



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

Гергана Кирилова Михайлова

**Засушаване на възкръсващото растение
Haberlea rhodopensis в условия на висока
температура и различни светлинни режими**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научната и образователна
степен „доктор“

Научна специалност:
01.06.10 – Биохимия

София, 2012

Дисертацията е написана на 143 страници и включва 46 фигури. Списъкът на цитираната литература съдържа 261 източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Разширен Научен Съвет на секция „Фотосинтеза” при Института по физиология на растенията и генетика–БАН, проведено на 30.03.2012 г.

Изследванията по дисертационния труд са проведени основно в секция „Фотосинтеза” на Института по физиология на растенията и генетика – БАН. Част от изследванията са проведени в Катедрата по биохимия на Биологически Факултет към СУ „Св.Климент Охридски” и Института по молекулярна биология към Университета във Франкфурт.

Благодарности: Работата по дисертационния труд е проведена благодарение на финансовата подкрепа на Фонд “Научни Изследвания” (Проект ДО02-208/2008).

Защитата на дисертационния труд ще се състои на на открито заседание на Жури, избрано от Научния съвет на Института по физиология на растенията и генетика – БАН с протокол №8/02.05.2012 и утвърдено със Заповед № 422/03.05.2012 на Директора на Института по физиология на растенията и генетика–БАН.

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев”, бл. 21, ет. 2, ст. 225 и на web-страницата на Института по физиология на растенията и генетика – БАН, <http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/>

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

Гергана Кирилова Михайлова

Засушаване на възкръсващото растение
***Haberlea rhodopensis* в условия на висока**
температура и различни светлинни режими

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научната и образователна
степен „доктор“

Научен ръководител:

доц. д-р Катя Георгиева

Рецензенти:

проф. дн Лиляна Масленкова

проф. дн Диана Петкова

Научна специалност:
01.06.10 – Биохимия

София, 2012

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АБК	Абсцисинова киселина
АКФ	Активни кислородни форми
АПО	Аскорбатпероксидаза
ГПО	Гваяколпероксидаза
КАТ	Каталаза
МДА	Малонилдиалдехид
ОВС	Относително водно съдържание
РЦ	Реакционен център
СОД	Супероксид дисмутаза
ФС1	Фотосистема 1
ФС2	Фотосистема 2
DT	Толерантност към десикация
DSP	Стресови белтъци, индуцирани от засушаването
HDT	Хомеохлорофилни толерантни към десикация растения
PDT	Пойкилохлорофилни толерантни към десикация растения
sHSPs	Нискомолекулни термошокови белтъци
nsLTP	Неспецифични липид - пренасящи белтъци
SDS-PAGE	Полиакриламидна гел електрофореза

УВОД

Един от основните фактори, които определят продуктивността на висшите растения, е наличието на вода. Според прогнозите на Международния институт по управление на водните ресурси през 2025 г. една трета от човечеството ще живее в региони, изпитващи силен недостиг на вода. Ето защо изясняването на механизмите на аклиматизация на растенията към воден дефицит е от първостепенно значение.

Някои растения притежават адаптационни механизми, които им позволяват да преживеят неблагоприятните периоди на засушаване, но те не ги правят толерантни към засушаване. С удължаване на периода на засушаване тези растения се дехидратират и загиват. Само малка група покритосеменни растения, известни като пойкилохидридни или "възкръсващи" растения, притежават уникалната способност да преживяват засушаване до въздушно-сухо състояние. При поливане растенията бързо се съвземат и се възстановяват напълно. Възкръсващите растения са отлична моделна система за изучаването на механизмите на устойчивост към силно засушаване. Устойчивост към екстремно засушаване (десикация) е доказана само за 350 вида, което представлява по-малко от 0.2% от цялата флора. В Европа възкръсващите растения са ограничени до два рода (*Ramonda* и *Haberlea*) от семейство *Gesneriaceae*.

Защитните механизми в процеса на десикация включват: синтез на нередуциращи ди- и олигозахариди, различни осмолити и специфични белтъци, такива като белтъците, появяващите се през късната ембриогенеза и термошовите белтъци, някои промени в липидния състав и повишена антиоксидантна активност за намаляване на предизвиканото от свободните радикали увреждане. Фотосинтетичният апарат е много чувствителен и податлив на увреждане, затова е нужно да бъде поддържан или бързо възстановен след рехидратиране.

Механизмите, позволяващи на възкръсващите растения да преживеят засушаване до въздушно-сухо състояние, не са напълно изяснени. Те са комплексни и варират между отделните видове. Много малко видове са изучени в детайли, като най-задълбочени биохимични изследвания са проведени с вида *Craterostigma*. Изследванията на механизмите на толерантност на уникалното за българската флора растение *Haberlea rhodopensis* към воден дефицит са все още недостатъчни.

В процеса на засушаване растенията трябва да бъдат защитени срещу различни стресови фактори, които съпровождат водния дефицит. Засушаването често протича на фона на висока температура и силна светлина, което оказва силно въздействие върху жизнеспособността на растенията. Ето защо изучаването на механизмите на устойчивост към засушаване при висока температура и/или силна светлина е изключително важно.

В настоящата работа е изследван ефектът на високата температура и силната светлина в процеса на засушаване на пойкилохидридното хомеохлорофилно възкръсващо растение *Haberlea rhodopensis*.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Въпреки значителния прогрес през последните години в изясняването на механизмите на устойчивост на възкръсващите растения към екстремно засушаване, все още доста въпроси остават неизяснени. Повечето от изследванията върху механизмите на толерантност на *Haberlea rhodopensis* към десикация са проведени с растения, които растат при много слаба светлина под сянката на дърветата. Макар че засушаването на възкръсващите растения в природата обикновено става при високи температури, такива изследвания липсват. Необходими са по-нататъшни изследвания и на влиянието на светлината в процеса на засушаване, тъй като силната светлина уврежда растителните тъкани. Използването на растения *Haberlea rhodopensis*, растящи при слаба или силна светлина в естествени условия, е удачен подход за изясняването на ефекта на светлината по време на засушаване.

Основната цел на настоящата работа е да се изследват механизмите на устойчивост към екстремно засушаване на хомеохлорофилното възкръсващо растение *Haberlea rhodopensis* при оптимална и висока температура и при нисък или висок интензитет на светлината.

За реализиране на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се проследи връзката между силата на стресовото увреждане и нивото на някои стресови маркери като пролин, малонилдиалдехид и електролитно изтичане по време на

- засушаване на растенията при различна температура и интензитет на светлината, както и след рехидратирането им
2. Да се изследва фотосинтетичната активност на *Haberlea rhodopensis* в процеса на засушаване и възстановяване при оптимална и висока температура
 3. Да се проследят промените в активността на някои антиоксидантни ензими по време на засушаване на растението *Haberlea rhodopensis* при оптимална и висока температура, както и след рехидратиране
 4. Да се установи влиянието на водния дефицит и температурата върху съдържанието на някои основни белтъци на ФС1 и ФС2 и да се анализира експресията на стрес-индуцирани sHSPs белтъци
 5. Да се изследва чувствителността на фотосинтетичния апарат на *Haberlea rhodopensis* към светлина по време на засушаването при оптимална и висока температура
 6. Да се сравни промяната във фотосинтетичната активност в процеса на засушаване на растения *Haberlea rhodopensis*, растящи при различни светлинни режими в естествени условия

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

РАСТИТЕЛЕН МАТЕРИАЛ

Изследванията са проведени с растения *Haberlea rhodopensis*, които растат в естествени условия при много нисък интензитет на светлината (около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) под сянката на дърветата при надморска височина около 650 m и растения, които растат върху скали със северно изложение, огрявани от слънцето през част от деня при интензитет на светлината в обедните часове около $600\text{--}700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и надморска височина от 1200 до 1400 m за различните местообитания. За всеки от експериментите са избрани розетки от едно и също местообитание и на еднаква възраст. Отделните туфи заедно с тънък слой от естествената им почва са засадени в саксии с торопочвена смес.

УСЛОВИЯ НА ТРЕТИРАНЕ НА РАСТЕНИЯТА

Засушаване при оптимална и висока температура

Изследванията върху ефекта на високата температура в процеса на засушаване са проведени с растения, които растат при много слаба светлина ($25\text{-}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) в естествени условия. Засадените в торопочвена смес растения са прехвърлени в климатична камера при $23/20^{\circ}\text{C}$ дневна/нощна температура, 12 ч. фотопериод, 60% въздушна влажност и интензитет на светлината около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и са акклимирани към тези условия за 2 седмици. Засушаването на растенията се провежда в климатичната камера при $23/20^{\circ}\text{C}$ или $38/30^{\circ}\text{C}$ дневна/нощна температура. След засушаване до абсолютно сухо състояние, растенията са рехидратирани като са поставени в ексикатор, в който сушителя е заменен с вода и с помощта на водна помпа се осигурява висока въздушна влажност чрез постоянна аерация на водата. Възстановяването на растенията, засушени при оптимална и висока температура, е проведено при 23°C . Контролните растения, както при $23/20^{\circ}\text{C}$, така и при $38/30^{\circ}\text{C}$, са пръскани и поливани редовно с вода. Измерванията са проведени с контролни растения и растения, които са слабо засушени (70-75% ОВС), средно засушени (48-55% ОВС), силно засушени (20-25% ОВС) и напълно (екстремно) засушени (под 10% ОВС), както и след 1 ден и 7 дни рехидратиране. Когато засушаването е проведено при оптимална температура различните степени на засушаване се достигат както следва: слабо засушаване след около 14 дни, средно засушаване – след около 16 дни, силно засушаване – след около 19 дни и екстремно засушаване (сухи листа) – след около 24 дни. Засушаването на растенията при висока температура увеличава скоростта на обезводняването им и слабо засушаване се достига след 3 дни, средно – след 4 дни, силно – след 6 дни и екстремно засушаване – след 7 дни.

Засушаване на растения, растящи при силна светлина в естествените местообитания

Изследванията са проведени с растения, засушени до различна степен в естествените им местообитания, както и в лабораторни условия.

Засушаване в естествени условия

Използвани са растения, засушени в различна степен в естествените им местообитания. Туфи (цели растения и прилежащия почвен слой) от напълно хидратирани (контролни) растения и средно, силно и напълно засушени растения са събрани и веднага са пренесени в лабораторни условия, където е измерено относителното им водно съдържание. ОВС варира в следните граници: контролни растения 90-98%, средно засушени – 48-55% и напълно засушени – 4-10%. Екстремно засушените растения са рехидратирани 5 дни в лабораторни условия по описания по-горе начин.

Растителният материал за биохимични изследвания веднага е замразен в течен азот и съхраняван при -80°C до провеждането на анализите.

Засушаване в лабораторни условия

Растенията са засушени в лабораторни условия в климатична камера при температура $23/20^{\circ}\text{C}$ (дневна/нощна), 12 ч. фотопериод, 60% влажност на въздуха и интензитет на светлината $700\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. След засушаване до абсолютно сухо състояние, растенията са рехидратирани за 5 дни. Контролните растения (95% ОВС) са пръскани и поливани редовно с вода. Измерванията са проведени с контролни растения, средно засушени (48-55% ОВС), силно засушени (20-25% ОВС) и напълно (екстремно) засушени (под 10% ОВС), както и след 5 дни възстановяване.

ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Определяне на относителното водно съдържание
2. Определяне на електролитното изтичане с помощта на кондуктометър (EC 215, Hanna Instruments, USA)
3. Определяне степента на липидно пероксидиране (Esterbauer et al. 1990)
4. Определяне количеството на свободен пролин (Bates et al. 1973)
5. Определяне количеството на листните пигменти– концентрацията е изчислена съгласно Lichtenthaler (1987)
6. Регистриране на параметрите на фотосинтезата и устичния апарат с помощта на портативен апарат LCpro+ (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK).

