

1988

**RUBISCO-DEFICIENT MUTANT OF BARLEY**

**ДЕФИЦИТЕН НА РУБИСКО МУТАНТ НА ЕЧЕМИК**

Demirevska-Kerova K., **Simova L.**, Chaianova S., Volodarsky A.

*Сборник Proceedings of International Symposium of Mineral Nutrition and Photosynthesis*, Varna-87, Vol. II Photosynthesis

Edited by S. Vaklinova, V. Stanev, M. Dilova, стр. 302-306

**Резюме:** Направени са имунохимични изследвания (двойна радиална имунодифузия, ракетна имуноелектрофореза и кръстосана имуноелектрофореза) върху разтворимите белтъци в листа от 10-12 дневни зелени, етиолирани и Албина мутантни ечемичени растения посредством моноспецифичен антисерум срещу пречистена Рубиско от ечемик и антисерум срещу голямата субединица на Рубиско от *Euglena gracilis* Klebs. Най-голямо количество на Рубиско е намерено в зелени ечемичени листа, по-малко - в етиолирани, а в Албина мутанти този антиген отсъства. Резултатите се съгласуват с ензимната активност на Рубиско в съответните екстракти. В Албина мутантите липсва голямата субединица на Рубиско и се предполага, че функцията на Рубиско се поема частично от ФЕП-карбоксилазата. Най-вероятно мутацията засага пластома.

1989

**ISOLATION AND PURIFICATION OF RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/  
OXYGENASE FROM BARLEY LEAVES**

**ИЗОЛИРАНЕ И ПРЕЧИСТВАНЕ НА РИБУЛОЗО-1,5-БИСФОСФАТ КАРБОКСИЛАЗА/  
ОКСИГЕНАЗА ОТ ЕЧЕМИЧЕНИ ЛИСТА**

Demirevska-Kerova K., **Simova L.**

*Физиология на растенията* 15 (3), 3-10 ISSN 1312-8183 (Print version)

**Резюме:** Предложен е комбиниран метод за изолиране и пречистване на Рубиско от ечемичени листа. Пречистването на ензима включва екстрахиране със стабилизиращи ензима съставки, преципитация с амониев сулфат, гел-филтрация на Сефадекс G-25, йонообменна хроматография на DEAE-Сефацел и гел-филтрация на Сефакрил S-300. Получен е напълно хомогенен препарат на ензима, който може да се съхранява дълго време на  $-18^{\circ}\text{C}$  в присъствие на глицерин, захароза или като амониево-сулфатен преципитат. Получен е моноспецифичен заешки антисерум срещу Рубиско и е направена електрофоретична и имунохимична характеристика на основните етапи на пречистване.

1995

**RUBISCO ACTIVASE FROM BARLEY LEAVES AND POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST IT  
РУБИСКО АКТИВАЗА ОТ ЕЧЕМИЧЕНИ ЛИСТА И ПОЛИКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА КЪМ НЕЯ**

Demirevska-Kerova K., **Simova L.**, Juperlieva-Mateeva B

*Доклади на БАН* 48 (1), 97-100; ISSN 0861-1459; **IF 0.082** (1995)

**Резюме:** Пречистена е Рубиско активата от листа на ечемик посредством преципитация с 55% амониев сулфат, обезсоляване на Сефадекс G-25, йонообменна хроматография на DEAE-Сефацел и препаративна електрофореза на 6% полиакриламиден гел за отстраняване на основния примес Рубиско. Етапите на пречистване са контролирани електрофоретично и по активността на активата. Получени са заешки поликлонални антитела срещу Рубиско активата от ечемик, с висок титър, определен посредством двойна имунодифузия в гел и пряка ELISA.

**INVESTIGATIONS ON THE STRUCTURE AND CONFORMATIONAL DYNAMICS IN RIBULOSE-  
1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE (RUBISCO) MOLECULE (REVIEW)**

**ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ СТРУКТУРАТА И КОНФОРМАЦИОННАТА ДИНАМИКА В  
МОЛЕКУЛАТА НА РУБИСКО (ОБЗОР)**

Demirevska-Kerova K., **Simova-Stoilova L.**

*Bulg. J. Plant Physiol.* 21 (1), 90-99; ISSN 1312-8183 (Print) 1312-8221 (Online)

**Резюме:** Направен е преглед на публикуваните изследвания върху структурата и динамичните изменения в конформацията на ключовия ензим на фотосинтезата и фотодишането Рубиско (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа) от висши растения. Анализирани са данни от X-лъчева кристалография, ЯМР-спектроскопия, локално насочен мутагенез и други техники. Значителни разлики в конформацията на ензима не са установени независимо от различията в аминокиселинната последователност на Рубиско от различни растителни видове. Третичната и четвъртичната структура на ензима са описани подробно, като е акцентирано върху активния център и регулаторните места в молекулата на Рубиско. Обсъдени са възможностите и ограниченията на различните методи за изследване на белтъчната структура и конформация. Изтъкнати са някои преимущества на имунохимичните методи и по-конкретно използването на моноклоналните антитела за изследване на динамичните изменения в структурата на белтъците в разтвор.

1996

**ЕПИТОПЕ MAPPING OF RUBISCO FROM BARLEY LEAVES.**

**ЕПИТОПНО КАРТИРАНЕ НА РУБИСКО ОТ ЕЧЕМИЧЕНИ ЛИСТА**

Demirevska-Kepova K., **Simova-Stoilova L.**, Kyurkchiev S., Juperlieva-Mateeva B.

*Доклади на БАН* 49 (3) 93-96; ISSN 0861-1459

**Резюме:** Направено е относително картиране на епитопите върху молекулата на Рубиско, разпознавани от четири моноклонални антители срещу ензима от ечемик, посредством ELISA адитивен тест и повлияване на ензимната активност. Изчислените индекси на адитивност позволяват да се определи относителното пространствено разположение на епитопите, разпознавани от антителата. Всички изследвани антители инхибират значително активността на Рубиско. Изказано е предположение, че антителата засягат или самия активен център, или се свързват на места в близост до активния център на Рубиско на повърхността на големите субединици, или взаимодействат с регулаторно място и непряко влияят на активния център посредством конформационни изменения.

1997

**REACTIVITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO RUBISCO FROM DIFFERENT  
PLANT SPECIES**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НА МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА С РУБИСКО ОТ РАЗЛИЧНИ  
РАСТИТЕЛНИ ВИДОВЕ**

**Simova-Stoilova L.**, Demirevska-Kepova K., Kyurkchiev S., Juperlieva-Mateeva B.

*Доклади на БАН* 50 (4), 97-100; ISSN 0861-1459

**Резюме:** Изследвана е локализацията на епитопите върху молекулата на Рубиско, разпознавани от четири моноклонални антители срещу ензима от ечемик, посредством сравняване на относителния им афинитет в пряка ELISA към ензим пречистен от 5 вида растения (ечемик, спанак, царевица, грах и тютюн), за които е известна аминокиселинната последователност на големите субединици (LS) на ензима. Рубиско от различните растителни видове е пречистена посредством фракциониране с амониев сулфат и препаративна електрофореза. Различията в относителния афинитет на антителата са съпоставени с аминокиселинните замени в LS и са посочени две най-вероятни места за локализация на припокриващите се епитопи, разпознавани от използваните антители – едно в N-домена (№89-97) и друго в C-домена (№353-356) на LS на Рубиско.

