

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И
ГЕНЕТИКА**

СВЕТЛА НИКОЛОВА СЪБЕВА

**ВЛИЯНИЕ НА ДЕХИДРАТАЦИОННИЯ СТРЕС И АБК
ВЪРХУ РАЗТВОРИМИ БЕЛТЪЦИ И АНТИОКСИДАНТНИ
ЕНЗИМИ В ПРОРАСТЪЦИ ОТ ПШЕНИЦА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна
степен „доктор”

Научна специалност
01.06.16 – Физиология на растенията

София, 2011

Дисертационният труд е написан на 131 страници и включва 48 фигури и 1 схема. Списъкът на цитираната литература съдържа 351 литературни източника, от които 27 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения научен съвет на секция “Молекулярна биология на растителния стрес” към Института по физиология на растенията и генетика, БАН, проведено на 28.05.2010г.

Изследванията по дисертационния труд са проведени в ИФР, БАН и в NIAB, Кеймбридж, Великобритания.

Докторантката работи като асистент в секция “Молекулярна биология на растителния стрес” към Института по физиология на растенията и генетика, БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2011г. от.....ч. в заседателната зала на ИФРГ, БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 21, ет. 2, на открито заседание на Научното жури, назначено за защитата на дисертацията.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на ИФРГ-БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл.21, ет. 2, ст. 225.

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И
ГЕНЕТИКА**

СВЕТЛА НИКОЛОВА СЪБЕВА

**ВЛИЯНИЕ НА ДЕХИДРАТАЦИОННИЯ СТРЕС И АБК
ВЪРХУ РАЗТВОРИМИ БЕЛТЪЦИ И АНТИОКСИДАНТНИ
ЕНЗИМИ В ПРОРАСТЪЦИ ОТ ПШЕНИЦА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна
степен „доктор”

Научен ръководител:
доц. д-р Димитринка Недева

Рецензенти:
проф. дбн Аглика Едрева
доц. д-р Ирина Пунева

Научна специалност
01.06.16 – Физиология на растенията

София, 2011

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АБК – абсцисинова киселина
АКФ – активни кислородни форми
кДНК – комплементарна ДНК
МДА - малондиалдехид
ОЕП - относителна електрофоретична подвижност
ПАГЕ – полиакриламидна гел електрофореза
ПП - полипептид
ТХО - трихлороцетна киселина

CAT – каталаза
PCR - полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)
POX - пероксидаза
RT - обратна транскрипция (Reverse Transcription)
SDS – натриев додецилсулфат
SOD - супероксиддисмуза

УВОД

Пшеницата е най-широко отглежданото културно растение в страните от умерения климатичен пояс. Около 40% от населението на планетата я използва за изхранване. Тя е сред житните култури с най-високи годишни добиви в света като през 2007г. общата световна реколта е 607 млн тона (Shewry, 2009). За България това количество е 4 632 210 тона (2008 г).

Представени са данни, че годишната реколта от пшеница може да намалее петкратно при неблагоприятни условия като недостиг на вода и хранителни вещества, вредители и патогени. Увеличението на температурата, на концентрациите на CO₂ във въздуха, както и замърсяването на околната среда допълнително влияят върху добивите от житни растения (Semenov, 2008). Сушата, засоляването и екстремните температури са най-често срещаните стресови фактори, които влияят върху растежа и развитието на растенията. Те ограничават продуктивността и редуцират добивите на широко отглежданите култури, включително и на пшеницата, с повече от 50% (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Реализирането на песимистичните прогнози на учените за нарастване недостига на вода и повишение на средните годишни температури би довело до значително намаляване продуктивността на отглежданите култури (Khurana *et al.*, 2008).

Прорастването на семената представлява лимитиращ етап в жизнения цикъл на растенията, отглеждани в условия на стрес, тъй като това е първото взаимодействие на растенията с неблагоприятната околна среда. При тези условия се забавя прорастването, което може да се дължи на нарушения във веригата от процеси, протичащи в метаболизма на прорастването като тези промени увреждат и растежа на прорастъка (Emst, 1998).

Всички неблагоприятни фактори на околната среда пречат на растенията да реализират генетичния си потенциал (Zhu, 2002). Поради това изучаването на физиологията и биохимията на стреса при растенията представлява интерес за много изследователи и е от значение за селскостопанската практика за постигане на максимални добиви.

Направеният литературен преглед показва, че в областта на физиологията и биохимията на прорастването на семената остават неизяснени редица въпроси. Единият от тях е доколко белтъчният синтез е задължителен през различните етапи от ранното прорастване на семената. Все още не са открити специфични белтъчни маркери (ензими), свързани само с прорастването на семената или с отговора към определен стрес. Няма доказателства за синтез на белтъци, които са от съществено значение или са свързани с индукция на прорастването. Неблагоприятните ефекти на приложените стресови фактори върху прорастването на семената и растежа на прорастъците са добре характеризирани, но биохимичните механизми, лежащи в основата на прехода на прорастъка в автотрофно младо растение (seedling establishment) в условия на стрес не са достатъчно изяснени. Все още остава неизяснен начина, по който АКФ повлияват реакцията на растенията към стреса на

ранните етапи от онтогенетичното им развитие. Неизяснен остава въпросът за връзката на активността на антиоксидантните ензими и толерантността на растенията към различни видове стрес и доколко промените в ензимната активност са свързани специфично с определен вид стрес.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационният труд е:

Да се изследва ролята на лесноразтворимите белтъци и антиоксидантните ензими пероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза при отговора на прорастъщи от пшеница към дехидратационен стрес (предизвикан от ниска и висока температура, NaCl, захароза) и при третиране с АБК и H_2O_2 .

За реализиране на поставената цел бяха набелязани следните задачи:

1. Да се проследи растежът под влияние на стресовите фактори: висока (+ 38 °C), ниска (+ 10 °C) температура, засоляване (0.2 M NaCl), осмотичен стрес (0.5 M захароза), 30 μM АБК и 10 mM H_2O_2 за период от 24, 48, 72 и 96 часа от прорастването на семена от пшеница.
2. Да се определи нивото на стресовите маркери МДА и H_2O_2 при прорастване на семена от пшеница при норма и стрес.
3. Да се проследят в динамика спектрите на тотални и термостабилни лесноразтворими белтъци и полипептиди при прорастване на семената в нормални и стресови условия.
4. Да се изследват електрофоретичните профили на ензимите пероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза при прорастване на семената при норма и стрес.
5. Да се изследват нивата на транскрипция на гени, кодиращи пероксидаза и каталаза в прорастващи семена от пшеница при норма и при стрес.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени със семена от пшеница (*Triticum aestivum* L, Садово 1) получени от отгледани при полски условия растения на опитната база на ИФР-БАН.

III.1. Условия на прорастване. Семената се поставят за прорастване в термостат в рула от филтърна хартия, навлажнена с вода (контрола) или с разтвор на 0.2 M NaCl, 0.5 M захароза, 30 μM АБК или 10 mM H_2O_2 , на тъмно при температура 24°C. Контролните семена прорастват при 24°C, третиранияте с ниска температура при + 10°C, с висока температура при + 38°C. Моментът, в който водата или третиращия разтвор се добавя към сухите семена се приема като начало на прорастването.

III.2. Растежни показатели. Проби за изследване се вземат на 24, 48, 72, 96 и 120 час от началото на прорастване. Изследва се процентът на прорастване на семената под влияние на всички въздействия от 24 до 120 час на прорастването. Проследяват се и промените в свежото тегло на ендосперма, корена и надземната част и дължината на корена и надземната част.

III.3. Етапи на изследването. Проследяват се промените на интересувашите ни биохимични показатели на 0 час от прорастване на семената (сухи семена) и на 24, 48, 72, 96 час. На 24 час от прорастването се изследват ендосперма и целия зародиш, а на 48, 72 и 96 час от прорастване на семената се изследват ендосперма и корените.

III.4. Методи

III.4.1. Екстракция на разтворими белтъци и ензими. Проби от ендосперма, зародиша или корена се стриват с 0.1 М трис-НСl буфер, рН 7.1 в хаван на ледена баня. Съотношението свеж материал/буфер е 1:5 за ендосперма и 1:10 за зародиша и корена. Екстрактът се центрофугира на центрофуга Janetzki K24 (Германия) при 12 000 g 30 мин. при 4°C. Супернатантата се използва за анализ на съдържание на разтворим белтък, белтъчни и полипептидни профили с помощта на нативна и SDS-електрофореза.

III.4.2. Термостабилна белтъчна фракция. Получава се по метода на Close *et al.* (1993).

III.4.3. Определяне съдържанието на тоталния разтворим белтък - по Lowry *et al.* (1951).

III.4.4. Определяне съдържанието на малондиалдехид (МДА) по метода на Heath and Packer (1968).

III.4.5. Определяне съдържанието на H₂O₂ по йодометричния метод на Jessup *et al.* (1994).

III.4.6. Нативна електрофореза в полиакриламиден гел по Davis (1964) и Reisfeld *et al.* (1962) за катодна пероксидаза.

III.4.7. Визуализация на нативните белтъчни профили с 0.05% Кумаси синьо G-250 разтворено в 12.5% ТХО.

III.4.8. Визуализация на изоензимните профили след нативна PAGE.

III.4.8.1. Анодна POX по метода на Omstein (1964) и катодна POX по Reisfeld *et al.* (1962).

III.4.8.2. SOD по метода на Greneche *et al.* (1991).

III.4.8.3. Определяне на трите форми на SOD по Donahue *et al.* (1997).

III.4.8.4. CAT по метода на Woodbury *et al.* (1971).

III.4.9. SDS електрофореза според Laemmli (1970) и визуализация на полипептидните спектри по Nesterenko *et al.* (1994).

III.4.10. Изолиране на тотална РНК с Promega SV Total RNA Isolation System.

III.4.11. Обратна транскрипция с кит Im Prom-II Reverse Transcription System.

III.4.12. Полимеразна верижна реакция (PCR) по Baga *et al.* (1995) и Real-Time PCR анализ.