7. Измерване на скоростта на кислородно отделяне в листни дискове с електрод от Кларков тип (LD2, Hansatech, UK)
8. Регистриране на параметрите на хлорофилната флуоресценция
 - 8.1. Измерване на хлорофилната флуоресценция с флуорометър РАМ 101-103
 - 8.2. Измерване на хлорофилната флуоресценция с портативен флуорометър РАМ 2500
 - 8.3. Определяне на компонентите на нефотохимичното гасене q_N
9. Промени в абсорбция на Р700 при $\Delta 830$ регистрирани с емитер-детекторна единица ED 700DW-E (Walz, Effeltrich, Germany), свързана с РАМ 101 блока на РАМ флуорометъра,
10. Определяне на активността на антиоксидантни ензими
 - 10.1. Определяне на активността на КАТ и ГПО (Brennan and Frenkel, 1977; Dias and Costa, 1983)
 - 10.2. Определяне на активността на АПО (Nakano and Asada, 1981)
 - 10.3. Определяне на активността на СОД (Beyer and Fridovich, 1987)
 - 10.4 Определяне на белтъчно съдържание (Lowry et al. 1951)
11. Едномерна полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) при денатуриращи условия за разделяне на тотален белтък
 - 11.1 Изолиране на тотален белтък от листа
 - 11.2 Определяне на белтъчната концентрация с *bicinchoninic acid*
 - 11.3 SDS-PAGE съгласно Laemmli (1970)
 - 11.4 Оцветяване на белтъци с Coomassie Brilliant Blue R-250
 - 11.5 Полусух електропренос с апарат TE70X (Hoefer, USA)
 - 11.6 Имуноблот
12. Двумерна гел електрофореза (2-D) (Issaq et al. 2002)
 - 12.1. Първо направление: Изоелектрично фокусиране (IEF)
 - 12.2. Второ направление: SDS-PAGE
13. Изолиране на тилакоидни мембрани (Berthold et al. 1981)
14. 1D SDS-PAGE електрофореза и имуноблот на белтъци от реакционните центрове на ФС1 и ФС2, ССК2 и PsbS (Schägger and Jagov, 1987)

Статистическа обработка на резултатите

Резултатите от измерванията са сравнени статистически. Данните от проведените изследвания представляват средни стойности $\pm SE$ от три независими експеримента, всеки поне в 3 повторения. Използван е Student t – test.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

ЗАСУШАВАНЕ В УСЛОВИЯ НА ВИСОКА ТЕМПЕРАТУРА

Растенията са засушавани до въздушно сухо състояние при нисък интензитет на светлината (около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при оптимална (23/20°C) или висока (38/30°C) температура. Засушаването на растенията при висока температура увеличава скоростта на обезводняването им 3 пъти. ОВС на листата достига 8% след 24 дни и 7 дни на засушаване, съответно при 23°C и 38°C. След рехидратирането на напълно засушените растения при 23°C и 38°C те бързо се възстановяват и ОВС на листата достига съответно 80% и 60% след 1 ден (R1) и 95% след 7 дни рехидратиране (R7).

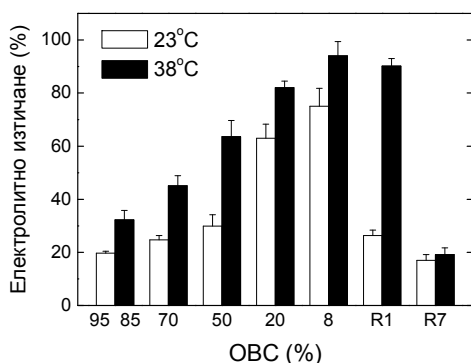
ОВС на растенията, които са поливани редовно, но са били изложени на висока температура (контрола за растенията, засушени при 38°C) е измервано при всяка от изследваните степени на засушаване. То намалява до 85% след 3 дневно високо температурно третиране, когато ОВС на засушените растения достига около 70% и не се променя до края на експеримента. Освен това, стойностите на изследваните параметри, измерени в процеса на третирането на растенията при 38°C са много близки. Поради това данните за контролата при 38°C са представени като средна стойност от измерванията, проведени при всяка степен на засушаване (70, 50, 20 и 8% ОВС). ОВС на контролните растения при 23°C не се променя съществено по време на експеримента.

Наблюдавани са следните фенотипни промени в процеса на засушаване на растенията: при 50% ОВС растенията са загубили тургор, листата са разтегливи, но площта им не е променена. Понататъшното намаляване на ОВС предизвиква завиване и свиване на листата, като площта им намалява с около 60% при 8% ОВС. След рехидратирането на растенията те бързо се възстановяват и не се различават от контролните след 7 дни (Фиг. 5 от дисертацията).

Изменение в нивото на електролитно изтичане

Промените в интегритета на мембраните е оценяван чрез измерване на електролитното изтичане от листата на контролните и засушените при оптимална и висока температура растения. Засушаването на *Haberlea* при 23°C води до постепенно повишаване на електролитното изтичане и то е статистически достоверно дори при умерено засушаване (ОВС 70% и 50%, $p < 0.05$) (Фиг. 1). В сухите листа

изтичането на електролити е четири пъти по-високо от това на контролата. Един ден след рехидратирането на растенията стойностите му рязко намаляват и достигат контролните след 7 дни. Електролитното изтичане се повишава с 65% в резултат на третирането на растенията с висока температура (85% ОВС, $p < 0.01$) и стойностите му продължават да нарастват в хода на засушаването при 38°C. Стойностите на електролитното изтичане не се променят съществено един ден след рехидратирането на засушените при 38°C растения, но силно намаляват след 7-дневното им възстановяване. Получените резултати показват, че силното засушаване на *H. rhodopensis*, особено при висока температура, предизвиква известно увреждане на мембраните, но то е обратимо и растенията напълно се възстановяват след рехидратирането им.



Фиг. 1. Промени в електролитното изтичане в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура и нисък интензитет на светлината ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), както и след един (R1) и 7 дни (R7) рехидратиране. Представени са средните стойности от 6 независими експеримента, всеки в 3 повторения със стандартната грешка.

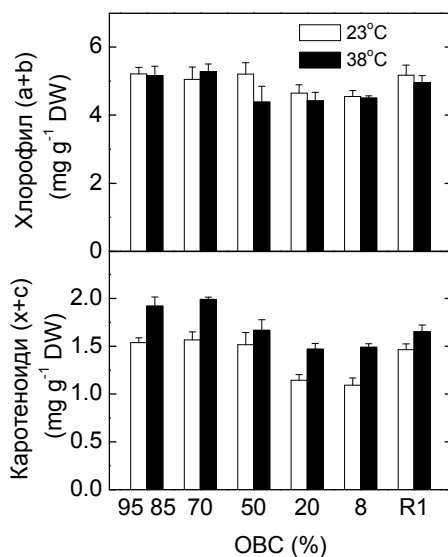
Резултатите на Yahubyan et al. (2009), както и нашите резултати показват повишаване на електролитното изтичане по време на засушаването на цели растения *Haberlea rhodopensis*. Засушаването на тъмно на откъснати листа на *Haberlea rhodopensis* предизвиква по-слабо увеличаване на електролитното изтичане в сравнение с това на цели растения (Georgieva et al. 2005, Maslenkova et al. 2010). Повишеното електролитното изтичане по време на засушаването

може да се дължи на реорганизация на мембраните поради промени в липидните и белтъчни й компоненти (Yahubyen et al. 2009).

Влияние на засушаването и високата температура върху фотосинтетичната активност на *Haberlea rhodopensis*

Промени в съдържанието на фотосинтетичните пигменти

Хлорофилното съдържание слабо се понижава в резултат на засушаването на *Haberlea rhodopensis* при оптимална и висока температура (Фиг 2). То намалява с около 15% в сухите листа ($p < 0.05$) и се възстановява след рехидратирането на растенията. Това е очакван резултат, тъй като хомеохлорофилните възкръсващи растения запазват хлорофила си при десикация. Освен това, засушаването е проведено при много слаба светлина, което съответства на условията на осветяване в естествените местообитания.



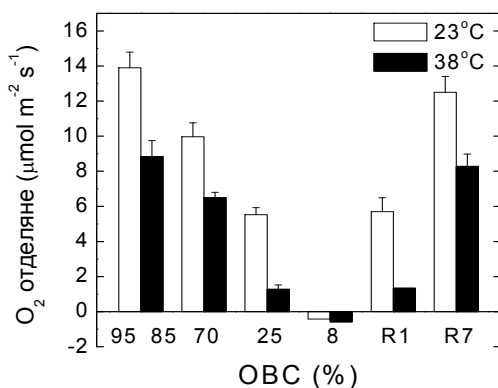
Фиг. 2. Промени в съдържанието на хлорофил и каротеноиди по време на засушаване на растения *Haberlea rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура, и нисък светлинен интензитет ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) и след един ден рехидратиране (R1).

Третирането на контролните растения при висока температура повишава каротеноидното съдържание (Фиг. 2, $p < 0.01$). Подобно на хлорофила, количеството на каротеноиди намалява само в силно засушените листа ($p < 0.01$), но то остава по-високо по време на засушаването при 38°C в сравнение с това при 23°C.

Тъй като каротеноидите притежават свойството да разсейват излишната светлинна енергия чрез нефотохимично гасене под формата на топлина и така да предотвратяват образуването на синглетен кислород, повишеното им съдържание при засушаването на *Haberlea* при висока температура вероятно помага за ограничаване на увреждането на растенията (Frank et al. 1999).

Влияние на засушаването и високата температура върху скоростта на фотосинтезата

Кислородното отделяне е много чувствително към засушаване. То намалява с 30% още при умерена степен на засушаване, 70% ОВС (Фиг. 3, $p < 0.01$) при 23°C, а при 8% ОВС е напълно инхибирано. Третирането на контролните растения с висока температура понижава скоростта на кислородното отделяне с 35% ($p < 0.01$). Резултатите показват, че засушаването при 38°C редуцира много по-силно скоростта на кислородно отделяне в сравнение със засушаването при 23°C. След 1 ден рехидратиране, скоростта на O_2 отделяне започва да нараства, като се възстановява много по-бързо при растенията, засушени при оптимална температура. След 7-дневно възстановяване на растенията стойностите на O_2 отделяне се доближават до контролните. Според Пеева (2009) силното засушаване на *H. rhodopensis* не води до големи промени в броя на кислород-отделящите центрове в S0 и S1 състояние, което вероятно допринася за по-бързото възстановяване на растенията след рехидратирането им.



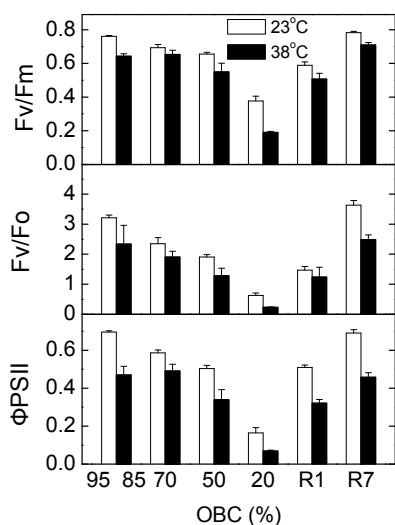
Фиг.3. Изменения в скоростта на фотосинтетичното кислородно отделяне при засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура и нисък интензитет на светлината ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), както и след 1 ден (R1) и 7 дни (R7) рехидратиране.

В хлоропластите, изолирани от засушени листа на *Haberlea* и *P. polypodioides* не са наблюдавани съществени изменения в кинетиката на кислород-отделящите реакции в сравнение с нетретираните контроли, което показва запазването на мембранныя интегритет на хлоропластите в процеса на десикация и рехидратиране на листата на толерантните растения (Масленкова 2009).

