

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА

БИЛЯНА СТОИЛОВА ГРИГОРОВА

**БИОХИМИЧНИ, ФИЗИОЛОГИЧНИ И МОРФОЛОГИЧНИ
ПРОМЕНИ ПРИ ПШЕНИЧНИ РАСТЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕ НА
ЗАСУШАВАНЕ, ВИСОКА ТЕМПЕРАТУРА И ТЯХНАТА
КОМБИНАЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност:
01.06.10 – Биохимия

София, 2012

Дисертацията е написана на 115 страници и включва 33 фигури и 4 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 191 източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Разширен Научен Съвет на секция “Молекулярна биология на растителния стрес” при Институт по физиология на растенията и генетика-БАН, проведено на 26.09.2012г.

Изследванията по дисертационния труд са проведени основно в секция “Молекулярна биология на растителния стрес” на Института по физиология на растенията и генетика-БАН. Част от тях са извършени в секция “Фотосинтеза” и секция “Минерално хранене и воден режим на растенията” към същия институт, както и в Института по растителни науки в Берн, Швейцария.

Работата по дисертационния труд е проведена благодарение на финансовата подкрепа на фонд “Научни изследвания”, Министерство на образованието и науката (проект СС1503) и проект DILPA между БАН (ИФР) и Университета в Берн, Швейцария (Институт по Растителни Науки), финансиран от SCOPES.

Защитата на дисертационния труд ще се състои нана открито заседание на Жури, избрано от Научния съвет на Института по физиология на растенията и генетика-БАН с протокол №43/26.09.2012г. и утвърдено със Заповед №.....на Директора на Института по физиология на растенията и генетика-БАН.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика-БАН, ул.”Акад. Георги Бончев”, бл.21, ет.2, стая 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

БИЛЯНА СТОИЛОВА ГРИГОРОВА

**БИОХИМИЧНИ, ФИЗИОЛОГИЧНИ И МОРФОЛОГИЧНИ
ПРОМЕНИ ПРИ ПШЕНИЧНИ РАСТЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕ НА
ЗАСУШАВАНЕ, ВИСОКА ТЕМПЕРАТУРА И ТЯХНАТА
КОМБИНАЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научен ръководител:
Проф. дн Климентина Демиревска

Рецензенти:
Доц. д-р Лиляна Гилова
Проф. дн Нина Бакърджиева

Научна специалност:
01.06.10 – Биохимия

София, 2012

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АБК - абсцисинова киселина

АКФ - активни кислородни форми

АТФ - аденозинтрифосфат

ЕПР - ендоплазматичен ретикулум

НАДФ – никотин амид динуклеотид фосфат

ФСII - фотосистема II

EL - относително електролитно изтичане на йони

D - самостоятелно приложено засушаване

DH - комбинирано прилагане на засушаване с високо температурен стрес

HSC - топлинно шокви протеини, действащи в нормални условия

HSE - топлинно шокви елемент

HSF - топлинно шокви транскрипционен фактор

HSPs - топлинно шокви протеини

HT - самостоятелно приложен топлинен стрес

RBP - Рубиско свързващ протеин

RWC - относително водно съдържание

SDS-PAGE - натриев додецил сулфат-полиакриламидна гел електрофореза

УВОД

Засушаването и високите температури са два от абиотичните стресови фактори, причиняващи най-големи щети на селскостопанските култури. В сухите и полусухите райони на Земята те често настъпват едновременно и силно негативно повлияват растежа, развитието и добива на растенията. Пшеницата (*Triticum aestivum* L.) е една от трите зърнено-житни култури, отнасящи се към клас едноседелни, с най-голямо икономическо значение за изхранването на човечеството, наред с царевичката и ориза. Недостатъчната информация за въздействието на комбинацията от гореспоменатите стресови фактори върху растенията, в частност и върху *Triticum aestivum* L., ни подтикна към задълбоченото и изследване на биохимично, молекулярно, физиологично и морфологично ниво. Засушаването, високата температура, както и тяхната комбинация бяха приложени върху два пшенични сорта с различна устойчивост към засушаване, с цел да проследим сравнително видово специфичния отговор на растението и междусортните разлики. Основният приоритет на биохимичното и молекулярното изследване бе проследяването на експресионния профил на най-съществените участници в специфичния антистресов отговор - топлинно шоквите протеини, докато морфологичният анализ имаше за цел установяване на стресовите изменения на субклетъчно ниво, в частност измененията в ултраструктурата на митохондриите, хлоропластите и пластоглобулите. Приоритет на физиологичния анализ бяха основно клетъчния интегритет, водния баланс и фотосинтетичните параметри.

Индивидуалното и комбинираното изучаване на водния дефицит и топлинния стрес би ни дало основание да посочим някои от настъпващите промени при *Triticum aestivum* L., като маркери за толерантност, които приложени към постиженията на

съвременната биотехнология, биха могли да доведат до създаването на подобрени пшенични сортове, устойчиви в условията на глобалното земно затопляне.

ОПИТНА ПОСТАНОВКА И ОТГЛЕЖДАНЕ НА РАСТЕНИЯТА

Обект на изследвания на настоящата работа бяха пшенични растения (*Triticum aestivum* L.) от два широко използвани български сорта – Катя и Садово. Предварителни проучвания относно устойчивостта на сортовете, както и множеството експерименти, проведени по темата на дисертацията, ни дават основание да ги определим като устойчив на засушаване сорт Катя, и чувствителен на засушаване сорт Садово. Растенията се отглеждаха като почвени култури в камера, при постоянен температурен режим от 22°C през нощта и 25°C през деня, при 14 часов фотопериод с интензивност на осветяването $150-200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и контролирана, нормална въздушна влажност (50%). Растенията отглеждахме в съдове с канелено-горска почва от опитното поле на ИФРГ в село Горни Лозен (Софийско), като почвата беше предварително оптимално наторявана с N, P и K. Пшеничните растения бяха ежедневно поливани до 7 ден след засаждането на семената. Осемдневните растения бяха разделяни на четири групи, като всяка от тях подлагаме на различни експериментални условия. Първата група се състоеше от контролни растения (означавани за краткост със С), които се поливаха ежедневно до достигането на 70% относителна почвена влажност. Втората група включваше пшенични растения, които не бяха напоявани в рамките на 5-, 6-, 7- или 8 последователни дни (т.е. 12-, 13-, 14- или 15 дневни растения). Всички засушени варианти бяха означавани за краткост с D (самостоятелно приложен воден дефицит). Означението D1-D8 в текста, отговаря на прогресивно обезводняване в рамките на 1-8 дни. Третата група включваше контролни (ежедневно поливани) растения, подложени еднократно на температура от 40°C в продължение на 5 часа, което се осъществяваше в температурна камера. Претърпялите само високотемпературен стрес растения означаваме с НТ. Означението НТ5-НТ8 следва да се приема като индивидуално приложен температурен стрес върху 12-15-дневни, всекидневно поливани растения, чието третиране и събиране на пробите съвпада по време с 5-8-дневното засушаване на D-стресираните растения. Температурата от 40°C беше приета като високотемпературен стрес, съгласно нашите физиологични и биохимични проучвания, както и от направените литературни справки по темата (Burdon, 1986; Porter и Gawith, 1999; Skylas et al., 2002; Demirevska-Kepova et al., 2005; Hassan, 2006). Последната група обхващаше 5-, 6-, 7- или 8-дневно засушавани растения, подложени допълнително на гореописания температурен стрес, които за краткост означаваме с DH5-DH8 (комбиниран стрес от засушаване в рамките на 5 до 8 дни, с допълнително приложена висока температура на 5-, 6-, 7- или 8 ден от засушаването). След приключване на съответното стресово въздействие, една част от растенията от всяка от трите стресови групи (D, НТ и DH) бяха подлагани на възстановяване чрез 3-дневно поливане до достигане на 70% относителна почвена влажност, като тези варианти бяха означавани съответно R5-R8, и отговоряха на продължителност на засушаване от 5 до 8 дни или 15-18-дневни растения. Пробите за всички изследвани растителни стресове, бяха събирани винаги по едно и също време (след приключване на топлинно шоките условия). За всичките си изследвания използвахме само първия лист на младите пшенични растения, който веднага след отрязването се замразяваше в течен азот, където се съхраняваше до извършване на съответните анализи. За биометричните измервания използвахме само свежи надземни части. Фотосинтетичните анализи се извършваха върху интактни растения.

ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Определяне на относителното водно съдържание съгласно Barrs и Weatherley (1962);
2. Определяне на относителното електролитното изтичане на йони с помощта на кондуктометър (EC215, Hanna Instruments, USA) съгласно Nunes и Smith (2003);
3. Определяне на количеството на разтворимите растителни протеини по метода на Bradford (1976);
4. Разделяне на разтворими листни протеини чрез 12.5% SDS-PAGE, използвайки вертикална система за електорфореза *Mini Protean II Dual Slab Cell* (BioRad, USA), съгласно метода на Laemmli (1970).
5. Имуноблот анализи, използвайки Trans Blot система (BioRad, USA) по метода описан от Mitsunashi и Feller (1992);
6. Екстракция на тотална РНК (RNeasy Mini кит (QIAGEN®)) от листа на зимна пшеница и провеждане на едностъпален RT-PCR анализ (QIAGEN® OneStep RT-PCR кит) с помощта на PCR Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Германия);
7. Включване на проби в Durcupan и осъществяване на трансмисионна електронна микроскопия (Jeol JEM 1010) с последващ морфометричен анализ (ImageJ софтуер, версия 1.36b (National Institute of Health, USA) и Cell B (Olympus, Germany)).
8. Екстракция на хлорофил и каротиноиди по метода на Lichtenthaler(1987) и спектрофотометрично определяне на пигментното съдържание със Спекол (Carl Zeiss, Jena, Germany);
9. Проследяването на флуоресценцията на хлорофил *a* с портативен хлорофилен флуориметър FMS-1 (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, U.K.);
10. Регистриране на параметрите на фотосинтезата и устичния апарат чрез използването на портативен апарат за фотосинтетични измервания LCpro+ (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK);

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистическата обработка на резултатите от отделните измервания се извършваше със SigmaPlot за Windows, версия 9.00 и Excel 2003. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка. Данните от морфометричните анализи на електронните микрографии са статистически обработвани с мултифакторна ANOVA на Statgraphics Plus версия 4.1. и са представени със съответните стандартни отклонения. При всички анализи за статистически значими разлики бяха приемани само стойности на *P* по-малки от 0.05 ($P < 0.05$).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа бе изследването на комбиниран стрес от засушаване и висока температура, приложени върху млади пшенични растения от два различни по своята устойчивост към воден дефицит сорта - Катя (устойчив) и Садово (чувствителен). Сравнителното разглеждане на двата индивидуално приложени стресови фактора и тяхната комбинация целеше да обогати недостатъчната информация относно отговора на тази икономически важна за изхранването на човечеството селскостопанска култура към комплексното прилагане на водния дефицит и топлинния стрес, както и да покаже какви са възможностите за екстраполиране на реакциите към единичните стресови фактори при прогнозиране на комбинирания

отговор. Предвиждахме установяването на специфични маркери за устойчивост към стреса на *Triticum aestivum* L., използвайки в работата си два различни сорта, които биха могли да бъдат от полза при създаването на нови толерантни пшенични линии. За осъществяването на набелязаните цели избрахме широкообхватен подход, който включваше изследвания на молекулярно, биохимично, физиологично и ултраструктурно ниво и си поставихме следните задачи:

1. Изследване ефекта на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху биометричните показатели, водния статус и мембранната цялост на млади пшенични растения;
2. Изследване влиянието на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху мезофилната клетъчна ултраструктура на *Triticum aestivum* L.;
3. Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху фотосинтетичните параметри на млади пшенични растения;
4. Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху експресията на избрани семейства топлинно шокови протеини (HSPs) при млади пшенични растения:
 - а/ по отношение на генната експресия;
 - б/ настъпващи измененията в протеиновия профил.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

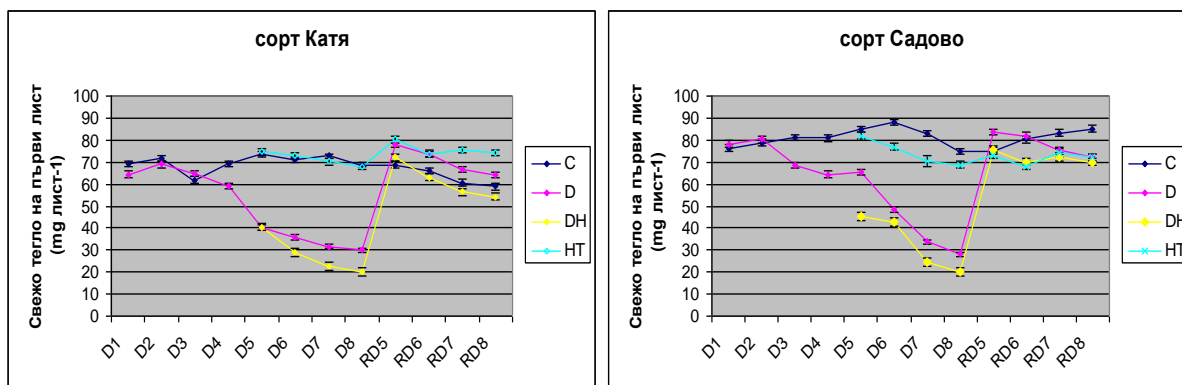
Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху биометричните показатели, водния статус и мембрания интегритет на млади пшенични растения

Биометрични показатели

Както може да се проследи от Фиг. 1 и Фиг. 2, засушаването, и особено комбинацията от засушаването и високите температури, се отразява негативно на вегетативния растеж и при двата сорта *Triticum aestivum* L. и водят до рязък спад по отношение на свежото тегло на първите листа на същите растения.



