

Kontrasterende invloed van chroniese osoonblootstelling op fotosintetiese elektronoordrag en CO₂-assimilering in gevoelige (*S156*) en bestande (*R123*) *Phaseolus vulgaris* L. genotipes

Author:

Gert HJ Krüger^{1*},
Cornelius CW Scheepers¹,
Reto J Strasser^{1,2},
Jacques M Berner

Affiliations:

¹ Eenheid vir
Omgewingswetenskappe en
Ontwikkeling, Noordwes-
Universiteit, Potchefstroom,
Suid-Afrika

² Laboratory of
Bioenergetics, University of
Geneva, Switzerland

Corresponding author:

Gert H.J. Krüger
E-posadres:
gert.kruger@nwu.ac.za

Dates:

Received: 02/09/2017
Accepted: 05/11/2018
Published:

How to cite this article:

Gert HJ Krüger, Cornelius
CW Scheepers, Reto J
Strasser, Jacques M Berner,
Kontrasterende
invloed van chroniese
osoonblootstelling
op fotosintetiese
elektronoordrag en
CO₂-assimilering in
gevoelige (*S156*) en
bestande (*R123*) *Phaseolus
vulgaris* L. genotipes,
*Suid-Afrikaanse Tydskrif
vir Natuurwetenskap en
Tegnologie* 37(1) (2018)

An English copy of this
paper is available online at
[http://www.satnt.ac.za/
index.php/satnt/article/
view/684](http://www.satnt.ac.za/index.php/satnt/article/view/684)

Copyright:

© 2018. Authors.
Licensee: *Die Suid-
Afrikaanse Akademie vir
Wetenskap en Kuns*. This
work is licensed under
the Creative Commons
Attribution License.

Troposferiese osoon (O₃) word beskou as een van die belangrikste lugbesoedelstowwe aangesien dit wêreldwyd meer skade aan landbougewasse aanrig as al die ander besoedelstowwe saam. Weens die oksiderende aard daarvan veroorsaak O₃ blaarskade en 'n afname in fotosintese. Bestandheid van gewasse teen O₃ verskil aansienlik tussen spesies en genotipes. Met hierdie studie is nuwe inligting oor die fisiologiese en biochemiese grondslag van die skadelike effek van O₃ verkry deur chroniese blootstelling van twee bosboongenotipes met bekende gevoeligheid vir O₃, naamlik *S156* (gevoelig) en *R123* (bestand), aan onderskeidelik houtskool-gefilterde lug en 80 dpm O₃. Die studie is uitgevoer in oop-dek-groei kamers (OTCs) vir die volle groeiperiode tot wasdom. Die status van die fotosintetiese apparaat van die proefplante is bepaal deur analyse van chlorofil *a*-fluoresensiekinetika en CO₂-afhanklikheidskrommes (*A:C*₂). Fisiologiese effekte is by *S156* waargeneem lank voor die verkyning van nekrotiese vlekke op die drieledige blare. Fotosintese is aansienlik gerem in *S156*, hoofsaaklik weens ont koppeling van die suurstofvrystellingskompleks (OEC), remming van fotosintetiese elektronoordrag, gevolglike afname in die reduksie van eind-elektronontvangers (ferredoksien, NADP⁺) en die gepaardgaande afname in die karboksilering en die regenerering van ribulose-1,5-bisfosfaat. Saad- en peulopbrengs het nou ooreengestem met die fotosintetiese gedrag van die proefplante. Ofskoon blare van albei genotipes sigbaar aangetas was, was dit *S156* wat ernstige nekrotiese vlekke vertoon het. Hierdie data bied nuwe inligting en komplementeer bestaande kennis oor die prosesse onderliggend aan die fitotoksiteit van O₃, nodig vir die ontwikkeling van bestande genotipes.

Sleutelwoorde: *Phaseolus vulgaris*, osoon, chlorofil *a*-fluoresensie, OEC, PSII, fotosintetiese elektronoordrag, CO₂-assimilering, stomatale geleiding, saadopbrengs, *open-top*-groei kamers.

Differential response of photosynthetic electron transport and CO₂ assimilation in sensitive (*S156*) and resistant (*R123*) *Phaseolus vulgaris* L. (bush bean) genotypes to chronic ozone exposure: Tropospheric ozone is currently regarded as one of the most important air pollutants, since it causes more damage to vegetation world-wide than all the other pollutants combined (Ashmore and Bell 1991). Due to its oxidative nature ozone causes leaf damage and a decrease in photosynthesis. Ozone tolerance varies widely between species and genotypes. The aim of this study was to identify and quantify the physiological and biochemical constraints imposed by chronic ozone exposure of two bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with known difference in sensitivity, namely *S156* (sensitive) and *R123* (resistant), to charcoal-filtered air and 80 nmol.mol⁻¹ O₃. The study was conducted in open-top growth chambers (OTCs) over the entire growth period by measuring chlorophyll *a* fluorescence (JIP-test) and photosynthetic gas exchange of the test plants weekly. The status of the photosynthetic apparatus was assessed by analysis of chlorophyll *a* fluorescence kinetics (JIP test) and CO₂ response curves (*A:C*₂). O₃-induced physiological effects were detected in *S156* long before appearance of necrotic spots on the trifoliolate leaves. Photosynthesis was substantially inhibited in *S156*, mainly due to disengagement of the oxygen evolving complex (OEC), inhibition of intersystem electron transport and the reduction of end-electron acceptors of PSI (ferredoxin, NADP⁺), causing the concomitant decrease in the carboxylation and regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate. Seed and pod yield closely reflected the photosynthetic response of the test plants.

Although leaves of both the genotypes were affected visually, it was *S156* that displayed severe necrotic ozone injury on the trifoliolate leaves. Our data contribute to and complement the existing knowledge on the processes underlying the phytotoxicity of O₃ needed for development of tolerant genotypes.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, ozone, photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, photosynthetic electron transport, seed yield, open-top chambers.

Inleiding

Weens die drastiese toename in kommersiële energieverbruik, het 'n skerp styging in atmosferiese besoedeling voorgekom sedert 1973 (McCormick 1997). Sommige van hierdie emissies, soos CH_4 , NO_x , CO en vlugtige organiese koolstowwe (VOCs), word geassosieer met die produksie van die sekondêre besoedelingstof, osoon (O_3) (Monks et al., 2015). Hierdie deurlopende styging van die troposferiese O_3 -vlakke (IPCC, 2007) word beskou as die stremingsfaktor wat meer skade aan oesgewasse en woude aanrig as enige ander lugbesoedelingstof (Ashmore & Bell, 1991). Die biologiese invloed van O_3 op plante word reeds vir meer as 60 jaar bestudeer (Manning et al., 1972); Heggstad, 1991; Davison & Reilling, 1995). Afgesien van die neerslag wat in 'n geringe mate op nie-stomatale oppervlakke plaasvind, dring O_3 die plant hoofsaaklik binne deur oop stomata gedurende die dag (Fowler et al., 2009). O_3 is 'n kragtige oksidant wat toksiese vry radikale in die apoplast en selsap genereer en sodoende die selmetabolisme beskadig (Mills et al., 2011). Hoewel verhoogde agtergrond- O_3 -vlakke soms onvoldoende is om sigbare skade te veroorsaak, lei dit dikwels tot verlaagde fotosintese (McKee et al., 1997). Hierdie afname in nettofotosintese van die plante, korttermyn of chronies blootgestel aan O_3 , is onder meer toegeskryf aan die versteuring van stomatale funksie, remming van fotosintetiese elektronoordrag en verminderde Rubisco-aktiwiteit en -inhoud. Deur bestudering van die invloed van chroniese osoonblootstelling ($38\text{--}120 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$) van sojaboon in 'n ope lug-eksperiment, kom Betzelberger et al. (2012) tot die gevolgtrekking dat aangesien ligonderskepping deur die blaredak die doeltreffendheid van fotosintese en die oesindeks nadelig beïnvloed, die aanslag van O_3 veelsydig is.

Osoonbestandheid varieer aansienlik tussen spesies en genotipes. Die families Fabaceae en Solanaceae, wat verskeie oesgewasse insluit, blyk besonder gevoelig te wees (Heagle, 1989). Osoongevoelige en -bestande kultivars is aangetoon vir talryke plante, insluitende die bosboon (*Phaseolus vulgaris* L.) (Guzy & Heath, 1993). Deur aanwending van chlorofil *a*-fluoressensie en gasanalise van intakte blare van die *Phaseolus vulgaris* kultivars Pinto (sensitief) en Goffry (bestand), wat vir 4h blootgestel was aan $80 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ O}_3$, kon Guidi et al. (1997) aantoon dat stomatale geleiding en kwantum- doeltreffendheid (F_v/F_M) gerem was en gelei het tot 'n afname in maksimum CO_2 -assimilering (J_{max}). Geen afdoende verklaring vir die verskil in gevoeligheid is egter aangebied nie. Deur evaluering van die fisiologiese en biochemiese kenmerke wat O_3 -bestandheid mag verleen aan boontjie-kultivars blootgestel aan akute O_3 -stremming, kom Guidi et al. (2010) tot die slotsom dat die bestande kultivar beskerm word teen die vorming van aktiewe suurstofspesies (AOS) deur die beheerde verlaging van PSII-aktiwiteit.

Na enkele akute ($200 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 4-16h) blootstellings van koring aan O_3 , was die bevinding van Farage et al.

(1991) dat die sleutelfaktor en aanleidende oorsaak van die gemete afname in ligversadigde CO_2 -opname, toegeskryf moes word aan verlaagde karboksileringsdoeltreffendheid, maar dat die regenerering van ribulose-1,5-bisfosfaat (RuBP) in 'n mindere mate aangetas was. In hul poging om fisiologiese substelsels verantwoordelik vir die verskil in O_3 -gevoeligheid van drie bosboontjies (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipes, naamlik S156, R123 en R331, te identifiseer, kon Flowers et al. (2007) nie besluit in watter volgorde O_3 -geïnduseerde verlies in inhoud (of aktiwiteit) van ribulose-1,5-bisfosfaatkarboksilase/oksigenase, die verlaging in mesofilgeleiding en F_v/F_M plaasvind nie. Hulle was van mening dat die remming van genoemde prosesse toegeskryf moet word aan algemene beskadiging, eerder as aan die opvolgende aantasting van die individuele substelsels. Laasgenoemde outeurs kon aantoon dat hoewel ongestremde S156 se fotosintese tempo hoër as dié van R123 was, dit geen beduidende vermoë besit om Rubisco teen hoë O_3 te beskerm nie.

