$0.77\pm0.01$ $^{a}$	$0.79\pm0.05$ $^{\rm a}$	$0.44\pm0.02$ $^{\rm c}$	$0.66\pm0.01~^{\text{b}}$
Chl <i>a/b</i>	$4.11 \pm 0.02 \ ^{\text{b}}$	$4.08\pm0.03~^{\text{b}}$	$4.45\pm0.03$ $^{a}$	$4.10\pm0.05~^{\text{b}}$

# **2.2.** Маркери за оксидативен стрес – малондиалдехид, водороден пероксид и пролин

Присъствието на 10 µM SA в хранителния разтвор не повлиява стойностите на маркерите за оксидативния стрес в сравнение с тези при контролните оризови растения.

За разлика от SA, при отглеждане на оризовите растения в присъствие на *C. vulgaris* в хранителния разтвор се наблюдава намаление на съдържанието на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (с около 20%), съдържанието на МДА (с 42%) и на пролина (с 53%) в листата на оризови растения в сравнение с контролата (Фиг. 5).

Кадмиевият стрес (150 µM CdCl<sub>2</sub>) води до нарастване на съдържанието на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листата с около 25%, докато при растенията, отглеждани в присъствието на SA и CdCl<sub>2</sub>,

натрупването на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листата е много по-слабо (с 5%) в сравнение с нетретираните растения (Фиг. 4 А).

Нарастването на  $H_2O_2$  може да доведе до прекисно окисление на липидите. Уврежданията на мембранните липиди в листата на оризовите растения под влияние на кадмиев стрес са оценени чрез определяне на съдържанието на МДА. Експерименталните резултати показват значително увеличение на съдържанието на МДА (с 90%) при оризовите растения, отглеждани в присъствието на CdCl<sub>2</sub>, докато при растенията, подложени на комбинирано третиране с CdCl<sub>2</sub> и SA, нарастването в съдържанието на МДА е по-слабо изразено спрямо контролата (с 20%) т.е. увреждането на мембраните в този случай е по-слабо (Фиг. 4 В).

Кадмиевият стрес предизвиква и силно нарастване (близо три пъти) на аминокиселината пролин в листата на оризовите растения спрямо контролните растения (Фиг.4 С), докато при растенията, третирани едновременно с CdCl<sub>2</sub> и SA, нарастването на съдържанието на пролин е по-слабо изразено (81%), в сравнение с нетретираните оризови растения.



**Фигура 4.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху маркерите на оксидативен стрес – MДA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пролин в листа от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверни разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Наблюдаваното при третирането с  $CdCl_2$  силно нарастване на съдържанието на изследваните маркери за оксидативен стрес е значително по-слабо изразено при оризовите растения, отглеждани съвместно с  $CdCl_2$  и *C. vulgaris*, при които нарастването на МДА е само с 15%, на пролина е два пъти, а съдържанието на  $H_2O_2$  не се променя спрямо контролата (Фиг. 5). Резултатите показват сходен защитен ефект на *C. vulgaris* и SA от Cd-индуцираната токсичност при оризовите растения.



**Фигура 5.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на *C. vulgaris* върху маркерите за оксидативен стрес (MДA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пролин), определени в листа от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) на съответния параметър.

### 2.3. Параметри на РАМ хлорофилна флуоресценция

Анализът на спектрите на РАМ хлорофилната флуоресценция на растения отглеждани в присъствието на 10  $\mu$ M SA показва нарастване на изследваните параметри (Фиг. 6, F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> c 20%,  $\phi_{PSII}$  c 8%, q<sub>P</sub> c 7%, ETR c 8%, R<sub>Fd</sub> c 11%). Нарастване на РАМ параметрите ( F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> c 19%,  $\phi_{PSII}$  c 18%, q<sub>P</sub> c 13%, ETR c 18%, R<sub>Fd</sub> c 16%) спрямо контролната група растения се наблюдава, също така при оризовите растения, отглеждани в присъствието на *C. vulgaris* (Фиг. 7).

Установено е, че в условия на кадмиев стрес (150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> за 14 дни) максималната квантова ефективност на  $\Phi$ C2 фотохимията ( $F_v/F_m$ ) не се променя ( $\Phi$ иг. 6). Установено е намаление на ефективния квантов добив на  $\Phi$ C2 фотохимията ( $\phi_{PSII}$ , с 9%) след Cd третираните на оризови растения, което е свързано с намалението на отношението на фотохимичните към нефотохимичните процеси ( $F_v/F_0$ ) ( $\Phi$ иг. 6 A). Прибавянето на SA към хранителния разтвор на оризовите растения, отглеждани в условия на кадмиевия стрес намалява предизвиканите от въздействието на Cd йони промени в параметъра  $\phi_{PSII}$ , като не се наблюдава статистически достоверни разлики от стойностите на контролната група растения. Отношението  $F_v/F_0$  нараства при растенията, подложени на комбинирано третиране с CdCl<sub>2</sub> и SA (с 16%) спрямо контролните (нетретирани) растения. Третирането само с CdCl<sub>2</sub> води до намаление на параметрите:  $\phi_{PSII}$ , q<sub>P</sub>, ETR и R<sub>Fd</sub> (от 9 до 13%), докато при оризовите растения, отглеждани съ стойностите на контролната група растения, отглеждани съ стойностите на контролните ( $\Phi$ II и SA в хранителния разтвор няма статистически достоверни разлики със стойностите на контролната група растения. 6 в).



**Фигура 6.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху параметрите на PAM хлорофилната флуоресценция в листа от оризови растения. **А.** F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> – максимална квантова ефективност на ФC2 фотохимията, F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>– отношение на фотохимичните към нефотохимичните процеси във ФC2, ф<sub>PSII</sub> – ефективен квантов добив на ФC2 фотохимията; **В.** q<sub>P</sub> – коефициент на фотохимично гасене, ETR – скорост на линеен електронен транспорт, R<sub>Fd</sub> – хлорофил флуоресцентно отношение, корелиращо със скоростта на фотосинтезата. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър. Стойностите за контролата за отделните параметри са: F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>=0.82±0.04; F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>=4.48±0.02; Ф<sub>PSII</sub>=0.60±0.01; q<sub>P</sub>=0.79±0.02; ETR=36.60±0.04; R<sub>Fd</sub>=4.18±0.02.

При комбинираното третиране на оризовите растения с  $CdCl_2$  и *C. vulgaris* не се наблюдава статистически достоверно намаление в изследваните параметри ( $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$ ,  $\phi_{PSII}$ , qP, ETR и  $R_{Fd}$ ) в сравнение с контролните стойности, показващо пълна защита на *C. vulgaris* от Cd-индуцираните ефекти върху  $\Phi C2$  фотохимията. Резултатите ясно показват сходен защитен ефект на зеленото водорасло и на SA върху излседваните РАМ параметри в условия на кадмиев стрес.



**Фигура 7.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl2 в присъствие и отсъствие на *C. vulgaris* върху параметрите на PAM хлорофилната флуоресценция в листа от оризови растения. **А.** Fv/Fm – максимална квантова ефективност на ФC2 фотохимията, Fv/Fo – отношение на фотохимичните към нефотохимичните процеси във ФC2,  $\phi_{PSII}$  – ефективен квантов добив на ФC2 фотохимията; **В.** q<sub>P</sub> – коефициент на фотохимично гасене, ETR – скорост на линеен електронен транспорт, R<sub>Fd</sub> – хлорофил-флуоресцентно отношение. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния парметър. Стойностите за контролата за отделните параметри са: F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>=0.84±0.04; F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>=4.50±0.02;  $\phi_{PSII}$ =0.57±0.03; q<sub>P</sub>=0.78±0.01; ETR=36.51±0.04; R<sub>Fd</sub>=4.20±0.02.

### 2.4. Окислително-редукционни свойства на Р700

За характеризиране на ефекта на *C. vulgaris* и SA в условия на Cd стрес върху фотохимията на  $\Phi$ C1 бяха изследвани окислително-редукционните свойства на P<sub>700</sub>. Светлинноиндуцираните абсорбционни промени при 830 nm (отношението  $\Delta$ A/A) и стойностите за полувремената на тъмнинната редукция на  $P_{700}^+$  ( $t_1$  за бързата компонента и  $t_2$  за бавната компонента) са представени в Табл. 7 и 8. Присъствието на зеленото водорасло в хранителната среда не води до промени в отношението  $\Delta A/A$  и  $t_1$  докато при  $t_2$  се наблюдава слабо намаление (Табл. 8). В раздел 5.1. е показано, че при третирани с 10 µM SA се стимулира фотохимията на  $\Phi$ C1 (отношението  $\Delta A/A$  нараства) с около 10%. Анализът на окислително-редукционните свойства на  $P_{700}$  показва, че Cd стрес води до намаляване на относителното количество на  $P_{700}^+$  (параметъра  $\Delta A/A$  намалява с около 20%), което показва повлияване на фотохимията на  $\Phi$ C1 при третиране с 150 µM CdCl<sub>2</sub>. Добавянето на SA към хранителната среда в условия на кадмиев стрес значително намалява токсичния ефект на Cd върху  $\Phi$ C1 фотохимията (параметърът  $\Delta A/A$  намалява с около третиране с СdCl<sub>2</sub> води и до намаляване на полувремената  $t_1$  (с 45%) и  $t_2$  (с 50%) спрямо контролните, докато при комбинираното третиране със SA и CdCl<sub>2</sub> времето  $t_1$  допълнително намалява, а  $t_2$  не се променя в сравнение с растения третирани само с CdCl<sub>2</sub>.

**Таблица 7.** Влияние на 150 µM CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10 µM SA върху фотоокислението на Р<sub>700</sub> при осветяване с дълговълнова червената светлина, 830 nm (100 %  $\Delta$ A/A = (7.91± 0.40) x 10<sup>-3</sup>) и кинетиките на тъмнинната редукция на Р<sub>700</sub><sup>+</sup> (полувремента,  $t_1$  и  $t_2$ ), измерени на листа. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	SA	CdCl <sub>2</sub>	SA & CdCl <sub>2</sub>
ΔA/A (%)	$100\pm1.07$ $^{\rm b}$	$110.02 \pm 1.03$ <sup>a</sup>	$80.30\pm1.40$ $^{\rm c}$	$92.0\pm1.09$ <sup>b</sup>
$t_{1}$ (s)	$1.58\pm0.13$ $^{\rm a}$	$1.38\pm0.30~^a$	$0.88\pm0.02^{\ b}$	$0.78\pm0.01~^{\rm d}$
<i>t</i> <sub>2</sub> (s)	$9.10\pm0.07~^a$	$6.77\pm0.02$ $^{b}$	$4.57\pm0.12\ ^{c}$	$4.32\pm0.14~^{c}$

При комбинираното третиране с CdCl<sub>2</sub> и *C. vulgaris*, ефектът на Cd стрес също е послабо проявен (стойнстите са близки до тези на растения отгледании в присъствие на *C. Vulgaris*). Отношението  $\Delta A/A$  и  $t_2$  намаляват съответно с 10% и с 12%, т.е. наблюдава се защитен ефект на зеленото микроводорасло в условия на Cd стрес подобно на ефекта от прилагането на SA, но при него  $t_1$  не се променя (Табл. 8).

**Таблица 8.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на *C.vulgaris* върху фотоокислението на P<sub>700</sub> при осветяване с дълговълнова червената светлина, 830 nm (100 %  $\Delta$ A/A = (7.87±0.31) x 10<sup>-3</sup>) и кинетиките на тъмнинната редукция на P<sub>700</sub><sup>+</sup> (полувремена,  $t_1$  и  $t_2$ ), измерени на листа от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	C.vulgaris	CdCl <sub>2</sub>	C.vulgaris & CdCl <sub>2</sub>
ΔA/A (%)	$100 \pm 1.09^{a}$	$101.5 \pm 1.32$ <sup>a</sup>	$80.26 \pm 1.18$ <sup>c</sup>	90.6 ± 1.11 <sup>b</sup>
<i>t</i> <sub>1</sub> (s)	$1.61\pm0.12$ $^a$	$1.50\pm0.11$ $^{a}$	$0.86\pm0.02~^{\text{b}}$	$1.42\pm0.29$ $^a$
<i>t</i> <sub>2</sub> (s)	$9.14\pm0.05~^a$	$8.31\pm0.23~^{b}$	$4.60\pm0.50~^{c}$	$8.06\pm0.37~^{b}$

### 2.5. Фотохимични активности на фотосистема 2 и фотосистема 1

В раздел 5.1.4. вече бе описано подробно влиянието на третирането със SA върху фотохимичната активност на двете фотосистеми. Данните показаха стимулиране на фотохимията на  $\Phi$ C1 и  $\Phi$ C2 при третиране с 10  $\mu$ M SA ( $\Phi$ иг. 8). Експерименталните резултати, получени от измерванията на изолирани тилакоидни мембрани при оризови растения, отглеждани в присъствието на зеленото микроводорасло *C. vulgaris*, показват стимулиране на  $\Phi$ C2 – зависимият електронен транспорт (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ) с около 27%, докато активността на  $\Phi$ C1 не се променя в сравнение с контролните растения ( $\Phi$ иг. 9).

При оризовите растенията, третирани само с 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> за 14 дни, беше установено значително инхибиране на активността на  $\Phi$ C2 (електронния транспорт H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ е инхибиран с 46%) и много по–слабо на  $\Phi$ C1 (електронния транспорт DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV е инхибиран с 7%). Добавянето на SA към хранителния разтвор по време на Cd стрес доведе до намаляване

инхибирането на ФС2 (23%) в сравнение с контролата, а фотохимичната активност на ФС1 слабо нараства спрямо контролата (Фиг. 8).



**Фигура 8.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху фотохимичните активности на  $\Phi$ C2 (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ) и  $\Phi$ C1 (DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV), измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) на съответния параметър. Стойностите за контролата са:  $\Phi$ C2 = 47.20±1.09  $\mu$ moles O<sub>2</sub>. mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> и  $\Phi$ C1 = 177.20±6.77  $\mu$ moles O<sub>2</sub>.mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>.

Подобно на SA присъствието на *C.vulgaris* при третиране с CdCl<sub>2</sub>, намалява ефекта на Cd стрес. Резултатите показват също така, че инхибирането на  $\Phi$ C2 е много по-слабо (15%), и не се наблюдава изменение във фотохимична активност на  $\Phi$ C1 в сравнение с контролната група растения ( $\Phi$ иг. 9).



**Фигура 9.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на *C.vulgaris* върху фотохимичните активности на  $\Phi$ C2 (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ) и  $\Phi$ C1 (DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV), измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от оризови растения.Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) на съответния параметър. Стойностите за контролата са: за  $\Phi$ C2 = 45.90±1.10 µmoles O<sub>2</sub>. mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> и за  $\Phi$ C1 = 174.20±6.87 µmoles O<sub>2</sub>.mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>.

