

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

AUŠRINĖ NAVICKAITĖ

(Neurobiofizikos studijų programa)

Bakalauro baigiamasis darbas

**MENTURDUMBLIO *NITELLOPSIS OBTUSA* LĄSTELIŲ CHLOROFILO
FLUORESCENCIJOS TYRIMAS**

Darbo vadovas dokt. Vilmantas Pupkis

(parašas)

Studentas _____
(parašas)

Konsultantas prof. Saulius Bagdonas

(parašas)

Vilnius, 2022

TURINYS

IVADAS.....	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1 <i>Characeae</i> šeimos dumbliai ir jų tyrimai	5
1.2 pH juostos <i>Characeae</i> šeimos dumbliuose	6
1.3 Fluorescencijos spektroskopija	8
1.4 Chlorofilo fluorescencija	10
1.4.1 Chlorofilo fluorescencijos tyrimai pH juostų įvertinimui	12
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	14
2.1 Bandiniai	14
2.2 Fluorescencijos spektrų registravimas	14
2.3 Apšvietimo sąlygų įtakos tyrimo metodikos	15
2.3.1 Laikinės kontrolės matavimai	15
2.3.2 Skirtingos trukmės švitinimo poveikio įvertinimas.....	16
2.4 Duomenų analizė	16
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	18
3.1 <i>Nitellopsis obtusa</i> fluorescencijos spektrai.....	18
3.2 <i>Nitellopsis obtusa</i> fluorescencijos parametrų pokyčiai išilgai ląstelės.....	18
3.3 <i>Nitellopsis obtusa</i> fluorescencijos parametrų priklausomybė nuo apšvietimo sąlygų	20
3.3.1 <i>Nitellopsis obtusa</i> fluorescencijos parametrų laikiniai pokyčiai skirtingo apšvietimo sąlygomis.....	21
3.3.2 <i>Nitellopsis obtusa</i> fluorescencijos parametrų priklausomybė nuo švitinimo trukmės	23
3.4 <i>Nitellopsis obtusa</i> fluorescencijos parametrų priklausomybė nuo ląstelių laikymo sąlygų.....	30
IŠVADOS.....	33
SANTRAUKA	34
SUMMARY	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	36
PRIEDAI	41

IVADAS

Fotosintezė yra pagrindinis deguonies ir maisto medžiagų šaltinis, aprūpinantis daugumą organizmų organinėmis medžiagomis. Būtent šis daugiapakopis procesas apsprendžia augalų augimo ir brendimo spartą (Baslam ir kt., 2020), todėl augant pasaulio gyventojų skaičiui ir agrokultūros problemoms tampant vis aktualesnėmis, detalesnis fotosintezės išaiškinimas ir ją paveikiančių veiksnių identifikavimas tampa būtinybe.

Viena iš plačiausiai taikomų eksperimentinių metodikų, suteikiančių informacijos apie fotosintetinius procesus – chlorofilo fluorescencijos spektrų registravimas. Fluorescencinis signalas renkamas greitai ir neinvaziškai, o dėl nesudėtingo technikos derinimo su kitais optiniais eksperimentiniais metodais: sugerties spektrų registravimu, refraktometrine analize, gaunami rezultatai ne tik suteikia daug informacijos apie tiriamą sistemą, bet ir leidžia sieti skirtingais metodais gaunamus parametrus (Baker, 2008). Šis privalumas svarbus norint identifikuoti veiksnius, lemiančius fotosintetinio aktyvumo pokyčius, bei užtikrinant gaunamų rezultatų patikimumą.

Menturdumblių tarpubamblinės ląstelės – unikali modelinė sistema fotosintetinių procesų tyrimuose. Pastovaus apšvietimo sąlygomis išilgai šių dumblių ląstelių stebimos skirtingo rūgštingumo zonos, siejamos su fotosintetinio aktyvumo skirtumais išilgai tarpubamblų (Bulychev ir kt., 2001a). Nepaisant to, kad šio reiškinio atsiradimas tiriamas jau kelis dešimtmečius, tikslus sričių susiformavimo mechanizmas nėra išaiškintas. Dauguma eksperimentų atlikti su *Chara corallina* ląstelėmis, pasitelkiant fluorescencijos kinetikos parametrus pateikiančią techniką, todėl išsami spektrinė analizė dar nėra atlikta. Taigi, siekiant išaiškinti skirtingo rūgštingumo sričių susiformavimą ir šio reiškinio svarbą fotosintetiniams procesams, reikalingas detalesnis nuostoviosios fluorescencijos spektrų įvertinimas, o eksperimentų atlikimas su kitos rūšies menturdumblių ląstelėmis ne tik prisidėtų prie procesų fiziologinės prasmės išaiškinimo, bet taip pat leistų spręsti apie skirtumus tarp organizmų.

Darbo tikslas – pritaikyti fluorescencijos spektroskopiją, įvertinant *Nitellopsis obtusa* fotosintetinį aktyvumą.

Uždaviniai:

- optimizuoti *Nitellopsis obtusa* autofluorescencijos registravimo sistemą;
- įvertinti skirtingų fluorescencijos parametrų tinkamumą fotosintetinio aktyvumo skirtumams *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinėse ląstelėse aptikti;
- įvertinti *Nitellopsis obtusa* fotosintetinio aktyvumo pokyčius išilgai tarpubamblinės ląstelės skirtingo apšvietimo sąlygomis;

- įvertinti *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių autofluorescencijos parametrų priklausomybę nuo ląstelių laikymo sąlygų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 *Characeae* šeimos dumbliai ir jų tyrimai

Characeae dumblių ląstelės jau daug dešimtmečių naudojamos kaip modelinės sistemos augalų fiziologijos tyrimuose. Pagrindinė šio taikymo priežastis – unikali tarpubamblių geometrija, vienos *Chara* ląstelės skersmuo yra apie 1 mm, o ilgis gali siekti iki 10 cm (Braun ir kt., 2007). Dėl šio privalumo augalų fiziologijos tyrimo metodai yra lengvai pritaikomi *Characeae* dumbliams, o ir dalis svarbių organizmų struktūros ir fiziologijos principų pirmiausia ištirti dumblių tarpubamblinėse ląstelėse ir tik po to patvirtinti aukštesniuose augaluose (Foissner ir Wasteneys, 2014). Be to, šios modelinės sistemos taikymo prasmingumas pagrįstas ir filogenetiniais tyrimais. Nustatyta, kad *Characeae* šeimos dumbliai yra artimiausi organizmai aukštesniesiems augalams (Karol ir kt., 2001). Toks giminingumas reiškia, kad dauguma šeimai būdingų ląstelinių procesų ir jų mechanizmų yra tokie patys kaip aukštesniųjų augalų, todėl ir dumblių tyrimai yra tiesiogiai susiję su detalesniu augalų fiziologijos išaiškinimu.

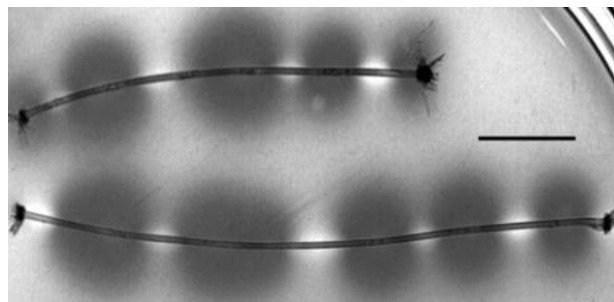
Plačiausiai *Characeae* dumbliai taikomi elektrofiziologiniuose eksperimentuose, dėl gebėjimo generuoti elektrinius signalus ir nesudėtingo mikroelektrodų įvedimo į ląsteles. Šie signalai yra sąlygoti membranos pernašos sistemų veikimo ir gali lemti kitų fiziologinių procesų pokyčius (Beilby ir Casanova, 2014). Modelinės sistemos patogumas taip pat leidžia atlikti ir įvairias kituose organizmuose sunkiai įvykdomas eksperimentines procedūras. Nesudėtingai pašalinama citoplazma, pakeičiama ląstelės vidinio turinio sudėtis, galima atlikti lokalaus apšvietimo ir cheminių medžiagų poveikio tyrimus (Foissner ir Wasteneys, 2014). Dėl šio privalumo *Characeae* dumbliai naudojami ne tik elektrofiziologiniuose eksperimentuose, bet ir ląstelės citoskeleto (Foissner ir kt., 2009), organelių sąveikos (Bulychev ir Komarova, 2015), fotosintetinio aktyvumo (Plieth ir kt., 1994; Bulychev ir kt., 2001a) bei kitų svarbių augalų savybių ir procesų tyrimuose.

Kadangi vis aktualesnės tampa ekologinės problemos, *Characeae* šeima taip pat pasitelkiama ir ekosistemų būklės įvertinimui. Dumbliai yra jautrūs įvairių aplinkos veiksnių pokyčiams: terpės cheminės sudėties, temperatūros, šviesos kiekio ir kt., todėl yra laikomi bioindikatoriais ir leidžia spręsti apie vandens telkinių užterštumą (Beaune ir kt., 2018). Taip pat, palankiomis sąlygomis dumbliai sukaupia didžiąją dalį ekosistemos maistinių medžiagų bei tuo pačiu absorbuoja toksinus ir sunkiuosius metalus (Kufel ir Kufel, 2002). Dėl šios savybės siūloma dumblius naudoti ir aplinkos taršos mažinimui, pasitelkiant naujas ir perspektyvias bioremediacijos technikas (Newete ir Byrne, 2016; Herbst ir kt., 2019).

Nors dumblių ląstelės ir yra plačiai naudojamos tyrimuose, kelios iš taikymą apribojančių priežasčių yra molekulinės biologijos duomenų ir metodų, tinkančių genetiškai transformuoti organizmus, trūkumas. Nepaisant to, kad 2018 m. paskelbtas *Chara braunii* genomas (Nishiyama ir kt., 2018), be šio tyrimo viešai publikuotos vos kelios baltymų sekos, nustatytos *Characeae* dumbliuose (Kashiyama ir kt., 2000; Hoepflinger ir kt., 2013). Kitas svarbus trūkumas – naudojamos kultūros nėra sterilios, o mikroorganizmai tarpubamblių ląstelių paviršiuje gali būti problema taikant tokius metodus, kaip fluorescencinė mikroskopija, jei organizmai turi autofluorescuojančių medžiagų (Foissner ir Wasteneys, 2014).

1.2 pH juostos *Characeae* šeimos dumbliuose

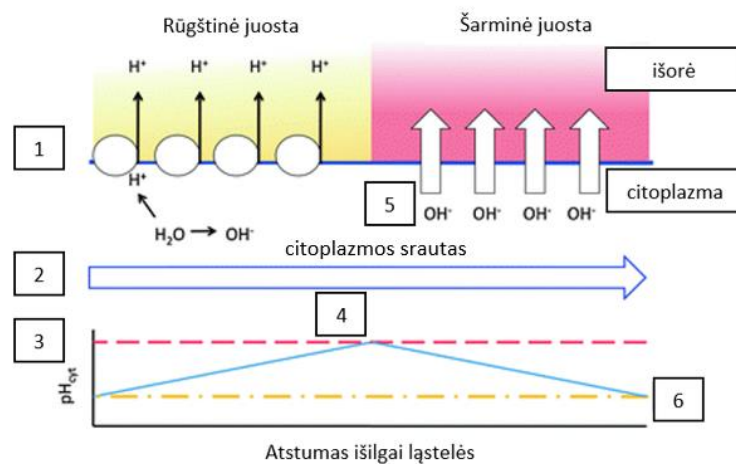
Skirtingų pH verčių zonų susiformavimas terpėje aplink *Characeae* dumblių tarpubamblių ląsteles (1.1 pav.) pastebėtas daugiau nei prieš 50 metų (Spear ir kt., 1969; Lucas ir Smith, 1973). Reiškiny stebimas tik pastovaus apšvietimo sąlygomis, suformuotų rūgštinių juostų pH vertės artimos 5,5, o šarminėse zonose kinta nuo 8,5 iki 9,5 (Lucas ir Smith, 1973). Sritys yra priklausomos nuo plazminės membranos pernašos procesų – rūgštinių zonų susiformavimą lemia H^+ -ATPazių veikimas (Tazawa, 2003). Tačiau vis dar trūksta žinių apie transporto sistemas atsakingas už šarmines sritis. Manoma, kad jos yra susijusios su H^+ srautu į ląstelę, arba OH^- pernaša iš ląstelės, tačiau modeliavimo duomenys rodo, jog OH^- srautas yra labiau tikėtinas (Beilby ir kt., 2017), o 2021 m. identifiкуotas CaSLOT genas, atsakingas už OH^-/H^+ transporto sistemą, kuri galėtų lemti šarminių zonų susiformavimą (Quade ir kt., 2021).



1.1 pav. pH juostos *Chara australis* tarpubamblinėje ląstelėje, vaizdintos fenolio raudonuoju indikatoriumi. Tamsios sritys žymi šarmines juostas ($pH > 8,2$), šviesios – rūgštines ($pH < 6,8$). Mastelis 1 cm (Beilby ir Bisson, 2012)

Kadangi skirtingo rūgštingumo sričių egzistavimui būtina šviesa, o didesnis šviesos intensyvumas taip pat lemia ir didesnę juostų skaičių (Bulychev ir kt., 2003), įvertintas ryšys tarp skirtingų sričių ir fotosintetinio aktyvumo. Pastebėta, kad rūgštinėse zonose chloroplastai yra didesni

nei šarminėse srityse (Foissner ir Wasteneys, 2014), o fotosintezė yra efektyvesnė (Plieth ir kt., 1994; Bulychev ir kt., 2001a). Toks prisitaikymas svarbus dumbliams, augantiems silpnai šarminėje aplinkoje, kadangi maža išorinės terpės pH vertė lemia prastai plazminę membraną pereinančio bikarbonato konversiją į CO_2 , o šis junginys membraną pereina lengvai ir yra būtinas Kalvino ciklui (Raven ir Hurd, 2012). Be to, CO_2 fiksacija taip pat yra ir vienas iš procesų, padedančių aiškinti pH juostų susidarymą, kadangi jos rezultatas gali lemti hidroksilų išskyrimą į citoplazmą. Beilby ir Bisson (2012) pateikiamas modelis teigia, jog terpę rūgštinančių transporto sistemų veikimas lemia citoplazmos šarmėjimą (1.2 pav.). Vykstant ciklozei, citoplazmai spirališkai judant išilgai ląstelės, stebimi pH vertės pokyčiai. Kuo ilgiau citoplazma išbūna po rūgštine juosta, tuo labiau jos pH didėja. Pasiekus kritinę vertę, vyksta signalų perdavimas, lemiantis pasyvų OH^- srautą iš ląstelės ir susiformuoja šarminė zona ląstelės išorėje. Vienintelis tyrimas prieštaraujantis šiam modeliui yra Bulychev ir kt. (2003) eksperimentas, nustatęs, kad NH_4Cl , didinantis citoplazmos pH, stabdo juostų susidarymą, o natrio acetatas skatina. Toks rezultatas leistų manyti, jog juostų susiformavimo mechanizmas yra priešingas – šarminės sritys lemia rūgštinių zonų susidarymą (Beilby ir Bisson, 2012).



1.2 pav. pH juostų susiformavimo modelis. (1) Transporto procesai, lemiantys citoplazmos šarmėjimą. (2) Ciklozė. (3) Kuo ilgiau citoplazma išbūna po rūgštine juosta, tuo labiau ji šarmėja, o pasiekus kritinę pH vertę (4), membranos transporto savybės pasikeičia, vyksta pasyvus OH^- srautas iš ląstelės (5). pH vertei sumažėjus (6) membrana atkuria įprastą H^+ pompos veikimą. Adaptuota pagal Beilby ir Bisson (2012)

Kita hipotezė, aiškinanti pH juostų susiformavimą, teigia, kad skirtumai atsiranda dėl nevienodo ATP sintezės pajėgumo chloroplastuose, skirtingose ląstelės srityse (Bulychev ir kt., 2005). Mažesnio efektyvumo sintezės zonose citoplazmos H^+ koncentracija sumažėja. Manoma, kad šis pokytis lemia mažesnę plazminės membranos protonų pompos aktyvumą (Hager, 2003), priverčia

atsiverti aukštos pH vertės kanalus, dėl ko H^+ srautas į ląstelę padidėja ir ląstelės išorėje terpės pH vertė tampa didesnė (Bulychev ir Krupenina, 2008). Srityse, kur ATP sintezė vykdoma efektyviau, protonų pompos aktyvumas nėra slopinamas, šarmėjimas išvengiamas ir susiformuoja rūgštinė juosta. Be to, rūgštinėse srityse H^+ pompos veikimą užtikrina ir didesnis ATP kiekis, kurį lemia mitochondrijų susikaupimas aukšto fotosintetinio aktyvumo zonose (Foissner, 2004).

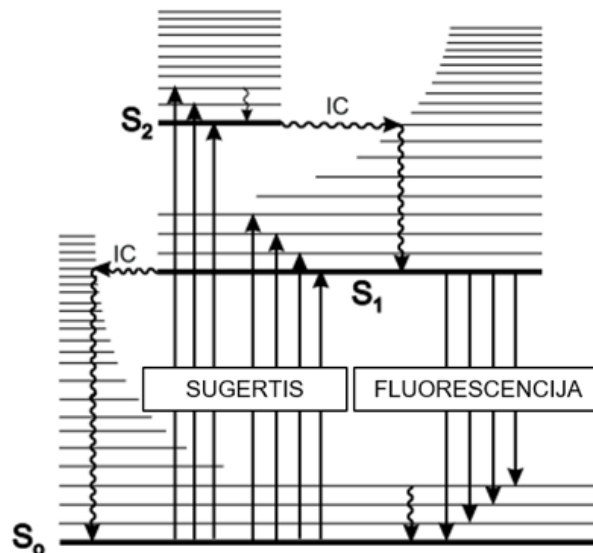
1.3 Fluorescencijos spektroskopija

Molekulių ir šviesos sąveikai tirti naudojami spektroskopiniai metodai ypač patrauklūs biologinių objektų tyrimuose, kadangi užtikrina greitą rezultatų registravimą ir yra neinvaziniai (Ramanujam, 2000). Fluorescencijos spektroskopija – tai viena iš daugelio šios grupės technikų, kuri dėl savo universalumo taikoma skirtingų fizikinių, cheminių ir biologinių procesų tyrimuose. Be to, visapusiška technologinė pažanga: naujų fluorescuojančių junginių sintezė, moderni registravimo įranga bei naujos duomenų analizės priemonės, užtikrina vis didesnę metodo populiarumą ir platesnes taikymo galimybes (Lakowicz, 2006).

