Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie
ISSN: (Online) 2222-4173, (Print) 0254-3486

Kontrasterende invloed van chroniese osoonblootstelling op fotosintetiese elektronoordrag en CO_2-assimilering in gevoelige (*S156*) en bestande (*R123*) *Phaseolus vulgaris* L. genotipes

Author:
Gert HJ Krüger[1*], Cornelius CW Scheepers[1], 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, Switserland

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 CO_2-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

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

Troposferiese osoon (O_3) 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 O_3 blaarskade en 'n afname in fotosintese. Bestandheid van gewasse teen O_3 verskil aansienlik tussen spesies en genotipes. Met hierdie studie is nuwe inligting oor die fisiologiese en biochemiese grondslag van die skadelike effek van O_3 verkry deur chroniese blootstelling van twee bosboongenotipes met bekende gevoeligheid vir O_3, naamlik *S156* (gevoelig) en *R123* (bestand), aan onderskeidelik houtskool-gefiltreerde lug en 80 dpm O_3. Die studie is uitgevoer in oop-dek-groeikamers (OTCs) vir die volle groeiperiode tot wasdom. Die status van die fotosintetiese apparaat van die proefplante is bepaal deur analise van chlorofil *a*-fluoressensiekinetika en CO_2-afhanklikheidskrommes (A:C_i). 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 ontkoppeling 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 fitotoksisiteit van O_3, nodig vir die ontwikkeling van bestande genotipes.

Sleutelwoorde: *Phaseolus vulgaris*, osoon, chlorofil *a*-fluoressensie, OEC, PSII, fotosintetiese elektronoordrag, CO_2-assimilering, stomatale geleiding, saadopbrengs, *open-top*-groeikamers.

Differential response of photosynthetic electron transport and CO_2 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 $nmol.mol^{-1}$ O_3. 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 CO_2 response curves (A:C_i). O_3-induced physiological effects were detected in *S156* long before appearance of necrotic spots on the trifoliate 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 trifoliate leaves. Our data contribute to and complement the existing knowledge on the processes underlying the phytotoxicity of O_3 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 atmosfieriese 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 stremmingsfaktor 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); Heggestad, 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 (38-120 nmol.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* cultivars Pinto (sensitief) en Goffry (bestand), wat vir 4h blootgestel was aan 80 nmol.mol^{-1} 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 cultivar beskerm word teen die vorming van aktiewe suurstofspesies (AOS) deur die beheerde verlaging van PSII-aktiwiteit.

Na enkele akute (200 nmol.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 fotosintesetempo hoër as dié van *R123* was, dit geen beduidendende vermoë besit om Rubisco teen hoë O_3 te beskerm nie.

Ofskoon chlorofil *a*-fluoressensie ruim gebruik word om stremming te moniteer, bly die aanwending van die inligting opgesluit in die fluoressensiekromme, dikwels beperk tot die fluoressensiewaardes van die maksimum (F_M) en die minimum (F_o). 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 analisering 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, intersisteem elektronoordrag, en reduksie van eind-elektronontvangers. Parallel hieraan is die effek van die stremming bepaal deur die analise van CO_2-afhanklikheidskrommes (A:C_i-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-groeikamers (open-top growth chambers, OTCs) vir die volle groeiperiode. Paralelle meting van chlorofil α-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*-groeikamers (OTCs)

elk bestaande uit 'n silindriese aluminiumraamwerk met 'n reënskerm, en bedek met deursigtige PVC-materiaal. Vier 5 m^3 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 O_3-verrykte lug, voorsien deur 'n elektriese O_3-generator (UV-20 HO, Olgear, Kaapstad). Lugtoevoer aan die ODGs is voorsien van groot aksiale waaiers met spoedbeheer. Die O_3-generator wat in die waaierkas ingebou was, het 'n konstante O_3-vloei (3000 mg/h) gelewer, opgewek uit suiwer suurstof vanaf gassilinders. Die O_3-konsentrasie in die kamers is met 'n oorvloeiklep beheer om die gevraagde $[O_3]$ 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 $[O_3]$ is gemoniteer met 'n osoonmonitor (Model 205, 2B Tecnologies, Inc., Colorado, USA). Sien Heyneke et al. (2012) vir tegniese besonderhede van die OTC-stelsel en rekord van daaglikse O_3-vlakke gehandhaaf in die behandelings-OTCs.