Ofskoon chlorofil *a*-fluoressensie ruim gebruik word om stremming te monitor, bly die aanwending van die inligting opgesluit in die fluoressensiekromme, dikwels beperk tot die fluoressensiewaardes van die maksimum (F_M) en die minimum (F_0). In ons studie egter, is die invloed van O_3 op primêre fotosintese bestudeer deur die kwantifisering van die OJIP fluoressensiekrommes volgens die JIP-toets wat die voorstelling en analise van die krommes volgens verskillende uitdrukkings (Strasser et al., 2004; Strasser et al., 2007) behels het. Sodoende is informasie verkry oor die beïnvloeding van al die deelprosesse van fotosintese, naamlik absorpsie van ligenergie, invangs (Eng: *trapping*) van opwekenergie, intersistiem elektronoordrag, en reduksie van eind-elektronontvangers. Parallel hieraan is die effek van die stremming bepaal deur die analise van CO_2 -afhanklikheidskrommes (*A:C₂*-krommes) van intakte blare, die invloed van O_3 op CO_2 -assimilering, karboksileringsdoeltreffendheid, Rubisco-regenerering en stomatale beperking te karakteriseer.

Die proefplante gebruik was die osoongevoelige (S156) en osoonbestande (R123) *Phaseolus vulgaris* (bosboon) genotipes wat chronies blootgestel is aan O_3 onder streng beheerde kondisies in oop-dek-groeiakamers (open-top growth chambers, OTCs) vir die volle groeiperiode. Parallele meting van chlorofil *a*-fluoressensie en CO_2 -assimilering het die korrelasie van komplementêre informasie oor die respons van die plante op biofisiese, biochemiese en fisiologiese vlak van fotosintese asook op saadopbrengsvlak moontlik gemaak. Die data is bedoel om die bestaande kennis van die invloed van O_3 op die fotosintese van oesgewasse aan te vul.

Materiaal en Metodes

Proefterrein en behandelings

Die studie is uitgevoer op die Potchefstroomse kampus van die Noordwes-Universiteit in oop-dek-groeiakamers (OTCs)

elk bestaande uit 'n silindriese aluminiumraamwerk met 'n reënskerm, en bedek met deursigtige PVC-materiaal. Vier 5 m³ kamers, geventileer teen 1.5 verplasings per minuut is gebruik. Twee kamers wat met houtskoolgefiltreerde (CF) lug geventileer is, het gedien as kontroles. Die twee behandelingskamers is geventileer met O₃-verrykte lug, voorsien deur 'n elektriese O₃-generator (UV-20 HO, Olgear, Kaapstad). Lugtoevoer aan die ODGs is voorsien van groot aksiale waaiers met spoedbeheer. Die O₃-generator wat in die waaierkas ingebou was, het 'n konstante O₃-vloei (3000 mg/h) gelewer, opgewek uit suiwer suurstof vanaf gassilinders. Die O₃-konsentrasie in die kamers is met 'n oorvloei klep beheer om die gevraagde [O₃] van 80 nmol.mol⁻¹ te lewer, waaraan die proefplante vir 9 lig-ure per dag blootgestel is vir die volle groeiseisoen (40 dae). Die [O₃] is gemoniteer met 'n osoonmonitor (Model 205, 2B Technologies, Inc., Colorado, USA). Sien Heyneke et al. (2012) vir tegniese besonderhede van die OTC-stelsel en rekord van daaglikse O₃-vlakke gehandhaaf in die behandelings-OTCs.

Plantmateriaal

Twee bosboon (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipes, naamlik 'S156' (O₃-gevoelig) en 'R123' (O₃-bestand) wat van 'Oregon 91' geselekteer is vir O₃-gevoeligheid deur Dr. Richard Reinert, USDA, Raleigh, NC) en verkry is van Dr. Kent Burkey (Air Quality Research Unit, Raleigh, NC). Saad is geplant in plastiekpote gevul met 'n mengsel van vermikuliet, sand en grond, verryk met 'n stadig-vrystellende messtof (Osmocote®). Vier potte is gebruik per genotipe per behandeling, dws 8 potte per ODG verteenwoordigend van 4 pseudoreplikate per behandeling. Konstante watervoorsiening aan elke pot is bemiddel deur veselglaspitte (Thoenes Dichtungstechnik GmbH, Duitsland) wat in die potgrond geplaas is en waardeur water deur kapilêre aksie uit 'n waterreservoir onder elke pot opgesuig is. Sodoende is die eenvormige waterregime van die proefplante gehandhaaf en is moontlike onewe effekte op stomatale geleiding en O₃-toegang uitgeskakel.

Chlorofilinehoud

Chlorofilinehoudindeks (CCI) van blare is nie-destruktiëf gemeet deur 'n chlorofilmeter (CCM-200, Opti-Sciences, Inc., VSA). Agt metings is geneem per jongste volledi-ontvoute blaar van twee plante per behandeling.

Fotosintetiese gaswisseling

Fotosintetiese gaswisseling is twee-weeklik met 'n infrarooigasanaliseerder, toegrus met 'n outomatiese blaarkuvert (CIRAS-2, PP-Systems, Hertz, VK), gemeet op twee lukraak-gekose plante van elk van die S156 en R123 genotipes in die behandelings- en kontrole-ODGs onderskeidelik. Meting van volle A:Ci-krommes is tydrowend en daarom is slegs twee replikaatmetings per genotipe per behandeling uitgevoer. Die derde volledi-ontvoute blaar van 'n proefplant is telkens vir 5 minute in die blaarkuvert aangepas by 'n CO₂-konsentrasie van

360 μmol. mol⁻¹ en 'n fotonvloeidigheid (PPFD) van 1200 μmol.m⁻².s⁻¹ om volle aktiwiteit van Rubisco te induseer (Taylor & Terry, 1984). Die temperatuur is konstant gehou by 26 °C. Nadat die gaswisseling ewewig bereik het, is die intersellulêre CO₂-konsentrasie (C_i) gemanipuleer deur die CO₂-konsentrasie (C_a) te varieer. Die aanvangshelling van die verbruikskromme is bepaal deur C_a in die kuvert vanaf 360 μmol. mol⁻¹ in vyf stappe te verlaag na 200, 100, 50 en 25 μmol. mol⁻¹. Daarna is C_a weer gestabiliseer by 360 μmol. mol⁻¹ om te verseker dat die stomata oop en die die fotosintetiese apparaat stabiel is. Hierna is C_a vanaf 360 μmol. mol⁻¹, in vier stappe verhoog na 500, 700, 1000 en 1500 μmol. mol⁻¹, sodat die CO₂-afhanklikheidskrommes (A: C_i) getrek kon word (Singaas et al., 2001). 'n Meetperiode van 3 minute was genoegsaam om stabiele waardes te verseker. Die versorgingsfunksie [A = g_{CO2}(C_a - C_i)] wat ooreenstem met die verbruiksfunksie [A = CE (C_a - Γ)] is getrek deur bloot die waarde van C_i = C_a = 360 μmol.mol⁻¹ op die abscissa met die punt wat A₃₆₀ verteenwoordig, te verbind (Pammenter, 1989). Die mate van stomatale beperking van fotosintese is bereken volgens die vergelyking: $\ell = (A_{360} - A_0) / A_0 \times 100$ (Farquhar and Sharkey, 1982).

Afkortings: A = nettofotosintese; A₃₆₀ = CO₂-assimilerings tempo by omgewings CO₂-konsentrasie; A₀ = CO₂-assimilerings tempo in afwesigheid van stomatale beperking (C_i ≥ 360 μmol. mol⁻¹); g_{CO2} = stomatale geleidingsvermoë vir CO₂; C_a = CO₂ konsentrasie van omgewingslug; C_i = intersellulêre CO₂-konsentrasie; CE = ΔA/ΔC_i = karboksilerings-doeltreffendheid; Γ = CO₂-kompensasiëpunt; E = transpirasietempo; ℓ = % stomatale beperking; PFD = fotonvloeidigheid.

Die interpretasie van die parameters is gedoen volgens Farquhar and Sharkey (1982). Ons is bewus daarvan dat die waardes van die berekende parameters vir dieselfde datastel mag verskil afhange van die passingmetode gebruik (Gu et al., 2010).

Chlorofil a-fluoresensie-induksie

Chlorofil a-fluoresensie is saans op donker-aangepasde (≥ 1 h) blare gemeet met 'n fluorometer (Handy-PEA, Hansatech Instrument Ltd., Kingslynn, UK). Ses metings is geneem op twee intakte blare van vier verskillende plante in die behandeling- en kontrole-ODGs onderskeidelik. Elke fluorensiekromme is geïnduseer deur rooi lig (piek 650 nm) teen 2000 μmol fotone m⁻² s⁻¹ (genoegsame opwekenergie om volledige sluiting van die PSII reaksiesentrums te verseker en dus die ware waarde van die maksimum fluorensie = intensiteit, F_M, te weerspieël) op 'n blaararea met 4 mm deursnee en is geregistreer vir 'n periode van een sekonde. Die geregistreeerde krommes (O-J-I-P) is geanaliseer volgens die JIP-toets (Strasser et al., 2004). OJIP verwys na die vinnige, veelfasige fluorensiestyging van minimale intensiteit by stap O (50 μs) deur die stappe J (~2 ms) en I (~30 ms) tot die maksimum P (~300 ms). Die kinetika van die OJIP fluorensiekromme van groen plante is bewys om hoogs-sensitief te wees vir omgewingstoestande (Strasser & Strasser, 1995; Krüger et al., 1997).

Die OJIP fluoressensiestyging in minder as 'n sekonde na beligting van 'n donker-aangepaste plant, weerspieël die konsentrasie van primêre gereduseerde kinoon-elektronontvangers van PSII in hul gereduseerde toestand ($Q_A^-/Q_{A, \text{total}}$), soos bepaal deur die kinetika van verskillende redoksreaksies wat in die ET-ketting plaasvind. Die JIP-toets verteenwoordig die translasing van die oorspronklike fluoressensiedata na biofisiese parameters wat die stapsgewyse energievloei deur PSII per reaksiesentrum (RC) asook per opgewekte dwarsseksie (Eng: *cross-section*, CS) kwantifiseer (Strasser & Strasser, 1995; Force et al., 2003; Strasser et al., 2004). Die waardes van die parameters is bereken met die rekenaarprogram 'Biolyzer' (<http://www.fluoromatics.com>). Die parameters wat almal na tyd 0 verwys (begin van die induksie van fluoressensie), is: (i) die spesifieke energievloede (per RC van PSII) vir absorpsie (ABS/RC), invangs (TR_0/RC), elektronoordrag (ET_0/RC) en dissipering op die vlak van die antennachlorofil (DI_0/RC); (ii) die vloedverhoudings of opbrengste, naamlik die maksimum kwantumopbrengs van primêre fotochemie ($\phi_{Po} = TR_0/ABS = F_v/F_M$), die doeltreffendheid waarmee 'n ingevangde eksiton ná reduksie van Q_A na Q_A^- , 'n elektron verder as Q_A^- in die ET-ketting kan beweeg ($\psi_{Eo} = ET_0/TR_0$), die kwantumopbrengs van elektronoordrag ($\phi_{Eo} = ET_0/ABS = \phi_{Po} \cdot \psi_{Eo}$), en die kwantumopbrengs van dissipering ($\phi_{Do} = DI_0/ABS = (1 - \phi_{Po})$); (iii) die fenomologiese energievloede (per opgewekte dwarsseksie) vir absorpsie (ABS/CS), invangs (TR_0/CS), elektronoordrag (ET_0/CS), en dissipering (DI/CS); (iv) die fraksie aktiewe PSII-RCs per totale absorpsie (RC/ABS) en per opgewekte dwarsseksie (RC/CS). Die aanvangsfase van die fotosintetiese aktiwiteit van 'n RC-kompleks word gereguleer deur vier funksionele stappe, naamlik absorpsie van ligenergie (ABS), invangs van opwekenergie (TR), omsetting van opwekenergie na elektronoordrag (ET) en reduksie van eind-elektronontvangers ná PSI (RE). 'n meerparametriese uitdrukking, die sogenaamde fotosintetiese prestasie-indeks (PI_{total}), wat die bydrae van al vier deelprosesse weerspieël, is bekendgestel deur Tsimilli-Michael & Strasser (2008) en Yordanov et al. (2008):