Фиг.1. Фенотипна характеристика на млади (14-дневни) пшенични растения (отляво надясно), отглеждани при контролни условия (А) (ежедневно поливани), подложени на 7-дневно засушаване (В), 7 дни засушени растения, допълнително подложени на 40°C за 5 часа (С) и само температурно стресирани при 40°C за 5 часа (D).



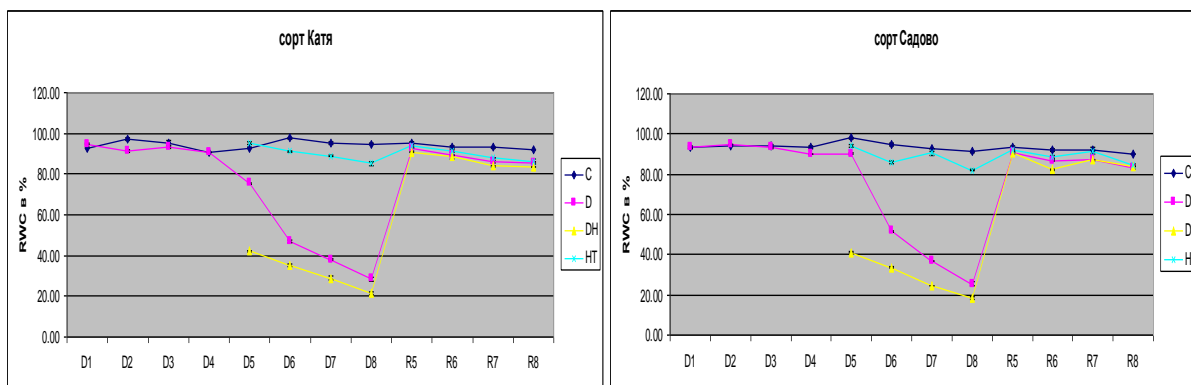
Фиг. 2. Изменение в свежото тегло на първи лист (mg лист^{-1}) при млади пшенични растения от два сорта – устойчив (Катя) и чувствителен (Садово), подложени на засушаване от 1-8 дни (D), самостоятелно приложени високи температури (HT) и тяхната комбинация (DH), както и при тридневен възстановителен режим след воден дефицит от 5-8 дни (RD5-RD8). Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

При сравнителното разглеждане на трите стреса е установено, че DH индуцира най-силна промяна в листната биомаса и при двата сорта, следван от самостоятелно приложеното засушаване, докато третирането на младите пшенични растения само с високи температури не води до сериозни фенотипни изменения, в сравнение с контролите, и твърде много се отличава от другите два стреса, включващи обезводняването. По отношение на направените биометрични измервания, устойчивият сорт Катя, както в оптимални, така и в стресови условия, поддържа макар и малко, но по-ниски стойности на изследваните листни показатели. По отношение на възстановителния режим, във фенотипно отношение, не се забелязва съществена разлика между двата сорта.

Негативното повлияване върху нормалния растеж и развитие на пшеничните растения, както и спадът в свежото тегло на първите листа при D и DH, навярно се свързват със забавеното уголемяване на клетките, произтичащо от намаленото тургорно налягане под въздействие на засушаването. Фенотипните промени корелират и с намаленото RWC на листата при засушаването (виж Фиг.3).

Воден статус на растенията

При двата изследвани пшенични сорта, подложени на продължително засушаване на 8-ия ден от засаждането на семената, се наблюдава значителен спад в RWC на листата (Фиг. 3), ясно изразен при D и DH, и достигащ най-ниски стойности при комбинирания стрес на 8 ден от безводния режим (18.5% при Садово и 21.3% при Катя). Поведението на *Triticum aestivum* L. по отношение на RWC при самостоятелно приложен топлинен стрес, е сходно с всекидневно поливаните растения, и твърде различно от другите два стреса, свързани със засушаване. Тридневният възстановителен режим чрез напояване, следващ всеки един от приложените стресове, доведе нивата на RWC близо до контролните и при двата генотипа. При оптимални или екстремни условия съществени междусортови разлики в RWC не се забелязват.

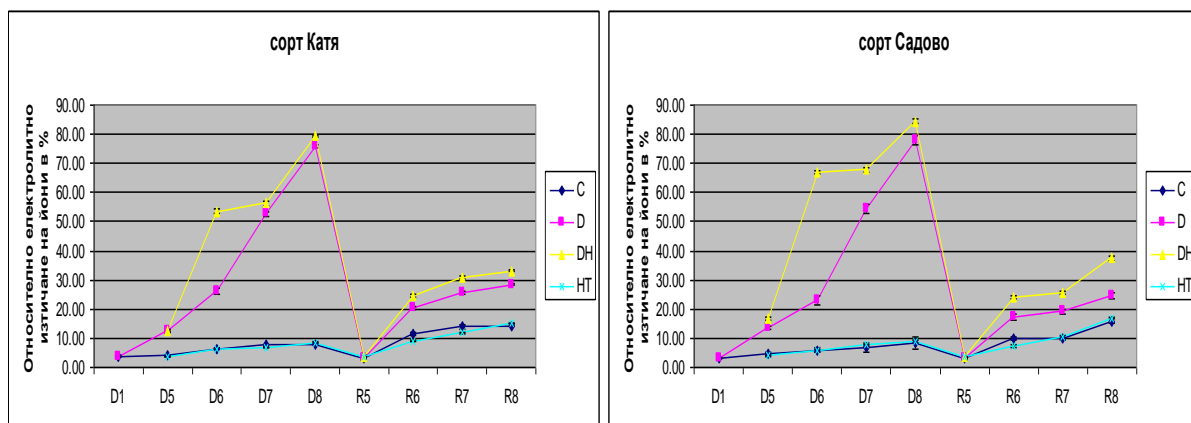


Фиг. 3. Относително водно съдържание (RWC), изразено в проценти и измерено върху първи напълно развит лист на различно третиранни (D-засушаване, DH-засушаване и висока температура, HT-топлинен шок, C-контрола) пшенични растения (сорт Катя и сорт Садово) при прогресивно засушаване от един (D1) до 8 дни (D8) и последващо тридневно възстановяване (R5-R8). Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

Получените резултати демонстрират значителните промени във водния статус на пшеничните растения, които настъпват в условията на воден дефицит, и в съчетание с резултата от фенотипните прояви на обезводняването (Фиг. 1) можем да заключим, че водната наличност е от голямо значение за листния тургур при *Triticum aestivum* L..

Относително електролитно изтичане на йони

Относителното електролитно изтичане на йони (EL), което е показател за целостта на клетъчните мембрани, рязко се повишава едва на 6 ден от началото на засушаването (виж Фиг.4).



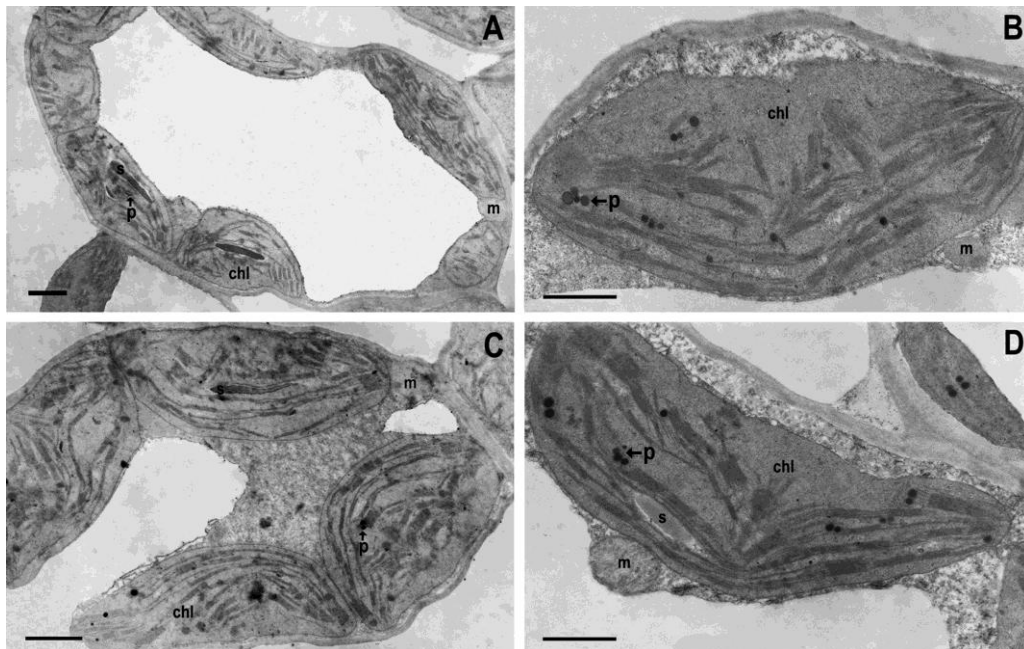
Фиг. 4. Относително електролитно изтичане на йони (EL), изразено в проценти, при различно третиранни (D-засушени, DH-засушаване и топлина, HT-висока температура, C-контролни) пшенични растения (сорт Катя и Садово), подложени на засушаване от 1 до 8 дни (D1-D8), както и след последващо тридневно възстановяване на 5-, 6-, 7- или 8-дневно засушени растения (R5, R6, R7 или R8). Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

Този процес е силно изразен при D (деветократно повишение на стойностите на EL спрямо съответните контроли) и DH (десетократно повишение на стойностите на EL спрямо съответните контроли) третираните растения, достигайки максималните си стойности при комбинирания стрес на 8 ден от началото на засушаването (79.3% при сорт Катя и 84.3% при сорт Садово). Самостоятелно приложеният HT стрес оказва

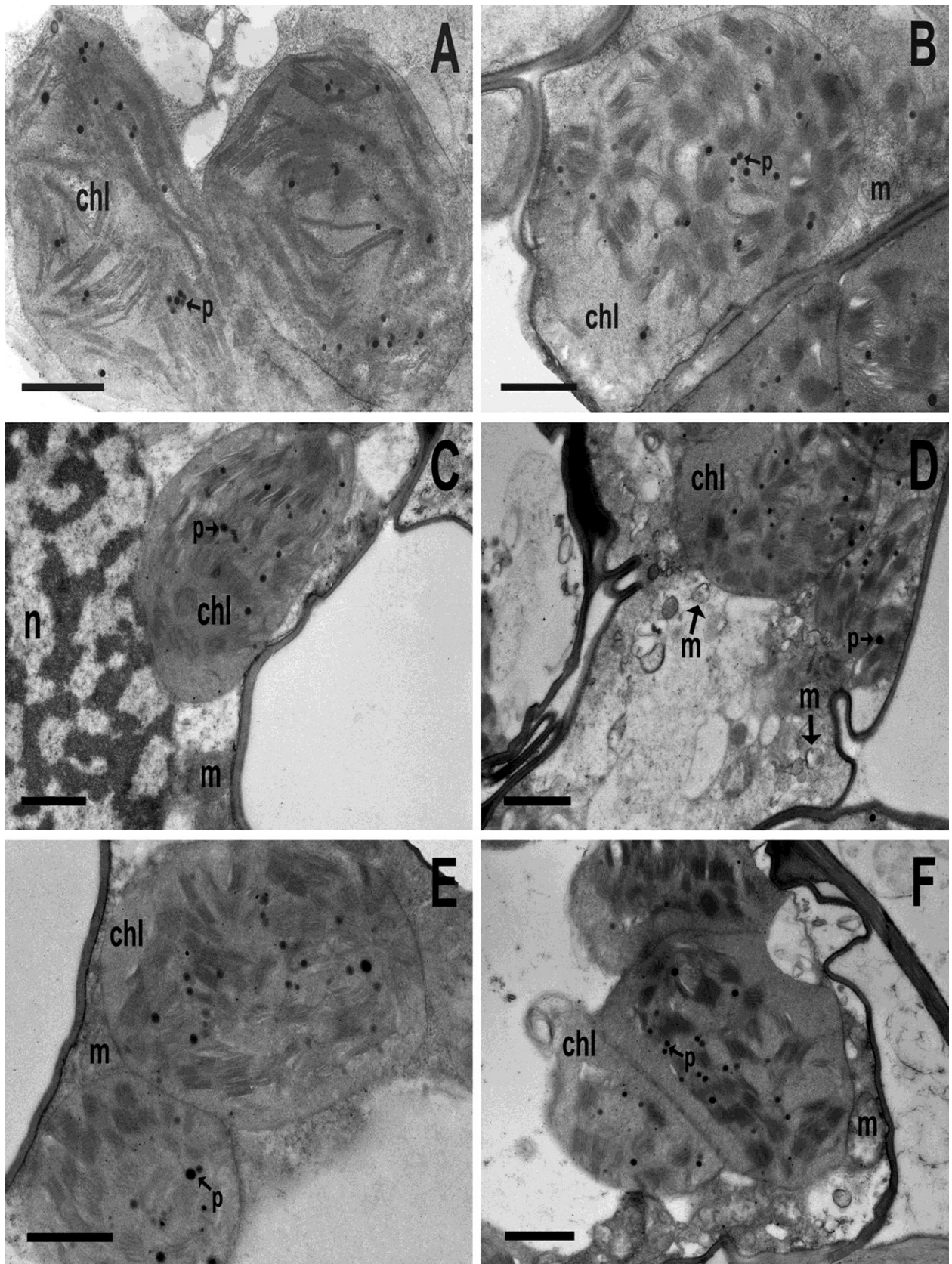
минимални промени по отношение на EL, а между двата пшенични сорта не установяваме съществени разлики по отношение на запазването на мембранната цялост в условията на дехидратиращи стресове. Интересно е да се отбележи, че за разлика от влиянието на D и DH върху RWC, което се възстановява почти напълно след тридневния напоителен период, по отношение на EL такава не се постига в случаите на 6-, 7- и 8-дневното засушаване. Това подсказва, че уврежданията на мембраните, причинени от 6-, 7- и 8-дневно засушаване или комбинацията му с топлина, не са напълно обратими, за разлика от 5-дневната дехидратация и самостоятелно приложения топлинен шок. Бихме могли да свържем горепосочените експериментални резултати с невъзможността за пълно възстановяване на повишената пропускливост на липидно-протеиновия мембранен бислой при D и DH третирани растения. Това ни дава основание да считаме EL като по-точен и чувствителен индикатор за въздействието на стреса от RWC.

Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху мезофилната клетъчна ултраструктура

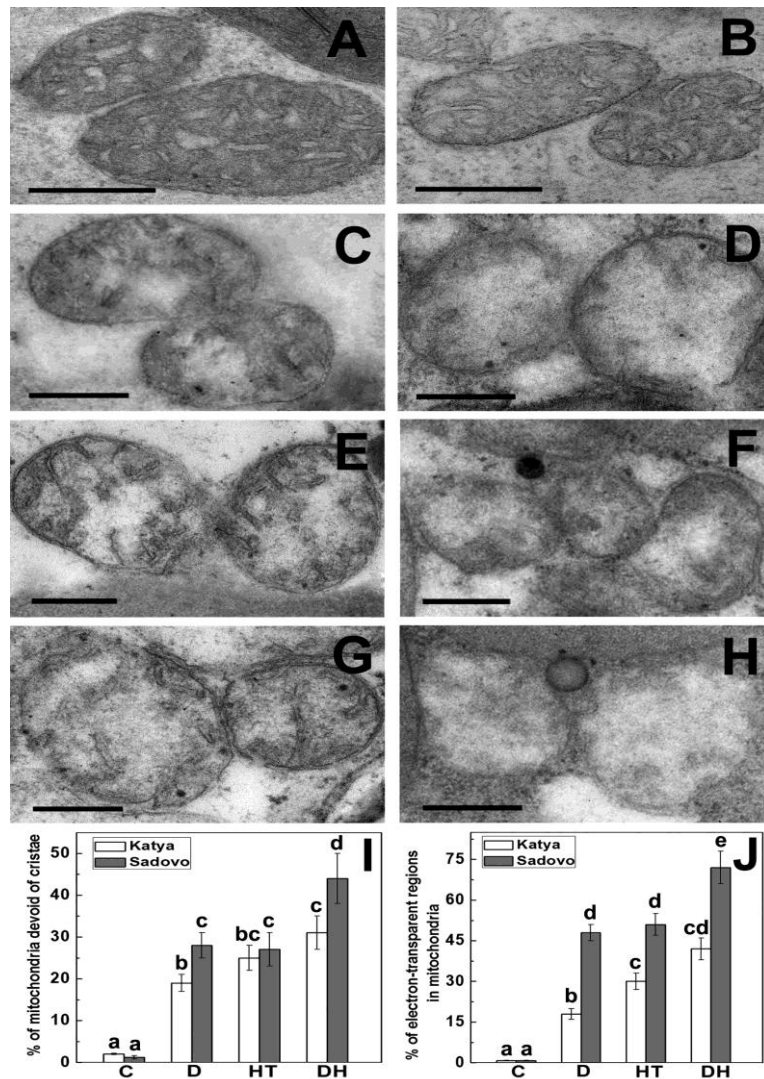
Проведеното морфологично изследване и последващите морфометрични анализи имаха за цел да установят промените, които настъпват в мезофилната клетъчна ултраструктура на пшенични листа под влияние на индивидуално приложено засушаване, висока температура и тяхната комбинация. При извършването на качествените и количествените анализи са използвани трансмисионни електронни микрографии на сегменти от първите напълно развити листа на растенията, като най-добрите от тях са избрани за представителни на съответните стресови варианти (виж Фиг. 5-7).



Фиг. 5. Трансмисионни електронни микрографии на мезофилни клетки от листа на сортовете пшеница Катя (А,В) и Садово (С,Д), отглеждани при всекидневно поливане (контролни растения). Обозначения: chl-хлоропласт, m-митохондрия, s-скорбелно зърно, p-пластоглобула. Бар чертичката отговаря на 1 μ m.



Фиг. 6. Трансмисионни електронни микрографии на мезофилни клетки от листа на сортовете пшеница Катя (A,C,E) и Садово (B,D,F), отглеждани в условия на засушаване (A,B), високи температури (C,D) или комбиниран стрес (E,F). Обозначения: chl-хлоропласт, m-митохондрия, p-пластоглобула. Бар чертичката отговаря на 1 μm .



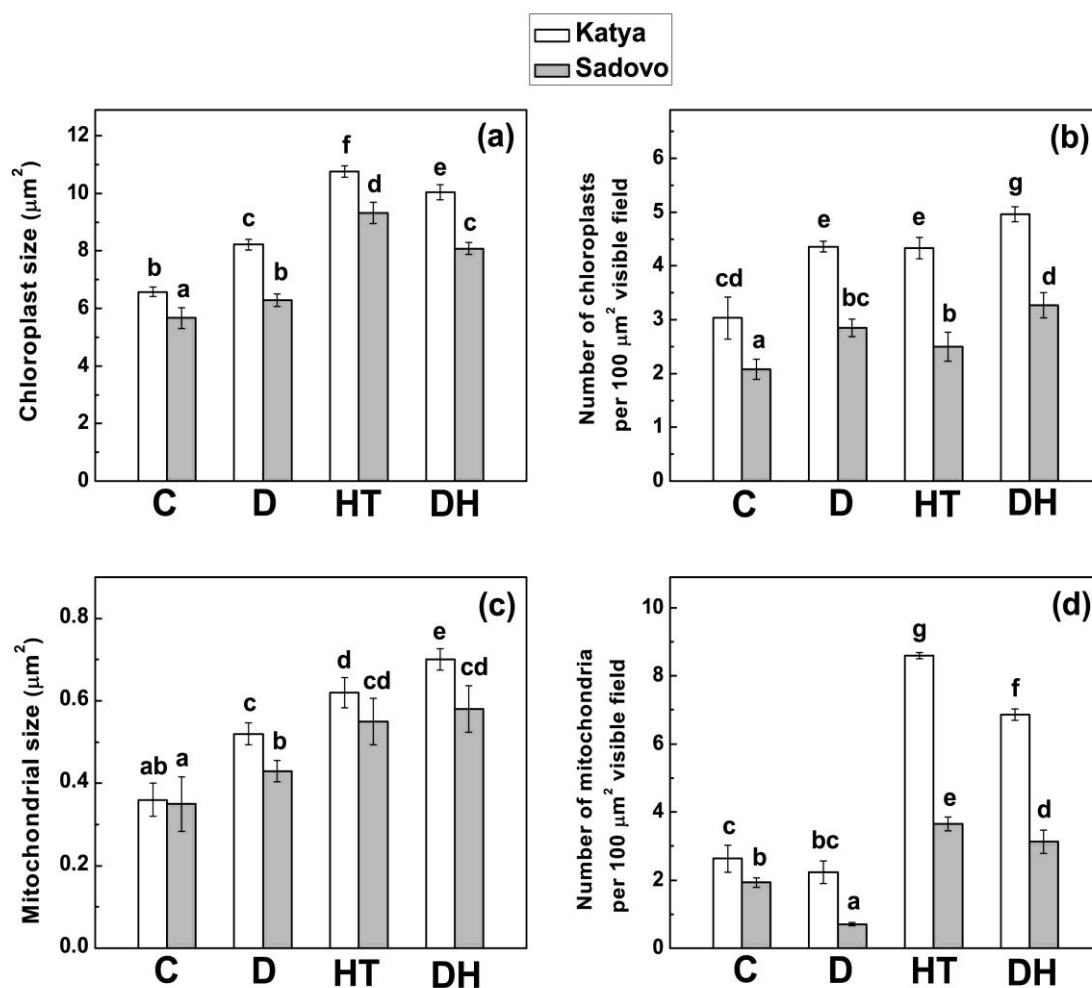
Фиг. 7. Трансмисионни електронни микрографии на мезофилни клетки от листа на сортовете пшеница Катя (A,C,E,G) и Садово (B,D,F,H), отглеждани в условия на всекидневно поливане (A,B), засушаване (C,D), високи температури (E,F) или комбиниран стрес (G,H). Бар чертичката отговаря на 0.25 μm . Графика I представя процента на митохондриите, напълно лишени от кристи, а графика J показва площта на електронно-празните пространства в митохондриите. Барчетата представляват стандартното отклонение ($\pm\text{SD}$) от средното значение. Различните букви показват значимите разлики при $P < 0.05$.

Представените микрографии показват, че контролните хлоропласти и при двата пшенични сорта са с продълговата или бъбрековидна форма, като дължината им надхвърля два пъти широчината (Фиг. 5A-D). Те имат ясно очертани външни мембрани, добре развита вътрешна мембранна система, изградена от грани и дълги стромални тилакоиди. Граните са равномерно разпределени в цялата хлоропластна площ, а граналните тилакоиди - добре оформени и плътно пакетирани. В хлоропластната строма се наблюдават единични скорбелни зърна (Фиг. 5A-D) и малък брой пластоглобули. Митохондриите в контролните растения и при двата сорта са с овална форма, електронно-плътен матрикс и ясно забележими кристи (Фиг. 7A, 7B). Морфометричният анализ на контролните митохондрии показва, че много малка част от тях са лишени от кристи, и че повечето са с интактна вътрешна структура (Фиг. 7I, 7J).

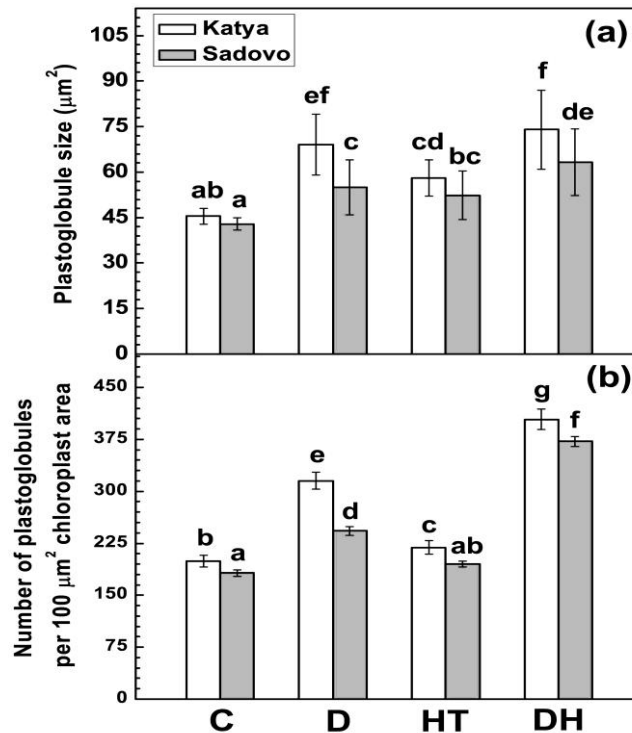
За разлика от тях, хлоропластите в листните мезофилни клетки, подложени на засушаване (Фиг. 6A, 6B), висока температура (Фиг. 6C, 6D) и тяхната комбинация (Фиг. 6E, 6F) са издути, с частично дезорганизирана мембранна система. Формата им се

променя от продълговата до кръгла или овална, в клетъчната цитоплазма се наблюдават електронно-празни участъци, и в стромата не се забелязват скорбелени зърна. Броят на тилакоидите в граните на D-третираните хлоропласти и на двата сорта пшеница е намален (виж Фиг. 6А, 6В). Под въздействие и на двата самостоятелно приложени стресови фактора се наблюдава увеличение в електронната плътност и размера на пластоглобулите в хлоропластната строма (Фиг. 6А-Д). По отношение на митохондриите (Фиг. 7С-Ф), двата единични стресови фактора предизвикват или очевидно заличаване на кристите (Фиг. 7I), или пък се забелязват малък брой кристи (Фиг. 7С-Ф) и големи електронно-празни участъци в матрикса (Фиг. 7J).

Изключително важно е да отбележим, че сравнителното изследване на стрес-индуцираните ултраструктурни промени, показва силно изразена генотипна зависимост (Фиг. 8 и Фиг. 9).



Фиг. 8. Среден размер на мезофилните хлоропласти (а) и митохондрии (с), както и брой на хлоропластите (б) и митохондриите (д) в листа от устойчивия пшеничен сорт Катя и чувствителния сорт Садово, отглеждани при всекидневно напояване (С), в условия на засушаване (D), висока температура (HT) и комбиниран стрес (DH). Барчетата на графиката показват стандартните отклонения от средните стойности, а буквите с малък шрифт - значимите разлики при $P < 0.05$.



Фиг. 9. Промени в размера (a) и броя на пластоглобулите на $100 \mu\text{m}^2$ хлоропластна площ (b) в листа от устойчивия пшеничен сорт Катя и чувствителния сорт Садово, отглеждани при всекидневно напояване (C), в условия на засушаване (D), висока температура (HT) и комбиниран стрес (DH). Барчетата на графиката показват стандартните отклонения от средните стойности, а буквите с малък шрифт - значимите разлики при $P < 0.05$.