# 2.6. Светкавични кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване

Прилагането на 10 µM SA доведе до стимулиране на кислородното отделяне (за подробности за влиянието и изследваните параметри виж раздел 5.1.6.). Отглеждането на оризовите растения в присъствието на *C. vulgaris* в хранителния разтвор води също до нарастване на кислородното отделяне при въздействие със светкавици и при непрекъснато

осветяване (Фиг. 11). Установено е нарастване с 21% за Y и с 17% за A (Фиг. 11), като това стимулиране е по-слабо изразено от ефекта на прилагането на 10 µM SA към хранителния разтвор (Фиг. 10).

Третирането с 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> силно инхибира кислородното отделяне, като стойностите на изследваните параметри (Y и A, подробности за тези параметри са дадени в глава 5.1.6.) силно намаляват спрямо контролата като ефекта е по-силно изразен при светкавичните кислородни добиви (Y с 52% и A с 39%) (Фиг. 10) При комбинираното третиране със SA и CdCl<sub>2</sub>, инхибирането на кислородното отделяне е по-слабо, като Y намалява с 31%, а параметърът A с 20%, в сравнение с нетретираната контролна група растения. Инхибиращото влияние на Cd върху кислородното отделяне е също много по-слабо изразено при оризовите растения, отглеждани в присъствието на C. vulgaris и CdCl<sub>2</sub>, като Y намалява с 21% и A с 8% спрямо контролата, но стойностите остават по-ниски от тези на контролните растения (Фиг. 11) Сравнявайки степента на инхибиране на кислородното отделяне (при въздействие със светкавици и при непрекъснато осветяване) в условия на Cd стрес става ясно, че този процес е по-слабо повлиян при растения отглеждани в присъствието на C. vulgaris в сравнение с тези отглеждани в присъствие на SA (Фиг. 10 и 11).



**Фигура 10.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху светкавичните кислородни добиви (*Y*) и амплитудата на кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (*A*), измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) на съответния параметър.



**Фигура 11.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на *C. vulgaris* върху светкавичните кислородни добиви (*Y*) и амплитудата на кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (*A*), измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) на съответния параметър.

### 2.7. Кинетични параметри на кислородното отделяне

Влиянието на 10  $\mu$ M SA при физиологични условия върху кинетичните параметри на кислородното отделяне : стойностите на ФС2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно, загубите ( $\alpha$ ) и двойните попадения ( $\beta$ ), количеството на блокираните ФС2 центрове (S<sub>B</sub>) и скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на "turn over" на кислород отделящите центрове, K<sub>D</sub>) (са подробно описани в глава 1.7. При отглеждане на оризовите растения в присъствието само на *C. vulgaris*, подобно на SA, е установено нарастване на скоростната константа K<sub>D</sub> и на двойните попадения ( $\beta$ ), докато параметрите S<sub>B</sub> и  $\alpha$  не се променят спрямо контролните растения, за разлика от въздействие само със SA, където промени са установени също и при първоначалното разпределение S<sub>0</sub> – S<sub>1</sub>, докато присъствието на *C. vulgaris* в хранителния разтвор не повлиява това разпределение (Табл. 9 и 10).

При оризовите растения, подложени на влиянието на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> е установено увеличаване на количеството блокирани ФС2 центрове (S<sub>B</sub>) с 43%, на ФС2 центровете в състояние S<sub>0</sub> на тъмно (над 2.5 пъти), на загубите ( $\alpha$ ) с 11% и на двойните попадения ( $\beta$ ) (над 2 пъти) и намаление на скоростната константа K<sub>D</sub> с 17% в сравнение със стойностите при нетретираните растения. Наблюдаваните промени, вероятно са резултат от изменения в Мл-клъстер и/или увреждане на КОС в донорната страна на ФС2.

Установените вследствие на Cd стрес изменения в кинетичните параметри на кислородното отделяне са по-слабо изразени при тилакоидни мембрани, изолирани от оризови растения, отглеждани едновременно в присъствието на CdCl<sub>2</sub> и SA в хранителния разтвор като по-слабо нарастване има само при центровете в първоначално S<sub>0</sub> състояние и двойните попадения ( $\beta$ ), докато останалите параметри ( $\alpha$ , S<sub>B</sub> и K<sub>D</sub>) са близки с тези на контролните растения (т.е. не се наблюдават статистически достоверни разлики) (Табл. 9).

Добавянето на *C. vulgaris* в хранителния разтвор на растенията едновременно с третирането с 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> също намалява отрицателното влияние на Cd йони върху KOC. Установено е, че стойностите на загубите ( $\alpha$ ), скоростната константа K<sub>D</sub> и количеството блокирани  $\Phi$ C2 центрове (S<sub>B</sub>) са подобни на тези при нетретираните растения. Експерименталните резултати също показват, че при растенията отглеждани в присъствието на *C. vulgaris* и CdCl<sub>2</sub>, слабо са повлияни само  $\Phi$ C2 центровете в състояние S<sub>0</sub> на тъмно и двойните попадения ( $\beta$ ) в сравнение с контролните растения като защитният ефект на *C. vulgaris* при тези параметри е по-слабо изразен от този на SA (Табл. 9 и 10).

**Таблица 9.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху кинетичните параметри на кислородното отделяне, измерено на тилакоидни мембрани от оризови растения. S<sub>0</sub> - ФС2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно, K<sub>D</sub> - скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния, S<sub>B</sub> - количеството на блокираните ФС2 центрове,  $\alpha$  - загубите и  $\beta$  - двойните попадения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметър	Контрола	SA	CdCl <sub>2</sub>	SA & CdCl <sub>2</sub>
<b>S</b> <sub>0</sub> (%)	$26.10 \pm 0.05$ °	$20.21 \pm 0.12^{d}$	$68.10 \pm 2.40^{a}$	$32.60 \pm 1.9^{b}$
S <sub>B</sub> (a.u.)	$1.42 \pm 0.07$ <sup>b</sup>	$1.59 \pm 0.15^{b}$	$1.93 \pm 0.03^{\ a}$	$1.78 \pm 0.04^{b}$
$K_{D}(s^{-1})$	$1.94 \pm 0.02^{b}$	$2.76 \pm 0.04^{\ a}$	$1.61 \pm 0.11^{\circ}$	$2.29 \pm 0.17^{b}$
$\alpha$ (%)	$26.80 \pm 1.01^{b}$	$22.90\pm1.01 ^{\circ}$	$37.91 \pm 1.70^{a}$	$28.70 \pm 1.90^{b}$
$\beta$ %	$4.71 \pm 0.03^{\circ}$	$4.68 \pm 0.03^{\circ}$	$10.21 \pm 1.01^{a}$	$6.30 \pm 0.06^{b}$

**Таблица 10.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на *C. vulgaris* върху кинетичните параметри на кислородното отделяне, измерено на тилакоидни мембрани от оризови растения. S<sub>0</sub> -  $\Phi$ C2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно, K<sub>D</sub> - скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на "turn over" на кислород-отделящите центрове), S<sub>B</sub> - количеството на блокираните  $\Phi$ C2 центрове,  $\alpha$  - загубите и  $\beta$  - двойните попадения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметър	Контрола	C. vulgaris	CdCl <sub>2</sub>	C. vulgaris & CdCl <sub>2</sub>
<b>S</b> <sub>0</sub> (%)	$26.18 \pm 0.05$ °	$25.20 \pm 0.08$ °	$67.01 \pm 2.20^{a}$	46.7 ± 2.51 <sup>b</sup>
S <sub>B</sub> (a.u.)	$1.39 \pm 0.07^{b}$	$1.43 \pm 0.15^{b}$	$1.90 \pm 0.03^{a}$	$1.51 \pm 0.14^{b}$
$K_{D}(s^{-1})$	$1.97 \pm 0.02^{b}$	$2.21 \pm 0.03^{a}$	$1.59 \pm 0.11^{\circ}$	$2.04 \pm 0.07^{ab}$
$\alpha$ (%)	$27.02 \pm 1.01$ <sup>b</sup>	$27.10 \pm 0.09^{b}$	$38.03 \pm 1.80^{a}$	$28.2 \pm 1.20^{b}$
$\beta$ %	4.75 ± 0.03 °	5.53 ± 0.06 <sup>b</sup>	$9.91 \pm 0.71^{a}$	9.56 ± 0.36 <sup>a</sup>

### 2.8. Нискотемпературна (77К) хлорофилна флуоресцеция

Анализът на спектрите на 77К хлорофилната флуоресценция показва, че присъствието както на 10  $\mu$ M SA, така и на *C. vulgaris* в хранителния разтвор на оризовите растения не води до промяна в отношението F744/F685 (Табл. 11 и 12), т.е. не е повлияно преразпределението на възбуждащата енергия между двете фотосистеми. Данните показват също, че третирането с CdCl<sub>2</sub> води до нарастване на това отношение, което е свързано с увеличаване на преноса от  $\Phi$ C2 към  $\Phi$ C1, докато добавянето както на SA така и на *C. vulgaris* в условия на Cd стрес предотвратява това нарастване.

**Таблица 11.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие и отсъствие на 10  $\mu$ M SA върху стойностите на отношението F744/F685 при възбуждане с дължина на вълната  $\lambda$ =436 nm на изолирани тилакоидни мембрани от оризовите растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	SA	CdCl <sub>2</sub>	SA & CdCl <sub>2</sub>
F744/F685	$1.10\pm0.07$ $^{b}$	$1.18\pm0.05$ $^{\rm b}$	$1.44\pm0.04$ $^a$	$1.20\pm0.06~^{\text{b}}$

**Таблица 12.** Влияние на 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присътвие и отсъствие на *C. vulgaris* върху стойностите за отношението F744/F685 при възбуждане с дължина на вълната  $\lambda$ =436 nm на изолирани тилакоидни мембрани при оризови растения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	Контрола	C. vulgaris	CdCl <sub>2</sub>	C. vulgaris & CdCl <sub>2</sub>
F744/F685	$1.06\pm0.05$ $^{\rm b}$	$1.14\pm0.03$ $^{\rm b}$	$1.40\pm0.06$ $^{a}$	$1.17\pm0.06$ $^{\rm b}$

### 2.9. Натрупване на кадмий в оризови растения

За да се установи дали по-слабите инхибиращи ефекти на третирането с CdCl<sub>2</sub>, когато в хранителната среда присъстват SA или *C. vulgaris*, се дължат на различното натрупване на Cd в корените и стъблата на оризовите растения е измерено съдържанието на Cd в двата органа след 14-дневно третиране с 150 µM CdCl<sub>2</sub> (Табл. 13). Данните показват, че при третиране със зеленото водорасло натрупването на Cd е по-малко както в корените, така и в стъблата, докато при третиране със 10 µM SA намалява съдържанието само в стъблата, т.е. SA намалява транспорта на Cd от корените към стъблата.

Оценката на способността на оризовите растения да транспортират Cd от корените към стъблата е направена чрез изчисляване на фактора на транслокация (TF), който представлява отношението на съдържанието на Cd в стъблата на растенията към съдържанието на Cd в корените (Mesnoua et al., 2016). Установно е, че TF е по-малък от 1 при всички третирания, като транспорта на Cd от корените към стъблата е по-силно ограничен след третиране със SA (TF=0.105) и по-слабо след третиране сC. vulgaris (TF=0.146) в сравнение с този при третиране само с 150 µM CdCl<sub>2</sub> (TF=0.240) (Табл. 13). Това показва, че добавянето на 10 µM SA или C. vulgaris към хранителния разтвор ограничава транспортирането на Cd в надземните части на растенията по-силно изразено при SA. От друга страна, абсорбцията на Cd йони от корените е намалена с около 64% от прилагането на C. vulgaris, което се дължи на абсорбирането на Cd от самите клетки на зеленото микроводорасло, което натрупва Cd около 3852 µg.g<sup>-1</sup>DW, за периода на третиране с 150 µM CdCl<sub>2</sub>.

**Таблица 13.** Натрупване на кадмий в стъблата и корените на оризовите растения, след третиране с 150  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> в присъствие или отсъствие на 10  $\mu$ M SA или *C. vulgaris*, изчислено на грам сухо тегло (DW). TF - фактор на транслокация, храктеризиращ отношението на съдържанието на кадмий в стъблата към това в корените. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	CdCl <sub>2</sub>	SA & CdCl <sub>2</sub>	C. vulgaris & CdCl <sub>2</sub>
Cd корени (µg.g <sup>-1</sup> DW)	$3290\pm69~^{\rm a}$	$3201\pm63~^a$	$1170\pm79$ $^{b}$
Cd стъбла (µg.g <sup>-1</sup> DW)	$789\pm88~^a$	$336\pm67^{\ b}$	171±37 °
TF	$0.240\pm0.021$ $^{a}$	$0.105\pm0.018$ $^{\circ}$	$0.146\pm0.020$ $^{\mathrm{b}}$

# 3. Роля на DELLA белтъците за толерантността на пшенични растения към кадмиев стрес

Изследвана е чувствителността към Cd стрес на два генотипа пшеница, различаващи се по *Rht-B1* алелите: див тип *Rht-B1a* и мутантната линия *Rht-B1c*. Мутантната линия на пшеницата синтезира модифицирани DELLA белтъци, при които е повлияно свързването им с рецептора GID1 на гиберелиновата киселина (GA), което води до увеличено количество на тези белтъци в мутанта в сравнение с дивия тип. Освен това, натрупаните DELLA белтъци подтискат растежа на растенията на ниво клетка, орган и цяло растение, което води до наблюдаване на растения джуджета (Wen et al., 2013).

### 3.1. Растежни параметри и пигментен състав

Сравнението на параметрите на растежа между двете контролни групи растения показва, че при мутанта стъблата са с 46% по-къси от тези на дивия тип, докато при корените

не се наблюдават статистически достоверни разлики между двата генотипа (Табл. 14). Експерименталните резултати показват сходно намаление в дължината на корените при двата генотипа пшеница (с около 70%), отглеждани в условия на Cd стрес. Инхибиращото действие на Cd върху дължината на стъблата е по-слабо изразено при мутанта (с 42%) отколкото при дивия тип (с 57%) спрямо нетретиранните контроли за съответния генотип.

Хлорофилното съдържание при нетретираните мутантни растения е малко по-високо от това при нетретираните растения от див тип като съдържанието на Chl a и Car е по-високо при мутанта с 6% и 8%, съответно, докато при съдържанието на Chl b не се наблюдава разлика между двата нетретирани генотипа пшеница. След третиране на растенията с CdCl<sub>2</sub>, пигментното съдържание (Car, Chl a и Chl b) намалява в по-голяма степен при дивия тип (16-21%), отколкото при мутанта (7-13%), сравнено със съответните контролни растения (Табл. 14). В допълнение, данните разкриват, че при мутанта Cd по-силно повлиява съдържанието на хлорофила (13%), отколкото това на каротиноидите (7%), поради което отношението Car/Chl е по-голямо при мутанта третиран с CdCl<sub>2</sub>, отколкото при третирания див тип (Табл. 14).