$$PI_{\text{total}} = \frac{\gamma_{RC}}{1 - \gamma_{RC}} \cdot \frac{\phi_{Po}}{1 - \phi_{Po}} \cdot \frac{\psi_{Eo}}{1 - \psi_{Eo}} \cdot \frac{\delta_{Ro}}{1 - \delta_{Ro}}$$

waar γ_{RC} staan vir die fraksie chlorofilmolekule wat aktiewe RCs is van PSII is. Dus, $\gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC}) = RC/Chl_{\text{Antenna}} = RC/ABS$ in die JIP-toetsterminologie. RC/ABS is die fraksie RC-chlorofil (Chl_{RC}) per totale chlorofil ($Chl_{RC} + Chl_{\text{Antenna}}$). Laasgenoemde uitdrukking kan afgebreek word in twee JIP-toetsparameters en bepaal word vanaf die oorspronklike fluoressensiesie as $RC/ABS = RC/TR_0 \cdot TR_0/ABS = [(F_{2ms} - F_{50\mu s})/4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})] \cdot F_v/F_M$. Die faktor 4 is nodig om die aanvangsstyging van die relatiewe varieerbare fluoressensie tussen stappe O en P van die OJIP-kromme (V_{OP}) per ms weer te gee. Die uitdrukking RC/ABS toon die bydrae van die RC-digtheid relatief tot die totale chlorofil van PSII, tot die PI_{total} . Die bydrae van die ligreaksies van primêre fotochemie word bepaal volgens die JIP-toets as $\phi_{Po}/(1 - \phi_{Po}) = TR_0/DI_0 = k_p/k_N = F_v/F_o$. Die bydrae van elektronoordrag

verder as Q_A^- is afgelei as $\psi_{Eo}/(1 - \psi_{Eo}) = ET_0/(TR_0 - ET_0) = (F_M - F_{2ms})/(F_{2ms} - F_{50\mu s})$. Die bydrae van reduksie van eind-elektronontvangers (laastens NADP⁺) is afgelei as $\delta_o/(1 - \delta_o) = RE/ABS = (1 - V_I)/(V_I - V_J) = (F_M - F_{30\mu s})/(F_M - F_{2ms})$.

Uitgebreide ontleding van die fluoressensiekrommes is gedoen deur die berekening van die verskil in relatiewe varieerbare fluoressensie, om die sogenaamde ΔV -krommes (uitgedruk as $V = f(t)$), voor te stel. Dit beteken die aftrekking van die genormaliseerde varieerbare fluoressensiewaardes van die kontroles van krommes genormaliseer tussen (1) F_o and F_j ($V_{Oj} = (F_t - F_o)/(F_j - F_o)$) en dus as funksie van tyd, $\Delta V_{Oj} = (V_{Oj \text{ treatment}} - V_{Oj \text{ control}})$; (2) F_j en F_p ($V_{Jp} = (F_t - F_j)/(F_p - F_j)$), $\Delta V_{Jp} = (V_{Jp \text{ treatment}} - V_{Jp \text{ control}})$ onderskeidelik, van die fluoressensiewaardes van hul onderskeidelike behandelings (Figuure 2b en d). Die ΔV -grafieke het verskuilde bande in die J- en I-stappe van die fluoressensiekinetika, veel ryker aan informasie as die oorspronklike OJIP-krommes, blootgelê. Van hierdie grafieke is waardevolle inligting aangaande die funksionaliteit van die suurstofvrystellingskompleks (OEC), akkumulering van elektrondraers, soos Q_A^- en die reduksie van eind-elektronontvangers van die fotosintetiese ET-ketting verkry (Strasser et al., 2004). Vir die volledige interpretasie van die invloed van O_3 op die I-P fluoressensiefase, is verdere normaliserings van die data gedoen wat die relatiewe amplitude van die I-P-fase voorstel (Figuur 2c en 2e). Sien Strasser et al. (2004) vir die volledige lys van formules en 'n glossarium van terminologie gebruik in die JIP-toets vir analise van die OJIP fluoressensiestyging.

Opbrengs

Die peule is geoes na rypwording, geskei van die plante en gedroog vir 24h by 60°C tot konstante massa bereik is. Opbrengs is bepaal as peule per plant, sade per peul, sade per plant en gram saad per peul.

Statistiese analise

Statistiese analise van die data is uitgevoer deur gebruik te maak van die 'Statistica' sagtewarepakket vir Windows, weergawe 6 (StatSoft, Inc., VSA). Vir die datastelle met parametriese verspreiding, is betekenisvolle verskille tussen behandelings bepaal met die *Student's t-test*.

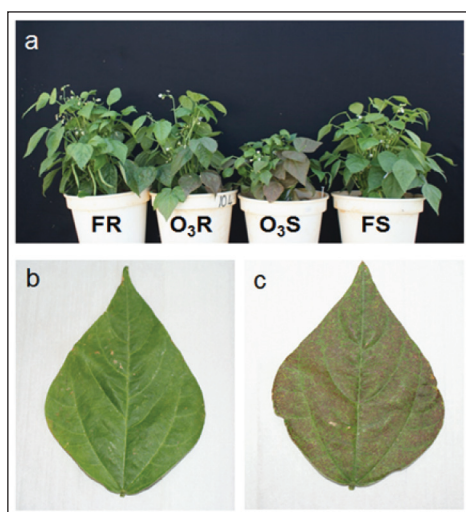
Nota: In n engere sin is die 8 replikaatpote per genotipe per behandeling gebruik in die studie pseudo-replikate. Die grootte van die ODGs en die uitstekende beheer van die daaglikse O_3 -konsentrasies wat deurlopend geregistreer is, het verseker dat deur die gebruik van twee ODGs per behandeling, die 8 O_3 -behandelings per genotipe aan presies dieselfde O_3 -regime vir die volle groeiperiode blootgestel was.

Resultate en Bespreking

Plantontwikkeling en blaarskade

Na 35 dae blootstelling aan O_3 het 'n merkbare afname in die groei van S156 (behandeling O_3S) in vergelyking met die houtskoolgefiltreerde proefplante (behandeling

FS) voorgekom (Figuur 1a). Hierteenoor het weinig sigbare skade en remming van groei, vergeleke met die ooreenstemende kontrole (O_3R) plaasgevind.



FIGUUR 1: (a) Osoon bestande (R123) en sensitiewe (S156) genotipes 35 dae na blootstelling aan koolstoffiltreerde lug (F) en $80 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$ onderskeidelik. Sigbare simptome op blare na blootstelling: (b) R123 (c) S156.

Simptome kenmerkend van O_3 -stremming was sigbaar op die blare van S156 (O_3S) reeds 12 dae ná aanvang van blootstelling aan $80 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$. Aanvanklik het simptome verskyn as grys-groen vlekke tussen die are wat oorgegaan het in bronskleurige letsels, wat geleidelik saamgegroeï het om na 35 dae groot dele van die blaaroppervlak te bedek (Figuur 1c). Burkey *et al.* (2005) het soortgelyke simptome in dieselfde genotype rapporteer. Onder dieselfde toestande het R123 (O_3R) veel minder simptome vertoon wat beperk was tot slegs ouer blare (Figuur 1b).

Saadopbrengs

Al die opbrengsparameters van die sensitiewe (S156) en bestande (R123) genotipes is kenmerkend onderdruk in vergelyking met hul onderskeie kontroles deur blootstelling aan $80 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$ vir 38 dae wat die reprodktiewe groeifase ingesluit het. (Table 1). S156 het 'n skerp daling in die meeste parameters vertoon. Die peule per plant, aantal sade per peul, sade per plant, en gram saad per plant, het onderskeidelik afgeneem met 34%, 21%, 51% en 55%. Die verskille tussen behandeling en kontrole was in alle gevalle statisties beduidend, met p-waardes laer as 0.001. Die matige afname van 21% in sade per peul in S156 wys

daarop dat saadaanleg nie drasties beïnvloed is nie. Ofskoon R123 (behandeling O_3R) wat alle opbrengs parameters betref minder beïnvloed is, het die aantal peule per plant met 16% afgeneem, terwyl sade per peul, sade per plant en totale gram saad per plant afgeneem het met 21%, 34% en 31% onderskeidelik. Daar is bevind dat boontjies (Tingey *et al.*, 2002) en sojabone (Morgan *et al.*, 2003) gevoeliger is vir O_3 -skade gedurende die reprodktiewe fase as die vegetatiewe fase. Wanneer die opbrengsparameters van O_3S vergelyk is met dié van O_3R , was die afname in aantal peule per plant, sade per peul, sade per plant en totale gram saad per plant, soos volg: 16% 15% 28% en 12% onderskeidelik. Die 40% afname in totale gram saad per plant relatief tot die kontrole (O_3R) was statisties beduidend. Die afname in peulopbrengs van S156 (O_3S) relatief tot die kontrole was vergelykbaar met die afname in opbrengs van S156 blootgestel aan omgewingslug met 'n seisoenale gemiddeld van omtrent $50 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$, relatief tot dié gekweek onder koolstoffiltreerde lug, gerapporteer deur Burkey *et al.* (2005). Flowers *et al.* (2007) het 'n afname van 77% in saadopbrengs gerapporteer na chroniese blootstelling van S156 aan $60 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$ in ODGs.