**PROTEOLYTIC DEGRADATION OF BARLEY RUBISCO AND RECOGNITION  
OF THE OBTAINED FRAGMENTS BY MONOCLONAL ANTIBODIES**

**ПРОТЕОЛИТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ НА РУБИСКО ОТ ЕЧЕМИК И РАЗПОЗНАВАНЕ НА  
ПОЛУЧЕНИТЕ ФРАГМЕНТИ ОТ МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА**

Demirevska-Kerova K., **Simova-Stoilova L.**, Kyurkchiev S; *Photosynthetica* 34 (2),  
211-218; ISSN 0300-3604 (Print) 1573-9058 (Online) **IF 0.663** (1998)

**Резюме:** Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/ оксигеназа (Рубиско) от ечемик е подложена на ограничена протеолиза посредством обработка с трипсин или с протеаза от *St. Aureus* щам V8. Третирането на нативна Рубиско с тези протеази води до разграждане на голямата субединица (LS) на ензима, като трипсинът откъсва три фрагмента от LS, а протеазата от *St. Aureus* щам V8 – само един. Малката субединица на Рубиско не е засегната. В присъствие на 0.5% натриев додецилсулфат Рубиско се разгражда на повеме фрагменти, някои от които са доста стабилни. Изследвано е разпознаването на фрагментите на LS от четири моноклонални антитела към Рубиско от ечемик посредством имуноблотинг. Всички антитела разпознават фрагментите с молекулна маса близка до тази на LS. Различия между антителата се наблюдават при разпознаването на фрагменти от LS с по-ниска молекулна маса.

**CHARACTERIZATION OF SPECIFIC SITES ON THE RUBISCO MOLECULE  
RECOGNIZED BY MONOCLONAL ANTIBODIES**

**ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ МЕСТА ВЪРХУ МОЛЕКУЛАТА НА РУБИСКО,  
РАЗПОЗНАВАНИ ОТ МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА**

Demirevska-Kerova K., **Simova-Stoilova L.**, Kyurkchiev S.  
*Plant. Physiol. Biochem.* 35 (7), 513-521; ISSN: 0981-9428; **IF 1.374** (1998)

**Резюме:** Четири моноклонални антитела срещу Рубиско (рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза/ оксигеназа, EC 4.1.1.39) от *Hordeum vulgare* L., описани по-рано като инхибиращи активността на ензима, са характеризирани по отношение на ефекта им върху активния център на Рубиско. Две от антителата частично предотвратяват карбамилирането на Рубиско в trapping експеримент чрез измерване количеството на необменяем  $^{14}\text{CO}_2$  блокиран в активния център от 2-карбоксиарабинитол-1,5-бисфосфат. Наблюдавани са изменения в свързването на антителата с комплекса на Рубиско с някои ефектори (рибулозо-1,5-бисфосфат, фосфоенолпируват, фруктозо-1,6-бисфосфат, 6-фосфоглюконат) в инхибиторна ELISA, които отразяват промяна в афинитета на антителата. За всички изследвани антитела е установено по-слабо взаимодействие с комплекса активирана Рубиско - карбоксиарабинитолбисфосфат. Установено е, че афинитетът на моноклоналните антитела зависи от

конформацията на ензима, въпреки че антителата не засягат пряко местата на активиране и на свързване на субстрата в молекулата на Рубиско. Проведени са сандвич ELISA експерименти с моноклонални антитела и Рубиско, чийто активен център е блокиран с карбоксиарабинитолбисфосфат, а използваните ефектори са свързани с предполагаемо регулаторно място в молекулата на ензима. Данните подкрепят хипотезата за съществуването на алостерично място в молекулата на Рубиско, което има отношение към регулацията на ензима.

**1998**

**LIMITED PROTEOLYSIS OF BARLEY RUBISCO AND RECOGNITION OF THE FRAGMENTS BY MONOCLONAL ANTIBODIES**

**ОГРАНИЧЕНА ПРОТЕОЛИЗА НА РУБИСКО ОТ ЕЧЕМИК И РАЗПОЗНАВАНЕ НА ФРАГМЕНТИТЕ ОТ МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА**

Demirevska-Kepova K., **Simova-Stoilova L.**, Juperlieva-Mateeva B., Kyurkchiev S.  
Proceedings of the First Balkan Botanical Congress, Thessaloniki, Greece, Sept. 1997,  
*Progress in Botanical Research*, Eds.: I. Tsekos and M Moustakas,  
Kluwer Acad. Publ., 211-214

**Резюме:** Направен е опит за по-детайлна характеристика на епитопите върху молекулата на Рубиско, разпознавани от набор от 4 моноклонални антитела, посредством ограничена протеолиза на ензима и имуноблотинг. Използвани са две протеази с различна специфичност на късане на белтъка, с които е третирана нативна и полуденатурирана Рубиско. Антителата разпознават редица фрагменти от голямата субединица на Рубиско. Различия между тях се появяват едва при фрагментите с по-ниска молекулна маса, което е в подкрепа на установеното по-рано припокриване на разпознаваните епитопи.

**1999**

**BARLEY LEAF RUBISCO, RUBISCO BINDING PROTEIN AND RUBISCO ACTIVASE AND THEIR PROTEIN/PROTEIN INTERACTIONS**

**РУБИСКО, РУБИСКО СВЪРЗВАЩ БЕЛТЪК И РУБИСКО АКТИВАЗА ОТ ЛИСТА НА ЕЧЕМИК И ТЕХНИТЕ БЕЛТЪК-БЕЛТЪК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

Demirevska-Kepova K., **Simova-Stoilova L.**, Kyurkchiev S.  
*Bulg. J. of Plant Physiol.* 25 (3-4), 31-44, ISSN 1312-8183 (Print) 1312-8221 (Online)

**Резюме:** Доказано е съществуването на белтък/белтък взаимодействия между Рубиско и Рубиско свързващ белтък, Рубиско и Рубиско активаза в присъствие и в

отсъствие на АТФ-регенерираща система. Използвана е ELISA в сандвич и инхибиторна конструкции, коимунопреципитация и имуноблотинг с моноклонални антитела срещу Рубиско от ечемик и поликлонални антитела срещу Рубиско свързващ белтък и Рубиско активаза. Резултатите показват, че в белтък-белтък взаимодействията участва голямата субединица на Рубиско, като местата на контакт на ензима с Рубиско активазата и с Рубиско свързващия белтък са разположени на разстояние от активния център и от местата, разпознавани от моноклоналните антитела.

**2000**

**IMMUNOCHEMICAL PROOF FOR PROTEIN/PROTEIN INTERACTIONS  
BETWEEN RUBISCO AND RUBISCO ACTIVASE**

**ИМУНОХИМИЧНИ ДОКАЗАТЕЛСТВА ЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
МЕЖДУ РУБИСКО И РУБИСКО АКТИВАЗАТА**

Demirevska-Kerova K., **Simova-Stoilova L.**, Kyurkchiev S.

Proceedings of the Second Balkan Botanical Congress "*Plants of the Balkan Peninsula: into the next Millennium*", Istanbul, Turkey, Vol. II, 67-75; edited by N. Gözökirmizi

**Резюме:** Доказано е съществуването на белтък-белтък взаимодействия между Рубиско и Рубиско активаза посредством имунохимични методи при използване на моноклонални и поликлонални антитела срещу Рубиско от ечемик. Взаимодействието не зависи от наличие или липса на АТФ-регенерираща система, както и от различните форми на Рубиско – активирана с  $\text{CO}_2$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , неактивирана без  $\text{CO}_2$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , в комплекс с рибулозо-1,5-бисфосфат или с карбоксиарабинитол-1,5-бисфосфат. Резултатите показват, че белтък-белтък взаимодействията са локализирани върху голямата субединица на Рубиско на места различни от активния център на ензима и несъвпадащи с местата за свързване с моноклоналните антитела, като най-силно е взаимодействието между комплекса Рубиско-рибулозобисфосфат и Рубиско активазата.

