

КОЛЬО ГЕОРГИЕВ ДАНКОВ

**РОЛЯ НА ОРГАНИЗАЦИЯТА НА ФОТОСИНТЕТИЧНИЯ АПАРАТ ЗА  
УСТОЙЧИВОСТТА МУ КЪМ ТЕМПЕРАТУРЕН И СВЕТЛИНЕН СТРЕС**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертация  
за присъждане на научната и образователна степен  
“Доктор”

Професионално направление Биологични науки, шифър 4.3 (стар  
шифър 01.06.08 - Биофизика)

*Научен ръководител:*  
доц. д-р Емилия Апостолова

*Рецензенти:*  
проф. д.б.н. Юли Занев  
проф. д.б.н. Милка Сеченска

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на 30.05.2011 от разширен семинар на секция „Фотовъзбудими мембрани” към Институт по Биофизика и Биомедицинско инженерство, Българска Академия на Науките.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 30.09.2011 г. от 11:00 часа в заседателната зала на ИФРГ, ул. Акад. Г. Бончев”, бл. 21, София.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ, БАН, ул. Акад. Г. Бончев”, бл. 105, София.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И ОЗНАЧЕНИЯ:

---

A	амплитуда на кислородното отделяне при непрекъснато осветяване
ДГДГ	дигалактозил диацилглицерол
ЕТВ	електрон-транспортна верига
Кар	каротиноиди
КОС	кислород отделяща система
МГДГ	моногалактозил диацилглицерол
НАДФ	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НКС	намалено каротиноидно съдържание
ПБК	пигмент-белтъчни комплекси
РЦ	реакционен център
ССКІ	светосъбиращ комплекс на ФСІ
ССКІІ	светосъбиращ комплекс на ФСІІ
СХДГ	сулфохиновозил диацилглицерол
ТМ	тилакоидна мембрана
ФГ	фосфатидилглицерол
Фео	феофитин
ФСА	фотосинтетичен апарат
ФСІ	фотосистема І
ФСІІ	фотосистема ІІ
Хл <i>a</i>	хлорофил <i>a</i>
Хл <i>b</i>	хлорофил <i>b</i>
$\Phi_{P_o}$	максимален квантов добив на фотохимията на ФСІІ в DAS
$\Phi_{P_o}'$	максимален квантов добив на фотохимията на ФСІІ в LAS
$\Phi_{P_s}'$	действителен квантов добив на фотохимията на ФСІІ в LAS
DAS	тъмнинно адаптирано състояние
$F_m$	максимална хлорофилна флуоресценция в DAS
$F_m'$	максимална хлорофилна флуоресценция в LAS
$F_o$	минимална хлорофилна флуоресценция в DAS
$F_o'$	минимална хлорофилна флуоресценция в LAS
$F_s'$	стационарно ниво на хлорофилна флуоресценция в LAS
$F_v$	вариабилна флуоресценция в DAS
$F_v'$	вариабилна флуоресценция в LAS
LAS	светлинно адаптирано състояние
NPQ	нефотохимично гасене на максималната хлорофилна флуоресценция
$P_{700}$	фотохимично активен димер на хлорофил <i>a</i> в РЦ на ФСІ
$q'_p$	коефициент на фотохимично гасене
$Q_A$ и $Q_B$	първичен и вторичен хионов акцептор на електрони във ФСІІ
$R_{o/m}$	отношение на олигомерна към мономерна форма на ССКІІ
$S_i$	редокс-състояние на КОС
$V_s'$	относителна вариабилна флуоресценция в светлинно адаптирано състояние
$Y_3$	амплитуда на кислородно отделяне след третата светкавица

---

## УВОД

Фотосинтетичният апарат на висшите растения е сложно устроен многокомпонентен комплекс, в чието изграждане участват пигментни, белтъчни и липидни молекули. Той е разположен в специализирани органели, наречени хлоропласти. Пигмент-белтъчните комплекси, участващи в процеса на фотосинтеза са разположени в тилакоидната мембрана. Тя представлява силно нагъната вътрешна мембранна система намираща се в хлоропласта, която претърпява динамична реорганизация при промяна на условията на околната среда. Структурната организация на тилакоидната мембрана позволява оптималното функциониране на фотосинтетичния апарат при различни температурни и светлинни условия. Формирането на макрокомплекси и тяхното специфично разпределение и групиране в различните участъци на тилакоидната мембрана е основен фактор, от който зависи устойчивостта на фотосинтетичния апарат към промените на околната среда. Фотосинтетичният апарат има способността да се адаптира към краткотрайни промени в температурните и светлинните условия на околната среда. По-продължителни и по-големи изменения в абиотичните фактори водят до нарушаване на нормалното му функциониране. През последните години усилията на много изследователи са насочени към изучаване на връзката между структурната организация на фотосинтетичния апарат и механизмите за адаптация на растенията към различни стресови фактори.

В настоящата работа са изследвани линии от грах (диви типове и мутанти) с различно съотношение на олигомерните към мономерните форми на светосъбиращия комплекс на фотосистема II и различен липиден състав, както и растения с намалена биосинтеза на каротиноидните пигменти. С помощта на биофизични и биохимични методи е изследвана връзката между организацията на фотосинтетичния апарат и промените настъпващи във функционалната му активност след въздействие със светлина с висок интензитет, високи температури и замразяване. Представените в дисертационния труд резултати дават важна информация за ролята на степента на олигомеризация на светосъбиращия комплекс на фотосистема II, липидния състав и количеството на каротиноидите в тилакоидната мембрана за температурната стабилност и чувствителността на фотосинтетичния апарат към светлина с висок интензитет.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Молекулните механизми на фотосинтетичните процеси са обект на непрекъснато засилващ се интерес. Оптималната активност на фотосинтетичния апарат зависи от ефективната абсорбция на светлината и регулирането на енергетичния пренос към реакционните центрове, което се осъществява от светосъбиращите комплекси. Изследванията на фотосинтетичните мембрани през последните години показват, че те се характеризират с динамични промени, включващи изменения в структурата им, техния състав и функции под въздействие на условията на околната среда. Интерес представлява влиянието на промените в структурната организация на пигмент-белтъчните комплекси, липидния и каротиноиден състав върху функционалната активност на фотосинтетичния апарат, както и ролята им в процеса на адаптация на фотосинтезиращите организми към разнообразните условия в природата.

Целта на настоящата работа е да се изясни ролята на структурната организация на пигмент-белтъчните комплекси (по-специално на светосъбиращ комплекс II, ССКII), липидния и каротиноидния състав на тилакоидната мембрана за устойчивостта на фотосинтетичния апарат към температурен и светлинен стрес. За осъществяване на тази цел бяха поставени следните конкретни задачи:

1. Да се характеризира функционалната активност на фотосинтетичния апарат при растения от грах, с различна степен на намаление на каротиноидното съдържание.
2. Да се изследва липидния състав на тилакоидни мембрани изолирани от мутантни линии на грах, характеризиращи се с различно количество и организация на ССКII.
3. Да се характеризира температурната стабилност на тилакоидни мембрани с намалено съдържание на каротиноиди.
4. Да се изследва ролята на процеса замразяване-размразяване върху функциите на тилакоидни мембрани с различна организация на ССКII, изолирани от мутантни линии на грах.
5. Да се проследят промените във функциите на фотосинтетичния апарат на растения от грах с различна организация на ССКII, при въздействие със светлина с висок интензитет и по време на тяхното възстановяване след прекратяване на светлинното третиране.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Експериментални обекти

В настоящото изследване бяха използвани растения от грах от сортовете Ran, Auralia и Borec, както и мутантни линии на дивите типове Auralia (*Chlorotica XV/1422*) и Borec (*Costata 2/133*, и *Coeruleovireus 2/16*). Граховите растения от дивите типове Borec и Auralia и техните мутантни линии *Costata 2/133*, *Coeruleovireus 2/16* и *Chlorotica XV/1422* имат различно отношение на хетеротримерните към мономерните форми на ССКП ( $R_{o/m}$ ). Отношението нараства в следния ред: *Chlorotica XV/1422* ( $R_{o/m} = 2.45$ ), Auralia див тип ( $R_{o/m} = 2.82$ ), *Costata 2/133* ( $R_{o/m} = 3.34$ ), Borec див тип ( $R_{o/m} = 4.57$ ) и *Coeruleovireus 2/16* ( $R_{o/m} = 6.62$ ) (Apostolova et al., 2006; Dobrikova et al., 2000; Dobrikova et al., 2001).

### Използвани методи

**Третиране с флуридон.** Растения от *Pisum sativum* L. cv. Ran са отглеждани в присъствието на различни концентрации на хербицида флуридон (1-метил-3-фенил-5-(3-трифлуорометилфенил)-4-(1H)-пиридон).

**Третиране с линкомицин.** Откъснати листа от грахови растения са поставяни в петри с 10 mM воден разтвор на линкомицин при слаба светлина ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ ) за 120 мин, преди прилагането на светлинен стрес.

**Изолиране на тилакоидни мембрани.** Тилакоидните мембрани са изолирани по методите на Harrison and Mellis (1992) при всички експерименти с изолирани ТМ, с изключение на експериментите за влияние на замразяването, където ТМ са изолирани по метода на Steinback et al. (1979).

**Количествено определяне на пигментите.** Пигментите са екстрахирани с 80% ацетон. Хлорофил *a* (Хл *a*), Хлорофил *b* (Хл *b*) и каротиноидите (Кар) са определяни спектрофотометрично по метода на Lichtenthaler (1987).

**Нискотемпературна (77К) хлорофилна флуоресценция.** Нискотемпературните спектри на хлорофилна флуоресценция на изолирани тилакоидни мембрани са записани с помоща на спектрофлуориметър Jobin Yvon JY3, снабден с приспособление за измервания в течен азот.

**Импулсно модулирана хлорофилна флуоресценция.** Импулсно модулираната хлорофилна флуоресценция е измерена на листни дискове при стайна температура с флуориметър (РАМ 101-103, Walz, Effeltrich, Germany). Използвайки стойностите на флуоресцентните нива са изчислени следните параметри: максимален квантов добив на първичната фотохимия на ФСII в тъмнинно адаптирано състояние  $\Phi_{P_0}=(F_m-F_0)/F_m=F_v/F_m$ ; коефициент на фотохимично гасене  $q'_p=(F'_m-F'_s)/(F'_m-F'_0)$ ; нефотохимично гасене на максималната флуоресценция  $NPQ=(F_m-F'_m)/F'_m$ ; максимален квантов добив на

първичната фотохимия на ФСII в светлинно адаптирано състояние  $\Phi_{P_0}' = F_v'/F_m'$ ; действителен квантов добив на първична фотохимия на ФСII в светлинно адаптирано състояние  $\Phi_{P_s}' = (F_m' - F_s')/F_m'$ ; относителната вариабилна флуоресценция в светлинно адаптирано състояние  $V_s' = 1 - q_p' = (F_s' - F_0')/(F_m' - F_0')$ , (Baker, 2008).

**Измерване на редокс-състоянието на  $P_{700}$ .** Изменението на окислително-редукционното състояние на  $P_{700}$  е проследено чрез измерване на абсорбционните изменения на първичния донор на РЦ на ФСI,  $P_{700}$ . За измерването е използвана емитер-детекторната система Walz ED 700DW-E, свързана с РАМ 101 единицата на РАМ флуориметъра.

**ФСI-зависим електронен транспорт.** Фотохимичната активност на ФСI е определяна чрез измерване на кислородното поглъщане при реакцията на Мелер. Използван е кларков електрод (Model DW1, Hansatech Instruments Ltd King's Lynn, Norfolk).

**ФСII-зависим електронен транспорт.** ФСII-зависимият електронен транспорт е определян чрез измерване на кислородното отделяне при реакцията на Хил с помощта на кларков електрод (Model DW1, Hansatech Instruments Ltd King's Lynn, Norfolk).

**Светкавични кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване. Параметри по модела на Кок.** Светкавичните кислородни добиви на суспензията от изолирани ТМ са измервани със скоростен полярографски електрод (Joliot and Joliot, 1968, Zeinalov, 2002). Параметрите от модела на Кок (Kok et al., 1970): дял на центровете в  $S_0$  състояние на тъмно, загуби ( $\alpha$ ) и двойни попадения ( $\beta$ ) са определени чрез компютърна програма за намиране на минимална сума от квадратите на отклоненията между експерименталните данни и теоретично изчислените по модела на Кок (Zeinalov, 2002).

**Замразяване на изолирани ТМ.** Пробите са замразявани за 24 часа при температура  $-20^\circ\text{C}$  и впоследствие размразявани на водна баня при  $20^\circ\text{C}$ .

**Светлинно третиране на листа.** Листа от 14 дневни грахови растения са осветявани за различни периоди от време при стайна температура с бяла светлина с интензитет  $1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ .

**Светлинно третиране на изолирани ТМ.** Изолирани ТМ са подложени на светлинно третиране с различна продължителност при стайна температура с бяла светлина с интензитет  $1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ .

**Температурно третиране на изолирани ТМ.** ТМ изолирани от листа на грах са подложени на температурен стрес с продължителност 5 мин на водна баня, при температури в диапазона  $20-50^\circ\text{C}$  на тъмно.