Fisiologiese invloed

Chlorofil α -fluorensensie: normaliserings, verskilkinetika, JIP-toets

Gemiddelde chlorofil α -fluorensensiekrommes van donker-aangepasde blare van die proefplante word voorgestel op logaritmiëse tydskaal in Figuur 2a-c. Hierdie krommes vertoon die tipiese O-J-I-P fluorensensiestyging, vanaf 'n beginvlak, F_o , tot 'n maksimum $F_p = F_M$, wat beskou kan word as die die maximum fluorensensie-opbrengs, aangesien die intensiteit van die aktiniese ligbron van die fluorometer (600 W m^{-2} , piek by 650 nm) hoog genoeg is om die sluiting van al die RCs te verseker. Let op dat F_o en F_M van die fluorensensiekrommes van die proefplante merkwaardig eenders was voor aanvang van die O_3 -behandeling wat aandui dat die proefplante fisiologies homogeen en aktief was (Figuur 2a). Die enderse en lae F_o -waardes bewys ook dat die plante volledig donker-aangepas was, i.e. al die RCs was oop (geoksideer). Na 25 dae blootstelling aan $80 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$, was die invloed van die behandeling relatief tot die kontrole sigbaar in die OJIP-krommes van die O_3S plante. Die gemiddelde fluorensensiekrommes van die proefplante genormaliseer tussen F_o ($50 \mu\text{s}$) en F_j ($\sim 2 \text{ ms}$) (Figuur 2b) demonstreer die

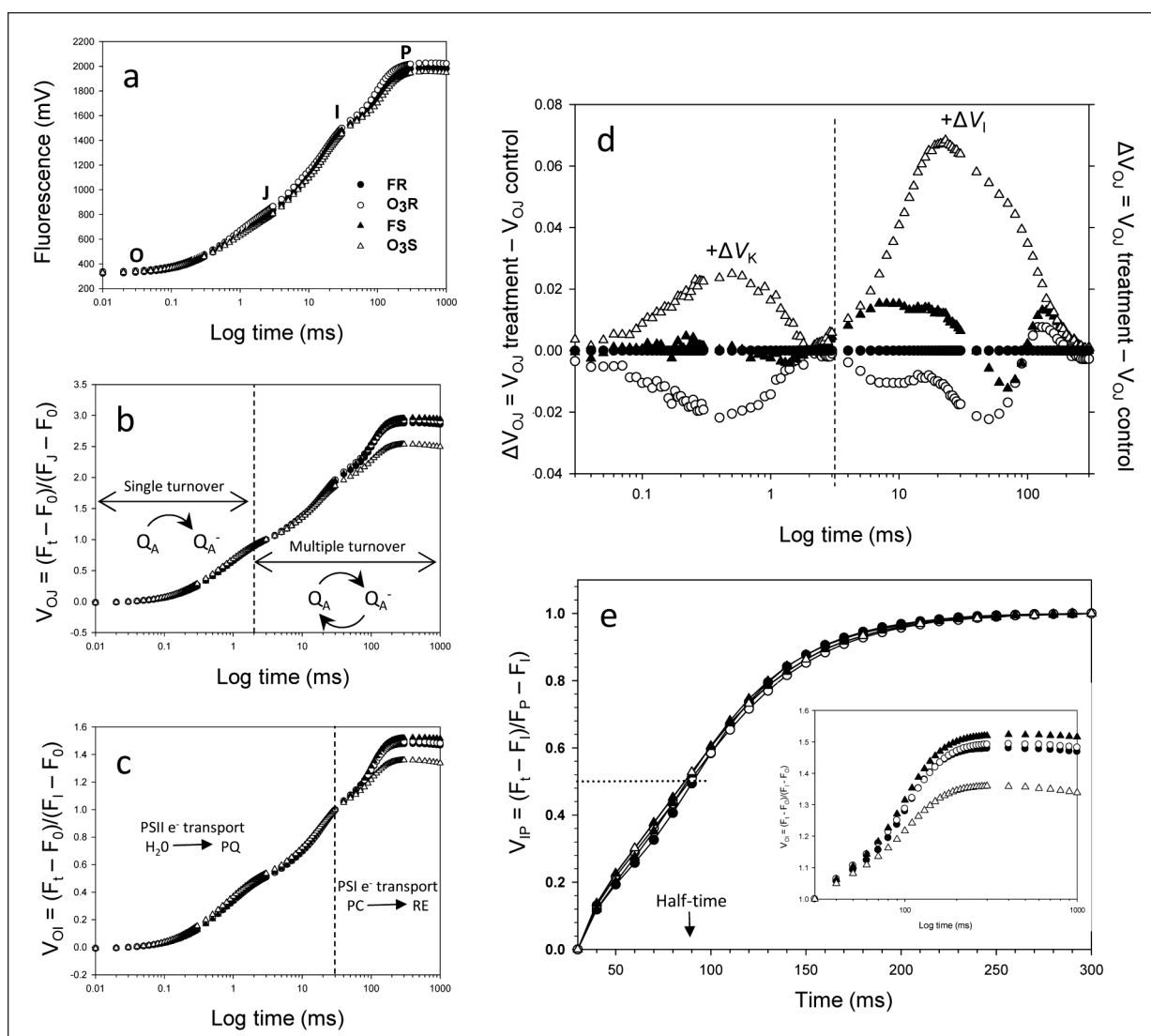
TABEL 1: Gemiddelde opbrengsparameters (\pm standaardfout) vir die onderskeie behandelings gemeet na ryppwording, naamlik: Peule per plant, Sade per peul, Sade per plant, en Gram saad per plant, met * en ** die aanduiding van betekenisvolheid by $p < 0.05$ en $p < 0.01$ onderskeidelik, van die verskil relatief tot die kontroleplante.

Behandelings	Peule per plant	Sade per peul	Sade per plant	Gram saad per plant
FR	36.12 (1.43)	3.78 (0.10)	136.87 (7.07)	34.37 (2.13)
O_3R	30.12 (1.12)	2.97 (0.13**)	90.00 (6.04**)	23.42 (1.47**)
FS	38.25 (2.32)	3.25 (0.06)	130.66 (6.60)	31.65 (1.88)
O_3S	25.25 (0.97**)	2.55 (0.08**)	64.50 (3.20**)	14.19 (0.93**)

verloop van die O-J en J-P fases van die fluoressensiestyging onderskeidelik. Die oorgang van O na J verteenwoordig die enkelomsettingbereik van die styging (i.e. Q_A^- slegs een keer gereduseer) en weerspieël die fotochemiese reaksies wat lei tot reduksie van die elektronontvanger Q_A , terwyl die oorgang J tot P die veelvoudige omsetting van Q_A , wat sterk beïnvloed word deur die opvolgende donkerreaksies in die ET-ketting, weerspieël. Figuur 2b dui daarop dat O_3 hoofsaaklik die veelvoudige omsettingsreaksies van PSII in S156 (O_3S) aantast, i.e. in die oorgang J (~2 ms) tot P (~330 ms) (Figuur 2b).

Verdere analise is gedoen deur die gemiddelde fluoressensiekrommes van die behandelings te normaliseer tussen die stappe O (50 μ s) en J (2ms) as $V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$

F_0), asook tussen die stappe J en F_M (piek) as $V_{JP} = (F_t - F_J)/(F_P - F_J)$. Die genormaliseerde fluoressensiekrommes van die kontrole (FR) is dan afgetrek van die genormaliseerde fluoressensiekrommes van die verskillende behandelings om die verskilkinetika ($\Delta V = V_{\text{treatment}} - V_{\text{kontrolle}}$) onderskeidelik, te vertoon. Die sein is met 'n faktor van 6 versterk om die verskilte duidelik te toon. Die verskilkinetika is nou grafies voorgestel as ΔV_{OJ} en ΔV_{JP} onderskeidelik (ΔV_{OJ} links en ΔV_{JP} regs in **Figuur 2d**). Die positiewe ΔV_K band (by ~ 300 μ s) wat in die O_3S plante verskyn het is as gevolg van 'n toename in fluoressensie (Figuur 2d), wat moontlik toegeskryf moet word aan die kortstondige akkumulering van gereduseerde elektrontraers soos bv. Feo⁻ (feofitien), wat veroorsaak is deur die ont koppeling van die OEC (suurstofvrystellingskompleks) wat lei tot 'n wanbalans



FIGUUR 2: Vinnige fase chlorofil α -fluoressensiekinetika van intakte blare van die verskillende behandelings en genotipes na 25 dae se blootstelling aan 80 nmol. mol⁻¹ O_3 . (a): Gemiddelde onverwerkte fluoressensiekrommes vóór aanvang van O_3 -blootstelling; (b): Gemiddelde fluoressensiekrommes, dubbeld genormaliseer tussen F_0 (50 s en F_J (2 ms) op logaritmiëse tydskaal, wat die relatiewe verandering in die enkel-omsettingsfase (0 – 2 ms) en die meervoudige omsettingsfase (2ms – ~ 300 ms) aantoon; (c): Gemiddelde fluoressensiekrommes dubbeld genormaliseer tussen F_0 (50 μ s) en F_P (30 ms) op logaritmiëse tydskaal, wat die relatiewe verandering in die enkel-omsettingsfase (0 – 2 ms) en die meervoudige omsettingsfase (2ms – ~ 300 ms) aantoon; (d): Verskil in varieerbare fluoressensie ($\Delta V = V_{\text{behandeling}} - V_{\text{kontrolle}}$) teenoor log-tyd van die verskillende behandelings en genotipes genormaliseer tussen die fluoressensie-ekstreem F_0 (50 μ s) en F_J (2 ms), en F_J (2 ms) en F_P onderskeidelik, om die ΔV_{OJ} en ΔV_{JP} krommes te verkry wat die ΔV_K en ΔV_I bande blootlê; (e), inset: Gemiddelde fluoressensiekrommes genormaliseer tussen F_0 (50 μ s) en F_P (30 ms) wat die V_{OI} -gedeelte vir waardes groter as 1 (na 30 ms) oor die tydverloop 30 -300 ms aantoon. Die I-P-styging weerspieël die grootte van die pool van eidelektronontvangers; (e), hoofgrafiek: Gemiddelde fluoressensiekrommes van behandelings en genotipes, onderskeidelik genormaliseer tussen F_J (30 ms) en F_M (piek) en voorgestel op 'n lineêre skaal tussen 30 – 300 ms met die maksimumamplitude vasgestel op 1 ten einde die reduksietempo van eidelektronontvangers van die verskillende behandelings te vergelyk. FR is as verwysing/kontrolle gebruik. Elke kromme verteenwoordig die gemiddelde van 48 metings.

in elektronvloei van die OEC na die RC en verder na die ontvangerkant van PSII. Ontkoppeling van die OEC maak dit moontlik dat 'n alternatiewe elektronskenker soos askorbaat of prolien (in plaas van H_2O) elektrone aan PSII kan skenk (Strasser, 1974; De Ronde et al., 2004; Toth et al., 2007; Nagy et al., 2012). Hierdie toestand veroorsaak 'n kortstondige toename in die Pheo/ Q_A^- konsentrasie wat lei tot 'n ΔV_k -band wat verskyn tussen 100 en 300 μs . 'n ΔV_k -band sou ook kon ontstaan weens 'n toename in die funksionele antennagrootte (Strasser et al., 2004). Hierteenoor het die O_3R plante egter 'n negatiewe ΔV_k -band vertoon wat aandui dat die OEC-funksie nie beskadig is deur O_3 nie (Figuur 2d).