**Таблица 14.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху растежните параметри и пигментното съдържание на два генотипа пшеница: *Rht-Bla* (див тип, WT) и *Rht-Blc* (мутант, Mut). Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	WT	Mut	WT & CdCl <sub>2</sub>	Mut & CdCl <sub>2</sub>
Корени (ст)	$14.60\pm0.30^{\text{ b}}$	$15.80 \pm 1.60^{\ a}$	$4.50\pm0.40^{\text{ b}}$	$4.70\pm0.30^{\text{ b}}$
Стъбла (ст)	$23.70\pm1.10\ ^{a}$	$12.90\pm0.90^{\text{ b}}$	$10.30\pm0.40$ $^{\rm c}$	$7.50\pm0.30~^{d}$
Chl (mg g <sup>-1</sup> FW)	$2.19\pm0.06^{\text{ b}}$	$2.32\pm0.05$ $^{a}$	$1.76\pm0.07~^{\text{d}}$	$2.02\pm0.05$ $^{\rm c}$
Chl $a (mg g^{-1}FW)$	$1.72\pm0.05$ $^{\rm b}$	$1.83\pm0.04~^a$	$1.37\pm0.05~^{\text{d}}$	$1.60\pm0.03$ $^{\rm c}$
Chl $b$ (mg g <sup>-1</sup> FW)	$0.47{\pm}0.02$ $^{\rm a}$	$0.48 \pm 0.01$ <sup>a</sup>	$0.39\pm0.02^{\text{ b}}$	$0.42\pm0.02^{\text{ b}}$
Car (mg g <sup>-1</sup> FW)	$0.49\pm0.01^{\ b}$	$0.53\pm0.02$ $^{a}$	$0.41{\pm}0.02$ $^{\rm c}$	$0.49\pm0.01^{\ b}$
Car/Chl	0.222 <sup>b</sup>	0.227 <sup>b</sup>	0.231 <sup>b</sup>	0.242 <sup>a</sup>

### 3.2. Параметри на РАМ хлорофилна флуоресценция

Експерименталните резултати показват, че няма достоверни разлики между нетретираните контролни растения на дивия тип и мутанта в изследваните параметри:  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$ ,  $\phi_{PSII}$ ,  $q_P$ , ETR,  $R_{Fd}$  (Фиг. 12). Третирането с 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> води до по-силно намаление на тези параметри при дивия тип (от 20 до 28%), отколкото при мутанта (от 11 до 22%) с изключение на отношението  $F_v/F_m$ , при което намалението е сходно и при двата третирани генотипа спрямо нетретираните контроли.



**Фигура 12.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху параметрите на PAM хлорофилната флуоресценция при два генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип, WT) и *Rht-B1c* (мутант, Mut). **A.**  $F_v/F_m$  – максимална квантова ефективност на ФC2 фотохимията,  $F_v/F_0$  – отношение на фотохимичните към нефотохимичните процеси във ФC2 ,  $\phi_{PSII}$  – ефективен квантов добив на ФC2 фотохимията; **B.**  $q_P$  – коефициент на фотохимично гасене, ETR – скорост на линеен електронен транспорт,  $R_{Fd}$  – хлорофил флуоресцентно отношение. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър. Стойностите за WT за отделните параметри са:  $F_v/F_m = 0.81\pm0.01$ ;  $F_v/F_0 = 5.08\pm0.14$ ;  $\phi_{PSII} = 0.58\pm0.02$ ;  $q_P = 0.85\pm0.01$ ; ETR = 43.3±1.03;  $R_{Fd} = 4.77\pm0.13$ . Стойностите за Mut за отделните параметри са:  $F_v/F_m = 0.82\pm0.01$ ; ETR = 44.9±1.14;  $R_{Fd} = 4.50\pm0.13$ .

### 3.3. Окислително-редукционни свойства на Р700

Влияние на Cd върху фотоокислението на  $P_{700}$  (отношението  $\Delta A/A$ ) и стойностите за полувремената  $t_1$  и  $t_2$  при двата изследвани генотипа пшеница са представени в Табл. 15. Не са установени статистически достоверни разлики в отношението  $\Delta A/A$  между нетретираните растения от дивия тип и мутанта. При третираните с CdCl<sub>2</sub> при мутантни растения се наблюдава по-слабо намаление на отношението  $\Delta A/A$ , отколкото при растения от дивия тип спрямо съответните нетретирани генотипове. Сравнението между контролните растения от дивия тип с около 12%, докато при  $t_2$  (за бързата компонента) при мутанта в сравнение с дивия тип с около 12%, докато при  $t_2$  (за бавната компонента) не се наблюдават разлики между нетретираните растения от двата генотипа. От друга страна, третирането с CdCl<sub>2</sub> води до намаление на  $t_1$  в еднаква степен и при двата изследвани генотипа (с около 22-24%) отколкото при дивия тип (с 23%).

**Таблица 15.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху фотоокислението на P<sub>700</sub> при осветяване с дълговълнова червена светлина ( $\Delta$ A/A (WT) = (8.51±0.24) x 10<sup>-3</sup> и  $\Delta$ A/A (Mut) = (9.41±0.29) x10<sup>-3</sup>) и кинетиките на тъмнинната редукция на P<sub>700</sub><sup>+</sup> (полувремена,  $t_1$  и  $t_2$ ), измерени на листа от два генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип, WT) и *Rht-B1c* (мутант, Mut). Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	WT	Mut	WT & CdCl <sub>2</sub>	Mut & CdCl <sub>2</sub>
ΔA/A (%)	$100.00\pm5.0$ $^{\rm a}$	$109.00 \pm 4.00$ <sup>a</sup>	$59.00\pm1.40$ $^{\rm c}$	$73.80\pm2.07~^{\text{b}}$
<i>t</i> <sub>1</sub> (s)	$0.72\pm0.04$ $^{\rm a}$	$0.63\pm0.03~^{\rm b}$	$0.56\pm0.03~^{\mathrm{b}}$	$0.48\pm0.02$ $^{\rm c}$
<i>t</i> <sub>2</sub> (s)	$5.10\pm0.45$ $^{\rm a}$	$4.42\pm0.21~^a$	$3.92\pm0.10^{\text{ b}}$	$3.11 \pm 0.20$ <sup>c</sup>

### 3.4. Фотохимични активности на фотосистема 2 и фотосистема 1

Данните показват, че при тилакоидни мембрани, изолирани от нетретирани растения на мутанта и дивия тип, не се наблюдават статистически достоверни разлики в активностите на ФС2 и ФС1 (Фиг. 23). Инхибирането на фотохимичните активности на ФС2 (H<sub>2</sub>O→BQ) и ФС1 (DCPIPH<sub>2</sub>→MV) в условия на Cd стрес е значително по-слабо изразено при тилакоидните мембрани от мутантните растения (8% и 7% съответно), отколкото при тези от дивия тип с

(28% и 22% съответно) спрямо съответните контроли (Фиг. 13). Резултатите показват, че Cd стрес по-силно инхибира ФС2 в сравнение с ФС1.



**Фигура 13.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху фотохимичните активности на  $\Phi$ C2 (H<sub>2</sub>O $\rightarrow$ BQ и  $\Phi$ C1(DCPIPH<sub>2</sub> $\rightarrow$ MV), измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от два генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип, WT) и *Rht-B1c* (мутант, Mut). Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър. Стойностите за контролата за съответния генотип са: WT, за  $\Phi$ C2 = 93.6±5.4 µmoles O<sub>2</sub>. mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> и за  $\Phi$ C1 = 426±12 µmoles O<sub>2</sub>.mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>; Mut, за  $\Phi$ C2 =100.8±4.5 µmoles O<sub>2</sub>. mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> и за  $\Phi$ C1 = 443±10 µmoles O<sub>2</sub>.mg Chl<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>.

3.5. Светкавични кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване

За по-детайлно изследване на промените в КОС, под влиянието на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> при двата изследвани генотипа пшеница, са изследвани светкавичните кислородни добиви и кислородното отделяне при непрекъснато осветяване. Определени са: амплитудата на кислородно отделяне след третата светкавица (Y) и амплитудата на кислородното избухване при непрекъснато осветяване (A). Резултатите показват по-големи стойности на параметрите Y (с 10%) и A (с 13%) при нетретираните растения на мутанта спрямо тези на дивия тип (Фиг. 14). При дивия тип пшеница, Cd стрес оказва силно инхибиращо действие върху светкавичните кислородни добиви (43%) и кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (36%), докато при мутанта намалението на тези параметри е много по-слабо изразено (Y с 21% и A с 13%).



**Фигура 14.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху светкавичните кислородни добиви (*Y*) и амплитудата на кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (*A*), измерени на тилакоидни мембрани от два генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип, WT) и *Rht-B1c* (мутант, Mut). Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

### 3.6. Кинетични параметри на кислородното отделяне

Стойностите за началното S<sub>0</sub> състояние на тъмно на  $\Phi$ C2 центровете, загубите ( $\alpha$ ) и двойните попадения ( $\beta$ ), както и количеството на блокираните  $\Phi$ C2 центрове (S<sub>B</sub>) и скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на "turnover" на кислород отделящите центрове, K<sub>D</sub>) при физиологични условия и в условия на стрес са представени в Табл. 16. Резултатите показват, че количеството на ФС2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно при нетретираните растения на мутанта са повече в сравнение с това на дивия тип. При другите изследвани параметри на кислородното отделяне (S<sub>B</sub>, K<sub>D</sub>,  $\alpha$  и  $\beta$ ) не са установени статистически достоверни разлики между контролните растения на дивия тип и на мутанта. След третиране с CdCl<sub>2</sub>, при растенията от дивия тип,  $\Phi$ C2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно нарастват с 81%, докато при мутанта нарастването е значително по-слабо в сравнение със съответните нетретирани растения. Експерименталните резултати показват също така, че при растенията от дивия тип се наблюдава силно увеличаване на загубите (с 38 %), двойните попадения (с 41%) и на блокираните центрове (с 34%) и намаление на скоростната константа К<sub>D</sub> (с 26%), докато при мутанта параметрите S<sub>B</sub> и α нарастват по-слабо (с 15% и 21 % съответно), а за параметрите K<sub>D</sub> и  $\beta$  не се установяват статистически достоверни разлики в сравнение с нетретираните растения на съответния генотип (Табл. 16).

**Таблица 16.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху кинетичните параметри на кислородното отделяне, измерени на тилакоидни мембрани, изолирани от два генотипа пшеница: *Rht-Bla* (див тип, WT) и *Rht-Blc* (мутант, Mut). S<sub>0</sub> - ФС2 центровете в състоянието S<sub>0</sub> на тъмно, K<sub>D</sub> - скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния, S<sub>B</sub> - количеството на блокираните ФС2 центрове,  $\alpha$  - загубите и  $\beta$  - двойните попадения. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	WT	Mut	WT & CdCl <sub>2</sub>	Mut & CdCl <sub>2</sub>
S <sub>0</sub> (%)	$20.20 \pm 0.90^{d}$	$23.90 \pm 0.60^{\circ}$	$36.60 \pm 2.80^{a}$	$30.10 \pm 0.80^{b}$
S <sub>B</sub> (a.u.)	$1.68 \pm 0.12^{\circ}$	$1.73 \pm 0.10^{\circ}$	$2.25 \pm 0.11^{a}$	$1.99 \pm 0.09^{b}$
$K_{D}(s^{-1})$	$2.01 \pm 0.17^{\ a}$	$1.91 \pm 0.13^{a}$	$1.49 \pm 0.13^{b}$	$1.74 \pm 0.22^{a}$
$\alpha$ (%)	$27.00 \pm 1.80^{\circ}$	$26.40 \pm 1.20^{\circ}$	$37.20 \pm 1.50^{a}$	$32.00 \pm 1.40^{b}$
$\beta$ (%)	$4.10 \pm 0.30^{b}$	$3.70 \pm 0.30^{b}$	$5.80 \pm 0.60^{a}$	$4.30 \pm 0.20^{b}$

### 3.7. Нискотемпературна (77К) хлорофилна флуоресценция

Влиянието на третирането с CdCl<sub>2</sub> върху преноса на енергия между пигмент-белтъчните комплекси на фотосинтетичния апарат е оценено по ниско-температурното флуоресцентно емисионно отношение F735/F685 (Табл. 17). Предизвиканите вследствие на въздействието на Cd промени във фотосинтетичния апарат водят до нарастване на отношението F735/F685, което говори за нарастване на преноса на енергия от  $\Phi$ C2 към  $\Phi$ C1 (Табл. 17). Подобно нарастване на това отношение беше наблюдавано и при оризови растения в условия на Cd стрес. Нарастването на това отношение е по-голямо в тилакоидните мембрани на дивия тип, отколкото при тези на мутанта, в сравнение със съответната контролна група растения.

**Таблица 17.** Влияние на 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> върху стойностите за отношението F735/F685 при възбуждане с дължина на вълната  $\lambda$ =436 nm на изолирани тилакоидни мембрани при два генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип, WT) и *Rht-B1c* (мутант, Mut). Различните букви обозначават статистически достоверни разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	WT	Mut	WT & CdCl <sub>2</sub>	Mut & CdCl <sub>2</sub>
F735/F685	$1.62\pm0.05$ $^{\rm c}$	$1.83\pm0.04~^{\rm b}$	$1.94\pm0.07$ $^{\rm a}$	$1.99\pm0.06~^a$

### 3.8. Натрупване на кадмий

За да се установи дали по-слабият инхибиращ ефект на Cd при мутанта (*Rht-B1c*) в сравнение с дивия тип (*Rht-B1a*) се дължи на различното натрупване на Cd е измерено неговото

съдържание в двата генотипа пшеница. Данните показват, че третирането с CdCl<sub>2</sub> чрез добавяне в хранителния разтвор води до натрупване на Cd в корените и стъблата на растенията и при двата изследвани генотипа пшеница (Табл. 18). Получените резултати показват, че при мутанта съдържанието на Cd е по-високо в стъблата с 58% и в корените с 12% спрямо това при дивия тип.

**Таблица 18.** Натрупване на Cd в стъблата и корените при двата генотипа пшеница: *Rht-B1a* (див тип, WT) и *Rht-B1c* (мутант, Mut), изчислено на грам сухо тегло (DW). Факторът на транслокация (TF) характеризира отношението на съдържанието на Cd в стъблата към това в корените. Различните букви обозначават статистически достоверните разлики (p < 0.05) за съответния параметър.

Параметри	WT & CdCl <sub>2</sub>	Mut & CdCl <sub>2</sub>
Cd корени (µg.g <sup>-1</sup> DW)	$106.1 \pm 5.1$ <sup>b</sup>	$118.8 \pm 6.1$ <sup>a</sup>
Cd стъбла (µg.g <sup>-1</sup> DW)	$39.9 \pm 1.8 \ ^{b}$	$63.0\pm3.2$ $^{a}$
TF	0.376 <sup>b</sup>	0.530 <sup>a</sup>

Оценката на способността на двата генотипа пшенични растения да транспортират Cd от корените към стъблата отново е направена чрез изчисляване на фактора на транслокация (TF). Установено е, че TF е по-малък от 1 и при двата генотипа пшеница, но при мутанта е значително по-висок от дивия тип (Табл. 18). Това предполага, че *Rht-B1c* мутацията не ограничава абсорбцията на Cd и транспортирането му в надземните части на растенията. Въпреки че мутантните растения натрупват повече Cd в тъканите от дивия тип, техните растежни параметри и фотосинтетичната активност са по-слабо повлияни.