**Определяне на липидния състав на изследваните тилакоидни мембрани.** Липидният състав на ТМ изолирани от листа на 14 дневни грахови растения е определен с тънкослойна и газова хроматография по метода на Sato and Murata (1988).

**Статистическа обработка на резултатите.** Статистическата достоверност на наблюдаваните разлики между сравняваните стойности е оценена по теста на Стюдънт.

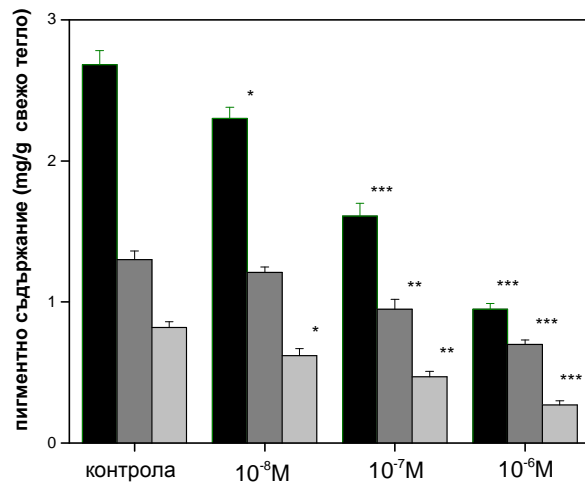
## РЕЗУЛТАТИ

### Функциониране на фотосинтетичния апарат при намалено съдържание на каротиноиди в тилакоидната мембрана

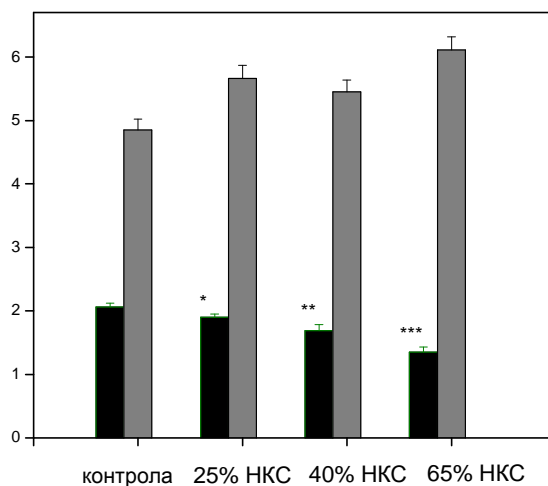
#### Флуридон-индуцирани изменения в пигментното съдържание

Каротиноидната биосинтеза е основното място в растителния метаболизъм, върху което действат обезцветяващите хербициди. Към тази група принадлежи хербицида флуридон, използван в настоящото изследване. Третирането с флуридон води до инхибиране на фитоендесатуразата, ензим катализиращ реакцията на превръщане фитоена във фитофлуен в биосинтетичния път на каротиноидите. Анализът, който проведохме на пигментното съдържание на листа от грах след третиране с флуридон показва, че в резултат на инхибирането на каротиноидната биосинтеза намалява съдържанието, както на каротиноидите, така и на хлорофила. Изследвано беше пигментното съдържание при третиране на растенията с три различни концентрации на флуридон. Най-много намаляват каротиноидите, по-малко е намалението на Хл *a* и най-малко на Хл *b* и при трите използвани концентрации на хербицида (фиг. 1). При най-високата използвана концентрация на флуридона ( $10^{-6}$ М) количеството на Хл *b* намалява с 46%, на Хл *a* с 65%, докато количеството на каротиноидите намалява с 67%, което води до нарастване на отношението Хл/Кар. От друга страна количеството на Хл. *a* намалява по-чувствително в сравнение с количеството на Хл *b*, което води до намаление на отношението Хл *a/b*. При  $10^{-6}$ М концентрация на хербицида измененията на отношението Хл *a/b* са по-големи от тези на отношението хлорофил към каротиноиди (фиг. 2). В зависимост от степента на намаление на каротиноидите в текста са въведени следните означения: НКС – намалено каротиноидно съдържание; 25% НКС съответства на 25% намаление на каротиноидното съдържание (третиране с  $10^{-8}$ М флуридон); 40% НКС съответства на 40% намаление на каротиноидното съдържание при третиране с  $10^{-7}$ М флуридон и 65% НКС съответства на 65% намаление на каротиноидното съдържание (третиране с  $10^{-6}$ М флуридон).





Фигура 1. Пигментно съдържание на листа от растения грах третиран с различни концентрации на флуридон. Черни стълбчета – Хл *a*, сиви – Хл *b*, светло сиви – каротиноиди. Средните стойности ( $\pm$  стандартна грешка) са от 5 независими експеримента. Означени са статистически достоверните разлики между стойностите на третиран и нетретиран растения (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).



Фигура 2. Отношение Хл *a*/Хл *b* (черни стълбчета) и хлорофил/каротиноиди (сиви стълбчета) на листа от растения грах третиран с различни концентрации на флуридон.

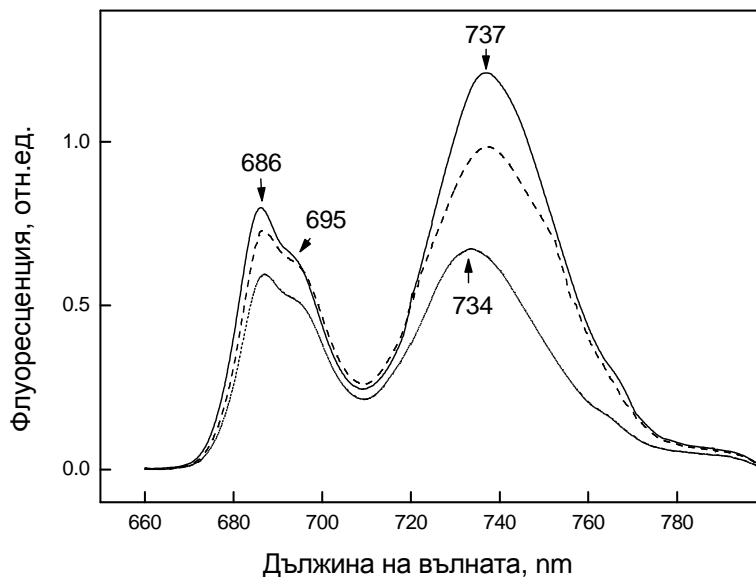
## Нискотемпературни (77К) флуоресцентни емисионни спектри на тилакоидни мембрани с различно каротиноидно съдържание

Ефектът на намаленото пигментно съдържание върху флуоресцентните характеристики на фотосинтетичния апарат беше изследван с помощта на 77К

хлорофилна флуоресценция на изолирани ТМ от растения третирани с  $10^{-8}$ М и  $10^{-7}$ М флуридон. Флуоресцентните емисионни спектри на ТМ при възбуждане на Хл *a* ( $\lambda_{exc}$  436 nm) са представени на фиг. 3. Спектрите на ТМ изолирани от нетретирани растения имат два ясно изразени максимума при 686 nm (F1) и 737 nm (F3) и рамо при 695 nm (F2). Анализът на флуоресцентните емисионни спектри показва, че при мембраните с променено количество на каротиноидните пигменти се повлиява интензитета на основните ивици на пигмент-белтъчните комплекси в ТМ (фиг. 3). Отношението между интензитетите на ивиците при използване на възбуждаща светлина с различна дължина на вълната (436 nm за Хл *a*, 472 nm за Хл *b* и 515 nm за възбуждане на каротиноидите) е представено на табл. 1. Флуоресцентното отношение F3/F1 отразява съотношението на флуоресценцията излъчена от ФСІ спрямо излъчваната от ФСІІ. F3/F1 намалява с 14-19% при по-ниската концентрация на флуридона ( $10^{-8}$ М) и с 30-34% при по-високата концентрация ( $10^{-7}$ М) за всички изследвани дължини на вълната на възбуждащата светлина. Максимумът на емисионната ивица на ФСІ при 734 nm е отместен с 3 nm към късовълновата област на спектъра в сравнение с нетретирани растения, при концентрация на флуридона от  $10^{-7}$ М (фиг. 3). Наблюдаваното отместване се наблюдава при възбуждане както на Хл *a*, така и на каротиноидите.

Таблица 1. Нискотемпературно (77К) флуоресцентно отношение на изолирани ТМ от нетретирани и флуридон третирани грахови растения. F1 – флуоресценция излъчена при 685 nm. F2 – флуоресценция излъчена при 695 nm и F3 – флуоресценцията излъчена при 737 nm за нетретирани и третирани с  $10^{-8}$  М флуридон растения и при 734 nm за растения третирани с  $10^{-7}$  М флуридон. Дадени са статистически достоверните разлики между стойностите за нетретирани и третирани растения (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001).

Концентрация на флуридона [М]	$\lambda_{exc}$	F3/F1	F2/F1
0	436 nm	1.44 ± 0.09	0.73 ± 0.04
	472 nm	1.25 ± 0.08	0.87 ± 0.02
	515 nm	1.74 ± 0.09	0.87 ± 0.04
$10^{-8}$	436 nm	1.24 ± 0.08	0.71 ± 0.02
	472 nm	1.07 ± 0.07	0.91 ± 0.04
	515 nm	1.41 ± 0.08*	0.89 ± 0.04
$10^{-7}$	436 nm	1.01 ± 0.07**	0.75 ± 0.02
	472 nm	0.88 ± 0.06**	0.99 ± 0.04*
	515 nm	1.15 ± 0.05***	0.96 ± 0.02*



Фигура 3. Ефект на намалението на каротиноидното съдържание върху 77К флуоресцентните емисионни спектри ( $\lambda_{exc}$  436 nm) на изолирани ТМ от нетретирани (непрекъсната линия) и третирани с различни концентрации флуридон растения:  $10^{-8}$ М флуридон (пунктирна линия) и  $10^{-7}$ М флуридон (точки). Спектрите са нормирани при 506 nm по флуоресцентния максимум на флуоресцеина.

### Влияние на намаленото каротиноидно съдържание върху параметрите на импулсно модулирана хлорофилна флуоресценция

Намалението на каротиноидите, индуцирано от третирането с флуридон, води до изменения на фотохимичните и нефотохимичните процеси протичащи във ФСII. Методът на импулсно модулираната хлорофилна флуоресценция беше използван за оценка на функционирането на фотосинтетичния апарат в условия на намалено съдържание на каротиноиди. Бяха изследвани промените в квантовите добиви в тъмнинно (DAS) и светлинно (LAS) адаптирано състояние, както и дисипацията на енергия чрез нефотохимични процеси във ФСА. В табл. 2 са представени флуоресцентните параметри за нетретирани растения и растения третирани с различна концентрация на флуридона. Максималният квантов добив на първичната фотохимия в DAS и в LAS ( $\Phi_{P_0}$  и  $\Phi_{P_0}'$ ), както и нефотохимичното гасене (NPQ) са повлияни при растения третирани с концентрации на флуридон по-високи от  $10^{-7}$ М (над 40% НКС), докато действителният квантов добив на първичната фотохимия ( $\Phi_{P_s}'$ ) намалява дори при най-ниската изследвана концентрация на хербицида ( $10^{-8}$ М или 25% НКС). Важен фактор, влияещ на първичната фотохимия е фракцията на отворените РЦ на ФСII. Количеството на отворените РЦ в светлинно адаптирано състояние е функция на промените на отношението на редуциран към тотален  $Q_A$  и може да бъде изразено с параметъра  $V'_s$  ( $V'_s=1-q_p$ ). Данните в табл. 2 показват намаление

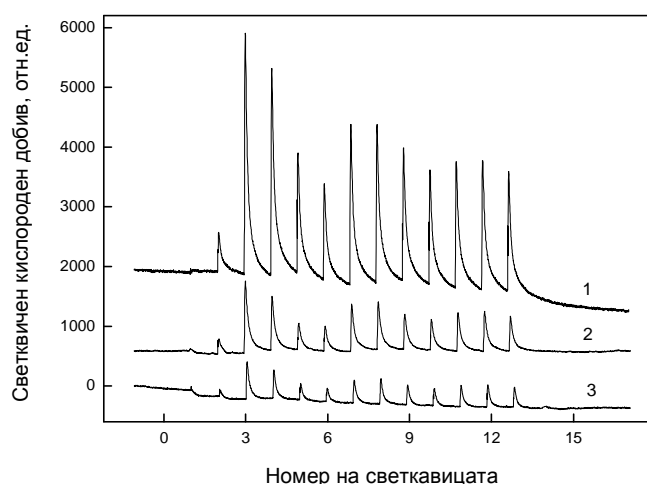
на количеството на отворените РЦ, при растения с намалено каротиноидно съдържание (нарастване на  $V'_s$ ). Максималните квантови добиви на ФСЦ съответно в DAS и LAS,  $\Phi_{P_0}$  и  $\Phi_{P_0}'$  при третирани с флуридон  $10^{-8}M$  са близки до стойностите за нетретирани растения, което дава право да се предположи, че първичната фотохимия на ФСЦ не е повлияна при 25% НКС.