Засушаването на *H. rhodopensis* при оптимална и висока температура повлиява скоростта на CO_2 асимилация по аналогичен начин, както кислородното отделяне (Фиг. 12 от дисертацията).

Промени във фотохимичната активност на ФС2

Максималната квантова ефективност на ФС2, оценена по отношението F_v/F_m , постепенно намалява в хода на засушаването до 50% ОВС (Фиг. 4) и това се дължи главно на увеличената минимална (нулева) хлорофилна флуоресценция, F_o (от 0.0344 ± 0.009 при 95% ОВС до 0.0518 ± 0.003 при 50% ОВС), докато максималната флуоресценция F_m не се променя съществено. По-силното обезводняване на растенията води до силно понижение на F_m и отношението F_v/F_m намалява с 50% при 20% ОВС ($P < 0.001$). Отношението вариабилна към нулева флуоресценция, F_v/F_o , което е значително по-чувствително към различни стресови фактори от F_v/F_m , намалява с 40% и 80% съответно при ОВС 50% и 20%.



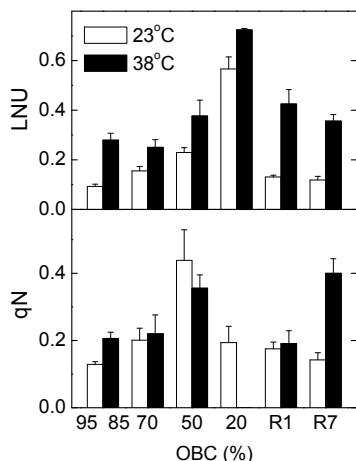
Фиг. 4. Промени в максималната квантова ефективност на ФС2 (F_v/F_m и F_v/F_o) и квантовият добив на електронния транспорт през ФС2 (ФСII) в процеса на засушаване на *H. rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура и нисък интензитет на светлината ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) и след един (R1) и 7 дни (R7) рехидратиране.

Квантовият добив на електронния транспорт през ФС2 в светлинно-адаптирано състояние (ФПСII) се повлиява по-силно от засушаването и от високата температура (Фиг. 4), в сравнение с отношението F_v/F_m . Третирането на растенията при 38°C води до понижаване на F_v/F_m и ФПСII съответно с 20% ($p < 0.001$) и 35% ($p < 0.001$). Засушаването на *Haberlea* при висока температура редуцира фотохимичната активност много по-силно, отколкото това при оптимална температура.

Установено е, че понижаването на фотохимичната активност на ФС2 при силно засушаване на *H. rhodopensis* се дължи на разпргането на двете фотосистеми и на намаляване на броя на активните реакционни центрове (Peeva and Maslenkova 2004; Strasser et al. 2010). Намаляването на фотохимичната активност на ФС2 е по-скоро регулаторен механизъм за приспособяване към ограниченото наличие на въглерод в резултат на водния стрес (Saccardy et al. 1998).

Промени в нефотохимичните процеси

Получените резултати показват, че частта от енергията, която не се използва за фотохимични реакции (LNU, Cornic 1994) нараства с увеличаване на степента на засушаване при 23°C и тя е 6 пъти по-висока от контролата при 20% ОВС (Фиг. 5). Стойностите на LNU при растенията, засушени при 38°C, са по-високи от тези при засушените при 23°C. След рехидратиране LNU намалява, но остава по-високо в сравнение с контролата.



Фиг. 5. Промени в пропорцията на светлината, неизползвана за фотохимични реакции и нефотохимичното гасене на хлорофилната флуоресценция, qN при засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура, и нисък светлинен интензитет ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) и след 1 ден (R1) и 7 дни (R7) рехидратиране.

Нефотохимично гасене на вариабилната хлорофилна флуоресценция, qN отразява активирането на нефотохимичните процеси през светлинния период, водещи до топлинна дисипация. qN се повишава значително при умерено засушените при оптимална и висока температура растения (Фиг. 5). Увеличение на нефотохимичното гасене при умерен воден дефицит е установено освен при *Haberlea rhodopensis* и при *Ramonda serbica* и *Paraboea rufescens* (Georgieva et al. 2007, Augusti et al. 2001, Huang et al. 2012). Екстремното засушаване води до намаляване на нефотохимичното гасене, особено при 38°C. Следователно, термалната дисипация на енергията на възбуждане, която не може да се използва за фотохимични реакции, играе важна роля за предотвратяване на фотоинхибирането в началните етапи на засушаване, когато все още е налице електронен транспорт и протонен градиент, докато при много ниско ОВС на листата вероятно други механизми са от значение.

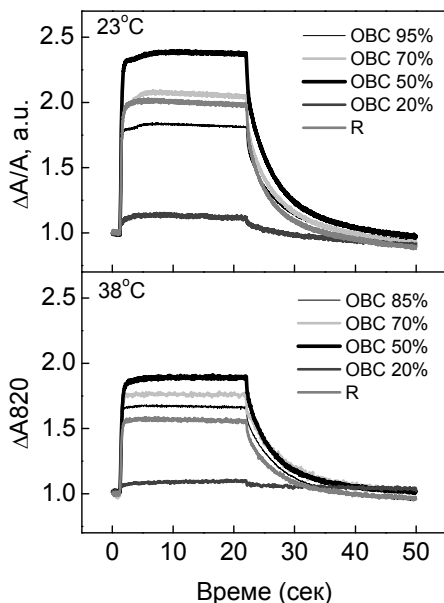
Стойностите на qN нарастват след рехидратирането на засушените растения и достигат тези на контролата след 1 ден възстановяване, но са по-високи от нея след 7 дни рехидратиране на растенията, засушени при висока температура.

Промени във фотохимичната активност на ФС1

Активността на ФС1, измерена чрез индуцираното от инфрачервената светлина окисление на P700, се увеличава при умерено засушените растения *Haberlea rhodopensis*, но силно се редуцира, когато ОВС достигне 20% (Фиг. 6).

Повишение на квантовия добив на ФС1 и окисление на P700 е установено при засушаване при слаба светлина на възкръсващото растение *Paraboea rufescens* (Huang et al. 2012). Възможно обяснение на тези резултати е, че ограничаването на електронния поток от ФС2 към ФС1 увеличава окислението на P700. Освен това, не могат да бъдат изключени и промени в оптичните свойства на засушените листа, които водят до повишено окисление на P700. Huang et al. (2012) са установили, че повишената активност на ФС1 на *Paraboea rufescens* при умерен воден дефицит е придружено от стимулиране на цикличния електронен транспорт около тази фотосистема, което я предпазва от фотоинхибиране като предотвратява прередуцирането на акцепторната страна на ФС1. От друга страна, резултатите на Пеева (2009) показват, че не е индуциран цикличен електронен транспорт около ФС1 в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis*. Нашите

резултати (оценени по скоростта на спада на сигнала след изключване на инфрачервена светлина) също не показват промени в ЦЕТ около ФС1 (Фиг. 6).



Фиг. 6. Промяна в окислението на P700, индуцирано от инфрачервена светлина при засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура, и нисък светлинен интензитет ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) и след 1 ден рехидратиране (R). Представени са осреднени криви ($n=6$, $\text{SE}<8\%$).

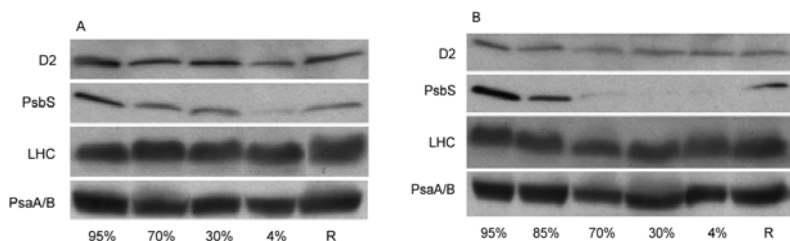
Третирането на растенията с висока температура слабо понижава функционалната активност на ФС1, потвърждавайки предишни резултати, че ФС1 е по-устойчива към високотемпературен стрес, отколкото ФС2 (Sayed et al. 1989; Boucher and Carpentier 1993). Засушаването на *Haberlea* при 38°C предизвиква по-силно понижаване на активността на ФС1 в сравнение с това при 23°C. Подобно на ФС2, активността на ФС1 се възстановява бързо след рехидратиране на растенията.

Промени в количеството на белтъците D2, PsaA/B, PsbS и ЛНС в изолирани тилакоидни мембрани

Установено е слабо намаляване на количеството на белтъците D2, PsaA/B и PsbS, особено при екстремно засушените листа на *Haberlea* (4% OBC) при 23°C (Фиг. 7). След рехидрататиране на растенията количеството им се възстановява. Резултатите показват увеличаване

на количеството на ЛНС протеините с увеличаване степента на засушаване.

Третирането на растенията при висока температура (85% ОВС) не повлиява значително изследваните белтъци. Засушаването при 38°C води до подобни промени, както при 23°C (Фиг. 7). Изглежда PsbS протеина е най-чувствителен към засушаване при 38°C, но въпреки това количеството му значително се повишава след рехидратирането на растенията. Намаляването на съдържанието на PsbS белтъка още в началото на засушаването както при оптимална, така и при висока температура, не съвпада с получените данни за нефотохимичното гасене, което нараства при умерен воден стрес. Повишените стойности на qN може би са свързани със зеаксантин-зависимо (Müller et al. 2001; Demmig-Adams 1990) или PsbZ - индуцирано нефотохимично гасене (Swiatek et al. 2001).



Фиг. 7. Имуноблот на тилакоидни мембрани от контролни, засушени при 23°C (A) и 38°C (B) и рехидратирани (7 дни) растения (R). На всеки старт са нанесени тилакоидни мембрани, съответстващи на 15 μ g Chl *a*

Получените резултати са напълно логични с оглед на това, че *Haberlea rhodopensis* принадлежи към групата на хомеохлорофилните растения, които запазват хлорофила си и хлорофил-белтъчните комплекси остават относително стабилни по време на засушаването на растенията (Georgieva et al. 2007). Висока стабилност на пигмент-белтъчните комплекси е установена и в процеса на дехидратиране на друго HDT растение, *Boea hygrometrica* (Deng et al. 2003), докато при чувствителните към засушаване растения те напълно се разграждат в резултат на засушаването (Lu and Zhang 1999).

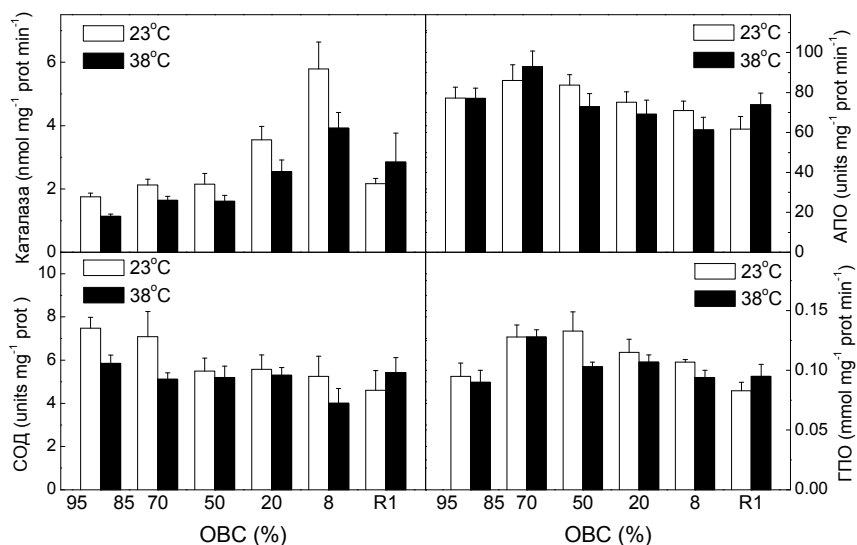
Промяна в активността на антиоксидантните ензими

Засушаването на *Haberlea* при слаба светлина и оптимална температура води до постепенно намаляване на активността на СОД

(Фиг. 8) и при 50% ОВС тя е с 25% по-ниска от тази на контролата ($p<0.05$). 24 ч. след рехидратирането на растенията активността на СОД е 60% от тази на контролата. Третирането с висока температура намалява активността на СОД с около 20% ($p<0.05$). Засушаването на растенията при 38°C не повлиява допълнително активността й, освен при растенията засушени до 8% ОВС, където тя намалява с около 30% ($p<0.05$) в сравнение с контрола при 38°C.