### Обсъждане

# 1. Влияние на салициловата киселина и *Chlorella vulgaris* върху оризови растения при физиологични условия

Салициловата киселина като хормоноподобен ендогенен регулатор участва в регулирането на различни физиологични процеси в растенията (Pancheva et al., 1996; Shakirova et al., 2003; Tang et al., 2017), включително се предполага и нейната роля в регулацията на процеса фотосинтеза (Tang et al., 2017). Установено е също, че ефектите на SA върху растенията са видово специфични и зависят от приложените концентрации и начина на третиране (Pancheva et al., 1996; Arfan et al., 2007). Показано е, че при по-високи концентрации SA може да причини тъканно увреждане и клетъчна смърт чрез индуциране на оксидативен стрес (Horváth et al., 2007), тъй като високите концентрации SA предизвикват формиране на ROS във фотосинтетичните мембрани, което води до тяхното увреждане (Borsani et al., 2001), което е свързано с намаляване на съдържанието на хлорофил (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011) и инхибиране на скоростта на фотосинтезата (Yordanova & Popova, 2007). В предишни изследвания е показано, че прилагането на по-ниска концентрация на SA (10 µM) върху синапени растения, подобрява CO<sub>2</sub> асимилацията, повишава съдържанието на хлорофил и активността на карбоанхидразата, на нитратната редуктаза и на Rubisco (Fariduddin et al., 2003). Предполага се, че благоприятното въздействие на тази ниска доза на SA върху фотосинтеза може да бъде свързано с предотвратяване на окислението на ауксините от SA, тъй като повишените нива на ауксините увеличават скоростта на фотосинтеза и активността на нитратредуктазата (Ahmad et al., 2001). Установено е също така, че SA повлиява разделянето и стабилизацията на зарядите във ФС2 при изолирани тилакоидни мембрани и в цели листа.

Следователно, приложената концентрация на SA е от ключово значение за регулирането на отговора на растенията към промените в условията на околната среда. По-голямата част от изследванията на влиянието на екзогенно приложената SA са проведени чрез третиране на семената или чрез пръскане на растенията (Khan et al., 2003; Metwally et al., 2003; Shakirova et al., 2003; Khodary, 2004; Horváth et al., 2007; Hayat et al., 2010). Данните за екзогенното прилагане на SA чрез кореново третиране са недостатъчни в литературата, така че нашите изследвания показват за пръв път ефектите на различните концентрации на SA върху растежа на растенията, съдържанието на пигменти и функционалната активност на фотосинтетичния

апарат на оризовите растения при физиологични условия. Представените в дисертационния труд резултати са в съгласие с твърденията, че SA повлиява растежните параметри на растенията като ефектът зависи от приложените концентрации (Табл. 1). Данните разкриват, че по-ниската концентрация SA (10 µM) има стимулиращ ефект върху растежа на оризовите растения, причинявайки значително увеличаване на дължината на корените и на стъблата на растенията, докато концентрации над 50 µM имат инхибиращ ефект върху растежа на растенията (Табл. 1). Промените в растежа са свързани и с вариране на количеството на листните пигменти в зависимост от приложената концентрация. Пигментният анализ показа, че третирането с 10 µM SA води до слабо нарастване на количеството на хлорофила, докато при високи концентрации то намалява (Табл. 1), което може да се дължи на разграждането на хлорофилите и/или инхибирането на биосинтезата им (Kumar et al., 2010). Нашите резултати за оризови растения показват, че 10 µM SA оказва оптимално въздействие върху растежните параметри и пигментния състав, докато при краставици е установено, че тази концентрация е 50 µМ (Kumar et al., 2010), което потвърждава твърдението, че оптималната концентрация е видово специфична и също така зависи от начина на прилагане върху растенията. Това се потвърждава и от изследванията на фотосинтетичните параметри при различните видове растения, показващи нарастване на отворените реакционни центрове на ФС2 (т.е. нарастване на фотохимичното гасене,  $q_P$ ) след предварителна обработка на семена от царевица с 50  $\mu$ M SA (Moravcová et al., 2018) или до нарастване на скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт в хлоропласти от пшеница след третиране на листата с 50 µM SA (Sahu et al., 2002).

Представените в дисертационния труд резултати показват, че високите концентрации на SA (100 µM) инхибират фотохимичните активности на ФС2 с около 25% (Фиг. 12). Вероятно инхибирането на ФС2 е резултат от промени в белтъците на ФС2 и по-специално на белтъците на КОС, като в предишни изследвания е установено намаление на 33 kDa полипептид, за който се предполага, че функционира като Mn-свързващ белтък (Maslenkova et al., 2009). Предишни изследвания на ечемик, отглеждан в присъствието на 100 µM SA (Pancheva et al., 1996) показваха повишено съдържание на пролин, което предполага че високите концентрации на SA може да провокират промени, свързани с реакциите на растенията към оксидативен стрес.

Измерванията на редокс-състоянието на  $P_{700}$  и последващите редукционни кинетики показват, че по-високите концентрации на SA (50 и 100 µM) значително стимулират цикличния електронен транспорт около ФС1 в сравнение с контролните растения (Табл. 2), който е от съществено значение за поддържане на ефективността на фотосинтезата в условия на стрес (Munekage et al., 2004).

Въз основа на проведените изследвания с различни концентрации на SA чрез кореново третиране установихме, че концентрацията на екзогенната SA е много важна за регулирането на растежа и фотосинтезата на растенията при физиологични условия. В допълнение нашите данни показват, че 10 µM е оптималната концентрация за растежа и функционалната активност на фотосинтетичния апарат на младите оризови растения при екзогенното прилагане на SA чрез хранителния разтвор за 14 дни. Установено е, че тази концентрация на SA води до: стимулиране растежа на растенията; увеличаване на съдържанието на общия хлорофил в листата; стимулиране на фотохимичните активности на двете фотосистеми и увеличение на цикличния електронен транспорт около ФС1. Всички тези промени не са придружени от промени в преноса на възбуждаща енергия между хлорофил-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани. Може да се предположи, че не настъпват структурни промени в TM, които да повлияват преноса на енергия във фотосинтетичния апарат.

Интерес представляват представените в дисертацинния труд резултати за ефекта на зеленото микроводорасло *C. vulgaris* върху растежа и фотосинтезата на оризови растения. Установено е стимулиране на растежните параметри и нарастване на хлорофилното съдържание при растенията, отглеждани в присъствието на *C. vulgaris* в хранителната среда, което вероятно е резултат от съдържащите се в това микроводорасло биоактивни растежни съединения (Tripathi et al., 2008). Освен това микроводораслите съдържат и аминокиселини, които са добре известни със своите положителни ефекти върху растежа и добивите на растенията (Kowalczyk et al., 2008). Според Faheed et al. (2008) стимулирането на растежа на марулята, при присъствието на *C. vulgaris* в почвата, е резултат от стимулиране на биосинтезата

на хлорофили и каротиноиди, което води до подобряване на фотохимичната активност и нарастване на листната маса. Barone et al. (2018) установяват благоприятно влияние на това микроводорасло върху корените на захарно цвекло чрез регулацията на гените, участващи в различни биологични пътища на първичния и вторичния метаболизъм. Предишни изследвания на Zhang et al. (2017) и Barone et al. (2019) също установиха нарастване на сухото и свежо тегло на доматени растения при съвместното им отглеждане с C. vulgaris. Предполагаемият биостимулиращ механизъм може да бъде свързан и с непрекъснатата фотосинтеза на микроводораслите, която постоянно доставя кислород към хидропоновия хранителен разтвор (Barone et al., 2018). Друг възможен механизъм, участващ в биостимулиращото действие на микроводораслите, принадлежащи към Chlorophyta spp. е производството и екскрецията на хормони (ауксини и цитокинини) в средата (Jäger et al., 2010; Renuka et al., 2018). Авторите предполагат, че тези екстракти от микроводорасли могат да смекчат вредните ефекти върху културите в условия на абиотичен стрес (El-Baky et al., 2010; El Arroussi et al., 2018). Други автори смятат, че стимулиращият ефект на водораслите върху растежа на растенията се дължи на съдържащите се във водораслите микроелементи (Zodape, 2001) и важни растителни хормони, участващи в регулацията на растежа (Stirk et al. 2013).

Сравнението между стимулиращите ефектите на *C. vulgaris* и 10  $\mu$ M SA върху растежните параметри на младите оризови растения при физиологични условия показа посилен ефект на микроводораслите върху корените, а на SA върху стъблата на растенията, докато нарастването на общото хлорофилно съдържание е в еднаква степен (Табл. 5 и 6). За разлика от SA (10  $\mu$ M), при отглеждане на оризовите растения в присъствие на *C. vulgaris* в хранителния разтвор се наблюдава намаление в количеството на изследваните маркери на оксидативен стрес при физиологични условия. Установихме намаление на съдържанието на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (с около 20%), съдържанието на МДА (с 42%) и на пролина (с 53%) в листата на оризови растения, отглеждани в присъствието на зеленото микроводорасло в хранителната среда в сравнение, с контролната група растения (Фиг. 5). Присътвието на *C. vulgaris* подобно на SA води до стимулиране на фотохимията на ФС2 (нарастват Ф<sub>PSI</sub> и q<sub>P</sub>), скоростта на линеен електронен транспорт (ЕТR) и скоростта на фотосинтезата (параметъра R<sub>Fd</sub>) (Фиг. 7). За разлика от ФС2, активността на ФС1 не е повлияна от добавянето на зеленото микроводорасло в хранителната среда (Фиг. 9), докато SA слабо стимулира фотохимията на ФС1 при физиологични условия (Фиг. 8).

# 2. Защитен ефект на салициловата киселина и Chlorella vulgaris в условия на кадмиев стрес

До момента са проведени много изследвания за идентифициране на защитната роля на SA като сигнална молекула при стресови условия на околната среда (Mishra & Choudhuri, 1999; Metwally et al., 2003; Khodary, 2004; Gunes et al., 2005; Waseem et al., 2006; Arfan et al., 2007; Horváth et al., 2007; Hayat et al., 2010; Tang et al., 2017). Салициловата киселина, също така, играе важна роля в защитните механизми на растенията срещу влиянието на тежките метали, като активира антиоксидантната защитна система и намалява образуването на супероксидни радикали, като по този начин понижава нивото на липидната пероксидация и поддържа стабилността на мембраните (Guo et al., 2007, Moussa & El-Gamal 2010; Wang et al., 2013a,b; Tamas et al., 2015; Khan et al., 2015).

Известно е, че Cd участва непрякото във формирането на ROS, причиняващи пероксидация на липидите в клетъчната мембрана (Schützendübel et al. 2002; Liu et al., 2003; Singh et al., 2006; Guo et al., 2007; Hsu & Kao 2007; Xu et al., 2010; Wang et al., 2011). Нарастването на количеството на MDA при третиране с Cd е индикация за висока степен на оксидативен стрес (Hou et al., 2007). Уврежданията от страна на редокс-активните метали в растителната клетка обикновено са насочени главно към клетъчната мембрана (Yilmaz & Parlak, 2011). Представените в дисертацията резултати разкриват, че липидната пероксидация в листата на оризовите растения, третирани с 10 µM SA и 150 µM CdCl<sub>2</sub>, е по-ниска от тази при растенията, третирани само с 150 µM Cd (Фиг. 14 В). Подобни резултати са наблюдавани и при предварително третиране на семена от грах с SA (Popova et al., 2009), както и при комбинирано третирани със SA и Cd чрез хранителния разтвор на райграс (*Lolium perenne*) и на водна леща

(Lemna minor) (Wang et al., 2013b; Lu et al., 2018). Друг индикатор за токсичното влияние на тежките метали върху растенията е пролинът, който се натрупва в растителните тъкани в условия на стрес (Krantev et al., 2008). Експерименталните резултати показват, че Cd води до натрупване на пролин в листата на оризовите растения (Фиг. 4 С), което е в съответствие с резултатите, докладвани в предишни изследвания за други растителни видове: Groenlandia densa (Yilmaz & Parlak 2011), Lolium perenne (Wang et al., 2013b) и Lemna minor (Lu et al., 2018). Установеното намаление на количеството пролин в изследваните оризови растения след комбинираното третирани с 10 µM SA и 150 µM Cd предполага частично намаляване на ефектите на Cd от приложената SA (10 μM). Установено е също така, че Cd може да стимулира генерирането на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при различни растения (Maksymiec & Krupa, 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2006, 2009; Vestena et al., 2011; Zhao et al., 2012). В допълнение Wang et al. (2013b) предполагат, че H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> играе важна роля в индуцираното от тежките метали инхибиране на растежа на растенията. Нашите експериментални резултати също показват, че Cd увеличава нивата на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листата на оризовите растения, докато добавянето на SA към хранителния разтвор понижава количеството на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и намалява ефектите на Cd стрес. Подобни резултати са получени и при комбинирано кореново третиране с Cd и SA на райграс (с 100 µM Cd и 200 µM SA) и водна леща (с 10 µM Cd и 50 µM SA) (Wang et al., 2013b; Lu et al., 2018).

Индуцираното от Cd формиране на ROS също води до инхибиране и оксидативно увреждане на фотосинтетичния апарат (Parmar et al., 2013; Zhu et al., 2016). Добре известно е, че вредното въздействие на Cd върху фотосинтезата е резултат от повлияване на метаболизма на хлорофила и ултраструктурата на хлоропластите (Djebali et al., 2005; Hakmaoui et al., 2007; Parmar et al., 2013; Arivazhagan & Sharavanan, 2015). В съответствие с тези изследвания са и нашите експериментални резултати, показващи силно намаление на хлорофилното и каротиноидного съдържание в листата на третираните с Сd оризови растения (Табл. 5 и 6), което най-вероятно е резултат от инхибиране на биосинтезата на хлорофила (Parmar et al., 2013). Предизвиканото от Cd намаление на количеството на пигментите е наблюдавано и при пшеница (Moussa & El-Gamal, 2010), царевица (Maurya et al., 2008; Arivazhagan & Sharavanan, 2015) и соя (Хие et al., 2013). Установените изменения в съдържанието на общия хлорофил вследствие на третирането с Cd са съпътствани и с нарастване на отношението Chl a/b (Табл. 5 и 6). Предполага се, че отношението на Chl a/b корелира с количеството на CCK2 и степента на стиковане на тилакоидите (Apostolova et al., 2006; Stoichkova et al., 2006), следователно може да се предположи, че третирането с Cd индуцира промени в организацията на тилакоидните мембрани, което вероятно е резултат и от повишено прекисно окисление на липидите в мембраната (Фиг. 4 и 5). Всички наблюдавани Cd-индуцирани промени в пигментния състав са по-слабо изразени в присъствието на екзогенно приложената SA в хранителния разтвор на растенията (Табл. 5). Инхибиращото влияние на Cd върху пигментното съдържанието на листата е съпроводено с намаление и на растежните параметри (Табл. 5 и 6), като то е по-слабо изразено в присъствието на екзогенно приложена SA. Данните корелират с изследванията на Krantev et al. (2008) за влиянието на Cd върху царевични растения след предварително накисване на семената със SA. Предполага се, че защитният ефект на SA е резултат от бързото обезвреждане на ROS, което осигурява защита на клетките от оксидативното увреждане, индуцирано от Cd. Предишни изследвания също показват защитната роля на SA при третиране с арсен на оризови растения, върху растежните параметри, в частност на дължините на стъблата и корените, както и върху общото хлорофилно съдържание (Singh et al., 2017). Друга причина за намалените токсични ефекти на Cd в присъствието на SA е установеното намалено натрупване на Cd в стъблата на оризовите растения в резултат от намалената с около 56% транслокация на метала от корените към надземните части в сравнение с третирането само с Cd (Табл. 13). Подобно благоприятно въздействие на SA, т.е. намалена транслокация на Cd от корените към надземните части на растенията е наблюдавана и при райграс (Wang et al., 2013b). От друга страна, изследванията на Fatima et al. (2014) върху четири сорта ориз показаха, че независимо от отношението на приложената висока концентрация SA (100 µM) към тази на Cd (100-1500 µM), натрупването на Cd в корените не се повлиява, а съдържанието на Cd в стъблата почти не намалява.