### **Ефект на намаленото каротиноидно съдържание върху фотосинтетичното кислородно отделяне**

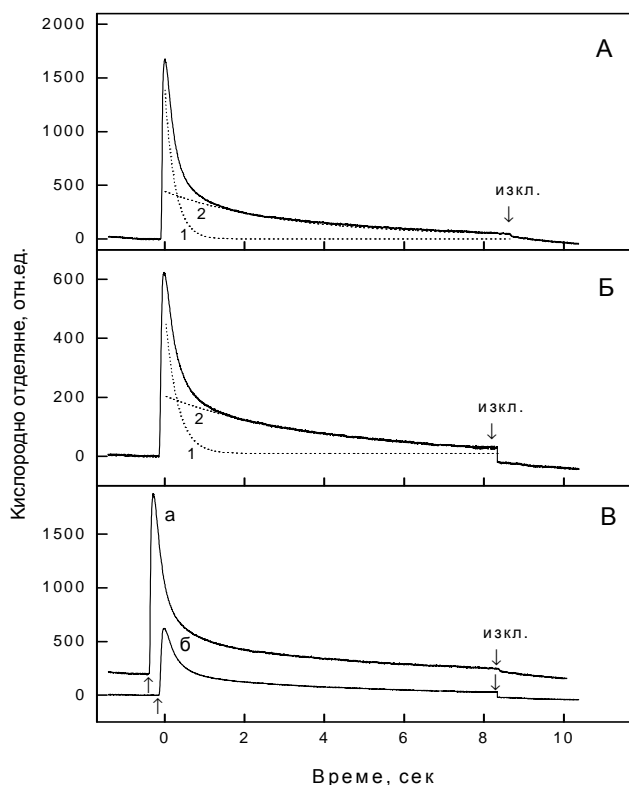
Индукционните криви на кислородно отделяне при постоянно осветяване за ТМ изолирани от нетретирани и третирани с флуридон растения са представени на фиг. 5. Кислородното отделяне при постоянно осветяване се характеризира с първоначален максимум, след което скоростта му намалява. Намалението на скоростта може да се опише с две експоненциално затихващи компоненти, което може да бъде обяснено с наличието на два различни механизма на кислородно отделяне или два различни типа кислород-отделящи центрове на ФСЦ, с различни кинетични характеристики (Zeinalov and Maslenkova, 1996; Zeinalov, 2005; Масленкова, 2009). Изчислени са следните параметри за оценка на влиянието на каротиноидното съдържание върху кислородното отделяне: амплитудата на началното кислородно отделяне ( $A$ ), корелираща с количеството на функционално активните центрове на ФСЦ, отношението  $A_1/A_2$  на амплитудите на бързата ( $A_1$ ) и бавната ( $A_2$ ) компонента на кислородното отделяне и скоростните константи на двете компоненти  $k_1$  и  $k_2$  (фиг. 5). Амплитудата на кислородното отделяне при постоянно осветяване ( $A$ ) намалява при по-малко количество на каротиноидите в листата. Инхибирането на кислородното отделяне е съпроводено и с намаление на отношението  $A_1/A_2$ , което вероятно е резултат от промени настъпващи във функционално активните ФСЦ $\alpha$  центрове. Осцилациите на светкавичните кислородни добиви на ТМ, изолирани от нетретирани и флуридон третирани растения са показани на фиг. 4. Светкавичният кислороден добив след третата светкавица ( $Y_3$ ) намаляват при намаление на каротиноидното съдържание. Инхибирането на светкавичните кислородни добиви, в ТМ с намалено каротиноидно съдържание позволява да се предположи повлияване на функциите на ФСЦ $\alpha$ . Промените в количеството на каротиноидите влияе по-силно върху светкавичния кислороден добив в сравнение с кислородното отделяне при непрекъснато осветяване.

Таблица 2. Параметри на импулсно модулираната хлорофилна флуоресценция на растения третиран с различни концентрации флуридон: максимален квантов добив на първичната фотохимия в DAS,  $\Phi_{P_0}$  и в LAS,  $\Phi_{P_0}'$ ; действителен квантов добив на първичната фотохимия в LAS,  $\Phi_{P_s}'$ ; коефициент на фотохимично гасене в LAS,  $q_P'$ ; относителна вариабилна флуоресценция в LAS,  $V_s'$ ; нефотохимично гасене на максималната хлорофилна флуоресценция, NPQ; Средните стойности са от 5 независими експеримента ( $\pm$  стандартна грешка). Статистически достоверните разлики между стойностите за третиран и нетретиран растения са означени (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

Флуоресцентни параметри	Концентрация на флуридона [M] / % на НКС			
	0	$10^{-8}$ [25%]	$10^{-7}$ [40%]	$10^{-6}$ [65%]
$\Phi_{P_0} = F_v/F_m$	$0.81 \pm 0.04$	$0.79 \pm 0.04$	$0.51 \pm 0.03^{***}$	$0.40 \pm 0.02^{***}$
$\Phi_{P_0}' = F_v'/F_m'$	$0.68 \pm 0.03$	$0.64 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.02^{***}$	$0.13 \pm 0.01^{***}$
$\Phi_{P_s}' = (F_m' - F_s')/F_m'$	$0.50 \pm 0.02$	$0.35 \pm 0.02^{**}$	$0.19 \pm 0.02^{***}$	$0.05 \pm 0.01^{***}$
$q_P' = (F_m' - F_s')/F_v'$	$0.73 \pm 0.04$	$0.55 \pm 0.04^{**}$	$0.43 \pm 0.03^{***}$	$0.38 \pm 0.03^{***}$
$V_s' = (F_s' - F_0')/F_v'$	$0.27 \pm 0.02$	$0.45 \pm 0.02^{**}$	$0.57 \pm 0.03^{***}$	$0.62 \pm 0.03^{***}$
$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$	$2.03 \pm 0.08$	$1.94 \pm 0.08$	$1.37 \pm 0.06^{***}$	$1.33 \pm 0.05^{***}$



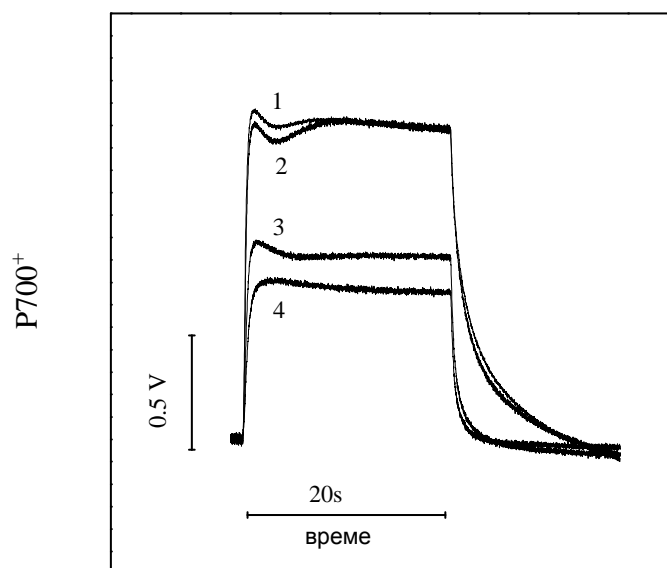
Фигура 4. Светкавични кислородни добиви на тъмнинно адаптирани ТМ от нетретиран растения (1), растения третиран с  $10^{-8}$ М флуридон (2) и растения третиран с  $10^{-7}$ М флуридон (3).



Фигура 5. Индукционна крива на кислородното отделяне при постоянно осветяване ( $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ ) на ТМ изолирани от нетретирани растения и третирани с  $10^{-7}\text{M}$  флуридон. Разлагане на кривите на кислородното отделяне на ТМ: (А) изолирани от нетретирани растения; (Б) изолирани от растения третирани с  $10^{-7}\text{M}$  флуридон; линия 1 – компонента  $A_1$  и линия 2 – компонента  $A_2$ ; (В) индукционни криви за ТМ от нетретирани растения (а), третирани с  $10^{-7}\text{M}$  флуридон растения (б).

### Ефект на намаленото каротиноидно съдържание върху фотоокислението на $P_{700}$

Влиянието на намаленото каротиноидно съдържание върху окислително-редукционните процеси във ФСІ беше изследвано чрез анализ на абсорбционните промени при 830 nm, които са резултат от фотоокислението на  $P_{700}$  с дълговълнова червена светлина ( $\lambda > 715 \text{ nm}$ ) и последващата му тъмнинна редукция (Klughammer and Schreiber, 1994). На фиг. 6 са показани оригинални записи на кривите на окисление на  $P_{700}$  с дълговълнова червена светлина в листа от нетретирани и третирани с различни концентрации на флуридон растения. Най-малката степен на намаление на каротиноидите (25% НКС) не повлиява съществено окислението на  $P_{700}$ , при осветяване с дълговълнова червена светлина.



Фигура 6. Фотоокисление на  $P_{700}^+$  от дълговълнова червена светлина ( $\lambda > 715 \text{ nm}$ ) и последваща тъмнинна редукция при листа от нетретирани (1) и третирани с  $10^{-8} \text{ M}$  флуридон (2),  $10^{-7} \text{ M}$  флуридон (3) и  $10^{-6} \text{ M}$  флуридон (4).

При по-значително намаление на количеството на каротиноидите (40% и 65%) стационарното ниво на окисление на  $P_{700}^+$  намалява. При 40% НКС се наблюдава намаление на окислението на  $P_{700}^+$  с 44%, докато при 65% НКС намалението е съответно с 55% (фиг. 6), което вероятно се дължи на промени в организацията на ФСІ комплекса. Това предположение се подкрепя и от наблюдаваното отместване с 3 nm на максимума на ФСІ в емисионния флуоресцентен спектър на ТМ при 77К (фиг. 3). Тъмнинната редукция на  $P_{700}^+$  се характеризира с двуфазно експоненциално намаление на абсорбцията при 830 nm. Първата фаза на редукция е бърза, а втората фаза – бавна. Донорът, осъществяващ бърз електронен пренос се предполага, че е редуцирания фередоксин, докато донорите участващи в бавния пренос могат да бъдат редуцираните пиридинови нуклеотиди (НАДФН) в хлоропластната строма (Endo et al., 1997). Анализът на кривите при 40% и 65% НКС показват по-голямо намаление на бавната компонента ( $I_s$ ) на редукцията на  $P_{700}^+$ , в сравнение с бързата компонента (фиг. 6). Това дава право да се предположи, че фередоксин-зависимия електронен транспорт е по-слабо засегнат в условия на намалено съдържание на каротиноиди. По-значителното намаление на бавната компонента на редукция на  $P_{700}^+$  е индикатор също така и за по-силно влияние на НКС върху ФСІ, намиращи се в неадхезираните участъци на граните отколкото върху ФСІ в стромалните участъци на ТМ.

Таблица 3. Ефект на различната степен на НКС върху функциите на фотосинтетичния апарат, изразен чрез фактор за оценка, представляващ отношението на стойностите за третирани спрямо нетретирани растения за следните параметри: максимален квантов добив на първичната фотохимия в тъмнинно адаптирано състояние,  $\Phi_{P_0}$  и в светлинно адаптирано състояние,  $\Phi_{P_0}'$ ; действителен квантов добив на първичната фотохимия в светлинно адаптирано състояние  $\Phi_{P_s}'$ ; кислородно отделяне при непрекъснато осветяване (А); светкавичен кислороден добив от третата светкавица ( $Y_3$ );

Параметър	Фактор за оценка		
	25% НКС	40% НКС	65% НКС
$\Phi_{P_0} = F_v/F_m$	0.98	0.63	0.49
$\Phi_{P_0}' = F_v'/F_m'$	0.94	0.65	0.19
$\Phi_{P_s}' = (F_m' - F_s')/F_m'$	0.70	0.38	0.10
А	0.64	0.37	--
$Y_3$	0.29	0.15	--

В табл. 3 са обобщени резултатите от импулсно модулираната хлорофилна флуоресценция и фотосинтетичното кислородно отделяне при различна степен на намаление на каротиноидите в ТМ. Най-големи изменения се наблюдават при амплитудите на кислородно отделяне при непрекъснато осветяване (А), при светкавичните кислородни добиви ( $Y_3$ ) и при действителния квантов добив  $\Phi_{P_s}'$ . Най-малки са промените в максималния квантов добив на първичната фотохимия, съответно в тъмнинно ( $\Phi_{P_0}$ ) и светлинно адаптирано състояние ( $\Phi_{P_0}'$ ). На база на получените резултати може да се предположи, че намалението на каротиноидите с 25% води до увреждане предимно на донорната страна на ФСII, докато по-силното намаление на каротиноидите причинява инхибиране на фотохимията както на ФСII, така и на ФСI.

### Връзка между организацията на ССКII и липидния състав на тилакоидната мембрана

Изследвани бяха ТМ, изолирани от растения на грах (*Pisum sativum*) от сортовете Borec и Auralia и техните мутантни линии *Coeruleovireus 2/16*, *Costata 2/133* (мутанти на Borec див тип) и *Chlorotica XV/1422* (мутант на Auralia див тип). Граховите растения от дивите типове Borec и Auralia и техните мутантни линии *Costata 2/133*, *Coeruleovireus 2/16* и *Chlorotica XV/1422* имат различно отношение на хетеротримерните към мономерните форми на ССКII ( $R_{o/m}$ ). Различната степен на олигомеризация на ССКII е свързана с промяна в електричните свойства на изследваните ТМ (Dobrikova et al., 2000; Dobrikova et al., 2001). Резултатите от липидния анализ са представени в табл. 4.