Активността на АПО се увеличава незначително при умерено засушени (70% и 50% ОВС) растения *Haberlea* при 23°C (Фиг. 8). Слабо понижение на активността на ензима се наблюдава при екстремно засушени растения (8% ОВС), както и при рехидратираните растения, но то е статистически недостоверно. Засушаването на *Haberlea* при висока температура повлиява активността на АПО аналогично на това при 23°C.

Аналогични са и промените в активността на ГПО по време на засушаването на *Haberlea rhodopensis* при оптимална и висока температура.



Фиг. 8. Промяна в активността на каталаза, СОД, АПО и ГПО по време на засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура и след 1 ден рехидратиране (R).

Нашите изследвания показаха, че активността на каталазата се увеличава с увеличаване на степента на засушаване при 23°C (Фиг. 8), като стойностите ѝ са три пъти по-високи от контролните в екстремно засушените растения.

Въпреки значителния инхибиторен ефект на високата температура върху каталазната активност (тя намалява с 35%, $p < 0.01$), засушаването при 38°C също води до увеличение на активността на ензима. Повишената каталазна активност предполага повишено фотодишане, което допринася за намаляването на концентрацията на O₂. След рехидратирането на растенията, активността на каталазата намалява, но остава по-висока от тази на контролата.

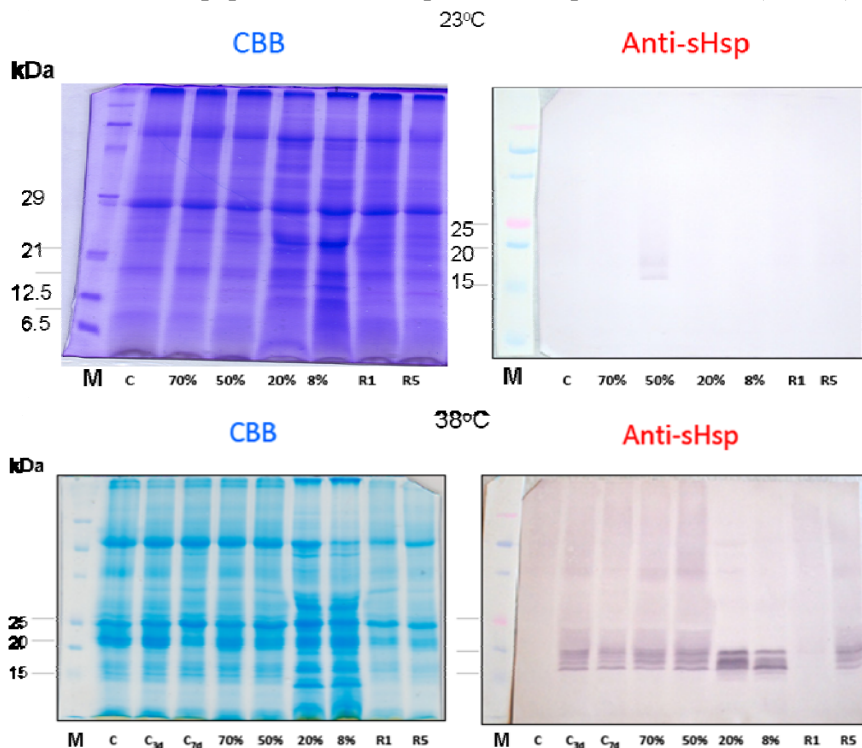
Изследваните антиоксидантни ензими играят значителна роля по време на засушаването на *Haberlea rhodopensis*, както при оптимална, така и при висока температура. Както нашите резултати, така и тези на Yahubyun et al. (2009) показват, че изследваните ензими не са инактивирани в засушените листа на *Haberlea* и дори в сухите листа те притежават значителна активност. Способността им да останат активни след екстракция от засушени тъкани може да се дължи на механизъм, който защитава и запазва антиоксидантните ензими в нативна форма, което впоследствие води до увеличение на активността на протеините (Illing et al. 2005).

Стрес-индуцирани sHSPs белтъци

Анализът на профила на белтъците след тяхното разделяне с едномерна SDS-PAGE и последващо оцветяване с кумаси (Фиг. 9) показва най-големи различия при силно и екстремно засушените при оптимална и висока температура растения (20% и 8% OBC), като се наблюдава поява на нови белтъци в областта между 10–30 kDa. Имуноблот анализът показва, че по време на засушаването при 23°C, sHSPs се експресират само при 50% OBC, като полученият сигнал е относително слаб. Нашите резултати потвърждават тези на Rizsky et al. (2002), че засушаването предизвиква сравнително слаба промяна в експресията на sHSPs.

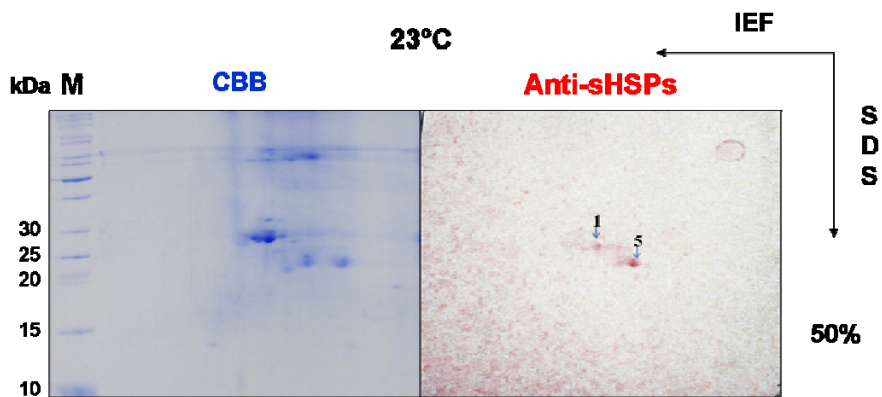
При засушаване на растенията при висока температура (38°C) обаче, резултатите от имуноблота показват наличие на sHSPs с молекулна маса 15 - 20 kDa във всички проби (с изключение на рехидратираните за 1 ден растения) (Фиг. 9). Изглежда, че експресията на sHSPs се променя количествено и качествено в хода на засушаването при висока температура, както и след рехидратиране на

растенията. При силно и екстремно засушаване (20% и 8% ОВС) се наблюдават изоформи, които не присъстват при останалите (Фиг. 9).



Фиг. 9. Анализ на експресията на sHSPs белтъци по време на засушаване на *Haberlea rhodopensis* при 23°C и 38°C чрез 1D електрофореза. Вляво – оцветяване с кумаси (CBB), вдясно – имуноблот анализ с anti – sHSPs антитяло (Ab_α). Нанесени са 30 µg белтък на старта.

За по-подробен анализ на качествените промени в експресията на sHSPs по време на засушаването беше използвана двумерна електрофореза (Фиг. 10 и Фиг. 11). След последваща серия от имуноблотове е установено наличието на различни изоформи на sHSPs с много близка молекулна маса (17 kDa и 18 kDa) и изоелектрични точки между 5 – 6.5. Различията в изоелектричната точка на белтъците с еднаква молекулна маса най-вероятно се дължат на пост - транслационни модификации на белтъците, като най-често срещаема от тях е фосфорилирането.



Фиг. 10. Анализ на експресията на sHSPs белтъци по време на засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална температура (50% OBC) чрез 2D електрофореза. Вляво – оцветяване с кумаси (CBB), вдясно – имуноблот анализ с anti – sHSPs антитяло (Ab_u). Диапазонът на амфолините е 2.5-8. Нанесени са съответно 30 μ g и 50 μ g белтък на старт.

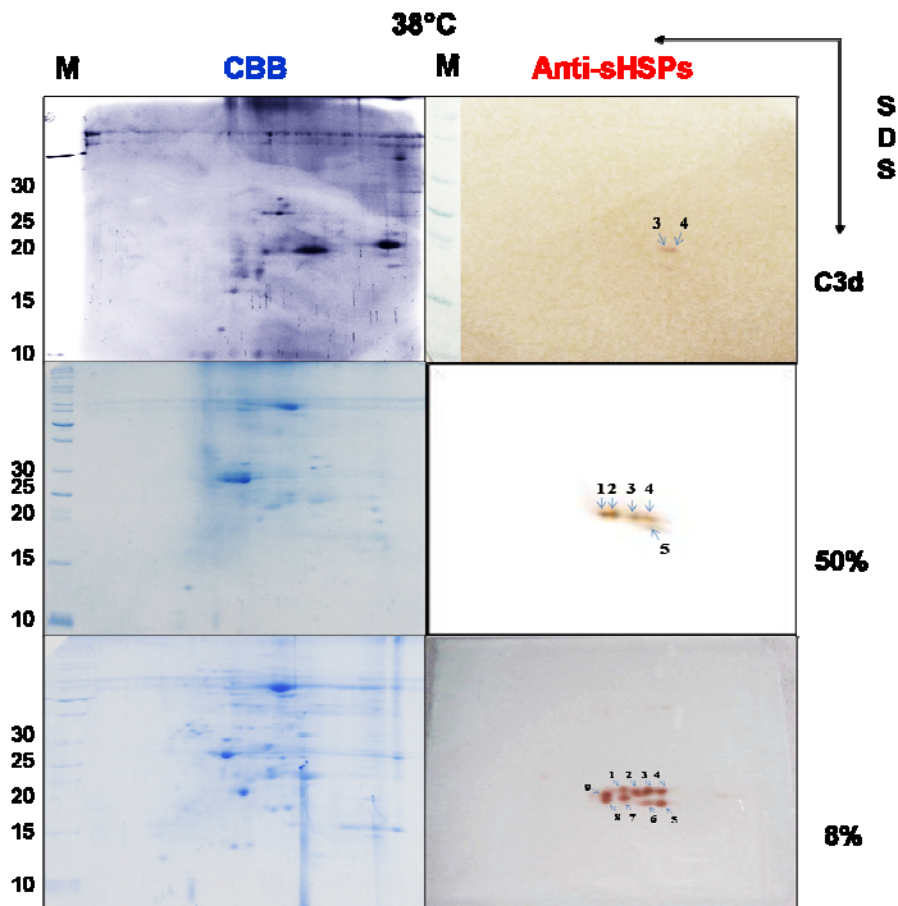
Имуноблотът след 2D електрофореза показва, че двата sHSPs с молекулна маса 17 kDa и 18 kDa, установени след 1D електрофореза и имуноблот (Фиг. 9) при засушаване на *Haberlea rhodopensis* до 50% OBC при оптимална температура, се отличават и по изоелектрична точка (№1 и №5) (Фиг. 10). Интересно за отбелязване е нарастването на броя на sHSPs изоформите при засушаване на растенията при висока температура, които достигат до 9 при екстремното засушаване (Фиг. 11). Белтъците се различават при различните етапи на третиране както следва: 2 изоформи се експресират при контролата, третирана само с висока температурата (C3d, №3 и №4), 5 – при 50% OBC (№1 – №5) и 9 при 8% OBC (№1 – №9).