Taip pat kaip ir kiti spektroskopiniai metodai, fluorescencijos registravimas pagrįstas šviesos sukeltų energinių vyksmų molekulėse, įprastai vaizduojamų Jablonskio diagrama (1.3 pav.), stebėjimu (Lakowicz, 2006). Fluorescencija vyksta tiriamą objektą paveikus šviesa, jei naudojamas bangos ilgis pakliūna į tiriamos medžiagos sugerties spektrą. Įprastai kambario temperatūroje molekulės yra pagrindinės, mažiausios energijos būsenos (S_0), o sąveika su šviesa lemia sužadimą – fotonas perduoda savo energiją elektronui ir šis peršoka į aukštesnę energinę lygmenį. Tačiau tokia molekulės būseną yra nestabili ir perteklinė energija yra atiduodama aplinkai šilumos pavidalu, arba išspinduliuojama – stebima liuminescencija. Šis reiškinys gali būti skirstomas pagal švytėjimo trukmę, o trumpiausias (nuo 10^{-9} s iki 10^{-6} s) šių vyksmų vadinamas fluorescencija (Noomnarm ir Clegg, 2009).

Nuostoviosios fluorescencijos spektrai pateikia emisijos intensyvumo vertes bangos ilgių intervale, o šios reikšmės yra priklausomos tiek nuo registravimo sistemos parametrų: signalo surinkimo kampo, naudojamų filtrų ir detektoriaus jautrumo (Valeur, 2001), tiek nuo fiziologinių procesų, jei tiriamas biologinis objektas (Ramanujam, 2000). Nepaisant to, fluorescencijos spektrai pasižymi keliomis bendromis charakteristikomis. Viena iš jų yra Stokso poslinkis – apšviestas objektas išspinduliuoja ilgesnių bangos ilgių šviesą nei naudota žadinimui. Pagrindinė šį poslinkį lemianti priežastis yra vidinės konversijos procesas, kurio metu energija atiduodama aplinkai šilumos pavidalu. Tačiau energinius nuostolius lemti gali ir kiti veiksniai: naudojamų tirpiklių savybės, energijos pernašos procesai bei sužadintos būsenos reakcijos, lemiančios molekulės struktūros

pokyčius (Lakowicz, 2006). Kita fluorescencijos signalų charakteristika – spektrai įprastai nėra priklausomi nuo žadinančios šviesos bangos ilgio, o to priežastis taip pat yra vidinės konversijos procesas. Elektronui peršokus į aukštesnius energinius lygmenis įvyksta greita ($< 10^{-12}$ s) relaksacija iki žemiausio S_1 lygmens vibracinio polygmenio, todėl spinduliavimas visada vyksta iš šio lygmens, išskyrus retai pasitaikančias išimtis, įprastai stebimas ne biologiniuose objektuose (Lakowicz, 2006).



1.3 pav. Jablonskio diagrama. Storomis horizontaliomis linijomis žymimi energiniai lygmenys (S_0 , S_1 , S_2), o plonomis jų vibraciniai polygmeniai. Banguotos linijos žymi nespindulinius šuolius, IC – vidinė konversija. Adaptuota pagal Valeur (2001)

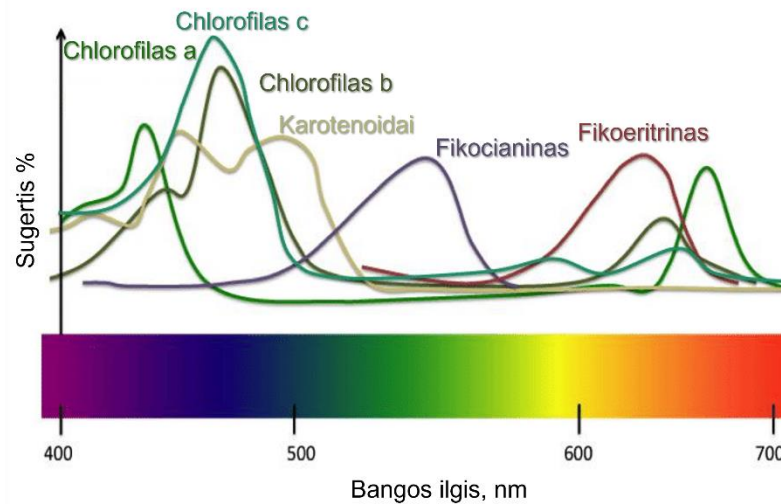
Be nuostoviosios fluorescencijos spektrų registravimo, plačiai taikomos ir kitos emisijos parametrų stebėjimu pagrįstos technikos. Viena iš jų – moduluojamos amplitudės impulsų (PAM) fluorimetrija, vis dažniau pasitelkiama augalų fotosintetinėms reakcijoms ir nuo jų priklausomiems procesams tirti. Taip pat kaip ir nuostoviosios fluorescencijos spektrų registravimas, ši technika išsiskiria greitu signalo surinkimu bei neinvaziškumu ir gali būti naudojama tiek laboratorinėmis, tiek lauko sąlygomis (Weiss ir Reigosa Roger, 2001). Tačiau skirtingai nei signalai, registruojami netaikant moduluojamų impulsų, ši metodika leidžia stebėti fluorescencijos parametrų kinetiką, o nuostoviosios fluorescencijos spektrai pateikia vidutinės intensyvumo vertes. Be to, vienas svarbiausių skirtingomis technikomis registruojamų parametrų skirtumų – matavimo metodikos įtaka nustatomoms vėrtėms. Priklausomai nuo registravimo sistemos, nuostoviosios fluorescencijos spektrų intensyvumo reikšmės gali skirtis keliomis eilėmis, o PAM fluorimetrijos pateikiamų verčių skirtumai siekia nedaugiau kelių kartų (Schreiber, 2004). Moduluojamų impulsų taikymas taip pat leidžia signalus fiksuoti neizoliavus bandinio nuo pašalinės šviesos, kadangi fluorescencija

registruojama tik trumpų (< 1 s), mėlynos arba raudonos šviesos impulsų metu, ir aplinkos veiksnių įtaka nustatomoms vertėms nėra reikšminga (Weiss ir Reigosa Roger, 2001). Tačiau vienas iš pagrindinių PAM technikos trūkumų – sudėtinga rezultatų interpretacija. Dauguma komerciškai prieinamų fluorimetų signalus registruoja plačiame bangos ilgių intervale, tačiau apskaičiuojamos parametų vertės pateikiamos kaip antrosios augalų fotosistemos reakcijų rezultatas, neatsižvelgiant į pirmosios fotosistemos veikimą (Baker, 2008). Taigi priimamos išvados gali būti klaidinančios. Priklausomai nuo augalo rūšies, pirmosios fotosistemos spinduliavimas tolimesniuose (> 700 nm) bangos ilgiuose gali sudaryti nuo 30 % iki 50 % registruojamo fluorescencijos signalo (Pfundel, 1998).

1.4 Chlorofilo fluorescencija

Pirmasis fotosintezės etapas – šviesos sugertis, kurią vykdo fotosintetinančio organizmo pigmentų kompleksas, sugeriantis šviesą nuo 400 nm iki 700 nm (Harbinson ir Rosenqvist, 2003). Šis bangos ilgių intervalas vadinamas fotosintetiškai aktyvia spinduliuote, o sugeriamą energiją toliau perduodama nespinduliniu būdu, pirmos ir antros fotosistemų (PSI ir PSII) reakcijos centrums. Ši energija yra būtina pradinėms fotocheminėms reakcijoms, kurios optimaliomis sąlygomis yra ypač efektyvios, daugiau nei 90 % sugertos šviesos panaudojama fotosintezei (Krause ir Weis, 1991). Pagrindiniai procesai, konkuruojantys dėl sužadavimo energijos, yra chlorofilo fluorescencija, panaudojanti vos 2-3 % pigmentų sugertos šviesos (Buchel ir Wilhelm, 1993), ir energijos išsklaidymas šilumos pavidalu. Taigi šių reiškinų parametų ir jų pokyčių įvertinimas leidžia spręsti apie fotocheminių reakcijų efektyvumą (Baker, 2008).

Fotosintetinančių organizmų pigmentų kompleksuose aptinkama daugiau nei 50 skirtingų chlorofilo tipų (van Amerongen ir kt., 2000), tačiau aukštesniuose augaluose svarbiausias pigmentas yra chlorofilas a (Chl a), aptinkamas ir beveik visuose kituose fotosintetinančiuose organizmuose (Bjorn ir kt., 2009). Ši molekulė geriausiai sugeria bangos ilgį nuo 400 nm iki 450 nm ir nuo 650 nm iki 680 nm (Papageorgiou, 2004) bei yra išsidėsčiusi arčiausiai reakcijos centro, todėl geba tiesiogiai perduoti energiją elektronų pernašos grandinei. Pagrindinė kitų fotosintetinių pigmentų funkcija – praplėsti sugeriamų bangos ilgių intervalą (1.4 pav.) ir perduoti energiją arčiau reakcijos centro esančiai molekulei (Papageorgiou, 2004). Be to, šis perdavimas įvyksta greičiau (apie 10^{-15} s) nei sužadinamas elektroną perduodančių pigmentų spinduliavimas, todėl dažniausiai registruojama Chl a fluorescencija (Harbinson ir Rosenqvist, 2003), sudaranti apie 90 % viso spinduliavimo (Buchel ir Wilhelm, 1993).



1.4 pav. Augaluose ir dumbliuose aptinkamų pigmentų sugerties spektrai. Adaptuota pagal Yarish ir kt. (2012)

Chlorofilo emisijos spektrui būdingi du maksimumai – raudonoje ir tolimoje raudonoje srityse, aukštesniuose augaluose artimi 685 nm ir 735-740 nm (Franck ir kt., 2002). Kambario temperatūroje, priešingai nei žemose temperatūrose, didžioji dalis energijos išspinduliuojama PSII, tačiau PSI gali prisidėti prie didesnio bangos ilgio spektrinės juostos (Krause ir Weis, 1984). Tai lemia, kad registruojamo fluorescencijos spektro maksimumų intensyvumų santykis atspindi fotosistemų aktyvumą ir leidžia spręsti apie organizmo fotosintetinių procesų pokyčius. Taip pat, kadangi augalai yra jautrūs aplinkos sąlygoms, spektro forma suteikia ir informacijos apie organizmo fiziologinę būseną, intensyvumų santykio vertė gali būti naudojama kaip augalų streso indikatorius (Buschmann, 2007). Tačiau yra žinoma, kad fluorescenciją panašiai paveikia daug skirtingų veiksnių, todėl spektrinė analizė nėra tinkama konkretaus streso lemiančio veiksnio identifikacijai, nebent nustatytas tikslus jo poveikis fotosintetinėms reakcijoms (Pedros ir kt., 2008).

Nepaisant to, kad chlorofilo fluorescencijos parametrai neleidžia nustatyti konkretaus streso lemiančio veiksnio, šio reiškinio stebėjimu pagrįstos technikos yra plačiai taikomos, o skirtingų fotosintezės tyrimo metodų kombinavimas leidžia detalai įvertinti šio proceso metu vykstančias reakcijas (Cruz ir Avenson, 2021). Spektroskopiniai eksperimentai remiasi skirtumų tarp įprastomis sąlygomis registruojamų spektrų ir signalų, paveiktų tam tikro išorinio poveikio, įvertinimu. Ši metodika sėkmingai naudojama augalų stresui aptikti (Eullaffroy ir Vernet, 2003), o pastaraisiais dešimtmečiais vis populiariesnis technikos taikymas nuotoliniams stebėjimams (Ac ir kt., 2015).

1.4.1 Chlorofilo fluorescencijos tyrimai pH juostų įvertinimui

Vienas pirmųjų eksperimentų, nustačiusių chlorofilo fluorescencijos parametrus skirtingo rūgštingumo zonose *Characeae* dumblių tarpubambliuose, atliktas su *Chara corallina* ląstelėmis (Plieth ir kt., 1994). Tačiau šio eksperimento rezultatų interpretaciją apsunkino metodiniai trūkumai, fluorescencijos signalai fiksuoti naudojant spalvinį fenolio raudonąjį indikatorį. Toks registravimo metodas lėmė netolygų chloroplastų apšvietimą skirtingose ląstelės zonose, kadangi indikatoriaus spalvinis pokytis lemia sugerties pH juostose skirtumus. Nepaisant šio trūkumo, tyrimo rezultatai patvirtinti vėlesniais eksperimentais. Įvertinta, kad rūgštinėse juostose maksimali fluorescencijos intensyvumo vertė yra mažesnė nei šarminėse zonose, o šį skirtumą lemia nevienodas PSII efektyvumas (Bulychev ir kt., 2001a; Krupenina ir kt., 2008).

Dauguma vėlesnių eksperimentų, nustačiusių chlorofilo fluorescencijos parametrų skirtumus *Characeae* šeimos dumblių ląstelėse, atlikti PAM fluorimetrijos technika, o nuostoviosios fluorescencijos spektrai nėra registruojami. Nepaisant to, PAM metodika yra tinkama fotosintetinio aktyvumo skirtumams aptikti. Vienas iš šių tyrimų – Bulychev ir kt. (2004) eksperimentas, kuriame skirtingo rūgštingumo zonos analizuotos įvertinus fluorescencijos kinetikos parametrus besiformuojančiose pH juostose. Šiame tyrime, perkėlus tamsoje adaptuotus bandinius į šviesą, rūgštinėse ir šarminėse srityse registruotas skirtingas atsakas. Mažesnio pH zonose PSII našumas didėjo 5-15 min. nuo apšvietimo pradžios, o šarminėse juostose registruotas priešingas atsakas – PSII našumas mažėjo. Taip pat, kaip ir ankstesnių eksperimentų rezultatai (Plieth ir kt., 1994; Bulychev ir kt., 2001a), registruoti PSII kinetikos pokyčiai siejami su skirtinga CO₂ fiksacija, skirtingo rūgštingumo srityse. Manoma, kad junginio įsisavinimas šarminėse zonose yra sutrikdytas, lyginant su mažesnės pH vertės sritimis (Bulychev ir kt., 2004).

Siekiant išaiškinti pH juostų susiformavimo mechanizmą bei fotosintezės svarbą reiškinio egzistavimui, eksperimentuose pasitelkiamos medžiagos, paveikiančios plazminės membranos pernašos sistemas, arba fotosintetinius procesus. Vienas iš dažniausiai taikomų junginių yra herbicidas 3-(3,4-dichlorfenil)-1,1-dimetil karbamidas (DCMU), sutrikdantis chloroplastuose vykstančią PSII elektronų pernašą (Kirilovsky ir kt., 1994). Paveikus dumblių ląsteles šia medžiaga, registruojamos didesnės fluorescencijos kvantinio našumo vertės nei nepaveiktuose bandiniuose, o skirtingo rūgštingumo zonos nėra stebimos (Bulychev ir Krupenina, 2008). Šis rezultatas patvirtina, jog pH juostų susiformavimas yra priklausomas nuo elektronų pernašos PSII, o fluorescencijos parametrai yra pakankamai jautrūs detektuoti šiuos skirtumus. Kita eksperimentuose taikoma medžiaga – fuzikokcinas (FC), aktyvuojantis H⁺-ATPazės (Sehnke ir kt., 2002). Priešingai nei

DCMU, šis junginys pH juostų nesunaikina, tačiau lemia mažesnes pH vertes rūgštinėse zonose (Bulychev ir Krupenina, 2008), o fluorescencijos parametrų įvertinimas leidžia aptikti šiuos skirtumus. Rūgštinėse juostose nustatomos didesnės efektyvaus kvantinio našumo vertės, nurodančios fotocheminių reakcijų efektyvumą, o šarminėse zonose reikšmingi skirtumai nėra registruojami (Bulychev ir kt., 2005). Šie rezultatai patvirtina, kad membranos protonų pompos veikimas lemia mažesnės pH vertės sričių susiformavimą, o šarminės juostos nėra priklausomos nuo šios pernašos sistemos.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Bandiniai

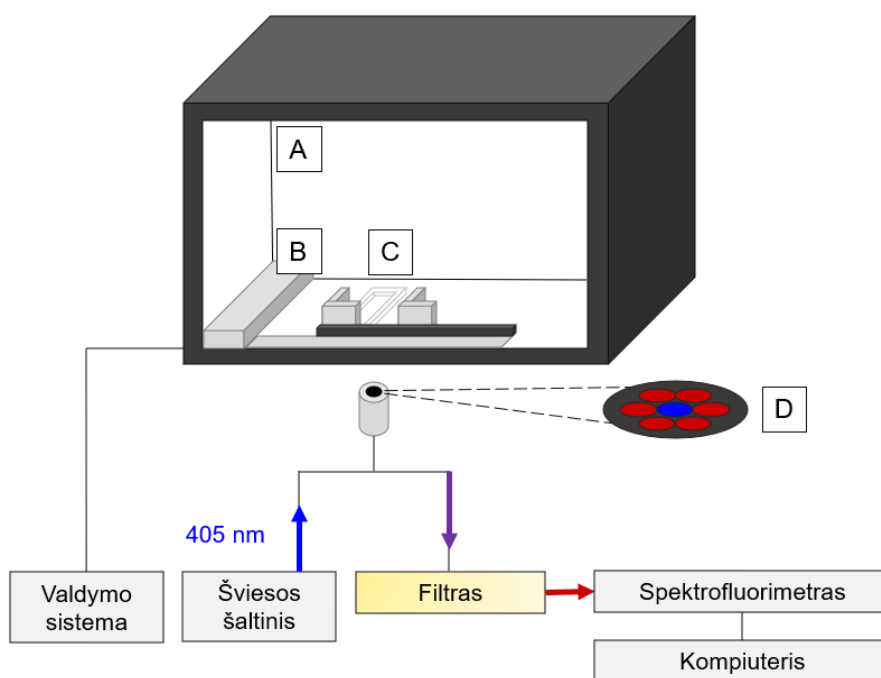
Tyrimuose naudoti *Nitellopsis obtusa* dumbliai, surinkti Lietuvos ežeruose rudens mėnesiais. Organizmai laikyti vandens pripildytuose akvariumuose kambario temperatūroje (21 ± 1 °C), kontroliuojamomis apšvietimo ($9,5 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sąlygomis, palaikant šviesa/tamsa (12/12 val.) apšvietimo ciklą. Prieš eksperimentus dumblių tarpubambliai buvo atskiriami nuo kitų ląstelių ir nakčiai iki eksperimento perkelti į kontrolinį, nebuferinį (pH apie 7,2) APW (dirbtinis tvenkinio vanduo, angl. *artificial pond water*) tirpalą, sudarytą iš 0,1 mM KCl, 1 mM NaCl ir 0,1 mM CaCl₂. Siekiant išvengti tamsinės adaptacijos, perkėlus ląsteles nebenaudotas tamsa/šviesa apšvietimo režimas ir bandiniai laikyti pastovaus apšvietimo sąlygomis. Skirtinga bandinio paruošimo metodika taikyta, vertinant fluorescencijos parametrų priklausomybę nuo apšvietimo sąlygų ir nuo laikymo kontrolinėje terpėje trukmės. Pirmuoju atveju, dalis tyrimų atlikti su tamsoje adaptuotomis ląstelėmis, kurios skirtingai nei kitos bandinių grupės, po atskyrimo neapšviestos, o izoliuotos nuo pašalinės šviesos apsauginiu folijos sluoksniu. Antruoju atveju, įprasta metodika paruošti bandiniai papildomai kontroliniame tirpale laikyti 8 d., nekontroliuojamomis, natūralaus apšvietimo sąlygomis. Nepriklausomai nuo atliekamo eksperimento, visų matavimų metu tarpubamblis buvo patalpintas organinio stiklo kameroje, kuri pripildyta 4 ml APW tirpalo.