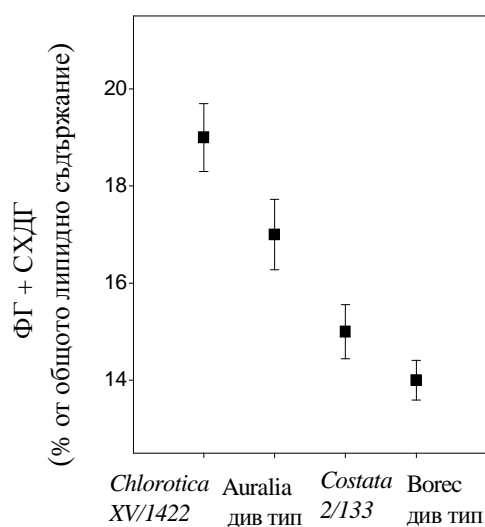
Таблица 4. Основни липидни класове в ТМ изолирани от изследваните линии грах (% от общото количество на липидите). Стойностите са средни от 3 независими експеримента. МГДГ - моногалактозилдиацилглицерол, ДГДГ-дигалактозилдиацилглицерол, СХДГ-сулфохиновозилдиацилглицерол, ФГ - фосфатидилглицерол;

Липиден клас	<i>Chlorotica XV/1422</i> mol %	<i>Auralia</i> mol %	<i>Costata 2/133</i> mol %	<i>Borec</i> mol %
МГДГ	35	45	47	48
ДГДГ	43	35	35	37
СХДГ	7	6	5	5
ФГ	12	11	11	9
други	3	3	2	1

Количеството на МГДГ нараства в изследваните ТМ при увеличаване на степента на олигомеризация на ССКП, от 35 mol% при *Chlorotica XV/1422* до 48 mol% при *Borec* див тип. Съдържанието на ДГДГ е по-голямо в ТМ, изолирани от мутанта *Chlorotica XV/1422* (43 mol%), в сравнение със съдържанието при останалите изследвани ТМ, където съдържанието на ДГДГ варира от 35 до 37 mol% (табл. 4). Количеството на анионните липиди (ФГ и СХДГ) също варира в изследваните мембрани (табл. 4). Сумата на анионните липиди (ФГ и СХДГ), изразена като процент от общото количество на липидите в ТМ е представено на фиг. 7. Съдържанието на анионните липиди в ТМ е най-голямо при *Chlorotica XV/1422* (19% от тоталните липиди) и най-малко при *Borec* див тип (14% от тоталните липиди). Количеството на анионните липиди намалява с нарастването на количеството на олигомерните форми на ССКП.

Резултатите от анализа на мастнокиселинния състав на изследваните ТМ показва, че в изследваните мембрани най-голямо е количеството на следните мастни киселини: 18:3 ( $\alpha$ -линоленова, 75-81% от тоталните липиди), 16:0 (палмитинова, 9-12% от тоталните липиди) и 16:1 (палмитолеинова, 2.9-3.2% от тоталните липиди). Установено беше, че няма съществени различия в мастнокиселинния състав на глицеролипидите (МГДГ и ДГДГ). Преобладаващите мастни киселини в състава на неутралните глицеролипиди (МГДГ и ДГДГ) са 18:3 (80-95%) и 16:0 (9-11% от състава на ДГДГ). В състава на заредените липиди най-много са 18:3 (20-22% при ФГ и 43-46% при СХДГ) и 16:0 (27-33% при ФГ и 39-41% при СХДГ). При ФГ се наблюдава увеличено

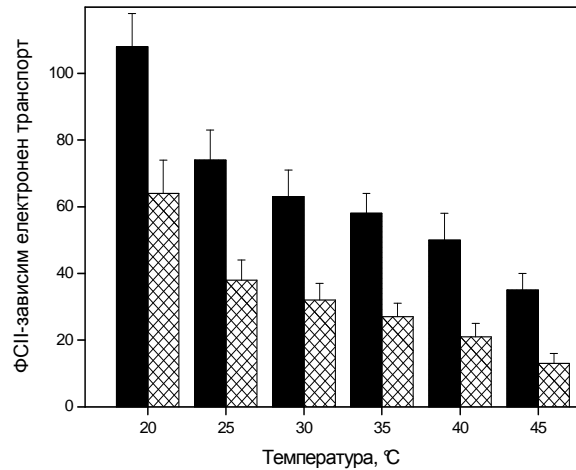
количество и на 16:1 мастните киселини. Количеството на 16:1 мастните киселини в състава на ФГ нараства заедно с увеличаване на съдържанието на олигомерни форми на ССКП от 22% при *Chlorotica XV/1422* до 26.5% при *Borec*.



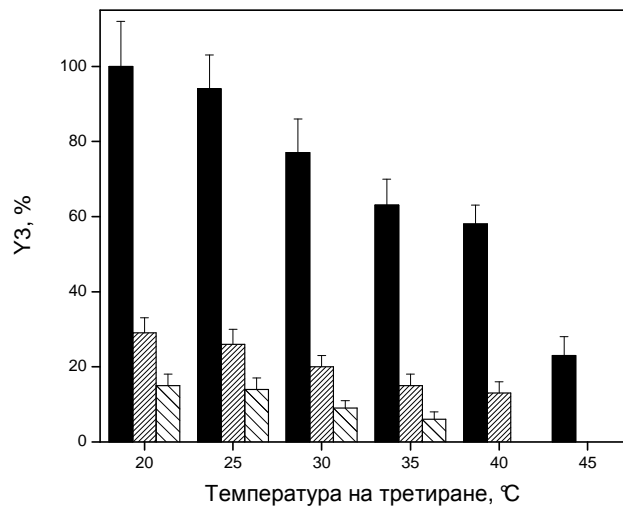
Фигура 7 Количество на анионните липиди (ФГ+СХДГ), изразено като процент от общото липидно съдържание в изследваните ТМ.

### Роля на каротиноидите за температурната стабилност на фотосинтетичния апарат.

Изследвани бяха ТМ, изолирани от листа на нетретирани и третирани с различни концентрации флуоридон растения и подложени на температурно третиране в интервала 20-50 С. Проследени бяха измененията в светкавичните кислородни добиви, кислородното отделяне при постоянно осветяване, ФСП зависимия електронен транспорт и максималния квантов добив на първична фотохимия на ФСП. Получените резултати показват, че намалението на каротиноидите повлиява степента на инхибиране на ФСП зависимия електронен транспорт (фиг. 8). При температура от 20 С скоростта на ФСП зависимия ЕТ, както и кислородното отделяне, измерено със скоростен полярографски електрод на ТМ с 40% НКС е по-малка от скоростта при контролните ТМ. При повишаване на температурата ФСП зависимият ЕТ и кислородното отделяне се инхибират по-силно в ТМ с намалено каротиноидно съдържание, в сравнение с контролните ТМ, като при 50 С се наблюдава пълно инхибиране и при двата типа изследвани тилакоидни мембрани.



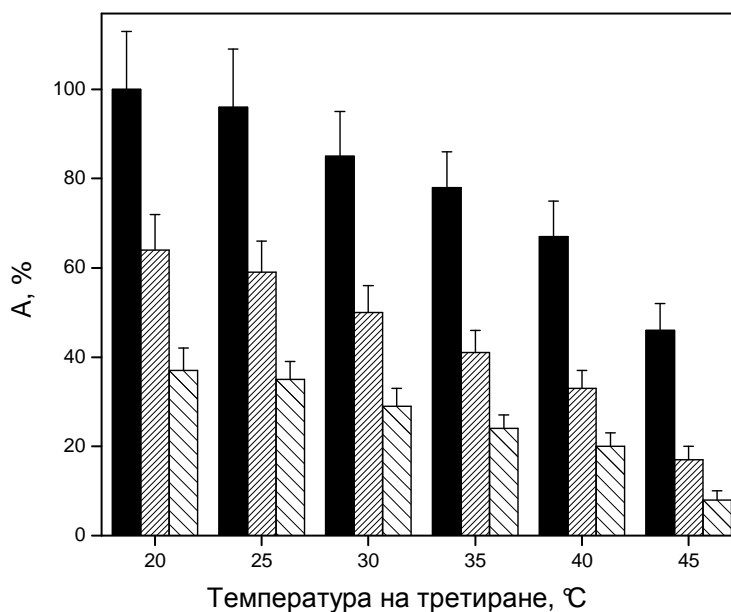
Фигура 8. ФСИ-зависимият електронен транспорт, ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg chl}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$ ) за ТМ, изолирани от нетретирани (черни стълбчета) и третирани с  $10^{-7}\text{M}$  флуридон (щриховани стълбчета) растения. ТМ са третирани за 5 мин при различни температури.



Фигура 9. Светкавичен кислороден добив след третата светкавица ( $Y_3$ , % от контролата) за ТМ, изолирани от нетретирани (черни стълбчета) и третирани с  $10^{-8}\text{M}$  флуридон (плътно щриховани) и  $10^{-7}\text{M}$  флуридон (щриховани стълбчета) растения. Изолираните ТМ са третирани за 5 мин при различни температури.

Светкавичните кислородни добиви ( $Y_3$ ) и кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (А) се инхибират в по-голяма степен при ТМ с намалено каротиноидно съдържание (фиг. 9 и 10). Сравнението на промените, които се наблюдават при двата параметъра показва по-силно инхибиране на светкавичните кислородни добиви ( $Y_3$ ) в сравнение с кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (А). Светкавичните кислородни добиви се наблюдават

до 35°C за растения с 40% НКС, до 40°C за растения с 25% НКС и до 45°C за нетретирани растения с флуридон растения (фиг. 10). Кислородното отделяне при непрекъснато осветяване се наблюдава до 45°C, както при контролни, така и при ТМ с намалено каротиноидно съдържание, но при ТМ от флуридон третирани растения е по-силно инхибирано (фиг. 10).



Фигура 10. Амплитуда на кислородното отделяне при постоянно осветяване (A, % от контролата) за ТМ, изолирани от нетретирани (черни стълбчета) и третирани с 10<sup>-8</sup>М флуридон (плътно шриховани) и 10<sup>-7</sup>М флуридон (щриховани стълбчета) растения. ТМ са третирани за 5 мин при различни температури.

Отношението на амплитудите на двете компоненти от индукционната крива на кислородно отделяне  $A_1/A_2$  намалява при повишаване на температурата, като намалението е по-голямо при растения третирани с флуридон. Наблюдаваните промени в отношението  $A_1/A_2$  са резултат от намаление предимно на бързата компонента  $A_1$ , която е свързана с функционирането на ФСIIα центровете. При температури от 40°C и 45°C кинетиката на кислородно отделяне при постоянно осветяване става еднокомпонентна.

## Роля на организацията на фотосинтетичния апарат за устойчивостта му към замразяване

Изследван беше ефектът на процеса замразяване-размразяване върху функциите на ФСА при три линии грах (*Costata 2/133*, *Vorec* и *Coeruleovireus*

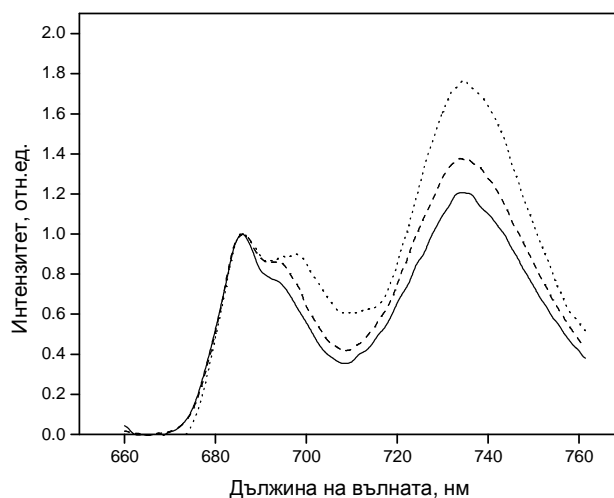
2/16) в присъствие на криотоксична сол или на криотоксична сол и криопротектор. Изолирани ТМ бяха използвани като модел за изясняване на ролята на състава, организацията и физикохимичните свойства на ТМ за устойчивостта на ФСА към замразяване.

### Влияние на замразяването върху нискотемпературните (77К) флуоресцентни емисионни спектри

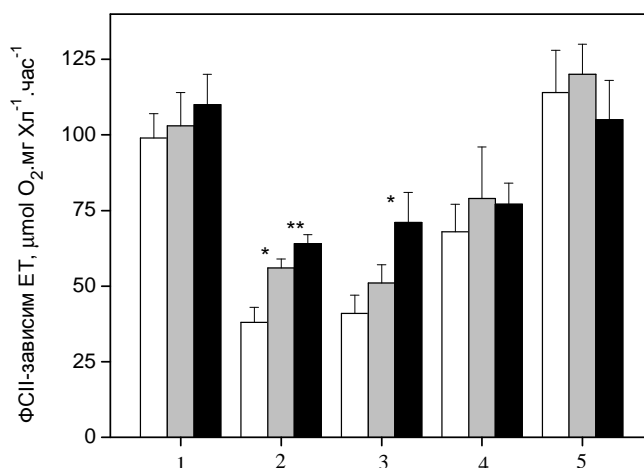
Ефектът на замразяването върху преноса на енергия между пигмент-белтъчните комплекси беше изследван с помощта на нискотемпературна (77К) хлорофилна флуоресценция на изолирани ТМ при възбуждане на Хл *a* (436 нм) и Хл *b* (472 нм). След замразяване-размразяване на ТМ в NaCl, отношението  $F_{735}/F_{685}$  нараства в сравнение с нетретираните мембрани, при възбуждане, както на Хл. *a*, така и на Хл. *b* (фиг. 11), което е резултат от нарастване на преноса на енергия на възбуждане от ФСII към ФСI при замразяване в среда, съдържаща само NaCl. Ефектът е по-малък за ТМ от мутанта *Coeruleovireus 2/16*, с по-високо отношение  $R_{o/m}$ , в сравнение с *Vores* и мутанта *Costata 2/133*. Когато в средата освен NaCl присъства и захароза, отношението на флуоресценцията, излъчена от ФСII към флуоресценцията на ФСI ( $F_{735}/F_{685}$ ) е по-слабо повлияно от замразяването, отколкото в среда съдържаща само NaCl (фиг. 11). Анализът на нискотемпературните флуоресцентни емисионни спектри на изследваните ТМ след замразяване показва, че промените в прерапределението на енергията след замразяването зависят от организацията на ССКII или от количеството на анионните липиди.