III.4.13. Статистическа обработка на резултатите.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

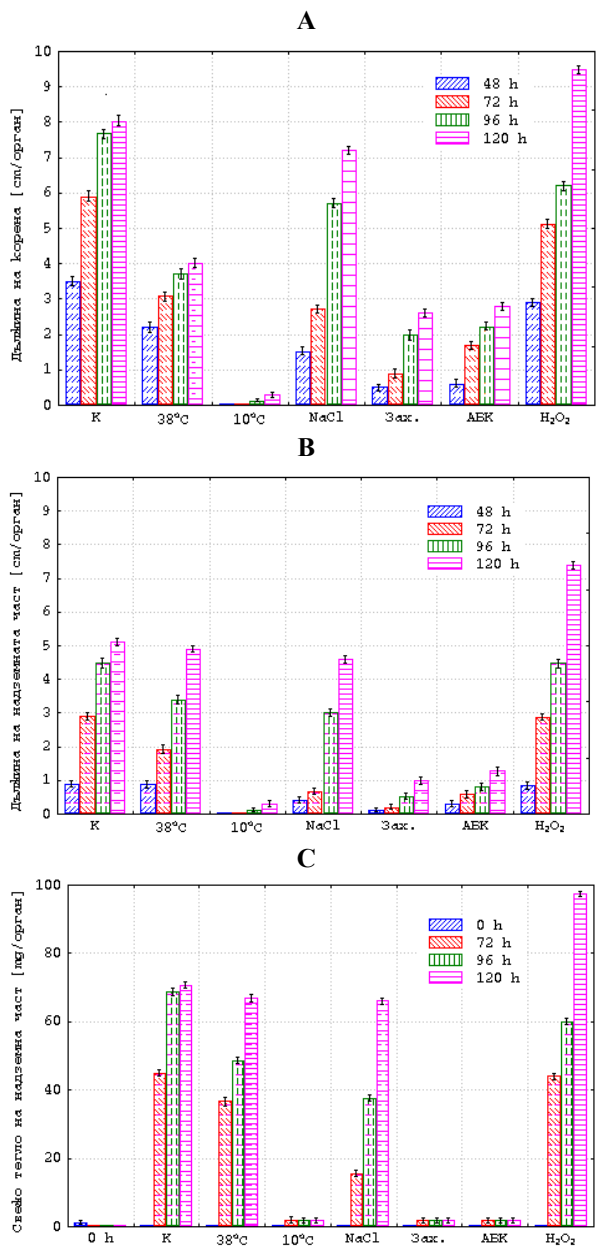
IV.1. Влияние на стресовите фактори върху растежа на прорастъците.

Всички приложени стресови фактори повлияват силно растежа на прорастъците (фиг. 1). Наблюдава се силно забавяне (88%) на растежа на корените, третиран с ниска температура, в сравнение с контролата, като това се установява дори на 120 час от началото на прорастването. Средната дължина на корените при контролата е 8 см, а на тези третиран с ниска температура е 0.3 см. Според Rymen *et al.* (2007) забавеният растеж на прорастъци от царевица под влияние на ниска температура се дължи на забавяне хода на клетъчния цикъл, а не на намален брой на меристемните клетки или на намаляване размера на зрелите клетки, както е при други абиотични стресове. Тези автори твърдят, че съществуват индуцирани от ниската температура механизми, които регулират клетъчното деление.

При нашите изследвания инхибиран е растежът на корените и под влияние на захарозата (68%) дори на късния час от началото на прорастването (120 час), където средната дължината на корена е 2.6 см, свежото му тегло е 16 mg, а дължината на корена в контролата е 8 см и свежото тегло е 50 mg. Под въздействие на H_2O_2 се установява ускоряване растежа на корените (14%) на 120 час, а растежът им под влияние на NaCl се изравнява с контролата. Същата тенденция се наблюдава и при надземната част (фиг. 1-С) като тук при третирането с NaCl и при високата температура темпът на растеж на прорастъка се изравнява с контролата, а ускоряването на растежа на надземната част от H_2O_2 спрямо контролата е 38%. Подобно активиране на растежа на прорастъци от пшеница и царевица при въздействие с H_2O_2 е установено и от Wahid *et al.* (2007-6; 2008). Според Kong *et al.* (2008) предварителното третиране на семена от пшеница с 0.1% H_2O_2 стимулира прорастването им и ускорява растежа на прорастъците, а при третиране с H_2O_2 с концентрации по-високи от 30 mM прорастването на семената се забавя.

Високата температура инхибира по-силно растежа на корените, докато ниската температура повлиява по-силно растежа на надземната част. При въздействието с ниска температура дължината на надземната част е 7 пъти по-малка, а на корена е 4 пъти по-малка в сравнение с контролата.

Известно е, че при пшеницата същинското прорастване е свързано с удължаване на клетките на корена и надземната част, а не с клетъчно деление, поради което може да се предположи, че в този случай ниската температура и захарозата влияят върху процеси свързани с клетъчната елонгация (Илли и др., 1985). Hampson and Simpson (1990-a) считат, че растежът на прорастъци от пшеница е по-чувствителен към солеви стрес, отколкото самия процес на прорастване. Yu and Rengel (1999) съобщават за инхибиране на растежа на лупина третирана със 100 mM NaCl. Подобни резултати са получени от Chen *et al.* (2003) за домати и от Eydogan *et al.* (2007) за нахут.



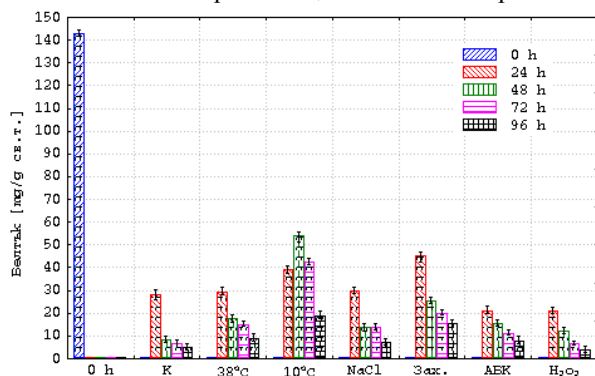
Фиг. 1. Дължина и свежо тегло на прорастъци, третираны с висока и ниска температура, NaCl, захароза, АБК, H_2O_2 . Данните са средни стойности от три измервания $\pm \text{SD}$ ($n=3$).

IV.2. Съдържание на разтворими белтъци в ендосперма и корените на прорастващи семена в условия на стрес.

Приложените стресови фактори повлияват и съдържанието на разтворимия белтък. В корените най-силно впечатление правят необичайно високите стойности за белтък на 48 час от прорастването при третирането с ниска температура, където стойността му спрямо контролата е 5.62 пъти по-висока, а за захарозата е 2.25 (фиг. 2).

При оптимални условия се наблюдава значително намаление на тоталния белтък по време на ранното прорастване в семена от пшеница (Заиров, 1987; Соловьева *и др.*, 1998) и тритикале (Чумикина *и др.*, 1999). В условия на стрес обаче се наблюдават значителни промени в съдържанието на разтворимите белтъци. В подложени на стрес семена от грах (Гумилевская *и др.*, 1993) и царевица (Riley, 1981) се наблюдава забавяне в мобилизацията на резервните белтъци. Разграждането на белтъка в началото на прорастването е съпроводено със синтез на нови полипептиди, който започва в първите часове от имбибиция на изолиран зародиш (Bewley, 1982). Според Гумилевская *и др.* (1993) и Riley (1981) усвояването на белтъчните резерви е тясно свързано с температурата при прорастването.

Във всички изследвани от нас въздействия, с изключение на H_2O_2 , на всички часове в корените се установява по-високо белтъчно съдържание. Установяваме, че забавеният растеж на корените (свежи тегла и дължини) е свързан с по-високо съдържание на разтворими белтъци, чието разграждане вероятно е забавено. Подобно на нашите резултати Ashraf and O'Leary (1999) показват, че увеличението на съдържанието на тоталните разтворими белтъци е по-високо в чувствителния към засоляване сорт пшеница и по-ниско в толерантния.



Фиг. 2. Съдържание на разтворим белтък в корени от прорастъщи, третирани с висока и ниска температура, NaCl, захароза, АБК, H_2O_2 . Данните са средни стойности от три измервания $\pm$ SD (n=3).

Редица автори се обединяват около становището, че съдържанието на белтък при стрес може да се увеличи в растенията в резултат на забавеното му използване при растежа на прорастъка (Hampson and Simpson, 1990-a, б; Kermode, 1995). Допускаме, че в нашите изследвания високото белтъчно съдържание,

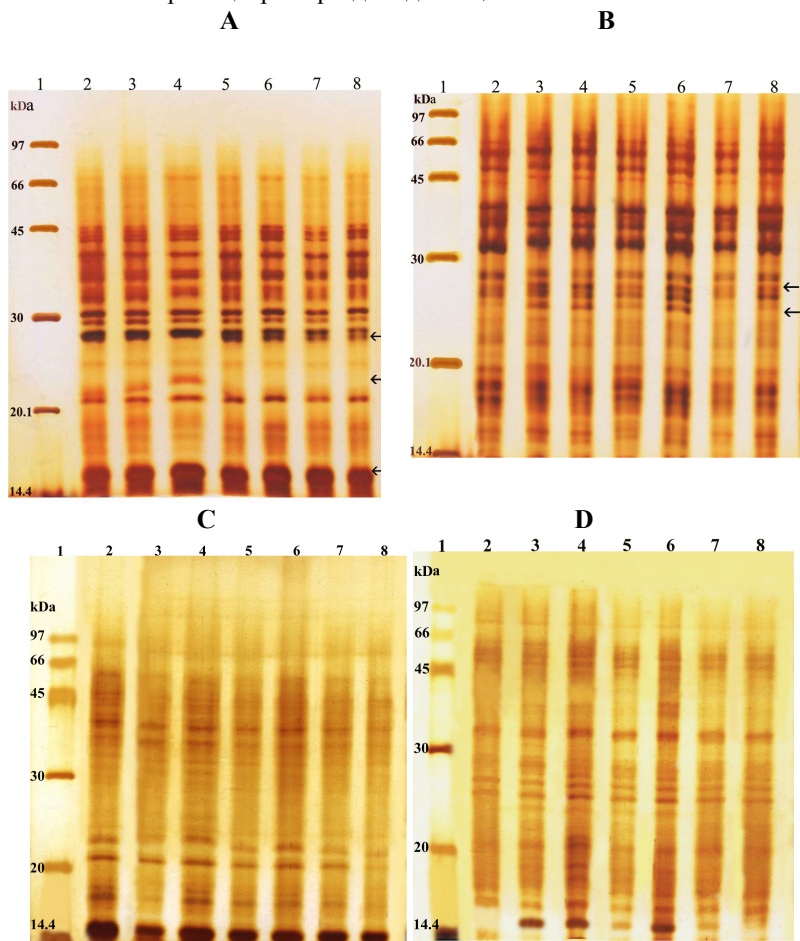
отчетено в корените, третиран с ниска температура, е следствие от подписната белтъчна мобилизация на резервите на корена, а не резултат на белтъчен синтез *de novo*. Възможни са няколко обяснения на този факт - известно е, че при нискотемпературен стрес протича стабилизация на вторичната структура на нуклеиновите киселини и вследствие се инхибира силно репликацията на ДНК, транскрипцията и транслацията на гените. Едновременно с това намалява активността на много ензими и интензивността на общия метаболизъм, а също така пропускливостта на мембраните, което затруднява транспорта на вещества в клетката (Воробьева, 2004). Sharhan and Perras (1987) показват, че рязкото понижаване на температурата води до забавяне синтеза на белтъци *de novo* в растителните клетки. Друго едно обяснение е, че липсват протеолитични ензими, синтезирани *de novo*, за да се осъществи мобилизацията на белтъците. В подкрепа на това допускане са данните на Minamikawa *et al.* (1983), че разграждането на глобулините в зародища вероятно зависи от синтеза *de novo* на протеолитични ензими. Трето възможно обяснение за забавената белтъчна мобилизация в отговор на стрес е предложено за житните растения от Fincher (1989). Известно е, че при неблагоприятни условия като дехидратационен и солеви стрес както и екстремни температури се натрупват значителни количества ендогенна АБК, което води до синтез на АБК-индуцируеми белтъци. Установено е, че тези белтъци включват инхибитори на ключови ензими, например протеази, необходими за белтъчната мобилизация в ендосперма и за прорастването.

