

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра „Медицинска физика, биофизика, рентгенология и
радиология“

Антония Стефанова Петрова

**АКВАФОТОМИКА – НОВ ПОДХОД ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА
ПРОМЕНТЕ В СТРУКТУРАТА НА ВОДАТА,
ИНДУЦИРАНИ ПРИ СТРЕС В РАСТЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„доктор“ по научна специалност „Биофизика“ научно направление
4.3. Биологически науки:

Научен ръководител:
Проф. д-р Стефка Любова Атанасова
Доц. д-р. Бояна Кънчева Първанова

Стара Загора, 2026

Дисертационният труд е написан на 124 страници. Резултатите са представени в 37 фигури и 12 таблици. Списъкът на цитираните литературни източници съдържа 215 заглавия, от които 8 на кирилица и 207 на латиница.

Изказвам сърдечната си признателност и благодарност на научния ми ръководител проф. Стефка Атанасова за подкрепата, помощта, споделения опит и търпението при цялостната подготовка на дисертационния труд.

Благодаря на всички колеги от катедрата по медицинска физика и биофизика, рентгенология и радиология към медицински факултет и катедра „Аграрно инженерство“ към аграрен факултет, които пряко или косвено помагала и съдействаха за осъществяването на дисертационния труд.

Не на последно място изказвам сърдечни благодарности на моето семейство за огромното търпение, помощ и подкрепа.

Дисертацията е обсъдена на 13 февруари 2026 г. и предложена за публична защита на заседание на разширен съвет на катедра „Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология“, Медицински факултет при Тракийски университет - Стара Загора.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 2026 г. от часа в академичната зала на Медицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора. Материалите във връзка със защитата са на разположение в Научен отдел на Медицински факултет и на сайта на Тракийски университет: <http://www.trakia-uni.bg>.

Съдържание

Използвани съкращения:	6
1. Въведение	7
2. Цели и задачи	8
3. Материали и методи	8
3.1. Изследвани растения	8
3.2. Режим на отглеждане на опитните растения	99
3.3. Физиологични измервания	10
3.3.1. Определяне на относително водно съдържание на листа на царевични растения	10
3.3.2. Измерване на височината на царевичните растения	10
3.3.3. Измерване на вегетативен индекс при царевични растения	10
3.3.4. Определяне на изтичане на електролити при краставични растения	10
3.3.5. Измерване на скорост на фотосинтеза при краставични растения	11
3.4. Спектрални измервания в близката инфрачервена област	11
3.5. Методи за обработка на получените спектрални характеристики на растенията	12
3.5.1. Първоначална обработка на резултатите от спектралните измервания	12
3.6. Радарни диаграми за представяне на абсорбционните линии на водата - Акваграми	12
3.7. Определяне на дните на стрес	14
3.8. Модели за класификация на опитните растения	14
3.9. Статистически анализ	15
4. Резултати и обсъждане	15
4.1. Изследване на стрес от засушаване при царевични растения	15
4.1.1. Физиологични промени в царевичните растения по време на засушаване	15

4.1.2. Спектри в близката инфрачервена област на листа от контролни, стресирани и подложени на възстановяване царевични растения	17
4.1.3. Спектри в близката инфрачервена област на листа на царевични растения, в процес на водно-дефицитен стрес ..	1818
4.1.4. Анализи по метода на Аквафотомиката	199
4.1.5. Модели за определяне на дните на засушаване на царевични растения	23
4.1.6. Модели за класификация на царевични растения.....	24
4.2. Опити с краставични растения	26
4.2.1. Физиологични промени в краставичните растения при подлагане на ниски температури.....	26
4.2.2. Спектрални измервания в близката инфрачервена област на листата на краставичните растения, подложени на нискотемпературен стрес	2929
4.2.3. Анализи по метода на Аквафотомиката	32
4.2.4. Модели за определяне на дните на нискотемпературен стрес на краставични растения	3636
4.2.5. Модели за класификация на краставични растения.....	38
4.3. Опити с домати растения	399
4.3.1. Спектрални измервания в близката инфрачервена област на листата на домати растения в процес на стрес	399
4.3.2. Анализи по метода на Аквафотомиката	40
4.3.3. Модели за класификация на домати растения.....	42
5. Изводи.....	44
6. Научни приноси	46
7. Препоръки за практиката	47
8. Публикации свързани с дисертационния труд	47
9. Участия в научни форуми	47
10. Проекти, свързани с настоящето изследване	48
SUMMARY	48

Използвани съкращения:

ANOVA (Analysis of Variance) – Дисперсионен анализ

LDA (Linear Discriminant Analysis) – Линеен дискриминантен анализ

MSC (Multiplicative Scatter Correction) – Множествена корекция на разсейването

NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) – Вегетативен индекс

NIR (Near Infra-Red) – Близка инфрачервена област на спектъра

NIRS (Near-Infrared Spectroscopy) – Спектроскопия в близката инфрачервена област

P – стойност (probability – value) – Вероятност – стойност

PCA (Principal Component Analysis) – Анализ на главните компоненти

PLS (Partial Least Squares) – Метод на частично най-малките квадрати

R – Коефициент на корелация

R² – Коефициент на детерминация

RMSE (Root Mean Square Error) – Средноквадратична грешка

RMSD (Root Mean Square Deviation) – Средноквадратично отклонение

RPD (Ratio of Performance to Deviation) – Коефициент на прогнозна способност

SECV (Standard Error of Cross-Validation) – Стандартна грешка при кръстосана проверка

SEE (Standard Error of Estimation) – Стандартна грешка на оценката

SD (Standard Deviation) – Стандартно отклонение

SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) – Гъвкаво независимо моделиране на класови аналогии

SNV (Standard Normal Variate) – Метод за корекция на спектралните измервания

WAMACs (water matrix coordinates) – Координати на абсорбция на водната матрица

WASP (Water Absorption Spectral Pattern) – Спектрален модел на абсорбция на вода

1. Въведение

Стремежът при отглеждане на растенията е да се постигне оптимална продуктивност с високо качество. Продуктивността и състоянието на растенията пряко зависят от факторите на околната среда, част от които са засушаване, ниски температури и наличие на хранителни вещества в почвата. Изследването на механизмите на растенията за справяне с различни видове абиотичен стрес, ще помогне за създаване на по-устойчиви сортове и успешни начини на отглеждане. Въпреки значителния напредък на науката в тази област остават много нерешени въпроси.

Изследване на спектри в близката инфрачервена област (NIRS), получени от стресирани растения, може да допринесе за разбирането на биофизичните и биохимичните процеси в тях. Спектроскопията в близката инфрачервен област е бърз, директен, недеструктивен и евтин метод за изследване на живи организми. Докато за традиционните изследователски методи са необходими квалифициран персонал, скъпо оборудване, поддръжка, време, химикали за обработка на пробите, с този метод се спестяват време, ресурси, замърсявания. Ранното откриване на стреса на растенията е важно за прилагане на ефективни стратегии и предотвратяване на загуби в селското стопанство.

Аквафотомиката е нов подход за изследване, при който се използва спектроскопията в близката инфрачервена област за извличане на повече информация за състоянието на обектите, съдържащи голямо количество вода, в нашия случай – растенията. Този подход дава многобройни възможности за приложение в различни области на науката и практиката.

В настоящата дисертация са представени резултати от изследвания на промените, предизвикани от абиотични фактори, като воден дефицит, намалено азотно торене и нискотемпературен стрес при някои сортове царевица, краставици и домати. Тези резултати имат теоретично значение и са свързани с изследване на промените на състоянието на водата в опитните растения. Те могат да се използват и за определяне на устойчивостта на растения на въздействието на различни стресови фактори.

2. Цели и задачи

Целта на направените изследвания е да се проучат възможностите на Аквафотомиката за изследване на промените в краставични растения, подлагани на нискотемпературен стрес, в царевични растения, под действие на стрес от засушаване, както и в оранжерийни домати, подложени на азотен и воден дефицит.

За реализиране на поставените цели са обособени следните задачи:

1. Изследване на промените, предизвикани от воден дефицит, в две инбредни линии царевични растения.
2. Изследване влиянието на нискотемпературен стрес върху два сорта краставични растения.
3. Изследване на промените, предизвикани от воднодефицитен и азотен стрес в домати растения.
4. Анализ на получените спектрални характеристики на растенията в близката инфрачервена област.
5. Пресмятане, графично представяне и анализ на Акваграми.
6. Създаване на прогнозни модели за определяне дни на стрес.
7. Създаване на модели за класификации в зависимост от стресовите фактори.

3. Материали и методи

3.1. Изследвани растения

За изследвания са подбрани едни от най-широко използваните култури като домати, краставици и царевица. В опитите растенията са подложени на специфични за вида абиотични стресови фактори, които влияят най-силно на тяхното състояние.

Проведени са три основни опита за изследване на стрес при:

- две линии царевични растения: *B37* и *XM 87-136* - разработен чрез химическо третиране на сухи семена от *B37*, за получаване на висока сухоустойчивост;
- два сорта краставични растения: българският Гергана и холандският *Voreas F1* (Enza Zaden);

- два сорта домати растения: Ред Баунти (*Red Bounty*) и Мануса, (*Manusa*).

3.2. Режим на отглеждане на опитните растения

Царевичните и краставичните растения се отглеждат в цветни саксии с почва, с диаметър 10 cm в камера за контролиран растеж (MLR 351, SANYO, Япония) от Агробиоинститута (АБИ) към Селскостопанската академия София (Moyankova et al., 2023). Поддържа се необходимата влажност на почвата, температура на въздуха 28/25°C (дневна/нощна), относителна влажност на въздуха 50 ± 5 % и фотонна плътност на светлинния поток 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ за 16 часа.

Стресът от засушаване е предизвикан върху десет царевични растения на етап трети лист чрез спиране на поливането за 17 дни, последвано от повторно поливане за четири дни. Други десет растения са поддържани в нормален воден режим през целия период и служат за контролни (Moyankova, et al., 2023).

Краставичните растения от сортовете *Гергана* и *Вореас F1*, с развит и вече формиран втори същински лист, се подлагат на ниска температура от 8°C за период от седем дни. След този период се възстановяват нормалните условия на отглеждане за три дни при температура 25°C, като се осигурява редовно поливане. Контролните растения се отглеждат при температура от 28°C през деня и 25°C през нощта. Отново по десет растения от всеки сорт краставици се подлагат на стрес от ниски температури, докато други десет растения се използват като контролни.

Доматените растения са засадени по схема 80 × 30 cm в неотопляема полиетиленова оранжерия с вентилация в учебно-опитни полета на Тракийски университет, Стара Загора, България. Растенията от всеки сорт са разделени на три групи по двадесет:

- 1гр. – контролни, отглеждани при оптимални агротехнически условия, по 8 kg/h амониев нитрат на всеки 10 дни преди и по време на плододаването и с 2-3 поливания седмично, в зависимост от температурата и състоянието им;
- 2гр. – получават 67% от азотните торове на контролните растения и редовно поливане;
- 3гр. – с една трета намалено поливане и нормално наторяване.

3.3. Физиологични измервания

3.3.1. Определяне на относително водно съдържание на листа на царевични растения

Относителното водно съдържание (Relative Water Content) RWC на трети лист по време на стрес и след опит за възстановяване се изчислява с помощта на следната формула:

$$RWC = \frac{FW-DW}{FTW-DW} * 100, \% \quad (1)$$

където: - FW (fresh weight) е теглото на свежата маса на листа;

- FTW (fresh turgor weight) е теглото на прясната тургорна маса, измерено след потапяне на листа в дестилирана вода, за 24 часа, при стайна температура;

- DW (dry weight) е теглото на сухата маса, измерено гравиметрично след сушене при 80°C, в лабораторна пещ, за 48 часа.