### Влияние на замразяването върху ФСII-зависимия електронен транспорт

ФСII-зависимият електронен транспорт в присъствие на външен акцептор за контролни и подложени на замразяване в различни среди ТМ са представени на фиг. 12. Беше установено инхибиране на активността на ФСII след замразяване-размразяване в среда съдържаща NaCl (50 и 100 mM). ФСII-зависимият електронен транспорт е по-силно повлиян при мутанта *Costata 2/133*, отколкото при *Vores* и мутанта *Coeruleovireus 2/16*. При по-високата концентрация на захароза (150 mM) инхибирането е по-малко при всички изследвани типове ТМ (фиг. 12). Инхибирането на ФСII-зависимият електронен транспорт може да бъде резултат, както от увреждането на донорната, така и на акцепторната страна на ФСII.



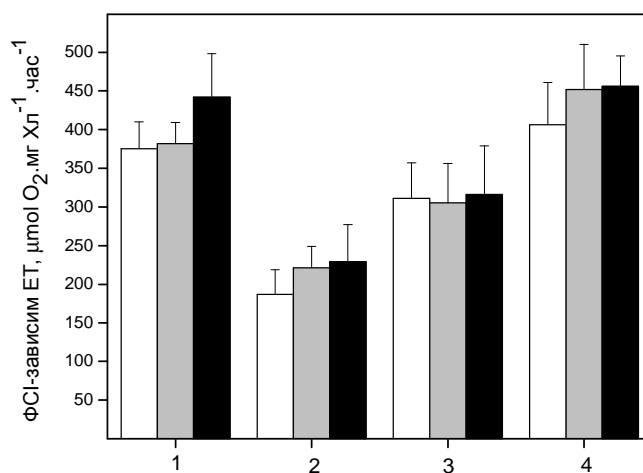
Фигура 11. Нискотемпературни флуоресцентни спектри на ТМ от мутанта *Costata 2/133* регистрирани при възбуждане на Хл *a* (436 nm), замразявани в среда съдържаща 100 mM NaCl (точки), 100 mM NaCl и 150 mM захароза (пунктирна линия) и контролни ТМ (непрекъснатата линия).



Фигура 12 ФСП-зависим електронен транспорт, след замразяване-размразяване на изолирани ТМ. *Costata 2/133* – бели, *Borec* – сиви, *Coeruleovireus 2/16* – черни стълбчета. Нетретирани ТМ (1) и замразявани в: 50 mM NaCl (2), 100 mM NaCl (3), 100 mM NaCl и 50 mM захароза (4), 100 mM NaCl и 150 mM захароза (5). Средните стойности са от 5 независими експеримента. Със звезда са означени статистически достоверните разлики между стойностите за *Costata 2/133* и стойностите за *Borec* и *Coeruleovireus 2/16* (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Влияние на замразяването върху фотохимичната активност на ФСИ

За да проследим как промените в организацията на ССКП и различния липиден състав на ТМ влияят върху стабилността на ФСІ при замразяване изследвахме фотохимичната активност на ФСІ на ТМ замразявани в различни среди. Активността на ФСІ на нетретирани и подложени на замразяване ТМ е представена на фиг. 13. Фотохимичната активност на ФСІ за ТМ, замразявани в среда съдържаща 100 mM NaCl се инхибира с до 50%. При наличие на 50 mM захароза в средата, активността на ФСІ след замразяване се инхибира от 20 до 30%, докато при замразявани в среда съдържаща 150 mM захароза фотохимичната активност на ФСІ е близка до тази за нетретирани ТМ.



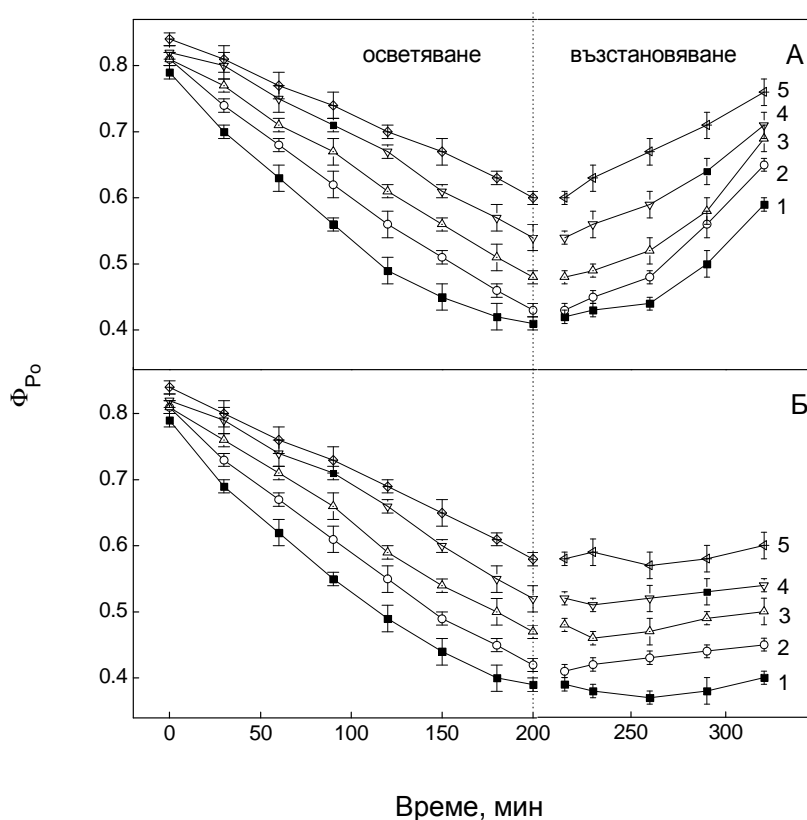
Фигура 13. ФСІ-зависим електронен транспорт след замразяване-размразяване на изолирани ТМ. *Costata 2/133* – бели, *Borec* – сиви, *Coeruleovireus 2/16* – черни стълбчета. Нетретирани (1) и замразявани в: 100 mM NaCl (2), 100 mM NaCl и 50 mM захароза (3), 100 mM NaCl и 150 mM захароза (4). Средните стойности са от 5 независими експеримента.

## Влияние на светлина с висок интензитет върху функциите на тилакоидни мембрани с различна организация

### Влияние на светлинния стрес върху параметрите на импулсно модулираната хлорофилна флуоресценция

За да определим ролята на организацията на ССКП при третиране със светлина с висок интензитет изследвахме максималният квантов добив на първична фотохимия ( $\Phi_{P_0}$ ). Зависимостта на  $\Phi_{P_0}$  от продължителността на осветяването е представена на фиг. 14А. Максималният квантов добив ( $\Phi_{P_0}$ )

намалява с увеличаване на продължителността на осветяване, в резултат на промени в отношението на фотохимичните и нефотохимичните процеси във ФСА. Степента на инхибиране на първичната фотохимия на ФСII е различна, в зависимост от степента на олигомеризация на ССКII. При *Chlorotica XV/1422* максималният квантов добив ( $\Phi_{P_0}$ ) след светлинното третиране се инхибира с 48%, докато при мутанта *Coeruleovireus 2/16*  $\Phi_{P_0}$  се инхибира само с 28%. Получените резултати показват, че ФСА в листа, характеризиращи се с по-малко отношение на олигомерни към мономерни форми на ССКII,  $R_{o/m}$  (*Chlorotica XV/1422*) е по-чувствителен към фотоинхибиране, в сравнение с ФСА в листа, характеризиращи се с по-високо отношение  $R_{o/m}$  (*Coeruleovireus 2/16*).



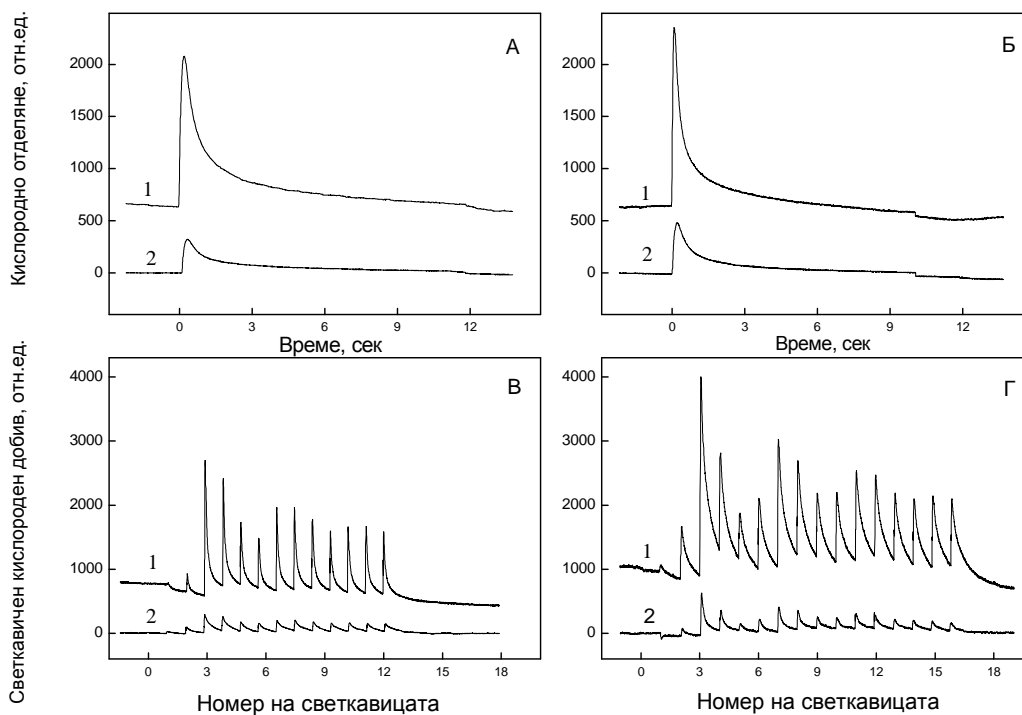
Фигура 14. Кинетика на измененията на максималния квантов добив на първичната фотохимия ( $\Phi_{P_0}$ ) на листа от грах по време на осветяване със светлина с интензитет  $1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$  и по време на последващото възстановяване при слабо осветяване ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ ): (1) *Chlorotica XV/1422*, (2) *Auralia*, (3) *Costata 2/133*, (4) *Borec*, (5) *Coeruleovireus 2/16*. (A) – листа, нетретиранни с линкомицин; (Б) - листа третиранни с линкомицин.



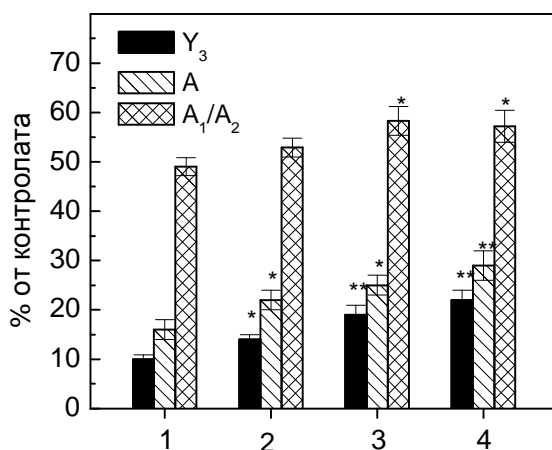
За да изясним ролята, която има биосинтезата на компонентите на ФСII в процеса на фотоинхибиране, проведехме експерименти с листа, предварително третирани с линкомицин, който е инхибитор на белтъчната биосинтеза в хлоропластите. Проследихме възстановяването на  $\Phi_{P_0}$  при ниска осветеност ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ ) до 130 мин след края на светлинното третиране. Бяха изследвани листа, предварително третирани с линкомицин и съответно листа, които не бяха третирани с линкомицин. В десния панел на фиг. 14А са представени резултатите за възстановяването на  $\Phi_{P_0}$  при листа, нетретирани с линкомицин, а на фиг. 14Б резултатите за листа третирани с линкомицин. При светлинен стрес на листа, предварително третирани с линкомицин, възстановяване на първичната фотохимия ( $\Phi_{P_0}$ ) не се наблюдава (фиг. 14Б), за разлика от нетретираните растения, при които се наблюдава възстановяване. Установените разлики в степента на възстановяване на  $\Phi_{P_0}$  между третираните и нетретираните с линкомицин листа дават право да се предположи, че възстановяването на ФСА след светлинен стрес зависи от белтъчната биосинтеза и респективно от замяната на увредените D1 белтъци с новосинтезирани.