'n Positiewe ΔV_l -band was ook sigbaar tussen 2 ms en F_M (Figuur 2d, regs) in O_3S na 25 dae blootstelling aan O_3 . Die ΔV_l -band verskaf inligting oor die aktiveringstatus van feredoksien-NADP⁺-reduktase (FNR), asook oor die moontlike remming van die reduksie van eind-elektronontvangers soos NADP⁺ en feredoksien (Fd) as gevolg van die hoër gereduseerde toestand van die poel van plastokinoon, sitochroom- b/f en plastosianien (Yusuf et al., 2010). Let op dat O_3R nie geaffekteer was in hierdie opsig nie.

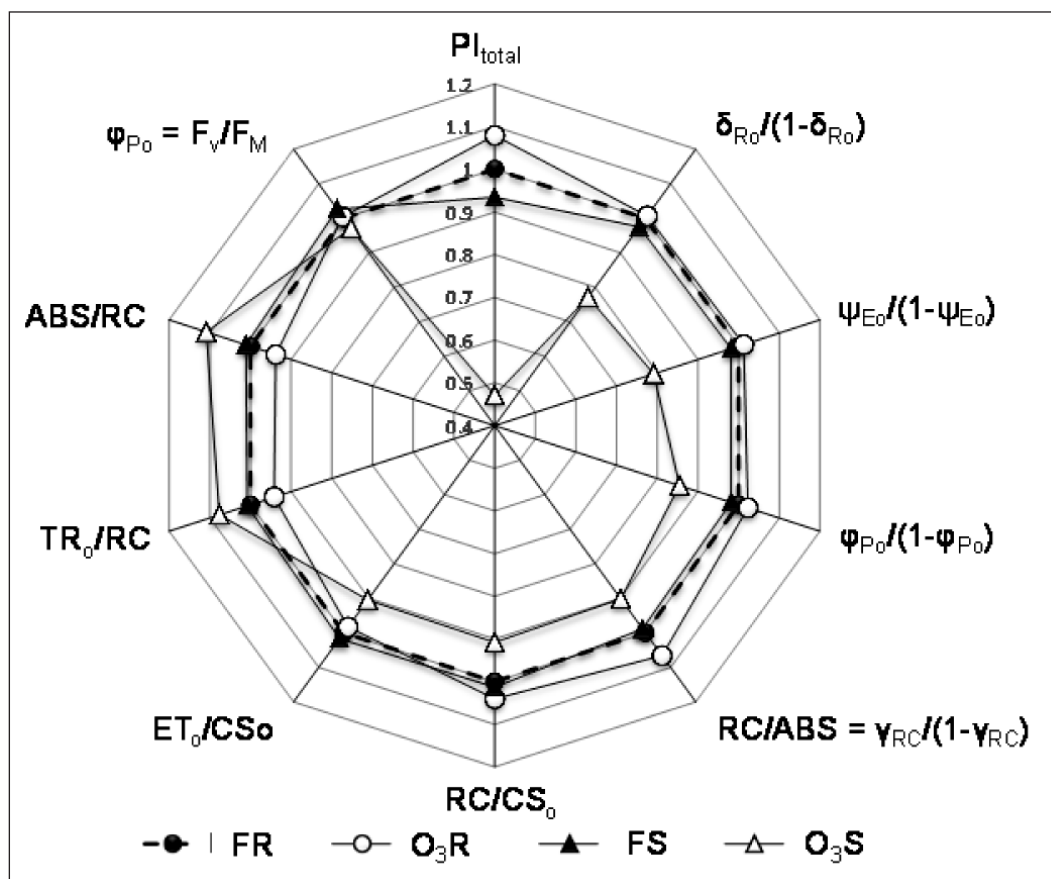
Om die invloed van O_3 op die I-P-fase van die fluoressensiekrommes verder te ontrafel, is die gemiddelde fluoressensiekrommes genormaliseer tussen die stappe O (50 μs) en I (30 ms) en voorgestel as $V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$ op 'n logaritmiëse tydskaal (Figuur 2c). Die O-I-gedeelte van die kromme verteenwoordig die die enkelomsetting $Q_A \rightarrow Q_A^-$ asook die begin van die reduksie van die intersisteem-elektrontraers, terwyl die I-P-gedeelte van die kromme slegs die PSI-gedrewe reduksie van die eindelektronontvangers, naamlik Fd en NADP⁺, verteenwoordig (Luo et al., 2006). Die opsigtelike invloed van O_3 op die O-I en I-P fases van *S156* (O_3S) word geïllustreer deur Figuur 2c. Om die verborge informasie te onthul, is gebruik gemaak van twee verskillende normaliserings van die I-P-fase van die krommes, soos getoon in Figuur 2e. Die insetsel verteenwoordig slegs die gedeelte $V_{OI} \geq 1$ van die genormaliseerde kromme van Figuur 2c, in die 30-1000 ms bereik (logskaal). Vir elke kromme weerspieël die maksimumamplitude van die fluoressensiestyging die grootte van die poel van eindelektronontvangers ná PSI (Yusuf et al., 2010). Dit het geblyk dat 'n 10% afname in die poelgrootte in *S156* (O_3S) tenoor 'n 3% toename in *R123* (O_3R) voorgekom het (Figuur 2e, insetsel). In die hoofgrafiek is die data genormaliseer tussen stappe I (30ms) en P (piek) as $V_{IP} = (F_t - F_I) / (F_P - F_I)$ en voorgestel op 'n lineêre tydskaal in die bereik 30 - 400 ms. Hierdie normalisering, waar die die maksimum amplitude van die styging vasgestel is op 1, het die vergelyking van die reduksietempo van die poel van eindelektronontvangers van die verskillende behandelings moontlik gemaak; hulle halflye word aangedui deur die snypunt van die kromme en die horisontale stippellyn by $V_{IP} = 0.5$ (halflyd). Die algehele tempokonstante vir die reduksie van e-eindontvangers kan ge-ekstrapoleer word deur die omgekeerde van die halflyd (Yusuf et al.,

2010). Geen betekenisvolle verandering in die relatiewe reduksietempo was sigbaar in die V_{OP} -kinetika van eind-elektronontvangers van die verskillende behandelings nie (Figuur 2e). Let op dat Figuur 2e (hoofgrafiek) gesien kan word as Michaeli-Menten kinetika V versus S , waar die tempo gegee word deur die relatiewe varieerbare fluoressensie, V_{IP} , en die substraat, S , die ligdosis gegee as die produk van ligintensiteit en beligtingstyd.

Figure 2c en 2e illustreer dat die verskillende fases OJ, JI, en JP van die kromme verskillend optree en dus verskillende informasie dra.

Die fluoressensiekrommes vertoon in Figuur 2b en 2c, is aansluitend ook met die JIP-toets (Strasser et al., 2004) geanaliseer om 10 strukturele en funksionele parameters van PSII-funksie, wat die fotosintetiese gedrag van die proefplante kwantifiseer, af te lei. Die waardes van die parameters is relatief tot die kontrole (FR) uitgedruk en voorgestel deur 'n multiparametriëse radiaalgrafiek (Figuur 3). In O_3S plante het 'n 13% ($p \leq 0.01$) afname in die aantal aktiewe RCs per absorpsie (RC/ABS) plaasgevind, terwyl 'n gelyktydige 10.8% ($p \leq 0.01$) toename voorgekom het in die skynbare antennagrootte (ABS/RC). Hierdie toename in ABS/RC kan toegeskryf word aan 'n strategie in *S156* om te kompenseer vir die afname in RC/ABS met gevolglik geen verandering in $TR_0/ABS (= F_v/F_M)$ in O_3S (Strasser et al., 2004). Die afname in RC/ABS dui daarop dat die grootte van die PSII-eenhede aangetas is, maar dat in sommige eenhede die RCs gedeaktiveer is en gevolglik slegs bydra tot ligabsorpsie maar nie tot fotochemie nie (toename in antennagrootte, ABS/RC), of dat die grootte van die PSII-eenhede met aktiewe RCs toeneem (Luo et al., 2006). Die 8.07% ($p \leq 0.01$) toename in die maksimum invangsvloed (TR_0/RC) in die O_3S plante dui egter op veranderinge in beide die fraksie RCs wat omvorm is in nie- Q_A^- -reducerende RCs asook in die funksionele antennagrootte (Yusuf et al., 2010). Die 9.53% ($p \leq 0.01$) afname in elektronoordrag per dwars-seksie (ET_0/CS) in die O_3S plante word toegeskryf aan die afname van 9.31% ($p \leq 0.01$) in die digtheid van PSII-RCs per opgewekte dwarsseksie (RC/ CS_0). Hierdie bevinding stem ooreen met die bewering van Guidi et al. (2010) dat die beheerde verlaging van PSII-aktiwiteit plaasvind in boontjies blootgestel aan akute O_3 -stremming as 'n voorkomende maatreef om die generering van aktiewe suurstofspesies (AOS) te voorkom.

Die O_3 -geïnduseerde veranderinge relatief tot die kontrole (FR) in die spesifieke (per RC) en die fenomenologiese (per CS) energievloede in die O_3S plante, is weerspieël deur die 53.5% ($p \leq 0.01$) afname in die PI_{total} wat die as maatstaf dien vir die potensiaal van die hele fotosintetiese ET-ketting wat ligenergie na redoksenergie omskakel (Figuur 3). Die afname in die potensiaal van die vier deelprosesse van fotosintese, relatief tot die kontrole, was soos volg: absorpsie [$y_{RC} / (1 - y_{RC}) = RC/ABS$]: 13.7%, invangs [$\phi_{P_0} / (1 - \phi_{P_0})$]: 14.5%, elektronoordrag [$\psi_o / (1 - \psi_o)$]: 20.8%, reduksie van eind-elektronontvangers [$\delta_{R_0} / (1 - \delta_{R_0})$]: 22.9%. Die



FIGUUR 3: Fraksionele verandering in geselekteerde funksionele en strukturele parameters van PSII relatief tot FR (toe driehoek en stippellyn van reëlmatige poligoon). O₃R = oop sirkels, FS = toe sirkels, O₃S = oop driehoeke.