**SENSITIVE AVIDIN-BIOTIN TEST SYSTEM FOR RUBISCO SPECIFIC  
PROTEOLYTIC ACTIVITY**

**ЧУВСТВИТЕЛНА АВИДИН-БИОТИН ТЕСТ-СИСТЕМА ЗА РУБИСКО СПЕЦИФИЧНА  
ПРОТЕОЛИТИЧНА АКТИВНОСТ**

**Simova-Stoilova L.**, Demirevska-Kerova K

*Доклади на БАН* 53 (5), 97-100; ISSN 0861-1459

**Резюме:** Разработен е чувствителен тест за оценка на Рубиско-специфична протеолиза основан на взаимодействие между биотинилирана Рубиско и

авидин/авидин-пероксидаза. Методът е приложен както към груб екстракт, така и към пречистен препарат на Рубиско.

**TOTAL AND RUBISCO SPECIFIC PROTEOLYTIC ACTIVITY DURING DARK INDUCED  
SENESCENCE OF BARLEY SEEDLINGS**

**ОБЩА И РУБИСКО-СПЕЦИФИЧНА ПРОТЕОЛИТИЧНА АКТИВНОСТ ПРИ  
ПРЕДИЗВИКАНО ОТ ТЪМНИНА СТАРЕЕНЕ В МЛАДИ ЕЧЕМИЧЕНИ РАСТЕНИЯ**  
**Simova-Stoilova L., Demirevska-Kepova K., Stoyanova Zl.**

*Bulg. J. Plant Physiol.* 26 (1-2), 15-26 ISSN 1312-8183 (Print) 1312-8221 (Online)

**Резюме:** Шестдневни ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L., сорт Хемус) са поставени на тъмно с цел предизвикване на изменения подобни на стареене. Симптомите на стареене и обратимостта на процесите са проследявани чрез анализ на съдържанието на листни пигменти, нивото на общ разтворим и на Рубиско имунореактивен белтък и общата протеолитична активност със субстрат казеин. Специфичното разграждане на Рубиско е оценявано посредством високочувствителен авидин-биотин ELISA метод. Резултатите не подкрепят участие на металопротеаза или АТФ-зависима протеаза при разграждане на Рубиско в листни екстракти по време на третирането с тъмнина. Предполага се, че преди самото разграждане на Рубиско може да става ензимна модификация, агрегиране и/или асоцииране с мембрани.

**2001**

**ONTOGENIC CHANGES IN LEAF PIGMENTS, TOTAL SOLUBLE PROTEIN AND RUBISCO IN  
TWO BARLEY VARIETIES IN RELATION TO YIELD.**

**ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИСТНИТЕ ПИГМЕНТИ, ОБЩИЯ РАЗТВОРИМ БЕЛТЪК И РУБИСКО В ДВА  
СОРТА ЕЧЕМИК В ХОДА НА ОНТОГЕНЕЗАТА ВЪВ ВРЪЗКА С ДОБИВА**  
**Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Demirevska-Kepova K.**

*Bulg. J. Plant Physiol.* 27 (1-2), 15-24; ISSN 1312-8183 (Print) 1312-8221 (Online)

**Резюме:** Във вегетационен почвен опит да добив са сравнени два сорта фуражен ечемик (*Hordeum vulgare* L.) – Хемус и Карнобат, съответно с високо и ниско съдържание на Рубиско в напълно развит първи лист (Metodiev and Demirevska-Kepova, 1992). Измененията в съдържанието на листните пигменти, нивото на общия разтворим и на Рубиско имунореактивен белтък са проследени в 6 фенофази – трети лист, братене, вретене, изкласяване, цъфтеж и млечна зрелост.

Независимо от различията, наблюдавани в първичните листа по отношение количество на Рубиско, резултатите показват поддържане на високи нива на фотосинтетични компоненти във фазите, критични за напълване на зърното. Следователно, използването на Рубиско като ранен селекционен маркер за подобрен добив не е достатъчно. Въпросът доколко съдържанието на Рубиско в листата по време на периода на напълване на зърната може да бъде полезен маркер за продуктивност, остава открит и се нуждае от по-нататъшни изследвания.

**2002**

**PURIFICATION OF RUBISCO FROM HIGHER PLANTS AND ITS IMMUNOCHEMICAL  
QUANTITATION IN LEAF EXTRACTS (INVITED REVIEW)**

**ПРЕЧИСТВАНЕ НА РУБИСКО ОТ ВИСШИ РАСТЕНИЯ И ИМУНОХИМИЧНОТО МУ  
ОПРЕДЕЛЯНЕ В ЛИСТНИ ЕКСТРАКТИ (ОБЗОР ПО ПОКАНА)**

**Simova-Stoilova L., Demirevska-Kepova K.**

*Recent Research Developments in Biotechnol. and Bioengineering*, 36-56. Editors S.K. Bhattacharya, T. Mal, S. Chakrabarti; ISBN 81-7736-176-7

**Резюме:** Направен е сравнителен анализ на публикуваните методи за изолиране и пречистване на Рубиско от висши растения, както и на методите за определяне на съдържанието на Рубиско, като са обяснени основните принципи. В подробности е описано пречистването на Рубиско от листа на ечемик (*Hordeum vulgare* L.) и имунохимичното му определяне посредством ELISA. Обсъдени са измененията в съдържанието на Рубиско сред различни растителни видове, сортове, в хода на онтогенезата и при стресови условия.

**RUBISCO SPECIFIC PROTEOLYSIS IN BARLEY CHLOROPLASTS  
DURING DARK INDUCED SENESCENCE.**

**РУБИСКО-СПЕЦИФИЧНА ПРОТЕОЛИЗА В ХЛОРОПЛАСТИ ОТ ЕЧЕМИК  
ПО ВРЕМЕ НА ИНДУЦИРАНО ОТ ТЪМНИНА СТАРЕЕНЕ**

**Simova-Stoilova L., Demirevska-Kepova K., Stoyanova Z.** *Photosynthetica* 40 (4), 561-566; ISSN 0300-3604 (Print) 1573-9058 (Online) **IF 0.807** (2002)

**Резюме:** Изолирани са интактни хлоропласти от първи лист на стареещи на тъмно ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L.) с цел изследване на селективното разграждане на рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза/ оксигеназата (Рубиско) в



стромална и мембранна фракции. Специфичното разграждане на Рубиско е оценявано чрез прилагане на чувствителен авидин-биотинов ELISA метод със субстрати – немодифицирана или окислително модифицирана биотинилирана Рубиско. Уловени са отделни протеолитични активности, различаващи се по зависимост от АТФ и двувалентни метални йони, по инхибиторен профил на протеазите, по динамика в хода на предизвиканото от тъмнина стареене. Резултатите подкрепят участието на серинов тип протеолитична активност, зависима от АТФ и метални йони в разграждането на немодифицирана Рубиско на ранен етап от стареенето. На по-късен етап се включва и АТФ-независима протеолитична активност. Окислително модифицираната биотинилирана Рубиско се разгражда от АТФ-независима протеаза от серинов тип, която вероятно съдържа съществени за ензима сулфхидрилни групи и се нуждае от двувалентни метални йони за активността си.