### **Влияние на светлина с висок интензитет върху фотосинтетичното кислородно отделяне**

Изследвано беше фотосинтетичното кислородно отделяне с помощта на скоростен полярографски електрод при непрекъснато осветяване (индукционни криви на кислородно отделяне) и светкавичния кислороден добив на ТМ, изолирани от листа след 3 часа светлинно третиране (фиг. 15). Светкавичният добив ( $Y_3$ ) на ТМ изолирани от листа след 3 часа светлинно третиране намалява значително. Стойностите му са между 10% (*Chlorotica XV/1422*) и 25% (*Coeruleovireus 2/16*) от добива на ТМ от контролните листа. Амплитудата на кислородно отделяне при непрекъснато осветяване (А) намалява по-малко в сравнение със светкавичните добиви след 3 часа светлинно третиране. Делът на центровете в So състояние на тъмно, загубите и двойните попадения нарастват след 3 часа светлинен стрес. Наблюдава се също така намаление на скоростните константи на бързата ( $k_1$ ) и бавната компонента ( $k_2$ ) от индукционните криви на кислородно отделяне.

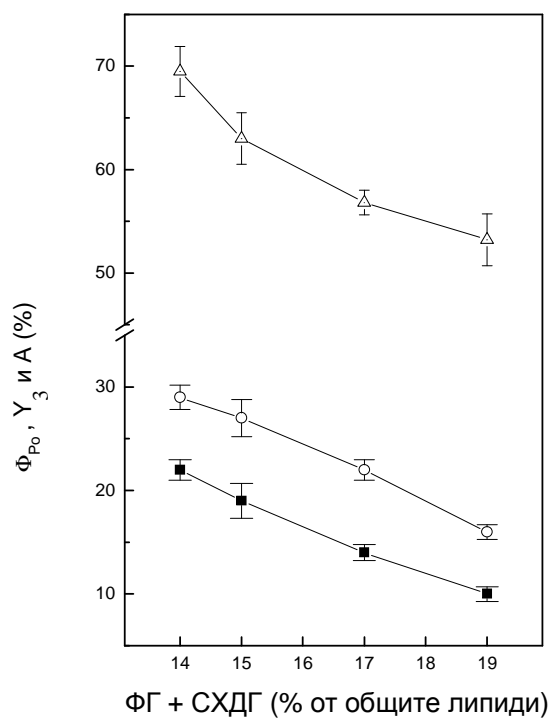


Фигура 15. Индукционни криви на кислородно отделяне при непрекъснато осветяване (А и Б) и светкавични кислородни добиви (В и Г) на ТМ от нетретирани листа (1) и листа след 3 часа светлинно третиране при стайна температура (2) от растения на Auralia (А и В) и Boges (Б и Г).



Фигура 16. Изменения в параметрите фотосинтетичното кислородно отделяне на ТМ изолирани от листа след 3 часа светлинно третиране. Стойностите са представени като процент от стойностите за нетретирани, контролни проби.  $Y_3$  - светкавичен кислороден добив след третата светкавица; A - амплитуда на кислородното отделяне при постоянно осветяване;  $A_1$  и  $A_2$  - амплитуди на бързата и бавна компонента на кислородно отделяне.

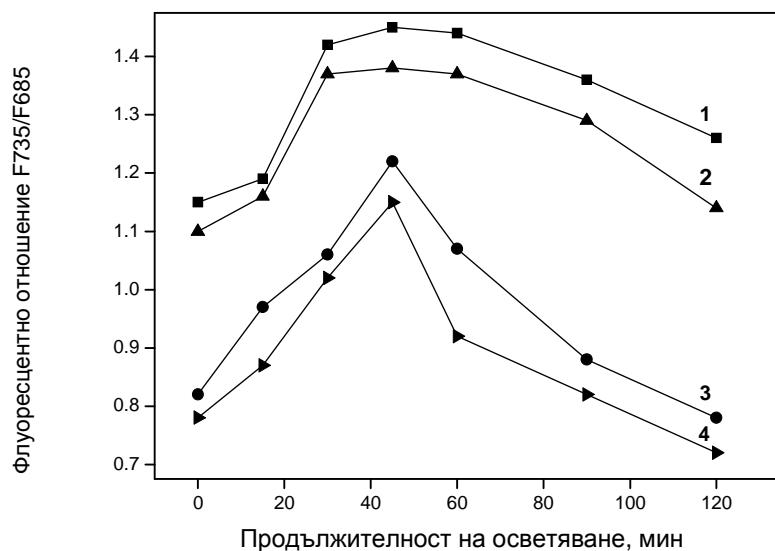
На фиг. 16 са представени измененията в параметрите на фотосинтетичното кислородно отделяне на ТМ от изследваните линии грах, изолирани след 3 часа светлинно третиране. Наблюдавахме нарастване на стойностите на светкавичния кислороден добив ( $Y_3$ ), амплитудата на кислородно отделяне при постоянно осветяване ( $A$ ) и отношението на амплитудите на бързата и бавната компонента от индукционните криви ( $A_1/A_2$ ) за различните изследвани линии грах. На фиг. 17 е представена зависимостта на относителните изменения в максималния квантов добив  $\Phi_{P_0}$ , степента на инхибирането на светкавичните кислородни добиви ( $Y_3$ ) и амплитудите на кислородно отделяне при непрекъснато осветяване ( $A$ ) за изследваните линии грах, след 3 часа светлинно третиране от количеството на анионните липиди в ТМ. След светлинното третиране  $\Phi_{P_0}$ ,  $Y_3$  и  $A$  намаляват. С нарастване на количеството на анионните липиди ( $\Phi\Gamma$  и  $CX\Delta\Gamma$ ) в ТМ и съответно намаляване на олигомеризацията на ССКП се наблюдава намаление в относителните стойности на  $\Phi_{P_0}$ ,  $Y_3$  и  $A$ .



Фигура 17. Относителни изменения (в % от контролата) на максималния квантов добив на ФСII ( $\Phi_{P_0}$ ,  $\Delta$ ) в листа от грах, светкавичен кислороден добив ( $Y_3$ ,  $\blacksquare$ ) и амплитуда на кислородното избухване при непрекъснато осветяване ( $A$ ,  $\circ$ ) на ТМ, изолирани от листа след 3 часа светлинно третиране ( $1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$ ) при стайна температура.

## Нискотемпературни (77К) флуоресцентни емисионни спектри на светлинно третиран ТМ

За да изследваме влиянието на организацията на ССКП върху преразпределението на енергията между ФСII и ФСI при въздействие със светлина с висок интензитет използвахме метода на нискотемпературната (77К) хлорофилна флуоресценция. Изследването беше проведено върху изолирани ТМ. Измененията на флуоресцентното отношение  $F_{735}/F_{685}$  при възбуждане на Хл *b* в зависимост от продължителността на осветяване на изолирани ТМ от линиите, *Chlorotica XV/1422*, *Auralia*, *Borec* и *Coeruleovireus 2/16* са представени на фиг. 18. При възбуждане на Хл *b* ( $\lambda_{ex} = 472$  нм) отношението  $F_{735}/F_{685}$  се увеличава до 45 мин от началото на осветяване, след което намалява. Промените са по-големи при *Borec* и при мутанта *Coeruleovireus 2/16*, отколкото при *Auralia* и мутанта *Chlorotica XV/1422*.



Фигура 18. Нискотемпературно (77К) флуоресцентно отношение  $F_{735}/F_{685}$  за ТМ след третиране със светлина с висок интензитет: *Chlorotica XV/1422* (1), *Auralia* (2), *Borec* (3), *Coeruleovireus 2/16* (4). Дължина на вълната на възбуждащата светлина 472 нм.

## ОБСЪЖДАНЕ

В настоящата работа беше изследвано влиянието, което оказват промените в количеството на каротиноидите, липидния състав и организацията на ССКП върху функционалната активност на ФСА и неговата чувствителност към абиотичен стрес. Получените резултати показват връзка между организацията на

ССКП, липидния състав на ТМ, каротиноидното съдържание и функционалната активност на ФСА, както и чувствителността му към стресови фактори, като висока температура, замразяване и светлина с висок интензитет.

## Функциониране на ФСА при намалено каротиноидно съдържание в ТМ

Каротиноидите във ФСА изпълняват светосъбираща, фотозащитна и структурна функция (Demmig-Adams and Adams, 1992; Horton et al., 1996). С помощта на хербициди, които блокират синтеза на каротиноидите (норфлуразон и флуридон) е показано, че  $\beta$ -каротина е важен за асемблирането на новосинтезирания D1 белтък във функционален ФСII комплекс (Trebst and Derka, 1997). Има данни, че измененията в пигментния състав след третиране с обезцветяващи хербициди оказват влияние върху мембранный флуидитет и структурната организация на хлоропластите (Dalla Vecchia et al., 2001), както и върху стабилността на светосъбиращите комплекси (Mullet et al., 1990). Di Vascio et al. (2002) показват, че третиране на етиопласти с обезцветяващи хербициди от класа на флуридона (амитрол и норфлуразон) води до изменения в липидния състав (нарастване на моларното отношение МГДГ/ДГДГ) и степента на ненаситеност на мастните киселини в полярните липиди, както и до намаление на отношението липид/белтък в ТМ. Докато структурната и защитната роля на каротиноидите срещу оксидативни увреждания е добре известна, ефектът на намаленото каротиноидно съдържание върху много от функционалните параметри на ФСА все още не е напълно изяснена.

Анализът на данните от нискотемпературната флуоресценция и модулираната хлорофилна флуоресценция, кислородното отделяне и фотоокислението на  $P_{700}$ , показва че намалението на каротиноидното съдържание повлиява функционирането на ФСА. Беше установено, че различната степен на намаление на каротиноидите (25, 40 и 65% НКС) оказват различно въздействие върху първичната фотохимия на ФСII, кислородното отделяне и фотоокислението на  $P_{700}$  (табл. 3, фиг. 6). При намаление на каротиноидите с 25% се инхибира основно кислород-отделящата активност на ФСА (светкавични кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване), докато максималния квантов добив в тъмнинно и светлинно адаптирано състояние и фотоокислението на  $P_{700}$  не се променят съществено. По-значителното намаление на каротиноидното съдържание (40% и 65% НКС) води до инхибиране на фотохимията на двете фотосистеми, както и повлияване на характеристиките на кислородното отделяне (тъмнинното разпределение на  $S_i$  състоянията, загубите, двойните попадения и скоростните константи на двете компоненти на намаление на кислородното отделяне). Експерименталните резултати показват, че намалението на каротиноидите съответно с 40% и 65% води до инхибиране на първичната фотохимия на ФСII и фотосинтетичното кислородно отделяне, като ефектът върху кислородното отделяне е по-силен от

ефекта върху първичната фотохимия на ФСII (табл. 3). Амплитудата  $A_1$  и скоростната константа  $k_1$ , които се предполага че са свързани с ФСIIа са по-силно повлияни. Сравнението на промените, които настъпват в  $Y_3$ , амплитудите ( $A_1$  и  $A_2$ ) на началното кислородно отделяне при постоянно осветяване и скоростните константи на двете компоненти на затихване на кислородното отделяне (бърза,  $k_1$  и бавна,  $k_2$ ) ни дава право да предположим, че инхибирането на кислород-отделящата активност, в следствие на намалението на каротиноидите в ТМ е резултат главно от увреждане на ФСIIа центрове.

### Връзка между организацията на ССКII и липидния състав на ТМ

Липидният анализ на изследваните мутантни линии от грах показва връзка между степента на олигомеризация на ССКII и липидния състав на ТМ. Съдържанието на анионните липиди (ФГ и СХДГ) намалява с нарастването на количеството на олигомерните форми на ССКII (фиг. 7). Промяната в липидния състав на изследваните ТМ вероятно влияе върху липид-белтъчните взаимодействия и променя макроорганизацията на ТМ. Изследваните ТМ се различават не само по количеството на анионните липиди, но също така и по количеството на неутралния липид МГДГ. Количеството на МГДГ в изследваните ТМ нараства при увеличаване на степента на олигомеризация на ССКII, докато съдържанието на ДГДГ намалява (табл. 4). Различното отношение на неутралните липиди МГДГ/ДГДГ в изследваните ТМ може да бъде обяснено с различната конформация, която имат липидните молекули в ТМ, а от там и различно предпочитание към гранални/стромални участъци на ТМ. Молекулите на МГДГ, благодарение на своята конична форма, се разполагат в нестикваните участъци на граните, докато молекулите на ДГДГ формират предимно агрегати в ламеларна фаза и относителният им дял в стромалните тилакоиди е по-голям (Webb and Green, 1991). Установено е също така (Andreeva et al., 2003), че организацията на ССКII влияе върху броя на адхезираните ТМ в граните. При мутанта с най-ниско отношение  $R_{o/m}$  (*Chlorotica XV/1422*) този брой е по-малък в сравнение с мутанта с най-високо отношение  $R_{o/m}$  (*Coeruleovireus 2/16*). Анализът на мастнокиселинният състав на основните липидни класове в изследваните ТМ показват, че няма съществени разлики в състава на мастните киселини на МГДГ и ДГДГ, докато при ФГ се наблюдава връзка между количеството на 16:1 мастните киселини в състава на молекулите на този липид и отношението  $R_{o/m}$ . Различията в количество на 16:1 мастните киселини в състава на ФГ подкрепят предположението за ролята на транс-3-хексадеценоната киселина (16:1 мастна киселина) в състава на фосфатидилглицерола при формирането на тримерите на ССКII (Dubertret et al., 2002). Намалението в количество на 16:1 мастните киселини в състава на ФГ е свързано и с намаляване на активността на ФСII (Maani et al., 1998). Нашите изследвания за първи път показват зависимост между генетично

детерминираното ниво на олигомеризация на ССКII и относителния дял на анионните липиди в ТМ. Получената зависимост може да се свърже също и с функционалните характеристики на изследваните ТМ, които са описани по-рано (Apostolova et al., 2006; Dobrikova et al., 2000; Dobrikova et al., 2001).