2.2 Fluorescencijos spektrų registravimas

Fluorescencijos registravimui atlikti sukonstruota bandinio padėtį kontroliuoti leidžianti sistema (1 priedas, 4.1 pav.). Pagrindiniai sistemos elementai: žingsninis variklis, variklio valdiklis ir Arduino Uno R3 mikrokontroleris. Prijungus prie šios plokštės kitus sistemos komponentus užtikrintas bandinio slinkimo krypties bei atstumo pasirinkimas. Reguluodama žingsninio variklio posūkį, sistema leidžia ląstelę paslinkti tiksliai 1 mm arba 1 cm atstumais, dviem kryptimis: pirmyn ir atgal. Bandinio padėtį taip pat galima kontroliuoti ir kitomis kryptimis: į kairę arba į dešinę, tačiau tai atliekama rankiniu būdu, papildomai prie bandinį laikančios konstrukcijos pritvirtintu sraigtu. Sistemos valdymas užtikrintas C++ programinės kalbos kodu (2 priedas), kuris iš kompiuterio perkeltas į Arduino Uno R3 plokštės vidinę atmintį.

Supaprastinta fluorescencijos registravimo sistemos schema pateikta 2.1 pav. Signalai fiksuoti visame tarpubamblio ilgyje, išskyrus centrinę ląstelės dalį (nuo 2 cm iki 3 cm ilgio), kuri praleista dėl ląstelės įtvirtinimo srities organinio stiklo kameroje. Bandinį pasirinkta slinkti 1 mm atstumu,

signalus registruojant visuose taškuose. Žadinimas ir signalo surinkimas atliktas optine šviesolaidine sistema. Žadinimui naudotas Ocean Optics LS-450 šviesos šaltinis su adaptuotu mažo intensyvumo ($< 1 \text{ mW}$), mėlynos šviesos (405 nm) diodu. Šviesos šaltinis sujungtas su septynių 200 μm skersmens gijų bifurkacinio šviesolaidžio atšaka, turinčia centrinę skaidulą, o šešios apskritimu išdėstytos gijos naudojamos signalo surinkimui į kitą šviesolaidžio atšaką. Siekiant atsiriboti nuo žadinimo šviesos signalo, papildomu 400 μm skersmens šviesolaidžiu prie Ocean Optics USB2000+ spektrofluorimetromui prijungtas filtras, nepraleidžiantis bangos ilgių iki 510 nm.



2.1 pav. Fluorescencijos registravimo sistemos schema. Matavimai atliekami izoliavus bandinį (C) nuo pašalinės šviesos (A). Bandinys paslenkamas žingsniniu varikliu (B). Žadinimui naudojamas „saulutės“ tipo šviesolaidis (D), mėlyna spalva pažymėta žadinimui naudojama gija, o raudonai žymimos skaidulos skirtos signalo surinkimui

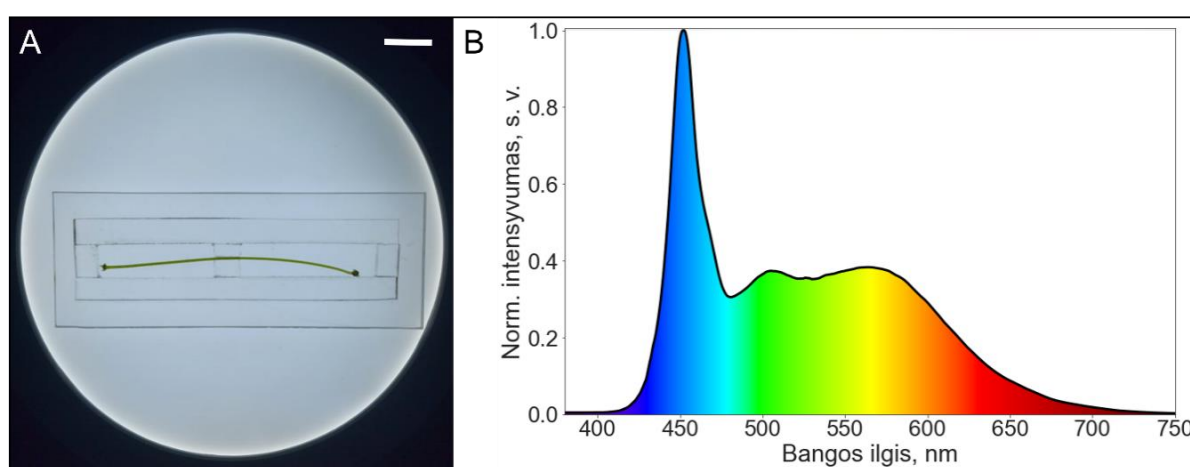
2.3 Apšvietimo sąlygų įtakos tyrimo metodikos

2.3.1 Laikinės kontrolės matavimai

Fluorescencijos parametrų išilgai tarpubamblinės ląstelės stabilumas įvertintas laikinės kontrolės matavimais. Eksperimentai atlikti su tamsoje adaptuotomis ląstelėmis ir šviesa/tamsa apšvietimo režimu laikytais bandiniais. Atsižvelgus į vienos ląstelės signalų registravimo trukmę (iki 1 val.), fluorescencijos spektrai išilgai tarpubamblio fiksuoti pakartotinai, išlaikant 1 val. laiko tarpą tarp pirmo ir antro tos pačios srities žadinimo.

2.3.2 Skirtingos trukmės švitinimo poveikio įvertinimas

Skirtingos trukmės apšvietimo įtaka fluorescencijos parametrams įvertinta registruojant emisijos spektrus prieš ir po poveikio šviesa. Pirmiausia signalai fiksuoti tamsoje adaptuotose ląstelėse. Po registravimo bandinys buvo perkeliamas ant šviesos šaltinio ir švitintas 15 min. arba 30 min. iš apačios (2.2 pav. A). Švitinimui naudotas plokščias, baltos šviesos, 18 W LED šviesos šaltinis (2.2 pav. B), fotosintetinio fotonų srauto tankio (PPFD) vertė $829 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ši reikšmė pasirinkta atsižvelgiant į literatūroje pateikiamas vertes, siekiant užtikrinti greitą pH juostų susiformavimą, tačiau taip pat išvengti bandinio pažeidimo (Dodonova ir Bulychev, 2011; Bulychev, 2012). Po švitinimo atliktas pakartotinis fluorescencijos spektrų registravimas.



2.2 pav. *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinė ląstelė, švitinama balta šviesa (A) ir naudojamo šviesos šaltinio spektras (B). Mastelis 2 cm

2.4 Duomenų analizė

Registruoti fluorescencijos signalai buvo tvarkomi OriginPro 2018 programa. Pirmiausiai atliktas filtravimas, siekiant sumažinti triukšmą. Naudota programoje pateikiama FFT filtravimo funkcija, parinktas 15 taškų langas, ribinis dažnis artimas 0,01 Hz. Parametrai nustatyti atsižvelgiant į maksimalios amplitudės vertę, užtikrinant, kad jos sumažėjimas siektų ne daugiau nei 5 %. Tolimesni analizės žingsniai bei grafinis rezultatų vaizdavimas atliktas programavimo kalba Python (versija 3.8.12). Nustatytos fluorescencijos intensyvumo vertės ties 680 nm, 710 nm ir 750 nm bangos ilgiais, apskaičiuoti šiuose taškuose registruojamų intensyvumo reikšmių santykiai: F680/F710, F680/F750 ir F710/F750. Taškai parinkti atsižvelgus į registruojamus spektrus (3.1 pav. A) bei analizuotą literatūrą. Reikšmės ties 680 nm leidžia spręsti apie PSII reakcijas, o vertės nuo 710 nm apie PSI (Franck ir kt., 2002). Kadangi apdorotuose fluorescencijos spektruose

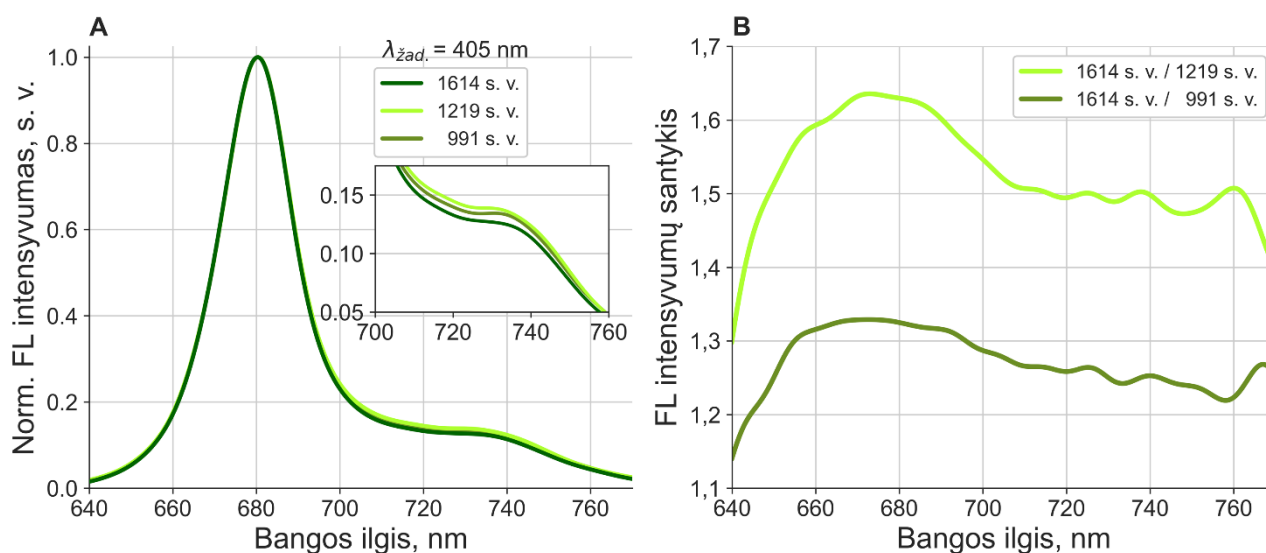
stebimi filtravimo algoritmo artefaktai – vertės svyravimai, išryškėjantys bangos ilgiuose nuo 710 nm iki 750 nm (3.1 pav. B), pasirinkta naudoti ne antrajame spektro maksimume (ties 739 nm) registruojamą fluorescencijos intensyvumo reikšmę, bet pirmiausiai įvertinti visą bangos ilgių intervalą nuo 710 nm ir 750 nm.

Statistinė analizė taip pat atlikta Python programavimo kalba, naudotos statistinių paketų Scipy (versija 1.7.3) ir Pingouin (versija 0.5.1) funkcijos. Duomenų pasiskirstymo normalumui tikrinti taikytas Shapiro-Wilk kriterijus. Atsižvelgus į šio testo rezultatus, duomenų centrui įvertinti naudotos medianų vertės, o sklaida nurodyta medianiniu absoliučiuoju nuokrypiu nuo medianos (MAD). Parametrų ryšys įvertintas Spearman koreliacijos koeficientu, sklaidos skirtumai įvertinti Brown-Forsythe testu. Skirtumų tarp grupių įvertinimo metodas priklausė nuo duomenų savybių ir lyginamų grupių skaičiaus. Lyginant lygiai dvi grupes, naudoti Wilcoxon porinių imčių ir Mann-Whitney testai, o kelių grupių palyginimui taikytas Kruskall-Wallis kriterijus. Nepriklausomai nuo taikomo metodo, rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos spektrai

Siekiant aptikti skirtingo fotosintetinio aktyvumo zonas, fluorescencijos signalai fiksuoti išilgai dumblių ląstelių. Registruoti tipiniai chlorofilo emisijos spektrai, kuriems būdingi du maksimumai. Pagrindinis stebimas ties 680 nm bangos ilgiu, antrasis ties 739 nm (3.1 pav. A). Šiuose taškuose fiksuojamos fluorescencijos intensyvumo vertės išilgai ląstelės yra kintančios, o parinkus skirtingo intensyvumo (1614 s. v., 1219 s. v. ir 991 s. v.) signalus nustatyti ir spektro formos pokyčiai. Skirtumai išryškėjo santykinuose spektruose (3.1 pav. B), didžiausio intensyvumo signalo vertės padalijus iš kitų analizuojamų spektrų verčių. Be to, pateiktuose grafikuose taip pat pastebima, kad reikšmės registruotos bangos ilgių intervale nuo 650 nm iki 710 nm pakito santykinai daugiau nei vertės, fiksuotos nuo 710 nm iki 760 nm.

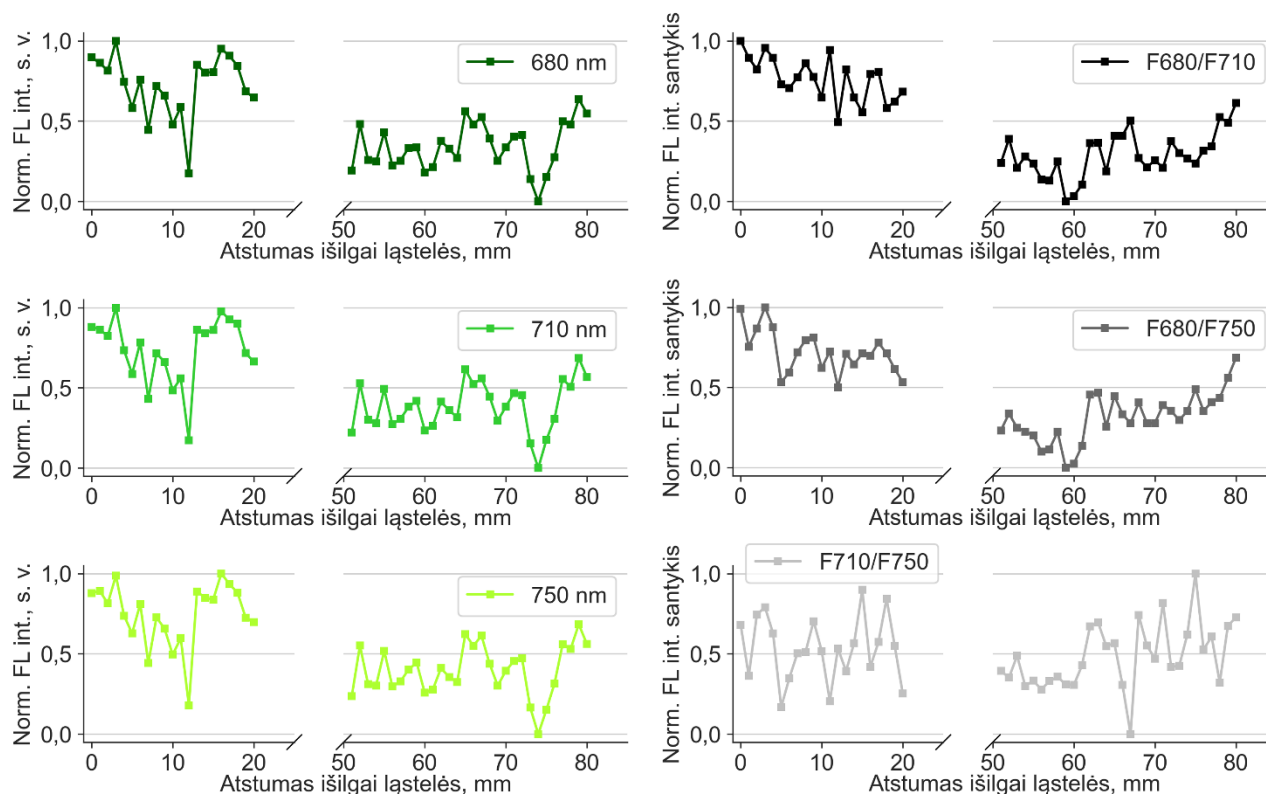


3.1 pav. Normuoti *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės fluorescencijos (FL) spektrai (A) ir nenormuotų signalų santykiniai spektrai (B). Įdėtiniame grafike pateiktas intervalo nuo 700 nm iki 760 nm vaizdas mažesnėje intensyvumo skalėje. Legendoje nurodyta pagrindinio maksimumo (680 nm) intensyvumo vertė

3.2 *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos parametrų pokyčiai išilgai ląstelės

Detalesnė spektro formos analizė atlikta apskaičiavus fluorescencijos intensyvumo santykius ties bangos ilgiais, parinktuose atsižvelgus į registruotų spektrų skirtumus (3.1 pav. B). Pastebėta, kad intensyvumo vertės ties 680 nm, 710 nm ir 750 nm kinta kartu (3.2 pav.), o apskaičiavus Spearman koreliacijos koeficientus, nustatytos stiprios ($r_s > 0,7$) ir statistiškai reikšmingos ranginės

koreliacijos (3.1 lentelė). Tačiau santykių reikšmių kitimo kreivėse stebimi nukrypimai nuo bendros tendencijos (3.2 pav.). Rezultatas patvirtina, kad skirtinguose bangos ilgių intervaluose stebimi intensyvumo vertės pokyčiai yra santykinai skirtingi.