**EFFECT OF CU AND MN TOXICITY ON GROWTH PARAMETERS AND PHOTOSYNTHETIC  
PIGMENTS OF YOUNG BARLEY PLANTS.**

**Влияние на Cu и Mn токсичност върху показателите на растежа и  
фотосинтетичните пигменти в млади ечемичени растения**

Stoyanova Z., Simova-Stoilova L., Demirevska-Kerova K., Smilova E

*Доклади на БАН* 55 (8), 83-88. ; ISSN 0861-1459

**Резюме:** Изследвани са параметрите на растежа и фотосинтетичните пигменти в млади ечемичени растения, изложени на токсични концентрации Cu (15, 150 и 1500  $\mu\text{M}$ ) или Mn (183, 1830 и 18300  $\mu\text{M}$ ) в хранителния разтвор. Контролите съдържат 1.5  $\mu\text{M}$  Cu и 18.3  $\mu\text{M}$  Mn в средата за отглеждане. Добре изразени морфологични изменения се наблюдават 5 дни след началото на третиране. Увеличаването на концентрацията на Cu и Mn в хранителния разтвор предизвиква заедно с появата на симптоми на токсичност и значително подтискане на растежа и на натрупването на свежа биомаса в ечемичените растения. При високи дози Cu и Mn се наблюдава и изсъхване на най-горната надземна част. Съдържанието на хлорофил a и b чувствително намалява. Съотношението хлорофил a/b не се променя и при двете третираня. При излишък на Cu се увеличава съдържанието на каротеноиди, докато при излишък на Mn то намалява. Дискутирани са различни обяснения на получените резултати.

**EFFECT OF CU AND MN TOXICITY ON LEAF PROTEIN PATTERN AND  
RUBISCO QUANTITY OF YOUNG BARLEY PLANTS**

**Влияние на Cu и Mn токсичност върху листните белтъци и количеството  
на Рубиско в млади ечемичени растения**

**Simova-Stoilova L., Demirevska-Kepova K., Stoyanova Z., Smilova E.**

*Доклади на БАН Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 55 (9), 79-84. ; ISSN 0861-1459

**Резюме:** Изследвано е съдържанието на листен разтворим белтък и количеството на Рубиско в млади ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L. сорт Обзор), третирани с токсични концентрации Cu (15, 150 и 1500 µM) или Mn (183, 1830 и 18300 µM) в хранителния разтвор. Контролите съдържат 1.5 µM Cu и 18.3 µM Mn в средата за отглеждане. Наблюдава се намаляване на белтъчното съдържание и на количеството на Рубиско след третирането, което е по-ясно на база сухо тегло. Въздействието на Cu токсичност върху белтъците и Рубиско е по-силно в сравнение с това на Mn. По-детайлна картина на измененията в листните белтъци е получена посредством 12.5% SDS-PAGE електрофореза. Установено е намаляване на интензитета на полипептидните ивици, съответстващи на голямата и малка субединици на Рубиско. При третиране с най-високата концентрация на Cu се наблюдава частично разграждане на голямата субединица на Рубиско. Във вариантите с най-голям излишък на Cu и Mn се появяват две полипептидни ивици с ММ 13 и 16 kDa и се засилва ивицата с ММ 25 kDa. Тези наблюдения предполагат както общи, така и специфични биохимични механизми на Cu и Mn токсичност в листата.

**2004**

**EFFECT OF Cd TOXICITY ON GROWTH PARAMETERS, PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS,  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ACCUMULATION AND OXIDATIVE DAMAGE TO PROTEINS  
IN YOUNG BARLEY PLANTS**

**Влияние на Cd токсичност върху показателите на растежа,  
фотосинтетичните пигменти, натрупването на водороден пероксид и  
окислителното увреждане на белтъците в млади ечемичени растения**

**Stoyanova Z., Simova-Stoilova L., Demirevska-Kepova K**

*Доклади на БАН* 57 (8), 27-32; ISSN 1310-1331

**Резюме:** Ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L. сорт Обзор), отглеждани на хранителен разтвор, са подложени на нарастващи концентрации на Cd (0, 5, 50 и 500 µM) за период от 5 дни. Повишените нива на Cd в хранителната среда водят до

натрупване на Cd в надземната част. Акумулирането на Cd води до намаляване на дължината и биомасата на корените и надземната част, както и на съдържанието на хлорофил *a* и *b* в първия лист. Намаляването на свежото тегло при високи концентрации на Cd е придружено от десикация на листата. Листният разтворим белтък не се променя значително. Нивото на водородния пероксид в листата се увеличава само при третиране с най-високата концентрация на Cd, но не се наблюдава натрупване на окислително увредени белтъци.

**EFFECT OF Cd TOXICITY ON THE LEVELS OF SOME ANTIOXIDANT ENZYMES AND COMPOUNDS IN THE LEAVES OF YOUNG BARLEY PLANTS.**

**Влияние на Cd токсичност върху някои антиокислителни ензими и компоненти в листата на млади ечемичени растения**

**Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Demirevska-Kepova K**

*Доклади на БАН* 57 (8), 45-50; ISSN 1310-1331

**Резюме:** Изследвани са основни съставлящи на антиокислителната система – супероксиддисмутазна (СОД), каталазна (КАТ), гваякол-пероксидазна (ПОД) и аскорбатпероксидазна (АПОД) активности в листа на ечемик (*Hordeum vulgare* L. сорт *Обзор*), с оглед изясняване на ролята на окислителния стрес в механизмите на предизвиканата от Cd фитотоксичност. Изследвано е и съдържанието на аскорбат (АСК) и на нискомолекулни тиолни съединения. Ечемичени растения са подложени на повишени концентрации на Cd (0, 5, 50 и 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  в хранителния разтвор) за 5 дни. При най-високата доза Cd са установени намалена активност на СОД и повишени активности на КАТ и ПОД в листата. АПОД активност се променя незначително. Общият АСК пул се разширява след третиране с 50 и 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , което предполага включване на аскорбата в неензимното погасяване на активни кислородни форми при Cd токсичност. Увеличеното количество окислен АСК е обаче показател и за наличие на известен окислителен стрес. Пултът на нискомолекулни тиоли драстично се увеличава при третиране с 50 и 500  $\mu\text{M}$  Cd. Освен глутатионът, в този пул се включват и фитохелатините и това може да отразява засилената синтеза на такива съединения. Резултатите показват по-скоро вторична роля на окислителното увреждане в листа на ечемик при Cd фитотоксичност.

**BIOCHEMICAL CHANGES IN BARLEY PLANTS AFTER EXCESSIVE SUPPLY  
OF COPPER AND MANGANESE**

**БИОХИМИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ В ЕЧЕМИЧЕНИ РАСТЕНИЯ ПРИ ИЗЛИШЪК  
ОТ МЕД И МАНГАН**

Demirevska-Kerova K., **Simova-Stoilova L.**, Stoyanova Z., Hölzer R., Feller U.