### Роля на каротиноидите за температурната стабилност на фотосинтетичния апарат

Известно е, че при температура в диапазона 38-42°C се увеличава фосфорилирането на ССКII, нараства миграцията му към стромалните области на ТМ и се променя макроорганизацията на граните (Mohanty et al., 2002). Повишаването на температурата е свързано и с увеличаване на количеството на свободно-радикалните форми, които се образуват в ТМ, вследствие на взаимодействие на формираните триплетни състояния на хлорофила с кислорода. Каротиноидите изпълняват важна роля при защитата на ФСА от свободно-радикални форми. Намалението на количеството на каротиноидите лутеин и  $\beta$ -каротин ограничават способността на антенните комплекси за топлинна дисипация на енергията на възбуждане, която е основен механизъм за деактивация на триплетното състояние на хлорофила ( $^3\text{Хл}$ ) и на синглетния кислород ( $^1\text{O}_2$ ). При по-висока температура скоростта на образуване на свободно-радикалните форми е по-висока и съответно и ефектът на увреждане на ФСА, причинен от намаленото съдържание на каротиноиди в ТМ е по-силно изразен. Температурно-индуцираните промени в ТМ с намалено съдържание на каротиноиди водят до по-силно инхибиране на функционалната активност на ФСII в сравнение с ТМ с непроменено каротиноидно съдържание. Светкавичният кислороден добив (фиг. 9) се инхибира по-силно от кислородното отделяне при непрекъснато осветяване (фиг. 10). Промените в отношението  $A_1/A_2$ , което дава информация за отношението на функционално активните ФСII $\alpha$  към ФСII $\beta$  центрове (Zeinalov, 2005) ни позволяват да предположим различна степен на увреждане на двата типа кислород-отделящи центрове. По-бързото намаление на амплитудата на бързата компонента  $A_1$  и на скоростната константа  $k_1$  позволява да се предположи по-силно инхибиране на ФСII $\alpha$  центровете. При температура от 40°C, при растения с 40% НКС не се наблюдава бързата компонента на кислородно отделяне, което дава право да предположим необратимо увреждане на ФСII $\alpha$  центровете. Тези промени във функционирането на ФСII могат да бъдат следствие от нарушената гранална организация на ТМ и мономеризацията на ССКII. Значителното инхибиране на максималния квантов добив при температури по-високи от 40°C, съвпада с температурата при която се наблюдава пълно инхибиране на светкавичните кислородни добиви при ТМ с 40% НКС. При 40°C граналната структура на ТМ не се разрушава напълно, но повишаването на температурата над 45°C довежда до формиране на тримерни липидни агрегати под формата на цилиндрични мицели. Установено е също така мономеризирането на ССКII в листа при 45-

47°C (Takeuchi and Thornber, 1994). Може да се предположи, че мономеризацията на ССКII при температурно третиране и нарушаването на граналната организация на ТМ са основната причина за силното инхибиране на максималния квантов добив на ФСII и на кислородното отделяне.

### Роля на организацията на фотосинтетичия апарат за устойчивостта му към замразяване

Промените, които настъпват в ТМ под въздействие на замразяването са сходни с уврежданията, които настъпват при засушаване. Поради тази причина, получените *in vitro* резултати дават ценни сведения, както за устойчивостта на ФСА към замразяване, така и за промените при засушаване. В предишни изследвания е показано, че замразяването на ТМ в присъствие на NaCl води до инхибиране на активността на ФСII, което е следствие не само на изменения във функционирането на кислород-отделящата система, но също така и на промени в акцепторната страна на ФСII (Hinch et al. 1996). Изследванията на електронния транспорт в присъствие на различни донори и акцептори на електрони, показват, че акцепторната страна на ФСII се инхибира по-силно при замразяването отколкото донорната страна (Öquist and Ögren, 1985). Промените в ТМ при замразяване влияят върху преразпределението на енергията на възбуждане между двете фотосистеми (фиг. 11). Настъпилите изменения зависят от състава на средата по време на процеса замразяване-размразяване, докато при замразяване в присъствие само на криотоксична сол промените зависят и от организацията на ССКII. Замразяването на ТМ в среда съдържаща само NaCl, води до инхибиране на ФСII-зависимия електронен транспорт в присъствие на външен акцептор бензохинон (фиг. 12). Степента на инхибиране на електронния транспорт намалява с увеличаване на количеството на олигомерните форми на ССКII в ТМ. Имайки предвид, че промяната на олигомеризацията на ССКII е свързана с разлики в липидното съдържание (фиг. 7) може да се предположи, че наблюдаваните изменения са в резултат, както от промяна в организацията на ССКII, така и от промяна в липидния състав на ТМ. При ТМ с повече олигомерни форми на ССКII и съответно по-ниска плътност на повърхностния заряд и повече гранални тилакоиди при *Ворес* и мутанта *Coeruleovireus* 2/16 промените биха могли да се дължат и на това, че достъпът на криотоксичните йони до комплекса на ФСII е ограничен. Анализът на кинетиката на кислородно отделяне показва, че има намаление на бързата ( $k_1$ ) и липса на изменение при бавната скоростна константа ( $k_2$ ) на кислородно отделяне. Тези резултати дават право да се предположи, че при замразяване в присъствие на криотоксична сол се модифицират предимно ФСII $\alpha$  центрoвете. В присъствие на криопротектори, индуцираните от замразяването промени намаляват. Ефектът на криопротекторните субстанции, като захарозата върху стабилността на ТМ и запазването на ФСII-зависимия електронен транспорт (фиг. 12) може да се дължи на независими ефекти върху липидния бислой и върху свързването на 33



kDa периферен белтък към комплекса на ФСII (Williams and Gounaris, 1992). При взаимодействието на криопротекторите с ТМ намалява флуидитета на липидния бислой близо до повърхността на мембраната (Sror et al., 2003), което влияе върху латералната дифузия на пластохинона и води до повлияване на кислородното отделяне при постоянно осветяване без външен акцептор (фиг. 12). Сравнявайки ТМ с различна олигомеризация на ССКII става ясно, че организацията на ФСII суперкомплекса, повърхностния заряд на ТМ и количеството на анионните липиди в ТМ имат съществено значение за предизвиканите от замразяването промени в преразпределението на енергия между ФСII и ФСI, както и в кислородното отделяне, когато ТМ са замразявани в NaCl среда. Анализирайки получените резултати може да се предположи, че при увеличаване на степента на олигомеризация на ССКII и намаляване на анионните липиди промените предизвикани от замразяването са по-малки.

### Влияние на светлина с висок интензитет върху функциите на ТМ с различна организация

Резултатите, които получихме показват ролята на олигомерното състояние на ССКII и липидния състав на ТМ за устойчивостта на ФСА към фотоинхибиране. Известно е, че степента на фотоинхибиране при светлинно третиране зависи от отношението на скоростите на фотоувреждане и на ресинтез на D1 белтъка (Yamamoto, 2001). Предполага се, че в процеса на фотоинхибиране се осъществяват модификации, както в акцепторната така и в донорната страна на ФСII (Vass et al., 2007). Тези изменения могат да бъдат причина за инхибирането на първичната фотохимия на ФСII, което наблюдавахме след светлинното третиране на изследваните растения (фиг. 14). Инхибирането на максималния квантов добив ( $\Phi_{P_0}$ ) е различно за отделните изследвани линии грах и зависи от степента на олигомеризация на ССКII. За разлика от промените в  $\Phi_{P_0}$  по време на светлинното третиране, степента на възстановяване след третирането не зависи от отношението на олигомерните към мономерните форми на ССКII (фиг. 14). Получените резултати показват, че инхибирането на фотосинтетичното кислородно отделяне е по-силно в сравнение с инхибирането на първичната фотохимия на ФСII (фиг. 14 и фиг. 15). В растения с по-голяма степен на олигомеризация на ССКII (*Coeruleovireus 2/16*, *Wogec* и *Costata 2/133*), наблюдавахме по-слабо инхибиране на първичната фотохимия на ФСII и на кислородното отделяне в сравнение с линиите *Chlorotica XV/1422* и *Auralia*. Различната степен на фотоувреждане, която наблюдавахме при отделните линии грах може да се дължи на различната гранална структура на техните ТМ. В предишни изследвания е показано, че растенията с повече олигомерни форми имат повече гранално пакетирани тилакоиди (Stoitchkova et al., 2006). Резултатите от нискотемпературната (77K) флуоресценция показват, че преразпределението на енергия между двете фотосистеми зависи от продължителността на светлинния стрес (фиг. 18).

Наблюдаваното нарастване (до 45 мин от началото на осветяване) на отношението  $F_{735}/F_{685}$ , което отразява отношението на нискотемпературна флуоресценция, излъчена от ФСІ спрямо флуоресценцията излъчена от ФСІІ може да се свърже със структурна реорганизация в ТМ. Следващото намаление на това отношение при увеличаване на продължителността на светлинно третиране до 120 мин вероятно се дължи на увреждане на пигмент-белтъчните комплекси (фиг. 18). Може да се предположи, че отношението на олигомерни към мономерни форми на ССКІІ, както и липидния състав на ТМ имат значение за динамичното преструктуриране на ФСА под действие на светлината и за промяната в разпределението на енергия на възбуждане между ФСІІ и ФСІ. Получените резултати за инхибирането на максималния квантов добив подкрепят хипотезата на Anderson и Aro (1994), според която центрите на ФСІІ, които са загубили функционална активност предпазват активните центрове в стикованите гранални участъци по време на осветяване със светлина с висок интензитет. От друга страна в литературата съществуват данни за структурната роля на МГДГ при формирането на граните, а също така и ролята му при защитата на ФСА от светлинен стрес (Aronsson et al., 2008). Имайки предвид тези данни, може да се предположи, че друга възможна причина за наблюдаваните от нас разлики в степента на фотоинхибиране между изследваните линии грах е тяхното различно липидно съдържание и по специално различното количество на МГДГ в ТМ (табл. 4). Schaller et al. (2011) предполагат, че важна роля за регулиране на активността на виолаксантин-деепоксидазата при условия на светлинно насищане на ФСА играе молекулата на МГДГ. Според тяхното изследване количеството на виолаксантина в състава на ССКІІ корелира с количеството на МГДГ, свързан със ССКІІ. Предполага се, че намалението на олигомеризацията на ССКІІ е съпроводено с увеличен капацитет за гасене на енергията на възбуждане в рамките на РЦ и промяна в редокс потенциалната разлика между  $Q_A$  и  $Q_B$  (Ivanov et al., 2005). Може да се предположи, че увеличената чувствителност към фотоувреждане на ТМ, характеризиращи се с намалено количество на олигомерните форми на ССКІІ е резултат от измененията, които настъпват в редокс свойствата на  $Q_A$  и  $Q_B$ . Липидният анализ, показва корелация между намалението на съдържанието на МГДГ и нарастването на количеството на анионните липиди (ФГ и СХДГ, табл. 4) в ТМ. От своя страна анионните липиди са по-малко в мембраните, характеризиращи се с по-високо отношение на олигомерни към мономерни форми на ССКІІ. Връзката между степента на фотоинхибирането на функциите на ФСІІ и количеството на анионните липиди е обобщена на фиг. 17. Предишни изследвания са показали, че намаляването на съдържанието на ФГ в ТМ води до промени в електронния транспорт във ФСІІ, като инхибира преноса между  $Q_A$  и  $Q_B$  (Gombos et al., 2002). Измененията в обкръжението на  $Q_B$  може да доведе до значително модифициране на електрон-транспортните свойства на ФСІІ, което да бъде причина за по-висока чувствителност към фотоинхибиращо третиране.

Нашите резултати позволяват да се предположи, че липидният състав на ТМ е от значение за чувствителността на ФСА към третиране със светлина с висок интензитет. По-голямото отношение на олигомерните към мономерните форми на ССКII, което корелира с намаление на количеството на анионните липиди (ФГ и СХДГ), води до намаляване на чувствителността на ФСА към светлинен стрес (фиг. 17). Получените резултати дават право да се предположи специфична роля на анионните липиди за чувствителността на ФСА към светлинен стрес. В заключение може да обобщим, че получените данни позволяват да предположим съществената роля на олигомерното състояние на ССКII, както и на липидния състав на ТМ за чувствителността на ФСА към светлинен стрес.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представените в дисертацията резултати показват ролята на организацията на фотосистема II, липидния и пигментния състав на тилакоидните мембрани за функционалната активност на фотосинтетичния апарат и неговата устойчивост към абиотичен стрес. Настоящата работа представя нови факти за значението на олигомерното състояние на светосъбиращ комплекс II, количеството на анионните липиди и на каротиноидите за температурната стабилност и чувствителността на фотосинтетичния апарат към светлина с висок интензитет. Данните в дисертационния труд разширяват познанията ни за механизмите на защита на растенията към промените в околната среда и могат да бъдат полезни в приложни направления, като селското стопанство и опазването на природата.