Данните от двумерната електрофореза и имуноблот показват, че различията в профила на sHSPs при третиране с висока температура и екстремно засушаване на растенията (38°C, 8% OBC) и тези на останалите степени на засушаване, показани на Фиг. 9, се дължат на наличието на 9 изоформи на sHSPs, като 4 от тях са специфични само за тази степен на засушаване (№ 6 – № 9) (Фиг. 11, 8% OBC). От получените резултати можем да заключим, че различните изоформи на sHSPs в листата на *Haberlea rhodopensis* се експресират под влияние:

- 1) само на засушаването (№ 1 и 5);
- 2) само на високата температура (№ 3 и 4);

3) на засушаване и висока температура (№ 2, 6, 7, 8 и 9).

sHSPs са установени при засушаване при 38°C (Фиг. 9), но също така и при растения, засушени до 50% ОВС при 23°C (Фиг. 9). Всички наши резултати досега са показали, че засушаването на *Haberlea* до 50% ОВС се явява критична точка за много от изследваните параметри.



Фиг. 11. Анализ на експресията на sHSPs белтъци по време на засушаване на *Haberlea rhodopensis* при висока температура (C3d, 50% ОВС и 8% ОВС) чрез 2D електрофореза. Вляво – оцветяване с кумаси (CBV), дясно – имуноблот анализ с anti – sHSPs антитяло (Ab_a). Диапазонът на амфолините е 2.5-8. Нанесени са съответно 30 μ g и 50 μ g белтък на старт.

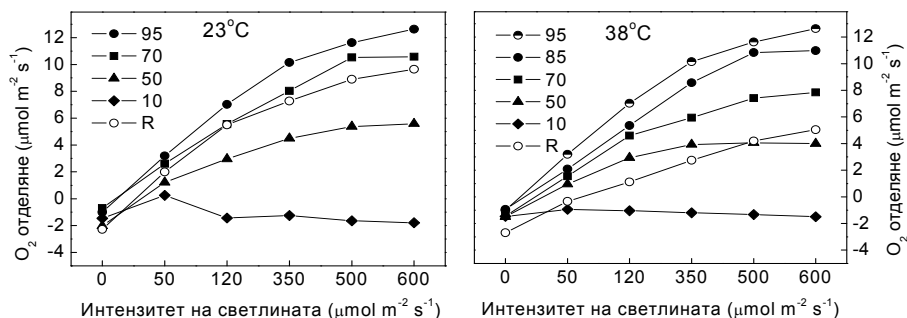
Въпреки че функцията на sHSPs не е напълно изяснена, общоприето е мнението, че те действат едновременно с други механизми за предотвратяване увреждане на клетките, провокирано от различни видове стрес (Kotak et al. 2007).

ОЦЕНКА НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА ФОТОСИНТЕЗАТА КЪМ ФОТОИНХИБИРАНЕ ПРИ РАСТЕНИЯ *HABERLEA RHODOPENSIS*, ЗАСУШЕНИ В РАЗЛИЧНА СТЕПЕН ПРИ ОПТИМАЛНА И ВИСОКА ТЕМПЕРАТУРА

Светлинни криви на кислородното отделяне

За оценка на чувствителността на растенията *Haberlea* към фотоинхибиране, скоростта на O_2 отделяне е измерена при различен интензитет на светлината. Стойностите на O_2 отделяне се повишават с увеличаване на интензитета на светлината и светлинно насищане се достига при $500-600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD (Фиг. 12). Но повишаването на фотосинтетичната активност с увеличаване на интензитета на светлината е по-слабо изразено с намаляването на ОВС на листата.

Светлинната зависимост на скоростта на O_2 отделяне е моделирана чрез хипербола (Ögren 1993). Максималната стойност на O_2 отделяне, изчислена от светлинната крива, A_{max} намалява в хода на засушаването (Фиг. 30 от дисертацията), като това намаление е по-силно изразено при растенията, засушени при висока температура. Предполага се, че намалението на A_{max} се дължи по-скоро на регулаторни процеси, отколкото на увреждане (Ribeiro et al. 2003).

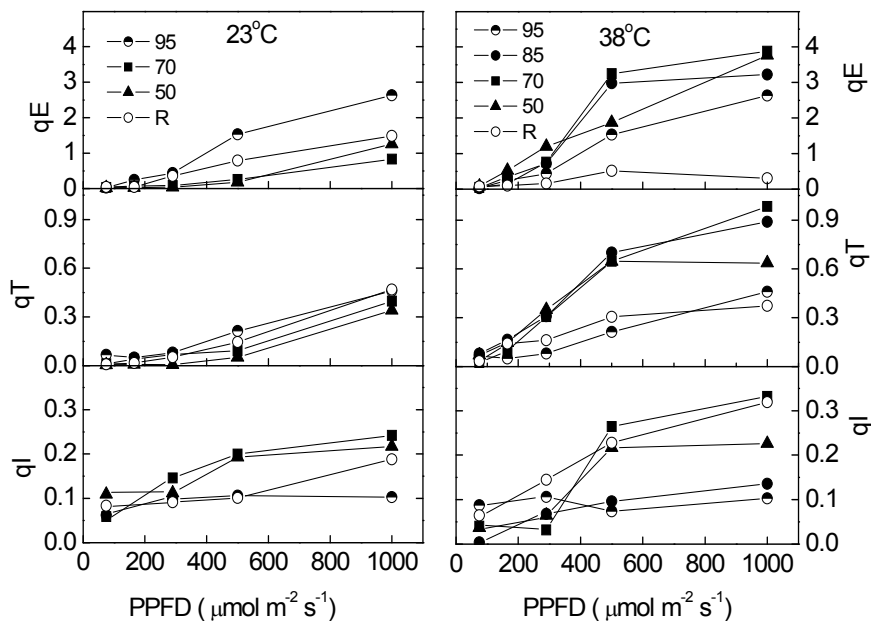


Фиг. 12. Светлинни криви на фотосинтетичното кислородно отделяне на *Haberlea rhodopensis*, засушени до различна степен при 23°C и 38°C и след 1 ден рехидратиране (R). Представени са осреднени криви ($n=6$, $SE<10\%$)

Резултатите, получени за алтернативните електронни потоци (AES) показват, че регулаторните процеси не са свързани с повишен цикличен електронен транспорт около ФС1. Наблюдаваната активация на AES при растенията *H. rhodopenensis*, засушени до 50% ОВС при 38°C, а също и след рехидратирането им, вероятно е свързано с други възможни процеси, като ЦЕТ през ФС2, хлоропластно дишане и процеси водещи до редукция на пластохиноновия пул от стромални донори на електрони. Повишените AES осигуряват АТФ, необходим за репарационните процеси.

Определяне на относителния дял на компонентите на нефотохимичното гасене

Увеличаването на термалната дисипация на енергията на възбуждане в условия на стрес е защитен механизъм, чрез който се регулира разпределението на светлинната енергия във ФС2.



Фиг. 13. Светлинни криви на компонентите на нефотохимичното гасене, измерени в растения *Haberolea rhodopenensis*, засушени при 23°C и 38°C и след 1 ден рехидратиране (R).

Нефотохичното гасене на хлорофилната флуоресценция има три компонента: енергетично-зависимо гасене, qE , което се индуцира от ниско рН в лумена на тилакоидите и процеса включва индуцирано от светлината формиране на зеаксантин (Demmig-Adams and Adams 1992); фотоинхибиторно гасене, qI и гасене, свързано с прехода от състояние 1 в състояние 2, qT (фосфорилиране на $CSK2$, Walters and Horton 1991). Относителният дял на компонентите на нефотохимичното гасене е определен чрез измерване на тъмнинната релаксация на хлорофилната флуоресценция след изключването на активиращата светлина.

Получените резултати показват, че третирането на хидратираните растения при $38^{\circ}C$ води до по-силно повишаване на qE и qT в сравнение с контролните растения при $23^{\circ}C$ и не повлиява съществено qI . Засушаването на *Haberlea* при висока температура предизвиква повишаване и на трите компонента на нефотохимично гасене.

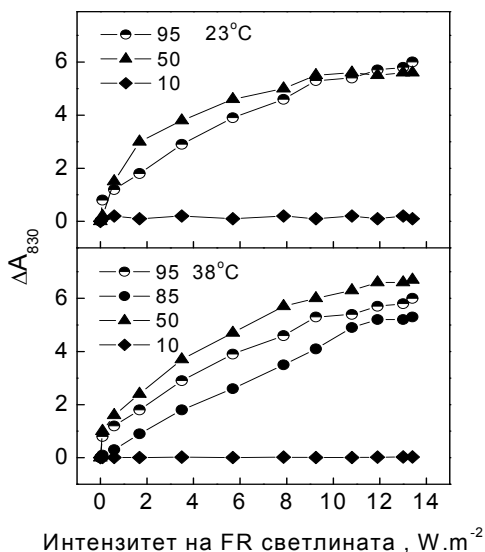
Окисление на P700 при различен интензитет на инфрачервената светлина

Редокс-състоянието на P700 е определено чрез регистриране на промяната в разликата между абсорбцията при 810 nm и тази при 860 nm. Разликата в сигнала ΔA_{810max} е показател за фотохимичната активност на $PC1$ (Harbinson and Woodward 1987; Weis and Lechtenberg 1989). Получените резултати показват, че окислението на P700 се повишава с нарастване на интензитета на инфрачервената светлина в засушените до 50% ОВС листа на *H. rhodopensis* и то е по-силно, когато засушаването е при висока температура (Фиг. 14).

Активността на $PC1$ е инхибирана в екстремно засушените листа (10% ОВС). Третирането на хидратираните (контролни) растения при $38^{\circ}C$ не повлиява съществено ΔA_{810max} , но се наблюдава по-слабо увеличение на ΔA_{810} с повишаване на интензитета на инфрачервената светлина (Фиг. 14).

От светлинните криви на A_{810} са изчислени стойностите на константата на полунасищане на окислението на P700, K_s ($\Delta A_{810max}/2$). Стойностите на K_s се понижават в хода на засушаването, като те са по-високи при растенията, засушени при висока температура, с изключение на растенията с ОВС 10%. Намаляването на K_s , наблюдавано по време на засушаване показва, че е необходим по-нисък интензитет на инфрачервената светлина за окислението на P700. От друга страна, увеличените стойности на K_s при растенията,

третирани при висока температура и засушените до 50% ОВС при 38°C, показват повишената активност на ФС1.



Фиг. 14. Промени в абсорбцията на P700 в зависимост от интензитета на инфрачервената светлина в листа на *Haberlea rhodopensis*, засушени в различна степен при оптимална (23°C) и висока (38°C) температура. Представени са осреднени криви (n=6, SE< 7%)

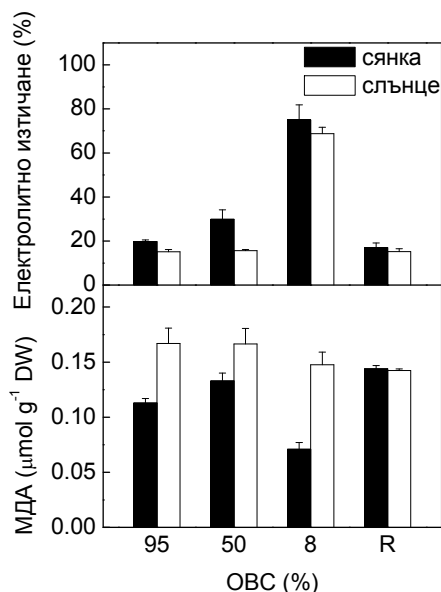
ВЛИЯНИЕ НА СВЕТЛИНАТА В ПРОЦЕСА НА ЗАСУШАВАНЕ

Ефектът на светлината в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* е оценен чрез сравняване на промените във фотосинтетичната активност и в количеството на някои стресови маркери, измерени в растения, растящи при различен интензитет на светлината в естествени условия. Използвани са растения, които растат върху скали със северно изложение при много слаба светлина под сянката на дърветата (около 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, „сенчести” растения) и такива, които са огрявани от слънцето през част от деня при интензитет на светлината в обедните часове (около 600-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, „слънчеви” растения).