IV.3. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА БЕЛЪТЦИ И ПОЛИПЕПТИДИ

IV.3.1. Електрофоретичен профил на тотални и термостабилни полипептиди в прорастващи семена на 24 час прорастване.

Приложените стресови фактори предизвикват промени в профилите на нативните белтъци (данните не са представени) и на полипептидите. Представени са само началният и крайният етап от изследванията на ПП спектри, тъй като останалите изследвани часове заемат междинно положение. Наблюдава се значително сходство между електрофоретичните спектри на нативните белтъци, както и в полипептидните спектри в зародишите и ендосперма, подложени на ниско и високотемпературен стрес с тази разлика, че в ендосперма на 24 час под влияние на нискотемпературния стрес се индуцира ПП с Мг 23 кДа, а под влияние на високата температура се индуцира друг 22 кДа ПП (фиг. 3). Този 23 кДа ПП се индуцира и в зародишите, третиран със захароза, екстремни температури и NaCl. Под влияние на NaCl, захароза, АБК и H₂O₂ в ендосперма се индуцира ПП с Мг 27.5 кДа. Други автори съобщават за полипептиди с подобни Мг (от 26 до 28 кДа) индуцирани от различни видове стрес NaCl (Hurkman *et al.*, 1991), АБК (Singh *et al.*, 1989), воден дефицит (Косаковская, 2003). Вероятно тези ПП са важни за отговора и адаптацията на растенията към стрес. В зародишите се индуцира термостабилен ПП с Мг 15 кДа от екстремните температури, захарозата, АБК и NaCl (фиг. 3).

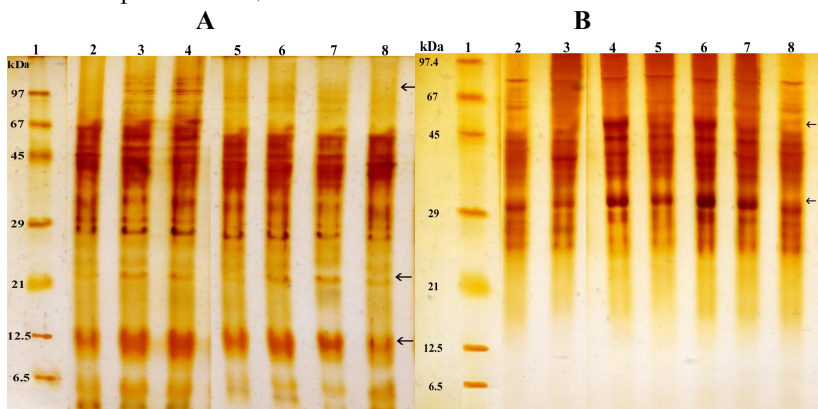
Ясно се вижда, че значителна част от тоталните ПП на този ранен час са и термостабилни. Вероятно голяма част от тях са дехидрини, характерни за семената, които се синтезират още през периода на десикацията им.



Фиг. 3. Електрофоретичен профил на тотални разтворими полипептиди в ендосперм (А) и зародиш (В), и на термостабилни разтворими полипептиди в ендосперм (С) и зародиш (D) на прорастващи семена на 24 час от началото на прорастването. Пътечка 1 - маркерни белтъци за определяне на Мт на MBI Fermentas (β -phosphorilase, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, α -lactoglobulin); пътечка 2 - контрола; пътечка 3 - 38 °C; пътечка 4 - 10 °C; пътечка 5 - NaCl; пътечка 6 - захароза; пътечка 7 - АБК; пътечка 8 - H_2O_2 . Нанесеното количество тотален белтък на всяка пътечка е 20 μ g.

IV.3.2. Електрофоретичен профил на тотални полипептиди в прорастващи семена на 96 час прорастване. При ендосперма и корените на 96 час от прорастване на семената не се откриват термостабилни полипептиди.

Обобщавайки данните за промените в профила на нативните разтворими белтъци и ПП профили от 0 час до 96 час прорастване може да се направи извод, че няма драстични промени в тези профили. Наблюдава се забавена мобилизация в резултат от въздействието на приложените стресови фактори, особено от ниската температура. Нашите резултати се различават от данните на Han and Kermode (1996) и Чиркова и Войцекoвская (1999). Тези автори съобщават за пълна смяна на набора от белтъци, които се синтезират при нормално прорастване и започване синтез на стресови белтъци.



Фиг. 4. Електрофоретичен профил на тотални разтворими полипептиди в ендосперм (А) и корен (В) на прорастващи семена на 96 час от началото на прорастването. Пътека 1 - маркерни белтъци за определяне на Мг на Serva Electrophoresis (phosphorylase B, bovine serum albumin, albumin egg, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, cytochrome C, trypsin inhibitor (bovine lung)); пътека 2 - контрола; пътека 3 - 38°C; пътека 4 - 10°C; пътека 5 - NaCl; пътека 6 - захароза; пътека 7 - АБК; пътека 8 - H₂O₂. Нанесеното количество тотален белтък на всяка пътека е 20 µg.

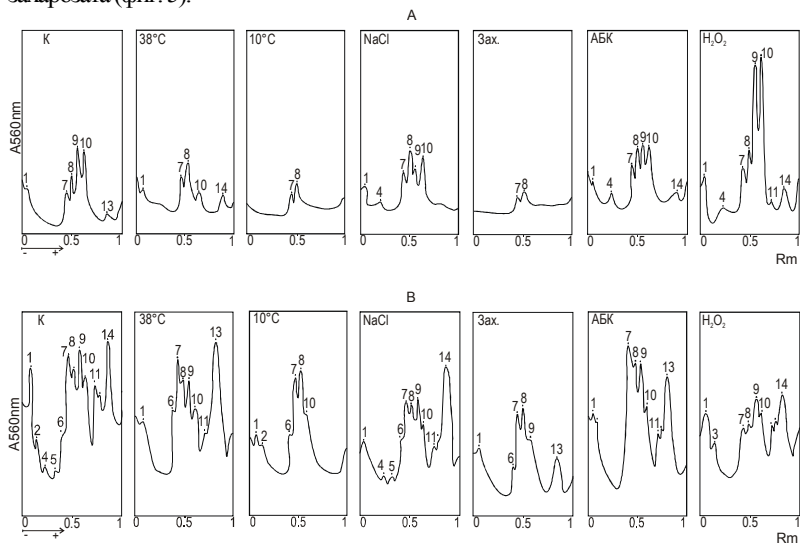
IV.4.ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНИТЕ ЕНЗИМИ

Анализът на данните за промените в активността на трите изследвани ензима POX, SOD и CAT в хода на прорастването и растежа на прорастъците показва, че и трите ензима присъстват още в сухите семена. Вероятно те са синтезирани в семената по време на формирането и развитието им и са останали неразградени в периода на десикация. Тези ензими са от изключително значение за антиоксидантната защита на най-ранните часове от прорастването, когато се натрупват значителни количества АКФ в резултат на преминаване на семето от покой към активен метаболизъм. Активностите на изоензимите на анодната и

катодна POX и на CAT са по-високи в сухите зародиши в сравнение с ендосперма, а активността на SOD е сходна и в двете части на семето. На денситограмите, великалната линия в ляво съпада със старта, а в дясно с фронта. Представени са само началният и крайният етап от изследванията на изоензимните спектри, тъй като останалите изследвани часове заемат междинно положение.

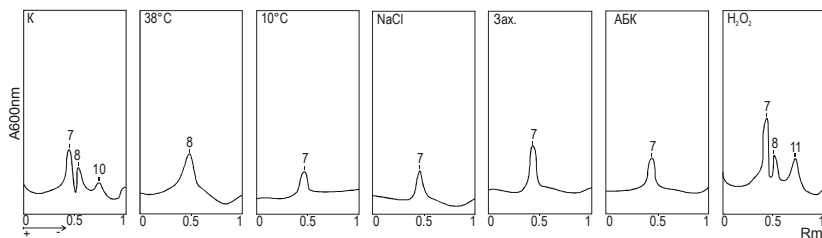
IV.4.1. Изоензимни профили на POX, SOD и CAT в прорастащи семена на 24 час прорастане.

В ендосперма и зародиша се наблюдава значително инхибиране на активността на **анодната POX** от въздействието на ниската температура и захарозата (фиг. 5).



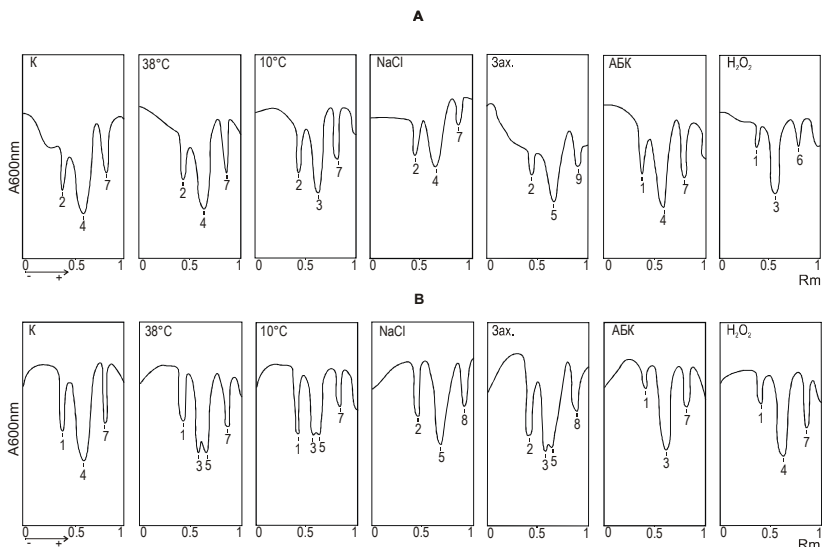
Фиг. 5. Электрофоретичен профил на анодна пероксидаза, изолирана от ендосперм (А) и зародиш (В) на 24 час прорастане. Нанесени са 100 μg белтък на гелче.

Активността на **катодната POX** във всички третирирования намалява, с изключение на H_2O_2 , където се наблюдава слаба стимулация (фиг. 6).