*Environ. Exp. Bot.* 52 (3), 253-266; ISSN: 0098-8472 **IF 1.653** (2004)

**Резюме:** Настоящото изследване има за цел да установи измененията в някои важни белтъци отговорни за CO<sub>2</sub> фиксацията (Рубиско, Рубиско активаза - РА, Рубиско свързващ белтък –РСБ), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> асимилацията (глутаминсинтетазата – ГС, и глутамат синтазата – ГОГАТ) посредством имуноблотинг, както и в антиокислителната защита при излишък от Cu или Mn в листа на ечемик (*Hordeum vulgare* L. сорт Обзор). Определяни са активностите и изоензимните профили на супероксиддисмутазата (СОД), аскорбатпероксидазата (АПД), гваякол-пероксидазата (ПОД) и каталазата (КАТ), както и нивата на аскорбат (АСК), на нискомолекулните тиоли, количеството на водороден пероксид и окислителното увреждане на белтъците. Данните са отнесени към натрупването на Cu или Mn в листата след 5-дневно подаване на излишък от тежък метал през хранителния разтвор. При най- високата доза Cu (1500 µM) голямата и малка субединици на Рубиско са значително намалели, докато при най-високата доза Mn (18300 µM) се наблюдават малки изменения в субединиците на Рубиско. РСБ намалява при най-високите концентрации и на Cu, и на Mn. Ивиците, съответстващи на РА, се променят различно при Cu и Mn токсичности. ГС намалява, а ГОГАТ изчезва при най- високата доза Cu. При излишък а Mn ГОГАТ намалява, докато ГС не се променя видимо. Развиването на симптоми на токсичност съответства на натрупването на Cu или Mn в листата и на постепенно увеличаване на белтъчното карбонилиране, на по-ниска СОД активност и на повишени КАТ и ПОД активности. АПОД активност намалява при Mn токсичност и не се променя при излишък на Cu. Измененията в изоензимните профили на изследваните антиокислителни ензими са подобни и при двете токсичности. Натрупване на водороден пероксид е наблюдавано само при излишък на Mn. При сравняване на двете токсичности се забелязват контрастиращи изменения в нискомолекулните антиоксиданти. Излишъкът на Cu влияе най-вече върху небелтъчните сулфхидрилни групи, докато Mn токсичност засяга количеството на АСК. Най-вероятно окислителният стрес при Cu или Mn токсичност е следствие от изчерпването на нискомолекулните антиоксиданти като резултат от въвличането им в детоксификационните процеси, както и на дисбаланса на антиокислителните ензими. Обсъжда се връзката между натрупването на тежки метали в листата,

водещо до различна проява на окислителния стрес, и измененията в нивата на отделни хлоропластни белтъци.

2005

ANTIOXIDATIVE PROTECTION IN THE LEAVES OF DARK-SENESCING INTACT  
BARLEY SEEDLINGS

АНТИОКИСЛИТЕЛНА ЗАЩИТА В ЛИСТАТА НА СТАРЕЕЩИ НА ТЪМНО ИНТАКТНИ  
МЛАДИ ЕЧЕМИЧЕНИ РАСТЕНИЯ

Simova-Stoilova L., Demirevska-Kepova K., Stoyanova Z.

*Acta Physiol. Plantarum* 27, 3B, 349-356; ISSN: 0137-5881 (print); ISSN: 1861-1664  
(electronic version); IF 0.379 (2005)

**Резюме:** С цел да се изясни дали е възможно окислителна модификация на Рубиско *in vivo* да бъде пусковият механизъм за преимуществено разграждане на този ензим на ранен етап на стареене, са изследвани някои антиоксидантни съединения, защитни ензими, нивата на водороден пероксид и карбонилирането на белтъците в листа от ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L. сорт *Обзор*) в хода на индуцирано от тъмнина стареене. Анализите са както в листни екстракти, така и в пречистени хлоропласти. В хода на третирането е установено известно отслабване на антиокислителната защита – намаляване на пуловете на аскорбата и на небелтъчните тиоли (предимно глутатион), по-ниски активности на супероксид дисмутазата, на гваякол- и аскорбат-пероксидазите. Въпреки това, не е регистрирано натрупване на водороден пероксид, измерени са по-ниски нива на белтъчно карбонилиране на тъмно, а процентът на редуциран аскорбат остава висок. Що се отнася до хлоропластите, при предизвикано стареене се наблюдава известен дисбаланс между аскорбатния и глутатионов пулове. Количеството небелтъчни тиоли намалява на ранен етап от стареенето, докато нивото на аскорбата остава непроменено. Процентът на редуцирания аскорбат в хлоропластите се запазва висок. Без промяна са и активностите на супероксиддисмутазата и на аскорбат пероксидазата. Резултатите не се съгласуват с вероятността за *in vivo* окислителна модификация на Рубиско при индуцирано от тъмнина стареене. Данните са в подкрепа на редокс-регулация на обмяната на Рубиско при стареене посредством пула на нискомолекулните хлоропластни тиолни съединения.

**HEAT STRESS EFFECTS ON RUBISCO, RUBISCO BINDING PROTEIN AND  
RUBISCO ACTIVASE IN WHEAT LEAVES**

**ЕФЕКТИ НА ТОПЛИНИЯ СТРЕС ВЪРХУ РУБИСКО, РУБИСКО СВЪРЗВАЩ БЕЛТЪК И  
РУБИСКО АКТИВАЗА В ЛИСТА НА ПШЕНИЦА**

Demirevska-Kerova K., Hölzer R., **Simova-Stoilova L.**, Feller U.

*Biologia Plantarum* 49 (4), 521-525; ISSN: 1573-8264 (electronic)

ISSN: 0006-3134 (print version) **IF 0.792** (2005)

**Резюме:** Изследвани са измененията в съдържанието на хлорофил, Рубиско, Рубиско свързващ белтък, Рубиско активазата, големите и малки субединици на Рубиско, както и изтичането на електролити в листни сегменти от пшеница, след топлинен стрес за 1 час и 24 часа при 40°C на светло и на тъмно, както и след възстановяване от топлинния стрес за 24 часа при 25°C на светло. Топлинното третиране за 24 часа на тъмно води до необратимо намаляване на фотосинтетичните пигменти, разтворимия белтък, Рубиско, Рубиско свързващия белтък, Рубиско активазата, големите и малки субединици на Рубиско, което е съпътствано от силно увеличаване на изтичането на електролити. При топлинен стрес за 24 часа на светло се увеличава съдържанието на Рубиско активазата и Рубиско свързващия белтък в съгласие с тяхната роля като каточаперони или белтъци на топлинния шок.

**2006**

**PROTEOLYTIC ACTIVITY IN WHEAT LEAVES DURING DROUGHT STRESS AND RECOVERY  
ПРОТЕОЛИТИЧНА АКТИВНОСТ В ЛИСТА НА ПШЕНИЦА ПРИ ЗАСУШАВАНЕ И  
ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ ОТ ВОДЕН СТРЕС**

**Simova-Stoilova L.**, Vassileva V., Petrova T., Tsenov N., Demirevska K., Feller U.

*General and Applied Plant Physiology*, Special Issue, 32 (1-2), 91-100;

ISSN 1312-8183 (Print) 1312-8221 (Online)

**Резюме:** Изследвани са осем сорта зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.) с различна устойчивост на засушаване в полски условия. Растенията са отглеждани като почвени култури и са поливани ежедневно за поддържане на 70% относителна почвена влажност. Постепенен воден стрес е предизвикан в растения с напълно развит първи лист чрез прекратяване на напояването за седем дни, последвано от триденно възстановяване чрез възобновяване на поливането. В третираните растения водният дефицит достига до 60%. Наблюдават се междусортови различия в мембранната стабилност. След възстановяване водният статус на листата и

мембранната стабилност са близки до тези на контролите. В зависимост от сорта, белтъчното съдържание на листата не се променя или намалява при засушаване и се възстановява след прекратяване на въздействието. Намаленото белтъчно съдържание при засушаване се съгласува с по-висока азоказеинолитична активност при рН 5.0 и рН 8.5. След възстановяване нивото на протеолитична активност намалява. Оцветяването за протеазна активност в гел на един сорт устойчив на засушаване (Златица) и един чувствителен (Мизия) разкрива две протеазни ивици с различен отговор на суша и спрямо протеазни инхибитори. Измененията в SDS-PAGE при стрес са по-изразени в чувствителния сорт в сравнение с устойчивия. Високата обща ендопептидазна активност е свързана по-скоро с чувствителност на засушаване, отколкото с устойчивост.