Намаляване на ефекта на Cd стрес върху пигментния състав и растежните параметри е установен също така и в присъствието на *C. vulgaris* (Табл. 6). Защитният ефект на зеленото микроводорасло е в резултат на намаленото количество на  $H_2O_2$  и намалената липидна пероксидация (Фиг. 15), като една от най-вероятните причини за това е намаленото съдържание на Cd в стъблата, в резултат от слабата транслокация на този метал от корените към стъблата, както и сорбцията му от водораслото (Nirmal & Oommen, 2012). Клетъчната повърхност е фокусното място на свързване на металите с водораслите (Andrade et al., 2005), а сорбцията на тежки метали включва обмен на метални йони с повърхностно свързани катиони или протони (Mehta & Gaur, 2005). Ji et al. (2012) установяват също така, че живите водорасли. Установено е, че присъствието на *C. vulgaris* при отглеждане на чушки (*Capsicum annuum* L.), води до значително намалено производството на ROS и на по-ниска липидна пероксидация (Guzmán-Murillo et al., 2013).

В допълнение, изследвания свързани с използване на биоторове съобщават, че използването на метало-резистентни ендофитни бактерии също могат да взаимодействат директно с тежките метали и по този начин намаляват натрупването на Cd в оризови растения (*Oryza sativa*) като се наблюдава също и подобрен растеж чрез регулиране на тяхната антиоксидантна система и ендогенни хормони (Lin et al., 2016; Jan et al., 2019).

Предполагаемите Cd-индуцирани промени в организацията на тилакоидните мембрани корелират с наблюдаваното увеличение на преноса на енергия от  $\Phi$ C2 към  $\Phi$ C1 (отношението F744/F685 нараства, Табл. 11 и 12). Вероятно това се дължи на влиянието на Cd върху организацията на CCK2 (съпътствано и с нарастване на отношението Chl *a/b*), като също е наблюдавано намаляване на количеството на тримерите на този комплекс и в крайна сметка ефективното използване на светлинната енергия (Croce & van Amerongen, 2011). Нашите данните показват, че третирането с SA, както и присъствие на *C. vulgaris*, предотвратява Cd-индуцираното нарастване на преноса на енергия от  $\Phi$ C2 към  $\Phi$ C1 (отношението F744/F685, Табл. 11 и 12), което вероятно е резултат от Cd-индуцираните промени във фотосинтетичния апарат. В предишни изследвания върху пшенични растения е установено, че третирането със SA в условия на Cd стрес, намалява уврежданията на тилакоидните мембрани, предотвратявайки структурни промени и/или раздуването (разстиковането) им установено посредством трансмисионен електронен микроскоп (Moussa & El-Gamal, 2010). От друга страна е установено, че самостоятелното третиране с SA не предизвиква ултраструктурни промени в хлоропластите (Moussa & El-Gamal, 2010).

Във фотосинтетичния апарат най-силно повлияни от Cd йони са реакциите на пренос на електрони в комплекса на  $\Phi$ C2, което води до инхибиране на кислородното отделяне (Atal et al., 1991; Chugh & Sawhney, 1999; Vassilev et al., 2004). Овен това, Sigfridsson et al. (2004) показват, че Cd повлиява както донорната, така и акцепторната страна на  $\Phi$ C2. Предполага се, че Cd йони модифицират комформацията на Q<sub>B</sub> свързващото място на акцепторната страна на  $\Phi$ C2 и блокират преноса на електрони от Q<sub>A</sub> към Q<sub>B</sub>. Анализът на представените в дисертацията данни от PAM хлорофилната флуоресценцията показва инхибиране на ефективния квантов добив на  $\Phi$ C2 ( $\phi_{PS2}$ ), фотохимичното гасене (q<sub>P</sub>), скоростта на линейния електронен транспортирт (ETR) и параметъра R<sub>Fd</sub>, корелиращ със скоростта на CO<sub>2</sub> асимилация (Lichtenthaler et al., 2005) (Фиг. 6 и 7), което е резултат от Cd-индуцираните промени във фотосинтетичния апарат. Индуцираното от Cd намаление на PAM параметрите е по-слабо изразено след добавянето на SA в хранителния разтвор. В предишни изследвания е установено, че предварителното накисване на семена от царевица в SA също има защитен ефект върху фотосинтезата, като намалява окислителните увреждания в растенията, предизвикани от Cd стрес (Krantev et al., 2008).

В своите изследвания, Sigfridsson et al. (2004) също предполагат, че Cd бързо инхибира функционалната активност на ФС2, засягайки донорната страна между КОС и първичния електронен донор на Р<sub>680</sub> (Yz). Нашите данни потвърждават това предположение и дават допълнителна информация за настъпващите промени в донорната страна на ФС2. Установени са промени в кинетичните параметри на кислород-отделящите реакциите, които предполагат модификация на Mn4Ca клъстер (Табл. 9 и 10), както и силно инхибиране на кислородното

отделяне (Фиг. 8 и 9). Промените в КОС, нарастването на количеството на ФС2 центрове в найредуцирано състояние  $(S_0)$ , както и на загубите ( $\alpha$ ) може да се дължи на заместване на Ca<sup>2+</sup> от  $Cd^{2+}$  в кофактора на Mn4Ca клъстер (Faller et al., 2005), а също и на намаляването на активните ФС2 центрове (т.е. нараства количество на блокирани ФС2 центрове, S<sub>B</sub>) (Табл. 9 и 10). В допълнение, установеното по-силно инхибиране на светкавичните кислородни добиви (Y) в сравнение с кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (А) (Фиг. 10 и 11) ни дава право да предположим, че ФС2 центровете в граналните области (ФС2α, бързи центрове) са посилно повлияни от Сd, отколкото ФС2β центровете в стромалните ламели. Тези резултати са в съгласие с предположението, направено от Atal et al. (1991), за намаляване на активните ФС2а центрове вследствие на Cd стрес. Изследванията на Atal et al. (1991) също показаха, че Cd предизвиква нарастване на броя на неактивните реакционни центрове във ФС2, както и намаляване на размера на антенните комплекси на  $\Phi C2$  и на броя на активните  $\Phi C2\alpha$ реакционни центрове в граните при пшеница. Нашите данни показват, че екзогенно добавената SA (10  $\mu$ M) в условия на Cd стрес, намалява неговия ефект върху кинетичните параметри на кислородното отделяне (Табл. 9), което предполага защита на КОС от увреждане или модификации. Освен това, експерименталните резултати показват по-силен защитен ефект на C. vulgaris в сравнение с този на SA върху параметрите на кислородното отделяне (Y и A) при въздействие с Cd. запазвайки количеството на активните ФС2 центрове и константата K<sub>D</sub> със стойности близки до контролните (Табл. 10).

Изследванията в дисертационния труд установиха също инхибиране на ФС1-зависимият електронен транспорт в условия на Cd стрес, като инхибирането е по-слабо в сравнение с това при ФС2-зависимият електронен транспорт (Фиг. 8 и 9). За по-детайлно изследване на промените във ФС1 са измерени кинетиките на тъмнинната редукция на Р<sub>700<sup>+</sup></sub>, които се характеризират с 2 експоненти (бърза и бавна) с полувремена  $t_1$  (за бързата компонента) и  $t_2$  (за бавната компонента). Предполага се, че двуфазната кинетика на тъмнинната редукция на Р<sub>700</sub>+ след изключване на червената светлина се дължи на две различни популации на ФС1, разположени в различни области на тилакоидните мембрани или произхождащи от две електрон-донорни системи (Albertsson, 1995; Bukhov et al., 2002). В условия на Cd стрес отношението  $\Delta A/A$ , както и стойностите за полувремената  $t_1$  и  $t_2$  намаляват спрямо контролните растения, което е резултат от Cd-индуцираните промени в комплекса на ФС1. Тези промени могат се дължат на разрушаването на желязо-серните центрове и/или на антенния комплекс на ФС1 (Atal et al., 1991; Chugh & Sawhney, 1999; Parmar et al., 2013). Повлияването на двете полувремена ( $t_1$  и  $t_2$ ) вследствие на Cd третиране вероятно се дължи на въздействие и върху двете популации на ФС1 съответно в нестикованите участъци на граните и в стромалните ламели.

Комбинираното третиране със SA и Cd води до нарастване на степента на фотоокисление на  $P_{700}$  ( $P_{700^+}$ , като нараства  $\Delta A/A$ ) и силно намаление на  $t_1$ , което говори за увеличаване на цикличния електронен транспорт около  $\Phi$ C1 в стромалните ламели, който е защитен механизъм при стрес (Munne-Bosch et al., 2005; Takahashi et al., 2009). Подобно въздействие на Cd йони върху фотохимията на  $\Phi$ C1 и ускоряване на цикличния електронен транспорт около  $\Phi$ C1 е установено и при грахови растения (Wodala et al. 2012). Експерименталните резултати в дисертационния труд показват също така и защитно действие на *C. vulgaris* върху фотохимията на  $\Phi$ C1 (Табл. 8) в условия на Cd стрес. Защитният ефект на *C. vulgaris* не е свързан с промяна във времената на тъмнината редукция ( $t_1$ ), съответно с увеличаване на цикличния електронен транспорт около  $\Phi$ C1 (Табл. 8). Подобен защитен ефект е показан и за микроводораслите *Spirulina maxima* и *Chlorella ellipsoida*, които увеличават толерантността на пшеницата към засоляване, повишавайки антиоксидантната защита (El-Baky et al., 2010).

Сравнението на влиянието на *C. vulgaris* върху оризови растения с известното действие на салициловата киселина в условия на кадмиев стрес показа, че ефектът на Cd върху растежните параметри, пигментния състав и прекисното окисление на липидите е много послабо проявен в присъствие на *C. vulgaris* в сравнение със SA. Данните показват също така, че защитните ефекти на зеленото микроводорасло и SA са почти еднакви върху фотохимичното преобразуване на енергията във  $\Phi$ C2, фотохимичното гасене, електронния транспорт, флуоресцентния параметър (R<sub>Fd</sub>, корелиращ със скоростта на фотосинтезата) (Фиг. 6 и 7), както и фотохимията на  $\Phi$ C1 при Cd третиране (Таблици 7 и 8). В допълнение е показано, че само третирането със SA в условия на Cd стрес, води до стимулиране на цикличния електронен транспорт около  $\Phi$ C1, който е един от защитните механизми в условия на стрес. Трябва да се отбележи и факта, че добавянето на *C. vulgaris* към хранителния разтвор ограничава силно натрупването на Cd в корените и стъблата на растенията, което се дължи на сорбцията му от самите клетки на зеленото микроводорасло, докато третирането със SA по-силно ограничава транспорта на Cd от корените към листата, т.е. TF е по-малък от този след прилагането на *C. vulgaris* (Табл. 13).

В заключение става ясно, че ниски концентрации на SA (10  $\mu$ M) и живи клетки на *C. vulgaris* могат успешно да се прилагат както при физиологични условия, така и за намаляване на вредното действие на Cd и за запазване на функционалната активност на фотосинтетичния апарат на висши растения.

### 3. Роля на DELLA белтъците в условия на кадмиев стрес

Растителните видове и генотипове значително се различават помежду си по своето усвояване на Cd от средата и последващото му транспортиране от корените към надземните части на растенията – стъблата и листата (Lysenko et al., 2015; Mesnoua et al., 2016; Perez-Romero et al., 2016; Zhu et al., 2016b), което води до инхибиране в различна степен на растежа и фотосинтезата при различните растения (Parmar et al., 2013; Tran & Popova, 2013). Установено е, че пшеничните растения са по-чувствителни към токсичните ефекти на Cd в сравнение с оризовите растения (Hoseini & Zargari, 2013), затова в нашите изследвания с пшенични растения сме използвали по-ниска концентрация на Cd (100 µM) в сравнение с третирането на оризовите растения (150 µM Cd), които бяха избрана след провеждане на предварителни опити.

Гените, отговарящи за намалената височина при пшеницата (*Rht*), които кодират модифицирани DELLA белтъци, значително повишават устойчивостта на растенията към стрес посредством регулиране на антиоксидантната защитна система и намаляване на нивата на ROS (Achard et al., 2006, 2008; Robert-Seilaniantz et al., 2010; Saville et al., 2012; Kocheva et al., 2014).

В дисертационния труд за първи път е сравнена чувствителността към Cd на две близкоизогенни линии пшеница, различаващи се в локуса *Rht-B1* (алели *-B1a* и *-B1c*). Резултатите от изследванията показват, че нискостъбленият DELLA мутант (*Rht-B1c*) е по-толерантен към Cd стрес, отколкото дивия тип (*Rht-B1a*). Толерантността към Cd на мутанта се изразява в намалено Cd-индуцирано инхибиране на растежните параметри, тъй като намаляването на дължината на стъблата е по-слабо изразено при мутанта, отколкото при дивия тип пшеница (Табл. 14). И при двата генотипа корените са по-силно засегнати, в сравнение със стъблата, което вероятно е резултат от по-голямото натрупване на Cd в корените, отколкото в стъблата (Табл. 14). При висшите растения корените са първите органи, които имат контакт с Cd. Впоследствие тежкият метал се пренася към стъблата, където инхибира растежа им и повлиява фотосинтезата (Bazzaz & Govindjee, 1974; Parmar et al., 2013; Mesnoua et al., 2016).

Представените в дисертацията данни показват по-голямо натрупване на Cd в тъканите на мутантните растения, особено в стъблата, в сравнение с дивия тип, което показва, че *Rht-B1c* мутацията не води до намаляване на транслокацията на Cd от корените към стъблата на растението. Това предполага, че по-високата устойчивост на мутанта към Cd не е пряко свързана с намаленото натрупване на Cd във фотосинтетичните тъкани на растенията. Наблюдаваната толерантност би могла да се дължи на повишен антиоксидантен капацитет на мутанта (*Rht-B1c*), както е установено от Kocheva et al. (2014) при засушаване, а също и от някои защитни механизми във фотосинтетичния апарат, изследвани в дисертационния труд.