Като цяло, клетъчните органели на устойчивият сорт Катя са по-малко негативно повлияни под въздействие на двата единично приложени стресови фактора, в сравнение с органелите на чувствителния (Фиг. 6A, 6C). Граните в хлоропластите на толерантния генотип са по-добре обособени и запазени, а стромалната ламеларна система е сравнително добре представена. За разлика от тях, при чувствителния сорт Садово граните са неравномерно разпределени и произволно (а не правилно и еднопосочно) ориентирани, без плътно стиковане на тилакоидите в тях (виж Фиг. 6B, 6D). Част от хлоропластната строма е лишена от грани, а цитоплазмата изглежда силно вакуолизирана, особено под въздействие на температурния стрес (Фиг. 6D). Логично е да направим връзка между тези деструктивни промени и установената в нашето изследване по-слаба фотосинтетична активност на чувствителния сорт Садово, под въздействие на различните стресови фактори. При третиране с D и HT, нарастването на броя на хлоропластите при сорт Катя е около 40% в сравнение с около 20% ръст при Садово (Фиг. 8b). Броят пластоглобули на $100 \mu\text{m}^2$ видимо поле при засушаване нараства с 66% при сорт Катя и само с 30% при чувствителния генотип, в сравнение с контролните тъкани (Фиг. 9b). Същата тенденция се наблюдава и по отношение на размера на пластоглобулите при обезводняване - 69 nm ($n=70$) при Катя и 55 nm ($n=55$) при Садово (Фиг. 9a).

По различен начин стресът се отразява върху дихателните органели на пшеничните растения. Засушаването редуцира броя на митохондриите на $100 \mu\text{m}^2$ видимо поле с повече от 50% при чувствителния сорт Садово (Фиг. 8d), докато самостоятелно приложените високи температури увеличават броя на същите органели 3.3 пъти при устойчивия сорт Катя и 1.9 пъти при чувствителния Садово в сравнение с времевите контроли. Сравнителният биометричен анализ на уврежданията при

митохондриите показва по-голям брой митохондрии, лишени от кристи, и по-големи електронно-празни участъци при Садово в сравнение с Катя (виж Фиг. 7I, 7J).

Комбинацията от засушаване и високи температури повлиява ултраструктурата на листните клетки (Фиг. 6E, 6F) по начин, различен от самостоятелно използваните въздействия (Фиг. 6A-6D). При устойчивия сорт Катя, комбинираният стрес води до увеличаване на размера ($10.04 \mu\text{m}^2$) и броя на хлоропластите на $100 \mu\text{m}^2$ от клетъчното видимо поле с 60% спрямо контролите, но не и спрямо топлинно третираните растения (Фиг. 8a, 8b). Тези хлоропласти са видимо издути и със заоблена форма, с неравномерно разположени грани, съставени от къси тилакоиди (Фиг. 6E). Хлоропластите на Садово се отличават с неправилна форма, а митохондриите изглеждат силно увредени (Фиг. 6F). При комбинирания стрес, хлоропластите на генотип Катя са с 24% по-големи по размер от тези на Садово (Фиг. 8a). Важно е да отбележим, че едновременното прилагане на воден дефицит и топлинен стрес води до значително увеличаване на броя и размера на тъмно оцветените пластоглобули, в сравнение с индивидуално изследваните стресове (виж Фиг. 6E, 6F и Фиг. 9a, 9b). Нарастването на броя пластоглобули е двукратно, спрямо контролите, и не може да бъде екстраполирано от данните за влиянието на двата отделни стреса (Фиг. 9b). Диаметърът на третираните с ДН пластоглобули на устойчивия сорт е по-голям (74 nm , $n=78$) от този на чувствителния (63 nm , $n=65$) (Фиг. 9a). Митохондриите също са значително повлияни при комбинирания стрес - голяма част са напълно лишени от кристи и изглеждат празни, като вакуоли (Фиг. 6E, 6F), докато друга част са с прозрачен матрикс и много малко кристи. Ултраструктурата на чувствителния сорт Садово е много по-силно увредена, отколкото при устойчивия. Прави впечатление, че мембраните на хлоропластите при Садово са с неясни очертания, често и с видими нарушения на целостта им или напълно липсващи. Клетъчната цитоплазма е силно вакуолизирана, с ясно отличими електронно-празни пространства. Трябва да се отбележи, че митохондрии с най-голям размер ($0.7 \mu\text{m}^2$) са наблюдавани именно под влияние на комбиниран стрес при устойчивия сорт Катя. Този размер е два пъти по-голям от установения при контролните растения. Освен размерът и броят на митохондриите нараства повече от 2.6 пъти при Катя и 1.6 пъти при Садово след прилагане на ДН (Фиг. 8d).

Едновременното настъпване на засушаване и висока температура е явление, което често се случва в природата (Zavalloni et al., 2008), а изследването на растителните отговори към него е все още слабо проучено, особено по отношение на мезофилната клетъчна ултраструктура и настъпващите изменения при основните клетъчни органели (Ristic и Cass, 1991; 1992; Stoyanova и Yordanov, 1999). По-големите размери, които придобиват хлоропластите в условията на стрес, може да са резултат от тяхното издуване, дължащо се на мембранни промени. Знаем, че мембранната стабилност е един от най-сигурните показатели за устойчивост към различни видове стрес, тъй като поради липопротеиновия си състав, те са твърде податливи и зависими от условията на средата (Ristic et al., 1992). Настъпващите изменения в хлоропластните мембрани със сигурност намират отражение и върху пряко свързаните с тях фотохимични и биохимични процеси, като улавянето на светлината, електронния транспорт и преноса на йони (Zhang et al., 2010). Важна предпоставка за издуването на хлоропластите може да бъде и натрупването на осмолити в стромата (Le Rudulier et al., 1984). В този смисъл, бихме могли да предположим, че установеното от нас отсъствие на скорбелени зърна в хлоропластите, подложени на индивидуален или комбиниран стрес от засушаване и висока температура, се дължи на тяхното разграждане, а продуктите на този процес навярно са осмолитично активните агенти, които водят до по-силното издуване на хлоропластите при сорт Катя, а оттам и до установяване на по-

добрата толерантност към стрес при този сорт. От друга страна според Hue et al. (2008), засушаването при пшеницата предизвиква клетъчен воден дефицит, който инхибира фотосинтезата и увеличава нуждите от синтеза на осмолити. Известно е, че независимо от намалените фотосинтетични нива при обезводняване, растенията натрупват голямо количество водно разтворими въглехидрати като глюкоза, фруктоза, захароза, манитол и пинитол, които се явяват типичен адаптивен отговор на растенията. Тяхната наличност в стресираните клетки свързваме не с инхибирането на гени, отговорни за фиксацията на CO₂, а с индуцираните по време на засушаване гени, кодиращи цитоплазмени и вакуоларни ензими, участващи в алтернативни пътища, които снабдяват третираните листа с необходимите им осмолити (Hue et al., 2008). Тези вещества служат за поддържането на клетъчния тургур, запазване на мембранната цялост и предпазване на протеините от денатурация. Освен това, устойчивият сорт Катя, който запазва по-високи фотосинтетичните си нива в условия на стрес, както установи нашето изследване и това на Vassileva et al. (2011), би могъл да натрупа и допълнителни осмолити и така да подобри толерантността си.

Установеното значително нарастване на размера и броя на тъмно оцветените пластоглобули, особено при комбинирания стрес, навярно се дължи на защитните им функции, иницирани в условията на стрес, който предизвиква окислителното разрушаване на клетъчния фотосинтетичен апарат (Kanwischer et al., 2005; Austin et al., 2006). Austin et al. (2006) е докладвал плътно групиране на пластоглобулите и тилакоидните мембрани по време на стрес, което позволява свободния обмен на липидни молекули като пластохинон, каротиноиди и токоферол между пластоглобулите (местата на тяхната синтеза и складиране) и тилакоидите (местата, където тези молекули служат като електронни преносители и способствуват за намаляване на повредите от свободните радикали). Според други изследвания, повишения брой пластоглобули при различни стресови ситуации води и до завишаване на нивата на специфични за пластоглобулите протеини с ензимни и структурни функции (Kessler et al., 1999; Vidi et al., 2006). Като резултат от тези процеси, в клетките, подложени на стрес, се синтезират и натрупват липидни молекули (каротиноиди, токоферол и пластохинон), които действат като електронни преносители и предпазват комплексите на фотосинтетичния апарат от повредите на окислителния стрес. По такъв начин, силно увеличеният брой и размер на пластоглобулите при толерантния сорт Катя, вероятно е един от адаптивните механизми за преодоляване на окислителния стрес, причинен от силното засушаване и комбинацията му с температурен стрес.

Установено е, че дишането е по-слабо чувствителен и по-адаптивен процес от фотосинтезата, и като такъв може да се приеме като определящ фактор за оцеляването на пшеничните растения в стресови условия (Vassileva et al., 2011). При неблагоприятни условия на околната среда, когато фотосинтезата се оказва силно подтисната, нарастващите нужди от АТФ за функционирането на растителните организми се осигурява именно от увеличения брой митохондрии в мезофилните клетки (Yordanov, 1992; Stoyanova и Yordanov, 1999; Silva et al., 2010). Идентифицирани са и редица специфични митохондриални протеини на стреса, индуцирани в отговор на различни стресови фактори (Rizhsky et al., 2002, 2004). Ето защо, наблюдаваните от нас изменения в броя на митохондриите при стрес са много по-силно изразени в сравнение с промените, настъпващи при хлоропластите (виж Фиг. 8b, 8d). Морфометричният анализ потвърди визуалните наблюдения и доказа, че както при контролните растения, така и при всички стресови варианти, броят на митохондриите в листата на устойчивия сорт Катя надхвърля този при Садово (Фиг. 8d). Значителното намаляване на митохондриите при чувствителния сорт Садово, подложени на силно 7-

дневно засушаване, както и различният отговор на пшеницата под въздействие на другите два стреса (Фиг. 8d), подсказват че митохондриите реагират адекватно не само на даден вид стрес, но проявяват дори и генотипна специфичност с цел преодоляване на отрицателните физиологични последици.

Промените в стрес-третираните клетъчни органели могат да бъдат провокирани от разграждането на мембранните фосфолипиди (Utrillas и Alegre, 1997) или от инхибирането на конвенционалната протеинова синтеза, засягаща различни органелни протеини и ензими (Rizhsky et al., 2002, 2004). Освен това, при стрес се увеличават мембранната пропускливост и киселинността на стромата, което предизвиква допълнително инхибиране на хлоропластните ензими (Yordanov, 1992; Dekov et al., 2000). За разлика от хлоропластите, ултраструктурните анализи на митохондриите показват, че независимо от силното им морфологично повлияване от стреса, те успяват да запазят своите високи дихателни способности в екстремни условия (Vassileva et al., 2009). Според същите автори, морфологичните промени в митохондриите могат да бъдат едни от най-ранните индикатори за това, дали клетките са повлияни от АКФ, като резултат от стреса. Стресът предизвиква директно или индиректно повишаване на пропускливостта на вътрешните митохондриални мембрани, което води до характерното издуване на митохондриите. Проведеното от Vassileva et al. (2009) сравнение на дихателните характеристики на изолирани листни митохондрии от същите пшенични сортове, които са обект и на настоящето изследване, дадоха информация за генотипната специфичност на отговора на тези органели към засушаването. По отношение на дихателния си потенциал, митохондриите на толерантния сорт Катя са по-слабо негативно повлияни от тези при Садово. Топлинно третираните растения допълнително са подложени и на окислителен стрес като резултат от увеличената продукция на кислородни радикали в митохондриите и хлоропластите. Същите органели реагират с производството на специфични анти-стрес протеини, които елиминират неблагоприятните ефекти от третиранията (Davidson и Schiestl, 2001; Silva et al., 2010). Rizhsky et al. (2002, 2004) например, публикуват данни за значително увеличаване в нивата на транскриптите, кодиращи ензимни системи, участващи в обезвреждането на АКФ в митохондрии при топлинен стрес. Вероятно това е причината за рязкото увеличаване на митохондриалния брой само при двата стреса, в които взема самостоятелно или комбинирано участие повишената температура (виж Фиг. 8d). От казаното можем да обобщим, че тези органели вземат активно участие в антистресовия растителен отговор и имат голям принос за оцеляването на организмите в условията на силен стрес. Допускаме, че увеличаването на митохондриалния размер е компенсаторен механизъм, осигуряващ недостигащия АТФ. От морфометричните данни, показани на Фиг. 8a-d и Фиг. 9a,b е видно, че не можем просто да сумираме отговорите на растенията към индивидуално приложените засушаване или висока температура, за да предвидим резултатите от тяхната комбинация.

Считаме, че установените междусортови различия, документирани чрез трансмисионната електронна микроскопия и последващите морфометрични анализи, могат да служат като надеждни стресови маркери при оценяването на устойчивостта на даден сорт към неблагоприятни природни условия.