**CADMIUM STRESS IN BARLEY: GROWTH, LEAF PIGMENT AND PROTEIN COMPOSITION AND DETOXIFICATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES.**

**КАДМИЕВ СТРЕС ПРИ ЕЧЕМИК: РАСТЕЖ, ПИГМЕНТЕН И БЕЛТЪЧЕН СЪСТАВ НА ЛИСТАТА И ОБЕЗВРЕЖДАНЕ НА АКТИВНИТЕ ПРОИЗВОДНИ НА КИСЛОРОДА**

Demirevska-Kepova K., **Simova-Stoilova L.**, Stoyanova Z., Feller U.

*J. of Plant Nutrition* 29 (3), 451-458; Print ISSN: 0190-4167

Online ISSN: 1532-4087; **IF 0.441** (2006)

**Резюме:** Ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L. сорт *Обзор*) са третирани с нарастващи концентрации на Cd (0, 5, 50 и 500  $\mu\text{M}$ ) в хранителния разтвор. Третирането с Cd води до намаляване дължината на растенията, биомасата и съдържанието на листни пигменти. Количеството листен разтворим белтък не се променя съществено. SDS-PAGE показва леко намаляване на субединиците на Рубиско и появата на нова нискомолекулна ивица след третиране с 50 и 500  $\mu\text{M}$  Cd. Антиокислителната защита в листата под въздействие на Cd токсичност е изследвана в детайли. Най-високите дози Cd предизвикват леко намаляване на супероксиддисмутазната активност, увеличаване на каталазната и силно повишаване на общата пероксидазна активност. Аскорбатпероксидазната активност не се променя значително. Изоензимният профил на изследваните антиокислителни ензими е слабо повлиян, без да се наблюдава синтез на нови изоформи. Съдържанието на окислен аскорбат се увеличава при третиране с 50 и 500  $\mu\text{M}$  Cd. Нивото на водородния пероксид нараства едва при 500  $\mu\text{M}$  Cd, без натрупване на малондиалдехид и на окислително модифицирани белтъци. Нискомолекулните тиолни съединения се покачват до 4 пъти след третиране с 50 и 500  $\mu\text{M}$  Cd. Резултатите се съгласуват с индуциране на механизми, позволяващи

ограничаване и имобилизиране на Cd. Минимални са ефектите, дължащи се на окислителен стрес.

**2007**

**IMPROVED PHYTOACCUMULATION OF CADMIUM BY GENETICALLY MODIFIED TOBACCO PLANTS (*NICOTIANA TABACUM* L.). PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSE OF THE TRANSFORMANTS TO CADMIUM TOXICITY**

**ПОДОБРЕНА ФИТОАКУМУЛАЦИЯ НА КАДМИЙ В ГЕНЕТИЧНО ИЗМЕНЕНИ ТЮТЮНЕВИ РАСТЕНИЯ (*NICOTIANA TABACUM* L.). ФИЗИОЛОГИЧЕН И БИОХИМИЧЕН ОТГОВОР НА ТРАНСФОРМАНТИТЕ КЪМ КАДМИЕВА ТОКСИЧНОСТ**

Gorinova N., Nedkovska M., Todorovska E., **Simova-Stoilova L.**, Stoyanova Z., Georgieva K., Demirevska-Kepova K., Atanassov A., Herzog R.

*Environmental Pollution* 145, 161-170; ISSN: 0269-7491; **IF 3.135** (2007)

**Резюме:** Сравнен е отговорът на тютюневи растения (*Nicotiana tabacum* L.) – нетрансформирани и трансформирани с металотионеинов ген *Mthis* от *Silene vulgaris* L. – към увеличено количество кадмий в хранителната среда. Трансгенните растения натрупват значително повече Cd както в корените, така и в листата си. Видимите симптоми на токсичност и нарушеният воден баланс съответстват на натрупването на Cd в тъканите. Третирането с 300 µM CdCl<sub>2</sub> води до инхибиране на фотосинтезата и до мобилизация на аскорбат-глутатионовия цикъл. Третирането с 500 µM CdCl<sub>2</sub> има за резултат необратимо увреждане на фотосинтезата и развиване на окислителен стрес. При най-високата концентрация на Cd се наблюдават изменения в профила на листните полипептиди и поява на нова изоформа на пероксидазата. Нивото на небелтъчните тиоли постепенно се увеличава след третиране с Cd както при трансгенните, така и при нетрансгенните растения.

**UV-B RESPONSE OF GREEN AND ETIOLATED BARLEY SEEDLINGS**

**UV-B ОТГОВОР НА ЗЕЛЕНИ И ЕТИОЛИРАНИ ЕЧЕМИЧЕНИ РАСТЕНИЯ**

Fedina I., Velichkova M., Georgieva K., Demirevska K., **Simova L.**

*Biologia Plantarum* 51(4), 699-706. ISSN: 1573-8264 (electronic) ISSN: 0006-3134 (print version) **IF 1.259** (2007)

**Резюме:** Седемдневни зелени и етиолирани ечемичени растения (*Hordeum vulgare* L. сорт Алфа) са облъчени с UV-B за 30 мин, след което са държани 24 часа на тъмно или на светло. В резултат на UV-B радиацията синтеза на хлорофил е



инхибиран с около 30%, но без значими изменения във фотохимичната активност, измервана чрез съотношението вариабилна към максимална флуоресценция, квантовия добив и скоростта на кислородно отделяне. Електронният транспорт в етиолираните растения е подобен на този в зелените, но съдържанието на хлорофил е два пъти по-малко. Голямата и малката субединици на Рубиско намаляват в резултат на UV-B третирането както в етиолираните, така и в зелените растения, особено силно в държаните на тъмно. Каталазната активност намалява, а общата супероксиддисмутазна активност се увеличава в стресираните растения. Появява се допълнителна пероксидазна ивица между гваякол-пероксидаза 2 и 3 (гваякол-пероксидаза X) при използване на субстрат бензидин, която е специфична за UV-B третирането. В резултат на облъчването, съдържанието на някои UV-B-абсорбиращи и UV-B-индуцирани съединения се увеличава в зелените, но не и в етиолираните растения.

**2008**

**DROUGHT INDUCED LEAF PROTEIN ALTERATIONS IN  
SENSITIVE AND TOLERANT WHEAT VARIETIES**

**ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ ЗАСУШАВАНЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИСТНИТЕ БЕЛТЪЦИ ПРИ  
ЧУВСТВИТЕЛНИ И УСТОЙЧИВИ СОРТОВЕ ПШЕНИЦА**

Demirevska K., **Simova-Stoilova L.**, Vassileva V., Vaseva I., Grigorova B., Feller U.,  
*General and Applied Plant Physiology*, Special Issue, 34 (1-2), 79-102  
ISSN 1312-8183 (Print) 1312-8221 (Online)

**Резюме:** Пшеничени растения с напълно развит първи лист са подложени на силен, но обратим воден стрес. За анализи са използвани листа от устойчиви на суша (*Катя* и *Златица*) и чувствителни (*Садово* и *Мизия*) сортове в контролни условия, засушаване и възстановяване. Физиологичният отговор на устойчивите сортове към суша на ранен стадий на развитие не се различава от този на чувствителните. Сравнителното изследване на свръхтънки срези от контролни и стресирани растения чрез трансмисионна електронна микроскопия разкрива значителни изменения във фината структура на митохондриите. Относителният клетъчен обем, заеман от митохондриите, е намален при чувствителните на засушаване сортове. Регистрирано е увеличено количество на абсцисиева киселина в засушените растения. Чувствителните на засушаване сортове (*Мизия* и *Садово*) имат по-висока азоказеинолитична активност. Направен е имуноблотинг анализ на измененията в някои специфични белтъци при засушаване - Рубиско, Рубиско активаза, Рубиско свързващ белтък, дехидрини, белтъци на топлинния шок, АТФ-

зависими калпаин-протеази. Получените резултати показват, че устойчивите на засушаване сортове *Катя* и *Златица* имат по-високи нива на тези белтъци, особено на Рубиско-свързващия белтък и калпаиновите протеази. Вниманието е насочено към координирания отговор на Рубиско, Рубиско активазата, Рубиско свързващ белтък, дехидрини, белтъци на топлинния шок, калпаин-протеази при засушаване. Дискутира се разликата в биохимичния отговор между чувствителни и устойчиви на засушаване сортове пшеница.