3.2 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo (int.) vertės ties 680 nm, 710 nm ir 750 nm išilgai *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės ir šiuose taškuose registruotų intensyvumų santykių kitimo kreivės. Pateiktos normuotos parametrų vertės

Pateiktose parametrų kreivėse (3.2 pav.) taip pat pastebima, kad F680/F710 ir F680/F750 santykių reikšmių kitimas yra panašus, o F710/F750 santykio verčių kitimo tendencija išsiskiria. Dėl šios priežasties nuspręsta apskaičiuoti visų pasirinktų bangos ilgių bei santykių sąryšius ir įvertinti, kurie parametrai suteikia bendros informacijos, t. y. ar jų reikšmių pokyčius lemti gali tie patys veiksniai. Nustatyta, kad daugumos analizuojamų parametrų ryšys yra stiprus ir statistiškai reikšmingas, išsiskiria tik F710/F750 santykio vertės, reikšmingai koreliuojančios tik su vienu iš parametrų, F680/F750 santykiu (3.1 lentelė). Šis rezultatas patvirtina, kad bangos ilgių intervale nuo 710 nm iki 750 nm registruojamos fluorescencijos intensyvumų reikšmės suteikia skirtingą informaciją nei ties 680 nm fiksuojamos vertės, o tolimesniuose (> 700 nm) bangos ilgiuose registruojamus reikšmių skirtumus gali lemti papildomi veiksniai.

3.1 lentelė. Fluorescencijos parametrų ryšys. Pateikti Spearman ranginės koreliacijos koeficientai r_s . Žalia spalva žymimas stiprus ($r_s > 0,7$), o geltona vidutinio stiprumo ($r_s > 0,4$) ryšys. Pilka spalva žymi statistiškai nereikšmingus rezultatus

		Intensyvumas			Santykis		
		680 nm	710 nm	750 nm	F680/F710	F680/F750	F710/F750
Intensyvumas	680 nm		> 0,99	0,99	0,84	0,80	0,20
	710 nm	> 0,99		> 0,99	0,81	0,77	0,21
	750 nm	0,99	> 0,99		0,80	0,76	0,20
Santykis	F680/F710	0,84	0,81	0,80		0,92	0,15
	F680/F750	0,80	0,77	0,76	0,92		0,49
	F710/F750	0,20	0,21	0,20	0,15	0,49	

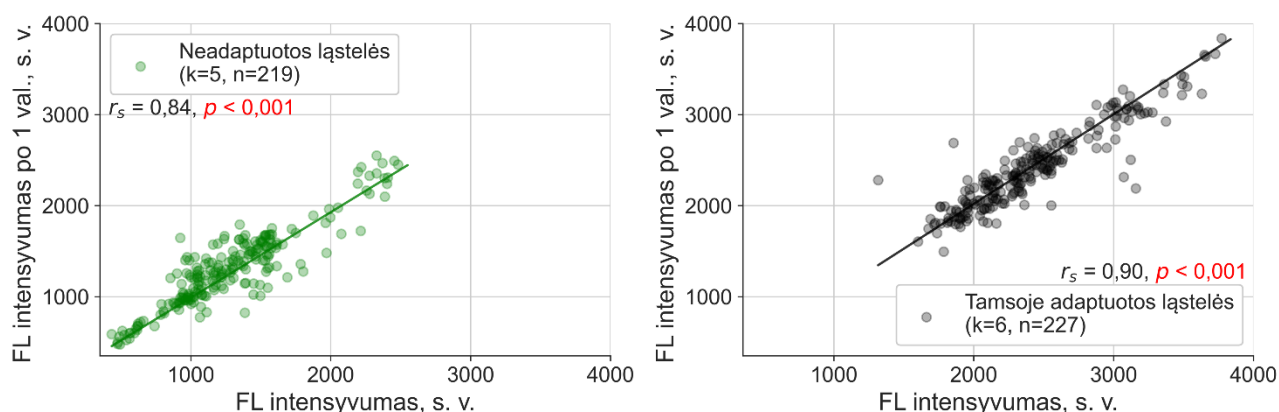
Kadangi fluorescencijos parametrai ir jų pokyčiai įprastai yra siejami su fotosintetiniais procesais (Baker, 2008), gauti rezultatai leistų manyti, jog *Nitellopsis obtusa* ląstelėse stebimos skirtingo fotosintetinio aktyvumo sritys. Be to, trumpesnių bangos ilgių intervalas (nuo 650 nm iki 710 nm) siejamas su PSII reakcijų efektyvumu, o bangos ilgiai nuo 710 nm su PSI (Franck ir kt., 2002). Dėl šios priežasties, registruoti santykinai skirtingi fluorescencijos intensyvumo verčių pokyčiai leidžia spręsti ir apie skirtingus fotosistemų aktyvumo pokyčius. Tačiau emisijos parametrus panašiai paveikti gali įvairūs fizikiniai ir fiziologiniai veiksniai (Valeur, 2001; Pedros ir kt., 2008), todėl gauti rezultatai neleidžia identifikuoti pokyčius lėmusių priežasčių.

3.3 *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos parametrų priklausomybė nuo apšvietimo sąlygų

Norint sieti stebimus fluorescencijos pokyčius su pH juostomis ir fotosintetiniu aktyvumu, pasirinkta įvertinti emisijos parametrų priklausomybę nuo apšvietimo sąlygų. Tamsoje skirtingo rūgštingumo sričių susiformavimas nėra stebimas, o didesnis šviesos intensyvumas ir ilgesnė apšvietimo trukmė įprastai lemia didesnę juostų skaičių (Bulychev ir kt., 2003). Taigi, registravus dažnesnius analizuojamų parametrų pokyčius šviesa paveiktose ląstelėse, būtų galima teigti, jog skirtumai fiksuojami išilgai tarpubamblinės ląstelės yra susiję su šviesoje vykstančiais fiziologiniais procesais.

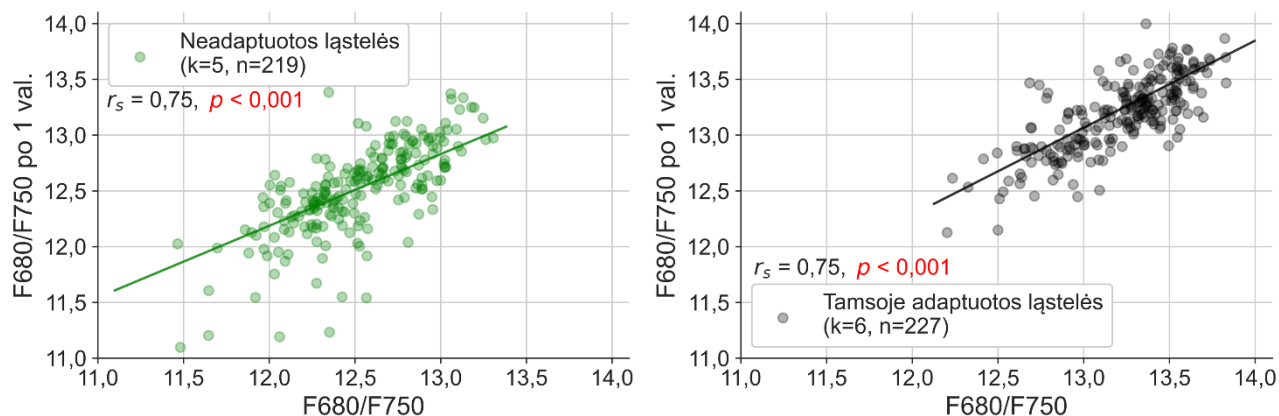
3.3.1 *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos parametrų laikiniai pokyčiai skirtingo apšvietimo sąlygomis

Siekiant užtikrinti gaunamų rezultatų patikimumą, pirmiausiai atlikti kontroliniai matavimai šviesa/tamsa apšvietimo režimu laikytose ir tamsoje adaptuotose ląstelėse. Nustatyta, kad priklausomai nuo apšvietimo sąlygų, bandiniuose registruojamų signalų fluorescencijos intensyvumas yra skirtingas. Neadaptuotų ląstelių pagrindinio maksimumo (ties 680 nm) intensyvumo vertės kito intervale nuo 434 s. v. iki 2481 s. v., o tamsoje adaptuotų bandinių nuo 1371 s. v. iki 3772 s. v. Šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas (Mann-Whitney kriterijus), pavienių ląstelių duomenys pateikti 3 priede (4.2 pav.). Nepaisant to, rezultatai taip pat leido įvertinti, jog nepriklausomai nuo apšvietimo sąlygų, maksimalios fluorescencijos intensyvumo vertės laikiniai pokyčiai (1 val.) nėra reikšmingi. Nustatytos stiprios ($r_s > 0,70$) ranginės koreliacijos tarp kartotinių matavimų. Statistinių parametrų vertės pateiktos sklaidos diagramose (3.3 pav.).



3.3 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo (680 nm) laikinė kontrolė, skirtingo apšvietimo sąlygomis. Santrumpos: r_s – Spearman koreliacijos koeficientas, p – reikšmingumo lygmuo, k – ląstelių skaičius, n - registruotų spektrų skaičius

Panašus rezultatas gautas ir analizuojant F680/F750 santykio laikinius (1 val.) pokyčius, registruojamos parametro reikšmės priklausė nuo apšvietimo sąlygų. Neadaptuotose ląstelėse vertės fiksuotos intervale nuo 11,47 iki 13,31, o tamsinė bandinių adaptacija lėmė statistiškai reikšmingą (Mann-Whitney kriterijus) verčių padidėjimą. Šiose ląstelėse parametro reikšmės registruotos intervale nuo 12,20 iki 13,83. Pavienių ląstelių duomenys pateikti 3 priede (4.3 pav.). Nepaisant nustatytų skirtumų, sąryšis tarp kartotinių matavimo išliko stiprus ($r_s > 0,70$) ir nepriklausė nuo apšvietimo sąlygų. Visgi, nustatytos ranginės koreliacijos koeficientų vertės (3.4 pav.) yra mažesnės nei apskaičiuotos analizuojant maksimalios fluorescencijos intensyvumo reikšmės (ties 680 nm) laikinius pokyčius.



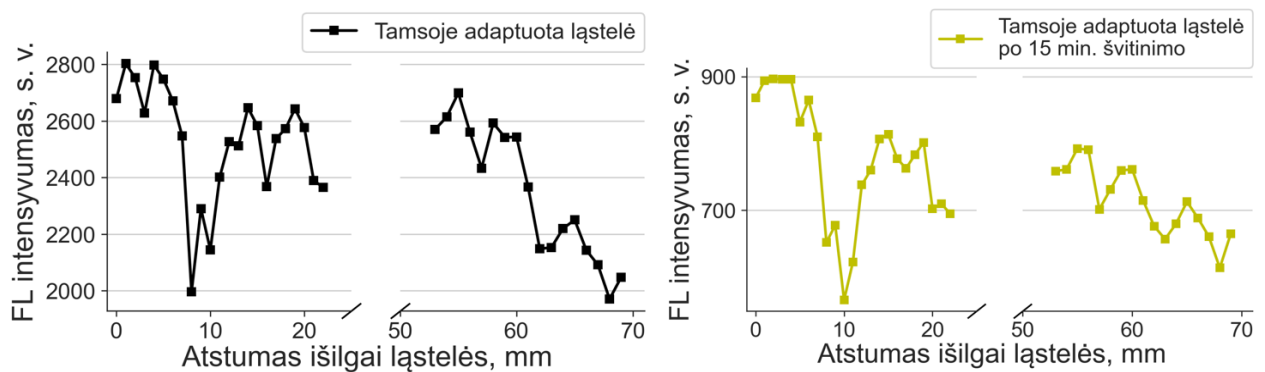
3.4 pav. F680/F750 santykio laikinė kontrolė, skirtingo apšvietimo sąlygomis. Santrumpos paaiškintos 3.3 pav.

Apibendrinant rezultatus, gautus atlikus kartotinius fluorescencijos signalų matavimus, žadinant tas pačias ląstelės sritis, galima teigti, jog valandos trukmės registravimo metu nėra stebimi reikšmingi fluorescencijos intensyvumo ir F680/F750 santykio laikiniai pokyčiai išilgai ląstelės. Taip pat, apskaičiuotų ranginės koreliacijos koeficientų vertės leidžia spręsti apie skirtingą analizuojamų parametru jautrumą. Fluorescencijos intensyvumas ties 680 nm po 1 val. koreliavo stipriau nei F680/F750 santykis, nepriklausomai nuo apšvietimo sąlygų, todėl yra mažiau jautrus. Šį rezultatą paaiškinti galėtų tyrimo metodika, kadangi signalai registruojami bandinių izoliavus nuo pašalinės šviesos. Taigi yra sutrikdomi nuo apšvietimo priklausomi fiziologiniai procesai, pavyzdžiui, pH juostų susiformavimas, lemiantis fluorescencijos parametru pokyčius (Bulychev ir kt., 2001a; Krupenina ir kt., 2008). Be to, registruojamus verčių skirtumus paaiškinti galėtų ir nefiziologiniai veiksniai. Dumblių ląstelės nėra visiškai tiesios, todėl atstumas nuo šviesolaidžio antgalio iki bandinio gali kisti (< 5 mm), o ląstelės storis taip pat nėra pastovus. Kadangi emisijos signalas yra priklausomas nuo šių parametru (Valeur, 2001), bandiniui tostant nuo šviesos šaltinio stebimi ir fluorescencijos intensyvumo pokyčiai. Registruojama vertė gali pakisti > 100 s. v., todėl apskaičiuojamos didesnės emisijos parametru koreliacijos koeficientų reikšmės. Taigi, priešingai nei F680/F750 santykis, fluorescencijos intensyvumo vertė yra jautresnė nefiziologinių veiksnių įtakai.

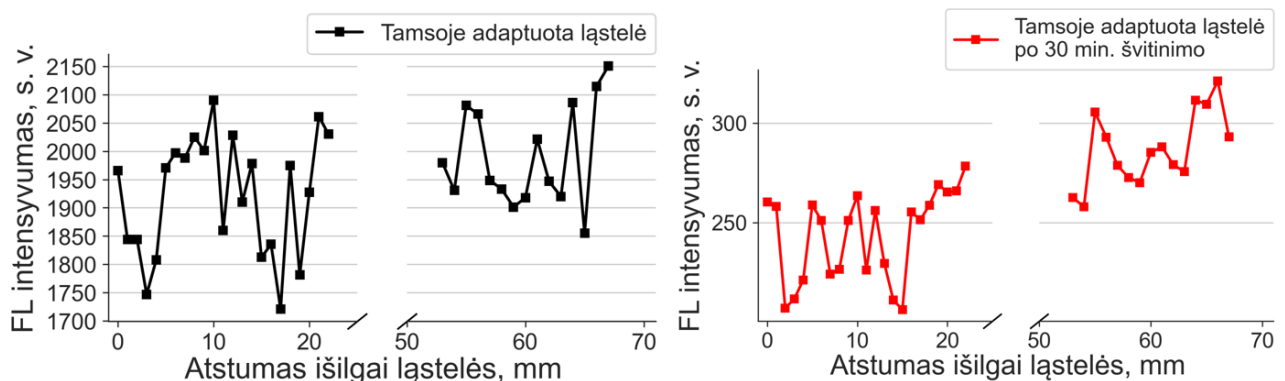
Atlikti matavimai taip pat leido nustatyti, kad skirtingos apšvietimo sąlygos lemia reikšmingus fluorescencijos parametru: intensyvumo ir F680/F750 santykio, verčių pokyčius. Šis skirtumas yra susijęs su fotosintetiniais procesais. Po tamsinės adaptacijos visi fotosistemų reakcijos centrai yra atviri, todėl žadinimas lemia greitą prisotinimą ir registruojamos maksimalios fluorescencijos intensyvumo vertės. Neadaptuotose ląstelėse fotosintetiniai procesai prieš eksperimentus nebuvo sutrikę, todėl dalis reakcijos centrų yra uždari dar prieš žadinimą ir registruojamos intensyvumo reikšmės nėra maksimalios (Baker, 2008).

3.3.2 *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos parametrų priklausomybė nuo švitinimo trukmės

Įsitikinus, kad analizuojami parametrai matavimo metu reikšmingai nekinta, įvertintas skirtingos trukmės švitinimo poveikis dumblių fluorescencijai. Pirmiausiai analizuoti porinių imčių eksperimentų rezultatai, siekiant nustatyti, ar paveikus tamsoje adaptuotas ląsteles balta šviesa, registruojami reikšmingi analizuojamų parametrų skirtumai. Pastebėta, kad apšviestose ląstelėse fiksuojamos mažesnės fluorescencijos intensyvumo ties 680 nm vertės, nei tamsoje adaptuotuose tarpubambliuose (3.5 pav. ir 3.6 pav.). Šis pokytis priklausė nuo švitinimo trukmės. Prieš 15 min. poveikį, intensyvumo vertės kito nuo 1058 s. v. iki 3346 s. v., o po apšvietimo registruotos intervale nuo 281 s. v. iki 896 s. v. Švitinant ląsteles 30 min., registruoti didesni skirtumai. Prieš šį poveikį intensyvumas kito nuo 1380 s. v. iki 3704 s. v., o po švitinimo nuo 139 s. v. iki 410 s. v. Nepriklausomai nuo švitinimo trukmės, nustatyti skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (Wilcoxon porinių imčių testas).