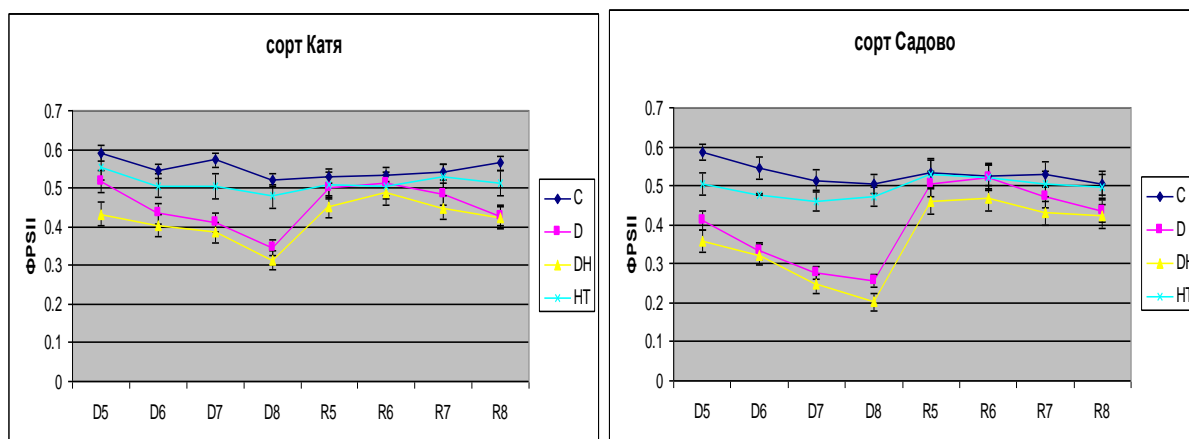
Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху фотосинтетичните параметри

Устойчивостта към стрес при двата сорта пшеница оценихме чрез параметрите на функционалната активност на фотосинтетичния апарат – газообмена и хлорофилната флуоресценция, измерени при стайна температура.

Повлияване на флуоресценцията на хлорофил а

За да проследим как трите вида стрес повлияват хлорофилната флуоресценция, и за да сравним чувствителността на двата пшенични сорта към стрес-индуцираното фотоинхибиране, измерихме фотохимичните параметри Φ_{PSII} и qP на третираните с различните стресови фактори интактни растения, както и след последващ стреса тридневен възстановителен период.

Според Genty et al. (1989), квантовият добив на електронния транспорт през ФСII в светлинно адаптирано състояние, означен като Φ_{PSII} , е важен параметър, който дава информация за количеството на отворените реакционни центрове на ФСII и е показател за фотохимичното използване на светлината в рамките на тази система (Calatayud и Varreno, 2000). Данните от измерванията му са представени на Фиг. 10.

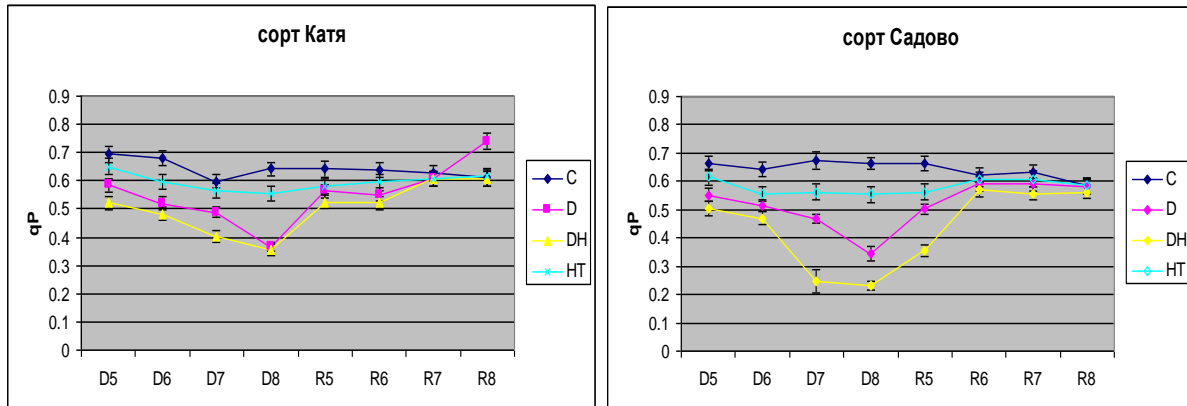


Фиг. 10. Изменение в квантовия добив на електронния транспорт през ФСII в светлинно адаптирано състояние (Φ_{PSII}), проследен в условията на 5-8-дневно засушаване (D5-D8) и последващо възстановяване (R5-R8). Паралелно е проследена промяната на Φ_{PSII} при контролни, подложени на високотемпературен стрес или подложени на комбиниран стрес от D/HT растения. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

Наблюдаваното намаление в стойностите на Φ_{PSII} при екстремни условия е най-голямо при комбинирания стрес на 7 и 8 ден от засушаването. Забелязва се и подчертана междусортова диференциация в отговора на пшеничните растения. Чувствителния сорт Садово показва на 8 ден от засушаването инхибиране на Φ_{PSII} с повече от 50% при D и с близо 60% по време на DH, докато спадът на същия параметър при устойчивия сорт Катя е съответно с 33% и 40%. Подобна отчетлива междусортова разлика е докладвана при нахута от Масар и Екмекси (2008). Спадът в квантовия добив на електронния транспорт през ФСII в светлинно адаптирано състояние по време на самостоятелното прилагане на висока температура (11% при Катя и 14% при Садово) е пренебрежимо малък в сравнение със същия при D и DH. Видно е, че възстановителният режим довежда стойностите на Φ_{PSII} до контролните нива и при двата сорта. Резултатите показват, че под влияние на стреса се редуцира електронния транспорт през фотосинтетичните електронно транспортни вериги, което е било

установено и при други растения (Pieters et al., 2003). Считаме, че забележителния спад в стойностите на Φ_{PSII} при D и DH стресовите, както и отчетливите разлики между двата генотипа, могат да бъдат свързани с установените от Grigорова et al. (2012) драстични деструктивни изменения в съответните хлоропластни структури (Фиг. 6А-В, 6Е-F). На Фиг.6 ясно се вижда, че морфологията на фотосинтетичните органили при Садово е негативно повлияна в много по-голяма степен от тази на Катя, и то най-вече при въздействията, свързани с обезводняване.

Установено е, че потискането на Φ_{PSII} се дължи на паралелно понижаване в стойностите на коефициента на фотохимично гасене на флуоресценцията qP (Lu and Zhang, 1999). Данните от нашите изследвания за qP при прогресивното засушаване и последващото тридневно възстановяване са представени на Фиг. 11.



Фиг. 11. Изменение в коефициента на фотохимично гасене на флуоресценцията (qP), проследен в условията на 5-8-дневно засушаване (D5-D8) и последващо възстановяване (R5-R8). Паралелно е проследена промяната на qP при контролни, подложени на високотемпературен или комбиниран стрес от D/HT растения. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

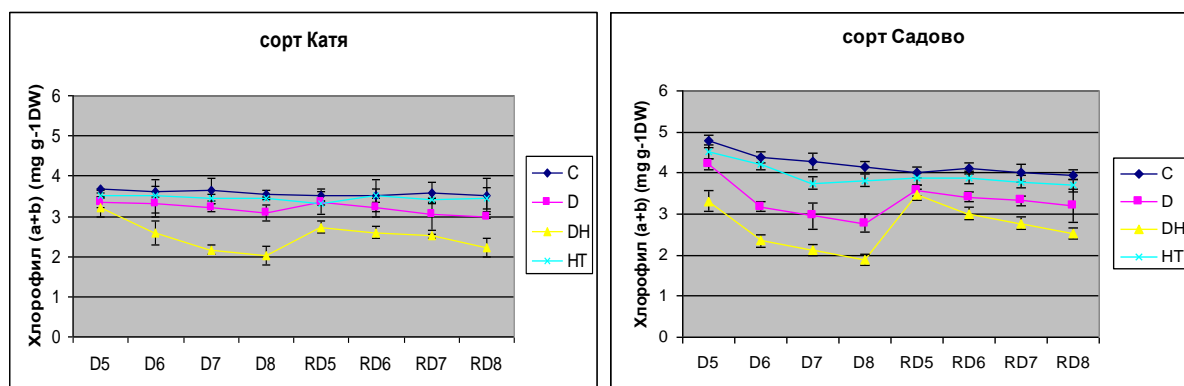
Засушаването, както и комбинацията му с висока температура, индуцират постепенно (от 5 до 8 ден на обезводняването) намаление в стойностите на фотохимичното гасене (qP) и при двата сорта. Установеното процентно намаление спрямо контролите, обаче, бе 2 пъти по-голямо при чувствителния сорт Садово на 7 ден, след приложен DH стрес, и 1.7 пъти по-голямо при D. След приложеното тридневно възстановяване стойностите на разглеждания параметър отново достигат оптималните си нива. За разлика от D (48%) и DH (65%), високотемпературният стрес отбеляза значително по-малък спад спрямо контролите (16%) и при двата пшенични сорта. Но тенденцията за по-ниски стойности на qP при чувствителния, спрямо толерантния генотип се запази и в този случай.

От направените измервания се вижда, че трите изследвани стресови фактора намаляват Φ_{PSII} и qP и при двата сорта пшенични растения. При устойчивия генотип, параметрите на хлорофилната флуоресценция като цяло са по-слабо повлияни от засушаването. Видно е, че фотохимичните изменения са най-драстични при комбинирания стрес на 8-я ден от засушаването, следван по интензитет от самостоятелно приложеното обезводняване. При *Triticum aestivum* L., топлинният стрес сравнително по-слабо повлиява изследваните показатели, свързани с ФСЦ. Това показва, че самостоятелно приложените високи температури не са силен инхибитор по отношение на активността на ФСЦ, но засушаването и комбинацията му с повишени температурни стойности вече предизвиква намаление в активността ѝ. Подобни резултати са били докладвани от Hassan, (2006). Навярно това е адаптивен механизъм, целящ предотвратяване на фотоокислителните разрушения върху структурите на ФСЦ (Munné-Bosch и Alegre, 1999), тъй като явно засушаването е по-силен стрес от високите температури за пшеницата. Намаленият капацитет на използване на светлината във

фотохимичната фаза на фотосинтезата при стрес, може да се дължи на разрушаването на фотосинтетичния апарат в хлоропластите (Grigorova et al., 2012), както и на умишленото елиминирание на ФСII като активен производител на АКФ (Calatayud, 1997).

Пигментен анализ при засушаване, висока температура и комбинацията им

С помощта на пигментния анализ установихме последователен спад в общото хлорофилно съдържание (хлорофил $a+b$) от 5 до 8 ден на безводния режим, особено силно изразен под въздействие на комбинирания стрес от засушаването и високата температура, който достига максимални стойности на 8-я ден от водния стрес, и е съответно 54% при чувствителния сорт Садово, и 43% при устойчивия сорт Катя (Фиг.12).



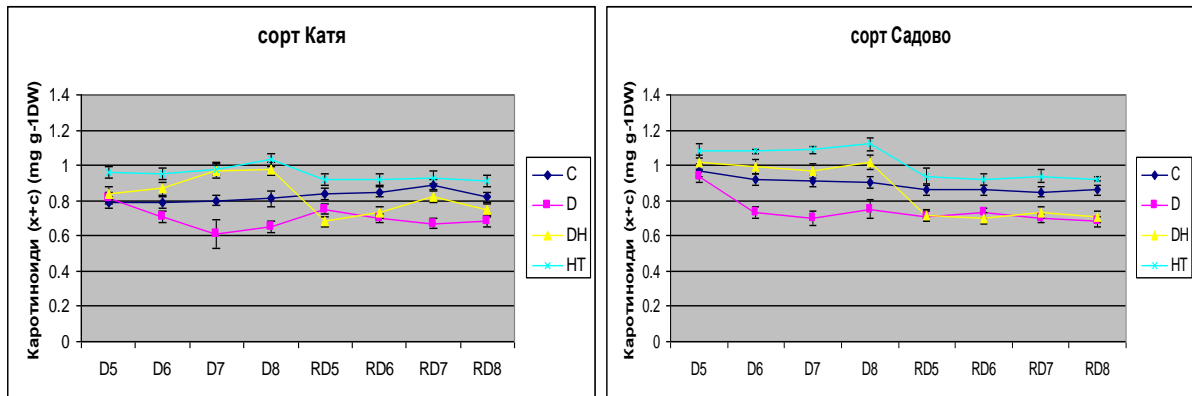
Фиг. 12. Изменение в съдържанието на хлорофил ($a+b$) ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$) при млади пшенични растения от два сорта – устойчив (Катя) и чувствителен (Садово), подложени на засушаване от 5-8 дни (D), самостоятелно приложени високи температури (HT) и тяхната комбинация (DH), както и при тридневно възстановени растения след воден дефицит от 5-8 дни (RD5-RD8). Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

При генотип Катя не се установява значително различие по отношение на хлорофилното съдържание под въздействие на самостоятелно приложените засушаване и висока температура, докато при сорт Садово и двата стресови фактора, свързани със засушаването, редуцират хлорофилното съдържание още от 5-я ден на водния дефицит. Смятаме, че този резултат корелира със силно деструктурираните хлоропласти (дезориентирани грани и нарушена мембранна цялост, виж Фиг. 6F), които наблюдавахме при чувствителния генотип и особено под въздействие на DH. От друга страна, намаленото хлорофилно съдържание, особено добре изразено при по-слабо толерантния пшеничен сорт, може да бъде свързано и с намалените стойности на Φ_{PSII} (виж Фиг.10). Това потвърждава теорията, че намаленото хлорофилно съдържание, разрушаването на фотосинтетичния апарат при някои растения по време на засушаване и намалената фотохимична активност на ФСII, са своеобразни адаптивни механизми за преодоляване на стреса (Maxwell и Johnson, 2000; Farrant, 2000).

Счита се, че каротиноидните пигменти имат съществена фотопротективна роля, тъй като гасят триплетния хлорофил и синглетния кислород, предпазвайки организмите от натрупването на АКФ (Farrant, 2000; Masar и Екмексі, 2008). От друга страна каротиноидите отразяват светлината, като по този начин “маскират” хлорофила, а и някои от тях имат антиоксидантни свойства (Farrant 2003, 2009).