**RUBISCO AND SOME CHAPERONE PROTEIN RESPONSES  
TO WATER STRESS AND REWATERING AT EARLY SEEDLING GROWTH  
OF DROUGHT SENSITIVE AND TOLERANT WHEAT VARIETIES  
ОТГОВОР НА РУБИСКО И НА НЯКОИ ЧАПЕРОНОВИ БЕЛТЪЦИ  
КЪМ ВОДЕН СТРЕС И ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ НА РАНЕН СТАДИЙ НА РАСТЕЖ ПРИ СОРТОВЕ  
ПШЕНИЦА ЧУВСТВТЕЛНИ И УСТОЙЧИВИ НА ЗАСУШАВАНЕ  
Demirevska K., Simova-Stoilova L., Vassileva V., Feller U.**

*Plant Growth Regulation* 56, 97–106;

ISSN: 0167-6903 (print version) ISSN: 1573-5087 (electronic version); **IF 1.333** (2008)

**Резюме:** Четири сорта пшеница с различна устойчивост на засушаване са подложени на силен, но обратим воден стрес на ранен стадий от развитието им. За оценка на интензивността на стреса и степента на възстановяване са използвани показателите на растежа, листният воден дефицит и изтичането на електролити. Физиологичният отговор на сортовете към силно засушаване е твърде сходен. Профилът на листните белтъци и нивата на някои индивидуални белтъци, имащи отношение към поддържането на Рубиско, са изследвани в контролни, стресирани и възстановени растения посредством електрофореза и имуноблотинг. Ивиците, отговарящи на голямата субединица на Рубиско, нейните N- и C- крайща, на Рубиско активазата, Рубиско свързващия белтък (срп 60), както и на чапероновите и протеолитични субединици на С1р протеазен комплекс са идентифицирани посредством поликлонални антители. Ивиците на голямата субединица на Рубиско, С1р протеазите, и особено Рубиско свързващия белтък са засилени, докато тези на Рубиско активазата се променят слабо. Устойчивите на засушаване сортове имат по-високо съдържание на Рубиско свързващ белтък в контролни и стресови условия. Неговото ниво може да бъде маркер за сухоустойчивост.

ANTIOXIDATIVE PROTECTION IN WHEAT VARIETIES UNDER SEVERE  
RECOVERABLE DROUGHT AT SEEDLING STAGE  
АНТИОКИСЛИТЕЛНА ЗАЩИТА В СОРТОВЕ ПШЕНИЦА ПОДЛОЖЕНИ НА СИЛЕН  
ОБРАТИМ ВОДЕН СТРЕС НА РАНЕН СТАДИЙ НА РАЗВИТИЕ

Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T., Tsenov N., Feller U.

*Plant Soil and Environment* 54 (12), 529–536;

ISSN 1214-1178 IF 0.697 (2009)

**Резюме:** Изследвана е антиокислителната защита в листа на четири сорта зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.), различаващи се по сухоустойчивост в полски условия, на ранен стадий на развитие посредством прекратяване на напояването за 7 дни (57-59% листен воден дефицит), последвано от възстановяване. Трикратното увеличение на изтичането на електролити и рязкото нарастване на количеството пролин в листата съответстват на силата на стреса. Съдържанието на водороден пероксид и каталазната активност са ниски при приложени стрес. Пероксидазната активност нараства, докато супероксиддисмутазната активност слабо се променя. Количеството на аскорбат и на нискомолекулни тиоли намалява при силно засушаване и се възстановява при снемане на стреса. Нивото на малондиалдеhid не се променя значимо в стресираните растения, но нараства след подновяване на напояването. При възстановяване се наблюдава повишена каталазна активност и намалена пероксидазна активност. Чрез оцветяване в гел са проявени три форми на супероксиддисмутазата, една на каталазата и три на неспецифичните пероксидази. В отговора към засушаване на ранен етап на развитие доминираща роля има натрупването на пролин. На ранен стадий от развитието на растенията не е намерено съответствие между чувствителност или толерантност към засушаване и междусортови различия в антиокислителния отговор.

2009

ANTIOXIDATIVE PROTECTION AND PROTEOLYTIC ACTIVITY IN TOLERANT AND  
SENSITIVE WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) VARIETIES  
SUBJECTED TO LONG-TERM FIELD DROUGHT

АНТИОКИСЛИТЕЛНА ЗАЩИТА И ПРОТЕОЛИТИЧНА АКТИВНОСТ В ТОЛЕРАНТНИ И  
ЧУВСТВИТЕЛНИ СОРТОВЕ ПШЕНИЦА (*TRITICUM AESTIVUM* L.), ПОДЛОЖЕНИ НА  
ПРОДЪЛЖИТЕЛНО ЗАСУШАВАНЕ В ПОЛСКИ УСЛОВИЯ

Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T., Tsenov N., Feller U.

*Plant Growth Regulation* 58 (1), 107-117

ISSN: 0167-6903 (print version) ISSN: 1573-5087 (electronic version) 1.024 (2009)

**Резюме:** Осъществено е засушаване в полски условия за оценка на ролята на окислителния стрес и на протеолитичната активност при загубата на добив в естествени условия на стрес. Анализирани са флагови листа от два сухоустойчиви (*Янтар* и *Златица*) и два чувствителни (*Мизия* и *Добруджанка*) сорта зимна пшеница. Силата на стеса е преценявана по относителното изтичане на електролити и натрупването на пролин. Проследени са прекисното окисление на липидите, съдържанието на водороден пероксид, активностите на изоформите на супероксиддисмутазата, каталазата и неспецифичните пероксидази, както и общата протеолитична активност от стадий изкласяване до стадий наливане на зърното. При засушаване в полски условия е по-изразено окислителното увреждане на белтъците и е увеличена мембранната пропускливост при чувствителните сортове. Активностите на Fe- и Cu/Zn- SOD изоформи намаляват постепенно в контролите, но остават високи при засушените растения. Активностите на MnSOD и на каталазата се засилват към фазата наливане на зърното, особено в чувствителните сортове при засушаване. Пероксидазните активности са повишени при стрес, но постепенно намаляват с времето. Ускореното стареене при засушаване в полски условия е свързано с по-висока протеолитична активност, като се наблюдават известни сортово обусловени различия в протеолитичната активност, но без ясна връзка с устойчивост или чувствителност към суша. Засушаването на полето води до по-силен окислителен стрес, който е по-изразен за чувствителните сортове, особено по време на фаза наливане на зърното.

VARIETY-SPECIFIC RESPONSE OF WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) LEAF  
MITOCHONDRIA TO DROUGHT STRESS

СОРТОВО-СПЕЦИФИЧЕН ОТГОВОР КЪМ ЗАСУШАВАНЕ НА МИТОХОНДРИИ ОТ ЛИСТА  
НА ПШЕНИЦА (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Vassileva V., **Simova-Stoilova L.**, Demirevska K., Feller U.