3.3.2. Измерване на височината на царевичните растения

Височината на царевичните растения е измервана през целия период на стрес от засушаване и при опита за възстановяване, като разстояние от повърхността на почвата до най-дългия лист на растението (в см/растение).

3.3.3. Измерване на вегетативен индекс при царевични растения

NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) се изчислява на базата на отражението в червения диапазон на видимата област (VIS) и в близката инфрачервена област (NIR):

$$NDVI = \frac{(NIR-Red)}{(NIR+Red)} \quad (2)$$

Измерванията на вегетативния индекс (NDVI) са извършени на трети лист на царевичните растения на 3^{-ия}, 7^{-ия}, 10^{-ия}, 12^{-ия}, 14^{-ия} и 17^{-ия} ден от засушаването и след опита за възстановяване. Използван е портативен фотометър PlantPen NDVI 300 (Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic, в два диапазона: във видимата (625 nm - 645 nm) и близката инфрачервена област (750 nm - 760 nm).

3.3.4. Определяне на изтичане на електролити при краставични растения

Стойността на EL (Electrolyte leakage) се пресмята със следния израз:

$$EL = (\sigma_1/ \sigma_2) \times 100 [\%] \quad (3)$$

където: σ_1 е измерената електрическа проводимост след 24 часа престой при стайна температура на разтвор, получен от 4 диска с диаметър 10 mm, (изрязани от първия напълно развит лист на всяко растение), потопени в 5 ml дейонизирана вода; σ_2 е измерената електрическа проводимост след третиране на пробата в автоклав и охлаждане.

Пробите са вземани на 3-ия, 5-ия и 7-ия ден по време на нискотемпературния стрес от 5 стресирани и 5 контролни краставични растения с кондуктометър Mettler Toledo MC 22C.

3.3.5. Измерване на скорост на фотосинтеза при краставични растения

Нетната скорост на фотосинтеза (P_n) на краставичните растения е определена чрез измерване на скоростта, с която известна листна площ усвоява CO_2 във времето. Записани са и данните за скоростта на транспирация (E) и устичната проводимост (C). Измерванията са направени на 0-ия, 3-ия, 5-ия и 7-ия ден върху пет стресирани и пет контролни растения, повторени пет пъти. Параметрите на газообмен на листата са измерени през деня между 10 часа и 13 часа на първия напълно развит лист с инфрачервен газов анализатор, модел CI-340 Handheld Photosynthesis System (CID BIO Science, Camas, WA, USA).

3.4. Спектрални измервания в близката инфрачервена област

Измерванията на царевични и краставични растения са извършени с преносим, ръчен спектрофотометър MicroNIR OnSite-W (VIAMI Solutions Inc., Чандлър, Аризона, САЩ) в режим на дифузно отражение в диапазона 908–1670 nm с разделителна способност 7 nm:

- царевични растения - на 3-ия, 7-ия, 10-ия, 12-ия, 14-ия и 17-ия ден след началото на засушаването и на третия и четвъртия ден след възобновеното поливане;

- краставични растения - котиледоните, първи и втори същински лист на всяко растение, всеки ден и след опита за възстановяване.

Измерени са тридесет различни листа от всяка група домати растения и сорт, веднага след откъсването им в оранжерията, в режим на дифузно отражение в диапазона от 900 до 1650 nm с AlbaNIR, GrainNit, SrL, Падуа, Италия.

Всеки лист от всяко растение се измерва в три различни точки на горната повърхност. За избягване на външни влияния и гарантиране на еднакви условия на измерване, под всеки лист, на всяко измерване се поставя черна подложка с дебелина 5 mm.

3.5. Методи за обработка на получените спектрални характеристики на растенията

Получените спектрални измервания в настоящето изследване са обработени с помощта на специализиран софтуер Pirouette 4.5 (Infometrix, Inc., Bothell, WA, САЩ).

3.5.1. Първоначална обработка на резултатите от спектралните измервания

На получените спектрални данни е извършена предварителна обработка с прилагане на втора производна, базирана на полиномен филтър на Савицки–Голай (Savitzky–Golay). Така трансформираните данни се използват и при създаване на моделите за определяне на дните на стрес и моделите за класификация на контролни и стресирани растения. За коригиране на ефектите от разсейване на лъчението и други нелинейни оптични ефекти, получените спектри са трансформирани чрез множествена корекция на разсейването (MSC - Multiplicative Scatter Correction).

3.6. Радарни диаграми за представяне на абсорбционните линии на водата - Акваграми

За по-детайлно изследване на промените в състоянието на водата в растенията, предизвикани от стресовите фактори, се изчисляват и построяват т.нар. акваграми. Акваграмите са графични изображения, построени като радарни диаграми с оси съответстващи на спектралните координати на абсорбция на водата (WAMACs).

В Таблица 1 са представени основните дължини на вълните (или спектралните диапазони), в които се проявява специфичната абсорбция от свободна и свързана вода, в различните й структури, установени от екипите на Ценкова (Tsenkova, 2009) и за краткост наречени спектрални координати на водата. Този списък продължава да се допълва в течение на научните изследвания.

Таблица 1. Специфични дължини на вълните (спектрални координати) на абсорбция на водата в близката инфрачервена област (1300 до 1600 nm), (Tsenkova, 2009)

Спектрални координати на водата WAMACs	Обхват (nm)	Поглъщаща структура
C1	1336 – 1348	H ₂ O асиметрични валентни трептения
C2	1360 – 1366	ОН-(H ₂ O) _{1,2,4} : Водна солватна обвивка
C3	1370 – 1376	комбинация от симетрични и асиметрични ОН – валентни трептения на H ² O
C4	1380 – 1388	ОН-(H ₂ O) _{1,4} : Водна солватна обвивка O ₂ -(H ₂ O) ₄ : Хидратирани супероксидни кълъстери H ₂ O симетрични валентни трептения
C5	1398 – 1418	Вода, затворена в локално поле от йони (уловена вода), S ₀ : Свободна вода, Вода със свободни ОН-
C6	1421 – 1430	Водна солватна обвивка, Н-ОН деформационни трептения
C7	1432 – 1444	S ₁ : Водни молекули с 1 водородна връзка
C8	1448 – 1454	ОН-(H ₂ O) _{4,5} : Водна солватна обвивка
C9	1458 – 1468	S ₂ : Водни молекули с 2 водородни връзки H ₂ O деформационни и асиметрични валентни трептения
C10	1472 – 1482	S ₃ : Водни молекули с 3 водородни връзки
C11	1482 – 1495	S ₄ : Водни молекули с 4 водородни връзки

Стойностите на нормализираните абсорбции се пресмятат по следната формула:

$$A'_\lambda = \frac{A_\lambda - \mu_\lambda}{\sigma_\lambda} \quad (4)$$

където A'_λ - е нормализираната абсорбция, A_λ - абсорбция след корекция на разсейването, μ_λ – средна стойност на всички спектри за изследваната група проби за дадена дължина на

вълната, σ_λ – стандартно отклонение на всички спектри за изследваната група проби за дадена дължина на вълната, λ – избрана дължина на вълната.

3.7. Определяне на дните на стрес

За определяне на дните на стрес е използван методът регресия на частично най-малките квадрати - PLS (Partial Least Squares). При този метод се пресмятат нови фактори, които описват едновременно вариациите в спектралните и количествените данни. Първият фактор описва максимален процент от тези вариации. Вторият - максимален процент от неописаните вариации и т.н. По този начин с няколко PLS фактора можем да опишем вариациите в данните. Тези нови фактори влизат в регресионно уравнение за количествено определяне на търсения параметър. За оценка на точността на получените уравнения се използват параметрите:

- SECV (Standart Error of Cross - Validation) - оценка на прогнозната способност на модела чрез крос-валидация.

- Rcv (Cross-validated correlation coefficient) - измерва връзката между предсказани и експериментални стойности - мярка за зависимостта на спектралните характеристики и дните на стрес.

- SEC (Standard Error of Calibration) - оценка точността при калибрирането

- Rcal - дава връзката между предсказаните и експерименталните стойности при калибриране на модела

3.8. Модели за класификация на опитните растения

Създадени са SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy - SIMCA) модели за класификация на контролни, стресирани и възстановени растения. При този метод се изискват предварителни данни за категориите, към които принадлежат пробите и предоставя възможност за много точно разделяне на наблюденията със сходни параметри. Създават се независими модели за всяка категория (клас) на базата на главните компоненти, които описват спектралните характеристики на пробите от даден клас. Основава се на принципа на подобие, при който се предполага, че подобните проби се намират в една и съща част от признаковото пространство, дефинирано от

измерваните параметри. Ефективността на моделите се определя от параметрите:

$$\text{Прецизност} = \frac{TP}{TP + FP} \quad (5)$$

$$\text{Чувствителност} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (6)$$

$$F1 = \frac{2 \times \text{Sens} \times \text{Prec}}{\text{Sens} + \text{Prec}} \quad (7)$$

$$\text{Обща точност} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}, \quad (8)$$

където: TN (true negative) е броят на истински отрицателните резултати, FP (false positive) е броят на фалшиво положителните резултати, FN (false negative) е броят на фалшиво отрицателните резултати и TP (true positive) е броят на истинските положителни резултати. Тези параметри са умножени по 100, за да се изразят в проценти.

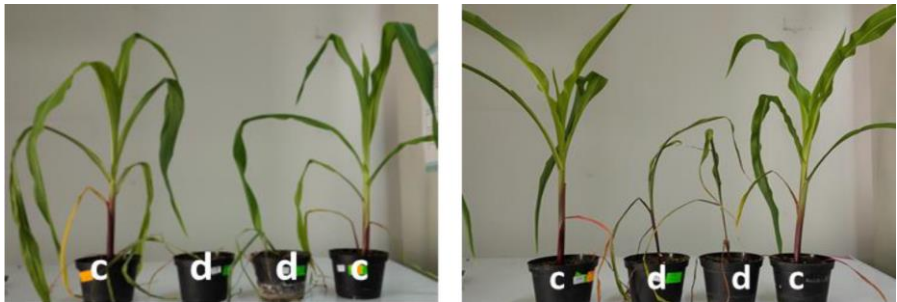
3.9. Статистически анализ

За извършване на статистическите анализи е използван софтуер IBM SPSS Statistics версия 26.0.

4. Резултати и обсъждане

4.1. Изследване на стрес от засушаване при царевични растения

4.1.1. Физиологични промени в царевичните растения по време на засушаване

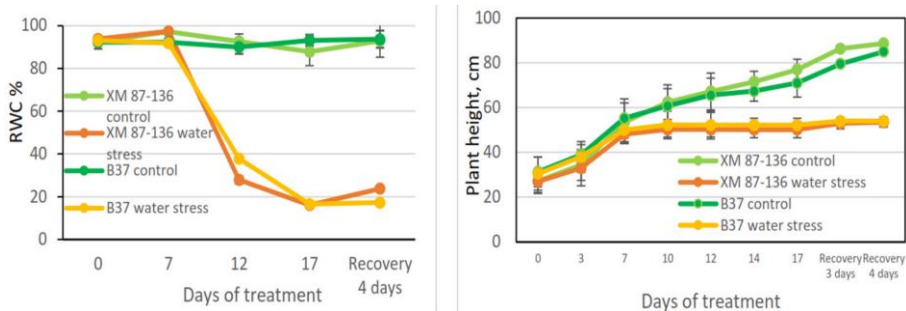


а) V37 - ден 17

б) XM 87-136 - ден 17

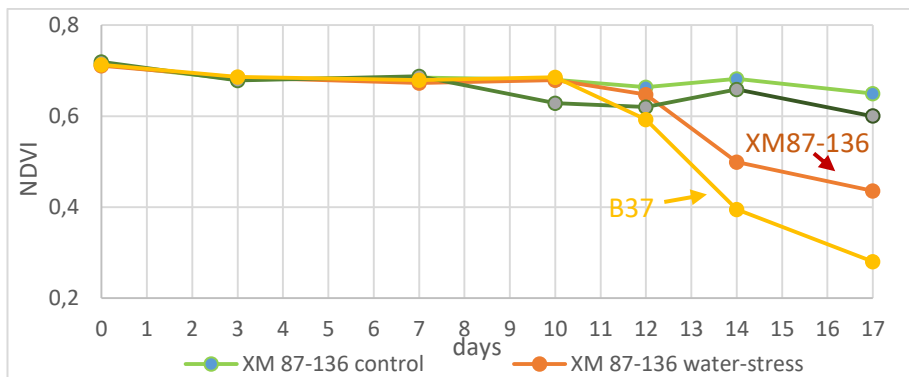
Фигура 1. Фенотипни реакции на царевичните растения, линии V37 и XM 87-136 на 17-^я ден на стреса от засушаване. „c“ - контролни растения, d-царевични растения на 17-^я ден на стрес от засушаване, (Moyankova, et al., 2023)

Общият растеж на царевицата по време на засушаването показва сходен модел и за двата анализирани генотипа, след 7-мия ден от стресово третиране, растежът спира в сравнение с контролните групи (Фигура 1 и Фигура 2b).