Известно е, че един от най-характерните признаци на Cd токсичност е загубата на хлорофил (Hendry et al., 1987), затова са проследени промените в количеството на пигментните при двата генотипа пшеница след третиране с Cd. Данните показват, че индуцираните от Cd промени в растежа на растенията се съпровождат от намаляване на съдържанието на Chl a, Chl b и Car (Табл. 14), което е в съответствие с предишни изследвания върху други растителни видове (Maurya et al., 2008; Moussa & El-Gamal, 2010; Xue et al., 2013; Lysenko et al., 2015; Mesnoua et al., 2016). Намалението на количеството на пигментите е по-силно изразено в листата на дивия тип, отколкото в тези на мутанта (Табл. 14), което вероятно се дължи на

намалената степен на разграждане на хлорофила и/или на инхибирането на неговата биосинтеза в мутанта (Bazzaz & Govindjee, 1974; Moussa & El-Gamal, 2010; Parmar et al., 2013). При сравнението на двата генотипа пшеница е установено, че при мутантните растения количеството на Chl a както преди, така и след третиране с Cd, е значително по-високо отколкото при дивия тип (Табл. 14). В предишни изследвания е установено, че DELLA мутантните гени при растения джуджета на Arabidopsis и пшеница участват в регулирането на биогенезата на хлоропластите и в регулацията на биосинтезата на хлорофил, свързано с повишено съдържание на хлорофил на единица листна площ и по-висока скорост на фотосинтеза (Jiang et al., 2012; Wen et al., 2013). Следователно, може да се предположи, че въздействието на тази мутация върху биосинтезата на хлорофила влияе върху пигментния състав след третирането на растенията с Cd, както и за по-високата устойчивост на мутанта към Сd. Освен това, наблюдаваного значително по-голямо количество Car и по-голямото отношение на Car/Chl при мутанта в сравнение с дивия тип в условия на Cd стрес (Табл. 14) предполага, че изследваният мутант на пшеница (Rht-Blc) има по-ефективна защитна система, тъй като отношението на Car/Chl се смята, че е пряко свързано с повишения защитен капацитет (Young & Britton, 1990).

Намаленото хлорофилно съдържание, както и евентуални Сd-индуцирани структурни промени водят до инхибиране на фотохимичната активност на фотосинтетичния апарат (Chen et al., 2010; Moussa & El-Gamal, 2010). Нашите резултати показват, че  $\Phi$ C2-зависимият електронен транспорт се повлиява по-силно от Cd, отколкото  $\Phi$ C1-зависимият електронен транспорт, което е в съответствие с предишни изследвания върху други растителни видове (Atal et al., 1991; Chugh & Sawhney, 1999; Vassilev et al., 2004). Освен това, инхибиращото влияние на Cd върху фотохимичната активност на двете фотосистеми е по-слабо изразено при мутанта в сравнение с дивия тип пшеница ( $\Phi$ ur. 13), което показва, че фотосинтетичният апарат при мутанта е по-устойчив към токсичното въздействие на Cd. Вероятно, предизвиканото от Cd инхибиране на  $\Phi$ C1 е резултат от повлияване на електронния транспорт откъм редуциращата страна на  $\Phi$ C1 (Siedlecka & Baszynski, 1993), докато Cd повлиява, както акцепторната, така и донорната страна на  $\Phi$ C2 (Sigfridsson et al., 2004), инхибирайки преноса на електрони от Q<sub>A</sub> към Q<sub>B</sub> (Geiken et al., 1998; Sigfridsson et al., 2004), инхибирайки функцията на КОС (Faller et al., 2005) и блокирайки електронния транспорт между КОС и първичния донор на електрони на P<sub>680</sub> (Yz) (Sigfridsson et al., 2004).

Изследванията на двата генотипа пшеница със скоростен кислороден електрод (при непрекъснато осветяване или след прилагане на насищащи светкавици) потвърждават повисоката толерантност на кислородното отделяне при мутанта в условия на Cd стрес, в сравнение с дивия тип пшеница. Светкавичните кислородни добиви са инхибирани с 28% при мутанта и с 43% при дивия тип (Фиг. 14). Индуцираното от Cd намаление на светкавичните кислородни добиви е свързано с инактивирането на кислород-отделящите  $\Phi$ C2 $\alpha$  центрове, отделящи кислород по модела на Кок, тъй като  $\Phi$ C2 $\alpha$  центровете в граните са едни от найчувствителните компоненти на фотосинтетичния апарат към абиотичен стрес (Yu & Björn, 1996).

Освен кислородните добиви, кинетичните параметри на кислород-отделящите реакциите на донорната страна на  $\Phi$ C2 като: първоначалното S<sub>0</sub>-S<sub>1</sub> разпределение, блокираните центрове (S<sub>B</sub>), скоростната константа (K<sub>D</sub>), загубите ( $\alpha$ ) и двойните попадения ( $\beta$ ), също са помалко засегнати в мутанта, отколкото в дивия тип в условия на Cd стрес. Следователно може да се предложи, че причина за намаленото инхибиране на  $\Phi$ C2 са и по-малките промени в Mn клъстер на КОС в мутантните растения. Освен това, резултатите показват, че при мутанта Cd има незначителен ефект върху скоростната константа на възбудените S<sub>i</sub> състояния (скоростна константа на "turnover" на кислород-отделящите центрове) (K<sub>D</sub>), докато при дивия тип тази константа намалява значително (Табл. 16). Следователно може да се предположи, че КОС при мутанта (*Rht-B1c*) е много по-малко увреден от Cd в сравнение с дивия тип (*Rht-B1a*).

Анализът на данните от РАМ хлорофилната флуоресценция не показва съществени разлики в РАМ параметрите между нетретираните контролни групи на двата генотипа пшеница (Фиг. 12). Стойностите на параметрите на хлорофилната флуоресценция: F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>, φ<sub>ΦC2</sub>, q<sub>P</sub>, R<sub>Fd</sub> и ETR, както при мутанта, така и при дивия тип намаляват при третиране с Cd, което е

установено и при изследвания на други видове растения (Wodala et al., 2012; Liu et al., 2014; Lysenko et al., 2015; Mesnoua et al., 2016). Експерименталните резултати показват също така, че действието на Cd е по-слабо изразено върху РАМ параметрите отколкото върху кислородното отделяне, което вероятно е резултат от значителни промени в КОС (Фиг. 13 и 14). Анализът на данните от РАМ хлорофилната флуоресценция потвърждават отново, че Cd има по-слаб ефект върху функциите на фотосинтетичния апарат на мутанта (*Rht-B1c*) в сравнение с дивия тип (Rht-Bla). По-високите стойности на qP при муганта в сравнение с дивия тип показват и поголямото количество на отворените центрове при мутанта. Според литературните данни Сd предизвиква дезорганизация на тримерите на ССК2 и намалено количество на ССК2 агрегати, водещо до дезорганизация на супрамолекулната структура на ФС2 (Janik et al., 2010). Всички тези изменения във фотосинтетичния апарат повлияват преноса на енергия между пигментбелтъчните комплекси при въздействие с Cd (Табл. 17). Нарастването на отношението F735/F685, характеризиращо преразпределението на възбуждащата енергия между двете фотосистеми предполага увеличен пренос на енергия от ФС2 към ФС1 след третиране с Cd, като тези изменения са по-слабо изразени в мутанта, отколкото в дивия тип пшеница. Следователно, може да се предположи, че преразпределението на енергията на възбуждане между двете фотоситеми вероятно е резултат от разстиковане на тилакоидните мембрани и прегрупиране на пигмент-белтъчните комплекси в резултат на Cd действие (Janik et al., 2010). Освен това, увеличеният пренос на енергия от ФС2 към ФС1 (отношението F735/F685) в тилакоидните мембрани на нетретирани мутантни растения, в сравнение в дивия тип, предполага структурна реорганизация в основните пигмент-белтъчни комплекси при мутанта, което вероятно влияе на устойчивостта на муганта (*Rht-B1c*) към абиотичен стрес.

Анализът на фотоокисляването на Р<sub>700</sub> ( $\Delta A/A$ ) и кинетиките на тъмнинната релаксация на P<sub>700</sub><sup>+</sup> показва, че Cd-индуцираното инхибиране на фотоокисляването на P<sub>700</sub> е по-силно изразено при дивия тип, отколкото при мутанта (Табл. 15). Също така, данните показват, че полувремената на тъмнинната релаксация, са по-малки при нетретираните мутантни растения, отколкото при нетретираните растения на дивия тип (Табл. 15). Предполага се, че бързо опериращите центрове на  $\Phi C1$  (характеризиращи се с време  $t_1$  и цикличен електронен транспорт) са разположени в стромалните ламели, докато бавният път (т.е. линейния електронен транспорт) се осъществява от центровете разположени в нестикованите области на граните (характеризиращи се с време  $t_2$ ) (Albertsson, 1995; Bukhov et al., 2002). Нашите данни показват по-ниски стойности за t1 при мутанта в сравнение с дивия тип след третиране с кадмий, което предполага повишен капацитет за цикличен електронен транспорт около ФС1 при мутанта. Намаляването на полувремената и на двете компоненти на тъмнинната релаксация на  $P_{700^+}(t_1 \text{ и } t_2)$  при третираните с Cd растения (Табл. 15), предполага, че Cd повлиява  $\Phi$ C1 комплексите, разположени както в стромалните ламели, така и в нестикованите участьци на граните в пшеничните растения. Всички тези изменения показват, че Сd предизвиква по-силно увеличение на цикличния транспорт на електрони около ФС1 при мутанта, отколкото при дивия тип. Следователно, ускореният цикличен електронен транспорт, наблюдаван в листата на мутантните растения пшеница, може да бъде механизъм, чрез който при тези растения са намалени уврежданията от Cd стрес. Най-новите изследвания с този пшеничен мугант (*Rht B1c*) установиха, че при него се наблюдава леко нарастване на съдържанието на SA в листата в сравнение с дивия тип (Szalai et al., 2020). Авторите предполагат, че дивият тип и мутанта използват различни стратегии в условия на Cd стрес, като дивият тип натрупва повече пролин и полиамини в корените, докато мутантът увеличава производството на фитохелатини. Тъй като фитохелатините играят важна роля в детоксикацията на тежки метали в растенията (Kovács et al. 2014), те също могат да са отговорни за по-високия Сd толеранс, наблюдаван при мутантната линия с увеличени DELLA белтъци.

Представените в дисертационния труд експериментални резултати и литературни данни предполаган възможен принос на DELLA белтъци в механизмите на адаптация на пшеничните растения към стреса от тежките метали и разкрива двойните ефекти на *Rht* гените в допълнение към основните им ефекти върху растежа и добива на растенията, които биха могли да бъдат от значение за селекционирането и селското стопанство.

### Изводи

- 1. Прилагането на ниска концентрация на салициловата киселина (10 μM) при оризови растения (*Oryza sativa* L.) води до нарастване на хлорофилното съдържание, както и до стимулиране на растежните параметри, фотохимичната активност на двете фотосистеми и цикличния електронен транспорт около ΦC1.
- **2.** В условия на кадмиев стрес намалява количеството на пигментите (хлорофили и каротиноиди) и се инхибират растежните параметри на оризовите растения (*Oryza sativa* L.) и на пшенични растения (*Triticum aestivum* L.). Салициловата киселина, *C. vulgaris* и увеличеното количество на DELLA белтъци намаляват ефекта на кадмия върху тези параметри, като защитният ефект на *Chlorella vulgaris* е най-голям.
- **3.** Количеството на натрупания кадмий в корените и стъблата е много по-малко при оризови растения, отглеждани в присъствието на *Chlorella vulgaris* в сравнение с тези, отглеждани в присъствие на салицилова киселина.
- **4.** Кадмиевият стрес повлиява активността и на двете фотосистеми както при оризови растения (*Oryza sativa* L.), така и при пшенични растения (*Triticum aestivum* L.), като найсилно е инхибирано кислородното отделяне в резултат на увреждането на кислородотделящата система и повлияване на кинетичните параметри на кислород-отделящите реакции.
- **5.** Намаленото кадмий-индуцирано инхибиране на кислородното отделяне, наблюдавано след прилагане на салицилова киселина и *Chlorella vulgaris*, както и при увеличеното количество на DELLA белтъците, е резултат от защита на Mn-клъстер на кислородотделящата система от повреда и модификация, както и на намаление на блокираните ФС2 центрове.
- **6.** В условия на кадмиев стрес салициловата киселина и *Chlorella vulgaris* имат защитен ефект върху фотохимията на двете фотосистеми при оризови растения (*Oryza sativa* L.), като при третиране със салицилова киселина се наблюдава стимулиране на цикличния електронен транспорт около ФС1.
- **7.** Увеличеното количество на DELLA белтъци в *Rht-B1c* мутанта на пшеница защитава функционалната активност на фотосинтетичния апарат, въпреки по-голямото натрупване на кадмий в стъблата в сравнение с дивия тип, което дава право да се предположи, участието на тези белтъци в механизмите на адаптация на растенията към кадмиев стрес.
- 8. Анализът на промените в окислително-редукционните свойства на  $P700^+$  показва, че кадмиевият стрес повлиява и двете субпопулации на  $\Phi$ C1 при оризови растения (*Oryza sativa* L.) и при пшенични растения (*Triticum aestivum* L.). Един от защитните механизми срещу вредното действие на кадмия върху фотосинтетичния апарат и при двете растения е стимулирането на цикличния електронен транспорт около  $\Phi$ C1.

### Приноси

- **1.** За първи път е показано, че микроводораслото *Chlorella vulgaris* защитава функциите на фотосинтетичния апарат на висши растения в условия на кадмиев стрес.
- 2. Представени са експериментални доказателства, че салициловата киселина, *Chlorella vulgaris* и DELLA белтъците намаляват инхибиращия ефект на кадмия върху растежните параметри и количеството на пигментите, като защитният ефект на *Chlorella vulgaris* е най-голям.
- **3.** За първи път е показано влиянието на различни концентрации салицилова киселина в хранителния разтвор върху кинетичните параметри на кислородното отделяне при физиологични условия.
- **4.** За първи път са представени експериментални доказателства за промените, настъпващи в кинетичните параметри на кислородното отделяне в условия на кадмиев стрес, както и ролята на салициловата киселина, *Chlorella vulgaris* и DELLA белтъците за защитата на Mn-клъстер на кислород-отделящата система.
- 5. За първи път са представени експериментални доказателства за защитната ролята на DELLA белтъците в пшеничен мутант (*Rht-B1c*) върху функционалната активност на фотосинтетичния апарат при въздействие с кадмий. Установени са молекулните механизми, чрез които тези белтъци подобряват толерантността на фотосинтетичния апарат към кадмиев стрес.