Промяна в електролитното изтичане и съдържанието на МДА

Резултатите от електролитното изтичане показват, че интегритетът на мембраните на слънчевите растения е добре защитен в процеса на

десикация. При 8% ОВС, електролитното изтичане значително нараства, както при сенчестите, така и при слънчевите растения, но се възстановява след рехидратирането на растенията (Фиг. 15). Това означава, че предизвиканите от екстремното засушаване мембранны увреждания са обратими и се възстановяват след оводняването на засушените както при слаба, така и при силна светлина растения. За разлика от *H. rhodopensis*, засушаването на тъмно на *C. wilmsii* и *M. flabellifolius* води до по-силно повишаването на електролитното изтичане в сравнение със засушаването на светло и предизвиканите увреждания на мембраните не се възстановяват след рехидратирането на растенията, засушени на тъмно (Farrant et al. 2003).



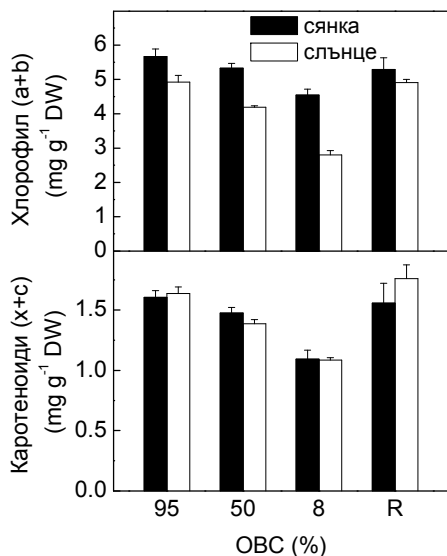
Фиг. 15. Промени в електролитното изтичане в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* растяща при слаба (около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) и силна (около $600\text{-}700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) светлина в естествени условия, и след 5 дни рехидратиране (R).

Съдържанието на малонилдиалдехид е с 50% по-високо в контролните слънчеви растения, отколкото при сенчестите. Това предполага по-голяма степен на липидно пероксидиране, което е индикатор за окислителен стрес. (Фиг. 15). Засушаването на растенията до въздушно сухо състояние при силна светлина не повлиява съществено съдържанието на МДА, т.е. не предизвиква допълнителен окислителен стрес. Въпреки незначителното намаление на МДА по време на засушаването на слънчевите растения, съдържанието му е по-високо в сравнение с това на сенчестите.

Количеството на МДА намалява с 40% в сухите листа на сенчестите растения ($p < 0.001$), но след рехидратирането им то е 27% по-високо от това на контролните растения ($p < 0.001$). В процеса на рехидратиране, когато водата навлиза в клетките, растенията са подложени на силно стресово въздействие и е необходимо ефективното действие на механизми на възстановяване, които да запазят интегритета на мембраните.

Съдържание на фотосинтетични пигменти

Съдържанието на хлорофил слабо намалява по време на засушаването на сенчестите растения *Haberlea rhodopensis* и то е с 20% по-ниско от това на контролата при екстремно засушените растения ($p < 0.01$, Фиг. 16). При слънчевите растения, хлорофилното съдържание в контролните растения е около 15% по-ниско от това на сенчестите растения ($p < 0.05$), и значително се понижава в хода на засушаването, намалявайки с около 50% в сухите листа ($p < 0.001$). След рехидратирането на растенията хлорофилното съдържание се възстановява, достигайки това на контролата.



Фиг. 16. Промени в съдържанието на хлорофил и каротеноиди по време на засушаване на *Haberlea rhodopensis*, растяща при слаба (около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) и силна (около $600\text{-}700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) светлина в естествени условия, и след 5 дни рехидратиране (R).

Съдържанието на каротеноидите се понижава по време на дехидратацията както на слънчевите, така и на сенчестите растения и се възстановява след рехидратирането им (Фиг. 16).

Намаляването на хлорофилното съдържание е една от стратегиите на растенията да избегнат вредното действие на излишната светлина, като намалят нейното поглъщане (Navaux and Tardy 1999). Освен това, загубата на тургор в сухите листа също е ефективен механизъм за намаляване на поглъщането на светлина (Lawlor and Cornic 2002). Това води до намаляване на листната повърхност, която се свива и нагъва. Нагъването на листата се наблюдава при ОВС под 50%, а свиването им корелира с времето, когато те губят по-голяма част от водното си съдържание. Листата на *H. rhodopensis* губят около 60% от първоначалната си площ, когато са засушени до въздушно сухо състояние (Georgieva et al. 2008).

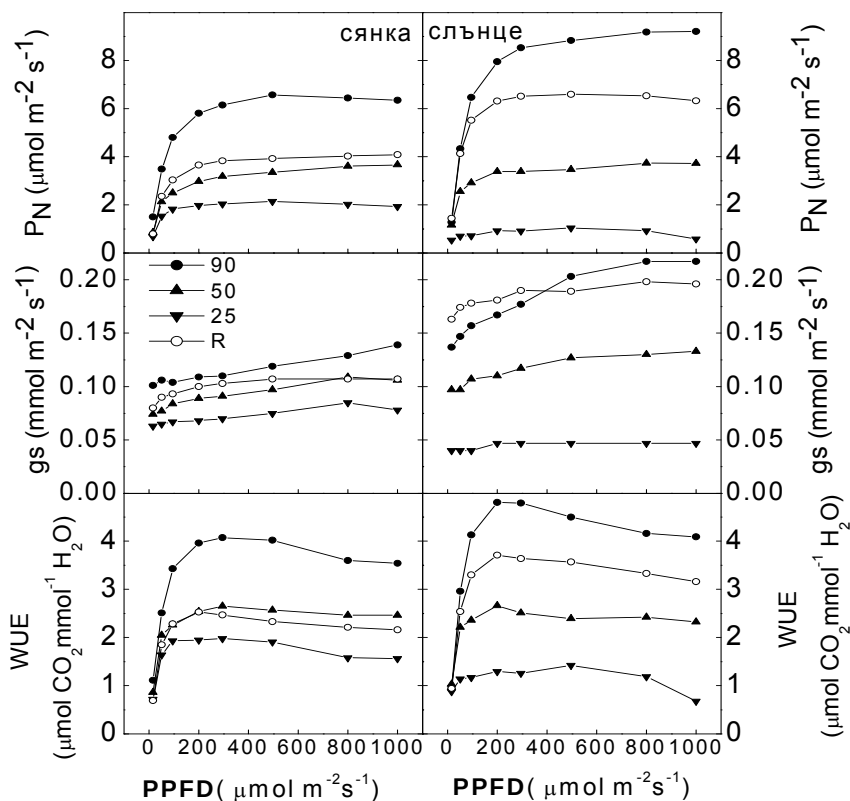
Промени в скоростта на фотосинтезата

Измерването на светлинните криви на CO_2 асимилацията показват, че тя се увеличава с повишаване на интензитета на светлината и достига максимум при $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ при сенчестите растения, а при слънчевите продължава да нараства (Фиг. 17). Растенията, които са изложени на слънчева светлина през част от деня, притежават по-висока фотосинтетична активност. Подобно на фотосинтетичната активност, устичната проводимост и ефективността на използване на водата (WUE), също са по-високи в контролните листа на слънчевите растения.

Редица изследвания показват, че в условия на силна светлина се наблюдава повишаване на количеството на фотосистемите, електронния транспорт, АТФ синтетазните комплекси и ензимите от цикъла на Калвин-Бенсън (Walters 2005). Предполага се, че тези промени са свързани с адаптацията на растенията към силна светлина-увеличаването на фотосинтезата намалява риска от увреждания.

В резултат на засушаването, P_N намалява по-бързо при слънчевите растения и при 50% ОВС стойностите са близки до тези на сенчестите. Освен това, при достигане на 25% ОВС, CO_2 асимилацията на слънчевите растения е инхибирана по-силно от тази на сенчестите. При последващото рехидратиране, растенията бързо се възстановяват и P_N е с около 70% по-високо при слънчевите растения в сравнение със сенчестите.

Устичната проводимост (g_s), измерена в умерено засушени листа (50% ОВС), намалява съответно с 20% и 40% в сенчести и слънчеви растения. От друга страна, g_s е силно инхибирана в силно засушени листа (25% ОВС), особено в слънчевите растения.



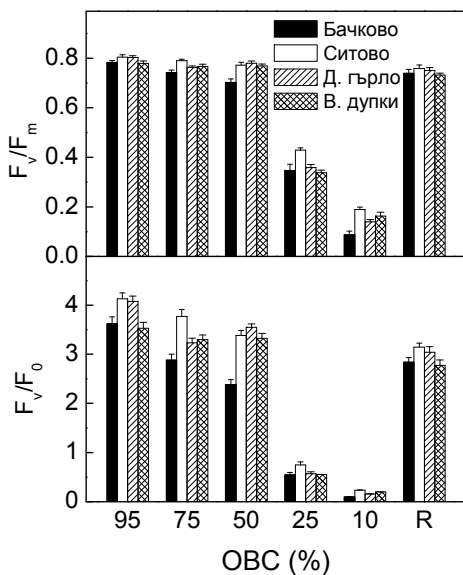
Фиг. 17. Светлинни криви на скоростта на CO_2 асимилация (P_N), устичната проводимост (gs) и ефективността на използване на водата (WUE) в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis*, растяща при слаба (около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) и силна (около $600\text{-}700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) светлина в естествени условия, и след 5 дни рехидратиране (R).

Нашите резултати показват, че засушаването при висока светлина силно редуцира P_N , което корелира със силното понижение на устичната проводимост. Затварянето на устицата регулира скоростта на CO_2 асимилация, като намалява степента на действие на стреса преди да настъпят увреждания в метаболизма (Lawlor and Cornic 2002).

Промени във фотохимичната активност

Сравнени са промените във фотохимичната активност на ФС2 по време на засушаване на растения *Haberlea rhodopensis*, растящи при различни условия на осветяване. Растенията от Бачково (N 41°59.988' E 024°50.656', надморска височина 650 m) растат при много слаба светлина под сянката на дърветата и цъфтят през май. Растенията от останалите 3 местообитания са изложени на пряка слънчева светлина през част от деня, но се различават помежду си. В Ситово (N 41°56.068' E 024°36.738', надморска височина 1400 m) и Ваклите дупки (N41°49.116' E 024°34.970', надморска височина 1600 m), *Haberlea* расте върху скалите, но температурите в Ситово са по-високи и растенията цъфтят месец по-рано (през юни). Растенията от региона на Триград растат дълбоко в основата на ждрелото и цъфтят през юни, както тези от Ситово.

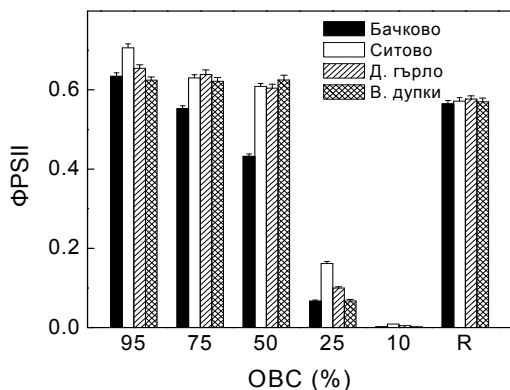
Максималната квантова ефективност в тъмнинно-адаптирано състояние (F_v/F_m) в контролните растения от Ситово и Триградското ждрело е малко по-висока от тази, измерена в сенчестите растения от Бачково (Фиг. 18). То се дължи главно на по-високите стойности на максималната хлорофилна флуоресценция, F_m .



Фиг. 18. Промени в максималната квантова ефективност на ФС2, оценена по отношението F_v/F_m и F_v/F_0 в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* в естествени условия в района на Бачково, Ситово, Дяволското гърло и Ваклите дупки, и след 7 дни рехидратиране (R).