## **ИЗВОДИ**

1. Установено е, че при намаление на каротиноидното съдържание с 25% се инхибира кислородното отделяне, но не се повлиява фотохимията на ФСI и ФСII.
2. Намалението на каротиноидите с повече от 40% води до инхибиране на функциите на двете фотосистеми, като степента на инхибиране на максималния квантов добив на ФСII и окислението на  $P_{700}$  е по-малка от степента на инхибиране на светкавичните кислородни добиви и кислородното отделяне при постоянно осветяване.
3. Структурните промени в комплекса на ФСII при намаление на количеството на каротиноидите водят до модифициране на функционално активните центрове на ФСII, като промените засягат основно ФСII $\alpha$  центрoвете в граните. Установено е, че донорната страна

на ФСII е по-чувствителна към увреждане при намаление на каротиноидите в сравнение с акцепторната страна на ФСII.

4. Анализът на промените в кинетиката на редукция на  $P_{700}^{+}$  показва по-силно влияние на намаленото съдържание на каротиноиди върху ФСI в неадхезираните участъци на граните, отколкото върху ФСI, разположени в стромалните участъци на тилакоидните мембрани.
5. Установено е намаление на количеството на анионните липиди и нарастване на количеството на МГДГ в тилакоидни мембрани с повече олигомерни форми на светосъбиращ комплекс II.
6. Намалението на количеството на анионните липиди в тилакоидните мембрани, което корелира с увеличено отношение на олигомерни към мономерни форми на светосъбиращ комплекс II води до по-малка чувствителност на фотосинтетичния апарат към светлина с висок интензитет.
7. Намалението на количеството на каротиноидите в тилакоидните мембрани води до намаление на температурната стабилност на фотосинтетичния апарат. При растенията с по-ниско съдържание на каротиноиди се наблюдава по-силно инхибиране на фотосинтетичното кислородно отделяне и на фотохимията на ФСII.
8. Модификациите настъпващи в акцепторната страна на ФСII при отрицателни температури, които повлияват взаимодействието на вторичния хинонов акцептор  $Q_B$  с пластохинона, зависят от организацията на светосъбиращ комплекс II. Промените настъпващи в акцепторната страна на ФСII при замразяване намаляват с нарастване на количеството на олигомерните форми на светосъбиращия комплекс II.

## **СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ**

1. Установено е, че при намаление на съдържанието на каротиноидите се увреждат основно ФСII $\alpha$  центровете в граните, като по-силно повлияна е донорната страна на ФСII.
2. За първи път е показано, че количеството на олигомерните форми на светосъбиращия комплекс на ФСII корелира с количеството на анионните липиди в тилакоидните мембрани.

3. Представени са за първи път експериментални доказателства показващи, че анионните липиди фосфатидилглицерол и сулфохиновозил диацилглицерол, както и организацията на светосъбиращ комплекс II определят чувствителността на фотосинтетичния апарат към светлина с висок интензитет.
4. Показано е, че липидният състав, каротиноидното съдържание и организацията на светосъбиращ комплекс II имат съществено значение за стабилността на фотосинтетичния апарат при високи температури и при замразяване.

### **СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Dankov K., Busheva M., Stefanov D., Apostolova E. (2009) Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of the photosynthetic apparatus. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 96, 49-56.
2. Dankov K., Dobrikova A., Ughy B., Bogos B., Gombos Z., Apostolova E. (2011) LHCII organization and thylakoid lipids affect the sensitivity of the photosynthetic apparatus to high-light treatment, *Plant Physiol. Biochemistry* 49, 629-645.
3. Dankov K., Taneva SG., Apostolova E. (2009) Freeze-thaw damage of photosynthetic apparatus. Effect of organization of LHCII-PSII Supercomplex. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 62 (9), 1103-1110.
4. Dankov K., Dobrikova A., Bogos B., Gombos Z., Apostolova E. (2009) Role of anionic lipids in LHCII organization and photoinhibition of the photosynthetic apparatus. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 62 (8), 941-948.

### **УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ И СЕМИНАРИ**

K. Dankov, A. Dobrikova, B. Bogos, Z. Gombos, E. Apostolova „Role of lipid composition and LHCII organization during photoinhibition of the photosynthetic apparatus” FEBS Workshop ‘Lipids as regulators of cell function’ 16-21 June 2008 Spetses, Greece (постер – Program and abstracts, p.28).

K. Dankov, E. Apostolova „Influence of the PSII organization on the response of the photosynthetic apparatus to high light intensity” Conference 'Responses of Plants to Environmental Stresses' 12-18 May 2008, Elena, Bulgaria (постер – Program and abstracts, p.59).

K. Dankov, S. Ivanov, P. Kerchev, M. Busheva, E. Apostolova, “Influence of fluridone on the structure and function of photosynthetic apparatus” Workshop “Sustainability: Stress and Bases of Plant Resistance” 08 Sept 2006, Sofia, Bulgaria (постер – Program and abstracts, p.28).

К. Данков, Е. Апостолова “Приложение на модулираната флуоресценция за изследване ролята на организацията на фотосинтетичния апарат в процесите на фотоинхибиране” 9-ти семинар на докторантите от физическите институти на БАН, 14-15.12.2006 Златни мостове, Витоша (доклад – Програма и абстракти, p.28).

К. Данков „Каротиноидните пигменти във фотосинтетичния апарат – функции и значение”, III-ти УЧЕБЕН СЕМИНАР по Проект BG051PO001-3.3.04/42 на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, 28.04.2011, ФзФ - СУ, София (доклад).

## **ЛИТЕРАТУРА ЦИТИРАНА В АВТОРЕФЕРАТА**

1. Anderson J., Aro E. (1994) Grana stacking and protection of Photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: An hypothesis, *Photosynth. Res.* 41: 315-326.
2. Andreeva A., Stoitchkova K., Busheva M., Apostolova E. (2003) Changes in the energy distribution between chlorophyll–protein complexes of thylakoid membranes from pea mutants with modified pigment content: I. Changes due to the modified pigment content. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 70, 153-162.
3. Apostolova E.L., A.G. Dobrikova, P.I. Ivanova, I.B. Petkanchin, S.G. Taneva, Relationship between the organization of the PSII supercomplex and the functions of the photosynthetic apparatus, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 83 (2006) 114-122.
4. Aronsson H., Schöttler M., Kelly A., Sundqvist C., Dörmann P., Karim S., Jarvis P. (2008) Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in Arabidopsis affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves, *Plant Physiol.* 148, 580-592.
5. Baker N., Chlorophyll Fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo, *Ann. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 89-113.
6. Dalla Vecchia F., R. Barbato, N. La Rocca, I. Moro, N. Rascio, Responses to bleaching herbicides by leaf chloroplasts of maize plants grown at different temperatures, *J. Exp. Botany* 52 (2001) 811-820.

7. Demmig-Adams B., W. W. Adams, Photoprotection and other responses of plants to high light stress, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 (1992) 599-626.
8. Di Baccio D., M.F. Qurtacci, F.D. vecchia, N.La Rocca, N. Rascio, F. Navari\_Izzo, Bleaching herbicide effects on plastids of dark-grown plants:lipid composition of etioplasts in amitrole and norflurazon-treated barley leaves, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1857-1865.
9. Dobrikova A., A. Ivanov, E. Apostolova, N. Naydenova, I. Petkanchin, S.G. Taneva, Contribution of LHCII complex to the electric properties of thylakoid membranes, in: N. Gözükirmizi (Ed.), *Proceedings of the Second Balkan Botanical Congress*, Marmara University, Publishing Section, Istanbul-Turkey, 2001, pp.75-80.
10. Dobrikova A., R. Morgan, A. Ivanov, E. Apostolova, I. Petkanchin, P.A. Huner, S.G. Taneva, Electric properties of thylakoid membranes from pea mutants with modified carotenoid and chlorophyll-protein complexes composition, *Photosynth. Res.* 65 (2000) 165-174.
11. Dubertret G., Gerard-Hirne C., Tremolieres A., Importance of trans- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimeric light-harvesting complex in *Chlamydomonas* (2002) *Plant Physiol. Biochem.* 40: 829-836.
12. Endo T., Mi H., Shikarai T., Asada K. (1997) Donation of electron to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 38, 1272-1277.
13. Gombos Z., Várkonyi Z., Hagi M., Iwaki M., Kovács L., Masamoto K., Itoh S., Wada H. (2002) Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q(B) in the photosystem II reaction center, *Biochemistry* 41, 3796-3802.
14. Harrison M.A., Melis A. (1992) Organization and stability of polypeptides associated with the chlorophyll a-b light-harvesting complex of photosystem-II, *Plant Cell Physiol* 33, 627-637.
15. Hincha D.K., Sieg F., Bakaltcheva I., Koth H., J. Schmitt (1996) Freeze-thaw damage to thylakoid membranes: Specific protection by sugars and proteins, in: *Advances in Low-Temperature Biology*, Vol. 3, pp. 141-183.
16. Horton P., A.V. Ruban, R.G. Walters, Regulation of light harvesting in green plants, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 655-684.
17. Ivanov A.G., Krol M., Apostolova E.L., Morgan-Kiss R.M., Naydenova N., Huner N.P.A., Sane P. (2005) Oligomerization state of LHCII modulates the redox properties of the acceptor side of photosystem II in *Costata-2/133* mutant of pea, *Physiol. Mol. Biol. Plants* 11, 199-207.
18. 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.

19. 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.
20. Lichtenthaler H.K., Chlorophylls and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzym.* 148 (1987) 350–382.
21. Maani A., Dubertret G., Delrieu M., Roche O., Tremolieres A. (1998) Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* affected in phosphatidylglycerol metabolism and thylakoid biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271: 609-619.
22. Mohanty P., Vani B., Prakash S. (2002) Elevated temperature treatment induced alteration in thylakoid membrane organization and energy distribution between the two photosystems in *Pisum sativum*. *Z. Naturforsch* 57, 836-842.
23. Mullet J.E., Klein P.G., Klein R. (1990) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 4038-4042.
24. Öquist G., E. Ögren, Effect of winter stress on photosynthetic electron transport and energy distribution between the two photosystems of pine as assayed by chlorophyll fluorescence kinetics, *Photosynth. Res.* 7 (1985) 19-30.
25. Sato N., Murata N., Membrane Lipids (1988) *Methods Enzymol.* 167: 251-256.
26. Schaller S., Latowski D., Jemioła-Rzemińska M., Dawood A., Wilhelm C., Strzałka K., Goss R. (2011) Regulation of LHCII aggregation by different thylakoid membrane lipids. *BBA* 1807, 326–335.
27. Srór H.A.M., G. Tischendorf, F. Sieg, J.M. Schmitt, D.K. Hinch, Cryoprotectin protects thylakoids during freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding, *Cryobiology* 47 (2003) 191-203.
28. Steinback K., J Burke, C. Arntzen, Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in cation-mediated control of chloroplast structure and function, *Arch. Biochem. Biophys.* 195 (1979) 546-557.
29. Stoitchkova K., M. Busheva, E. Apostolova, A. Andreeva (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: Biology* Vol. 83, 1, 11-20.
30. Takeuchi T., Thornber J. (1994) Heat-induced alterations in thylakoid membrane protein composition in barley, *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 759 – 770.
31. Trebst A., B. Depka, Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* 400 (1997) 359–362.
32. Vass, K. Cser, O. Cheregi, Molecular mechanisms of light stress of photosynthesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113 (2007) 114-22.
33. Webb M.S., Green B.R., Biochemical and physical properties of thylacoid acyl lipids, (1991) *BBA* 1060: 133-158.



34. Williams W. P., K. Gounaris (1992) Stabilisation of PS-II-mediated electron transport in oxygen-evolving PS II core preparations by the addition of compatible co-solutes BBA, 1100, 92–97.
35. Yamamoto Y. (2001) Quality Control of Photosystem II, Plant and Cell Physiology, 42 (2), 121-128.
36. Zeinalov Y. (2005) Mechanisms of photosynthetic oxygen evolution and fundamental hypotheses of photosynthesis, in: M. Pessarakli (Ed.), Handbook of Photosynthesis, second ed., CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 129-150.
37. Zeinalov Y., Maslenkova L. (1996) Mechanisms of photosynthetic oxygen evolution, in: Pessarakli M. (Eds.), Handbook of Photosynthesis. New York, Marcel Dekker, pp. 129-150.
38. Zeinalov Y., Equipment for investigations of photosynthetic oxygen production reactions, Bulg. J. Plant Physiol. 28 (2002) 57-67.
39. Масленкова Л. (2009) Дисертация за присъждане д.б.н., Хетерогенност на кислород-отделящите центрове и механизми на фотосинтетичното кислородно отделяне. Роля в процесите на увреждане и адаптация в условия на стрес.