### Използвана литература:

- 1. Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N.P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science 311, 91–94.
- 2. Achard P., Renou J.-P., Berthome R., Harberd N.P., Genschik P. (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. Curr. Biol. 18, 656–660.
- 3. Ahmad A., Hayat S., Fariduddin Q., Ahmad I. (2001) Photosynthetic efficiency of plants of Brassica juncea treated with chlorosubstituted auxins. Photosynthetica 39:565–568.
- 4. Albertsson P.A. (1995) The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane—a model for the domain organization. Photosynth Res 46:141–149.
- 5. Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell Environ 24:1337–1344.
- Andrade A.D., Rollemberg M.C.E. & Nobrega J.A. (2005) Proton and metal binding capacity of the green freshwater alga Chaetophora elegans. Process Biochem. 40:1931–1936.
- 7. Apostolova E.L., Dobrikova A.G., Ivanova P.I., Petkanchin I.B., Taneva S.G. (2006) Relationship between the organization of the PSII supercomplex and the functions of the photosynthetic apparatus. J Photochem Photobiol B 83:114–122.
- 8. Arfan M., Athar H.R., Ashraf M. (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress, J. Plant Physiol. 164: 685–694.
- 9. Arivazhagan V., Sharavanan P.S. (2015) Effect of cadmium on photosynthetic responses and biochemical contents of maize plants. Am J Environ Eng Sci 2:32–36.
- 10. Atal N., Saradhi P.P., Mohanty P. (1991) Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. Plant Cell Physiol 32:943–951.
- 11. **Barone** V., Baglieri A., Stevanato P., Broccanello C., Bertoldo G., Bertaggia M., et al. (2018). Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (Beta vulgaris L.). J. Appl. Phycol. 30:1061–1072.
- 12. Barone V., Puglisi I., Fragalà F., Lo Piero A.R., Giuffrida F. and Baglieri A. (2019). Novel bioprocess for the cultivation of microalgae in hydroponic growing system of tomato plants. J. Appl. Phycol. 31:465–470.
- 13. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39:205-207.
- 14. Bazzaz M.B., Govindjee (1974) Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. Environ. Lett. 6, 1–12.

- 15. **Borsani** O., Valpuesta V., Botella M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings, Plant Physiol., 126(3):1024–1030.
- 16. **Bukhov** N., Egorova E., Carpentier R. (2002) Electron flow to photosystem I from stromal reductants in vivo: the size of the pool of stromal reductants controls the rate of electron donation to both rapidly and slowly reducing photosystem I units. Planta 215:812–820.
- Chen F., Wang F., Sun H.Y., Cai Y., Mao W.H., Zhang G.P., Vincze E., Wu F.B. (2010) Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (Hordeum vulgare). J. Plant Growth Regul. 29:394–408.
- Chugh L.K., Sawhney S.K. (1999) Photosynthetic activities of Pisum sativum seedlings grown in presence of cadmium. Plant Physiol Biochem 37:297–303.
- 19. Croce R., van Amerongen H. (2011) Light-harvesting and structural organization of photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. J Photochem Biochem B Biol 104:142–153.
- Djebali W., Zarrouk M., Brouquisse R., Kahoui E.S., Limam F., Ghorbel M.H., Chaibi W. (2005) Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast membranes. Plant Biol. 7:358– 368.
- 21. **Dobrikova** A.G., Krasteva V., Apostolova E.L. (2013) Damage and protection of the photosynthetic apparatus from UV-B radiation. I. Effect of ascorbate. J. Plant Physiol. 170:251–257.
- 22. El Arroussi H., Benhima R., Elbaouchi A., Sijilmassi B., El Mernissi N., Aafsar A., et al. (2018) Dunaliella salina exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). J. Appl. Phycol. 30:2929–2941.
- 23. El-Baky Abd H. H., Rl-Baz F. K. & El Baroty G. S. (2010) Enhancing antioxidant availability in wheat grains from plants grown under seawater stress in response to microalgae extract treatments. J. Sci. Food Agric. 90: 299–303.
- 24. **Faheed** F., Abd el Fattah Z. (2008) Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizeron growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. Jagric Soc Sci 4:165–9.
- 25. Faller P., Kienzler K., Krieger-Liszkay A. (2005) Mechanism of Cd2+ toxicity: Cd2+ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca2+ site. Biochim Biophys Acta 1706(1-2):158-164.
- Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. Photosynthetica, 41: 281–284.
- 27. Fatima R.N., Javed F., Wahid A. (2014) Salicylic acid modifies growth performance and nutrient status of rice (Oryza sativa) under cadmium stress. Int J Agric Biol. 16(6):1083–1090.
- Flintham J.E., Borner A., Worland A., Gale M. (1997) Optimizing wheat grain yield effects of Rht (gibberellininsensitive) dwarfing genes. J. Agric. Sci. 128:11–25.
- 29. Flintham J.E., Gale M.D. (1982) The Tom Thumb dwarfing gene, Rht3 in wheat, I. Reduced pre-harvest damage to breadmaking quality. Theor. Appl. Genet. 62:121–126.
- Geiken B., Masojidek J., Rizzuto M., Pompili M.L., Giardi M.T. (1998) Incorporation of S-35 methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. Plant Cell Environ. 21:1265–1273.
- 31. Genty B., Briantals G., Baker N. (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim Biophys Acta 990:87–92.
- 32. Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Cicek N., Guneri E., Erasland F. and Guzelordu T. (2005) Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (Zea mays L.), Arch. Agron. Soil Sci., 51(6):687–695.
- Guo B., Liang Y.C., Zhu Y.G., Zhao F.J. (2007) Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (Orysa sativa) subjected to cadmium stress. Environ. Pollut. 147:743–749.
- 34. **Guzmán-Murillo** M.A., Ascencio F., Larrinaga-Mayoral J.A. (2013) Germination and ROS detoxification in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under NaCl stress and treatment with microalgae extracts. Protoplasma, 250:33–42.
- 35. Hakmaoui A., Ater M., Boka K., Baron M. (2007) Copper and cadmium tolerance, uptake and effect on chloroplast ultrastructure. Studies on *Salix purpurea* and *Phragmites australis*. Z. Naturforsch. C 62:417–426.
- 36. **Harrison** M.A., Melis A. (1992) Organization and stability of polypeptides associated with the chlorophyll a-b lightharvesting complex of photosystem-II, Plant Cell Physiol 33:627–637.
- 37. Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review, Environ. Exp. Bot., 68(1):14–25.
- Heath R.L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast, I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125:189–198.
- 39. **Hendry** G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B. (1987) Tansley review No.11. The degradation of chlorophyll e a biological enigma. New Phytol. 107:255–302.
- Horváth E., Szalai G., Janda T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling, J. Plant Growth Regul. 26(3): 290–300.
- 41. Hoseini S.M., Zargari F. (2013) Cadmium in plants: a review. Int. J. Farm. Alli. Sci. 2, 579–581.
- 42. **Hou** W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C. (2007) Effect of copper and cadmium on heavy metal polluted water body restoration by duckweed (Lemna minor). Plant Physiol Biochem 45:62–69.
- 43. **Hsu** Y.T., Kao C.H. (2007) Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Soil 298:231–241.
- 44. Jäger K., Bartók T., Ördög V., & Barnabás B. (2010). Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. S. Afr. J. Bot. 76:511–516.

- 45. Jan R., Khan M.A., Asaf S., Lubna N., Lee I.J., Kim K.M. (2019) Metal resistant endophytic bacteria reduces cadmium, nickel toxicity, and enhances expression of metal stress related genes with improved growth of Oryza sativa, via regulating its antioxidant machinery and endogenous hormones. Plants 8:363.
- Janik E., Maksymiec W., Mazur R., Garstka M., Gruszecki W.I. (2010) Structural and functional modifications of the major light-harvesting complex II in cadmiumor copper-treated Secale cereale. Plant Cell Physiol. 51 (8):1330–1340.
- 47. Ji L., Xie S., Feng J. L. Y. & Chen L. (2012) Heavy metal uptakecapacities by the common freshwater green alga Cladophora fracta. J. Appl. Phycol. 24:979–983.
- 48. **Jiang** X., Li F., Wang T., Peng C., Wang F., Wu F., Wang X. (2012) Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells. Plant J. 72:768–780.
- 49. **Joliot** P. & Joliot A., (1968) A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill reagent by isolated chloroplasts. BBA 153:625–634.
- 50. Khan M.I.R., Fatma M., Per T.S., Anjum N.A., Khan N.A. (2015) Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. Review. Front. Plant Sci. 6:462.
- 51. Khan W., Prithiviraj B., Smith D.L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates, J. Plant Physiol., 160:485–492.
- 52. **Khodary** S.E.A. (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in saltstressed maize plants, Intl. J. Agri. Biol., 6(1):5–8.
- Kitajima M., Butler W. (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochim Biophys Acta 376:105–115.
- Klughammer C. & Schreiber U. (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm. Planta 192, 261–268.
- Kocheva K., Nenova V., Karceva T., Petrov P., Georgiev G.I., Borner A., Landjeva S. (2014) Changes in water status, membrane stability and antioxidant capacity of wheat seedlings carrying different Rht-B1 dwarfing alleles under drought stress. J. Agron. Crop Sci. 200, 83–91.
- 56. **Kok** B., Forbush B., McGloin M. (1970) Co-operation of charges in photosynthetic O2 evolution. I. A linear four step mechanism. Photochem. Photobiol. 11:457–475.
- Kowalczyk K., Zielony T., Gajewski M. (2008) Effect of aminoplant and asahi on yield and quality of lettuce grown on rockwool. In Biostimulators in Modern Agriculture. Vegetable Crop; Dabrowski, Z.T., Ed.; Wies´ Jutra: Warsaw, Poland, 35–43.
- Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. J Plant Physiol. 165:920–931.
- Krause G.H., Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 42, 313–349.
- 60. Kumar S., C. Kumar, B. Bandana (2010) Effects of salicylic acid on seedling growth and nitrogen metabolism in cucumber (Cucumis sativus L.), J. Stress Physiol. Biochem., 6(3):102–113.
- 61. Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148, 350–382.
- 62. Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Knapp M. (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. Photosynthetica 43:379–393.
- Lin X., Mou R., Cao Z., Xu P., Wu X., Zhu Z., Chen M. (2016) Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains. Sci. Total Environ. 569–570:97–104.
- Liu J., Li K., Xu J., Liang J., Lu X., Yang J., Zhu Q. (2003) Interaction of Cd and five mineral nutrients for uptake and accumulation in different rice cultivars and genotypes. Field Crop. Res., 83:271–281.
- 65. Liu L., Sun H., Chen J., Zhang Y., Li D., Li C. (2014) Effects of cadmium (Cd) on seedling growth traits and photosynthesis parameters in cotton (Gossypium hirsutum L.). Plant Omics 7:284–290.
- Lu Q., Zhang T., Zhang W., Su C., Yang Y., Hu D., Xu Q. (2018) Alleviation of cadmium toxicity in Lemna minor by exogenous salicylic acid. Ecotoxicol Environ Saf 147:500–508.
- 67. Lysenko E.A., Klaus A.A., Pshybytko N.L., Kusnetsov V.V. (2015) Cadmium accumulation in chloroplasts and its impact on chloroplastic processes in barley and maize. Photosynth. Res. 125, 291–303.
- 68. **Maksymiec** W., Krupa Z. (2006) The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in Arabidopsis thaliana. Environ Exp Bot 57:187–194.
- 69. Maslenkova L., Peeva V., Stojnova Z., Popova L. (2009) Salicylic acid-induced changes in photosystem II reactions in barley plants. Biotechnol. Biotechnol. Eq. 23:297–300.
- Maurya R., Prasad S.M., Gopal R. (2008) LIF technique offers the potential for the detection of cadmium-induced alteration in photosynthetic activities of Zea Mays L. J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev. 9, 29–35.
- 71. **Maxwell** P.C., Biggins J. (1976) Role of cyclic electron transport in photosynthesis as measured by the photoinduced turnover of P700 in vivo. Biochemistry 15(18):3975–3981.
- 72. Mehta S.K. & Gaur J.P. (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 25:113–152.
- Mesnoua M., Mateos-Naranjo E., Barcia-Piedras J.M., Perez-Romero J.A., Lotmani B., Redondo-Gomez S. (2016) Physiological and biochemical mechanisms preventing Cd-toxicity in the hyperaccumulator Atriplex halimus L. Plant Physiol. Biochem. 106:30–38.
- 74. **Metwally** A., Finkemeier I., George M., Dietz K. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings, Plant Physiol., 132(1):272–281.

- 75. **Mishra** A., Choudhuri M.A. (1999) Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane degradation mediated by lipoxygenase in rice, Biol. Plant, 42:409–415.
- Moravcová Tůma, J., Dučaiová Z.K., Waligórski P., Kula M., Saja D., Słomka A., Bąba W., Libik-Konieczny M. (2018) Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of Zea mays plants under copper stress. Plant Physiol. Biochem. 122:19–30.
- 77. Moussa H.R., El-Gamal S.M., (2010) Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat. Biol. Plantarum, 54:315–320.
- Munekage Y., Hashimoto M., Miyake C., Tomizawa K., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis, Nature, 429(6991):579–582.
- 79. **Munne-Bosch** S., Shikanai T., Asada K. (2005) Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and a-tocopherol quinone accumulation in water-stressed ndhB -inactivated tobacco mutants. Planta 222:502–511.
- Nirmal J.I.K. & Oommen C. (2012) Removal of heavy metals by biosorption using freshwater alga Spirogyra hyaline. J. Environ. Biol. 33, 27–31.
- Pancheva T., Popova L., Uzunova A. (1996) Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants, J. Plant Physiol., 149(1-2):57–63.
- 82. **Parmar** P., Kumari N., Sharma V. (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. Bot Studies 54:45–51.
- Perez-Romero J.A., Redondo-Gomez S., Mateos-Naranjo E. (2016) Growth and photosynthetic limitation analysis of the Cd-accumulator Salicornia ramosissima under excessive cadmium concentrations and optimum salinity conditions. Plant Physiol. Biochem. 109, 103–113.
- 84. **Popova** L.P., Maslenkova L.T., Yordanova R.Y., Ivanova A.P., Krantev A.P., Szalai G., Janda T. (2009) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. Plant Physiol Biochem 47:224–231.
- Rashkov G.D., Dobrikova A.G., Pouneva I.D., Misra A.N., Apostolova E.L. (2012) Sensitivity of Chlorella vulgaris to herbicides. Possibility of using it as a biological receptor in biosensors. Sens. Actuators B Chem. 161, 151–155.
- 86. **Renuka** N., Guldhe A., Prasanna R., Singh P. and Bux F. (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. Biotechnol. Adv. 36:1255–1273.
- Rivas-San Vicente M., Plasencia J. (2011) Salicilic acid beyond defence: its role in plant growth and development. J. Exp. Bot. 62:3321–3338.
- Robert-Seilaniantz A., Bari R., Jones J.D.G. (2010) A biotic or abiotic stress? In: Pareek, A., Sopory, S.K., Bohnert, H., Govindjee (Eds.), Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological. Molecular and Genomic Foundation, Springer, 103–122.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pazmino D.M., Testillano P.S., Risueno M.C., Del Rio L.A. et al. (2009) Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. Plant Physiol 150:229–243.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Zabalza A., Corpas F.J. Gómez M., Del Río L.A. et al. (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (Pisum sativum L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. Plant Cell Environ 29:1532–1544.
- 91. Rohaćêk K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic measuring and mutual relationships. Photosynthetica 40:13–29.
- Sahu G.K., Kar M., Sabat S.C. (2002) Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid. Plant Biol, 4, 321–328.
- Saville R.J., Gosman N., Burt C.J., Makepeace J., Steed A., Corbitt M., Chandler E., Brown J.K.M., Boulton M.I., Nicholson P. (2012) The 'Green Revolution' dwarfing genes play a role in disease resistance in Triticum aestivum and Hordeum vulgare. J. Exp. Bot. 63, 1271–1283.
- 94. Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth Res 10:51–62.
- 95. Schützendübel A., Nikolova P., Rudolf C., Polle A. (2002) Cadmium and H2O2-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. Plant Physiol Biochem 40:577–584.
- 96. **Shakirova** F., Sakhabutdinova A., Bezrukova M., Fatkhutdinova R., Fatkhutdinova D. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity, Plant Sci., 164: 317–322.
- 97. **Siedlecka** A., Baszynsk, T. (1993) Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. Physiol. Plant 87:199–202.
- Sigfridsson K.G.V., Bernat G., Mamedov F., Styring S. (2004) Molecular interference of Cd2+ with Photosystem II. Biochim Biophys Acta 1659:19–31.
- 99. Singh A.P., Dixit G., Kumar A., Mishra S., Kumar N. et al. (2017) A protective role for nitric oxide and salicylic acid for arsenite phytotoxicity in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Physiol Biochem 115:163–173.
- 100. Singh S., Eapen S., Souza S.F.D. (2006) Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. Chemosphere 62:233–246.
- 101. **Stirk** W.A., Ördög V., Novák O., Rolèík J., Strnad M., Bálint P., Staden J. (2013) Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. J. Phycol., 49:459–467.
- 102. Stoichkova K., Busheva M., Apostolova E., Andreeva A. (2006) Changes in the energy distribution in mutant thylakoid membranes of pea with modified pigment content II. Changes due to magnesium ions concentration. J Photochem Photobiol B 83:11–20.