Plantmateriaal

Twee bosboon (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipes, naamlik '*S156*' (O_3-gevoelig) en '*R123*' (O_3-bestand) wat van '*Oregon 91*' geselekteer is vir O_3-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 plastiekpotte gevul met 'n mengsel van vermikuliet, sand en grond, verryk met 'n stadig-vrystellende messtof (Osmocote®). Vier potte is gebruik per genotope 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 O_3-toegang uitgeskakel.

Chlorofilinhoud

Chlorofilinhoudindeks (CCI) van blare is nie-destruktief gemeet deur 'n chlorofilmeter (CCM-200, Opti-Sciences, Inc., VSA). Agt metings is geneem per jongste volledig-ontvoude blaar van twee plante per behandeling.

Fotosintetiese gaswisseling

Fotosintetiese gaswisseling is twee-weekliks met 'n infrarooigasanaliseerder, toegrus met 'n outomatiese blaarkuvet (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 tyd-rowend en daarom is slegs twee replikaatmetings per genotipe per behandeling uitgevoer. Die derde volledig-ontvoude blaar van 'n proefplant is telkens vir 5 minute in die blaarkuvet aangepas by 'n CO_2-konsentrasie van 360 µmol. mol^{-1} en 'n fotonvloeidigtheid (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 CO_2-konsentrasie (C_i) gemanipuleer deur die CO_2-konsentrasie (C_a) te varieer. Die aanvangshelling van die verbruikskromme is bepaal deur C_a in die kuvet 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 CO_2-afhanklikheidskrommes (*A*: *Ci*) 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 [$A = CE\ (C_a - \Gamma)$] is getrek deur bloot die waarde van $C_i = C_a$ = 360 µmol.mol^{-1} op die abscissa met die punt wat A_{360} 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; A_{360} = CO_2-assimileringstempo by omgewings CO_2-konsentrasie; A_0 = CO_2-assimileringstempo in afwesigheid van stomatale beperking ($C_i \geq$ 360 µmol. mol^{-1}); g_{CO2} = stomatale geleidingsvermoë vir CO_2; C_a = CO_2 konsentrasie van omgewingslug; C_i = intersellulêre CO_2-konsentrasie; $CE = \delta A/\delta C_i$ = karboksilerings-doeltreffendheid; Γ = CO_2-kompensasiepunt; E = transpirasietempo; ℓ = % stomatale beperking; PFD = fotonvloeddigdheid.

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 afhangende van die passingmetode gebruik (Gu et al., 2010).

Chlorofil *a*-fluoressensie-induksie

Chlorofil *a*-fluoressensie 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 fluoressensiekromme 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 fluoressensie= intensiteit, F_M, te weerspieël) op 'n blaararea met 4 mm deursnee en is geregistreer vir 'n periode van een sekonde. Die geregistreerde krommes (O-J-I-P) is geanaliseer volgens die JIP-toets (Strasser et al., 2004). OJIP verwys na die vinnige, veelfasige fluoressensiestyging 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 fluoressensiekromme 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-aangepasde plant, weerspieël die konsentrasie van primêre gereduseerde kinoon-elektronontvangers van PSII in hul gereduseerde toestand ($Q_A^-/Q_{A,\,total}$), soos bepaal deur die kinetika van verskillende redoksreaksies wat in die ET-ketting plaasvind. Die JIP-toets verteenwoordig die translering 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 ($\varphi_{Po} = TR_0/ABS = F_v/F_M$), 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 ($\psi_{Eo} = ET_o/TR_o$), die kwantumopbrengs van elektronoordrag ($\varphi_{Eo} = ET_0/ABS = \varphi_{Po} \bullet \psi_o$), en die kwantumopbrengs van dissipering ($\varphi_{Do} = DI_o/ABS = (1 - \varphi_{Po})$; (iii) die fenomologiese energievloede (per opgewekte dwarsseksie) vir absorpsie (ABS/CS), invangs (TR_o/CS), elektronoordrag (ET_o/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 elektronoordraging (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):