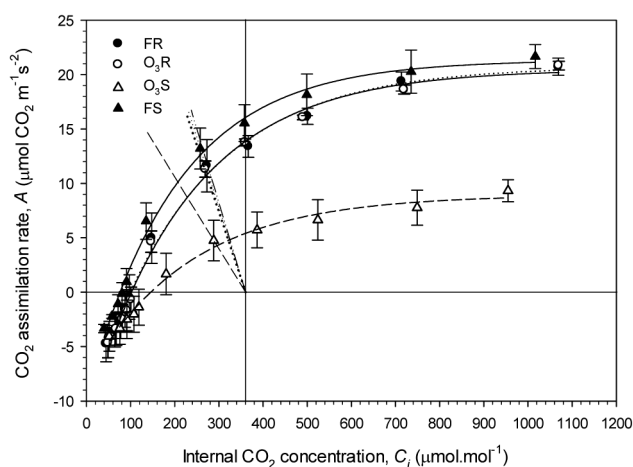
groot afname in die potensiaal vir die reduksie van eind-elektronontvangers [$\delta_{R_o}/(1 - \delta_{R_o})$] in O₃S (**Figuur 3**), het die data van die verskilkinetika van die fluoressensiekrommes wat die prominente ΔV_F -band (**Figuur 2d**) vertoon het, ondersteun. In teenstelling met die 53.5% afname in PI_{total} in O₃S, het O₃R 'n toename van 18.4% ($p \geq 0.01$) vertoon, wat hoofsaaklik toegeskryf kan word aan die hoër digtheid van RC/CS en 'n toename in die aantal aktiewe RCs per ABS (**Figuur 3**). Let op dat die parameter $\phi_{P_o} = F_v/F_{M'}$ wat dikwels die enigste fluoressensieparameter is wat in sommige plantstremmingstudies gebruik word, hoogs ongevoelig was. $F_v/F_{M'}$ het ook geblyk onsensitief te wees teenoor droogte in katoen (Luo et al., 2016).

Die veranderinge in die struktuur en funksie van die fotosintetiese apparaat in O₃S het bevestig dat aansienlike skade op membraanvlak plaasgevind het, in besonder wat betref die fotosisteme en redokskomponente van die tilakoïede. Dit kan toegeskryf word aan onvoldoende antioksidantvermoë in S156 in vergelyking met R123, wat geblyk het goed beskerm te wees.

Fotosintetiese gaswisseling

Die aanvaarde standaard om die status van die fotosintetiese apparaat te bepaal en te vergelyk op grond van gaswisseling, is 'n CO₂-afhanklikheidskromme ($A: C_i$) van intakte blare (Lange et al., 1987). Metings is uitgevoer op vergelykbare,

fisiologies-aktiewe blare van die verskillende genotipes en behandelings na 25 dae blootstelling. Om die invloed van O₃ op fotosintetiese gaswisseling van die proefplante te bepaal, is verskeie fotosintetiese gaswisselingsparameters van die $A: C_i$ -krommes (**Figuur 4**) afgelei en word in Tabel 2 vertoon. Die werklike asimilerings tempo (omgewingstoestand, A_{360})



FIGUUR 4: CO₂-afhanklikheid van nettofotosintese ($A: C_i$ -grafiek) van intakte blare van R123 en S156 na 25 dae se blootstelling aan gefiltreerde lug (F) en 80 nmol.mol⁻¹ O₃ onderskeidelik. Elke waarde verteenwoordig die gemiddeld (\pm SF), waar $n = 4$. Die versorgingsfunksie [$A = g_{CO_2}(C_o - C_i)$] wat ooreenstem met die verbruiksfunksie [$A = CE(C_o - C_i)$], is getrek deur blou die waarde van $C_i = C_o = 360 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ op die abscissa met die punt wat A_{360} verteenwoordig te verbind (Pammenter, 1989). Foutbalke toon die standaardfout aan.

TABEL 2: Gemiddelde waardes (\pm standaardfout) van die gaswisselingsparameters van intakte blare van R123 en S156 ($n = 4$ plante per behandeling) 25 dae na aanvang van blootstelling aan gefiltreerde lug (F) en $80 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ O}_3$, onderskeidelik. Simbole: A_{360} = CO_2 -assimilasietempo by $C_a = 360 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; $C_{i,360}$ = intersellulêre CO_2 -konsentrasie by $C_a = 360 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ CO}_2$; A_0 = CO_2 -assimilasietempo by $C_i = 360 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; $g_{\text{CO}_2,360}$ = stomatale geleiding by $C_a = 360 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; CE = karboksileringsdoeltreffendheid; J_{max} = maksimum CO_2 -assimilasietempo; Γ = CO_2 -kompensasiekonsentrasie; l = persentasie stomatale beperking van fotosintese; WUE = water use efficiency. Asteriske * en ** dui op betekenisvolle verskille relatief tot FR by $p > 0.05$ en $p > 0.01$ onderskeidelik, aan.

	FR	O ₃ R	FS	O ₃ R
E ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	5.3 (1.12)	4.66 (0.48)	4.90 (0.86)	3.70 (0.63)
A_{360} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	11.45 (1.2)	11.2 (1.2)	13.76 (1.38)	4.92 (1.27**)
$C_{i,360}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)	295.75 (19.34)	270.0 (18.24)	256.16 (18.48)	292.2 (26.61)
A_0 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	14.87 (1.24)	14.98 (0.76)	16.07 (0.94)	5.97 (0.85**)
g_{CO_2} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	259 (80.97)	203.25 (25.96)	274.66 (14.71)	165.2 (50.45*)
CE ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	0.056 (0.002)	0.056 (0.002)	0.061 (0.003)	0.014 (0.003**)
J_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	20.25 (0.56)	20.17 (0.31)	20.95 (1.27)	7.87 (1.51**)
Γ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)	98 (4.57)	101.6 (5.64)	76.4 (2.78)	145.8 (6.35**)
l (%)	22.99	25.23	14.37	17.73
WUE ($\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$)	2.97 (0.23)	2.75 (0.24)	2.99 (0.13)	1.46 (0.55*)

vind plaas by die gelyktydige oplossing van die verbruiks- en versorgingsfunksies, i.e. die operasionele punt (**Figuur 4**). Die waarde van A_{360} van die O₃S plante het met 63 % ($p < 0.01$) afgeneem, terwyl die ooreenstemmende geringe afname van 3 % ($p \geq 0.01$) in O₃R plante aandui dat O₃ byna geen invloed op A_{360} van R123 gehad het nie en dus die fluoressensiedata (PI_{total} , **Figuur 3**) ondersteun. Dit is opmerklik dat A_{360} in FS 16% hoër was as dié van FR, alhoewel hierdie verskynsel nie ondersteun is deur die PI_{total} -waarde nie (**Figuur 3**). Hierdie bevinding stem ooreen met die data van Flowers et al. (2007) wat aangetoon het dat hoewel S156 'n hoër inherente fotosintetiese kapasiteit in skoon lug as R123 en R331 besit, die ekstra kapasiteit nie weerspieël word in saadopbrengs nie. Die drastiese remming van A_{360} (CO_2 -assimileringsvermoë) in O₃S, kan toegeskryf word aan die groot afname in die CO_2 -versadigde fotosintese tempo (J_{max}), wat aandui dat O₃ die regenereringsvermoë van RuBP benadeel het. J_{max} in O₃S het in der daad met 61% ($p < 0.01$) afgeneem. Hierdie bevinding stem ooreen met die verduideliking van Von Caemmerer & Farquhar (1984) dat 'RuBP-regenereringsvermoë' gevoeliger is teenoor stremming as Rubisco-aktiwiteit, aangesien, behalwe vir een ensiem naamlik Rubisco, RuBP-regenerering die hele biochemie van fotosintetiese CO_2 -assimilering behels. Hierteenoor was J_{max} in O₃R opvallend onaangetas wat oortuigend demonstreer dat R123 goed beskerm is teen O₃-skade.

Die karboksileringsdoeltreffendheid (CE , aanvangshelling van die A : C_i -kromme by $C_i \leq 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) van O₃S het hoogs betekenisvol met 75% afgeneem (Tabel 2). Die CE druk die CO_2 -assimilerings tempo uit in terme van die effektiewe C_i en die vermoë (CE) van die sisteem om CO_2 te assimileer. Farquhar et al. (1980) het aangetoon dat by lae $[\text{CO}_2]$, assimilering die Michaelis-Menten kinetika volg en bepaal word deur die RuBP-versadigde tempo van die ensiem: hoe laer die karboksileringsvermoë, hoe vlakker die helling van die verbruiksfunksie. Die FR en O₃R plante het presies dieselfde CE vertoon (**Figure 4** and **Table 2**), wat aandui dat O₃ geen invloed op die karboksileringsdoeltreffendheid van die bestande genotipe na 25 dae blootstelling aan 80 nmol .

mol^{-1} gehad het nie en dus die merkwaardige bestandheid van R123 soos berig, bevestig het. Alhoewel CE in FS effens hoër was as in FR, is 'n groot afname gemeet in O₃S. Dit stem ooreen met die standpunt van Farage et al. (1991), wat koring aan akute enkel-dosisse O₃ blootgestel het, dat die afname in A toegeskryf moet word aan verlaagde CE . In teenstelling met ons bevinding, was hulle bevinding egter dat J_{max} weinig beïnvloed is.

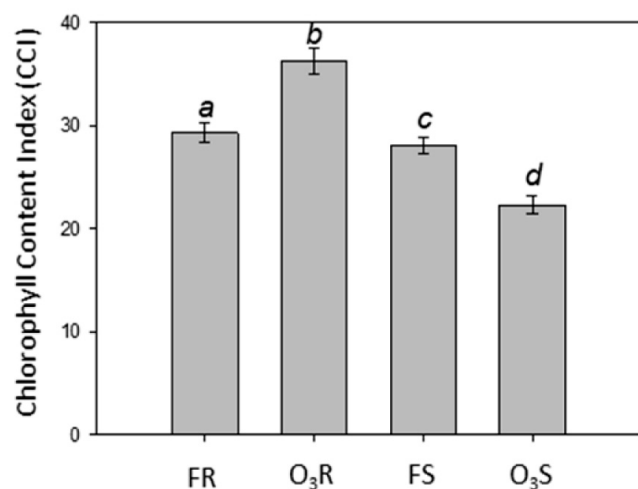
Ons data aangaande die groot verskil in gevoeligheid tussen R123 en S156 stem ooreen met die bevinding van Flowers et al. (2007) dat R123 vir O₃-skade kompenseer met beheerde stimulerings van Rubisco-aktiwiteit, deur die aktiveringstatus en/of *de novo* sintese daarvan te verhoog. Ons gaswisselingsdata ondersteun die bevinding van Izuta et al. (1996), wat met beukesailinge getoon het dat verhoogde O₃, beide CE en J_{max} verlaag. O₃-geïnduseerde afname in Rubisco-aktiwiteit van sensitiewe plante is ook deur Pell et al. (1997) gerapporteer.