Фигура 2. Промени в относителното водно съдържание в листата (a) и растежа (b) на царевичните растения. Данните са представени като средни стойности \pm стандартно отклонение (Moyankova et al., 2023)

След 7-мия ден от засушаването, процентът на относителното водно съдържание намалява, достигайки 16 % на 17-тия ден (Фигура 2a). Листата на растенията не успяват да се възстановят дори след повторно напояване 4 дни по-късно. Все пак растенията от линия XM 87-136 се възстановяват по-добре от линия B37.

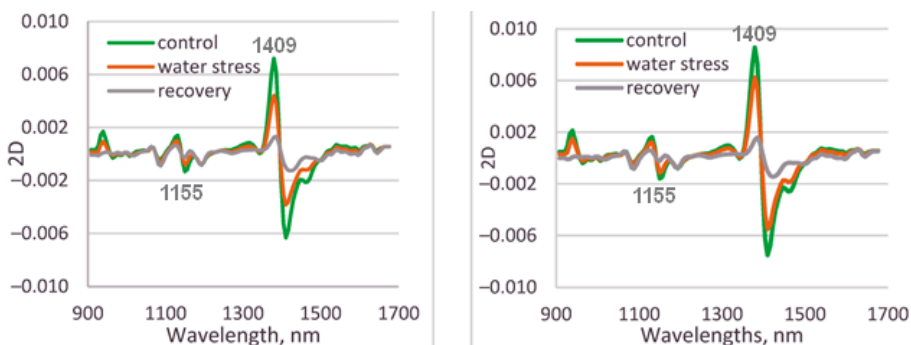


Фигура 3. Промени във вегетативния индекс на царевичните растения от линии B37 и XM 87-136 по време на засушаване

Стойностите на вегетативния индекс са приблизително еднакви и за двете линии до 7-мия ден (Фигура 3). Следват малки промени между 10-ия и 12-ия ден и настъпва рязко намаляване за стресираните растения, много по-голямо за растенията от линия В37 в сравнение със стойностите за линия ХМ 87–136 (Фигура 3 и Фигура 2b).

4.1.2. Спектри в близката инфрачервена област на листа от контролни, стресирани и подложени на възстановяване царевични растения

Установени са значими разлики между спектрите на трите групи растения - контролни, подложени на воден дефицит и след опита за възстановяване (Фигура 4).



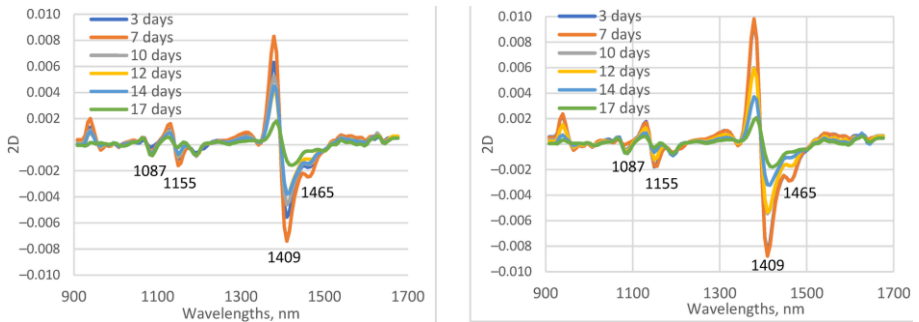
а) линия В37

б) линия ХМ 87-136

Фигура. 4. Осреднени втори производни на спектри на контролни, стресирани растения и след опит за възстановяване, трети лист

При еднакъв мащаб се виждат разликите между спектрите на растенията от двете линии. Трансформация на спектрите като втора производна е използвана да се покажат абсорбционните максимуми. Максимумът при 1409 nm е най-интензивен за контролните растения, по-малък за стресираните и на-малък при опита за възстановяване. Той свързан с абсорбция на свободна вода в растенията. Абсорбцията при 1155 nm, свързана с наличие на вода - комбинация от О-Н валентни и О-Н деформационни трептения също е по-интензивна за контролните растения. При всички изследвани царевични листа от линията ХМ 87-136 абсорбцията в диапазони, свързани със съдържанието на вода е по-голяма в сравнение с тези от линия В37.

4.1.3. Спектри в близката инфрачервена област на листа на царевични растения, в процес на водно-дефицитен стрес



а) линия V37

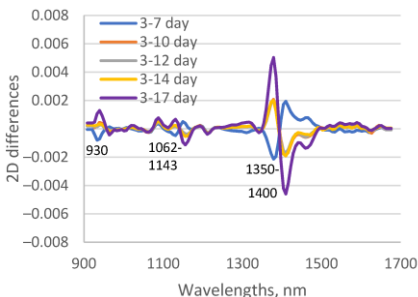
б) линия XM 87-136

Фигура 5. Осреднени втори производни на спектри на стресирани растения, измерени от 3^{ти} до 17^{ти} ден на засушаване

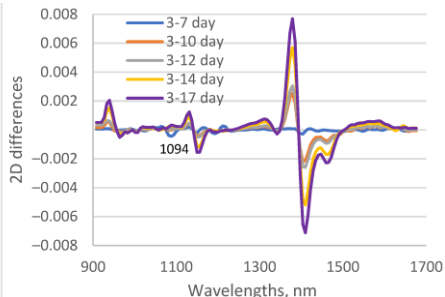
Осредните стойности на трансформираните като втора производна спектри на листата само на стресираните растения, измерени за периода от 3-ти до 17-ти ден на засушаване показват значими разлики между растенията от двете царевични линии (Фигура 5). Абсорбцията около 1155 и 1409 nm намалява с увеличаване на дните на стрес, което е свързано с намаляването на свободни водни молекули в резултат на засушаването.

За по-детайлно изследване на промените в спектрите в процеса на засушаване на растенията, са пресметнати разликите между стойностите, измерени на 3^{-тия} ден и всеки от следващите дни на засушаване (Фигура 6). Процесите в растенията, подложени на воден дефицит се развиват по различен начин за двете изследвани линии царевица. Разликите за растенията от линия V37 при 930 nm, 1062÷1143 nm и 1350÷1400 nm между 3^{-ия} и 7^{-ия} ден от засушаване – отразяват по-значимо загуба на влага - още в началото на стресиране.

До седмия ден на подложените на засушаване растения все още не се наблюдават промени във физиологичните данни - относителното водно съдържание и височина на растенията (Фигура 2), но има промени в спектралните характеристики, измерени за растения от линия V37.



a) линия V37



b) линия XM 87-136

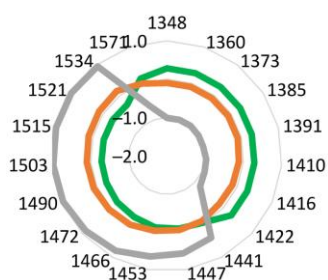
Фигура 6. Разликите между втори производни на спектри на третия лист, измерени на 3-тия ден и всеки от следващите дни на засушаване

Следователно промените в спектралните характеристики предшестваат видимите промени на растенията.

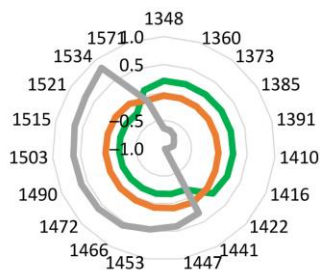
4.1.4. Анализи по метода на Аквафотомиката

В това изследване са използвани 19 дължини на вълните, за които е установено, че са от значение за функционирането на биологичните водни системи (Vitalis et al., 2023). Сравнението на водните спектрални модели на контролите, засушените и възстановяваните растения показват разликите в състоянието на растенията на двете царевични линии. Стойностите на коефициентите на акваграмите в диапазона от дължини на вълните между 1360 nm и 1422 nm (това са C2, C3, C4, C5 от WAMACs координатите) за контролните растения при всички случаи са по-високи в сравнение с тези на растенията, които са подложени на воден дефицит (Фигура 7). Абсорбцията при 1410 и 1416 nm е свързана с наличието на свободна вода и указва загуба на вода в листата, които са в процес на воден дефицит. Между 1441 nm и 1533 nm забелязваме обратна тенденция - стойностите за растенията с воден дефицит са по-високи от тези на контролните растения. Абсорбцията на вода в този диапазон указва за силно молекулярно свързана вода, като например молекули с 2 водородни връзки при 1466 nm, 3 водородни връзки при 1478 nm и 4 водородни връзки при 1490 nm.

Други WAMACS дължини на вълните в тази област са свързани с взаимодействието на протеин-вода при 1466 nm и взаимодействието вода-целулоза при 1503, 1521 и 1534 nm (Muncan et al., 2022; Vitalis et al., 2023).



линия В37



линия XM 87-136

Фигура 7. Акваграми на втори лист от трите групи царевични растения, контролни в **зелено**, засушени – в **оранжево** и след опит за възстановяване в **сиво**

Акваграмите на листата по време на възстановяване се различават значително от тези на контролните или растенията във воден дефицит, показвайки загуба на течна вода и наличие на силно свързана вода при дължини на вълните над 1500 nm. Останалата вода в тези листа е предимно свързана с целулозните компоненти в тъканите на листата.

Резултатите от статистическия анализ потвърждават статистически значимите разлики в коефициентите на акваграмите и от там в процесите, предизвикани от водния дефицит между проучваните линии царевица. По-силно статистически значими разлики с голяма степен на достоверност се получават между акваграмните коефициенти за линията В37 в сравнение с устойчивата на засушаване линия XM 87-136. Най-статистически достоверни разлики има в областта на 1348 – 1410 nm и 1466 – 1534 nm. Резултатите са сходни за всички измерени листа.