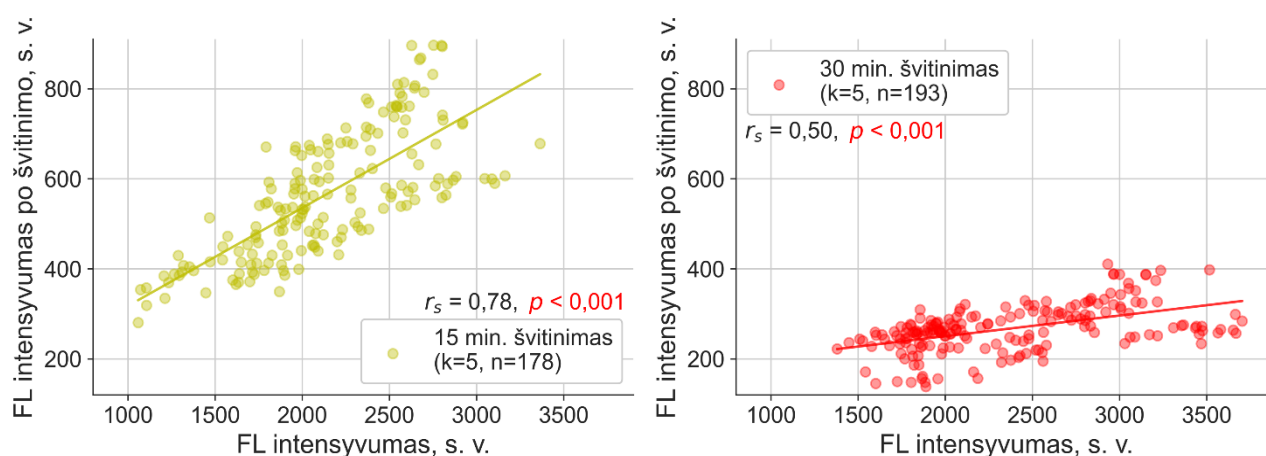


3.5 pav. Išilgai *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės registruotų fluorescencijos (FL) intensyvumo verčių (ties 680 nm) pokyčiai po 15 min. švitinimo balta šviesa. Intensyvumo reikšmės prieš ir po švitinimo atvaizduotos skirtingose skalėse



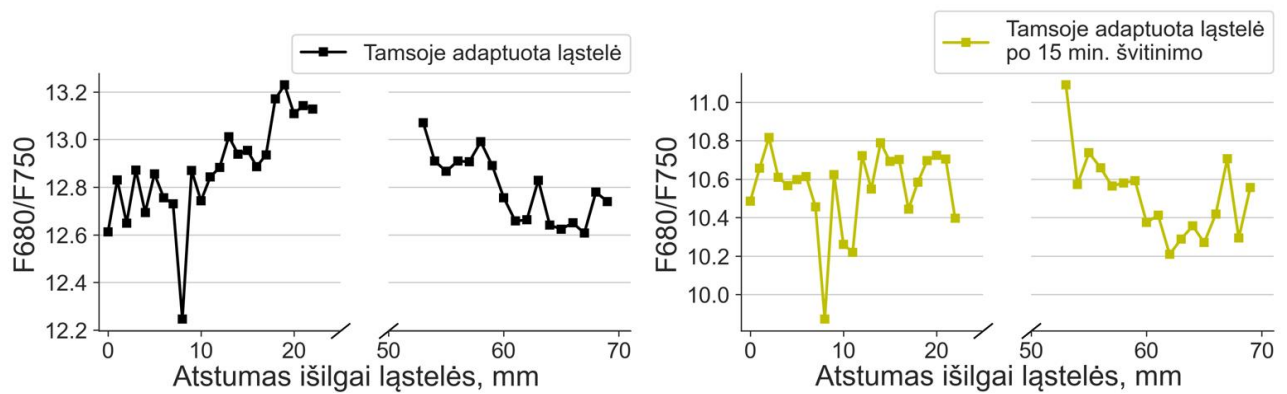
3.6 pav. Išilgai *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės registruotų fluorescencijos (FL) intensyvumo verčių (ties 680 nm) pokyčiai po 30 min. švitinimo balta šviesa. Intensyvumo reikšmės prieš ir po švitinimo atvaizduotos skirtingose skalėse

Pateiktuose grafikuose (3.5 pav. ir 3.6 pav.) taip pat pastebima, jog fluorescencijos intensyvumo pagrindiniame maksimume (ties 680 nm) vertės kitimas išilgai ląstelės išlieka panašus. Įvertinus šio parametro reikšmių prieš ir po švitinimo ryšį, nustatytos statistškai reikšmingos ranginės koreliacijos (3.7 pav.), pavienių ląstelių duomenys pateikti 4 priede (4.4 pav.). Toks rezultatas leidžia teigti, kad pagrindinis veiksnys, lemiantis fluorescencijos intensyvumo vertės kitimą išilgai tarpubamblinės ląstelės nėra šviesos sukelti procesai. Tačiau didesnės Spearman koreliacijos koeficiento vertės apskaičiuotos ląsteles apšvietus trumpiau, todėl nors apšvietimas ir nėra pagrindinis pokyčius lemiantis veiksnys, jis prisideda prie fluorescencijos intensyvumo vertės kitimo.

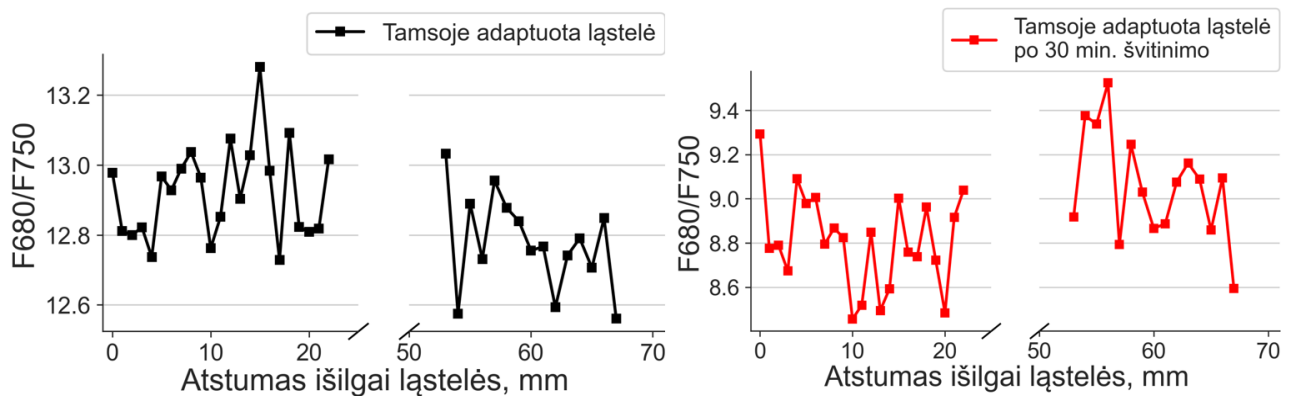


3.7 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo ties 680 nm verčių prieš ir po švitinimo ryšys. Santrumpos: r_s – Spearman koreliacijos koeficientas, p – reikšmingumo lygmuo, k – ląstelių skaičius, n – registruotų spektrų skaičius

Panašus rezultatas gautas įvertinus F680/F750 santykio pokyčius. Švitinimas lėmė parametro reikšmių sumažėjimą, o skirtumai priklausė nuo poveikio trukmės (3.8 pav. ir 3.9 pav.). Prieš paveikiant ląsteles 15 min. trukmės švitinimu, registruotos F680/F750 santykio reikšmės kito intervale nuo 11,82 iki 14,05, o po apšvietimo nuo 9,04 iki 11,28. Ilgesnės trukmės (30 min.) poveikis lėmė didesnius verčių skirtumus. Prieš šį švitinimą santykio vertės registruotos intervale nuo 12,49 iki 13,52, o po poveikio nuo 7,40 iki 10,16. Nepriklausomai nuo švitinimo trukmės, nustatyti skirtumai buvo statistškai reikšmingi (Wilcoxon porinių imčių testas). Taigi nuo apšvietimo trukmės priklauso ne tik maksimali fluorescencijos intensyvumo vertė (ties 680 nm), bet ir F680/F750 santykio reikšmės.

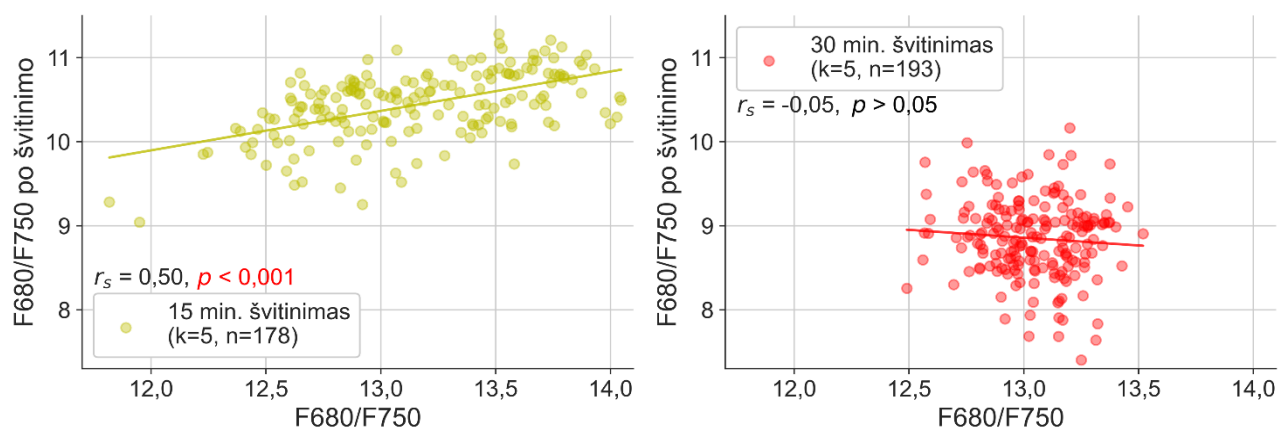


3.8 pav. Išilgai *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės registruotų F680/F750 santykio verčių pokyčiai po 15 min. švitinimo balta šviesa. Santykio reikšmės prieš ir po švitinimo atvaizduotos skirtingose skalėse



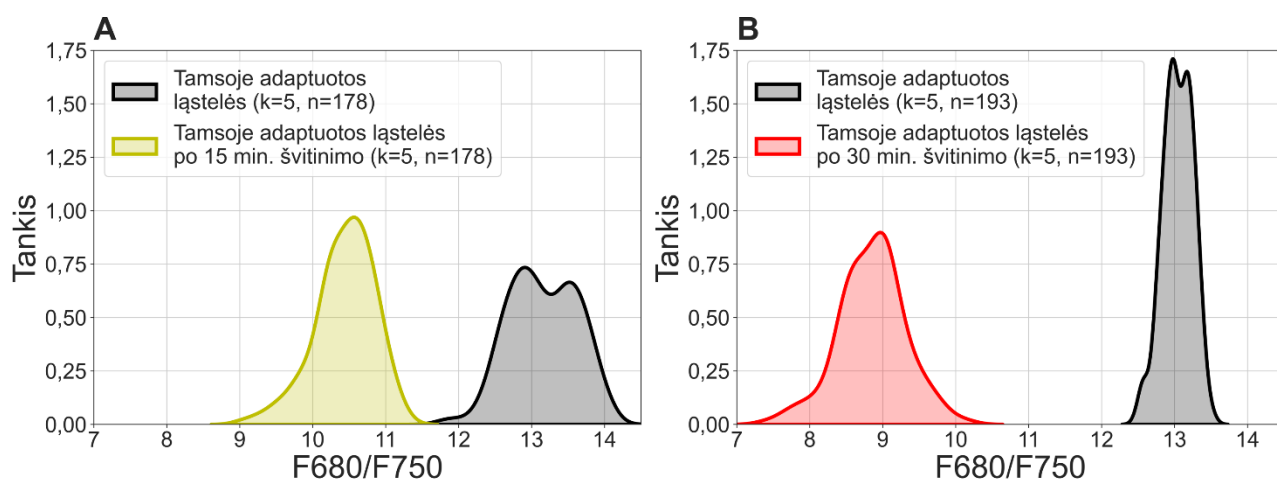
3.9 pav. Išilgai *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės registruotų F680/F750 santykio verčių pokyčiai po 30 min. švitinimo balta šviesa. Santykio reikšmės prieš ir po švitinimo atvaizduotos skirtingose skalėse

Taip pat įvertinta ir F680/F750 santykio reikšmių svyravimo išilgai tarpubamblinės ląstelės tendencijos pokyčiai po švitinimo. Tai atlikta siekiant susieti šio parametro skirtumus su nuo šviesos priklausomais fiziologiniais procesais. Nustatyta, kad ilgesnė švitinimo trukmė reikšmingai pakeitė parametro svyravimo tendenciją. Įvertinus pradinių ir po švitinimo registruotų verčių sąryšį, statistiškai reikšminga koreliacija nustatyta po 15 min. poveikio, o po 30 min. apšvietimo reikšmingas ryšys nebuvo nustatytas (3.10 pav.). Pavienių ląstelių duomenys pateikti 4 priede (4.5 pav.). Šis rezultatas nebuvo stebimas analizuojant fluorescencijos intensyvumo vertės pokyčius, todėl leistų patvirtinti 3.3.1 skyrelyje pateiktą teiginį, kad F680/F750 santykis yra jautresnis fiziologinių procesų įtakai nei fluorescencijos intensyvumo vertė pagrindiniame maksimume (680 nm).



3.10 pav. F680/F750 santykio verčių prieš ir po švitinimo ryšys. Santrumpos paaiškintos 3.7 pav.

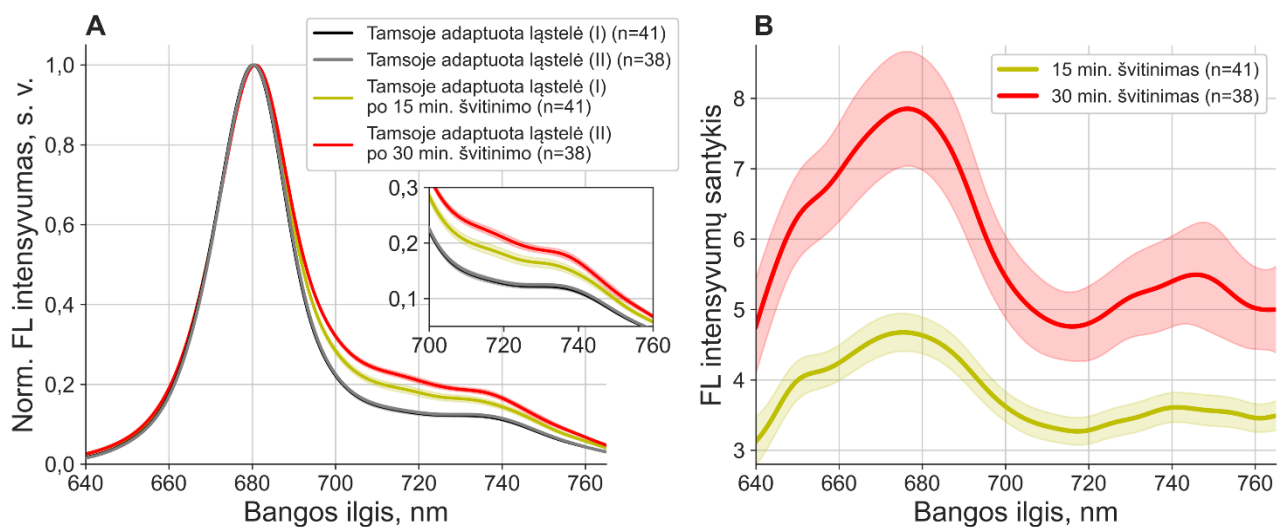
Patvirtinus, kad F680/F750 santykio vertė yra tinkamesnė fiziologinių procesų įtakos įvertinimui, o šio parametro skirtumai prieš ir po švitinimo yra reikšmingi, nuspręsta atlikti išsamesnę statistinę analizę. Pasirinkta nustatyti sklaidos pokyčius, kadangi šio parametro įvertinimas leistų spręsti, ar šviesos poveikis lemia didesnius vertės svyravimus išilgai ląstelės. Atlikus Brown-Forsythe testą, statistiškai reikšmingi skirtumai po švitinimo nustatyti tik po 30 min. poveikio, o šis skirtumas stebimas ir pateiktuose verčių skirstiniuose (3.11 pav.). Registruojamų reikšmių sklaida pakito nuo 0,15 iki 0,28 (pateiktos MAD reikšmės). Rezultatas parodo, jog ilgesnė apšvietimo trukmė lėmė platesnį po poveikio registruojamų F680/F750 santykio verčių intervalą, o nustatyti skirtumai taip pat leidžia spręsti, kad po 30 min. poveikio šviesa tarpubamblinėse ląstelėse stebimos labiau atsiskiriančios skirtingo fotosintetinio aktyvumo zonos.



3.11 pav. Tamsoje adaptuotų *Nitellopsis obtusa* ląstelių F680/F750 santykio verčių pokyčiai po 15 min. (A) ir 30 min. (B) švitinimo. Pateikti normuoti skirstiniai, plotas po kreivėmis lygus vienetui. Santrumpos paaiškintos 3.7 pav.

Be to, F680/F750 santykio reikšmių skirstiniuose (3.11 pav.) taip pat stebimi ir skirtingi verčių kitimo intervalai tarp vienodomis apšvietimo sąlygomis laikytų bandinių. Palyginus tamsoje adaptuotų ląstelių reikšmių pasiskirstymą, matoma, kad vienoje iš grupių (3.11 pav. A) registruotų parametro verčių intervalas yra platesnis nei kitos bandinių grupės (3.11 pav. B). Toks rezultatas leistų manyti, kad F680/F750 santykio reikšmė priklauso ne tik nuo šviesos sąlygotų fiziologinių procesų, tačiau gali būti nulemta ir pavienių ląstelių savybių.