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

waar γ_{RC} staan vir die fraksie chlorofilmolekule wat aktiewe RCs is van PSII is. Dus, $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC}) = RC/Chl_{Antenna} = RC/ABS$ in die JIP-toetsterminologie. RC/ABS is die fraksie RC-chlorofil (Chl_{RC}) per totale chlorofil ($Chl_{RC} + Chl_{Antenna}$). Laasgenoemde uitdrukking kan afgebreek word in twee JIP-toetsparameters en bepaal word vanaf die oorspronklike fluoressensieseine as $RC/ABS = RC/TR_0 \bullet TR_0/ABS = [(F_{2ms} - F_{50\mu s})/4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})] \bullet F_V/F_M$. 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-digdheid 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 $\varphi_{Po}/(1-\varphi_{Po}) = TR_0/DI_0 = k_P/k_N = F_V/F_0$. Die bydrae van elektronoordrag verder as Q_A, is afgelei as $\psi_o/(1-\psi_o) = ET_o/(TR_o - ET_o) = (F_M - F_{2ms})/(F_{2ms} - F_{50\mu s})$. 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, $\Delta V_{OJ} = (V_{OJ\ treatment} - V_{OJ\ control})$; (2) F_J en F_P ($V_{JP} = (F_t - F_J)/(F_P - F_J)$, $\Delta V_{JP} = (V_{JP\ treatment} - V_{JP\ control})$ 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 teminologie 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 60ºC 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*' sagtewarepaket 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*.

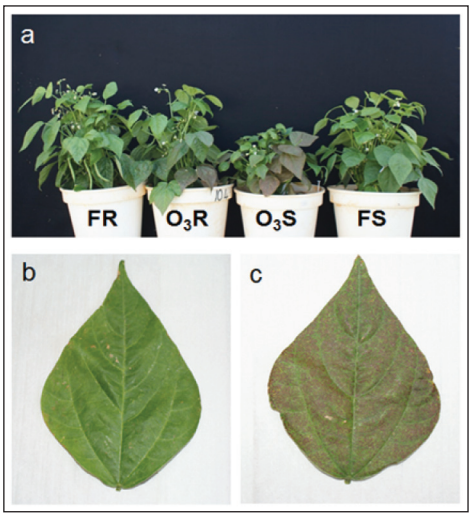
Nota: In n engere sin is die 8 replikaatpotte per genotipe per behandeling gebruik in die studie pseudo-replikate. Die grootte van die ODGs en die uitstekende beheer van die daaglikse O_3-konsentrasies wat deurlopend geregistreer is, het verseker dat deur die gebruik van twee ODGs per behandeling, die 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 nmolmol^{-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 nmol.mol^{-1} O_3. Aanvanklik het simptome verskyn as grys-groen vlekke tussen die are wat oorgegaan het in bronskleurige letsels, wat geleidelik saamgegroei het om na 35 dae groot dele van die blaaroppervlak te bedek (**Figuur 1c**). Burkey *et al*. (2005) het soortgelyke simptome in dieselfde genotype raporteer. 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 nmol.mol^{-1} O_3 vir 38 dae wat die reproduktiewe 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 beïnvoed 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 reproduktiewe 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 statisies 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 nmol.mol^{-1} O_3, relatief tot dié gekweek onder koolstofgefiltreerde lug, geraporteer deur Burkey et al, (2005). Flowers et al. (2007) het 'n afname van 77% in saadopbrengs geraporteer na chroniese blootstelling van *S156* aan 60 nmol.mol^{-1} O_3 in ODGs.