По-високата максималната квантова ефективност на ФС2 при слънчевите растения е по-добре изразена при умерено засушените растения (50% ОВС). Отношението Fv/Fm в сенчестите растения намалява с 10%, но при слънчевите почти не се повлиява. Fv/Fm е относително постоянен показател и се повлиява при по-силна степен на засушаване. Много по-чувствителен показател е отношението Fv/Fo (Lichtenthaler et al. 2005). Данните, представени на Фиг. 18 показват, че докато Fv/Fm бавно се понижава в условия на умерено засушаване, Fv/Fo намалява с 35% при сенчестите и с 10-18% при слънчевите растения. Когато ОВС достигне 25%, Fv/Fm и Fv/Fo се понижават съответно с 50% и 85%. Максималната фотохимична активност на ФС2 е почти напълно инхибирана при ОВС от 10%, което отразява инхибирането на активността на реакционния център на ФС2. След пет дни рехидратиране, активността на ФС2 е възстановена близо до контролните стойности.

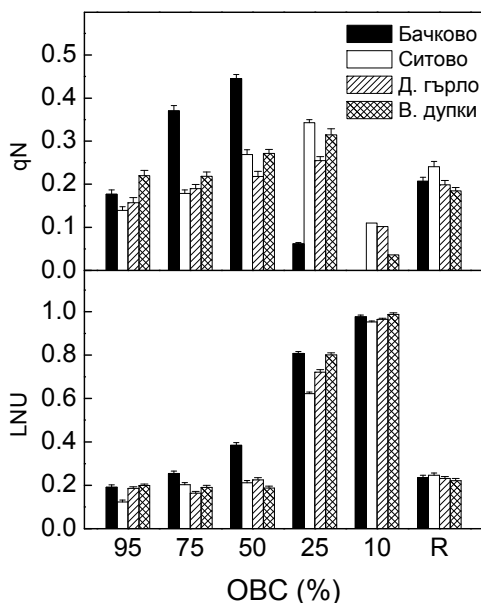
По време на засушаването на *Haberlea rhodopensis*, квантовият добив на електронния транспорт на ФС2 в светлинно-адаптирано състояние (ФПСII), се повлиява в по-голяма степен отколкото отношението Fv/Fm (Фиг. 19). Слънчевите растения показват по-голяма ефективност на електронния транспорт през ФС2 в сравнение със сенчестите. Това е по-добре изразено при 50% ОВС - ФПСII намалява с 32% и около 10%, съответно в сенчести и слънчевите растения. Резултатите показват, че няма значителни разлики във фотохимичната активност по време на засушаването на слънчевите растения от различните местообитания.



Фиг. 19. Промени в квантовият добив на електронния транспорт през ФС2 в светлинно-адаптирано състояние (ФПСII) в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* в естествени условия в района на Бачково, Ситово, Дяволското гърло и Ваклите дупки, и след 7 дни рехидратиране (R).

Делът на светлината, която не се използва за фотохимични реакции (LNU), се повишава в хода на засушаването, като достига най-високите си стойности в напълно засушените (10% ОВС) листа на *Haberlea rhodopensis*, като това се отнася за всички изследвани местообитания (Фиг. 20).

Нефотохимичното гасене на хлорофилната флуоресценция (qN) играе важна роля в защитата на растенията от фотоинхибиране, като понижава квантовия добив на ФС2 и така допринася за запазване на баланса между фотосинтетичния електронен транспорт и въглеродния метаболизъм (Lichtenthaler et al. 2005). Стойностите на qN се повишават с намаляването на ОВС до 50% и са по-високи при сенчестите растения, което е в съответствие с тяхната по-ниска фотохимична активност (Фиг. 20). При 25% ОВС, qN рязко намалява при сенчестите растения, докато при слънчевите продължава да се повишава. При достигане на 10% ОВС обаче, qN спада и при слънчевите растения. В условия на екстремно засушаване, когато qN е силно редуцирано, инхибирането на фотохимичната активност на ФС2 може би представлява защитен механизъм срещу образуването на токсични кислородни радикали, за запазване интегритета на мембраните и преживяването на клетката (Degl'Innocenti et al. 2008).



Фиг. 20. Промени в частта на светлината, неизползвана за фотохимични реакции, LNU и гасене на хлорофилната флуоресценция, qN в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* в естествени условия в района на Бачково, Ситово, Дяволското гърло и Ваклите дупки, и след 7 дни рехидратиране (R).

Възстановяването на фотохимичната активност след рехидратирането на слънчевите и сенчестите растения показва, че индуцираното от засушаването инхибиране на ФС2 е обратимо и растенията успяват да се справят с уврежданията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата дисертационна работа е изследван ефектът на високата температура и силната светлина в процеса на засушаване на пойкилохидридно хомеохлорофилно възкръсващо растение *Haberlea rhodopensis*. Въпреки че засушаването на растенията в естествените им местообитания често протича на фона на висока температура и силна светлина, изследванията досега са доста оскъдни. Данните относно ефекта на светлинната енергия върху фотосинтетично активните тъкани по време на засушаването на възкръсващите растения са ограничени върху *Craterostigma wilmsii* и *Myrothamnus flabellifolius*.

Получените резултати показват, че засушаването на *H. rhodopensis* при висока температура има по-силно увреждащо действие от това при оптимална температура и възстановяването на растенията след рехидратирането им е по-бавно.

Запазването на интегритета на мембраната по време на засушаването на възкръсващите растения е изключително важно. Силното засушаване на *H. rhodopensis*, особено при висока температура, предизвиква известно увреждане на мембраните, но то е обратимо и растенията напълно се възстановяват след рехидратирането им. Повишеното електролитното изтичане по време на засушаването може да се дължи на реорганизация на мембраните поради промени в липидните и белтъчни й компоненти. Физичните свойства на тилакоидните мембрани, в които е разположен фотосинтетичния апарат, са от особено значение при толерантните към екстремно засушаване растения. Активността на фотосинтезата се понижава значително още при умерен воден дефицит. Подобно на кислородното отделяне, при засушаване при висока температура понижението на CO_2 фиксацията е в по-голяма степен. Сравняването на промените във фотохимичната активност и параметрите на газообмена показва, че в условия на умерен воден дефицит при нисък интензитет на осветяване ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), понижаването на скоростта на фотосинтезата се дължи на затварянето на устицата, докато силното редуциране на скоростта на фотосинтезата в условия

на екстремно засушаване се дължи и на инхибирането на фотохимичните реакции. Засушаването на *H. rhodopensis* при висока температура предизвиква и по-силно понижаване на фотохимичната активност на ФС1 и особено на ФС2, в сравнение с измененията при оптимална температура (23°C). Една от причините за по-силно изразеното увреждащо действие на засушаването при висока температура може да е трикратно увеличената скорост на обезводняване на растенията при тези условия. Скоростта на обезводняване повлиява съществено способността на висшите пойкилохидридни растения да преживеят екстремно засушаване, тъй като при тях защитните механизми в процеса на десикация са от основно значение (Bartels 2005; Farrant 2007).

Haberlea rhodopensis принадлежи към групата на хомеохлорофилните възкръсващи растения, които запазват хлорофила си в процеса на засушаване. Установено е, че хлорофилното съдържание се понижава само с около 15% в резултат на засушаването при оптимална и висока температура. Освен това съдържанието на някои основни белтъци на ФС1 и ФС2 слабо се повлиява от обезводняването на листата. Запазването на фотосинтетичния апарат в процеса на десикация допринася за по-бързото възстановяване на сухите листа след рехидратирането на растенията. Но от друга страна, в условия на силен воден дефицит, асимилацията на CO₂ намалява, електронният транспорт силно се редуцира и преносът на електрони към кислорода нараства, което води до образуването на активни кислородни форми (Lawlor and Cornic 2002). След инактивирането на електронния транспорт в резултат на силното засушаване, фотосинтетичните пигменти продължават да абсорбират светлинната енергия. Високото хлорофилно съдържание може да бъде източник за образуването на синглетен кислород. В условия на воден стрес антиоксидантните ензими са от съществено значение за поддържане на хомеостазата, премахвайки излишните активни кислородни форми. Получените резултати показват, че антиоксидантните ензими каталаза, супероксиддисмутаза, гваякол-пероксидаза и аскорбатпероксидаза, запазват висока активност в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis*, както при оптимална, така и при висока температура, което допринася за преодоляване на окислителния стрес. Засушаването на *Haberlea* при висока температура предизвиква повишаване и на трите компонента на нефотохимично гасене: енергетично-зависимо гасене (qE), фотоинхибиторно гасене (qI) и

гасене, свързано с прехода от състояние 1 в състояние 2 (qT). Повишената дисипация на енергията на възбуждане, по-високото съдържание на пролин и на каротеноиди в процеса на засушаване при висока температура, ограничават степента на окислителен стрес и помагат за преодоляване на стресовото въздействие и пълното възстановяване на растенията след рехидратиране. Резултатите от измерването на светлинните криви на кислородното отделяне на растения *Haberlea rhodopensis*, засушени при оптимална и висока температура, показват активирането на алтернативни електронни потоци при умерено засушените листа (50% OBC) при висока температура, както и след рехидратирането им. Активирането на алтернативните електронни потоци и повишеното тъмнинно дишане осигуряват енергия, необходима за процесите на възстановяване.

Нискомолекулните термошокови белтъци играят важна роля за повишената толерантност на растенията към засушаване (Hoekstra et al. 2001). Функцията на sHSPs е да запазват структурата на белтъка, да минимизират агрегацията на белтъците, които не са нативни, или да разпознават агрегираните белтъци и тези, които не са нативни и спомагат за разграждането и отстраняването им от клетката. Чрез използването на поликлонално анти-sHSPs (Ab_{α}) антитяло е установено наличието на 9 различни изоформи на sHSPs, чиято експресия е зависима от засушаването, температурния стрес или от комбинираното им действие, а също така и от степента на засушаване на растенията. За екстремно засушените растения (8% OBC, 38°C) е характерно наличието на 4 различни изоформи на sHSPs, неприсъстващи при останалите проби. Белтъците с еднаква молекулна маса имат малка разлика в изоелектричната точка, което вероятно се дължи на пост-транслационни модификации на белтъците, като най-често срещана от тях е фосфорилирането.

Ефектът на светлината в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* е оценен чрез сравняване на промените във фотосинтетичната активност и в количеството на някои стресови маркери, измерени в растения, растящи при различен интензитет на светлината в естествени условия. Резултатите показват, че засушаването при силна светлина не предизвиква по-силно увреждане на мембраните в сравнение с това при слаба светлина, т.е. интегритетът на мембраните на слънчевите растения е добре защитен. Съдържанието на малонилдиалдехид е с 50% по-високо в контролните слънчеви растения, отколкото при сенчестите. Това предполага по-голяма степен на липидно пероксидиране, което е

индикатор за окислителен стрес. Но засушаването на растенията при силна светлина не повлиява допълнително този параметър, т.е. не предизвиква допълнително фотоинхибиране. Възкръсващите растения притежават редица механизми за ограничаване на уврежданията, причинени от фотоокислителен стрес. За да избегнат вредното действие на излишната светлина, растенията могат да намалят нейното поглъщане чрез изменение в ъгъла, под който са разположени листата, чрез разграждане на хлорофила (Navaux and Tardy 1999) и/или чрез увеличаване на топлинната дисипация на енергията (Demmig-Adams and Adams 1996). Засушаването на *H. rhodopensis* при силна светлина води до значително понижение на хлорофилното съдържание и силно нарастване на термалната дисипация на енергията на възбуждане, която не може да се използва за фотохимични реакции. Освен това, завиването на листата и намаляването на площта им в условия на силен воден дефицит също е ефективен механизъм за намаляване на поглъщането на светлина. Установено е, че растенията, които растат при по-силна светлина се характеризират с по-висока фотохимична ефективност на ФС2 и по-висока скорост на фотосинтеза, което намалява степента на фотоинхибиране.