Таблица 2. Резултати от статистически анализ на акваграми за 2-ри лист на царевични растения

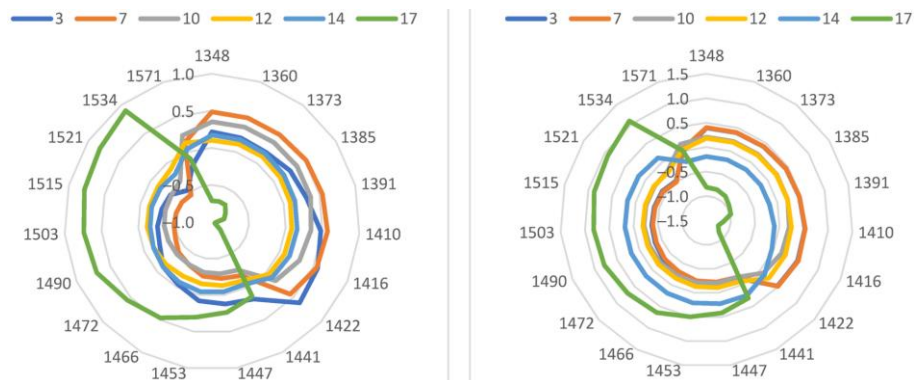
Дължина на вълната	В37, 2 лист				XM 87-136, 2 лист			
	Конт-ролни	Засу-шени	Възста-новявани	R ²	Конт-ролни	Засу-шени	Възста-новявани	R ²
1348	a	a		0,165	a	a		0,164
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1360	a	a		0,162	a	a		0,167

	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1373	a	a		0,160	a	a		0,176
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1385	a	a		0,163	a	a		0,188
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1391	a	a		0,167	a	a		0,192
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1410	a	a		0,171	a	a		0,183
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1416	a	a		0,164	ns	ns		0,174
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1422	a	a		0,122	ns	ns		0,152
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1441	a	a		0,036	a	a		0,048
	b		b		b		b	
		ns	ns			ns	ns	
1447	a	a		0,049	a	a		0,071
	b		b		b		b	
		ns	ns			c	c	
1453	a	a		0,059	a	a		0,087
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1466	a	a		0,091	a	a		0,120
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1472	a	a		0,114	a	a		0,132
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1490	a	a		0,154	a	a		0,146
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1503	a	a		0,166	a	a		0,150
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1515	a	a		0,177	a	a		0,157
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1521	a	a		0,184	a	a		0,161
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	

1534	a	a		0,198	a	a		0,173
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1571	a	a		0,020	ns	ns		0,029
	ns		ns		b		b	
		ns	ns			c	c	

Едни и същи букви на един и същи ред показват значими разлики, когато $p < 0,05$; **ns** означава, че няма значими разлики. Различните цветове отразяват степента на значимост на разликите: $< 0,001$ са в **зелено**; $0,001 \div 0,01$ са в **синьо**; $0,01 \div 0,05$ са в **жълто**; незначимите (**ns**) в **сиво**.

За последващо изследване на промените на листата при воден стрес са пресметнати акваграми за различните дни на засушаване (Фигура 8). Вижда се плавно намаляване на стойностите на коефициентите на акваграмата в обхвата от 1348 до 1442 nm за растенията от сорта ХМ 87-136, които са подложени на воден дефицит. Стойностите за 3-тия и 7-мия ден, както и за 10-тия и 12-тия ден са много сходни. Ясно се забелязва също, че акваграмата, получена за листата на растенията на 17-тия ден от водния дефицит и на двете линии, е значително по-различна от тези за другите дни.



линия V37

линия ХМ 87-136

Фигура 8. Акваграми на листата на царевичните растения в различните дни на засушаване

Акваграмите за третия и седмия ден показват, че растенията от сорта V37 се различават от тези на ХМ 87-136. Този факт подчертава различията в началните стадии на засушаване

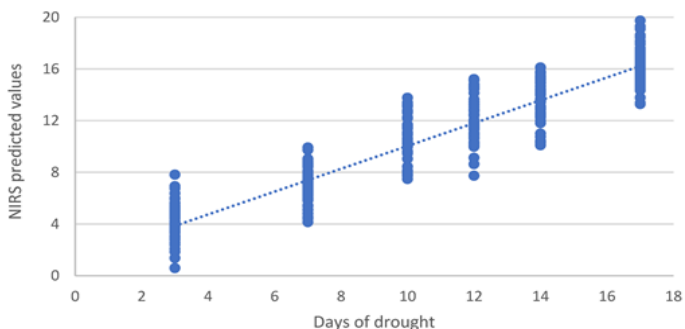
между двата сорта царевица. Особено важни са разликите в областта между 1409 и 1453 nm. Водната абсорбция при 1441 nm и 1447 nm указва за процеси на засушаване и абиотичния стрес (Kuroki et al., 2019; Cattaneo et al., 2021). Тя се използва като специфичен маркер за тези процеси.

4.1.5. Модели за определяне на дните на засушаване на царевични растения

Получени са успешни модели с висока точност за определяне на дните на засушаване по метода на частично най-малките квадрати (PLS), създадени поотделно за линиите В37 и ХМ 87-136, в диапазона 1300 - 1600 nm (Таблица 3 и Фигура 9).

Таблица 3. Статистически параметри на моделите за определяне на дни на засушаване при царевичните растения

Линия	PLS фактори	SECV	Rcv	SEC	Rcal
В37	2	1,47	0,961	1,46	0,961
ХМ 87-136	2	1,42	0,949	1,41	0,949

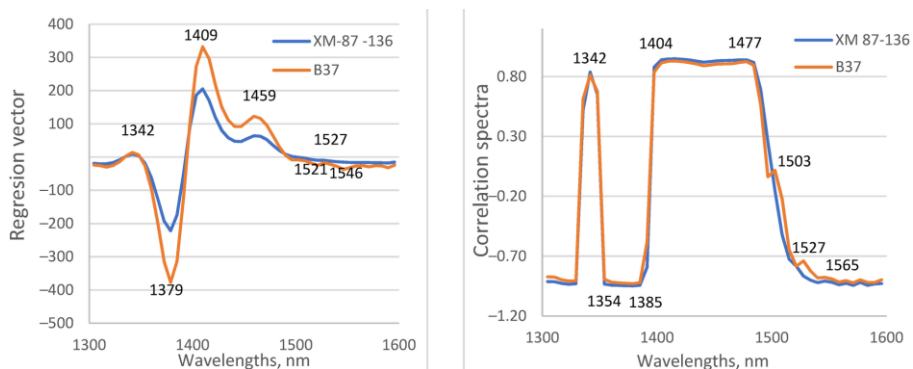


Фигура 9. Резултати от PLS модела за определяне на дните на засушаване при царевичните растения от линия ХМ 87–136

С по-малка точност се определят дните на засушаване за линия В37 (SECV = 1,47 дни) в сравнение с линията, устойчива на засушаване ХМ 87-136 (SECV = 1,42 дни). Получени са високи корелационни коефициенти за връзката между спектралните характеристики и дните на стрес.

Графиките на регресионния вектор и корелационния спектър от регресионните модели показват значението на спектралната информация, свързана с абсорбцията на вода при

определяне на дните на засушаване (Фигура 10). За двата модела за B37 и XM 87-136 са установени сходни регресионни вектори и корелационни спектри.



Фигура 10. Графична информация за значимите дължини на вълните за прогнозиране на периодите на засушаване при царевичните растения (Moyankova et al., 2023)

Най-съществените дължини на вълните за определяне на дните на засушаване се наблюдават при 1342, 1379, 1409 и около 1459 nm, които кореспондират с координатите C1, C4, C5 и C9 на абсорбция на водата (WAMACs). Коефициентите на регресионния вектор са по-големи за B37 в сравнение с XM 87-136, което се дължи на различните стойности на абсорбция за двете разновидности царевични растения.

Анализът на регресионните вектори и корелационните спектри потвърждава наличието на разлики в спектралните характеристики в спектрите на двата вида царевични растения. Тези различия са свързани с промени във водното съдържание и структурата на водата по време на процеса на засушаване.

4.1.6. Модели за класификация на царевични растения

На база на спектралните характеристики в диапазона на близката инфрачервена област от 908 до 1670 nm са създадени SIMCA модели за класификация на контролни, подложени на воднодефицитен стрес и възстановявани царевични растения (Таблица 4 и Таблица 5). Постигната висока точност на правилна класификация – общата точност на моделите и за двете царевични линии е по-голяма от 90 %. Точността на моделите за

линия XM 87-136 е малко по-висока в сравнение с тази за линия B37.

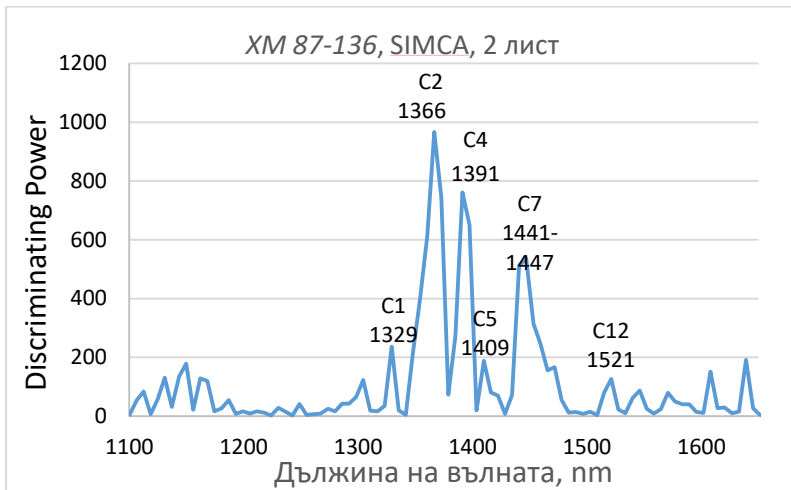
Таблица 4. Резултати от моделите за класификация на царевичните растения от сорт B37, втори лист

	Опреде- лени като контролни	Опреде- лени като стресирани	Опреде- лени като възстано- вявани	Чувстви- телност, %	F1, %
Контрола	110	13	3	87,30	85,94
Стресирани	20	120	12	78,95	84,21
Възстановявани	0	0	30	100	80,00
Прецизност, %	84,62	90,23	66,67		
Обща точност, %	90,28				

Таблица 5. Резултати от моделите за класификация на царевичните растения от сорт XM 87-136, втори лист

	Опреде- лени като контролни	Опреде- лени като стресирани	Опреде- лени като възстано- вявани	Чувстви- телност, %	F1, %
Контрола	117	12	0	90,70	91,76
Стресирани	9	150	5	91,46	92,02
Възстановявани	0	0	39	100	93,98
Прецизност, %	92,86	92,59	88,64		
Обща точност, %	94,74				

За изясняване на най-важната спектрална информация за разграничаване на образците от различните групи растения е изследван и параметъра „Discriminating Power” (Фигура 11). Най-значимите спектрални линии за разграничаване на трите групи растения в този диапазон – 1329, 1366, 1391, 1409, 1441 - 1447, 1521 nm, са свързани основно с абсорбция от водата. Тези дължини на вълните са характерни и в спектрите на изследваните растения (Фигура 4, Фигура 5 и Фигура 6).



Фигура 11. Значими дължини на вълни към моделите за класификация на засушавани царевични растения

4.2. Опити с краставични растения

4.2.1. Физиологични промени в краставичните растения при подлагане на ниски температури

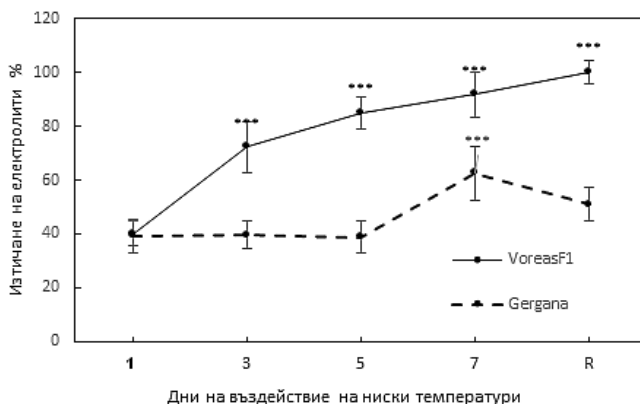


Фигура 12. Фенотипни промени при краставични растения, „C“ – контролни при 28°C; „LT“ – подложени на ниски температури; „R“ - възстановявани за 3 дни при 28°C

Растенията от сорт Гергана, подложени на 8°C за 7 дни, показват леки симптоми на увреждания от ниската температура – повяхване на листата (Фигура 12). При прехвърляне към нормална температура на растеж, растенията успяват да се

възстановят, докато растенията от сорт Voreas, при същите условия не оцеляват след 7 дни на нискотемпературно третиране.