Fisiologiese invloed

Chlorofil *a*-fluoressensie: normaliserings, verskilkinetika, JIP-toets

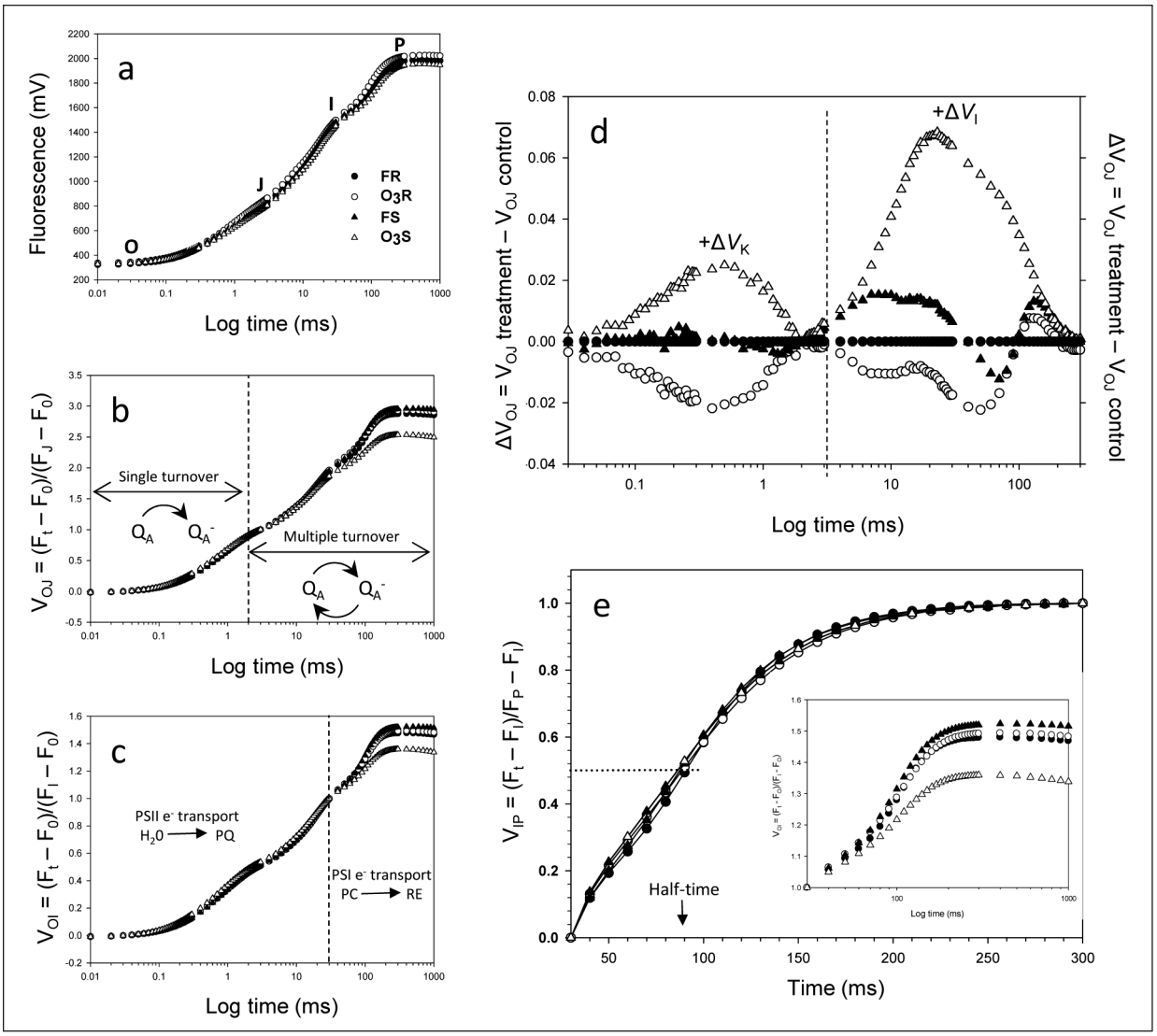
Gemiddelde chlorofil *a*-fluoressensiekrommes van donker-aangepasde blare van die proefplante word voorgestel op logaritmiese tydskaal in **Figuur 2a-c**. Hierdie krommes vertoon die tipiese O-J-I-P fluoressensiestyging, vanaf 'n beginvlak, F_o, tot 'n maksimum $F_P = F_M$, wat beskou kan word as die die maximum fluoressensie-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 fluoressensiekrommes 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 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 fluoressensiekrommes van die proefplante genormaliseer tussen F_o (50 µs) en F_J (~2 ms) (**Figuur 2b**) demonstreer die