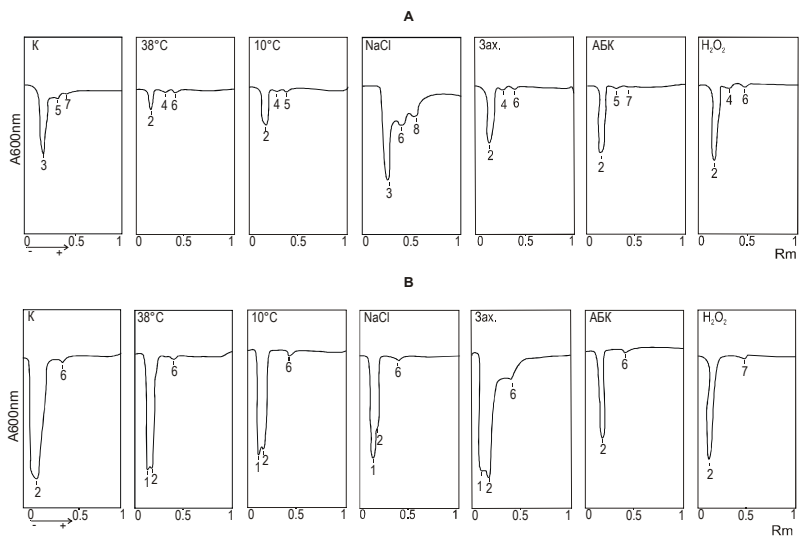
Фиг. 6. Электрофоретичен профил на катодна пероксидаза, изолирана от зародиш на прорастъци на 24 час от началото на прорастането. Нанесени са 100 μg белтък на гелче.

Висока активност на **SOD** се регистрира и в двете части на семената като най-високо активен е средноподвижният изоензим. Слабо изразено понижаване в активността на **SOD** се регистрира в ендосперма при въздействие с NaCl , а в зародиша такава тенденция се установява за ниската температура (фиг. 7).



Фиг. 7. Електрофоретичен профил на **SOD**, изолирана от ендосперм (А) и зародиш (В) на 24 час от началото на прорастването. Нанесени са 100 μg белтък на гелче.

Характерно е, че дори на този ранен час от прорастването се наблюдава известно намаляване в активността на индивидуалните изоензими на **CAT** под влияние на високата и ниската температура в ендосперма. При зародиша не се наблюдават ясно изразени ефекти на приложените фактори на въздействие с изключение на **АБК**, която понижава активността на **CAT** (фиг. 8).



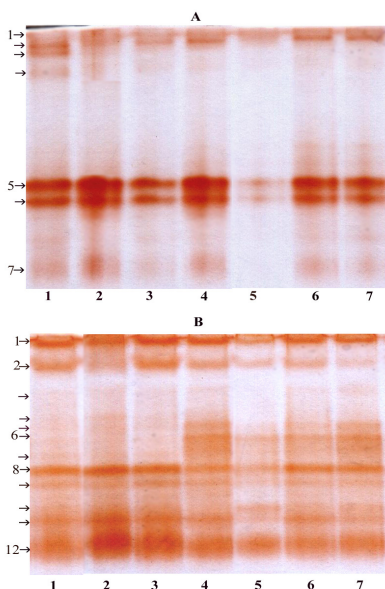
Фиг. 8. Электрофоретичен профил на CAT, изолирана от ендосперм (А) и зародиш (В) на 24 час от началото на прорастването. Нанесени са 100 μg белтък на гелче.

IV.4.2. Изоензимни профили на POX, SOD и CAT в прорастващи семена - 96 час.

Изоензимните профили на трите ензима за прорастващите на 96 час семена са изследвани освен на цилиндрични гелчета и на вертикална електрофореза на плаки. Резултатите и при двата вида електрофореза са твърде сходни.

На 96 час прорастване най-малък брой и с най-ниска активност са изоензимите на анодната POX в ендосперма на семената третиран с ниска температура, където изоензим № 5 е 27.5% от активността на същия изоензим в контролата, а изоензим № 6 е 18.2% (фиг. 9-A). Най-ниска е активността на анодната POX в корените третиран с ниска температура, както е установено и за ендосперма. При това въздействие изоензим № 8 е 30.8% от активността на същия изоензим в контролата. При третиранията с АБК и захароза се наблюдава активиране на средноподвижните POX изоензими (фиг. 9-B).

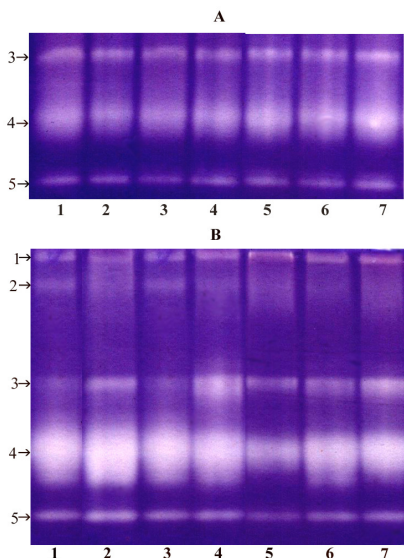
В ендосперма няма съществени различия в активностите на отделните изоензими на SOD (фиг. 10-A). Най-ниска е активността на SOD в корените, третиран с ниска температура, където изоензим № 4 представлява 49% от активността на същия изоензим в контролата. Наблюдава се активиране на изоензими № 3 и № 4 от високата температура и АБК. Захарозата активира изоензим № 3 (фиг. 10-B).



Фиг. 9. Електрофоретичен профил на анодни POX изоензими изолирани от ендосперм (А) и корен (В) на 96 час от началото на прорастването.

Пътечки: 1 - контрола; 2 - 38 °C; 3 - H_2O_2 ; 4 - АБК; 5 - 10 °C; 6 - NaCl; 7 - захароза.

На всяка пътечка е нанесен 50 μ g белтък.



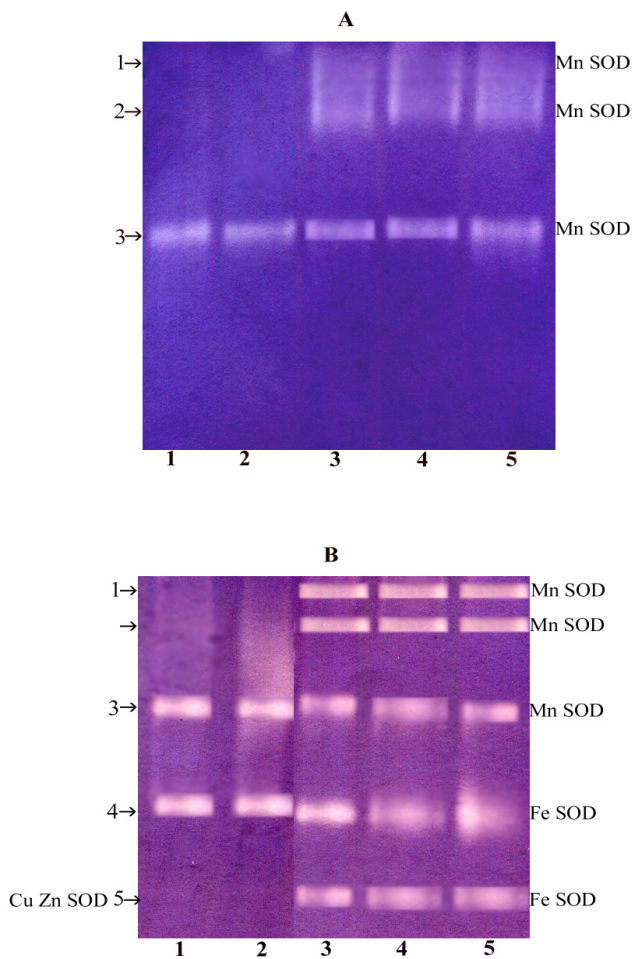
Фиг. 10. Електрофоретичен профил на SOD изоензими, изолирани от ендосперм (А) и корен (В) на 96 час от началото на прорастването.

Означенията на пътеките са както е описано на фиг. 9.

На всяка пътечка е нанесен 50 μ g белтък.

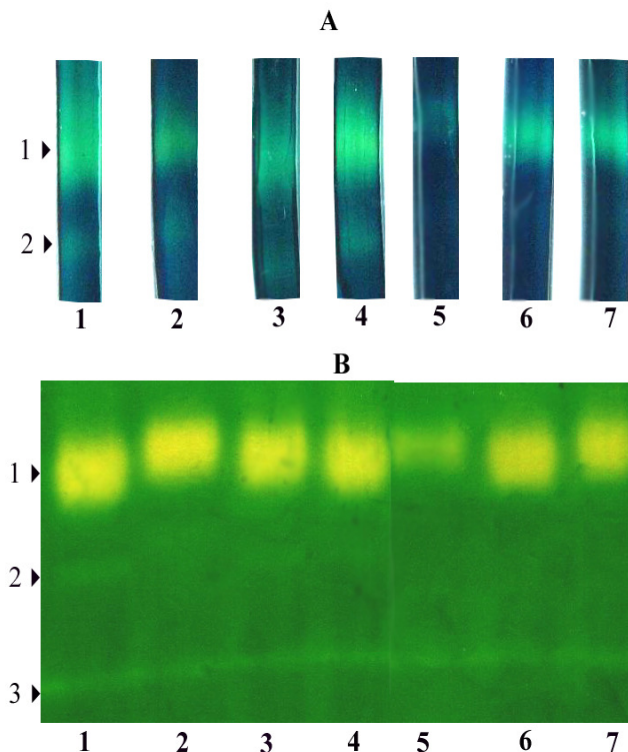
Проведено е и електрофоретично изследване за **идентификация на метала в протетичната група на SOD**. Силно впечатление прави факта, че при това изследване ние не открихме CuZnSOD изоензими в корените (фиг. 11). Необичайно е наличието на FeSOD изоензими в корените тъй като е известно, че FeSOD формата е характерна за фотосинтезиращите тъкани.

В ендосперма се наблюдава подписание на активността на всички изоензими на **каталазата** от ниска и висока температура (фиг. 12-A). При въздействието с ниска температура, активността на изоензим № 1 представлява 19.3% от активността на същия изоензим в контролата. В корените инхибиращият ефект на въздействието с ниска температура е отново най-силен, като активността на изоензим № 1 тук е 37.6% от активността на същия изоензим в контролата (фиг. 12-B).



Фиг. 11. Електрофоретичен профил на SOD изоензими изолирани от ендосперм (пътечки 1 и 2) и корен (пътечки 3, 4, 5) на 96 час прорастване. Гелове са третиран с 5 mM H_2O_2 (A) или 3 mM KCN (B) за 20 мин. преди оцветяването за активност.

Пътечки: 1 - контрола, 2 – 10 °C, 3 - контрола, 4 – 10 °C, 5 - АБК. На всяка пътечка е нанесен 50 μ g белтък.



Фиг. 12. Електрофоретичен профил на САТ изоензими, изолирани от ендосперм (А) (нанесен е 100 μg белтък на гелче) и корен (В) (на всяка пътечка е нанесен 50 μg белтък) на 96 час от прорастването. Означенията на пътечките и гелчетата са както е описано на фиг.9.