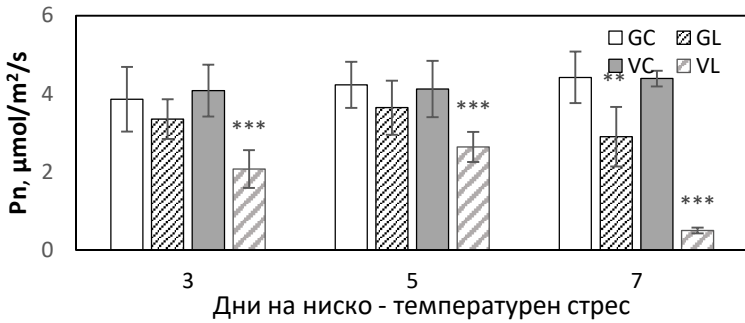
Състоянието на клетъчната мембрана по време на стрес е оценено чрез измерване на изтичането на електролити (EL), (Фигура 13). При сорт Гергана мембраните остават стабилни до 5-тия ден на стрес, показвайки леко повишение на EL на ден 7 и възстановяване при нормална температура. При сорт Voreas F1 - увеличаване на EL от листата на третия ден при ниска температура, достигайки 92 % в края на третирането и 100 % (след опита за възстановяване), което показва пълно разрушаване на клетъчните мембрани. EL е подчертан като ключов физиологичен маркер за оценка на индуцирани от ниска температура увреждания при тиквови растения (Li et al., 2025).



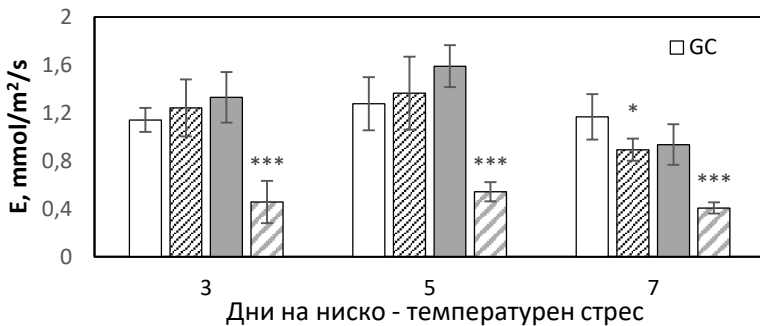
Фигура 13. Изтичане на електролити по време на нискотемпературния стрес и последващ опит за възстановяване на краставични растения. Грешките представляват стандартното отклонение * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Разликите между стойностите за изтичането на електролити на контролните и за всеки от измерваните дни за стресиранията растения от сорт Вореас са статистически достоверни. За сорта Гергана, статистически достоверни разлики се наблюдават само между контролните растения и тези, подложени на ниски температури за 7 дни.

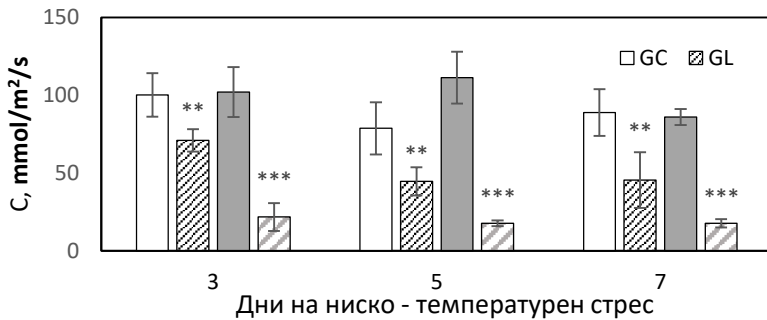
Сорт Гергана поддържа почти постоянна нетна скорост на фотосинтеза (Pn) по време на ниската температура с леко намаление (30 %) спрямо контролите на 7-мия ден (Фигура 14, А).



A). Нетна скорост на фотосинтеза - P_n , $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



B). Скорост на транспирация – E , $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$



C). Устична проводимост – C , $\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$

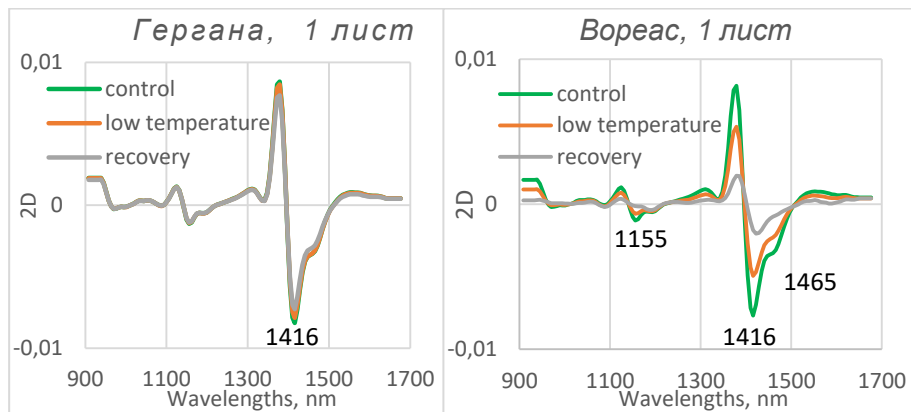
Фигура 14. Ефективност на фотосинтезата по време на нискотемпературен стрес при краставичните растения GC - контроли Гергана; GL - Гергана при нискотемпературен стрес; VC - контроли Вореас; VL - Вореас при нискотемпературен стрес; Грешките представляват стандартното отклонение * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

При сорт Вореас, скоростта на фотосинтезата (P_n) намалява от около 50 % на третия и петия ден при ниска температура до 90 % на 7-мия ден. Скорост на транспирация (E) и устична проводимост (C) показват корелация с динамичните промени на скоростта на фотосинтезата (P_n) по време на стрес (Фигура 14, В, С). Ниската фотосинтезна ефективност при сорт Вореас по време на нискотемпературния стрес е свързана със затваряне на устицата и липса на транспирация.

Намалението на устичната проводимост и постоянната скорост на транспирация по време на нискотемпературното третиране при сорт Гергана е малко, но статистически значимо. Тези резултати съответстват на фенотипните разлики, наблюдавани между двата сорта, и разкриват по-добрата адаптивност на сорт Гергана. След кратък период на охлаждане и отчетливи физиологични нарушения, тези растения превключват към механизми за преодоляване на неблагоприятните условия.

4.2.2. Спектрални измервания в близката инфрачервена област на листата на краставичните растения, подложени на нискотемпературен стрес

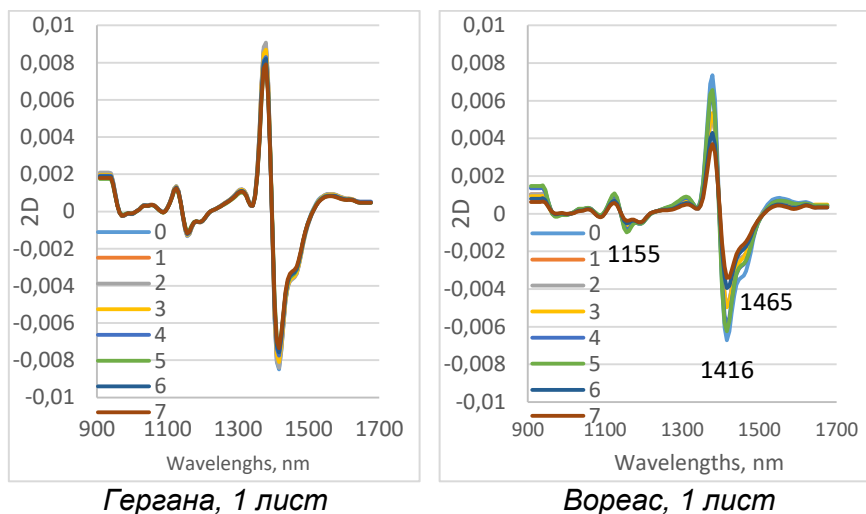
За растенията от сорт Гергана се наблюдават много по-малки разлики между контролните и третираните растения в сравнение с тези за растенията от сорт Вореас (Фигура 15).



Фигура 15. Средни стойности на втора производна на спектралните характеристики на краставични растения

Най-големият максимум се наблюдава при 1416 nm, дължащ се на абсорбцията от вода. Спектралните характеристики в областта 1456–1470 nm са свързани също основно с абсорбцията от вода. Други малки абсорбционни линии се наблюдават при 970 nm, 1087 nm и 1155 nm, които също са свързани с абсорбцията от О-Н група. Подобни тенденции се наблюдават и при останалите измерени листа. Както при царевичните растения, резултатите показват разлики в спектралните характеристики както между двата сорта краставични растения, така и между различните групи - контролни, стресирани и възстановявани растения.

При един и същ мащаб, за растенията от сорт Гергана се наблюдават минимални разлики между спектрите, измерени за различните дни на температурен стрес на третираните растения в сравнение с тези за растенията от сорт Вореас (Фигура 16).

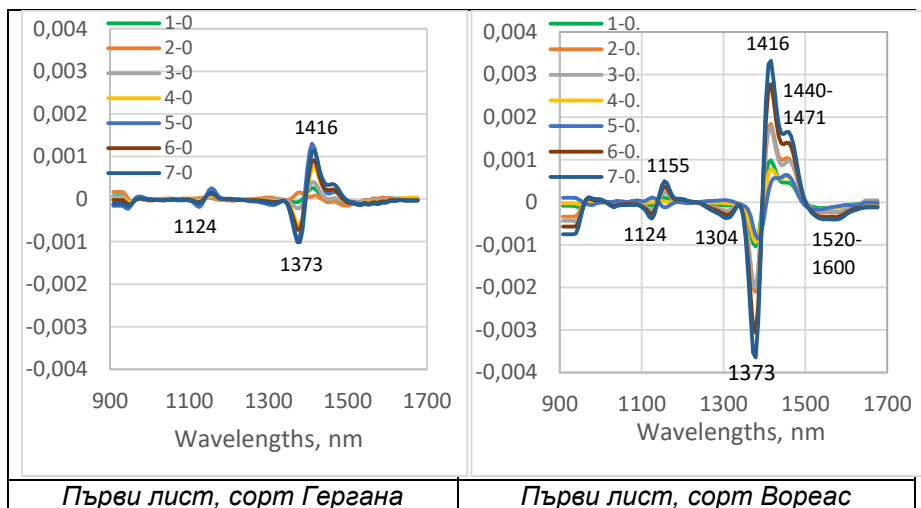


Фигура 16. Средни стойности на втора производна на спектралните характеристики на отглеждани при нискотемпературен стрес краставични растения, в зависимост от дните на стрес

Най-големи разлики се наблюдават в областта между 1410 и 1477 nm при растенията от сорт Вореас по време на нискотемпературен стрес, както и при 1155 nm. Абсорбцията в тези дължини на вълните е предимно свързана с О-Н групи от

вода и намалява значително с увеличаване на времето на престой при ниски температури. Максималната стойност на абсорбцията при 1416 nm е леко изместена към по-големите дължини на вълните в сравнение с максимума при царевичните растения. Спектралните характеристики в областта 1400–1470 nm зависят главно от различните молекулярни конформации на водата. Водородните връзки силно влияят на спектъра на водата в близката инфрачервена област чрез разширяване на абсорбционните линии и изместване на техните позиции. Силата на водородните връзки влияе върху максимума на валентните трептения на O–H групата. По-силните водородни връзки изместват максимума към по-големите дължини на вълните. Резултатите са сходни за всички измерени листа.