TABEL 1: Gemiddelde opbrengsparameters (± standaardfout) vir die onderskeie behandelings gemeet na rypwording, 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 plan	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)
O3S	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) aantas, 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 µs) en J (2ms) as $V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$, 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 ($\Delta V = V_{treatment} - V_{control}$) onderskeidelik, te vertoon. Die sein is met 'n faktor van 6 versterk om die verskille duidelik te toon. Die Die verkilkinetika 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 µs) 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 elektrondraers soos bv. Feo^- (feofitien), wat veroorsaak is deur die ontkoppeling 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 genormaliseerd tussen F_o (50 s en F_J (2 ms) op logaritmiese tydskaal, wat die relatiewe verandering in die enkel-omsettingsfase (0 – 2 ms) en die meervoudige omsettingsfase (2ms - ~ 300 ms) aantoon; **(c)**: Gemiddelde fluoressensiekrommes dubbeld genormaliseerd tussen F_o (50 µs) en F_I (30 ms); (**d**): Verskil in varieerbare fluoressensie ($\Delta V = V_{behandeling} – V_{kontrole}$) teenoor log-tyd van die verskillende behandelings en genotipes genormaliseerd tussen die fluoressensie-ekstreme F_o (50 µs) 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)**, **insetsel**: Gemiddelde fluoressensiekrommes genormaliseerd tussen F_o (50 µs) en F_I (30 ms) wat die V_{OI}-gedeelte vir waardes groter as 1 (na 30 ms) oor die tydsverloop 30 -300 ms aantoon. Die I-P-styging weerspieël die grootte van die poel van eindelektronontvangers; **(e), hoofgrafiek**: Gemiddelde fluoressensiekrommes van behandelings en genotipes, onderskeidelik genormaliseerd tussen F_I (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 eind-elektronontvangers van die verskillende behandelings te vergelyk. FR is as verwysing/kontrole 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 verroorsaak '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 onstaan 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**).

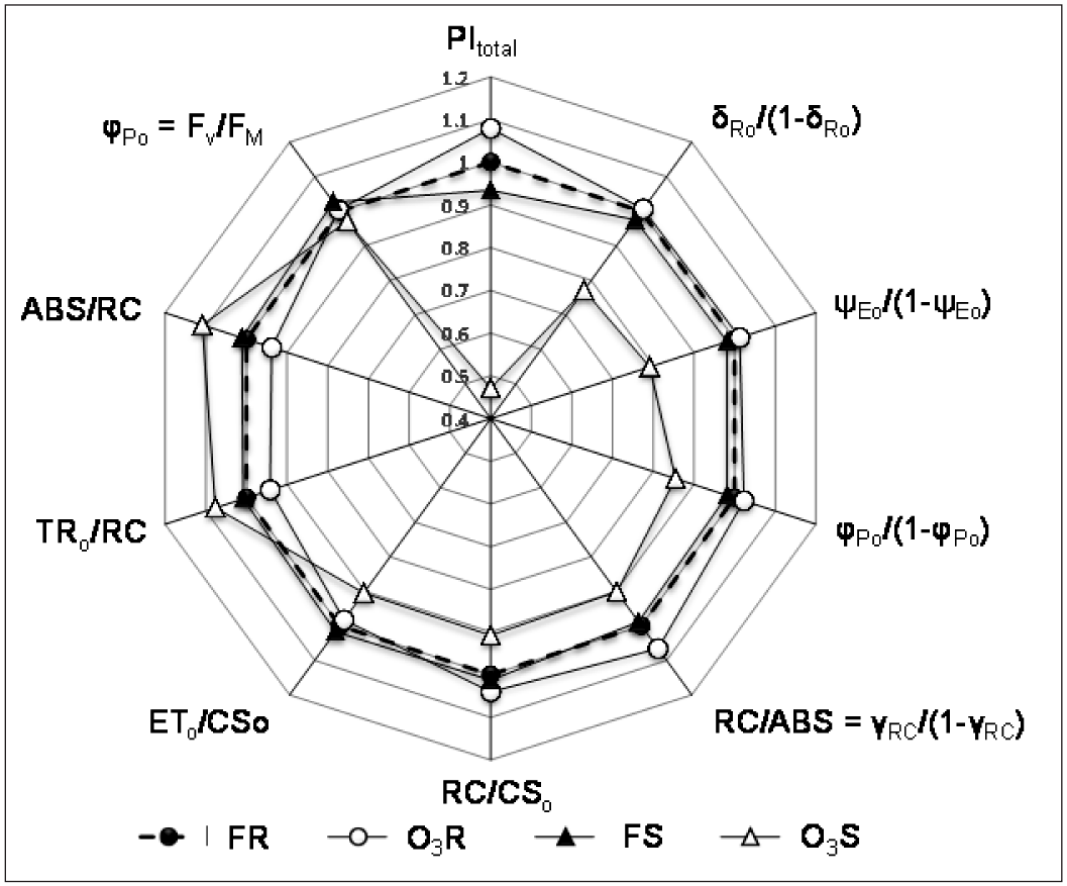
'n Positiewe ΔV_I-band was ook sigbaar tussen 2 ms en F_M (**Figuur 2d, regs**) in O_3S na 25 dae blootstelling aan O_3. Die ΔV_I-band verskaf inligting oor die aktiveringstatus van feredoksien-NADP$^+$-reduktase (FNR), asook oor die moontlike remming van die reduksie van eind-elektronontvangers soos NADP$^+$ en ferredoksien (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 logaritmiese 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-elektrondraers, 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 halftye word aangedui deur die snypunt van die kromme en die horisontale stippellyn by V_{IP} = 0.5 (halftyd). Die algehele tempokonstante vir die reduksie van e$^-$-eindontvangers kan ge-ekstrapoleer word deur die omgekeerde van die halftyd (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 **Figure 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 multiparametriese 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-reduserende 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 digdheid 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 maatreël 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 [$\gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC})$ = RC/ABS]: 13.7%, invangs [$\varphi_{Po}/(1 - \varphi_{Po})$]: 14.5%, elektronoordrag [$\psi_o/(1 - \psi_o)$]: 20.8%, reduksie van eind-elektronontvangers [$\delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$]: 22.9%. Die