Die 14% toename in $C_{i,360}$ in O₃S (**Tabel 2**, **Figuur 4**) teenoor die 9% toename in O₃R, bevestig nogeens dat die groot afname in A_{360} in O₃S te wyte was aan mesofilbeperking eerder as aan stomatale beperking. Hierdie bevinding word verder ondersteun deur die 90% toename in die kompensasiëkonsentrasie (Γ) en die 77% afname in CE in O₃S, teenoor geen afname in O₃R. Die versorgingsfunksie (g_{CO_2}) in O₃S het met 38% ($p < 0.05$) afgeneem. Die versorgingsfunksie druk die CO_2 -assimilerings tempo uit as 'n funksie van die verskil tussen C_a en C_i (dryfkrag vir die inwaartse CO_2 -beweging) en die heersende g_{CO_2} . Volgens Farquhar & Sharkey (1982), is die afname in g_{CO_2} egter selde die hooforsaak van verlaagde assimilering tempo. Die matige 21% toename in l bereken vir O₃S, bevestig dat hoewel stomabeperking 'n rol gespeel het, die afname in A hoofsaaklik aan mesofilbeperking gewyt moet word. Hierteenoor het O₃R 'n toename van slegs 9% in l vertoon. Die afname in WUE het plaasgevind ten spyte van die afname in die transpirasietempo (E). E van O₃S het met 25% gedaal teenoor 'n daling van 13% in O₃R (**Tabel 2**).

Deur die blootstelling van sojaboon aan verskillende O_3 -konsentrasies tussen 40 en 120 $nmol.mol^{-1}$ in 'n opelug- O_3 -verrykingsfasiliteit (SoyFACE), het Van Loocke et al. (2012) bevind dat evapotranspirasie lineêr met $[O_3]$ verminder en dat WUE met 50% afgeneem het weens O_3 -geïnduseerde verlagings van die vermoë om water op te neem. Eweneens rapporteer Clebsch et al. (2009) 'n betekenisvolle afname in WUE van *Phaseolus vulgaris* Pinto wat in ODGs blootgestel is aan O_3 -konsentrasies vergelykbaar met dié gebruik in ons studie. Hulle wyt die afname aan 'n groter afname in *A* teenoor 'n matige afname in *E*.

Chlorofilinhoudindeks

Na 30 dae blootstelling aan 80 $nmol.mol^{-1}$ O_3 het die O_3S plante afnames van 21.8% in CCI in vergelyking met die FS plante en 24% in vergelyking met FR (Figuur 5) getoon. Dit weerspieël die verlagings van 10% in die digtheid van die RCs (Figuur 3). Hierteenoor het die CCI van die O_3R plante met 19% relatief tot FR verhoog, wat ooreenstem met die 18.4% toename in PI_{total} soos gemeet na 25 dae blootstelling (Figuur 3). 'n Korrelasie het bestaan tussen PI_{total} en CCI: albei indekse wys op 'n O_3 -geïnduseerde afname in O_3S en 'n matige toename in O_3R relatief tot die kontroles. Die positiewe korrelasie tussen chlorofilinhoud en kwantumdoeltreffendheid van fotosintese is 'n bekende verskynsel (Nyachiro et al., 2001). Die 19% toename aangeteken in CCI van die O_3R plante, stem ooreen met die O_3 -geïnduseerde toename in chlorofilinhoud van winterkoring verkry deur Zheng et al. (2005) met 'n ODG-eksperiment. Volgens Guzy & Heath (1993) het dit geblyk dat O_3 -bestande boontjievaryëteite weerstand bied teen chlorofilverlies met behulp van antioksidante soos askorbaat en nie-proteïen sulfhidriël. In ons eksperiment is die toename in CCI in die O_3R plante nie weerspieël deur saadopbrengs nie. Dit moet egter in gedagte gehou word dat die waardes van die opbrengsparameters die resultaat is van die volle 40 dae O_3 -blootstelling.



FIGUUR 5: Chlorofilinhoudindeks (CCI) van R123 en S156 genotipes na 30 dae blootstelling aan koolstofgefiltereerde (F) lug en 80 $nmol.mol^{-1}$ O_3 , onderskeidelik. Letters bokant die foutbalke dui die betekenisvolle verskille by $p=0.05$ aan

Samevatting en Gevolgtrekking

Blootstelling van die proefplante aan 80 $nmol.mol^{-1}$ O_3 , vir die volle groeisiklus tot saadvorming, wys dat die stremming opgelê binne die fisiologiese vermoë van die proefplante was. Dit het ook geblyk uit die minimale sigbare effek na 25 dae en klein afname in opbrengs na 38 dae blootstelling, onderskeidelik, wat die bestande (R123) genotipe vertoon het. Parallele meting van chlorofil *a*-fluorensensie en fotosintetiese gaswisseling het die korrelasie van komplementêre informasie van indirekte en direkte meettegnieke van die fotosintetiese gedrag van die proefplante moonlik gemaak. Ons kon oortuigend demonstreer dat die fotosintetiese prosesse van S156 nadelig beïnvloed is deur O_3 . Dit is bekend dat versteurde plasmaproteïenfunksie, as vroeë teken van O_3 -skade kan dien (Castillo and Heath, 1990). Dit kan aanvaar word dat die tilakoïede wat die multimolukulêre peptiedkomplekse van die fotosintetiese elektronoordragketting van (gevoelige) plante insluit, net so blootgestel sou wees aan vroeë O_3 -skade. Hierteenoor mag O_3 -bestande plante beskerm word deur spesiale eienskappe van hul antioksidantmetabolisme wat ROS van O_3 -oorsprong opruim (Fiscus et al., 2005). Deur die analise van die hele chlorofil *a*-fluorensensiekrommes volgens die JIP-toets, kon ons oortuigend demonstreer dat in S156 na 25 dae al vier die domeine van fotosintetiese elektronoordrag, naamlik ligabsorpsie (ABS), die elektronskenkerkant van PSII (OEC), elektronoordrag tussen PSII en PSI, én die elektronontvangerkant van PSI wat die reduksie-ekwivalente opwek vir die aandrywing van die Calvin-Benson siklus en sekondêre metabolisme, versteur was. Die verskyning van 'n positiewe ΔV_K -band in die verskillkinetika van S156 het gedui op die dissosiasie van die OEC wat lei tot 'n wanbalans tussen die elektronvloei vanaf die OEC na die RC en die elektronvloei verder na die ontvangerkant van PSII. Hierbenewens het die sterk positiewe ΔV_I -band gedui op die afname in die aktiveringstatus van NADP⁺-reduktase met moontlike afname in die reduksie van die eind-elektronontvangers (NADP⁺ en Fd). Verdere ontleding van die I-P-fase van die fluorensensiekrommes het aangetoon dat 'n afname van ongeveer 10%, relatief tot die kontrole (en relatief tot R123), in die poelgrootte van eind-elektronontvangers voorgekom het. Die remmende invloed van O_3 op die fotosintetiese elektronoordrag het gepaardgegaan met 'n 24% afname in die CCI soos gemeet na 30 dae se blootstelling. Deur geen van genoemde effekte te vertoon nie, is R123 se beweerde weerstand teen O_3 bevestig.

Gegewe die sterk remmende invloed op die funksionering van die ET-ketting van S156 en in ag genome dat die Calvin-Benson siklus aangedryf word deur reduksie-ekwivalente gegeneer deur genoemde reaksies, is ons gevolgtrekking dat beide die lig- en donkerprosesse van fotosintese asook die wisselwerking daarva, deur O_3 aangeval word. Die groot (63%) afname in J_{max} in S156 wat ooreenstem met die maksimumtempo van die regenerering van RuBP, en aanvaar word as die maksimumtempo van gekoppelde

elektronoordrag (Long & Hällgren, 1987), het sterk gedui op O₃-geïnduseerde versteuring van die interaksie tussen die Calvin-Benson siklus in die stroma en die ET-ketting in die tilakoïde. Die O₃-gevoeligheid van RuBP-regenerering in *S156* is origins 'n aanduiding dat verskeie ensieme van die Calvin-Benson siklus gerem is. Die aansienlike afname in *CE* dui daarop dat Rubisco gerem wa, deur deaktivering, verlaagde sintese of afbreking.

Ofskoon PI_{total} 'n indeks is vir fotosintetiese potensiaal, gebaseer op ligabsorpsie en gemeet in die donker-aangepasde toestand, het dit goed gekorreleer met die fisiologiese en groeiparameters. Met hierdie studie is bevind dat 'n uitstekende korrelasie bestaan tussen PI_{total} en die parameters van CO₂-assimilering (A , J_{max} , CE) wat die daaropvolgende dag gemeet is in die O₃-plante. Die ontleding van die fluoressensiekrommes met die JIP-toets het ryke informasie opgelewer oor die werking van die OEC, akkumulering van elektrondraers soos Q_A^- en die reduksie van eind-elektronontvangers van die fotosintetiese elektronoordragketting. Ons data het die merkwaardige O₃-bestandheid van *R123* oortuigend bevestig. Die uiterste gevoeligheid vertoon deur *S15*, ondersteun die moontlike geskiktheid daarvan as bio-indikatorspesie vir O₃-besoedeling as alternatief tot die klawer-assai, soos voorgestel deur Burkey et al., 2005.

Erkenning

Hiermee word die Noorwes-Universiteit erken vir die fondse beskikbaar gestel vir die oprig van die ODC-fasiliteit op die Potchefstroomkampus. Hierdie navorsing is ondersteun deur Sasol Technology (Pty) Limited, en die Nasionale Navorsingstigting (NRF). Laasgenoemde het ook 'n M.Sc.-beurs aan CCWS ingesluit. Ons bedank Dr. Felicity Hayes, Centre for Ecology and Hydrology Wales, Bangor, UK, vir die lewering van kosbare saad gebruik in die eksperimente aan ons.

Outeursbydraes

CCWS het die eksperimente gedoen en 'n konsepartikel geskryf. GHJK het die eksperimente en protokol ontwerp en die finale artikel geskryf. RJS het bygedra tot die interpretasie en voorstelling van die chlorofil *a*-fluoressensiedata. JMB het bygedra tot die finalisering van die figure.

Verwysings

- Ashmore, M.R. & Bell, J.N.B., 1991 'The role of ozone in global change', *Annals of Botany* 67, 39-48.
- Betzberger, A.M., Yendrek, C.R., Sun, J., Leisner C.P., Nelson, R.L., Ort, D.R., Ainsworth, E.A., 2012, 'Ozone exposure-response for U.S. soybean cultivars: linear reductions in photosynthetic potential, biomass and yield', *Plant Physiology* 160, 1827-1839.
- Betzberger, A.M., Yendrek, C.R., Sun, J., Leisner, C.P., Nelson, R.L., Ort, D.R., Ainsworth, E.A., 2012, 'Ozone exposure for U.S. soybean cultivars: Linear reductions in photosynthetic potential, biomass, and yield', *Plant physiology* 160, 1827-1839.
- Burkey, K.O., Miller, J.E., Ficus, E.L., 2005, 'Assessment of ambient ozone effects on vegetation using snap bean as bioindicator species', *Journal of Environmental Quality*, 34, 1081-1086.