*J Plant Res.* 122, 445-454;

ISSN: 0918-9440 (print version) ISSN: 1618-0860 (electronic version) IF **1.024** (2009)

**Резюме:** Основната цел на настоящата работа е да се разгледа дихателния отговор на обезводняване и последващо възстановяване в три сорта зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.), различаващи се по сухоустойчивост. При засушаване както общото дишане, така и дишането по салицилхидроксамат(SHAM)-устойчивия цитохромен път в листни сегменти намалява значимо в сравнение с добре оводнените растения. Намаляването е по-изразено в чувствителните сортове *Садово* и *Прелом*. Обратно, KCN- устойчивият SHAM-чувствителен алтернативен път е силно включен и допринася за около 80% от общото дишане. В сухоустойчивия сорт *Катя* засилването на алтернативния път е съпроводено с леко намаляване на активността на SHAM-устойчивия цитохромен път. Дишането в митохондрии, изолирани от листата, също показва сортово обусловени различия при засушаване. Митохондриите от чувствителните на суша генотипи имат ниска ефективност на окислително фосфорилиране след стресиране и възстановяване, докато митохондриите на сухоустойчивия сорт *Катя* показват по-високи стойности на фосфорилиране. Морфометричният анализ на листната ултраструктура разкрива, че митохондриите заемат около 7% от клетъчната площ в контролни растения. При засушаване тази площ е намалена до 2% в чувствителните сортове, докато в сорт *Катя* тя е около 6%. Резултатите се обсъждат във връзка с вероятните механизми, обуславящи сортово-специфичния отговор към засушаване в митохондриите.

DROUGHT STRESS EFFECTS ON RUBISCO IN WHEAT: CHANGES IN THE  
RUBISCO LARGE SUBUNIT

ЕФЕКТ НА ЗАСУШАВАНЕТО ВЪРХУ РУБИСКО В ПШЕНИЦА: ИЗМЕНЕНИЯ В  
ГОЛЯМАТА СУБЕДИНИЦА НА РУБИСКО

Demirevska K., Zasheva D., Dimitrov R., **Simova-Stoilova L.**, Stamenova M., Feller U.

*Acta Physiologiae Plantarum* 31, 1129-1138.

ISSN: 0137-5881 (print version) ISSN: 1861-1664 (electronic version) IF **1.232** (2009)

**Резюме:** Посредством двумерна електрофореза (2D-PAGE) е изследван профилът на листни разтворими белтъци от устойчиви и чувствителни на засушаване сортове

пшеница, подложени на силно, но обратимо почвено засушаване. Петната, представляващи голямата субединица на Рубиско (RLS), са идентифицирани чрез имуноблотинг с поликлонални антитела срещу Рубиско. Проявени са някои качествени и количествени различия в 2D-PAGE белтъчната картина на отделните сортове при стресови условия. Триденевният период на възстановяване не е достатъчен за достигане на количеството на Рубиско до нивата на контролите след седемдневно засушаване, особено в чувствителния сорт *Мизия*. В литературата има противоречиви данни относно намалено или увеличено количество на RLS в засушени растения. Направено е сравнение на RLS след разделяне с SDS-PAGE и с 2D-PAGE. Установено е, че белтъчният профил зависи от присъствието или отсъствието на протеазни инхибитори в буфера за екстрахиране, от начина на екстрахиране, както и от силата на стреса.

**2010**

**ABSCISIC ACID AND LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN PROFILE CHANGES IN  
WINTER WHEAT UNDER PROGRESSIVE DROUGHT STRESS**

**ИЗМЕНЕНИЯ В АБК И LEA – БЕЛЪЧНИЯ ПРОФИЛ В ЗИМНА ПШЕНИЦА  
ПРИ ПОСТЕПЕНЕН ВОДЕН СТРЕС**

Vaseva I., Grigorova B., **Simova-Stoilova L.**, Demirevska K., Feller U.

*Plant Biology* 12 (5), 698–707 ISSN - 1435-8603 **IF 2.223**(2009)

**Резюме:** Три сорта зимна пшеница (*Triticum aestivum* L., сортове *Победа*, *Катя* и *Садово*) с различна агрономична характеристика са анализирани при постепенен почвен воден стрес и възстановяване от стреса на ранен вегетационен стадий. Проследени са измененията в съдържанието на АБК, SDS-PAGE и имуноблотинг-профилите на термостабилните белтъци. Първоначално по-високите стойности на АБК в контролните растения от сортове *Победа* и *Катя* отговарят на по-ранна експресия на изследваните LEA белтъци. Комбинацията от по-високо съдържание на АБК, ранна имунодетекция на дехидрини и значително увеличаване на WZY2-транскриптите е наблюдавана в засушените листа на толерантния сорт *Катя*. Едностъпален RT-PCR анализ на някои гени за кисели дехидрини (WCOR410b, TADHN) доказва тяхната относително постоянна и висока експресия в листата на стресираните растения на ранен етап от развитие. Транскриптите на неутралните дехидрини WZY2, TaLEA2 и TaLEA3 се натрупват постепенно с нарастване на водния дефицит. В най-слабо устойчивия сорт *Садово* се наблюдава закъсняла експресия на TaLEA2 и TaLEA3 гените. Профилът на експресия на WZY2 показва

две отделни ивици, предполагайки наличие на алтернативен сплайсинг, задълбочаващ се при воден стрес.

**PROTEOLYTIC ACTIVITY AND CYSTEINE PROTEASE EXPRESSION IN WHEAT LEAVES  
UNDER SEVERE SOIL DROUGHT AND RECOVERY**

**ПРОТЕОЛИТИЧНА АКТИВНОСТ И ЕКСПРЕСИЯ НА ЦИСТЕИНОВИ ПРОТЕАЗИ В ЛИСТА  
НА ПШЕНИЦА ПРИ СИЛНО ПОЧВЕНО ЗАСУШАВАНЕ И СЛЕД ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ**

**Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., Feller U.**

***Plant Physiol. Biochem.* 48 (2-3), 200-206; ISSN 0981-9428; IF 2.485 (2009)**

**Резюме:** Изследвано е участието на киселите протеази в отговора към почвено засушаване при зимна пшеница (*Triticum aestivum* L.) на ранен стадий от развитие в три сорта, различаващи се по сухоустойчивост. Изключването на напояването за седем дни предизвиква силен воден стрес в листата, съответстващ на 60% воден дефицит. Стресираните растения са възстановявани чрез оптимално поливане за 3 дни. Установени са обратими изменения в количеството на листни пигменти и белтъци, които са в най-малка степен при устойчивия на засушаване сорт Катя. Загубата на белтък е обратно пропорционално свързана с увеличението в протеолитичната активност при рН 5 и на аминокептидазната активност при рН 7. Количествени различия между сортовете са установени само за азоказеинолитичната активност (рН 5). Устойчивият сорт Катя е с относително малко повишена кисела протеазна активност, докато най-големи стойности на тази активност са отчетени при сорт Победа. Оцветяването в гел за цистеин-активируеми протеази проявява 4-5 отделни ивички с протеолитична активност. Най-горната ивица е специфично инхибирана от E-64 (инхибитор на цистеинови протеази) и е засилена при засушаване. Посредством RT-PCR са анализирани нивата на транскриптите на две цистеинови протеази от пшеница – Та.61026 предполагаема тиолова протеаза и WCP2 пептидаза от папаинов тип. Тяхната гена експресия е подтисната в устойчивия сорт при засушаване, докато при почувствителните сортове остава непроменена или се засилва. Резултатите показват, че по-ниската протеолитична активност и намалената експресия на някои гени за цистеинови протеази при засушаване на ранна фаза от развитие на растенията може да се разглежда като индикатор за устойчивост на засушаване за отделни сортове зимна пшеница.