При еднакъв мащаб на графиките за двата сорта краставици се вижда, че разликите между средните спектри, измерени на 0-ия ден и на дни от 1-ви до 7-ми от нискотемпературния стрес са много по-малки при растенията от сорт Гергана, в сравнение с тези при сорт Voreas (Фигура 17). Този факт подчертава по-значителните промени в растенията от сорт Voreas вследствие на ниски температури, в сравнение с тези от сорт Гергана.

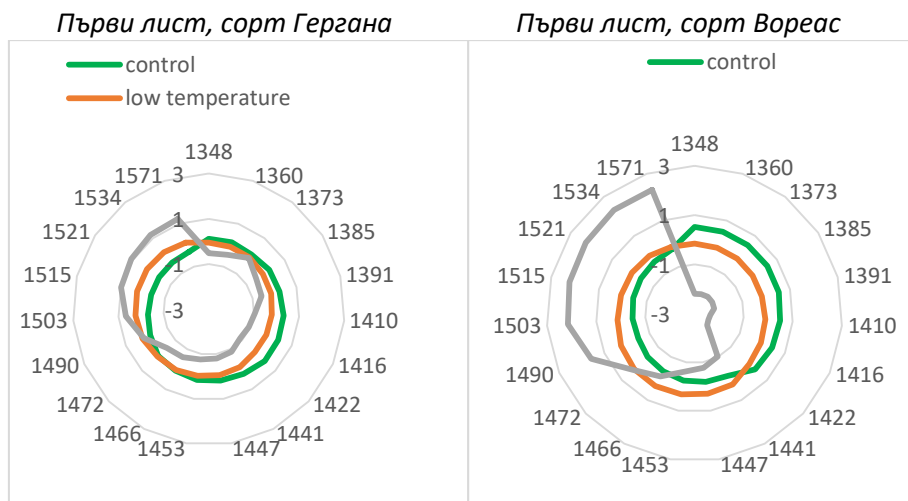


Фигура 17. Разлики между осреднени спектри, измерени на 0-ия ден и на дни от 1-ви до 7-ми от нискотемпературния стрес

Най-големи различия и при двата сорта растения се наблюдават около 1373 nm – СЗ от координатите на абсорбцията от вода (WAMACs). Установено е, че абсорбцията при 1373 nm е важна за определянето на пресни или по-дълго съхранявани на студено проби за рукола (Marinoni et al., 2022). Други области, където се наблюдават разлики, са диапазона около 1124 nm, 1304 nm, 1440-1500 nm и 1520-1600 nm. Отново, разликите в тези диапазони са много по-големи за сорт Voreas. Абсорбцията в 1400-1500 nm е доминирана от абсорбцията от вода и взаимодействията протеин-вода. Също така, значителните разлики, видими при сорт Voreas в диапазона 1520-1600 nm, указват по-голямо съдържание на свързана вода и взаимодействие на водата с протеини и въглехидрати в тези растения. Подобни резултати се получават за всички измерени листа.

4.2.3. Анализи по метода на Аквафотомиката

Акваграмите също показват, че двата изследвани сорта краставици реагират различно на нискотемпературен стрес (Фигура 18).



Фигура 18. Акваграми на контролни, стресирани и възстановявани краставични растения

За сорт Вореас се виждат ясни разлики между контролни, стресирани и възстановявани растения, които в по-малка степен

се наблюдават за сорт Гергана. Стойностите на акваграмата в диапазона 1348-1422 nm на контролните растения са по-високи от тези на стресираните растения, докато в диапазона 1441-1534 nm тези на стресираните растения са по-високи. Това означава, че стресираните растения имат по-малко свободна или слабо свързана вода и увеличение на силно свързаната вода. Много различна е акваграма за листата на възстановяваните растения. Рязко намалява свободната и слабо свързаната вода в нея, като се увеличава силно молекулярно свързаната вода (молекули с 2 водородни връзки при 1466 nm, с 3 водородни връзки при 1478 nm, с 4 водородни връзки при 1490 nm) и структурната вода (взаимодействие вода-целулоза и вода-протеин). При растенията от сорт Гергана няма толкова голямо намаляване на свободната и слабосвързана вода (WAMACS 1373 и 1385 nm). Сравняването на акваграмите на двата сорта краставични растения отразява различното състояние на водата в растенията и промените, които настъпват в резултат на действието на ниската температура.

Тези изводи се потвърждават и от статистическия анализ, показващ статистически значимите разлики между коефициентите на акваграмите на различните дължини на вълните за листата на различните групи растения (Таблица 6).

Таблица 6. Резултати от статистически анализ на акваграми за първи лист на краставичните растения

Дължина на вълната	Краставици Вореас 1 лист				Краставици Гергана 1 лист			
	Конт-ролни	Под ниски температури	Възстано-вявани	R ²	Конт-ролни	Под ниски температури	Възстано-вявани	R ²
1348	a	a		0,480	ns	ns		0,033
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1360	a	a		0,471	ns	ns		0,031
	b		b		b		b	
		c	c			ns	ns	
1373	a	a		0,464	ns	ns		0,006
	b		b		ns		ns	
		c	c			ns	ns	
1385	a	a		0,472	a	a		0,051
	b		b		b		b	
		c	c			ns	ns	
1391	a	a		0,482	a	a		0,066
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	

1410	a	a		0,510	a	a		0,151
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1416	a	a		0,494	a	a		0,186
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1422	a	a		0,434	a	a		0,205
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1441	a	a		0,116	a	a		0,103
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1447	a	a		0,103	a	a		0,078
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1453	a	a		0,102	ns	ns		0,064
	ns		ns		b		b	
		c	c			c	c	
1466	a	a		0,108	ns	ns		0,036
	ns		ns		b		b	
		c	c			c	c	
1472	a	a		0,135	ns	ns		0,023
	b		b		b		b	
		ns	ns			c	c	
1490	a	a		0,329	a	a		0,033
	b		b		ns		ns	
		c	c			ns	ns	
1503	a	a		0,446	a	a		0,115
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1515	a	a		0,447	a	a		0,191
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1521	a	a		0,443	a	a		0,207
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1534	a	a		0,438	a	a		0,211
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	
1571	ns	ns		0,188	a	a		0,188
	b		b		b		b	
		c	c			c	c	

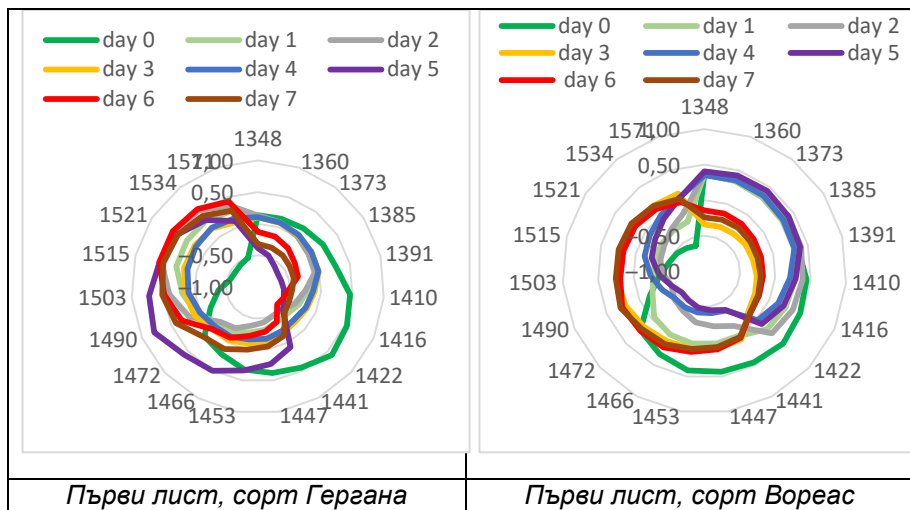
Едни и същи букви на един и същи ред показват значими разлики, когато $p < 0,05$; **ns** означава, че няма значими разлики. Различните цветове отразяват степента на значимост на разликите: $< 0,001$ са в **зелено**; $0,001 \div 0,01$ са в **синьо**; $0,01 \div 0,05$ са в **жълто**; незначимите (**ns**) в **сиво**.

Докато тенденцията за сорт Вореас е силна статистическа достоверност между всички групи растения за почти всички дължини на вълните, при сорт Гергана се получават по-малко статистически значими разлики между различните групи растения. Разликите в коефициентите на акваграмите с най-голяма степен на достоверност са в диапазона 1410 – 1422 nm и 1515 – 1571 nm. Това отново показва значимостта на промяната в съотношението на свободна и свързана вода в резултат на действие на стресовия фактор. По-малката статистическа значимост на резултатите за сорт Гергана се дължи на по-малките разлики в спектралните характеристики на измерените листа на растенията.

Коефициентът на детерминация R^2 показва кои дължини на вълните са важни за разграничаване на отделните групи растения – контролни, подложени на стрес и в опит за възстановяване. Най-висока степен на статистическа значимост на нива $p < 0,001$ (в зелено) и най-високи стойности за $R^2 > 0,400$ за Вореас и $R^2 > 0,200$ за Гергана и за двата сорта се установява при дължини на вълните от 1409 до 1422 nm и от 1515 до 1534 nm. Тези дължини на вълните са значими за разграничаване на трите групи растения в зависимост от стресовия фактор. Резултатите са сходни и за останалите измерени листа.

Построените са и акваграми за различните дни на нискотемпературно третиране, за да се проследи динамиката на промените във водното състояние в тях (Фигура 19).

Най-големите разлики се наблюдават между контролата и първите два дни на нискотемпературен стрес. Наблюдава се групиране на акваграмите за четвъртия и петия, както и за шестия и седмия ден. Изненадващо, акваграмата за третия ден на нискотемпературен стрес е по-близка до тези за шестия и седмия ден, отколкото за четвъртия и петия. Вероятно на третия ден има някои нестабилни промени във водната структура. С увеличаване на дните на стрес, свободната и слабо свързаната вода намалява, а свързаната вода се увеличава, въпреки че в този опит поливането на растенията не беше намалено.



Фигура 19. Разлики в акваграмите в различните дни на нискотемпературен стрес при краставичните растения

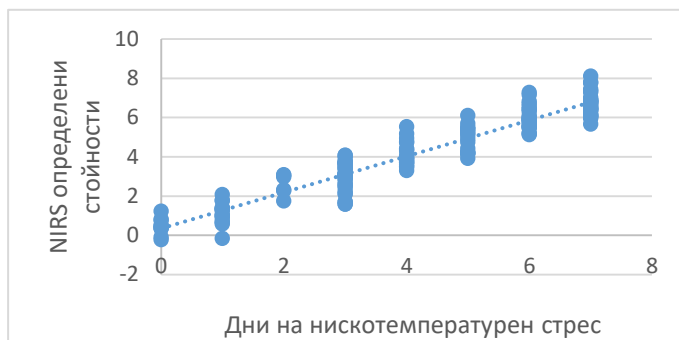
4.2.4. Модели за определяне на дните на нискотемпературен стрес на краставични растения

Създадени са PLS модели за определяне на дните на ниски температури, в спектралния диапазон от 900 до 1700 nm (Таблица 7 и Фигура 20).