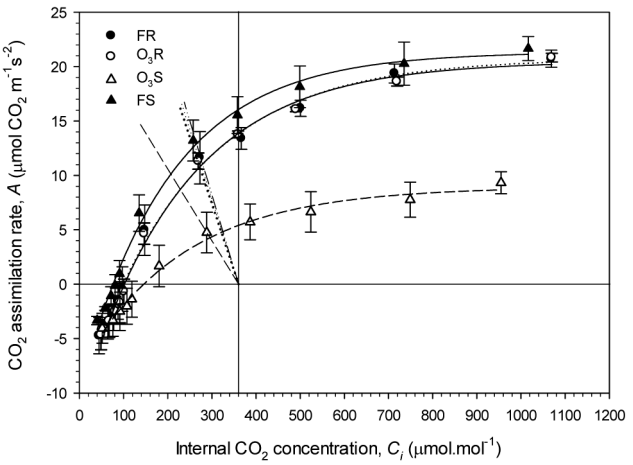
FIGUUR 3: Fraksionele verandering in geselekteerde funksionele en strukturele parameters van PSII relatief tot **FR** (toe driehoeke en stippellyn van reëlmatige poligoon). **O_3R** = oop sirkels, **FS** = toe sirkels, **O_3S** = oop driehoeke.

groot afname in die potensiaal vir die reduksie van eind-elektronontvangers [δ_{Ro}/ (1 - δ_{Ro})] in O_3S (**Figuur 3**), het die data van die verskilkinetika van die fluoressensiekrommes wat die prominente ΔV_I-band (**Figuur 2d**) vertoon het, ondersteun. In teenstelling met die 53.5% afname in PI_{total} in O_3S, het O_3R '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 $\varphi_{Po} = F_v/F_M$, 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 O_3S 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 CO_2-afhanklikheidskromme (*A*: *Ci*) 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 O_3 op fotosintetiese gaswisseling van die proefplante te bepaal, is verskeie fotosintetiese gaswisselingsparameters van die *A*: *Ci*-krommes (**Figuur 4**) afgelei en word in **Tabel 2** vertoon. Die werklike asimileringstempo (omgewingstoestande, A_{360})