- Castillo, F.J. & Heath, R.L., 1990, 'Ca²⁺ transport in membrane vesicles from pinto bean leaves and its alteration after ozone exposure', *Plant Physiology* 94, 788-795.
- Clebsch, C.C., Divan, A.M., Oliveira, P.L., Nicolau, M., 2009, 'Physiological disturbances promoted by ozone in five cultivars of *Phaseolus vulgaris*', *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21, 319-329.
- Davison, A.W. & Reiling, K., 1995, 'A rapid change in ozone resistance of *Plantago major* after summers with high ozone concentrations', *New Phytologist* 131, 337-344.
- De Ronde, J.A., Cress, W.A., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J. Van Staden, J., 2004, 'Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing and Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress', *Journal of Plant Physiology* 161, 1211-1224.
- Farage, P, Long, S.P., Lechner, E.G., Baker, N., 1991, 'The sequence of change within the photosynthetic apparatus of wheat following short-term exposure to ozone' *Plant Physiology* 95, 529-535.
- Farquhar, G.D., Von Caemmerer, S., Berry, J.A., 1980, 'A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species', *Planta* 149, 78-90.
- Farquhar, G.D. & Sharkey, T.D., 1982, 'Stomatal conductance and photosynthesis', *Annual Review of Plant Physiology* 33, 317-345.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L., Burkey, K.O., 2005, 'Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning' *Plant, Cell and Environment* 28, 997-1011.
- Fowler, D., Pilegaard, K., Sutton, M.A. et al., 2009, 'Atmospheric composition change', *Atmospheric Environment* 43, 5193-5267.
- Flowers, D., Fiscus, E.L., Burkey, K.O., Booker, F.L., Dubois J.-J. B., 2007, 'Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes differing in sensitivity to ozone', *Environmental and Experimental Botany* 61, 190-198.
- Force, L., Critchley, C., van Rensen, J.J.S., 2003, 'new fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants', *Photosynthesis Research* 78, 111.
- Gu, L., Pallardy, S.G., Tu, K., Law, B.E., Wullschlegler, S.D., 2010, 'Reliable estimation of biochemical parameters from C3 leaf photosynthesis-intercellular carbon dioxide response curves', *Plant Cell & Environment* 33, 1852-1874
- Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 1997, 'The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars', *Journal of Experimental Botany*, 48 (306), 173-179.
- Guidi, L., Degl'Inocenti, E., Giordano, C., Biricolti, S., Tattini, M., 2010, 'Ozone tolerance in *Phaseolus vulgaris* depends on more than one mechanism', *Environmental Pollution* 158, 3164-3171.
- Guzy, M.R. & Heath, R.L., 1993, 'Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)', *New Phytologist* 124, 617-625.
- Heagle, A.S., 1989, 'Ozone and crop yield', *Annu Rev Phytopathol* 27, 397-423.
- Heggstad, H.E., 1991, 'Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone', *Environmental Pollution* 74, 264-291.
- Heyneke, E., Smit, P.R. Van Rensburg, L., Krüger G.H.J., 2012, 'Open-top chambers to study air pollution impacts in South Africa. Part I: microclimate in open-top chambers', *South African Journal of Plant and Soil*, 29, 1-7.
- IPCC, 2007, 'Climate change 2007. Impacts, Adaptation, Vulnerability. Contribution of Working Group II to the fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change', Parry, M., Canziani, O., Palutikof, J., Van der Linden, P., Hanson, C. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 939 pp.
- Izuta, T., Umamoto, M., Horie, K., Aoki, M., Totsuka, T., 1996, 'Effects of ambient levels of ozone on growth, gas exchange rates and chlorophyll contents of *Fagus crenata* seedlings', *Journal of Japan Society of Atmospheric Environment* 31, 91-105.
- Krüger, G.H.J., Tsimilli Michael, M., Strasser, R.J., 1997, 'Light stress provokes plastic and elastic modifications in the structure and function of photosystem II in *Camelia* leaves', *Physiologia Plantarum* 101, 265-277.
- Lange, O.L., Harley, P.C., Beyschlag, W., Tenhunen, J.D., 1987, 'Gas exchange methods for characterizing the impact of stress on leaves', *In Plant response to stress. Edited by J.D.Tenhunen, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 3-22.*
- Long, S.P. & Hällgren, J.-E., 1987, 'Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and laboratory'. *In J. Coombs, D.O. Hall, S.P. Long, J. M.O. Scurlock (Edit.). Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Pergamon Press, pp 62-94.*
- Luo, H.-H., Tsimilli-Michael, M., Zhang, Y.-L., Zhang W.-F., 2016, 'Combining gas exchange and chlorophyll a fluorescence measurements to analyze the photosynthetic activity of drip-irrigated cotton under different soil water deficits', *Journal of Integrative Agriculture* 15(6), 1256-1266.
- Luo, T., Deng, W.-Y., Chen, F., 2006. 'Study on cold-resistance ability of *Jatropha curcas* growing in different ecological environments', *Acta Sci. Nat. Univ. Neimongol* 37, 446-449.

- Manning, W.J., Feder, W.A., Perkins, I., 1972, 'Sensitivity of spinach cultivars to ozone', *Plant Disease Report* 56, 832-833.
- McCormick, J., 1997, 'Acid Earth – The politics of acid pollution', 3rd ed., Earthscan Publications Ltd., London, 190 pp.
- McKee, I.M., Bullimore, J.F., Long, S.P., 1997, 'Will elevated CO₂ concentration protect the yield of wheat from ozone damage?' *Plant Cell and Environment* 20, 77-84.
- Mills, G., Hayes, F., Simpson, D., Emberson, L., Norris, D., Harmens, H., and Buker, P., 2011, 'Evidence of widespread effects of ozone on crops and (semi-) natural vegetation in Europe (1990–2006) in relation to AOT40-and flux-based risk maps', *Glob. Change Biol.*, 17, 592–613, doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02217.x, 2011
- Monks P.A., A. T. Archibald, A., Colette, O. Cooper, M. Coyle, R. Derwent, D. Fowler, C. Granier, K. S. Law, G. E. Mills, D. S. Stevenson, O. Tarasova, V. Thouret, E. von Schneidmesser, R. Sommariva, O. Wild, and M. L. Williams. 2015. 'Tropospheric ozone and its precursors from the urban to the global scale from air quality to short-lived climate forcer', *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15, 8889–8973, 2015, doi:10.5194/acp-15-8889-2015.
- Morgan, P.B., Ainsworth, E.A. & Long, S.P., 2003, 'How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield', *Plant, Cell and Environment* 26, 1317-1328.
- Nagy, V., Tengölics, R., Schansker, G., Rákhely, G., Kovács, K., Garab, G., Tóth, S. Z., 2012, 'Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii*', *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 8864-8871.
- Nyachiro, J.M., Briggs, K.G., Hoddinott, J., Johnson-Flanagan, A.M., 2001, 'Chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and water deficit in spring wheat', *Cereal Research Communications* 29, No 1/2, 135-142.
- Pammenter, N.W., 1989, 'Clarification of an apparent anomaly in the supply function associated with the response of carbon assimilation to carbon dioxide determined using conventional field equipment', *South African Journal of Science*, 85, 271-272.
- Pell, E.J., Schlagnhauser, C.D., Arteca, R.N., 1979, 'Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction', *Plant Physiology* 100, 264-273.
- Schmidt W., Neubauer C., Kolbowski J., Schreiber U., Urbach W., 1990, 'Comparison of the effects of air pollutants (SO₂, O₃, NO₂) on intact leaves by measurements of chlorophyll fluorescence and P700 absorbance changes', *Photosynthesis Research* 25, 241-248.
- Singaas, E., Ort, D.R., Delucia, E.H., 2001, 'Variation in measured values of photosynthetic quantum yield in ecophysiological studies', *Oecologia*, 128, 15-23.
- Smit, M.F., Van Heerden, P.D.R., Pienaar, J.J., Weissflog, L., Strasser, R.J., Krüger, G.H.J., 2009, 'Effect of trifluoroacetate, a persistent degradation product of fluorinated hydrocarbons, on C₃ and C₄ crop plants', *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 623-634.
- Strasser, R.J. & Strasser, B., 1995, 'Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test', In: Mathis, P. (Edit.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol 5, 977-980.
- Strasser R.J., 1974, 'Studies on the oxygen evolving system in flashed leaves', In: M. Avron, Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis, September 2-6, 1974, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2004, 'Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient', In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, pp 321-362.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Dangre, D., Rai, M., 2007, 'Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plant systems biology: a case study for the evaluation of the impact of mycorrhization with *Piriformospora indica*. In Varma, A., Oelmüller, R. (Eds.), *Soil Biology. Advanced Techniques in Soil Microbiology*, volume 11, Springer-Verlag, Berlin.
- Taylor, S.E. & Terry, N., 1984, 'Limiting factors in photosynthesis. V. Photochemical energy supply co-limits photosynthesis at low values intercellular CO₂ concentration', *Plant Physiology* 75, 82-86.
- Tingey, D.T., Rodecap, K.D., Lee, E.H., Hoggset, W.E., Gregg, J.W., 2002, 'Pod development increases ozone sensitivity of *Phaseolus vulgaris*', *Water, Air and Soil Pollution* 39, issue 1/4: 325-341
- Toth, S.Z., Schansker, G., Garab, G., Strasser, R.J., 2007, 'Photosynthetic electron transport activity in heat treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II', *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 295-305.
- Tsimilli-Michael, M. & Strasser, R.J., 2008, 'In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants', In: Varma, A. (Ed.), *Mycorrhiza: State of the art, Genetics and molecular biology, Eco-function, Biotechnology, Eco-physiology, Structure and systematics*, 3rd ed. Springer, pp 679-703.
- VanLoocke, A., Betzelberger, A., Ainsworth, E.A., Bernacchi, C.J., 2012, 'Rising ozone concentrations decrease soybean evapotranspiration and water use efficiency whilst increasing canopy temperature', *New Phytologist*, 195,
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1984, 'Effects of partial defoliation, changes of irradiance during growth, short-term water stress and growth at enhanced p(CO₂) on the photosynthetic capacity of leaves of *Phaseolus vulgaris* L.', *Planta* 160, 320-329.
- Yordanov, I., Goltsev, V., Stefanov, D., Chernev, P., Zaharieva, I., Kirova, M., Gecheva, V., Strasser, R.J., 2008, 'Preservation of photosynthetic electron transport from senescence-induced inactivation in primary leaves after decapitation and defoliation of bean plants', *Journal of Plant Physiology* 165, 1954-1963.
- Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, Sarin, M.B., 2010, 'Overexpression of γ-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements', *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1428-1438.
- Zheng, Q., Wang, X., Feng, Z., Song, W., Feng, Z., 2005, 'Ozone effects on chlorophyll content and lipid peroxidation in *in situ* leaves of winter wheat', *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 25, 2240-2244.