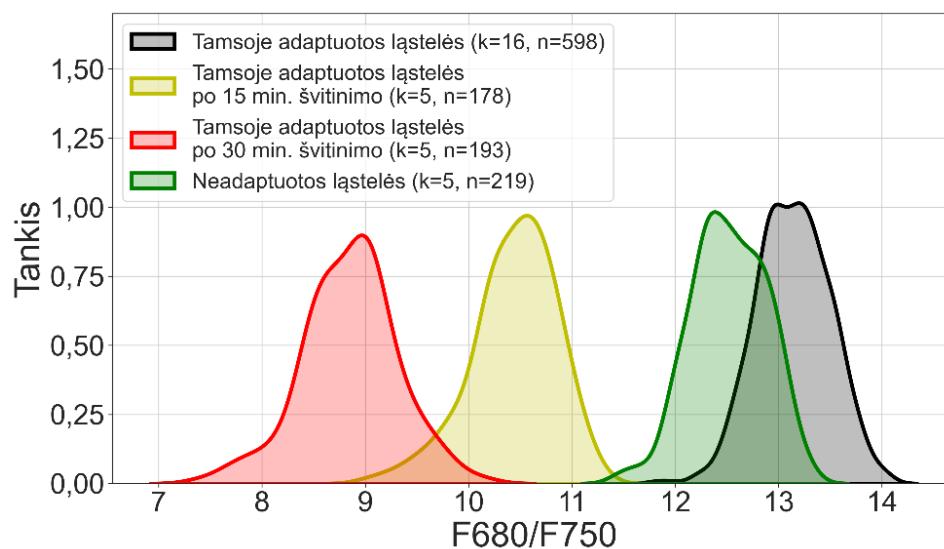
Kadangi F680/F750 santykio vertės leidžia spręsti apie spektro formos pokyčius, nustačius statistiškai reikšmingus parametro skirtumus, palyginti santykiniai fluorescencijos intensyvumo pokyčiai visame signalo bangos ilgių intervale. Nustatyta, kad registruojamų spektrų forma yra priklausoma nuo apšvietimo sąlygų (3.12 pav. A). Šie skirtumai išryškėjo suvidurkinus vienos ląstelės fluorescencijos spektrus ir intensyvumo vertes registruotas prieš poveikį padalijus iš reikšmių registruotų po švitinimo (3.12 pav. B). Pastebima, kad fluorescencijos intensyvumai registruoti bangos ilgių intervale nuo 650 nm iki 710 nm pakito santykinai daugiau nei vertės, fiksuotos nuo 710 nm iki 760 nm. Kadangi pagrindinis chlorofilo fluorescencijos spektro maksimumas siejamas su PSII, o antrasis su PSI aktyvumu (Franck ir kt., 2002), rezultatas leidžia teigti, kad švitinimas labiau paveikia PSII reakcijų efektyvumą.



3.12 pav. Normuoti vidurkiniai *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos (FL) spektrai skirtingo apšvietimo sąlygomis (A), įdėtiniame grafike pateiktas intervalo nuo 700 nm iki 760 nm vaizdas mažesnėje intensyvumo skalėje. (B) Nenormuotų signalų prieš ir po švitinimo vidutiniai santykiniai skirtumai. Nuspaldintas plotas aplink kreives vaizduoja standartinį nuokrypį, n – suvidurkintų spektrų, registruotų vienoje ląstelėje, skaičius

Nustačius F680/F750 santykio priklausomybę nuo švitinimo trukmės, nuspręsta po poveikio registruotus spektrus palyginti su signalais, fiksuotais nešvitintuose bandiniuose. Įvertinta, kad tiek

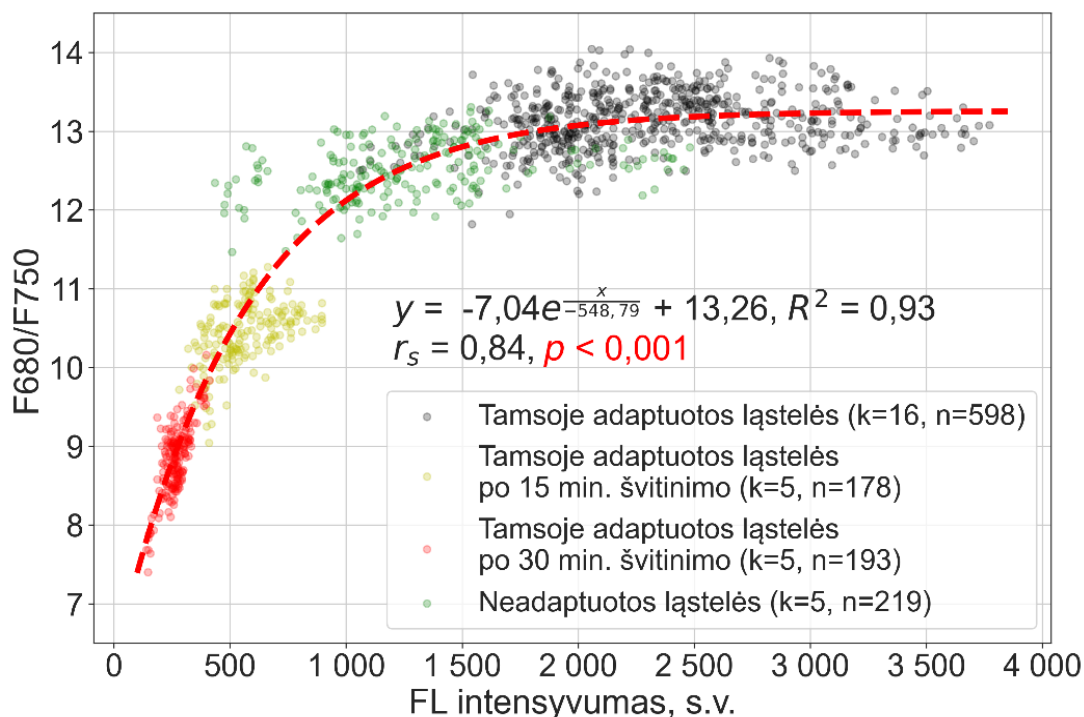
kontroliuojamomis šviesa/tamsa apšvietimo sąlygomis laikomuose, tiek tamsoje adaptuotuose bandiniuose registruojamos didesnės parametro vertės (3.13 pav.). Neadaptavus ląstelių apskaičiuotos F680/F750 santykio reikšmės nuo 11,47 iki 13,31, o po tamsinės adaptacijos nustatytos didžiausios parametro vertės nuo 11,82 iki 14,05. Atlikus statistinę rezultatų analizę (Kruskall-Wallis testas), patvirtinta, kad stebimi F680/F750 santykio reikšmių skirtumai yra reikšmingi tarp visų bandinių grupių. Tačiau kitoks rezultatas nustatytas įvertinus sklaidos pokyčius (Brown-Forsythe testas). Šiuo atveju reikšmingi skirtumai nustatyti tik tarp 30 min. švitintų dumblių ląstelių ir nešvitintų bandinių. Taigi, jei sklaidos parametras siejamas su labiau atsiskiriančiomis skirtingo fotosintetinio aktyvumo sritimis, jų susiformavimui būtina ilgesnė nei 15 min. švitinimo trukmė, kai naudojamo šviesos šaltinio PPFD vertė siekia $829 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



3.13 pav. Normuoti F680/F750 santykio skirstiniai skirtingo apšvietimo sąlygomis. Santrumpos paaiškintos 3.7 pav.

Kadangi skirtingo apšvietimo sąlygomis registruojami signalai pasižymi ir skirtingomis fluorescencijos intensyvumo vertėmis, įvertintas F680/F750 santykio ir pagrindiniame spektro maksimume (680 nm) fiksuoto intensyvumo ryšys. Nustatyta, kad registruojant didesnes fluorescencijos intensyvumo reikšmes, apskaičiuojamos ir didesnės F680/F750 vertės, sąryšis yra statistiškai reikšmingas (3.14 pav.). Tačiau stebima priklausomybė nėra tiesinė, todėl norint geriau įvertinti parametų sąryšį atlikta aproksimacija eksponentine funkcija, kuri taip pat pateikta 3.14 pav. Be to, apskaičiuota determinacijos koeficiento vertė patvirtina, kad sudarytas modelis yra tinkamas prognozuoti apšvietimo nulemtus pokyčius. Taigi nukrypimai nuo nustatytos tendencijos leistų spręsti apie kitų veiksnių poveikį dumblių ląstelių fluorescencijos parametrų bei fotosintetiniams

procesams. Tai patvirtinta atlikus preliminarinius eksperimentus, fluorescencijos spektrus registruojant tarpubamblius patalpinus skirtingo rūgštingumo APW tirpaluose. Nustatyta, kad F680/F750 vertės fiksuotos rūgštinėje (pH 4) terpėje nėra būdingos tokio paties intensyvumo signalų reikšmėms, kai fluorescencija registruojama nebuferiniame tirpale (5 priedas, 4.6 pav.).



3.14 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo vertės ties 680 nm ir F680/F750 santykio sąryšis. Reikšmės aproksimuotos eksponentine funkcija. Santrumpos: R^2 – determinacijos koeficientas, r_s – Spearman koreliacijos koeficientas, p – reikšmingumo lygmuo

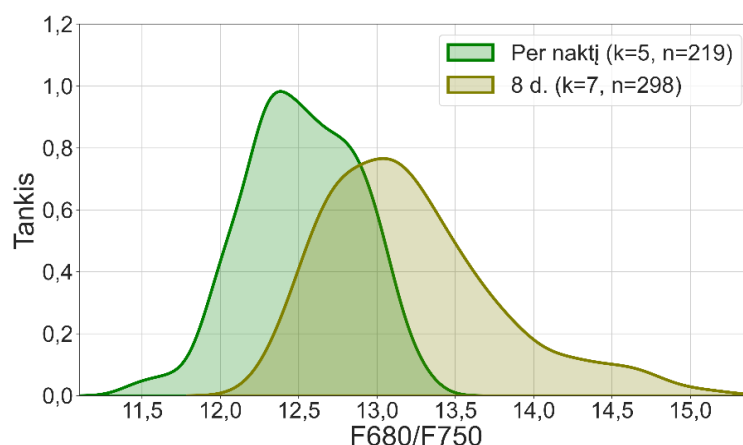
Apibendrinant skirtingo apšvietimo sąlygomis registruotų *Nitellopsis obtusa* ląstelių fluorescencijos spektrų analizės rezultatus, galima teigti, jog skirtingos apšvietimo sąlygos lemia reikšmingus fluorescencijos parametrų pokyčius, leidžiančius spręsti apie fotosintetinio aktyvumo skirtumus (Baker, 2008). Lyginant dviejų skirtingų apšvietimo trukmių poveikį analizuojamiems parametrams nustatyta, kad ilgesnė apšvietimo trukmė (30 min.) lėmė didesnę fluorescencijos parametrų verčių sumažėjimą ir reikšmingus F680/F750 santykio sklaidos pokyčius. Šis rezultatas leidžia spręsti apie didesnius skirtumus išilgai ląstelės, tačiau rezultatų interpretacija yra sudėtinga. Dauguma publikuotų *Characeae* šeimos dumblių fotosintetinio aktyvumo tyrimų atlikti PAM metodika, o skirtingos fotosistemos nėra išskiriamos. Nepaisant to, (Bulychev ir kt., 2001b) eksperimente, naudojant mažesnio intensyvumo šviesos šaltinį, pH juostos buvo atkurtos po 20 min. trukmės apšvietimo. Toks rezultatas leistų spręsti, kad šiame darbe naudotas 30 min. švitinimas taip

pat turėtų būti pakankamas skirtingo fotosintetinio aktyvumo sritims atkurti. Tačiau fluorescencijos parametrų pokyčiai registruoti ir tamsoje adaptuotose ląstelėse, nors pH juostų reiškinys tokiomis sąlygomis nėra stebimas (Lucas ir Smith, 1973). Dodonova ir Bulychhev (2011) eksperimente nustatyta, kad net ir mažo intensyvumo ($190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) lokalus švitinimas gali lemti šarminių juostų susiformavimą, zonose nuo žadinamos srities nutolusiose mažiau nei 2 mm, o susiformavimas trunka iki 4 min. Tačiau publikuotuose moksliniuose tyrimuose šie eksperimentai nėra atlikti su tamsoje adaptuotomis ląstelėmis, todėl sunku spręsti, ar šiame darbe žadinimui naudota šviesa galėjo lemti šarminių sričių susiformavimą 1 val. trukmės matavimų metu. Taip pat svarbu pastebėti, kad dauguma publikuotų eksperimentų atlikti su *Chara corallina* ląstelėmis, todėl galimi ir skirtumai tarp rūšių. Visgi, Bulychhev ir kt. (2021) eksperimente, fluorescencijos signalus registruojant *Chara australis* ir *Nitellopsis obtusa* ląstelėse, reikšmingi rūšių skirtumai nebuvo nustatyti. Taigi norint sieti registruojamus fluorescencijos parametrų pokyčius su pH juostomis, detalesnė analizė yra būtina, eksperimentų rezultatai neleidžia identifikuoti procesų, lėmusių stebimus pokyčius. Nepaisant to, pasirinktas neinvazinis tyrimo metodas yra pakankamai jautrus šiems skirtumams detektuoti.

Analizuojant švitinimo eksperimentų duomenis taip pat buvo pastebėtas ir skirtingas fotosistemų atsakas. Nepriklausomai nuo švitinimo trukmės, apie PSII efektyvumą spręsti leidžiančiuose bangos ilgiuose registruoti santykinai didesni fluorescencijos intensyvumo pokyčiai. Publikuotuose moksliniuose *Characeae* dumblių tyrimuose fotosistemos atskiriamos nėra, o pateikiamos fluorescencijos parametrų vertės įprastai siejamos tik su PSII reakcijomis.

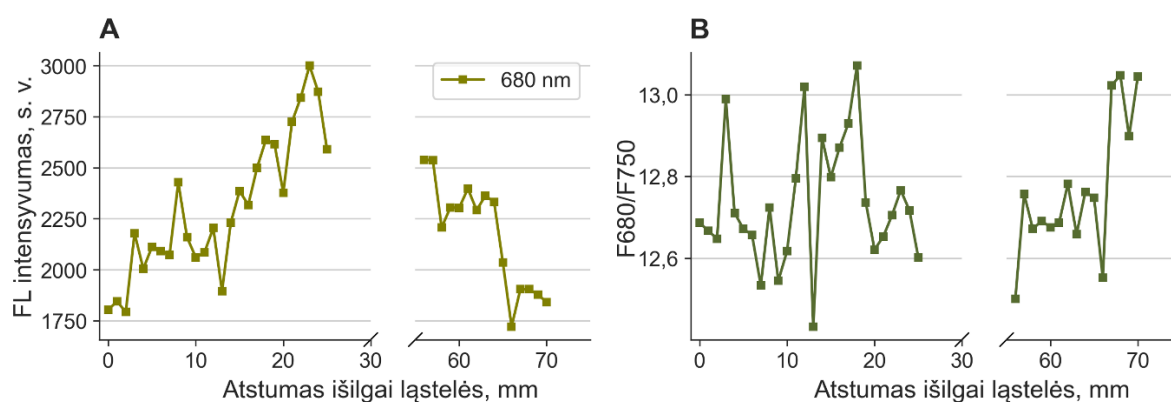
3.4 *Nitellopsis obtusa* fluorescencijos parametrų priklausomybė nuo ląstelių laikymo sąlygų

Fluorescencijos parametrus panašiai paveikti gali skirtingi veiksniai (Pedros ir kt., 2008), todėl norint sieti stebimus pokyčius su konkrečiais fiziologiniais procesais, svarbu atsižvelgti į skirtingų veiksnių įtaką registruojamiems signalams. Šioje eksperimentų serijoje nuspręsta nustatyti parametrų priklausomybę nuo bandinio paruošimo metodikos. Atsižvelgus į ankstesniuose skyreliuose pateiktus rezultatus, pirmiausia analizuotos ne fluorescencijos intensyvumo vertės, o F680/F750 santykio skirtumai. Nustatyta, kad šis parametras yra priklausomas nuo bandinio paruošimo metodikos. Eksperimentuose atskirtos dumblių ląstelės kontroliniame APW tirpale įprastai laikomos naktį iki tyrimo, pastovaus apšvietimo ($9,5 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sąlygomis, o fiksuojamos parametro vertės kinta nuo 11,47 iki 13,31. Tačiau pakeitus šią trukmę ir signalus registruojant ląstelėse, papildomai kontroliniame tirpale laikytose 8 d., nekontroliuojamomis apšvietimo sąlygomis, nustatomos didesnės parametro reikšmės, nuo 12,32 iki 15,14 (13.15 pav.).



3.15 pav. Normuoti F680/F750 santykio verčių skirstiniai, naudojant skirtingą bandinio paruošimo metodiką. Legendoje nurodyta laikymo kontroliniame APW tirpale trukmė, pateikti skirtingų ląstelių duomenys, t. y. matavimai nėra poriniai. Santrumpos: k – ląstelių skaičius, n – registruotų spektrų skaičius.

Nepaisant verčių skirtumo, tiek fluorescencijos intensyvumo, tiek F680/F750 santykio reikšmių kitimas išilgai tarpubamblinės ląstelės yra išlikęs (13.16 pav.). Šis rezultatas leistų teigti, kad ilgesnė bandinio laikymo kontroliniame tirpale trukmė paveikia fotosintetinių procesų efektyvumą, tačiau veiksniai, lemiantys fluorescencijos parametro verčių svyravimus, yra išlikę. Pateiktame grafike (13.16 pav.) taip pat galima pastebėti, kad registruotos fluorescencijos intensyvumo vertės, ankstesniuose eksperimentuose stebėtos bandinius adaptavus tamsoje. Tai leistų manyti, kad skirtumus lemti galėjo ir apšvietimo sąlygos, kadangi tiriant parametrų priklausomybę nuo bandinio paruošimo metodikos, jos nebuvo kontroliuojamos. Tačiau fiksuotos intensyvumo vertės buvo skirtingos tarp ląstelių ir kito nuo 671 s. v. iki 3892 s. v., o dalis apskaičiuotų F680/F750 santykio reikšmių nebuvo būdingos nei vienai iš skirtingo apšvietimo sąlygomis laikytų bandinių grupių. Toks rezultatas leistų spręsti apie skirtingų veiksnių poveikį registruotiems signalams.



3.16 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo vertės ties 680 nm (A) ir F680/F750 santykio (B) kitimas išilgai *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinės ląstelės po 8 d. kontroliniame APW tirpale.