FIGUUR 4: CO_2-afhanklikheid van nettofotosintese (A: Ci-grafiek) van intakte blare van R123 en S156 na 25 dae se blootstelling aan gefiltreerde lug (F) en 80 nmol.mol^{-1} O_3 onderskeidelik. Elke waarde verteenwoordig die gemiddeld (±SF), waar n = 4. Die versorgingsfunksie [$A = g_{CO2}(C_a - C_i)$] wat ooreenstem met die verbruiksfunksie [$A = CE\ (C_a - C_i)$], is getrek deur bloot die waarde van $C_i = C_a$ = 360 **µmol. 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 (± 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 nmol.mol^{-1} O_3, onderskeidelik. Simbole: A_{360} = CO_2-assimilasietempo by C_o = 360 µmol.mol^{-1}; $C_{i\ 360}$ = intersellulêre CO_2-konsentrasie by C_o = 360 µmol.mol^{-1} CO_2; A_0 = CO_2-assimilasietempo by C_i = 360 µmol.mol^{-1}; $g_{CO2,360}$ = stomatale geleiding by C_o = 360 µmol.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_3R	FS	O_3R
E (mmol.m^{-2}.s^{-1})	5.3 (1.12)	4.66 (0.48)	4.90 (0.86)	3.70 (0.63)
A_{360} (µmol.m^{-2}.s^{-1})	11.45 (1.2)	11.2 (1.2)	13.76 (1.38)	4.92 (1.27**)
$C_{i,\ 360}$ (µmol.mol^{-1})	295.75 (19.34)	270.0 (18.24)	256.16 (18.48)	292.2 (26.61)
A_0 (µmol.m^{-2}.s^{-1})	14.87 (1.24)	14.98 (0.76)	16.07 (0.94)	5.97 (0.85**)
g_{CO2} (µmol.m^{-2}.s^{-1})	259 (80.97)	203.25 (25.96)	274.66 (14.71)	165.2 (50.45*)
CE (mol.m^{-2}.s^{-1})	0.056 (0.002)	0.056 (0.002)	0.061 (0.003)	0.014 (0.003**)
J_{max} (µmol.m^{-2}.s^{-1})	20.25 (0.56)	20.17 (0.31)	20.95 (1.27)	7.87 (1.51**)
Γ (µmol.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 (µmol. 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 O_3S plante het met 63 % (p<0.01) afgeneem, terwyl die ooreenstemmende geringe afname van 3 % (p ≥ 0.01) in O_3R plante aandui dat O_3 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 O_3S, kan toegeskryf word aan die groot afname in die CO_2-versadigde fotosintesetempo (J_{max}), wat aandui dat O_3 die regeneringsvermoë van RuBP benadeel het. J_{max} in O_3S het in der daad met 61% (p<0.01) afgeneem. Hierdie bevinding stem ooreen met die verduideliking van Von Caemmerer & Farquhar (1984) dat 'RuBP-regeneringsvermoë' 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 O_3R opvallend onaangetas wat oortuigend demonstreer dat *R123* goed beskerm is teen O_3-skade.

Die karboksileringsdoeltreffendheid (*CE*, aanvangshelling van die *A*: *Ci*-kromme by $C_i \leq 200$ µmol.mol^{-1}) van O_3S het hoogs betekenisvol met 75% afgeneem (Tabel 2). Die *CE* druk die CO_2-assimileringstempo 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 [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 O_3R plante het presies dieselfde *CE* vertoon (**Figure 4** and **Table 2**), wat aandui dat O_3 geen invloed op die karboksileringsdoeltreffenheid 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 O_3S. Dit stem ooreen met die standpunt van Farage et al. (1991), wat koring aan akute enkeldosisse O_3 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.