Резултатите от нашето изследване показват, че екстремните условия, свързани с повишаване на температурите над оптималните (HT и DH), са пряко свързани с повишаване на общото съдържание на каротиноидите (27% увеличение при сорт Катя и 24% при сорт Садово при HT), като след прекратяване на третираната пшеничните

растения възстановяват стойностите на въпросните пигменти до контролни нива (при НТ) или спадат под тях (при ДН) (виж Фиг. 13).



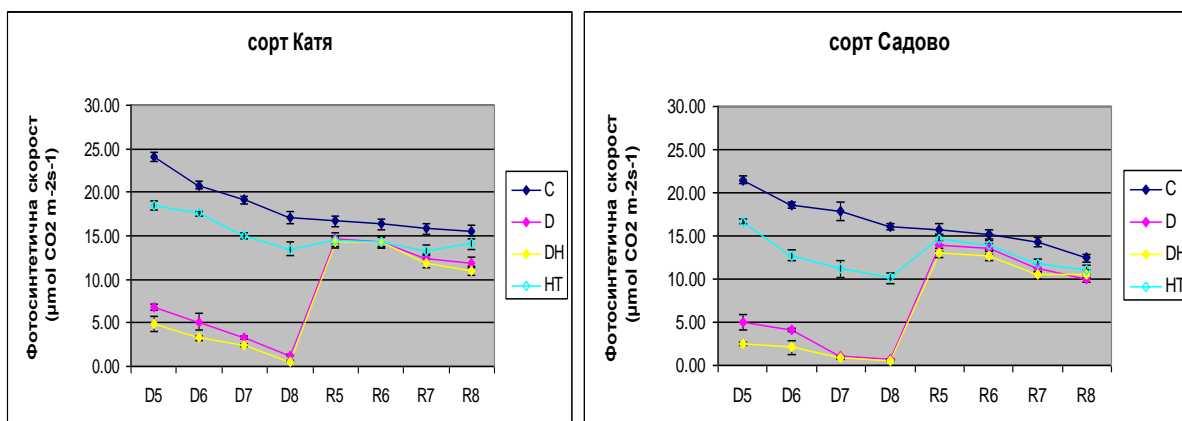
Фиг. 13. Изменение в съдържанието на каротиноиди (x+c) ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$) при млади пшенични растения от два сорта – устойчив (Катя) и чувствителен (Садово), подложени на засушаване от 1-8 дни (D), самостоятелно приложени високи температури (НТ) и тяхната комбинация (DH), както и при триднешно възстановени растения след воден дефицит от 5-8 дни (RD5-RD8). Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

Считаме, че това е защитна реакция на младите пшенични растения срещу окислителния стрес, предизвикан като вторична реакция към повишените температури (Buchanan, 2000). Спекулирайки с получените резултати дори можем да предположим, че окислителните повреди, предизвикани от свързаните с топлинен стрес фактори са доста по-големи, в сравнение с тези, предизвикани от засушаването, което изисква натрупването и проявата на каротиноидите като защитни механизми, специално при НТ и DH условия. Устойчивият сорт разчита на този механизъм на защита малко повече от чувствителния.

Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху активността на фотосинтезата

Съгласно Yordanov et al. (2001/2002), първичните фотохимични реакции са по-стабилен показател при засушаване и за правилното оценяване на чувствителния и устойчивия сорт при пшеницата, е необходимо да се разгледат и интегралните фотосинтетични показатели.

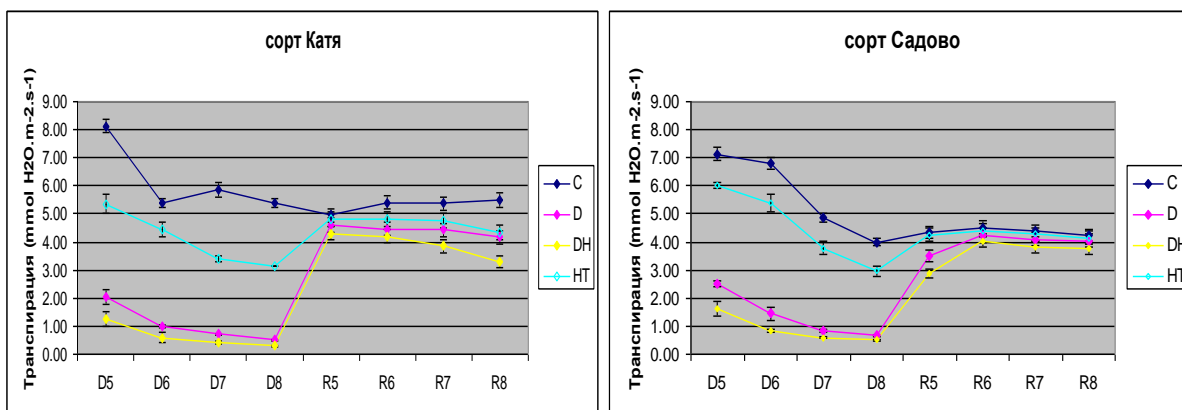
Графиките на Фиг. 14 характеризират отговорите на двата пшенични сорта Катя и Садово, получени от портативния газов анализатор, и пряко свързани с фотосинтезата по време на прогресиращо засушаване (от 5 до 8 ден на безводния режим), при самостоятелно приложена висока температура, както и при едновременното въздействие на двата стреса.



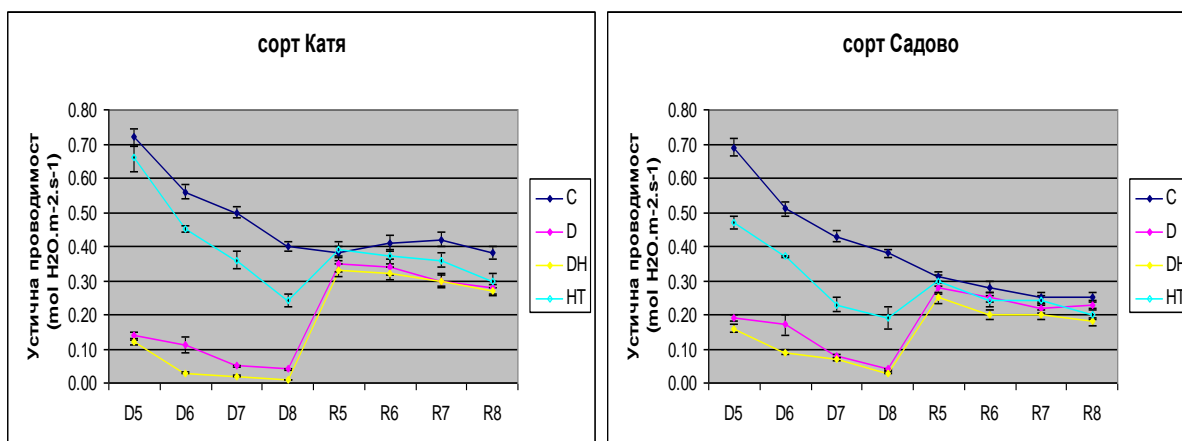
Фиг. 14. Изменение на нето фотосинтетичната скорост ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) при пшенични растения от сорт Садово (чувствителен) и Катя (устойчив), проследена в условията на 5-8-дневно засушаване (D5-D8) и последващо възстановяване (R5-R8). Паралелно е проследена промяната на фотосинтезата при контролни, подложени на високотемпературен или комбиниран стрес от D/HT растения. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

От изложените експериментални резултати на Фиг.14 е видно, че скоростта на фотосинтезата се редуцира в низходяща прогресия успоредно с повишаването на степента на дехидратация. Най-негативно повлияна се оказва фотосинтезата при пшеничните растения, подложени на комбиниран стрес, където процесът достига 97% инхибция (на 8 ден от засушаването) спрямо съответните контроли, следвана от индивидуално приложено обезводняване. Температурният стрес, приложен в рамките на 5 часа, намалява фотосинтетичните нива в много по-малка степен (до 37% при чувствителния сорт Садово) на фона на почти пълното подтискане на процеса при комбинирания стрес. Също така установихме, че степента на фотосинтетичните промени е различна при двата сорта. Скоростта на фиксация на CO_2 при устойчивият сорт Катя намалява с 83% на 7 ден от засушаването в сравнение с контролите, докато при растенията от сорт Садово тази редукция е близо 94% (11% междусортова разлика). Данните ни дават основание да идентифицираме Садово като по-чувствителен генотип по отношение на фотосинтетичния капацитет. Този факт може да бъде свързан както с по-силно изразените негативни морфологични промени на хлоропластите му, установени от нас (Grigorova et al., 2012) и други колективи (Yordanov et al., 2001a), така и с някои биохимични изменения на HSPs ниво (Grigorova et al., 2011a; 2011b).

Измерванията по отношение на другите два параметъра, свързани с листния газообмен (устична проводимост и транспирация), показват същата тенденция на плавен спад с напредване на прогресиращото засушаване (от 5 до 8 ден), достигайки минималните си нива на 8 ден от засушаването при комбинирания стрес (виж Фиг. 15 и Фиг. 16).



Фиг. 15. Изменение в интензитета на листната транспирация ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при пшенични растения от сорт Садово (чувствителен) и Катя (устойчив), проследен в условията на 5-8-дневно засушаване (D5-D8) и последващо възстановяване (R5-R8). Паралелно е проследена промяната в транспирацията при контролни, подложени на високотемпературен или комбиниран D/HT стрес растения. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.



Фиг. 16. Изменения в устичната проводимост ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при пшенични растения от сорт Садово (чувствителен) и Катя (устойчив), проследени в условията на 5-8-дневно засушаване (D5-D8) и последващо възстановяване (R5-R8). Паралелно е проследена промяната в устичната проводимост при контролни, подложени на високотемпературен или комбиниран D/HT стрес растения. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

Самостоятелно приложеното обезводняване показва близки резултати по отношение на тези два параметъра до DH, докато HT отново се откроява с минимални негативни промени от контролните стойности. Интересно е да се отбележи, че на 5-6-7 ден от засушаването (при съответстващи нива на RWC съответно около 40%-35%-25%) устойчивият генотип Катя показва по-малка устична проводимост и по-ниски нива на транспирация, в сравнение с чувствителния сорт Садово. Тази реакция на намаляване на водообмена при устойчивия сорт Катя се наблюдава само при D и DH, което ни навежда на мисълта, че е твърде вероятно това да е защитна реакция на по-добре адаптируемия пшеничен сорт към силни стресови фактори, пряко свързани с недостига на вода, каквито при нашите изследвания са D и DH. При аналогични изследвания резултатите се потвърждават от Vassileva et al. (2011), където авторите коментират, че толерантният генотип Катя се адаптира по-добре в условията на засушаване, държейки устицата си по-слабо отворени. Според Flexas et al. (2004), устичната проводимост може да се счита за чувствителен индикатор по отношение на силата на водния стрес и нейните стойности под $0.1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ са показателни за силно засушаване. Според този критерий, и при двата пшенични сорта, засушаване в рамките съответно на 7 и 8 дни, трябва да бъде квалифицирано като силно.

Сравнявайки данните от Фиг. 14-16 установихме, че под въздействие на D и DH на по-големия спад в устичната проводимост и транспирацията при сорт Катя отговаря, по-малък спад на фотосинтетичната скорост. Получените резултати показват, че при силни стресови условия не устичните, а други фактори имат определящо значение. Изследванията на Flexas et al. (2004) потвърждават, че при силен воден стрес това са метаболитните фактори.

Устойчивостта към стрес при двата сорта пшеница оценихме чрез параметрите на функционалната активност на фотосинтетичния апарат – газообмена и хлорофилната флуоресценция, измерени при стайна температура. Установихме, че водният дефицит силно понижава фотосинтетичната активност на младите пшенични растения, а комбинацията му с високи температури силно засилва този негативен ефект (Yordanov et al., 2001a). Фактът може да корелира с намаленото хлорофилно съдържание (Фиг. 12) и силните деструктивни промени в хлоропластите (Фиг. 6), установени от нас (Grigorova et al., 2012). Публикациите на други автори обясняват подобни резултати с намалената наличност на CO₂ в хлоропластите, с редуцираното количество рибулозо-1,5-бифосфат в условията на засушаване или със загубата на Рубиско активността (Yordanov et al., 2001a, 2001b; Vassileva et al., 2012). При сравнителното разглеждане на параметрите на хлорофилната флуоресценция и анализ на газообмена на *Triticum aestivum* L. прави впечатление, че листната CO₂ асимилация, устичната проводимост и транспирацията спадат при всички видове стрес, докато по отношение на фотохимичната активност (стойностите на qP и Φ_{PSII}), значително инхибиране забелязваме предимно при D и DH. Счита се, че при температурен стрес растенията включват високоефективна антиоксидантна система и ефективна защита срещу фотохимичното разрушаване, които не са свързани с подтискане на фотохимичните реакции (Silva et al., 2011).