Palyginus pokyčius, stebimus keičiant bandinio laikymo kontroliniame tirpale trukmę, ir skirtumus registruotas ląsteles paveikus balta šviesa, pastebima, kad šie veiksniai turi priešingą poveikį dumblių fluorescencijai. Po švitinimo registruotos mažesnės F680/F750 santykio vertės, o ilgesnė ląstelių laikymo kontroliniame tirpale trukmė lėmė didesnes reikšmes. Tačiau nepriklausomai nuo poveikio, fluorescencijos intensyvumo ir F680/F750 santykio verčių svyravimas išilgai ląstelės buvo išlikęs. Be to, svarbu pastebėti, kad po 30 min. poveikio šviesa nustatyti ir reikšmingi sklaidos skirtumai, todėl registruotos mažesnės fluorescencijos parametrų vertės leistų teigti, kad pokyčiai išilgai ląstelės taip pat yra priklausomi nuo apšvietimo sąlygų ir gali būti siejami su fotosintetiniu aktyvumu. Nustatant analizuojamų parametrų priklausomybę nuo laikymo kontroliniame tirpale trukmės, kartotiniai eksperimentai nebuvo atliekami, tačiau įvertinus sklaidos skirtumus (Brown-Forsythe testas) tarp nepriklausomų matavimų, taip pat nustatytas statistiškai reikšmingas rezultatas, sklaida buvo didesnė. Toks rezultatas leistų manyti, kad ląstelių laikymo kontroliniame tirpale trukmė taip pat lemia didesnius verčių pokyčius išilgai ląstelės, tačiau tam patvirtinti reiktų atlikti kartotinius matavimus. Taigi fluorescencijos parametrų priklausomybės nuo ląstelių laikymo sąlygų įvertinimas patvirtina, jog pasirinkti parametrai yra tinkami dumblių fiziologinės būklės įvertinimui, o kontroliuojamų sąlygų prieš eksperimentus palaikymas yra būtinas, norint užtikrinti gaunamų rezultatų patikimumą.

IŠVADOS

1. *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių autofluorescencijos parametrai – intensyvumas ir spektro forma, išilgai ląstelės yra kintantys ir leidžia įvertinti skirtingo fotosintetinio aktyvumo sritis;
2. *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių F680/F750 santykis yra tinkamesnis fotosintetinio aktyvumo skirtumams aptikti nei absoliuti fluorescencijos intensyvumo vertė;
3. Statistiškai reikšmingas *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių autofluorescencijos parametru – intensyvumo ir F680/F750 santykio, verčių sumažėjimas po švitinimo indikuoja fotosintetinių procesų pokyčius;
4. *Nitellopsis obtusa* tarpubamblinių ląstelių autofluorescencijos parametrai – intensyvumas ir F680/F750 santykis, yra paveikiami ląstelių laikymo sąlygų.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Aušrinė Navickaitė
Bakalauro baigiamasis darbas

**MENTURDUMBLIO *NITELLOPSIS OBTUSA* LĄSTELIŲ CHLOROFILO
FLUORESCENCIJOS TYRIMAS**

SANTRAUKA

Fotosintezės metu, dalis šiam procesui būtinos energijos išsklaidoma fluorescencijos būdu. Dėl šios priežasties fluorescencijos spektroskopija yra plačiai taikoma fotosintetinių procesų tyrimuose. Menturdumbliai – unikali modelinė sistema, pastovaus apšvietimo sąlygomis išilgai šių dumblių ląstelių stebimos skirtingo rūgštingumo zonos, o šio reiškinio svarba fotosintetiniams procesams dar nėra suprata.

Šio darbo tikslas – pritaikyti fluorescencijos spektroskopiją, įvertinant *Nitellopsis obtusa* fotosintetinį aktyvumą. Kombinuojant optinę šviesolaidinę bei bandinio padėtį kontroliuoti leidžiančią sistemas, dumblių tarpubambliai žadinti 405 nm šviesa, o fluorescencijos signalai registruoti 1 mm intervalais. Matavimai atlikti ląstelėse, prieš eksperimentus laikomose skirtingo apšvietimo sąlygomis bei paruoštose skirtinga metodika.

Rezultatai atskleidė, kad registruojamų fluorescencijos spektrų intensyvumas ir forma kinta išilgai ląstelės ir leidžia spręsti apie skirtingo fotosintetinio aktyvumo sritis. Taip pat nustatyta, kad F680/F750 santykis yra tinkamesnis spręsti apie fiziologinius pokyčius dumblių ląstelėse nei maksimali fluorescencijos intensyvumo vertė, kadangi parametras yra mažiau jautrus nefiziologinių veiksnių įtakai. Be to, po 15 min. ir 30 min. švitinimo balta šviesa, registruotas reikšmingas šių parametrų reikšmių sumažėjimas, indikuojantis fotosintetinių procesų pokyčius. Reikšmingi fluorescencijos parametrų skirtumai taip pat nustatyti ir ląsteles iki eksperimento laikant skirtingomis sąlygomis. Šis rezultatas parodo, kad emisijos parametrai yra paveikiami įvairių aplinkos veiksnių.

Taigi pasirinktas optinis, neinvazinis metodas yra pakankamai jautrus detektuoti fotosintetinio aktyvumo pokyčius, tačiau atliktų eksperimentų rezultatai kol kas dar negali identifikuoti veiksnių, lemiančių šiuos skirtumus. Nepaisant to, eksperimentų rezultatai gali būti pritaikomi tolimesniuose menturdumblių fotosintetinio aktyvumo tyrimuose.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Aušrinė Navickaitė
Bachelor thesis

**INVESTIGATION OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE OF CHARACEAN
NITELLOPSIS OBTUSA CELLS**

SUMMARY

Fluorescence spectroscopy is widely used to investigate photosynthetic performance, as part of the energy needed for photosynthesis can be emitted instead of being used in photochemical reactions. Characean algae represent a unique model to study photosynthetic activity. Under constant illumination characean internodes produce alternating pH bands along their surface whose relationship with photosynthesis still needs to be investigated.

The aim of this study was to apply fluorescence spectroscopy to investigate changes of photosynthetic activity in *Nitellopsis obtusa*. A controlled stepper motor paired with an optical fibre system enabled registration of fluorescence signals along algae cells in 1 mm intervals while exciting the cell with 405 nm light. Signals were registered in cells kept under different lighting and storage conditions before the experiments.

Results showed that intensity and spectral shape of registered fluorescence spectra vary along the cell and indicate zones of different photosynthetic activity. It was also concluded that the F680/F750 ratio is a more suitable parameter to draw conclusions about physiological changes in algae cells than the peak fluorescence intensity value as it is less affected by non-physiological factors. Moreover, 15 min. and 30 min. illumination of algae cells resulted in lower maximum fluorescence intensity and F680/F750 ratio values indicating changes of photosynthetic performance. Different sample preparation technique also resulted in statistically significant changes of fluorescence parameters showing that emission parameters are sensitive to various environmental factors.

Hence, the sensitivity of the chosen optical non-invasive method is sufficient to detect physiological patterns. However, results of performed experiments are unable to identify the cause of these changes yet. The obtained knowledge can be applied in further studies of Characean algae photosynthetic performance.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ac, A., Malenovsky, Z., Olejnickova, J., Galle, A., Rascher, U., & Mohammed, G. (2015). Meta-analysis assessing potential of steady-state chlorophyll fluorescence for remote sensing detection of plant water, temperature and nitrogen stress. *Remote Sensing of Environment*, 168, 420–436. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2015.07.022>
2. Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
3. Baslam, M., Mitsui, T., Hodges, M., Priesack, E., Herritt, M. T., Aranjuelo, I., & Sanz-Saez, A. (2020). Photosynthesis in a Changing Global Climate: Scaling Up and Scaling Down in Crops. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00882>
4. Beaune, D., Sellier, Y., Lambert, E., & Grandjean, F. (2018). The use of Chara spp. (Charales: Characeae) as a bioindicator of physico-chemical habitat suitability for an endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in lentic waters. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(2), 506–511. <https://doi.org/10.1002/aqc.2847>
5. Beilby, M. J., & Bisson, M. A. (2012). PH Banding in Charophyte Algae. A. G. Volkov (Sud.), *Plant Electrophysiology: Methods and Cell Electrophysiology* (p. 247–271). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29119-7_11
6. Beilby, M. J., & Casanova, M. T. (2014). Detached Cells in Steady State: Electrophysiology and Transport. M. J. Beilby & M. T. Casanova (Sud.), *The Physiology of Characean Cells* (p. 43–114). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40288-3_2
7. Beilby, M. J., Shepherd, V., & Absolonova, M. (2017). The role of H⁺ /OH[–] channels in saline pathology of Chara australis: Brief history. *Botany Letters*, 165, 1–10. <https://doi.org/10.1080/23818107.2017.1356745>
8. Bjorn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E., & G. Govindjee. (2009). A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynthesis Research*, 99(2), 85–98. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>
9. Braun, M., Foissner, I., Lohring, H., Schubert, H., & Thiel, G. (2007). Characean Algae: Still a Valid Model System to Examine Fundamental Principles in Plants. K. Esser, U. Lottge, W. Beyschlag, & J. Murata (Sud.), *Progress in Botany* (T. 68, p. 193–220). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36832-8_9
10. Buchel, C., & Wilhelm, C. (1993). In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: Progress, problems and perspectives. *Photochemistry and Photobiology (USA)*, 58(1), 137–148.
11. Bulychev, A. A., Cherkashin, A. A., Rubin, A. B., Vredenberg, W. J., Zykov, V. S., & Muller, S. C. (2001a). Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of Chara corallina. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 53(2), 225–232. [https://doi.org/10.1016/s0302-4598\(01\)00096-4](https://doi.org/10.1016/s0302-4598(01)00096-4)
12. Bulychev, A. A., Polezhaev, A. A., Zykov, S. V., Pljusnina, T. YU., Riznichenko, G. YU., Rubin, A. B., Jantoss, W., Zykov, V. S., & Muller, S. C. (2001b). Light-triggered pH Banding Profile in Chara Cells Revealed with a Scanning pH Microprobe and its Relation to Self-Organization Phenomena. *Journal of Theoretical Biology*, 212(3), 275–294. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2375>
13. Bulychev, A. A., Zykov, S. V., Rubin, A. B., & Muller, S. C. (2003). Transitions from alkaline spots to regular bands during pH pattern formation at the plasmalemma of Chara cells. *European Biophysics Journal*, 32(2), 144–153. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0280-4>

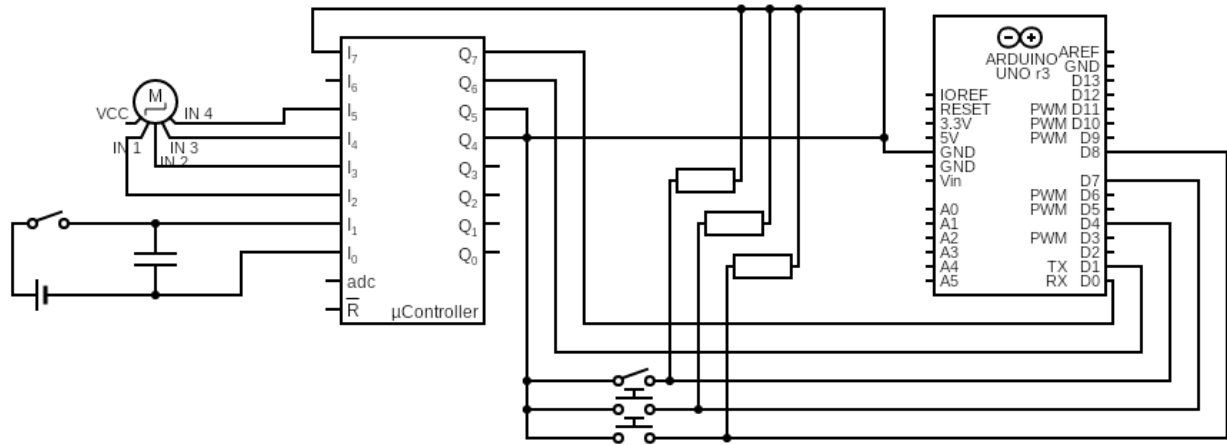
14. Bulychev, A. A., Cherkashin, A. A., & Rubin, A. B. (2004). Spatial Coordination of Photosynthesis and H⁺ Transport in Chara corallina as Studied with the Use of Local and Whole-Cell Illumination. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(1), 1–8. <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000011296.16215.9d>
15. Bulychev, A., Wijngaard, P., & Boer, A. D. (2005). Spatial Coordination of Chloroplast and Plasma Membrane Activities in Chara Cells and Its Disruption through Inactivation of 14-3-3 Proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 55–61. <https://doi.org/10.1007/PL00021756>
16. Bulychev, A. A., & Krupenina, N. A. (2008). Effects of plasma membrane excitation on spatially distributed H⁺ fluxes, photosynthetic electron transport and non-photochemical quenching in the plant cell. E. M. Bernstein (Sud.), *Bioelectrochemistry Research Developments* (p. 159–188). Nova Science Publishers.
17. Bulychev, A. A. (2012). Membrane Excitation and Cytoplasmic Streaming as Modulators of Photosynthesis and Proton Flows in Characean Cells. A. G. Volkov (Sud.), *Plant Electrophysiology: Methods and Cell Electrophysiology* (p. 273–300). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29119-7_12
18. Bulychev, A. A., & Komarova, A. V. (2015). Photoinduction of cyclosis-mediated interactions between distant chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(4), 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.004>
19. Bulychev, A. A., Cherkashin, A. A., Shapiguzov, S. Y., & Alova, A. V. (2021). Effects of chloroplast-cytoplasm exchange and lateral mass transfer on slow induction of chlorophyll fluorescence in Characeae. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1901–1913. <https://doi.org/10.1111/ppl.13531>
20. Buschmann, C. (2007). Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research*, 92(2), 261–271. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9187-8>
21. Cruz, J. A., & Avenson, T. J. (2021). Photosynthesis: A multiscopic view. *Journal of Plant Research*, 134(4), 665–682. <https://doi.org/10.1007/s10265-021-01321-4>
22. Dodonova, S. O., & Bulychev, A. A. (2011). Cyclosis-related asymmetry of chloroplast–plasma membrane interactions at the margins of illuminated area in Chara corallina cells. *Protoplasma*, 248(4), 737–749. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0241-6>
23. Eullaffroy, P., & Vernet, G. (2003). The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: A potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Water Research*, 37(9), 1983–1990. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00621-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00621-8)
24. Foissner, I. (2004). Microfilaments and microtubules control the shape, motility, and subcellular distribution of cortical mitochondria in characean internodal cells. *Protoplasma*, 224(3), 145–157. <https://doi.org/10.1007/s00709-004-0075-1>
25. Foissner, I., Menzel, D., & Wasteneys, G. O. (2009). Microtubule-dependent motility and orientation of the cortical endoplasmic reticulum in elongating characean internodal cells. *Cell Motility*, 66(3), 142–155. <https://doi.org/10.1002/cm.20337>
26. Foissner, I., & Wasteneys, G. O. (2014). Chapter Seven—Characean Internodal Cells as a Model System for the Study of Cell Organization. K. W. Jeon (Sud.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (T. 311, p. 307–364). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800179-0.00006-4>
27. Franck, F., Juneau, P., & Popovic, R. (2002). Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1556(2–3), 239–246. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00366-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00366-3)

28. Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: Historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116(6), 483–505. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0110-x>
29. Harbinson, J., & Rosenqvist, E. (2003). An Introduction to Chlorophyll Fluorescence. J. R. DeEll & P. M. A. Toivonen (Sud.), *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (p. 1–29). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0415-3_1
30. Herbst, A., Patzelt, L., Schoebe, S., Schubert, H., & von Tumpling, W. (2019). Bioremediation approach using charophytes—Preliminary laboratory and field studies of mine drainage water from the Mansfeld Region, Germany. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), 34983–34992. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06552-6>
31. Hoepflinger, M. C., Geretschlaeger, A., Sommer, A., Hoeflberger, M., Nishiyama, T., Sakayama, H., Hammerl, P., Tenhaken, R., Ueda, T., & Foissner, I. (2013). Molecular and biochemical analysis of the first ARA6 homologue, a RAB5 GTPase, from green algae. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5553–5568. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert322>
32. Yarish, C., Redmond, S., & Kim, J. (2012). *Gracilaria Culture Handbook for New England*. Mansfield: Konektikuto universitetas [žiūrėta 2022-05-26]. Prieiga per internetą: <https://opencommons.uconn.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1072&context=wracklines>
33. Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T., & Delwiche, C. F. (2001). The Closest Living Relatives of Land Plants. *Science*, 294(5550), 2351–2353. <https://doi.org/10.1126/science.1065156>
34. Kashiya, T., Kimura, N., Mimura, T., & Yamamoto, K. (2000). Cloning and characterization of a myosin from characean alga, the fastest motor protein in the world. *Journal of Biochemistry*, 127(6), 1065–1070. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022699>
35. Kirilovsky, D., Rutherford, A. W., & Etienne, A. L. (1994). Influence of DCMU and ferricyanide on photodamage in photosystem II. *Biochemistry*, 33(10), 3087–3095. <https://doi.org/10.1021/bi00176a043>
36. Krause, G. H., & Weis, E. (1984). Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology: II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research*, 5(2), 139–157. <https://doi.org/10.1007/BF00028527>
37. Krause, G. H., & Weis, E. (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
38. Krupenina, N. A., Bulychev, A. A., Roelfsema, M. R. G., & Schreiber, U. (2008). Action potential in Chara cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(6), 681–688. <https://doi.org/10.1039/B802243G>
39. Kufel, L., & Kufel, I. (2002). Chara beds acting as nutrient sinks in shallow lakes—A review. *Aquatic Botany*, 72(3), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00204-2)
40. Lakowicz, J. R. (2006). Introduction to Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (p. 1–26). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_1
41. Lucas, W. J., & Smith, F. A. (1973). The Formation of Alkaline and Acid Regions at the Surface of Chara corallina Cells. *Journal of Experimental Botany*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/jxb/24.1.1>
42. Newete, S. W., & Byrne, M. J. (2016). The capacity of aquatic macrophytes for phytoremediation and their disposal with specific reference to water hyacinth. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(11), 10630–10643. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6329-6>