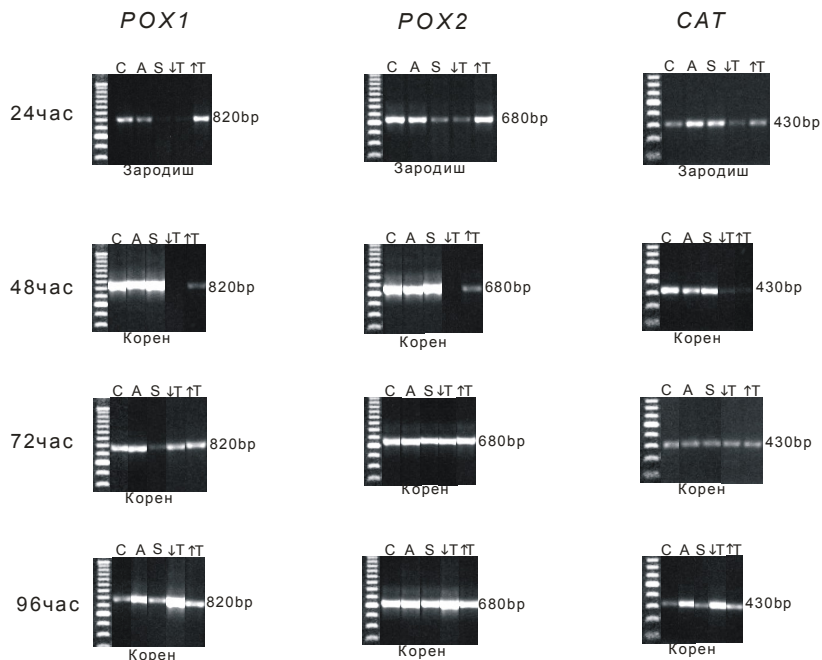
Проведените биохимични изследвания показват промени в активността на изследваните антиоксидантни ензими като най-силен е ефектът на приложените стресови фактори върху активността на САТ и ПОХ. Активността на SOD остава сравнително по-стабилна, с по-слаби изменения до 72 час прорастване.

IV.5. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГЕННАТА ЕКСПРЕСИЯ

Известно е, че контролът на ензимната активност се осъществява на ниво активиране или инхибиране на налични ензимни белтъци, на транслационно и на транскрипционно ниво.

Целта на проведеното изследване се състои в това да се установи дали приложените стресови въздействия влияят само на активността на ензимите, или ефектът на стреса е на ниво транскрипция на гените кодиращи изоензими на САТ и ПОХ. Тази цел е реализирана чрез проследяване нивата на транскрипция на

съответните гени (*POX1*, *POX2*, *CAT*) под влияние на екстремни температури, АБК и захароза.



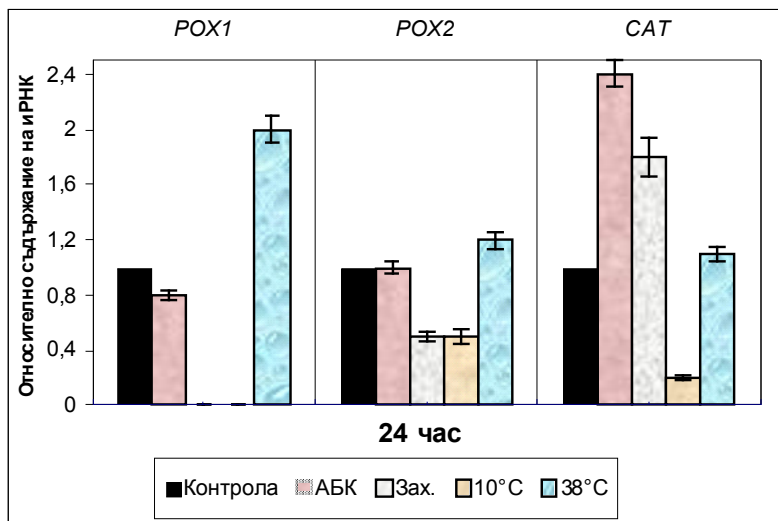
Фиг. 13. Продукти от PCR, визуализирани върху 1.4% агарозен гел с EtBr. C - контрола, A - АБК, S - захароза, ↓T – ниска температура, ↑T – висока температура.

IV.5.1. Влияние на екстремни температури, захароза и АБК върху нивото на транскрипция на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* на 24 час от прорастването в зародиши на пшеница.

Количеството на транскриптите на *POX1* е най-високо при зародишите, третиран с висока температура (със 100% повече от контролата), което е съпроводено и от висока ензимна активност, установена електрофоретично. Захарозата и ниската температура подтискат транскрипцията на този ген - липсват транскрипти. *POX2* е експресиран при всички варианти, като най-ниско е нивото на транскрипция при ниската температура и захарозата (с 50% по-ниско от контролата). Този резултат се съгласува с данните от електрофоретичните изследвания (фиг. 5-В и фиг. 14). Huh *et al.* (1997) съобщават за различия в нивата на транскрипция на гените *swpa1* и *swpn1* при картофи, в зависимост от третирането с ниска температура и от фазата на развитие. Тези гени кодират съответно една анодна и една неутрална изоформа на POX. Високото количество транскрипти

корелира с висока активност на изоензима и обратно подписнатата транскрипция корелира с ниска ензимна активност.

Установихме стимулиране на експресията на *CAT* под влияние на АБК (повишение със 140%) и захароза (повишение с 80%). Високата ензимната активност на *CAT* съвпада с високо ниво на транскрипти само при третираните със захароза зародиши, докато при въздействието с АБК има високо ниво транскрипти и понижена активност на изоензимите на *CAT* при електрофоретичните изследвания. Въздействието с ниска температура подписка транскрипцията на *CAT* (понижение с 80%) и този резултат корелира с подписнатата ензимна активност установена електрофоретично (фиг. 8-В и фиг. 14).

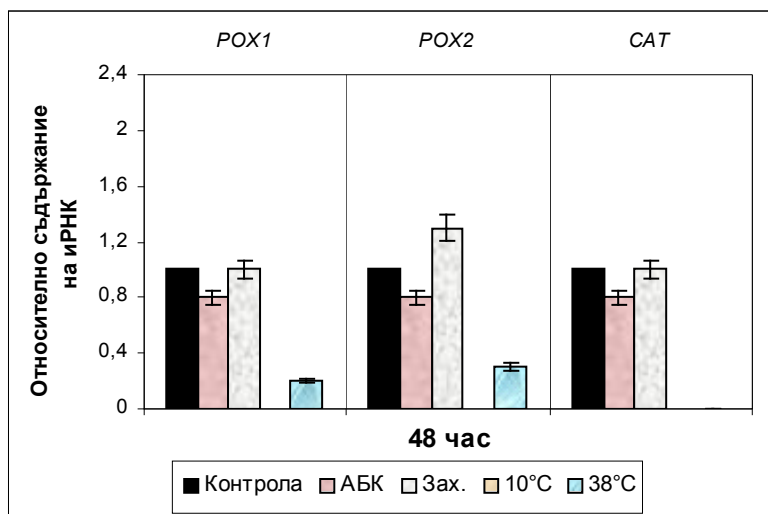


Фиг. 14. Количествен Real-Time PCR анализ на нивата на иРНК на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* в зародиши от пшеница на 24 час прорастване. Количеството на транскриптите на всеки от трите гена е нормализирано спрямо експресията на гена β -*TUBULIN*, който е използван като референтен ген в настоящата работа. Нивата на иРНК в контролите са винаги със зададена стойност 1.

IV.5.2. Влияние на екстремни температури, захароза и АБК върху нивото на транскрипция на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* на 48 час от прорастването в корени на пшеница.

В корените е установено, че *POX1* и *POX2* са експресирани в повечето варианти. При третиране с ниска температура липсва транскрипция на двата *POX* гена (фиг. 15), което корелира с ниската активност на ензима при електрофоретичните изследвания. Високата температура предизвиква понижаване на нивото на транскрипция на *POX* в сравнение с контролата (намаление с 80%). Този резултат се съгласува с установената ниска активност на катодната *POX*.

Интересно е да се отбележи, че подписнатата активност на POX (анодна и катодна) от третирането със захароза и АБК не корелира с нормалното количество на транскриптите на гените *POX*. Нивата на транскрипти на *CAT* под влияние на АБК и захарозата са близки до тези в контролата, докато при температурните въздействия липсва транскрипция на този ген. Тези данни са в съгласие с данните ни за ензимната активност на *CAT*, която е подписната от екстремните температури. Подобно на установеното от нас Janda *et al.* (2003) твърдят, че експресията на каталазните гени е силно подписната от ниската температура и корелира с намалена активност на ензима в аклиматизирани към ниска температура листа от пшеница.

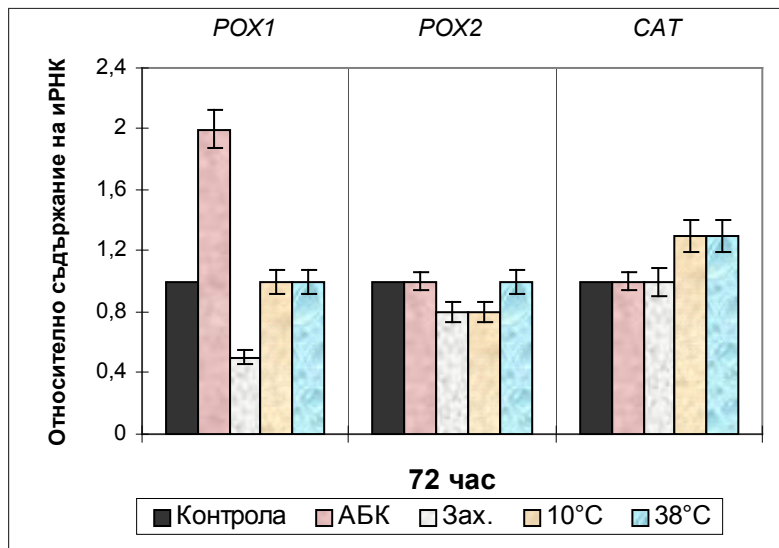


Фиг. 15. Количествен Real-Time PCR анализ на нивата на иРНК на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* в корени от пшеница – 48 час прорастване. Количеството на транскриптите на всеки от трите гена е нормализирано спрямо експресията на гена β -*TUBULIN*, който е използван като референтен ген в настоящата работа. Нивата на иРНК в контролите са винаги със зададена стойност 1.

IV.5.3. Влияние на екстремни температури, захароза и АБК върху нивото на транскрипция на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* на 72 час от прорастването в корени на пшеница.