Влияние на засушаването, високата температура и тяхната комбинация върху избрани класове топлинно шокови протеини (HSPs)

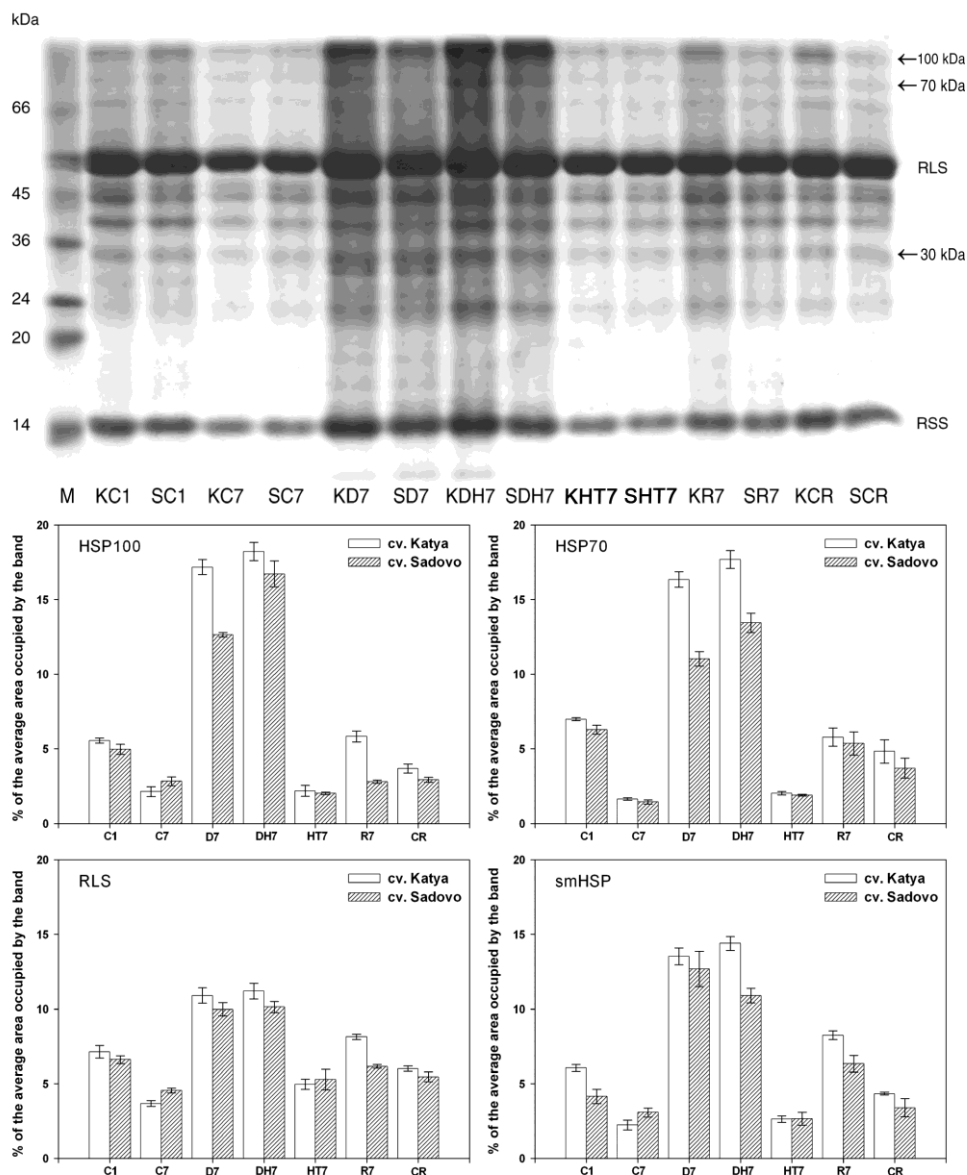
Засушаването и високите температури са сред абиотичните стресови фактори, причиняващи най-сериозни загуби при селскостопанските култури, тъй като те водят до сериозни нарушения в протеиновите структури и функции (Howarth и Ougham, 1993; Sreenivasulu et al., 2007; Timperio et al., 2008), за възстановяването на които, при екстремни условия, основна роля има шапероновата активност на HSPs (Burdon, 1993). И въпреки че комбинацията между двата стреса е често срещано явление в сухите и полусухи райони на Земята, твърде малко се знае за ефекта ѝ върху профила на HSPs, особено при пшеничните растения (Rizhsky et al., 2002; 2004; Mittler, 2006).

Водещата цел на настоящата работа, бе сравнителното изследване на настъпващите промени в нивото на експресия на определени HSPs (smHSPs, HSP70 и HSPs с високо молекулно тегло) по време на комбинирано и индивидуално прилагане на засушаване и висока температура при *Triticum aestivum* L., използвайки потенциала на молекулярни и биохимични подходи. Резултатите от генната експресия сами по себе си не са достатъчни, за да отразят категорично настъпващите *in vivo* промени в протеиновия профил, поради множеството посттранскрипционни изменения и посттранслационни модификации на полипептидите (Gygi et al., 1999; Timperio et al., 2008; Hassan et al., 2010; Simova-Stoilova et al., 2010).

Проследяване на протеиновия профил и експресията на избрани класове топлинно шокови протеини (HSPs) чрез SDS-PAGE и имуноблотинг

Известно е, че засушаването, високата температура, както и тяхната комбинация провокират спирането на конвенционалната протеинова синтеза, придружено с увеличена транслация на HSPs (Vierling, 1991; Schoffi et al., 1998; Mittler, 2006; Caeiro et al., 2008; Lin et al., 2008) и други стресови протеини (Demirevska et al., 2008b; Simova-Stoilova et al., 2010; Vaseva et al., 2010; Vassileva et al., 2012). Индуцирането на синтезата на HSPs е един от най-бързите отговори, разпространен при всички растителни видове, който е свързан със специфичната клетъчна защита в екстремни условия (Ritossa, 1962; Wangxia et al., 2004; Kotak et al., 2007).

Промените в протеиновия профил при двата пшенични сорта и под въздействие на трите вида стрес първоначално са документирани чрез провеждането на множество SDS-PAGE анализи, чиято софтуерна обработка дава количествена представа за настъпващите биохимични изменения. Всички гелове даваха сходни резултати, но един от тях е избран за представителен (Фиг.17).



Фиг. 17. Протеинов профил след 12.5% SDS-PAGE разделяне на листни екстракти от пшеничен сорт Катя (**K**) и сорт Садово (**S**). Пробите са получени от контролни **C1** (1^{ви} ден на водния стрес - респективно 8-дневни растения, ежедневно поливани) и **C7** (7^{ми} ден на водния стрес - респективно 14-дневни растения, ежедневно поливани), **D7** (7 дни засушавани, респективно 14-дневни растения), **DH7** (същите като **D7**, допълнително подложени на температурен стрес за 5 часа при 40°C, преди събирането на пробите), **HT7** (само подложени на температурен стрес за 5 часа при 40°C, 14-дневни растения), **R7** (възстановени чрез тридневно напояване **DH7**-растения, респективно 18-дневни растения), и **CR** (възрастова контрола на възстановените пшенични растения -18-дневни растения, ежедневно поливани) растения. На първа пътека на вертикалния гел е нанесен Dalton Mark Standard Mix (**M**). Позициите на голямата (RLS) и малката (RSS) субединици на Рубиско са поставени като референтни точки от дясната страна на гела.

Разделянето на протеините чрез вертикална SDS-PAGE и последващата обработка чрез софтуера ImageJ на получените профили (Фиг.17) показват драстично увеличение в експресията на HSP70 при растенията, подложени на D7 (8 пъти) и DH7 (9 пъти) в сравнение със съответните контроли. Съдържанието на HSP70 остава високо при тридневно възстановените след комбинирания стрес растения (R7), в сравнение със съответната възрастова контрола (CR). Прави впечатление по-доброто

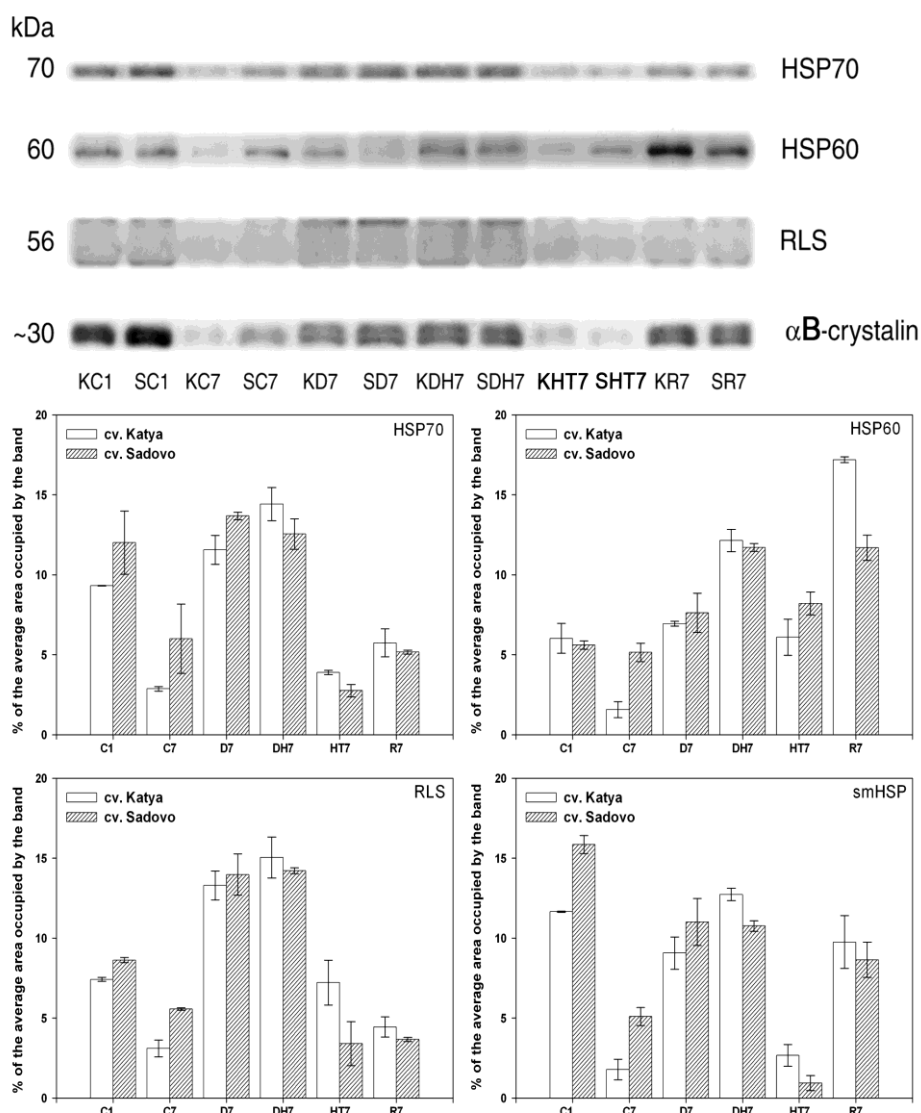
представяне на HSP70 при устойчивия сорт под въздействие на D и DH (0.7 пъти), в сравнение с чувствителния сорт. Самостоятелно приложеният топлинен стрес не променя така силно експресията на HSP70. Този факт може би има връзка с ранния етап от развитието на растенията (8-15 ден след засаждането на семената), когато те формират функционалните си системи, и дори при оптимални условия имат по-големи нужди от този основен молекулен шаперон (Mayer и Bukau, 2005).

При топлинно шоките протеините с молекулно тегло над 100 кДа забелязваме сходна тенденция с тази на HSP70 (Фиг. 17). Най-силна е проявата им при комбинацията от двата стреса, в сравнение с нетретирания пшенични растения, като разликата в експресията на обсъжданите протеини надминава 9 пъти. Нивото на високомолекулните HSPs при Катя е значително по-високо от измереното при Садово. Считаме, че повишената им експресия, особено в условията на комбиниран стрес, е свързана с тяхното съществено значение за оцеляване на растенията в екстремни условия, тъй като те участват в предотвратяването на агрегацията на ненативните форми на протеините, чието количество тогава силно нараства (Gulli et al., 2007).

Както се очакваше, нискомолекулните HSPs са транслирани в много по-високи нива при D (5 пъти по-високи в сравнение с контролите), и DH (6 пъти по-високи в сравнение с контролите), достигайки максимална експресия при толерантния сорт, под въздействие на комбинирания стрес (Фиг. 17). Получените данни потвърждават тяхната висока шаперонова активност в условията на силни абиотични стресови фактори (Mansfield et al., 1987; Waters et al., 1996; Smykal et al., 2000). Експерименталните данни също така показват, че smHSPs са силно представени и в контролните растения (при контролите от първия ден на засушаването C1, нивата им са 2 пъти по-високи от съответните контроли след шест дни C7). От направената литературна справка става ясно, че акумулирането на smHSPs може да се провокира освен от стресови фактори, и на определени етапи от нормалното развитие на растителните организми (Mansfield et al., 1987; Vierling, 1991; Waters et al., 1996; Smykal et al., 2000). Този факт според нас обяснява тяхното силно представяне в листата на контролните растения, намиращи се в ранна вегетативна фаза (8-14 ден след прорастване на семената).

SDS-PAGE анализите разкриват някои разлики в експресионния профил между двата изследвани генотипа. Толерантният сорт Катя демонстрира по високи нива на всички изследвани HSPs, в сравнение с чувствителния сорт Садово, по време на D и DH (Фиг. 17), което можем да свържем с неговите по-добри адаптивни възможности.

Имуноблот анализите, проведени с моноклоналното анти-HSP70 антитяло и поликлоналните анти-HSP110 и анти- α B-кристалин антитела (Фиг. 18), потвърждават първоначалните данни, получени от проведените електрофорези. Те осигуряват по-прецизно и специфично оценяване на настъпилите транслационни промени в хода на разглежданите стресови варианти, по отношение на гореизброените протеини.



Фиг. 18. Имуноблот анализ на листни топлинно шокови протеини в контроли (C1 – 1^{ви} ден и C7 – 7^{ми} ден от стреса - респективно 8- и 14-дневни растения, ежедневно поливани), 7 дни засушавани растения (D7, които представляват 14-дневни растения), допълнително подложени на топлинен стрес D7-растения (DH7), само топлинен стрес, приложен на 14-дневни растения, ежедневно поливани (HT7), възстановени DH7-растения (R7 или 18-дневни растения), възрастова контрола на възстановените индивиди (CR-18-дневни растения, ежедневно поливани).