- 103. Szalai G., Tajti J., Hamow K.Á., Ildikó D., Khalil R., Vanková R., Dobrev P., Svetlana P., Misheva S., Janda T., Pál M. (2020) Molecular background of cadmium tolerance in Rht dwarf wheat mutant is related to a metabolic shift from proline and polyamine to phytochelatin synthesis. Environ Sci Pollut Res.
- 104. Takahashi S., Milward S.E., Fan D.Y., Chow W.S., Badger M.R. (2009) How does cyclic electron flow alleviate photoinhibition in Arabidopsis? Plant Physiol. 149:1560–1567.
- 105. Tamas L., Mistrik I., Alemayehu A., Zelinova V., Bocova B., Huttova J. (2015) Salicylic acid alleviates cadmiuminduced stress responses through the inhibition of Cd-induced auxin-mediated reactive oxygen species production in barley root tips. J Plant Physiol 173:1–8.
- 106. Tang Y., X. Sun, T. Wen, M. Liu, M. Yang, X. Chen (2017) Implications of terminal oxidase function in regulation of salicylic acid on soybean seedling photosynthetic performance under water stress, Plant Physiol. Biochem. 112:19–28.
- Tran T.A., Popova L. (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. Turk. J. Bot. 37, 1–13.
- 108. **Tripathi** R.D., Dwivedi S., Shukla M.K., Mishra S., Srivastava S., Singh R., Rai U.N., Gupta D.K. (2008) Role of blue green algae biofertiliser in ameliorating the nitrogen demand and fly-ash stress to the growth and yield of rice (Oryza sativa L.) plants. Chemosphere 70:1919–1929.
- 109. Vassilev A., Lidon F., Scotti P., Da Graca M., Yordanov I. (2004) Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants. Biol Plant 48:153–156.
- 110. Vestena S., Cambraia J., Ribeiro C., Oliveira J.A., Oliva M.A. (2011) Cadmium induced oxidative stress and antioxidative enzyme response in Water Hyacinth and Salvinia. Braz J Plant Physiol 23:131–139.
- 111. **Wang** Q., Liang X., Dong Y., Linlin Xu, Zhang Xiuwei, Kong Jing, Liu Shuang et al. (2013b) Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on physiological characteristics of perennial ryegrass under cadmium stress. J Plant Growth Regul 32:721–731.
- 112. Wang X., Zhang Z.W., Tu S.H., Feng W.Q., Xu F., Zhu F., et al. (2013a) Comparative study of four rice cultivars with different levels of cadmium tolerance. Biologia 68:74–81.
- 113. Wang Y., Qian Y., Hu H., Xu Y., Zhang H. (2011) Comparative proteomic analysis of Cd-responsive proteins in wheat roots. Acta Physiologiae Plantarum 33(2):349–357.
- Waseem M., Athar H., Farooq M. (2006) Effect of salicylic acid applied through rooting medium on drought tolerance of wheat, Pak. J. Bot., 38(4):1127–1136.
- 115. Wen W., Deng Q., Jia H., Wei L., Wei J., Wang H., Yang L., Cao W., Ma Z. (2013) Sequence variations of the partially dominant della gene Rht-B1c in wheat and their functional impacts. J. Exp. Bot. 64:3299–3312.
- 116. Wodala B., Eitel G., Gyula T.N., Ordog A., Horvath F. (2012) Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P700 absorbance in pea leaves. Photosynthetica 50:380–386.
- 117. Xu J., Wang W.Y., Yin H.X., Liu X.J., Sun H., Mi Q. (2010) Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of Medicago truncatula seedlings under cadmium stress. Plant Soil 326:321–330.
- 118. Xue X.C., Gao H.Y., Zhang L.T. (2013) Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. Biol Plant 57:587–590.
- Yilmaz D.D., Parlak K.U. (2011) Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in Groenlandia densa under cadmium stress. Ecol Indic 11:417–423.
- 120. Yordanova R., Popova L. (2007) Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. Gen Appl Plant Physiol, 33: 155–170.
- 121. Young A.J., Britton G. (1990) Carotenoids and oxidative stress. In: Baltscheffsky, M. (Ed.), Current Research in Photosynthesis. Kluwer, Dordrecht, 587–590.
- 122. Zeinalov Y. & Maslenkova L. (1996) Mechanisms of photosynthetic oxygen evolution, in: Pessarakli M. (Eds.), Handbook of Photosynthesis. New York, Marcel Dekker, 129-150.
- 123. Zeinalov Y. (2002) Equipment for investigations of photosynthetic oxygen production reactions, Bulg. J. Plant Physiol. 28: 57-67.
- 124. Zeinalov Y. (2005) Mechanisms of photosynthetic oxygen evolution and fundamental hypotheses of photosynthesis, in: M. Pessarakli (Ed.), Handbook of Photosyntesis, second ed., CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 129-150.
- 125. Zeinalov Y. (2010) Photosynthesis Behind the Fundamental Concepts. LAP Lambert Academic Publishing AG & Co. KG, Saarbrücken.
- 126. **Zhang** J., Wang X., Zhou Q. (2017) Co-cultivation of *Chlorella spp* and tomato in a hydroponic system. Biomass. Bioenergy 97:132–138.
- 127. Zhao F.Y., Han M.M., Zhang S.Y., Wang K., Zhang C.R., Liu T. et al. (2012) Hydrogen peroxide-mediated growth of the root system occurs via auxin signaling modification and variations in the expression of cell-cycle genes in rice seedlings exposed to cadmium stress. J Integr Plant Biol 54:991–1006.
- 128. Zhu D., Ke X., Wu L., Li Z., Christie P., Luo Y. (2016a) Ecotoxicity of cadmium in a soil collembolan-predatory mite food chain: can we use the15 N labeled litter addition method to assess soil functional change? Environ. Pollut. 219:37– 48.
- 129. Zhu J., Wang W.S., Ma D., Zhang L.Y., Ren F., Yuan T.T. (2016b) A role for CK2 b subunit 4 in the regulation of plant growth, cadmium accumulation and H2O2 content under cadmium stress in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. Biochem. 109, 240–247.
- 130. Zodape S.T. (2001) Seaweeds as a bio-fertilizer. J. Sci. Ind. Res., 60:378–82.

### Публикации

**1.** <u>E. K. Yotsova</u>, A. G. Dobrikova, M. A. Stefanov, M. Kouzmanova, E. L. Apostolova, "Improvement of the rice photosynthetic apparatus defence under cadmium stress modulated by salicylic acid supply to roots", Theoretical and Experimental Plant Physiology, 30, 57-70, 2018.

### IF = 1.532, Q2

### Цитирания:

- B. Guo, C. Liu, Y. Liang, N. Li, Q. Fu (2019) Salicylic acid signals plant defence against cadmium toxicity. Int. J. Mol. Sci. 20, 2960; doi:10.3390/ijms20122960
- 2. A.S. Bali, G.P.S. Sidhu, V. Kumar, R. Bhardwaj (2019) Mitigating Cadmium Toxicity in Plants by Phytohormones. Chapter 15, In: Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation, 1st Edition (Eds. M. Hasanuzzaman, M.N.V. Prasad, M. Fujita), Elsevier, pp. 275-298.

**2.** <u>E. K. Yotsova</u>, A. G. Dobrikova, M. A. Stefanov, E. L. Apostolova, "Impact of salicylic acid on the growth and the activity of photosynthetic apparatus in rice under non-stress conditions", Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 71, 368-375, 2017.

### IF = 0.321, Q2

### Цитирания:

 Khatun M. (2018) Exogenous application of salicylic acid on mitigation of drought stress of BRRI Dhan28. Master's Thesis, The Faculty of Agriculture Sher-e-Bangla, Agricultural University, Dhaka – www.saulibrary.edu.bd

**3.** A.G. Dobrikova, <u>E. K. Yotsova</u>, A. Börner, S. Landjeva, E. L. Apostolova, "The wheat mutant DELLAencoding gene (Rht-B1c) affects plant photosynthetic responses to cadmium stress", Plant Physiology and Biochemistry, 114, 10-18, 2017.

### IF = 3.404, Q1

### Цитирания:

- **4.** Jobson E. M., Johnston R. E., Oiestad A. J., Martin J. M. & Giroux M. J. (2019) The Impact of the Wheat *Rht-B1b* Semi-Dwarfing Allele on Photosynthesis and Seed Development Under Field Conditions. Frontiers in Plant Science, 10.
- 5. Yan Y.-Y., Yang B., Lan X.-Y., Li X.-Y., Xu F.-L. (2019) Cadmium accumulation capacity and resistance strategies of a cadmium-hypertolerant fern Microsorum fortunei, Science of the Total Environment 649, pp. 1209-1223.
- 6. Zaid I.U., Zheng X., Li X. (2018) Breeding low-cadmium wheat: Progress and perspectives, Agronomy 8(11).
- 7. Xu Z., Ge Y., Zhang W., Zhao Y., Yang G. (2018) The walnut *JrVHAG1* gene is involved in cadmium stress response through ABA-signal pathway and MYB transcription regulation, BMC Plant Biology 18(1), 19.
- **8.** Mishra B., Chand S., Sangwan N.S. (2019) ROS management is mediated by ascorbate-glutathione-α-tocopherol triad in co-ordination with secondary metabolic pathway under cadmium stress in *Withania somnifera*. *Plant Physiol. Biochem.* 139: 620-629.
- 9. Talaat N.B. (2019) Abiotic stresses-induced physiological alteration in wheat. In: *Wheat Production in Changing Environments* (Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain M. Eds.), pp. 1-30. Springer, ISBN: 978-981-13-6883-7.
- Kralova K., Masarovičová E., Jampilek J. (2019) Plant responses to stress induced by toxic metals and their nanoforms. Chapter 25, In book: *Handbook of Plant and Crop Stress* (Ed. M. Pessarakli), 4th Edition, Boca Raton-CRC Press, pp.479-522.
- **11.** Xu S., He X.Y., Du Z., Chen W., Li B., Li Y., Li M.H., Schaub M. (2020) Tropospheric ozone and cadmium do not have interactive effects on growth, photosynthesis and mineral nutrients of *Catalpa ovata* seedlings in the urban areas of Northeast China. *Sci. Total Environ.* 704:135307.
- 12. Pilarska M., Niewiadomska E., Sychta K., Słomka A. (2020) Differences in the functioning of photosynthetic electron transport between metallicolous and non-metallicolous populations of the pseudometallophyte *Viola tricolor. J. Plant Physiology*, online, https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153185.

### Участие в проекти свързани с дисертационния труд

Ефект на *Chlorella vulgaris* върху фотосинтетичния апарат на оризови растения в условия на кадмиев стрес, Програма за подпомагане на младите учени в БАН, ДФНП-137/12.05.2016, Научен ръководител: Екатерина Йоцова – докторант, Научен консултант: проф. д-р Емилия Апостолова

#### Учатие в научни мероприятия

- 1. <u>E. Yotsova</u>, A. Dobrikova, M. Stefanov, M. Kouzmanova, E. Apostolova, Influence of *Chlorella vulgaris* on the photosynthetic apparatus of rice plants under cadmium stress, The 43<sup>rd</sup> FEBS Congress held in Prague Congress Centre, 7-12 July 2018, Prague, Czech Republic (poster № P,06-001-Mon).
- 2. <u>E. Yotsova</u>, A. Dobrikova, M. Stefanov, M. Kouzmanova, E. Apostolova, **Influence of** *Chlorella vulgaris* **on the photosynthetic apparatus of rice plants under cadmium stress**, The 18<sup>th</sup> FEBS Young Scientists' Forum (YSF), held in Park Inn Hotel, Prague, 4–7 July 2018, Prague, Czech Republic (**oral presentation, abstract № 13, Symposium 3**).
- 3. <u>E. Yotsova</u>, M. Stefanov, A. Dobrikova, E. Apostolova, **Regulatory effect of salicylic acid on the photosynthetic activity** of rice plants under physiological conditions, Scientific session "Biomedicine and Quality of Life Youth in Science". 26-27 June 2017, IBPhBME BAS, Sofia, Bulgaria (oral presentation).
- <u>E. Yotsova</u>, A. Dobrikova, M. Stefanov, E. Apostolova, Effect of salicylic acid on Photosystem II in rice plants, Session II: Plant Nutrition: Physiology and Mechanism, VISCEA International Conference "Plant Nutrition, Growth & Environment Interactions III", 20-21 February, 2017, Vienna, Austria (oral presentation)
- <u>E. Yotsova</u>, A. Dobrikova, M. Stefanov, E. Apostolova, Effect of exogenous salicylic acid on rice plants under cadmium stress at non-stress conditions, VISCEA International Conference "Plant Molecular Physiology", 23-24 February, 2017, Vienna, Austria (poster № 8)
- 6. <u>E. Yotsova</u>, S. Landjeva, E. Apostolova, A. Dobrikova, **Investigations of the sensitivity to cadmium stress in two wheat** genotypes, Seminar of Ecology 2016 with international participation, 21-22 April 2016, Sofia, Bulgaria (oral presentation № L04\_04)