Транскрипцията на *POX1* е стимулирана от АБК (повишение със 100%) и подписната от захарозата (понижение с 50%) (фиг. 16). Тези резултати съвпадат с резултатите за повишената активност на катодната POX под влияние на АБК и понижената активност на същият ензим при третиране със захароза. Интересно е да се отбележи, че ниската температура инхибира активността на катодната и анодна POX, но не подпуска транскрипцията на изследваните *POX* гени. При всички третираня са наблюдавани близки нива на транскрипти на *POX2*. Количествата на

транскриптите на *CAT* са подобни при всички въздействия. Тези данни не се съгласуват с данните за ензимната активност на *CAT*, която е поддържана от третираната със захароза и ниска температура. Възможно е тези стресови фактори да инхибират транслацията на иРНК на *CAT* или да инхибират самите ензимни молекули.

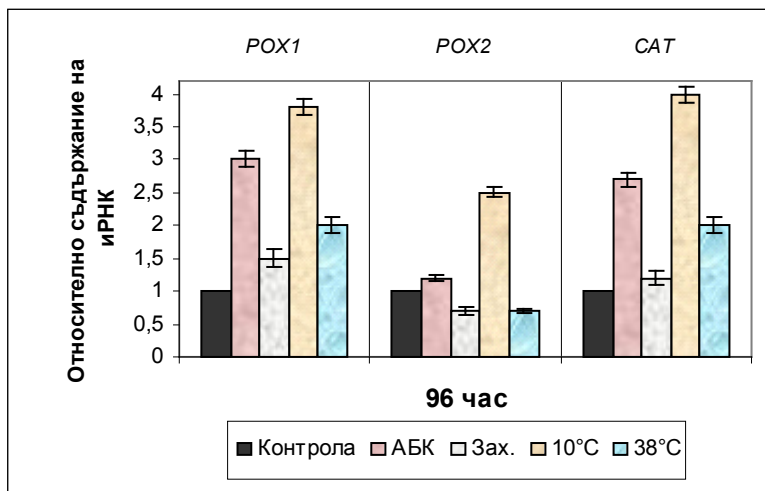


Фиг. 16. Количествен Real-Time PCR анализ на нивата на иРНК на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* в корени от пшеница – 72 час прорастване. Количеството на транскриптите на всеки от трите гена е нормализирано спрямо експресията на гена β -*TUBULIN*, който е използван като референтен ген в настоящата работа. Нивата на иРНК в контролите са винаги със зададена стойност 1.

IV.5.4. Влияние на екстремни температури, захароза и АБК върху нивото на транскрипция на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* на 96 час от прорастването в корени на пшеница.

На този час се установява активиране на транскрипцията на *POX1* от всички приложени стресови фактори (фиг. 17). Нивото на транскрипти на *POX1* е повишено по-значително от третирането с ниска температура (повишение с 280%) и АБК (повишение с 200%), а по-слабо от въздействията с висока температура (повишение със 100%) и захароза (повишение с 50%). Повишеното ниво транскрипти под влияние на АБК и високата температура корелира с повишена ензимна активност на анодната *POX*. Транскрипцията на *POX2* е активирана от ниската температура (повишение със 150%), а в другите третираня е с нива, подобни на контролата (фиг. 16). Интересен резултат е, че ниската температура активира транскрипцията на *POX* гените, но поддържа активността на

пероксидазните изоензими в корените на 96 час прорастване. Вероятно на този час все още няма транслация на новотранскрибираните иРНК-и, които са се натрупали под влияние на ниската температура или е възможно да се синтезират инхибитори, които директно повлияват активността на ензимите. Gijzen *et al.* (1999) съобщават, че няма пряка връзка между количеството на ензима POX и количеството на транскриптите му *Prx2* и *Er* в семена от соя. Причината за това според тези автори е скоростта на транслация на тези транскрипти или различната стабилност, или локализация на ензимните молекули.



Фиг. 17. Количествен Real-Time PCR анализ на нивата на иРНК на гените *POX1*, *POX2*, *CAT* в корени от пшеница – 96 час прорастване. Количеството на транскриптите на всеки от трите гена е нормализирано спрямо експресията на гена β -*TUBULIN*, който е използван като референтен ген в настоящата работа. Нивата на иРНК в контролите са винаги със зададена стойност 1.

Ние установяваме, че транскрипцията на *CAT* генът е активирана от всички приложени стресови фактори - ниска температура (повишение с 300%), АБК (със 170%), висока температура (със 100%), захароза (с 20%). Тези данни не съответстват на данните за ензимната активност на *CAT*, където екстремните температури най-силно подпикат активността на изоензимите. В този случай вероятно става инхибиране на транслацията на налични транскрипти на *CAT* генът или е възможно да се инхибира активността на наличните ензимни белтъци. По данни на Williamson and Scandalios (1993-а,б) и Singh *et al.*, (2007) стрес индуцираните промени в увеличението на количеството на определени транскрипти не винаги корелира със съответстващи промени в антиоксидантните белтъчни нива и ензимни активности.

Установените от нас високи количества транскрипти на *CAT* при въздействието с АБК съответстват на повишена ензимна активност установена електрофоретично. Този резултат се съгласува с наблюденията на редица автори, че АБК индуцира експресия на гени, кодиращи *CAT* и съответно повишава активността на *CAT* в различни растения (Prasad *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995; Guan and Scandalios, 1998-a; Guan *et al.*, 2000; Jiang and Zhang, 2002; Yoshida *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007).

При нашите изследвания третирането със захароза подпуска транскрипцията на *POX1* в зародишите на 24 час и корените на 48 час. Данните за експресията на *CAT* не показват тъканна специфичност, за разлика от транскрипцията на *POX* гените (данните не са представени). Генът *CAT* е експресиран в повечето изследвани варианти, с изключение на корените от 48 час третиран с екстремни температури. Според Guan *et al.* (2000) при изследване на генната експресия на каталазни гени при дехидратационен стрес се индуцира силно експресията само на *CAT1*, докато транскрипцията на *CAT2* и *CAT3* е подисната. Данните и на други автори показват, че се наблюдава тъканна специфичност в експресията на *POX* гените. Baga *et al.* (1995) съобщават, че *POX2* е експресиран в корените, също показват и Hertig *et al.* (1991) за *pox wht*, чиято секвенция е подобна на *POX2*. Quiroga *et al.* (2000) установяват, че при засоляване на домати с NaCl се увеличава количеството на транскриптите на гена *TPX1* (кодиращ катодни пероксидази) само в корените на третираните растения.

Получените от нас резултати за ефекта на стресовите фактори върху генната експресия са в съгласие с тези на Bohnert *et al.* (1995), които твърдят че промяната в генната експресия винаги съпътства подготовката на растенията за оцеляване при стрес. При силен стрес растението приспособява своя метаболизъм и променя развитието си.

V. ОБОБЩЕНИЕ

Резултатите от проведените изследвания са получени от комплексно проследяване на растежни показатели, различни физиологични подходи, биохимични и генетични анализи. Тези резултати допълват и разширяват познанията за отговорите на растенията към абиотичен стрес на най-ранните етапи от онтогенетичното им развитие.

Всички изследвани от нас стресови фактори – висока и ниска температура, АБК, захароза, NaCl, H₂O₂ подпикат растежа на прорастъците от пшеница до 96 час прорастване, като ниската температура е най-силният ефектор. На 120 час се наблюдава засилен растеж на корените и надземните части при третирането с H₂O₂.

Съдържанието на МДА в ендосперма, зародишите и корените нараства с напредване фазата на прорастване, както и под влияние на всички изследвани въздействия. Най-силен е ефектът на захарозата, NaCl и ниската температура в ендосперма и корените, а в корените подобен ефект има и високата температура. Третирането с H₂O₂ предизвиква понижаване на количеството на МДА при корените на 96 час.

В хода на прорастването съдържанието на H_2O_2 в ендосперма се повишава при норма, а също и под влияние на захарозата, NaCl и ниската температура. В корените най-високи стойности са отчетени при екстремните температури, захарозата, АБК и H_2O_2 на 48 час. Най-високи са нивата на H_2O_2 при третиране с ниска температура и захароза. При корените на контролата и тези третирани с NaCl пикът в количеството на H_2O_2 е на 72 час прорастване. Вероятно с напредване фазата на развитие се променя реакцията на прорастъците към отделните стресови фактори. В корените на прорастъците на по-късните часове от прорастването се установява корелация между стимулирането на растежа от H_2O_2 и понижението на нива на МДА в тях. Корелация е установена и между подтискането на растежа на корените и надземните части от ниската температура и захарозата и наблюдаваното високо ниво на МДА и H_2O_2 в тях.

В електрофоретичните спектри на белтъците и антиоксидантните ензими се установяват два основни типа промени - едните предизвикани от фазата на развитие и растеж на прорастъците и другите предизвикани от ефекта на приложените стресови фактори. Промените, предизвикани от напредване фазата на развитие се изразяват в намаляване количеството на всички полипептиди в ендосперма, зародиша и корена. Количеството на полипептидите с по-високо Мт намалява по-бавно до 96 час. В зародиша се установява по-високо ниво на високомолекулните термостабилни ПП (0 – 24 час) в сравнение с ендосперма. Тяхното количество намалява силно в хода на прорастването.

Най-общо промените, предизвикани от стресовите условия на прорастване се проявяват чрез забавяне на промените, настъпващи в хода на нормалното развитие на прорастъците - например забавената мобилизация на белтъците от ендосперма и корена под влияние на ниската температура на прорастване. Редица автори (Гумилевская и др., 1993; Han and Kemode, 1996; Чиркова и Войцекковская, 1999) твърдят, че в условия на стрес спира биосинтеза на белтъци характерни за прорастване и растеж при нормални условия и започва биосинтез на белтъци, предназначени да помогнат на клетките да се адаптират или да преодолеят стреса.

Получените от нас данни не подкрепят твърдението на гореизброените автори за тотална промяна на белтъчните профили характерни за нормалните условия. По-скоро в някои случаи установяваме намаляване или повишаване на налични в контролата полипептиди, а в редки случаи се наблюдава индукция. Например в ендосперма на контролата намалява количеството на термостабилния ПП с Мт 14 кДа на 24 час. В ендосперма на третирани с АБК и H_2O_2 прорастъци намалява количеството на термостабилните ПП с Мт 10 и 14.5 кДа. Под влияние на екстремните температури, NaCl, захароза и АБК на 48 час нараства количеството на ПП с Мт 32 кДа. В корените се наблюдава увеличаване на количеството на ПП с Мт 45 кДа под влияние на ниска температура, NaCl, захароза, АБК, а под влияние на ниската температура и АБК нараства количеството на ПП с Мт 31 кДа. На 72 час нараства количеството на ПП с Мт 25 кДа при въздействие с ниска температура, NaCl, АБК и захароза. В корените на 96 час нараства количеството на ПП с Мт 31, 44 и 51 кДа при въздействия с ниска температура, захароза и АБК.