Таблица 7. Статистически параметри на моделите за определяне на дните на нискотемпературен стрес на краставичните растения, 1 лист

Вид лист	Гергана					Вореас				
	PLS фактори	SECV	Rcv	SEC	Rcal	PLS фактори	SECV	Rcv	SEC	Rcal
Котиле дони	2	0,80	0,94	0,78	0,95	2	1,05	0,87	1,04	0,88
Първи лист	6	1,05	0,91	0,98	0,92	3	0,66	0,95	0,65	0,96
Втори лист	8	1,23	0,87	1,01	0,92	2	0,97	0,92	0,96	0,92

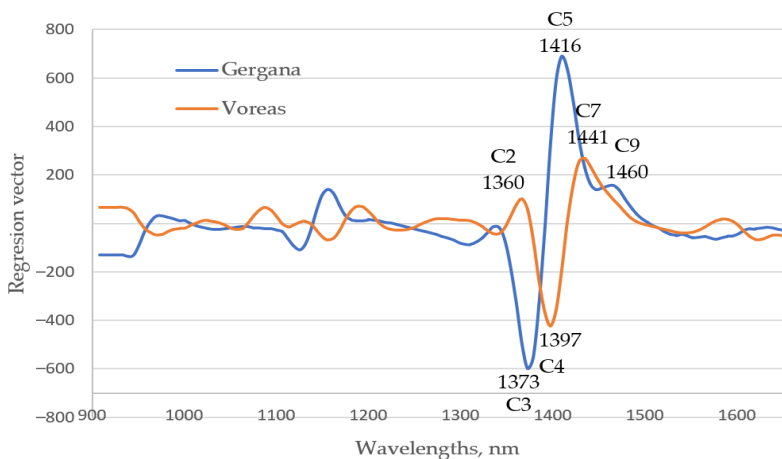
Точността при определяне на дни с ниски температури при кръстосаната проверка тук показва грешка от 0,8 до 1,23 дни за растения от сорт Гергана и $0,66 \div 1,05$ за сорт Вореас (Таблица 7).



Фигура 20. Графично представяне за определяне на дните на нискотемпературен стрес за сорт Вореас, първи лист

По-голямата точност на модела за определяне дни на нискотемпературен стрес за сорт "Вореас" е заради по-големите разлики в спектралните характеристики в зависимост от дните на стрес за този сорт.

Регресионните вектори за двата модела за оценка на дни на нискотемпературен стрес за сортовете Гергана и Voreas са сходни (Фигура 21). Най-значимата информация в регресионните вектори е при дължини на вълните в областите 1360 – 1460 nm съответстващи на C2, C3, C4, C5, C7 и C9 координати на водната матрица. Графиките на регресионния вектор потвърждават важността на областта на водната абсорбция за откриване на нискотемпературен стрес при краставичните растения. Това е свързано с промени във водната структура по време на нискотемпературен стрес. Разликите в регресионните коефициенти са свързани с разликите в стойностите на абсорбция за двата сорта.



Фигура 21. Регресионни вектори на моделите за определяне на дните на нискотемпературен стрес за първи лист на краставичните растения

4.2.5. Модели за класификация на краставични растения

Постигната е висока точност при класификация на различните групи растения - контролни, подложени на нискотемпературен стрес и след опит за възстановяване (Таблица 8 и Таблица 9).

Таблица 8. Резултати от моделите за класификация на краставичните растения, сорт Гергана, първи лист

	Опреде- лени като контролни	Опреде- лени като стресира- ни	Определени като възстано- вявани	Чувстви- телност, %	F1, %
Контрола	130	34	2	78,31	83,60
Стресирани	15	113	2	86,92	81,59
Възстановявани	0	0	29	100	93,55
Прецизност, %	89,66	76,87	87,88		
Обща точност,%	87,74				

По-голямата точност за сорт *Вореас*: 93,37 % – 100 % се дължи на по-големите разлики в спектралните характеристики. Подобни резултати са получени и за другите изследвани листа в наблюдаваните растения.

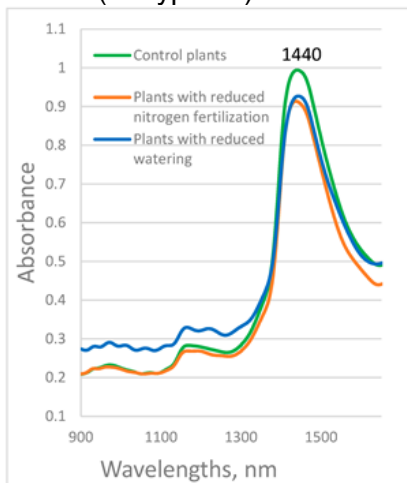
Таблица 9. Резултати от моделите за класификация на краставичните растения, сорт Вореас, първи лист

	Опреде- лени като контрол-ни	Опреде- лени като стресира-ни	Опреде- ни като възстано- вявани	Чувстви- телност, %	F1, %
Контрола	143	3	0	97,95	95,33
Стресирани	11	155	0	93,37	95,68
Възстановявани	0	0	24	100	100
Прецизност, %	92,86	98,1	100		
Обща точност,%	99,08				

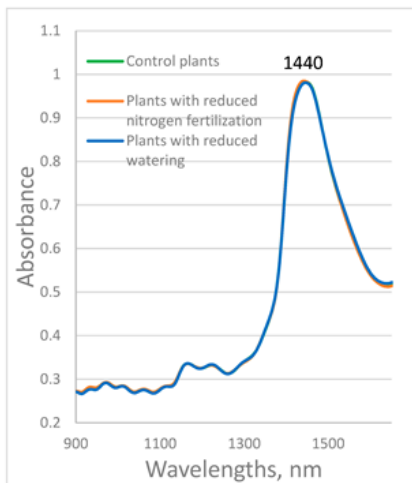
4.3. Опити с домати растения

4.3.1. Спектрални измервания в близката инфрачервена област на листата на домати растения в процес на стрес

Значителни разлики в спектрите между контролните и стресирани растения от сорта *Ред Баунти* се наблюдават около 1440 nm (Фигура 22).



Ред Баунти



Мануса

Фигура 22. Абсорбционни спектри на домати растения

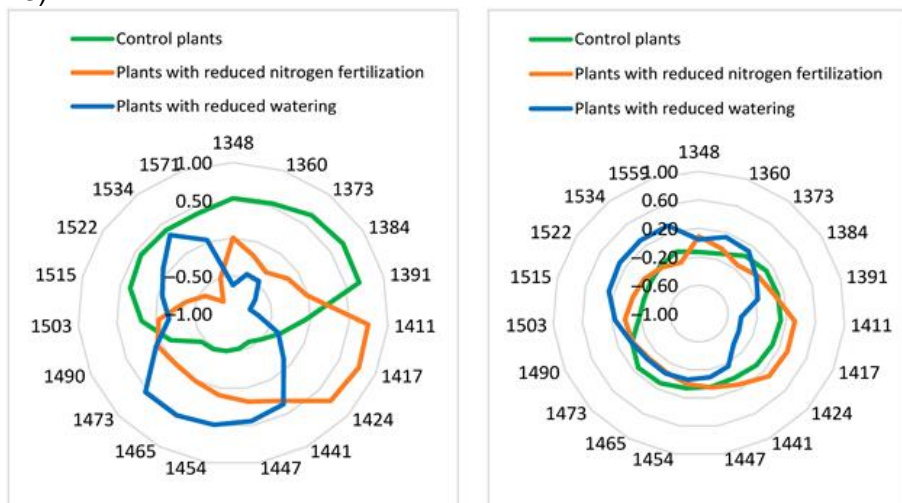
Абсорбцията в този диапазон се дължи главно на ОН връзките на водата. Наблюдава се разлика между абсорбцията на контролните растения, и растенията с намалено азотно торене, и

тези с намалено поливане в диапазона 900–1300 nm. Това вероятно се дължи не само на промени в химичния състав, но най-вече на промени в структурата на листата, дължащи се на засушаването. Подобни разлики са наблюдавани в абсорбционните спектри в областта на първият обертон на водата от 1300 до 1600 nm между контролните и засушени растения царевица, както и между различните дни на воден стрес (Moyankova et al., 2023).

Разликите между спектрите на контролните и стресираните растения от сорта *Ред Баунти* са много по-големи от тези на сорта *Мануса*. Това може да се обясни с по-високата устойчивост на стресови фактори на растенията от сорта *Мануса* в сравнение с тези на сорта *Ред Баунти*. Подобно на растения царевица и краставици, и тук са получени разлики както между спектрите на листата от контролните и стресираните растения за двата сорта домати, така и между сортовете.

4.3.2. Анализи по метода на Аквафотомиката

Виждат се разлики в акваграмите между контролните и стресираните растения, както и между тези с намалено азотно торене и с намалено поливане и за двата сорта домати (Фигура 23).



сорт Ред Баунти

сорт Мануса

Фигура 23. Акваграми на листата на доматиените растения

Коефициентите на акваграмата за контролните растения от сорт *Мануса* показват, че различните водни структури са приблизително равномерно разпределени, с лек превес на свободната вода в сравнение с по-силно свързаната вода. Стойностите на акваграмата намаляват в диапазона 1391–1473 nm и се увеличават в 1503–1559 nm за растенията с намалено поливане. Характерно е намалението при 1411 nm (координата на водната матрица C5), дължина на вълната, свързана със свободната вода. Това показва намаляване на свободната вода поради намаленото поливане. Областта от 1503–1559 nm съответства на силно свързана вода и структурна вода, което е резултат от взаимодействието вода-целулоза или вода-протеин (Muncan et al., 2022). Наблюдавани са различни промени в акваграмата на растенията с намалено азотно торене. Стойностите на акваграмата се увеличават в 1411–1441 nm (координати на водната матрица C5, C6 и C7). Това показва по-голямо съдържание на свободна вода в сравнение с контролните растения.

От Фигура 35 се вижда, че акваграмите за листата от сорта домати *Ред Баунти* са различни от тези за *Мануса*, особено за контролните растения и растенията с намалено поливане. Акваграмата за контролните растения *Ред Баунти* има най-високи стойности в областите 1348–1391 nm (координати на водната матрица C1–C5) и 1503–1559 nm. Това показва, че част от водата в този сорт домати е в квазисвободно или свободно състояние. Друга част от водата е в силно свързана вода. Акваграмата на растенията с намалено поливане показва силно намаляване на свободната вода и увеличаване на солватната обвивка (стойности на акваграмата при 1447 nm), както и водни молекули с две или три водородни връзки (стойности на акваграмата при 1454, 1465 и 1473 nm). Част от водата в растенията с намалено поливане е в силно свързано състояние или структурна вода (1522–1559 nm). Акваграмата на растенията с намалено азотно торене от сорта *Ред Баунти* показва характеристики, подобни на тези, получени за растенията от сорта *Мануса*. Стойностите на акваграмата се увеличават в областта 1411–1441 nm. Това показва по-високо съдържание на свободна вода в сравнение с контролните растения.

Акваграмите показват промени в съотношението на свободната и свързаната вода и броя на водородните връзки между водните молекули в контролните и стресираните растения, както и влиянието на различните видове стресови фактори върху доматиените растения. Наблюдават се значителни разлики между акваграмите за стресирани от воден дефицит доматиените растения от двата изследвани сорта. Това показва различни водни структури в изследваните сортове. Следователно, акваграмите могат да се използват като допълнителен метод за оценка на устойчивостта на различните сортове домати към стресови фактори.

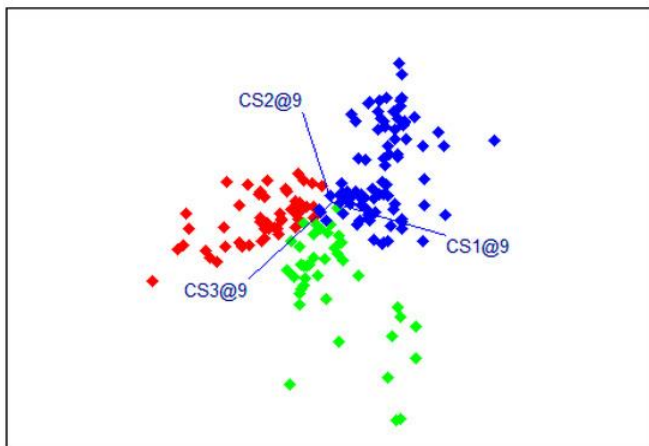
4.3.3. Модели за класификация на доматиените растения

Резултатите от моделите за класификация (SIMCA) за сорта *Ред Баунти* (Таблица 10) и сорта *Мануса* (Таблица 11) показват висока точност на успешно диференциране на контролните и стресираните доматиените растения въз основа на спектралните характеристики на листата им във видимия и близкия инфрачервен диапазон.