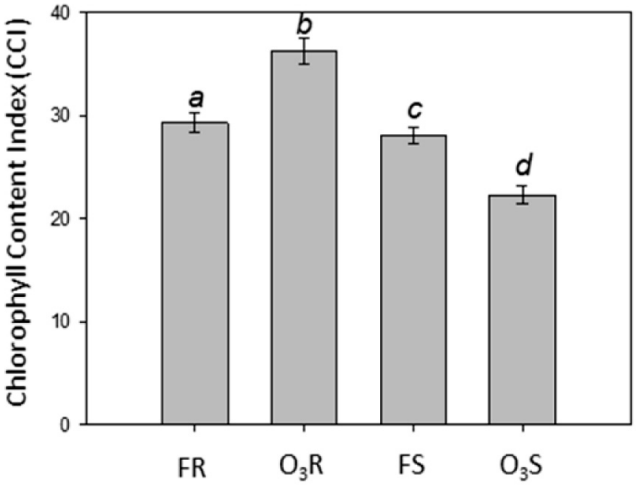
Ons data aangaande die groot verskil in gevoeligheid tussen *R123* en *S156* stem ooreen met die bevinding van Flowers et al. (2007) dat *R123* vir O_3-skade kompenseer met beheerde stimulering van Rubisco-aktiwiteit, deur die aktiveringstatus en/of *de novo* sintese daarvan te verhoog. Ons gaswisselingsdata ondersteun die bevinding van Izuta et al. (1996), wat met beukesaailinge getoon het dat verhoogde O_3, beide *CE* en J_{max} verlaag. O_3-geïnduseerde afname in Rubisco-aktiwiteit van sensitiewe plante is ook deur Pell et al. (1997) geraporteer.

Die 14% toename in $C_{i\ 360}$ in O_3S (**Tabel 2, Figuur 4**) teenoor die 9% toename in O_3R, bevestig nogeens dat die groot afname in A_{360} in O_3S te wyte was aan mesofilbeperking eerder as aan stomatale beperking. Hierdie bevinding word verder ondersteun deur die 90% toename in die kompensasiekonsentrasie (Γ) en die 77% afname in *CE* in O_3S, teenoor geen afname in O_3R. Die versorgingsfunksie (g_{CO2}) in O_3S het met 38% (p<0.05) afgeneem. Die versorgingsfunksie druk die CO_2-assimileringstempo uit as 'n funksie van die verskil tussen C_a en C_i (dryfkrag vir die inwaartse CO_2-beweging) en die heersende g_{CO2}. Volgens Farquhar & Sharkey (1982), is die afname in g_{CO2} egter selde die hoofoorsaak van verlaagde assimileringstempo. Die matige 21% toename in *l* bereken vir O_3S, bevestig dat hoewel stomabeperking 'n rol gespeel het, die afname in *A* hoofsaaklik aan mesofilbeperking gewyt moet word. Hierteenoor het O_3R '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 O_3S het met 25% gedaal tennoor 'n daling van 13% in O_3R (**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 [O3] verminder en dat *WUE* met 50% afgeneem het weens O_3-geïnduseerde verlaging van die vermoë om water op te neem. Eweneens raporteer 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 verlaging van 10% in die digdheid 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 boontjievariëteite weerstand bied teen chlorofilverlies met behulp van antioksidante soos askorbaat en nie-proteïen sulfhidriel. 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 koolstofgefiltreerde (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 blootstellin, onderskeidelik, wat die bestande (*R123*) genotipe vertoon het. Paralelle meting van chlorofil *a*-fluoressensie 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 plasmaproteïenfunksi, 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*-fluoressensiekrommes 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 verskilkinetika 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 fluoressensiekrommes 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 gegenereer 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 O_3-geïnduseerde versteuring van die interaksie tussen die Calvin-Benson siklus in die stroma en die ET-ketting in die tilakoïde. Die O_3-gevoeligheid van RuBP-regenerering in *S156* is origens '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, gebsseer 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 CO_2-assimilering (*A*, J_{max}, *CE*) wat die daaropvolgende dag gemeet is in die O_3S-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 O_3-bestandheid van *R123* oortuigend bevestig. Die uiterste gevoeligheid vertoon deur *S15*, ondersteun die moontlike geskiktheid daarvan as bio-indikatorspesie vir O_3-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.

Betzelberger, 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.

Betzelberger, 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, 'Ca^{2+} 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., Oliviera, 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 CO_2 assimilation in leaves of C_3 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., Wullschlegger, 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.

Heggestad, H.E., 1991, 'Origen 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., Umemoto, 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 CO_2 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 CO_2 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 Schneidemesser, 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-Flanagen, 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., Schlagnhaufer, 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 (SO_2, O_3, NO_2) 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 persistant degradation product of fluorinated hydrocarbons, on C_3 and C_4 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, Dortrecht, 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 *Piriformaspora 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 CO_2 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 $p(CO_2)$ 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.