Получените резултати показват, че в хода на прорастването се наблюдават промени на количествата на различни полипептиди под влияние на различните стресови фактори. Не е установен обаче специфичен ефект на нито един от изследваните стресови фактори. Индуциран синтез под влияние на някои стресови фактори се наблюдава за полипептиди с Мг 22, 23, 27.5 кДа и термостабилен ПП с Мг 15 кДа на 24 час от прорастването. На 48 час прорастване се наблюдава индукция от различните третираня на термостабилни полипептиди с Мг съответно: 38.5, 68 и 134 кДа. На 72 час се индуцират 2 - 3 полипептида с Мг от 21 до 17 кДа, а също и термостабилни полипептиди с Мг 41, 63, 67 кДа.

В хода на прорастването и развитието на прорастъците установихме, че изчезват някои полипептиди, характерни за по-ранните часове на прорастване. Термостабилният ПП с Мг 13 кДа изчезва при третиране с висока температура, АБК и H_2O_2 на 48 час, а полипептид с Мг 32 кДа изчезва под влияние на H_2O_2 . В ендосперма на 72 час при контролата изчезват всички полипептиди с Мг над 78 кДа, един 64 кДа ПП и един 40 кДа полипептид.

Не се наблюдава специфичност в реакцията на прорастъците към приложените фактори на въздействие. Наблюдаваната специфичност в полипептидните профили се дължи в по-голяма степен на промени, предизвикани от хода на прорастването и в по-малка степен от приложените стресови фактори.

Получените от нас резултати за промените в полипептидните спектри се различават от тези на цитираните по-горе автори и биха могли да се обяснят с това, че измененията в синтеза на белтък не са единствения отговор на растенията към стреса. Нивото на белтъка не винаги корелира непосредствено с оцеляването или толерантността на растението. Известно е, че наред със синтеза на белтък се осъществяват и процеси на разграждане и подпискане на метаболитната активност (Ferguson *et al.*, 1994; Обручева и Антипова, 1997; Чумикина *и др.*, 1999). Друго широко възприето становище е, че синтезът на стресовите белтъци започва по различно време в зависимост от вида на стресовия фактор. Например термошоковите белтъци започват да се синтезират броени минути след началото на действие на екстремната температура, но ако стресовия фактор е аноксия този биосинтез започва след шестия час от началото на въздействие. Според някои автори (Dure, 1993) на този ранен етап в семената се съдържат достатъчни количества стресови белтъци (LEA-proteins) синтезирани при десикацията по време на зреене на семената.

Важно е да се отбележи, че се наблюдава сходство между полипептидните профили при третиране с ниска температура и захароза и значително различие между профилите при въздействие с висока и ниска температура. Това сходство в ефектите на ниската температура и осмотичния стрес (захароза) се проявява и в наблюдаваната силна инхибиция на растежа. Вероятно става въпрос за различен механизъм на действие на двете екстремни температури върху белтъчния метаболизъм. Установихме, че белтъчната мобилизация настъпва по различно време в зависимост от приложения стрес. Тъканноспецифичен отговор към екстремните температури се наблюдава на 72 час. Ефектът от ниската температура се изразява в по-голям брой и по-високо съдържание на отделните

полипептиди. Този ефект корелира с високо съдържание на тотален белтък установено в корените на същия час.

Ние не установяваме драстично инхибиране на синтеза на белтъци, които се синтезират в норма, както и рязко нарастване в биосинтеза на специфични за стреса белтъци до 96 час от началото на прорастването. Наблюдаваните от нас промени в профилите са само частични. За разлика от Чиркова и Войцековская (1999), не наблюдаваме загуба на тъканна и органна специфичност под влияние на приложените стресови фактори. Нещо повече специфичните спектри на ендосперма и корена се запазват дори и в условия на много силен стрес, какъвто е ниската температура и до края на изследвания период. Наблюдава се различен отговор към стреса на ендосперма и зародиша (корените), който се изразява както по отношение промените в количествата на повлияните от стреса индивидуални белтъци и полипептиди, така и по отношение на индуцираните под влияние на стреса белтъци и полипептиди.

Изследването на промените в изoenзимните профили съчетано с данни от различни физиологични подходи и биохимични показатели може да даде допълнителни данни за отговора на растенията към даден стрес. Анализът на данните за промените в активността на трите изследвани ензима в хода на прорастването и растежа на прорастъците показва, че и трите ензима POX, CAT и SOD присъстват още в сухите семена. Вероятно те са синтезирани в семената по време на формирането им и са останали неразградени в периода на десикация. Тези ензими са от изключително значение за антиоксидантната защита на най-ранните часове от прорастването, когато се натрупват значителни количества АКФ в резултат на преминаване на семето от покой към активен метаболизъм.

Активността на изoenзимите на анодната и катодна POX и на CAT е висока в сухите зародиши и корените в сравнение с ендосперма, а активността на SOD е сходна и в двете части на семето. В хода на прорастването при норма активността на POX и CAT нараства в зародиша, корена и ендосперма. Активността на SOD не се променя значително до 72 час и нараства силно на 96 час, което е особено добре изразено в корените. Под влияние на приложените стресови фактори се наблюдават редица промени в изoenзимните профили на POX, SOD и CAT. При анодните изопероксидази активността се инхибира от захарозата и ниската температура и в двете части на семето. Наблюдава се тъканноспецифичен отговор на зародиша и ендосперма на 24 час прорастване към H_2O_2 . В ендосперма H_2O_2 активира изoenзимите на POX, а в корените се наблюдава инхибиране на ензимната активност. Под влияние на приложените стресови фактори се наблюдават специфични промени (силна инхибция на активността на някои изoenзими) в профила на катодната POX още на 24 час. Катодните изопероксидази се повлияват по-силно от стреса в сравнение с анодните. При катодните изoenзими всички приложени стресови фактори (с изключение на H_2O_2 на 24 час) подтискат активността на изoenзимите на всички изследвани часове. Най-силен е ефектът на ниската температура и захарозата.

Разликите в профилите на анодните и катодни изопероксидази в зависимост от приложените стресови фактори вероятно се дължат на различната им

роля в растежа и развитието на растенията. Анодните пероксидази се откриват основно в диференцирани растителни тъкани, поради което се счита, че те участват във формиране на вторичната клетъчна стена и лигнификацията ѝ в условия на стрес (Fecht-Christoffers *et al.*, 2006). Катодните пероксидази са установени в млади развиващи се тъкани и играят важна роля при формирането на клетъчната стена в хода на нормалното прорастване на семената (Morohashi, 2002).

На по-ранните часове (24 час) от прорастването каталазата в ендосперма се инхибира слабо от екстремните температури. Тя реагира по-силно на стреса едва на 72 час. Ниската температура, захарозата и NaCl подтискат активността на изоензимите и в двата органа. На 96 час и високата температура оказва силен инхибиращ ефект върху активността на изоензимите на CAT. На този етап от прорастването ефектът на екстремните температури върху активността на CAT е сходен. Активността на SOD в ендосперма е подтисната от ниската температура и захарозата на 72 час, а на 96 час такъв ефект има само високата температура. В корените стресовите фактори инхибират активността на някои изоензими на SOD на 72 и 96 час. Ниската температура, захарозата и NaCl инхибират активността на ензима, а високата температура и АБК я стимулират.

Тези наши резултати подкрепят становището на Гарник *и др.* (2004) за по-голямата стабилност на SOD при отговора на растенията към стрес. Тези автори показват, че изоензимните спектри на SOD в калусни култури на *Larix* са по-консервативни от спектрите на киселите (анодни) изопероксидази. Пероксидазата и SOD в растенията се различават значително, както по степента на изоензимния полиморфизъм така и по способността да образуват тъканноспецифични спектри от множество молекулни форми (Гарник *и др.*, 2004).

Получените от нас резултати показват, че трите изследвани антиоксидантни ензими се включват по различно време при формиране отговора към стреса, POX на 24 час, CAT на 48 час и SOD на 72 - 96 часа прорастване.

По отношение активността на антиоксидантните ензими ниската температура е най-силният ефектор от изследваните от нас стресови фактори. Тя подтиска силно активността на всички изоензими на POX още на ранните часове от прорастването и този инхибиращ ефект се запазва до края на изследвания период (96 час). Най-рано настъпват промени в изоензимния спектър на POX, след това при CAT и накрая при SOD. В белтъчните и полипептидни спектри тези промени не са така силно изразени. Поради това изоензимите на POX биха могли да се използват като маркери за стрес.

Интересен резултат са установените от нас CuZnSOD изоензими в ендосперма и липсата им в корените на прорастващите за 96 часа семена. В корените на тези прорастъци установихме наличие на FeSOD изоензими. Според редица автори (Bowler *et al.*, 1992; Alsher *et al.*, 2002) FeSOD често липсват във висшите растения, а когато се откриват, те са локализирани в хлоропластите.

С помощта на транскрипционните анализи за изследване експресията на гени на POX и CAT установихме ниско ниво на експресия на *POX* гените в третираните с ниска температура зародиши на 24 час и корените на 48 час, където активността на ензимите също е подтисната. На 72 и 96 час отчитаме постепенно

увеличение на *POX* транскриптите, но активността на *POX* си остава ниска. Вероятно на тези по-късни часове се натрупват нови транскрипти на *POX* гените, които все още не се транслират. Генът *CAT* е експресиран в повечето изследвани въздействия, с изключение на корените от 48 час, третирани с екстремни температури, където и ензимната активност е подписана. Възможно е при тези въздействия каталазния ген да се включва между 48 и 72 час прорастване и тогава да стартира транскрипцията му, но активността на *CAT* остава ниска до 96 час на прорастването. Допускаме, че в този случай става инхибиране на трансляцията на иРНК или на активността на самите ензимни молекули. Трябва да се отбележи, че ние изследваме само два *POX* гена и един *CAT* ген и е възможно при някои случаи на стрес да се повлияват други гени, а не изследваните от нас и именно това да е причината понякога да липсва пряка корелация между количеството транскрипти и ензимната активност. Тези резултати потвърждават становището на Bohnert *et al.* (1995), че подготовката на растенията за оцеляване в условия на стрес е съпроводена с промени в генната експресия.

Анализът на данните за всички изследвани часове от прорастването показва, че приложените стресови въздействия оказват неспецифичен ефект върху белтъчните, ензимните профили и генната експресия. Например активността на *CAT* и *POX* се подписва не само от ниската температура, но и от захарозата, високата температура и *NaCl*. Тези наши резултати потвърждават предположението на Kreps *et al.* (2002), Munns (2002), Rabbani *et al.* (2003), че значителна част от гените, индуцируеми от даден стрес могат да се индуцират и от други стресови фактори. Ето защо е от изключително значение да се изясни въпросът дали регулаторните елементи при тази промяна в генната експресия са стресово специфични и дали всеки регулаторен елемент е уникален в специфичните стрес толерантни видове.