Таблица 10. Резултати от моделите за класификация на доматиените растения от сорт *Ред Баунти*

	Контролни	Определени като с намалено азотно торене	Определени като с намалено поливане	Няма съвпадение	Чувствителност, %	F1, %
Контролни	96	2	4	0	94,12	96,48
с намалено азотно торене	0	86	0	0	100,00	98,85
с намалено поливане	1	0	84	2	96,55	95,95
Прецизност, %	98,97	97,72	95,45			
Обща точност, %	96,73					

Графиките на резултатите от моделите за класификация и за двата сорта растения показват ясно разграничение между трите групи доматиените растения – контролни, с намалено поливане и с намалено азотно торене, представени на Фигура 24.



Фигура 24. Графика на резултатите от моделите за класификация на доматиените растения от сорт Ред Баунти (в червено - контролни, в синьо - с намалено поливане и в зелено - с намалено торене)

Таблица 11. Резултати от моделите за класификация на доматиените растения от сорта Мануса

	Контролни	Определени като с намалено азотно торене	Определени като с намалено поливане	Няма съвпадение	Чувствителност, %	F1, %
Контролни	77	5	4	0	89,53	87,50
с намалено азотно торене	8	75	6	0	84,27	85,23
с намалено поливане	5	7	80	0	86,95	87,91
Прецизност, %	85,55	88,23	88,88			
Обща точност, %	86,89					

Резултатите от SIMCA моделите за класификация за сорта Мануса показват малко по-ниска точност на разграничаване на растенията спрямо сорта Ред Баунти (Таблица 11).

Резултатите от класификацията на контролните и стресирани доматиените растения съответстват на резултатите, представени от Xia et al.

Резултатите също така демонстрират възможностите на подхода на Аквафотомиката за по-добро разбиране на процесите, протичащи по време на азотен и воден дефицит в доматените растения. Това би могло да се използва в бъдеще като допълнителен подход в програми за селекция на устойчиви на стрес сортове домати.

5. Изводи

1. Установени са разлики в абсорбционните спектри в близката инфрачервена област между контролни растения и растения под въздействие на различен вид абиотичен стрес.

2. Установени са разлики в абсорбционните спектри в близката инфрачервена област на стресираните растения между различните дни на действие на стресовия фактор.

3. При растения от един и същи вид и различни сортове са установени спектрални разлики в резултата на реакцията им на съответния абиотичен стрес.

4. Акваграмите показват отчетливо разликите в спектралните характеристики между:

- различните групи растения в зависимост от третирането - контролни, подложени на стрес и възстановявани;

- различните дни от действието на абиотичен стрес върху едни и същи растенията.

- реакцията на различни сортове от един и същи вид растения на стресовия фактор.

5. Установено е, че при действието на всичките изследвани видове абиотичен стрес върху растенията, се наблюдава загуба на свободна и слабо свързана вода и увеличаване на вода с по-голям брой водородни връзки или вода свързана със структурните елементи на растенията.

6. Направените прогнозни модели по метода на частично най-малките квадрати (PLS) позволяват определяне на дни на абиотичен стрес с висока точност. Определянето на дните на засушаване на царевични растения е с точност 1,47 дни за линия *V37* и 1,42 дни за линия *XM 87-136* при кръстосана проверка. Точността при определяне на дните с въздействие на ниски температури при краставични растения е от 0,8 до 1,23 дни за различните листа на растения от сорт *Гергана* и от 0,66 до 1,05

за сорт Вореас при кръстосаната проверка, в зависимост от използвания спектрален диапазон.

7. Спектралните характеристики на листата на растенията позволяват създаване на модели за разграничаване на контролни, стресирани и възстановявани растения. Точността на разработените SIMCA модели е много висока. Критерият F1 за моделите за класификация на растения краставици варира между 78,31 % и 100 % за сорт *Гергана* и между 93,37 – 100 % за сорт *Вореас*. За царевични растения от линия *B37* стойностите на F1 варират от 80 % до 85,98 %, а за линия *XM 87-136* от 91,78 % до 93,98 %. Моделите за класификация на доматиените растения като контролни, с намалено поливане и намалено азотно торене също показват висока точност. Стойностите на F1 варират от 95,95 % до 98,85 % за сорт *Ред Баунти* и от 85,23 % до 87,91 % за сорт *Мануса*. Значимата спектрална информация, на която се базират моделите за класификация, е свързана главно с абсорбцията от вода в тях.

8. Информацията от процедурите на методите регресия на частично най-малките квадрати (PLS) и гъвкаво независимо моделиране на класова аналогия (SIMCA) показва важността на спектралната информация, свързана с абсорбцията на вода в диапазона 1370-1480 nm, за определяне на дните на стрес и разграничаване на контролни и стресирани растения.

9. В резултат на стреса са установени промени на относителното водно съдържание и на вегетативния индекс (NDVI) при царевичните растения. Установени са промени и в изтичането на електролити и на скоростта на фотосинтезата при краставични растения. Чрез анализ на измерените спектри е направена връзка между известните физиологични процеси в клетките на зелените растения в отговор на абиотичен стрес и промените в състоянието и баланса на свободната и свързаната вода. Тази информация допринася за по-добро разбиране на структурните промени на водата в клетките на растенията.

10. Резултатите от това пилотно проучване показват, че анализът на спектрите на растенията в близката инфрачервена област и методът на Аквафотомиката позволяват да се подобри нашето разбиране за процесите, протичащи при абиотичен стрес в растенията. Този подход може да се използва и като допълнителен метод в програмите за селекция на устойчиви към съответния абиотичен стрес сортове растения.

11. Аквафотомиката, базирана на спектроскопията в близката инфрачервена област, може да бъде използвана в безразрушителни изследвания на живи организми. Може да открие съвременно значителни промени в конформацията на водните молекули, произтичащи от външно въздействие. Обогатяването на базата данни от спектрална информация за състоянията на различни обекти е стъпка към структуриране и създаване на обща платформа за информация за бъдещи изследвания в различни области.

6. Научни приноси

1. Установени са спектралните диапазони, в които се наблюдават разлики в абсорбционните спектри в близката инфрачервена област между: контролни растения царевица и растения подложени на воден дефицит; контролни растения краставици и растения под въздействие на нискотемпературен стрес; контролни растения домати и растения под въздействието на воден и азотен дефицит.

2. За първи път по метода на Аквафотомиката са установени промените в състоянието на водата в изследваните растения царевица, краставици и домати в резултат на действието на тестваните абиотични фактори.

3. Създадени са модели за класификация на контролни и стресирани растения, базирани на спектри в близката инфрачервена област, имащи много добра точност. Те дават възможност за ранна диагностика на абиотичен стрес при растенията, без да се налагат разрушителни въздействия върху тях.

4. На базата на спектралните характеристики на изследваните растения в близката инфрачервена област за първи път са създадени модели за определяне на дните на действие на абиотичните стресови фактори с висока точност.

5. Показана е възможността за прилагане на спектрален анализ в близката инфрачервена област и Аквафотомика като допълнителен метод в програмите за селекция на устойчиви към съответния абиотичен стрес сортове растения.

6. Получената допълнителна информация за промените в спектрите на изследваните растения в близката инфрачервена област под действие на различни стресови фактори и състоянието

на водата в тях ще обогати аквафотомната база данни и връзката между специфичните водни състояния и промените във физиологичните процеси в растенията в резултат на абиотичния стрес.

7. Препоръки за практиката

1. Спектралния анализ в близката инфрачервена област и Аквафотомиката могат да се използват за бърз и недеструктивен анализ на промените в растения в резултат на абиотичен стрес.

2. Спектралния анализ в близката инфрачервена област и Аквафотомика може да се използва като допълнителен метод в програмите за селекция на устойчиви към съответния абиотичен стрес сортове растения.

8. Публикации свързани с дисертационния труд

1. An Aquaphotomics Approach for Investigation of Water-Stress-Induced Changes in Maize Plants, Daniela Moyankova; Petya Stoykova; Petya Veleva; Nikolai K. Christov; Antoniya Petrova; Stefka Atanassova, Sensors 2023, Volume 23, Issue 24, 9678, SJR 0.764, Q1, IF 3.5;

2. Visible and Near-Infrared Spectroscopy for Investigation of Water and Nitrogen Stress in Tomato Plants, Stefka Atanassova; Antoniya Petrova; Dimitar Yorgov; Roxsana Mineva; Petya Veleva, AgriEngineering 2025, Volume 7 Issue 5, 155; SJR 0.559, Q1, IF 3.

9. Участия в научни форуми

1. Второ място на Национална конференция с международно участие „Физика – Инженерство – Технологии“, Visible-near-infrared spectroscopy and aquaphotomics for detection of drought-stress induced changes in maize plants, Moyankova, D.; Stoykova, P.; Veleva, P.; Christov, **Petrova, A.**; Vanya Skila, V.; Atanassova, S. Пловдив, България, 4-5 декември 2025;

2. INTERNATIONAL CONFERENCE “AGRICULTURE – WAY OF LIFE”, with paper titled: Aquaphotomics – a novel approach to study low temperature stress in cucumber plants. **Petrova, A.**;

10. Проекти, свързани с настоящето изследване

Изследванията извършени с двете линии царевични растения и двата сорта краставични растения са проведени в рамките на проект, финансиран от Фонд научни изследвания на България „Аквафотомика – нов подход за изследване на промените в структурата на водата в растения и микроводорасли, индуцирани при стрес“ договор № КП-06-Н51/3).

SUMMARY

This study explores the potential of near-infrared spectroscopy and Aquaphotomics to analyze changes in plants during abiotic stress, caused by drought, low temperature, and reduced nitrogen fertilization. Two corn lines (B37Ht, XM 87-136), two cucumber varieties (Gergana, Voreas F1), and two tomato varieties (Red Bounty, Manusa) were investigated.

Spectra of all tested plants were measured during the experiments nondestructively in the spectral range of 900–1700 nm. Several physiological parameters of plants were measured: electrolyte leakage, net photosynthesis rate, stomatal conductance, and transpiration rate in the experiment with cucumber plants; relative water content, plant height, and NDVI index in the experiment with maize plants.

Spectral differences and variations in aquagrams were found depending on treatment (control, stressed, and recovery plants), stress duration, and plant varieties. Under all types of abiotic stress, a loss of free and weakly bound water was observed, while water with higher hydrogen bonding or bound to structural elements of the plant increased.

Changes in physiological parameters, including Relative Water Content, NDVI, Electrolyte Leakage, and photosynthesis rate, were established. The analysis connects physiological processes to changes in the balance between free and bound water.

PLS models for predicting stress days were developed, which achieved high accuracy. Days of drought of corn plants had been

predicted with a standard error of cross-validation of 1.47 days (for B37 lines) and 1.42 days (for XM 87-136 lines). Low-temperature days' detection in cucumber plants had an accuracy ranging from 0.8 – 1.23 days (for Gergana varieties) and 0.66 – 1.05 days (for Voreas varieties). Highly accurate SIMCA models for the classification of control, stressed, and recovered plants were developed. The F1 criterion of models for cucumber plants ranged from 78.31% to 100% for Gergana and 93.37% to 100% for the Voreas variety. For maize plants, F1 ranged from 80% – 85.98% (for B37 lines) and 91.78% – 93.98% (for XM 87-136 lines). For tomatoes, F1 ranged from 95.95% – 98.85% (for Red Bounty varieties) and 85.23% – 87.91% (for Manusa varieties).

The results of this pilot study demonstrated the potential of near-infrared spectroscopy and the aquaphotomics approach to better understand the process of abiotic stress in plants. This can also be used as an additional approach in breeding programs for the selection of stress-tolerant plant varieties.