43. Nishiyama, T., Sakayama, H., de Vries, J., Buschmann, H., Saint-Marcoux, D., Ullrich, K. K., Haas, F. B., Vanderstraeten, L., Becker, D., Lang, D., Vosolsobe, S., Rombauts, S., Wilhelmsson, P. K. I., Janitza, P., Kern, R., Heyl, A., Rumpler, F., Villalobos, L. I. A. C., Clay, J. M., ... Rensing, S. A. (2018). The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell*, 174(2), 448-464.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.033>
44. Noomnarm, U., & Clegg, R. M. (2009). Fluorescence lifetimes: Fundamentals and interpretations. *Photosynthesis Research*, 101(2-3), 181-194. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9457-8>
45. Papageorgiou, G. C. (2004). Fluorescence of Photosynthetic Pigments in Vitro and in Vivo. G. C. Papageorgiou & G. Govindjee (Sud.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (p. 43-63). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_2
46. Pedros, R., Moya, I., Goulas, Y., & Jacquemoud, S. (2008). Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 7, 498-502. <https://doi.org/10.1039/b719506k>
47. Pfundel, E. (1998). Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research*, 56(2), 185-195. <https://doi.org/10.1023/A:1006032804606>
48. Plieth, C., Tabrizi, H., & Hansen, U.-P. (1994). Relationship between banding and photosynthetic activity in Chara corallina as studied by the spatially different induction curves of chlorophyll fluorescence observed by an image analysis system. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 205-211. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00420.x>
49. Quade, B. N., Parker, M. D., Hoepflinger, M. C., Phipps, S., Bisson, M. A., Foissner, I., & Beilby, M. J. (2021). The molecular identity of the characean OH⁻ transporter: A candidate related to the SLC4 family of animal pH regulators. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01677-3>
50. Ramanujam, N. (2000). Fluorescence Spectroscopy In Vivo. R. A. Meyers (Sud.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (p. 20-56). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0102>
51. Raven, J. A., & Hurd, C. L. (2012). Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae. *Photosynthesis Research*, 113(1), 105-125. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9768-z>
52. Schreiber, U. (2004). Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. G. C. Papageorgiou & G. Govindjee (Sud.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (p. 279-319). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_11
53. Sehnke, P. C., DeLille, J. M., & Ferl, R. J. (2002). Consummating signal transduction: The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *The Plant Cell*, 14 Suppl, S339-354. <https://doi.org/10.1105/tpc.010430>
54. Spear, D. G., Barr, J. K., & Barr, C. E. (1969). Localization of hydrogen ion and chloride ion fluxes in Nitella. *The Journal of General Physiology*, 54(3), 397-414. <https://doi.org/10.1085/jgp.54.3.397>
55. Tazawa, M. (2003). Cell physiological aspects of the plasma membrane electrogenic H⁺ pump. *Journal of Plant Research*, 116(5), 419-442. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0109-3>
56. Valeur, B. (2001). Characteristics of Fluorescence Emission. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (p. 34-71). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/3527600248.ch3>

57. van Amerongen, H., Valkunas, L., & van Grondelle, R. (2000). Introduction: Structural organization, spectral properties and excitation energy transfer in photosynthesis. *Photosynthetic Excitons* (p. 1–45). World Scientific. https://doi.org/10.1142/9789812813664_0001
58. Weiss, O., & Reigosa Roger, M. J. (2001). Modulated Fluorescence. M. J. Reigosa Roger (Sud.), *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques* (p. 173–183). Springer. https://doi.org/10.1007/0-306-48057-3_11

1 priedas. Žingsninio variklio valdymo sistemos elektrinė schema



4.1 pav. Žingsninio variklio valdymo sistemos elektrinė schema. M – žingsninis variklis, plokštė kairėje – variklio valdiklis, jungiklis kairėje įjungia sistemą. Plokštė dešinėje – Arduino Uno R3 mikrokontroleris, jungiklis centre keičia variklio sukimosi kryptį, o mygtukai centre paslenka bandinį 1 mm ir 1 cm. Sistema sukonstruota konsultuojantis su darbo vadovu

2 priedas. Žingsninio variklio valdymo sistemos programinis kodas

```
// Defines pins numbers
const int stepPin = 3;
const int dirPin = 2;
const int blackButtonPin = 7;
const int redButtonPin = 8;
const int switchPin = 4;
#define stepsPerRevolution 200

// Variables for the status of pushbutton or switch
int blackButtonState = 0;
int redButtonState = 0;
int switchState = 0;

void setup() {
    // Sets the two pins as Outputs, buttons and switch as Inputs
    pinMode(stepPin, OUTPUT);
    pinMode(dirPin, OUTPUT);
    pinMode(blackButtonPin, INPUT);
    pinMode(redButtonPin, INPUT);
    pinMode(switchPin, INPUT);
}

void loop() {
    // Read the state of the switch and pushbutton values
    blackButtonState = digitalRead(blackButtonPin);
    redButtonState = digitalRead(redButtonPin);
    switchState = digitalRead(switchPin);

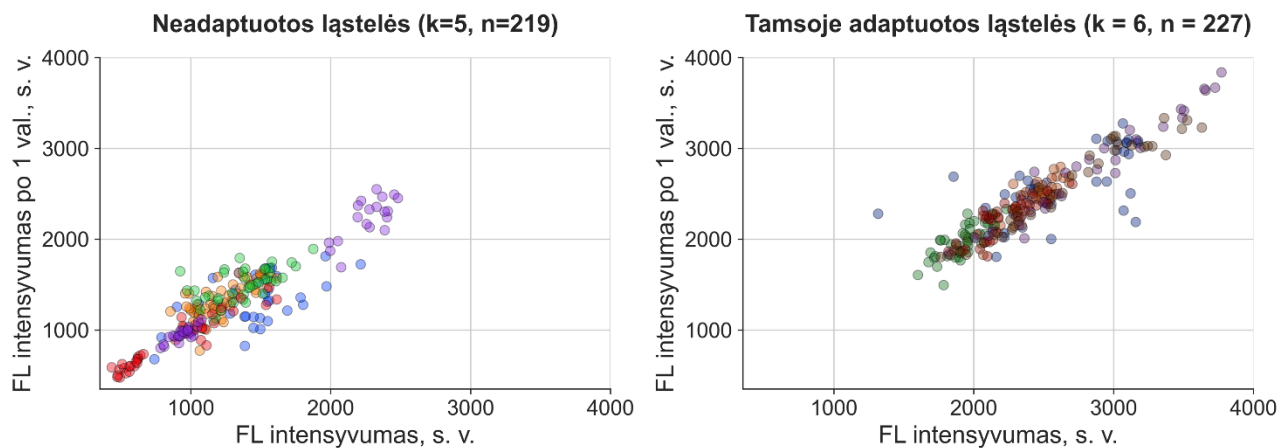
    // If switch is on & black button is pressed - go 1 cm forward each push
    if (switchState == HIGH && blackButtonState == HIGH) {
        digitalWrite(dirPin, HIGH);
        // 200 steps:
        for(int x = 0; x < 1 * stepsPerRevolution; x++) {
            // These four lines result in 1 step:
            digitalWrite(stepPin, HIGH);
            delayMicroseconds(2000);
            digitalWrite(stepPin, LOW);
            delayMicroseconds(2000);
        }
    }
    // If switch is on & red button is pressed - go 1 mm forward each push
    if (switchState == HIGH && redButtonState == HIGH) {
        digitalWrite(dirPin, HIGH);
        // 200 steps:
        for(int x = 0; x < 0.1 * stepsPerRevolution; x++) {
            // These four lines result in 1 step:
            digitalWrite(stepPin, HIGH);
            delayMicroseconds(2000);
            digitalWrite(stepPin, LOW);
            delayMicroseconds(2000);
        }
    }
    // If switch is off & black button is pressed - go 1 cm backwards each push
    if (switchState == LOW && blackButtonState == HIGH) {
        digitalWrite(dirPin, LOW);
        // 200 steps:
```

```

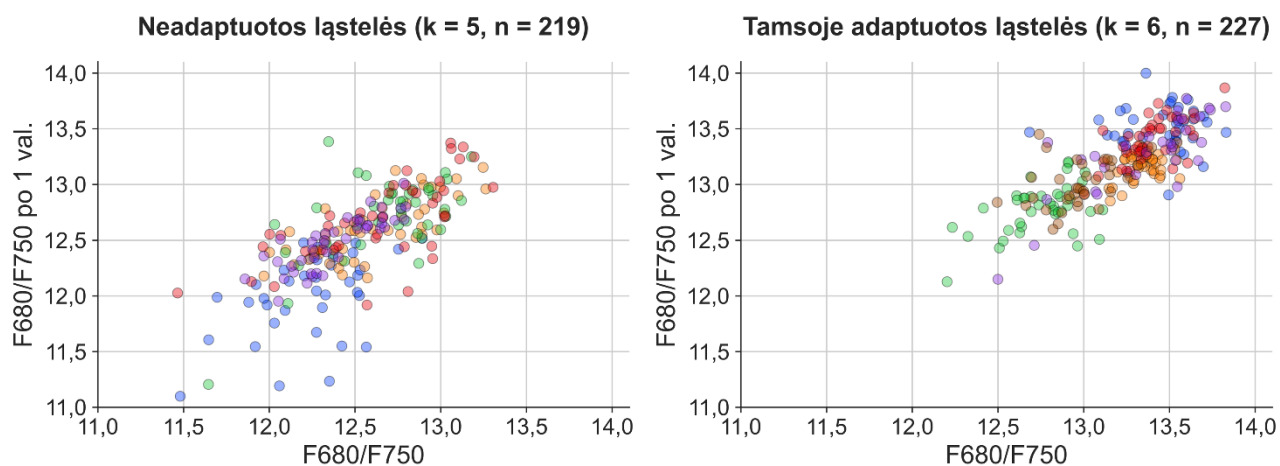
    for(int x = 0; x < 1 * stepsPerRevolution; x++) {
        // These four lines result in 1 step:
        digitalWrite(stepPin, HIGH);
        delayMicroseconds(2000);
        digitalWrite(stepPin, LOW);
        delayMicroseconds(2000);
    }
}
// If switch is off & red button is pressed - go 1 mm backwards each push
if (switchState == LOW && redButtonState == HIGH) {
    digitalWrite(dirPin, LOW);
    // 200 steps:
    for(int x = 0; x < 0.1 * stepsPerRevolution; x++) {
        // These four lines result in 1 step:
        digitalWrite(stepPin, HIGH);
        delayMicroseconds(2000);
        digitalWrite(stepPin, LOW);
        delayMicroseconds(2000);
    }
}
// Delay, release button to stop
delay(1000);
}

```

3 priedas. Pavienių ląstelių fluorescencijos parametrų laikinės kontrolės

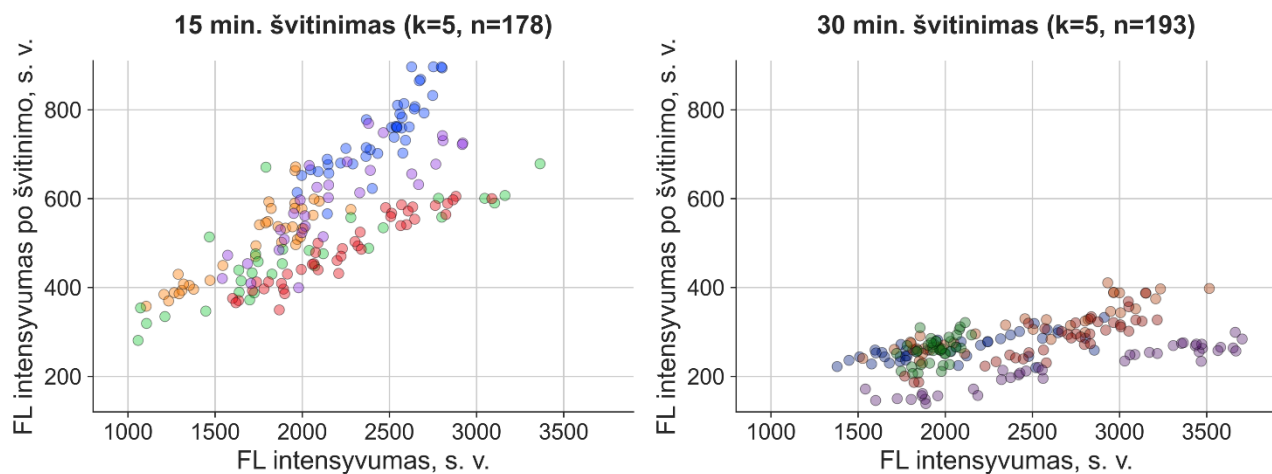


4.2 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo (680 nm) laikinė kontrolė, skirtingo apšvietimo sąlygomis. Skirtingomis spalvomis žymimi skirtingų ląstelių duomenys. Santrumpos: k – ląstelių skaičius, n – registruotų spektrų skaičius

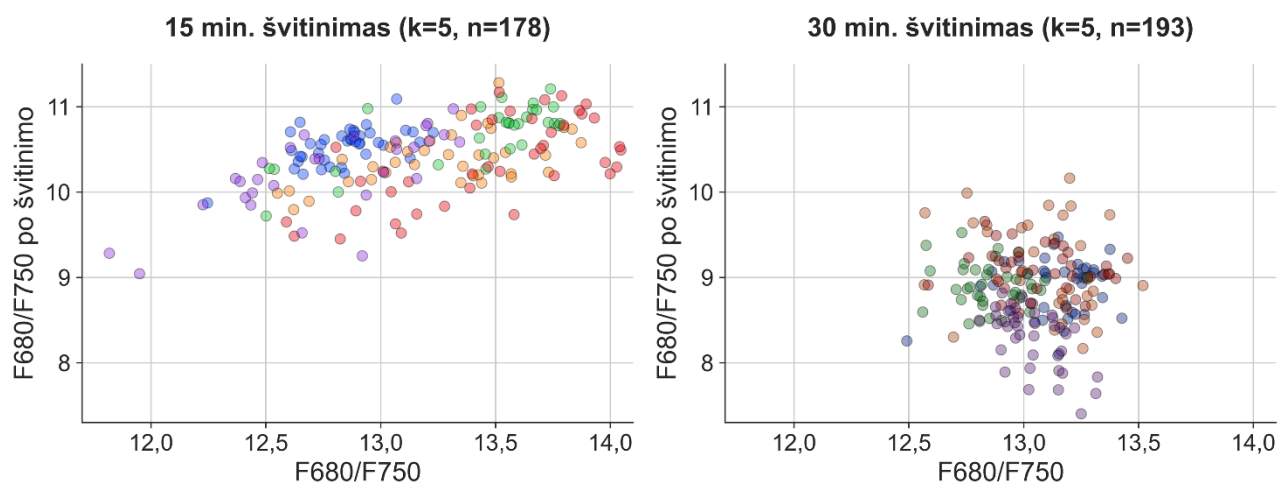


4.3 pav. F680/F750 santykio laikinė kontrolė, skirtingo apšvietimo sąlygomis. Skirtingomis spalvomis žymimi skirtingų ląstelių duomenys. Santrumpos paaiškintos 4.2 pav.

4 priedas. Pavienių ląstelių fluorescencijos parametrai prieš ir po švitinimo

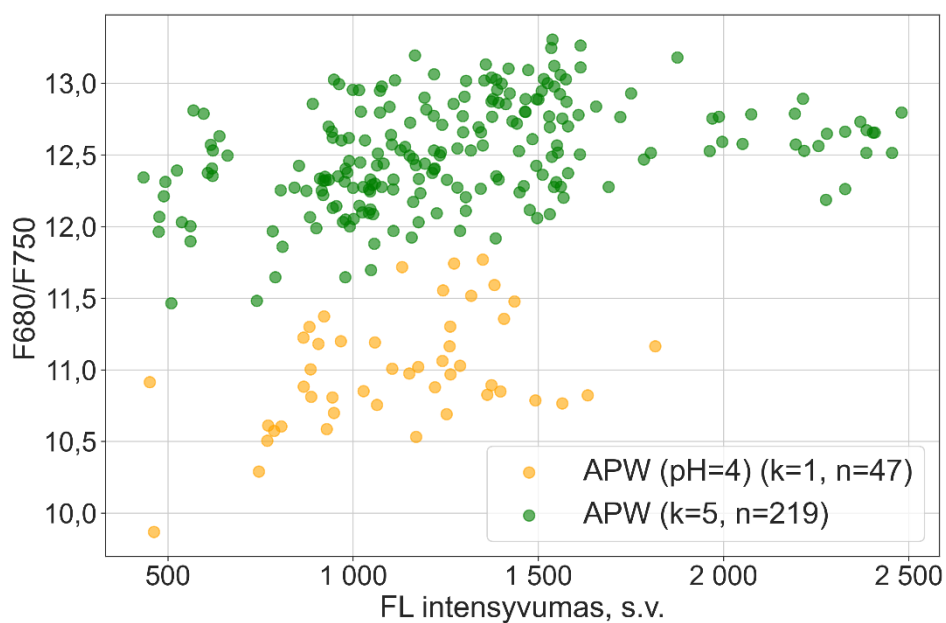


4.4 pav. Fluorescencijos (FL) intensyvumo ties 680 nm vertės prieš ir po švitinimo. Skirtingomis spalvomis žymimi skirtingų ląstelių duomenys. Santrumpos: k – ląstelių skaičius, n – registruotų spektrų skaičius



4.5 pav. F680/F750 santykio vertės prieš ir po švitinimo. Skirtingomis spalvomis žymimi skirtingų ląstelių duomenys. Santrumpos paaiškintos 4.4 pav.

5 priedas. Preliminarus *Nitellopsis obtusa* tarpubamblių fluorescencijos parametrų įvertinimas rūgštiniame pH



4.6 pav. F680/F750 santykio priklausomybė nuo fluorescencijos (FL) intensyvumo (ties 680 nm), skirtingo pH terpėse. Legendoje nurodyta APW tirpalo pH vertė, nepateikta reikšmė žymi nebuferinę sistemą (pH apie 7,2). Santrumpos: k – ląstelių skaičius, n – registruotų spektrų skaičius