Получените от нас резултати показват, че корените са по-чувствителни към приложените стресови фактори в сравнение с ендосперма. Това се обяснява с факта, че корените съдържат живи, делящи се клетки, а ендоспермът е съставен основно от мъртви клетки, като живи са само клетките на алеироновия слой. Тези данни подкрепят твърдението на Anderson *et al.* (1995), че ефектът на застудяването върху антиоксидантните ензими зависи от тъканта, в която са локализирани. Нашите изследвания допълват и разширяват това становище с получените от нас доказателства, че такава зависимост съществува и при други видове стрес, освен застудяването (оксидативен стрес - H_2O_2 , осмотичен стрес - захароза, температурен стрес - 38°C).

Според нас промяната в активността на *POX*, *SOD*, *CAT* се дължи предимно на промяна в активността на наличните изоензими. Това наше твърдение се различава от становището на Rao *et al.* (1996) и Pinchero *et al.* (1997), които считат че синтезът на нови изоформи на антиоксидантните ензими е по-ефективен за метаболизма на АКФ, отколкото активирането на съществуващи изоензими. Установеното от нас е в съгласие с резултатите на Selote and Khanna-Chopra (2006), че дехидратационният стрес не предизвиква индукция на нови изоензими при никой от антиоксидантните ензими - *CAT*, *POX*, *SOD* в прорастъци от пшеница.

В хода на проведеното изследване ние не установихме активиране на някои от изследваните от нас антиоксидантни ензими за сметка на намалена активност на други. Активността на SOD не нараства съществено под влияние на ниската температура, за сметка на поддържаната активност на CAT и POX.

Интерпретацията на отговорите на растенията към стрес е твърде сложна, тъй като механизмите, лежащи в основата на отговорите, се различават при отделните видове растения, тъкани, фази на развитие, физиологичния статус на растението и силата и продължителността на стреса (Baek and Skinner, 2003).

VI. ИЗВОДИ

1. Подписването на растежа на прорастъците от пшеница от ниската температура и захарозата е съпроводено с повишено ниво на стресовите маркери малондиалдехид и водороден пероксид.

2. Съдържанието на разтворим белтък в корените е високо при третирането с ниска температура и захароза на всички изследвани часове от прорастването, независимо че растежът на корените е подписан от тези фактори на въздействие.

3. Отговорът на ендосперма и корените на приложените абиотични стресови фактори се различава както по отношение на промените в количеството на индивидуалните нативни белтъци, така и по отношение на стрес-индуцираните белтъци и полипептиди.

4. Антиоксидантните ензими се включват по различно време в отговора на прорастъците от пшеница към стресовите условия на прорастване. Най-рано настъпват промените в изоензимния профил на пероксидазата (24 час), след това на каталазата (48 час) и най-късно в профила на супероксиддисмутазата (72 час).

5. Базичните (катодни) пероксидази са по-чувствителни към приложените стресови фактори в сравнение с киселите (анодни) пероксидази. Изоензимите на пероксидазата могат да се използват като маркери за нискотемпературен и осмотичен стрес.

6. Забавеният растеж на прорастъците от пшеница е съпроводен от понижена активност на пероксидазата и каталазата, колкото по-забавен е растежа на прорастъците, толкова по-ниска е ензимната активност.

7. Активността на пероксидазата, супероксиддисмутазата и каталазата е значително по-висока в органите с интензивен метаболизъм (зародиш, корени) в сравнение с ендосперма.

8. От изследваните стресови фактори висока и ниска температура, захароза, АБК, NaCl, H₂O₂ – най-силният ефектор с негативно действие е ниската температура. Тя инхибира растежа на прорастъците, повлиява съдържанието и профила на нативните белтъци и полипептиди, изоензимните профили на антиоксидантните ензими и генната експресия.

9. Експресията на гените *POX1* и *POX2*, кодиращи пероксидазни изоензими се повлиява по различен начин от приложените стресови фактори. По-чувствителен към въздействията е *POX1* гена.

10. Ниската температура подтилка транскрипцията на всички изследвани гени на ранните часове от прорастването (24 и 48 час), докато на 72 и 96 час се отчита постепенно повишаване на нивото на транскрипти на *POXI*, *POX2*, *CAT* гените. Не във всички изследвани случаи се наблюдава пряко съответствие между нивото на транскриптите на изследваните гени и активността на ензимите.

VII. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път се изследва влиянието на хроничен дехидратационен стрес, предизвикан от ниска и висока температура, NaCl и захароза. Проследен е ефектът върху прорастването и растежа на прорастъците и електрофоретичните профили на нативните белтъци и полипептиди, и на ензимите пероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза.

2. С напредване фазата на развитие на прорастъците се променя отговора на корените към отделните стресови фактори. Най-рано те реагират към ниската температура и захарозата. На 96 час се преодолява инхибиращия ефект на високата температура, АБК и водородния пероксид.

3. Ниската температура по време на прорастване на семената забавя силно мобилизацията на албумините и глобулините, както в корените (48 час), така и в ендосперма (72 час). Следователно и в двете части на семето се забавя разграждането на белтъците, които при нормалното прорастване се разграждат първи.

4. За първи път са установени различия в отговорите на прорастъци от пшеница към ниска и висока температура. Установява се сходство между отговора към ниска температура и към осмотичен стрес (захароза), докато отговора към високата температура е сходен с този към екзогенна АБК. Различията между реакциите към двете температури се наблюдават по отношение растежа на прорастъците. Високата температура инхибира по-силно растежа на корените, докато ниската температура повлиява по-силно растежа на надземната част. Полипептидните профили, изоензимните спектри на антиоксидантните ензими и нивата на транскрипти също се различават.

5. В хода на прорастване на семената корените загубват по-рано толерантността си към дехидратация (48 час), а ендосперма запазва толерантността си до 96 час.

6. За първи път е установено, че в корените на млади прорастъци от пшеница липсват CuZnSOD изоензими, наблюдават се само MnSOD и FeSOD изоензими.

7. Оригинални са получените данни за тясната взаимовръзка между инхибирането на активността на пероксидазата от ниската температура и захарозата и инхибирането на растежа. Особено чувствителни към стрес са базичните изоензими на пероксидазата. Активността на пероксидазата може да се използва като маркер за нискотемпературен и осмотичен стрес.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Bakalova (Sabeva), S., Nikolova, A., Nedeva, D., 2004, Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds, Bulg. J. Plant Physiol, 30 (1-2), 64-77.
2. Bakalova (Sabeva), S., Nedeva, D., 2005, Effect of dehydration and oxidative stress on protein and polypeptide profiles in germinating wheat seeds, Comp. rend. Acad. Bulg. sci., 58, (8), 957-962.
3. Sabeva, S., Nedeva, D., 2008, Antioxidant defense system in germinating wheat seeds. Acta Agronomica Hungarica, 56, 2, 113-127.

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Bakalova, S., Nedeva, D., Nikolova, A., 2002, Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA, участие с постер на European Workshop on Environmental Stress and Sustainable Agriculture, Варна.
2. Bakalova, S., Glynn, N., Nedeva, D., Nikolova, A., 2003, Peroxidase gene patterns in germinating wheat seeds under stress conditions, участие с постер на International Workshop on Applied Seed Biology, New Developments in Seed Quality Improvement, Лудж, Полша.
3. Събева, С., 2009, Различия в нивата на транскрипция на каталазни и пероксидазни гени в отговор на висока и ниска температура, АБК и осмотичен стрес в зародиши и прорастъци на пшеница, участие с устно съобщение на XI Юбилейна Национална Конференция по Физиология на Растенията, София.

X. ЗАБЕЛЯВАНИ ЦИТАТИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

Bakalova, S., Nikolova, A., Nedeva, D., 2004, Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds, Bulg. J. Plant Physiol, 30 (1-2), 64-77.

1. Živilė Lukšienė, Honorata Danilčenko, Živilė Tarasevičienė, Žilvinas Anusevičius, Audronė Marozienė, Henrikas Nivinskas, 2007, New approach to the fungal decontamination of wheat used for wheat sprouts: Effects of aminolevulinic acid, International Journal of Food Microbiology, 116, 153–158.

2. Колупаев, Ю. Е., 2007, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В РАСТЕНИЯХ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ: ОБРАЗОВАНИЕ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ, ВІСНИК ХАРКІВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ СЕРІЯ БІОЛОГІЯ, 3 (12), 6-26.

3. Landjeva, S., Korzun, V., Stoimenova, E., Truberg, B., Ganeva, G., Bomer, A., 2008, The contribution of the gibberellin-insensitive semi-dwarfing (*Rht*) genes to genetic variation in wheat seedling growth in response to osmotic stress, Journal of Agricultural Science, 146, 275-286.

4. Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В., 2008, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОЙ СИСТЕМЫ В КОЛЕОПТИЛЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И НАГРЕВА,

5. Карпец, Ю. В., Колупаев, Ю. Е., Мусатенко, Л. І., 2008, Роль активних форм кисню в підвищенні термостабільності антиоксидантних ферментів коренів пшениці після теплового загартування, Доповіді Національної академії наук України, №12, 136-140.

6. Карпец, Ю. В., Ястреб, Т. О., Обозный, А. И., Колупаев, Ю. Е., 2009, АКТИВНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА, ВІСНИК ХАРКІВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ СЕРІЯ БІОЛОГІЯ, 2 (17), 62-70.

7. CHENG Xi-lei YI Yan-li Cheng Shire, West-lei CHENG YI Wine-Li, 2009, Effect of Magnetic Treatment on Amount and Generation Time of Slow-Growing *Rhizobium*(USDA110) and Fast-growing *Rhizobium*(USDA191), SOUTHWEST CHINA JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, 22, 5.

8. Abedi, T., Pakniyat, H., 2010, Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.), Czech. Genet. Plant Breed., 46, (1), 27-34.

9. Sharifi, G., Ebrahimzadeh, H., 2010, Changes of antioxidant enzyme activities and isoenzyme profiles during *in vitro* shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.), Acta Biol. Hung., 61 (1), 73-89.

10. Eisvand, H.R., Tavakkol-Afshari, R., Sharifzadeh, F., Maddah Arefi, H., Hesamzadeh Hejazi, S.M., 2010, Effects of hormonal priming and drought stress on activity and isozyme profiles of antioxidant enzymes in deteriorated seed of tall wheatgrass (*Agropyron elongatum* Host), Seed Science and Technology, 38, 2, 280-297(18).

11. Ahmadizadeh, M., Valizadeh, M., Zaefizadeh, M., Shahbazi, H., 2011, Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition, Journal of Applied Sciences Research, 7(3), 236-246.

Sabeva, S., Nedeva, D., 2008, Antioxidant defense system in germinating wheat seeds. Acta Agronomica Hungarica, 56, 2, 113-127.

12. Balla, K., Bencze, S., Janda, T., Veisz, O., 2009, Analysis of heat stress tolerance in winter wheat, Acta Agr. Hung., 57, 4, 437-444.

13. Bencze, S., Bamberger, Z., Janda, T., Balla, K., Bedo, Z., Veisz, O., 2011, Drought tolerance in cereals in terms of water retention, photosynthesis and antioxidant enzyme activities, Central European Journal of Biology, 6 (3), 376-387.