Силното редуциране на CO_2 асимилацията при умерено засушаване, когато фотохимична активност е висока, може да доведе до пренос на възбуждащата енергия от хлорофила към кислорода и образуване на активни кислородни форми. Получените резултати показват, че увеличението на термалната дисипация на енергия, изразена като нефотохимично гасене, защитава растенията от фотоинхибиране в началните етапи на дехидратирането. Но в условия на екстремно засушаване, когато фотохимичната активност на ФС2 е почти напълно инхибирана и q_N е силно редуцирано, други механизми са от значение за предпазване от фотоувреждане (Augusti et al. 2001). Намалението на активността на ФС2 с намаляване на относителното водно съдържание на листата на *Haberlea rhodopensis*, може би представлява защитен механизъм срещу образуването на токсични кислородни радикали, за запазване интегритета на мембраните и преживяването на клетката. Възстановяването на фотохимичната активност на ФС2 и скоростта на CO_2 асимилация след рехидратирането на слънчевите и сенчестите растения показва, че индуцираното от засушаването инхибиране на фотосинтетичната активност е обратимо и растенията успяват да се справят с уврежданията.

ИЗВОДИ

1. Третирането на растения *Haberlea rhodopensis* с висока температура (38°C) при нисък интензитет на осветяване ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) предизвиква увреждане на мембраните, понижаване на фотохимичната активност и скоростта на фотосинтеза. ФС2 е по-чувствителна към висока температура в сравнение с ФС1.
2. Засушаването на *H. rhodopensis* при висока температура предизвиква по-значително увреждане на мембраните и води до понижаване на фотохимичната активност на ФС1 и особено на ФС2, както и на скоростта на фотосинтеза в сравнение с измененията при оптимална температура (23°C).
3. Изследването на промените на някои от основните белтъци, участващи в светлинните реакции на фотосинтезата, показва че количеството на белтъците D2, PsaA/B слабо намалява при екстремно засушените листа на *Haberlea* (4% ОВС), като намаление се наблюдава както при оптимална, така и при висока температура.
4. Резултатите от измерването на светлинните криви на кислородното отделяне на растения *Haberlea rhodopensis*, засушени при оптимална и висока температура, показват активирането на алтернативни електронни потоци при умерено засушените листа (50% ОВС) при висока температура, както и след рехидратирането им. Активирането на алтернативните електронни потоци и повишеното тъмнинно дишане осигуряват енергия, необходима за процесите на възстановяване.
5. Физиологичната активност на растения, засушени до въздушно сухо състояние при висока температура (38°C и интензитет на светлината $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) се възстановява напълно след рехидратирането им, въпреки че възстановяването им е по-бавно. Това показва, че предизвиканите от стресовото въздействие увреждания са обратими.
6. Засушаването на *Haberlea* при висока температура предизвиква повишаване и на трите компонента на

нефотохимично гасене. Повишената дисипация на възбуждащата енергия, по-високото съдържание на пролин и каротеноиди в процеса на засушаване при висока температура и слаба светлина ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), са едни от механизмите, чрез които се ограничава степента на окислителен стрес и се допринася за преодоляване на стресовото въздействие и пълното възстановяване на растенията след рехидратиране.

7. Антиоксидантните ензими каталаза, супероксиддисмутаза, гваякол-пероксидаза и аскорбатпероксидаза, запазват висока активност в процеса на засушаване на *Haberlea rhodopensis* при оптимална и при висока температура (при $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), което допринася за преодоляване на окислителния стрес.
8. Установена е появата на нови белтъци с молекулна маса между 10 – 30 kDa при екстремно засушените (20% и 8% ОВС) растения при оптимална и висока температура. Чрез използването на поликлонално анти-sHSPs антитяло е установено наличието на 9 различни изоформи на sHSPs, чиято експресия е зависима от засушаването, температурния стрес или от комбинираното им действие, а също така и от степента на засушаване на растенията.
9. Сравнителните изследвания с растения, които растат при осветяване с нисък интензитет ($25\text{-}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, сенчести растения) и висок интензитет (около $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, слънчеви растения) в естествени условия показва, че интегритетът на мембраните на слънчевите растения е добре защитен и независимо от по-високото съдържание на малонилдиалдехид в листата на хидратирани (контролни) слънчеви растения, в сравнение със сенчестите, засушаването на растенията при висок интензитет на светлината не предизвиква допълнително фотоинхибиране.
10. По-значителното понижаване на хлорофилното съдържание, по-високата фотохимична активност и скорост на фотосинтеза, и нарастването на дела на енергията на възбуждане, която не се използва за фотохимия, допринася за намаляване на степента на фотоинхибиране в процеса на засушаване на слънчевите растения.

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

1. За първи път е изследван ефектът на високата температура в процеса на засушаване на уникалното за българската флора пойкилохидридно растение *Haberlea rhodopensis* при интензитет на светлината, близък до този в естествените местообитания (около $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
2. Установено е, че засушаването при висока температура ($38/30^{\circ}\text{C}$, дневна/нощна) предизвиква по-силно увреждане на мембраните и скоростта на фотосинтеза, понижаване на фотохимичната активност, особено на ФС2, както и на количеството на основните белтъци на тилакоидните мембрани.
3. Показано е, че за преодоляване на стресовите въздействия и пълното възстановяване на растенията помагат повишената дисипация на енергията на възбуждане, по-високото съдържание на пролин и каротеноиди в процеса на засушаване при висока температура, както и запазването на висока активност на антиоксидантните ензими каталаза, супероксиддисмутаза, гваякол-пероксидаза и аскорбатпероксидаза. Възстановяването на засушените при висока температура растения след рехидратиране е по-бавно.
4. За първи път са анализирани специфичните за растенията нискомолекулни термошокови белтъци (sHSPs) чрез използването на поликлонално анти-sHSPs (Ab_{α}) антитяло. Установено е наличието на 9 различни изоформи на sHSPs с много близка молекулна маса (17 kDa и 18 kDa) и изоелектрични точки между 5 – 6.5. Експресията им е зависима от засушаването, температурния стрес или от комбинираното им действие, а също така и от степента на засушаване на растенията. За екстремно засушените растения ($8\% \text{ OBC}$, 38°C) е характерно наличието на 4 различни изоформи на sHSPs, неприсъстващи при останалите проби.
5. За първи път е изследван ефектът на светлината по време на засушаване на *Haberlea rhodopensis* чрез използването на растения, които растат при слаба ($25\text{--}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) и силна ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) светлина в естествени условия. Установено е,

че интегритетът на мембраните на слънчевите растения е добре защитен и засушаването на растенията при силна светлина не предизвиква допълнително фотоинхибиране. Понижаването на хлорофилното съдържание, повишената фотохимична активност и значителното нарастване на дела на енергията на възбуждане, която не се използва за фотохимия, допринасят за намаляване на степента на увреждане в процеса на засушаване на слънчевите растения.

Списък на публикациите във връзка с дисертацията:

- 1. Mihailova G, Petkova S, Georgieva K (2009) Changes in some antioxidant enzyme activities in *Haberlea rhodopensis* during desiccation at high temperature. *Biotechnology and Biotechnological equipment*, Special issue, 23 (2), 561-564**
- 2. Mihailova G, Petkova S, Stefanov D, Georgieva K (2009) Light dependence of photosynthetic oxygen evolution of *Haberlea rhodopensis* desiccated at high temperature. *GAPP*, 35 (3-4), 111-116**
- 3. Mihailova G, Petkova S, Büchel C, Georgieva K (2011) Desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* at high temperature – *Photosynth. Res*, 108, 5-13**
- 4. Mihailova G, Petkova S, Stefanov D, Georgieva K (2012) Effect of desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* at high temperature on the photochemical activity of PSI and PSII. *Proceedings of the 15th International Congress on Photosynthesis*, Beijing, China, 2010 (in press)**

Забелязани цитати на публикациите във връзка с дисертацията:

Mihailova G, Petkova S, Georgieva K (2009) Changes in some antioxidant enzyme activities in *Haberlea rhodopensis* during desiccation at high temperature. *Biotechnology and Biotechnological equipment*, Special issue, 23 (2), 561-564

- 1. Popov B, Georgieva Sv, Gadjeva V, Petrov V (2011) Radioprotective, anticlastogenic and antioxidant effects of total extract of *Haberlea Rhodopensis* on rabbit blood samples exposed to gamma radiation *in vitro*. *Revue de Médecin Vétérinaire*, 162 (1), 34-39**

2. Djilianov D, Ivanov S, Moyankova D, Miteva L, Kirova E, Alexieva V, Joudi M, Peshev D, Van den Ende W (2011) Sugar ratios, glutathione redox status and phenols in the resurrection species *Haberlea rhodopensis* and the closely related non-resurrection species *Chirita eberhardtii*. *Plant Biology*, 13 (5), 767-776

Mihailova G, Petkova S, Büchel C, Georgieva K (2011) Desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* at high temperature – *Photosynth. Res.*, 108, 5-13

3. Daskalova E, Dontcheva S, Yahoubian, Minkov I, Toneva V (2011) A strategy for conservation and investigation of the protected resurrection plant *Haberlea rhodopensis* Friv. *BioRisk*, 6, 41-60

Участия в научни форуми:

1. **Mihailova G, Petkova S, Georgieva K (2008)** Desiccation of resurrection plant *Haberlea rhodopensis* at high temperature. *Международна конференция 'Responses of Plants to Environmental Stresses'*, 12 - 18 май 2008 г., Елена, България (постерно съобщение)
2. **Mihailova G, Petkova S, Georgieva K (2009)** Changes in some antioxidant enzyme activities in *Haberlea rhodopensis* during desiccation at high temperature. *XI Юбилейна научна конференция с международно участие „Биологията – Традиции и Предизвикателства”*, 27 – 29 май 2009 г., София, България (постерно съобщение)
3. **Mihailova G, Petkova S, Stefanov D, Georgieva K (2009)** Light dependence of photosynthetic oxygen evolution of *Haberlea rhodopensis* desiccated at high temperature. *XI Юбилейна национална конференция по физиология на растенията с международно участие*, София, България, 19-20 Ноември, 2009г. (постерно съобщение)
4. **Mihailova G, Petkova S, Stefanov D, Georgieva K (2012)** Effect of desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* at high temperature on the photochemical activity of PSI and PSII. *15th*

International Congress of Photosynthesis, Beijing, China, 22-27 August, 2010 (постерно съобщение)

5. Georgieva K, Doncheva S, **Mihailova G**, Petkova S (2012) Effect of light on the photosynthetic activity during desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* *15th International Congress of Photosynthesis*, Beijing, China, 22-27 August, 2010 (постерно съобщение)
6. Velitchkova M, Lazarova D, **Mihailova G**, Stanoeva D, Dolchinkova V, Georgieva K (2012) Characterization of energy transfer processes and flash oxygen yields of thylakoid membranes isolated from resurrection plant *Haberlea rhodopensis* subjected to different extent of desiccation. *15th International Congress of Photosynthesis*, Beijing, China, 22-27 August, 2010 (постерно съобщение)
7. **Mihailova G**, Tchorbadjieva M, Georgieva K (2012) Expression of sHSPs during desiccation of *Haberlea rhodopensis* under optimal and high temperature. *6th International Workshop on Desiccation Sensitivity and Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues*, Cradle of Humankind, South Africa, 8-13th January, 2012 (постерно съобщение)
8. Georgieva K, **Mihailova G**, Petkova S, Velitchkova M, Daskalova E, Sarvari E, Solti A, Rapparini F (2012) Desiccation of sun- and shade-adapted plants of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *6th International Workshop on Desiccation Sensitivity and Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues*, Cradle of Humankind, South Africa, 8-13th January, 2012 (устно съобщение)