И тук HSP70 се оказва постоянно представен, но с поне трикратно по високи нива при D, DH и контролните проби от първия ден в сравнение със 7-дневните контроли. Запазва се установената тенденция при SDS-PAGE за високи нива на протеина при тридневно възстановените растения. Имунодетекцията на нискомолекулните протеини е значително увеличена във вариантите на D, DH и R (възстановени след 7-дневно засушаване в комбинация с топлинен стрес) третиращи растения, в сравнение със 7-дневните контроли (C7). По отношение на smHSPs прави впечатление, че на фона на значително повишената им експресия при двата стреса, свързани с обезводняването, самостоятелно приложения HT не променя съществено нивото им в сравнение с C7. Инкубацията с анти-HSP110 антитела даде много слаба реакция и оцветяване на ниво 110 кДа, което не ни предостави информативен образ след сканиране на мембраната. Смятаме, че полученият резултат намира своето обяснение в публикацията на Vierling

(1991). Авторката докладва, че HSP110 се характеризира с кратковременна експресия, ограничена в рамките на първия час от прилагането на топлинния стрес. При нашата експериментална постановка листният материал от всички стресови варианти се събираше едновременно и след приключването на 5-часовия топлинен стрес. Наличното количество на HSP110 в този времеви период явно не е достатъчно за определянето му.

Независимо от експерименталния неуспех с идентификацията на HSP110, проведенят имуноблот анализ ни предостави ясни изображения от настъпили крос-реакции, кореспондиращи с HSP60 имунодетекцията. Тази проява беше отбелязана като възможна и в сертификата на закупеното поликлонално антитяло. Обработената мембрана показва силно изразена експресия на шаперонин 60 в случаите на третираните с ДН растения и пробите от възстановените растения след въздействие с ДН (R7) (виж Фиг. 18). Основната роля на този молекулен шаперон е свързана с протеиновото сглобяване, като например сглобяването на Рубиско. Повишеното HSP60 съдържание във възстановените листа, подкрепя теорията за неговите шаперонови функции през възстановителния период след ДН, когато растенията се борят да оцелеят и да възобновят нормалното си функционално състояние. При този процес, поддържането на оптимално Рубиско съдържание, явно изисква високи нива на HSP60, които ние успяхме да докажем чрез имуноблот анализа. Изглежда, че пшеничните семена при екстремни условия трябва да имат “готовност за възстановяване” след стреса и дори да завишават нивата на Рубиско субедниците си, както се вижда от получените резултати (Фиг. 17 и Фиг. 18).

Обобщавайки резултатите от проведените електрофорези и имуноблотове, можем да кажем, че изследваните от нас HSPs (ниско и високомолекулни HSPs, HSP семейства с молекулни маси 70 и 100 кДа) се експресират по-силно под въздействие и на трите стресови фактора, като достигат максимални нива при ДН. Подобно е и представянето им под въздействие на D, докато при H стойностите им не се отклоняват много от контролните нива. Нискомолекулните HSPs и HSP70, освен с максимално завишена транслация при обезводняващите стресове, се отличават и със стабилна експресия в контролните и възстановените тъкани, което е напълно оправдано с оглед на биологичните им функции.

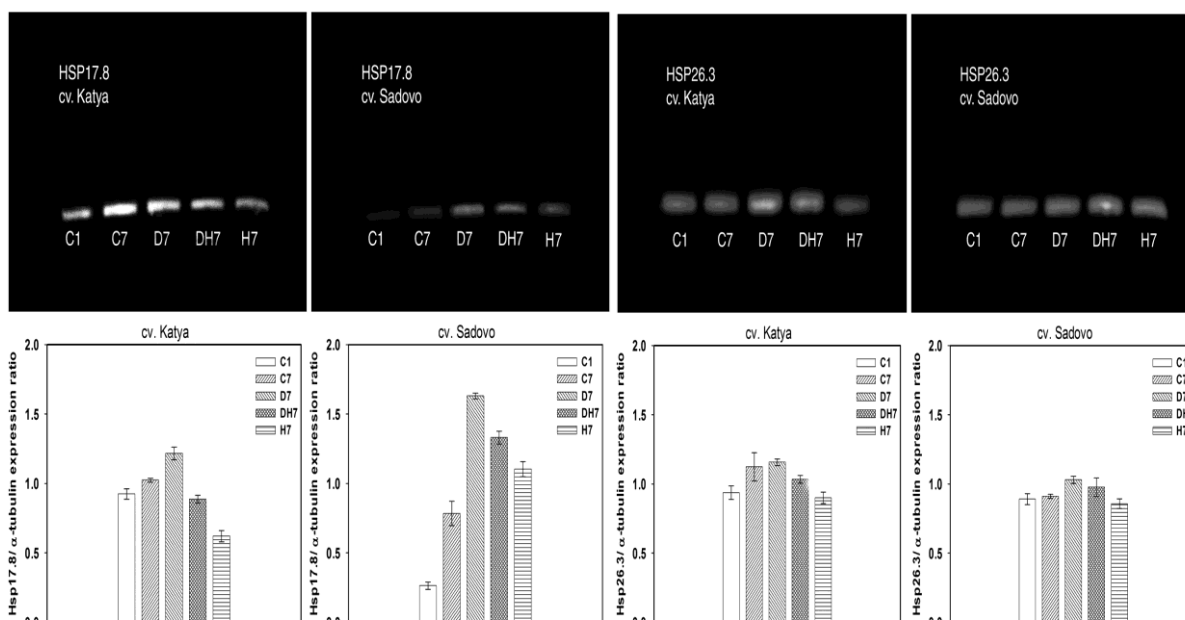
Проследяване експресията на избрани класове топлинно шокови протеини (HSPs) чрез едностъпален RT-PCR анализ

С помощта на едностъпален RT-PCR анализ проследихме настъпващите промени в експресията на четири *Hsp* гена (*Hsp* 17.8, *Hsp* 26.3, *Hsp* 70 and *Hsp* 101b) при пшенични растения под влияние на самостоятелно приложени засушаване (7-дневно), висока температура (5 часа при 40°C) и тяхната комбинация. Дизайнът на специфичните праймери, необходими за амплифицирането на гореспоменатите гени, беше осъществен със софтуер DNASTar, използвайки публикуваните секвенции на мРНК за *Triticum aestivum* (<http://www.ncbi.org>). Използвахме 25 µl реакции и PCR Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Германия). Всяка RT-PCR реакция започваше с инкубиране на пробите за 30 min при 50°C (обратна транскрипция), следвана от PCR анализ, осъществяван при следните условия:

Стъпка	Температура	Времетраене	Бр.цикли	Реакция
1.	95°C	4 min	1	денатурация
2.	95°C	30 sec	25	денатурация
3.	61°C за <i>Hsp</i> 26.3	30 sec		прикачване на праймерите

Стъпка	Температура	Времетраене	Бр.цикли	Реакция
	61°C за <i>Hsp70</i> 61°C за <i>Hsp 101b</i> 64.5°C <i>Hsp 17.8</i>			
4.	72°C	1 min		удължаване
5.	72°C	10 min	1	крайно удължаване
6.	4°C	∞		охлаждане

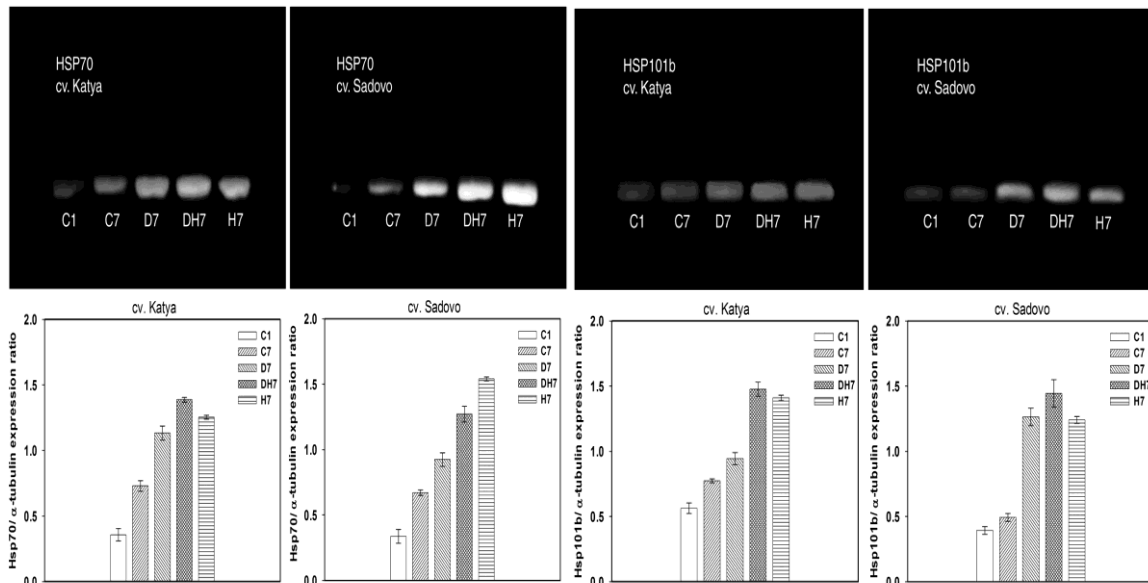
Изображенията на Фиг. 19 и Фиг. 20 са избрани като представителни от трите проведени експеримента. Експресията на α -тубулиновия ген (housekeeping ген) при *Triticum aestivum* L. беше използвана при същите RT-PCR условия ($T_a = 61^\circ\text{C}$) като вътрешен стандарт за нормализиране на данните от *Hsp* експресия.



Фиг. 19. RT-PCR амплификационни продукти на гени, кодиращи *Hsp17.8* и *Hsp26.3* в първи лист на пшенични растения от сорт Катя и сорт Садово, отглеждани при различни условия: **C1** – контрола на 1 ден от засушаването или 8-дневни растения (ежедневно поливани), **C7** – контрола на 7 ден от засушаването или 14-дневни растения (ежедневно поливани), **D7** – 7 дни засушавани или 14-дневни растения, **DH7** – комбиниран стрес: топлинно стресирани D7-растения, **H7** – само топлинен стрес, приложен на 14-дневни растения (ежедневно поливани). Диаграмите показват относителното експресионно съотношение на съответните *Hsp* гени и α -тубулин. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

Нискомолекулните *Hsp* гени (*Hsp17.8* and *Hsp26.3*) са силно експресирани при засушените (D7, DH7) растения, което можем да обясним с високата им шаперонова активност (Smykal et al., 2000; Kotak et al., 2007). Експерименталните данни показват също, че транскриптите на *Hsp26.3* и *Hsp17.8* са изобилно представени в контролните тъкани (C7), което би могло да бъде свързано с определени етапи от развитието на растенията (Vierling, 1991; Waters et al., 1996, Smykal et al., 2000). Смятаме, че причината за силната проява на smHSPs при контролите е ранния вегетационен етап (8-14 ден след засаждане на семената) от развитието на културата. Интересен експериментален резултат е четири пъти по-голямата експресия на *Hsp17.8* в

контролите от първия ден (C1) при толерантния сорт Катя, в сравнение с чувствителния Садово. Навярно, това също е важна придобивка на толерантния сорт за по-добро оцеляване.



Фиг. 20. RT-PCR амплификационни продукти на гени, кодиращи *Hsp70* и *Hsp101b* в първи лист на пшенични растения от сорт Катя и сорт Садово, отглеждани при различни условия: **C1** – контрола на 1 ден от засушаването или 8-дневни растения (ежедневно поливани), **C7** – контрола на 7 ден от засушаването или 14-дневни растения (ежедневно поливани), **D7** – 7 дни засушавани или 14-дневни растения, **DH7** – комбиниран стрес: топлинно стресирани D7-растения, **H7** – само топлинен стрес, приложен на 14-дневни растения (ежедневно поливани). Диаграмите показват относителното експресионно съотношение на съответните *Hsp* гени и α -тубулин. Осреднените резултати са представени със съответната стандартна грешка.

По отношение на *Hsp70* установихме двукратно и по-голямо от два пъти повишение в експресията му под въздействие на комбинация и топлинния стрес (DH7 и H7), в сравнение с контролните растения от същия ден (C7) (Фиг. 20). Счита се, че HSP70 е основният молекулен шаперон, който участва в анти-стрес растителните отговори, предотвратявайки агрегирането чрез поддържане на ненативните протеини и опосредстване на тяхното правилно повторно нагъване (Vierling, 1991; Wangxia et al., 2004; Mayer и Vukau, 2005). Неговите високи транскрипционни нива, специално при DH стрес, са недвусмислено доказателство за защитната роля на HSP70 протеина и силния деструктивен ефект на комбинация стрес при пшеницата. Силно завишени при DH7 и H7 в сравнение с C7 се оказват и транскрипционните нива на *Hsp101b* (Фиг. 20), достигайки максимално нарастване до 2.4 пъти при комбинация стрес. Тези резултати кореспондират с основната роля на високомолекулните HSPs - да предпазват протеиновата агрегация (колаборирайки се с HSP70 шапероните), настъпваща в резултат на силен стрес (Queitsch et al., 2000; Wangxia et al., 2004). Документираното сравнително високо ниво на *Hsp101b* по време на HT стрес потвърждава публикуваната информация за участието на Hsp101 в установяването на термотолерантност при *Arabidopsis* (Queitsch et al., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основната цел на настоящия дисертационен труд бе комплексното и сравнително изучаване на комбиниран стрес от засушаване и висока температура, приложени върху

млади пшенични растения от два различни по своята устойчивост към воден дефицит сортове - Катя (устойчив) и Садово (чувствителен). В литературата има недостиг на информация, както относно съвместното влияние на двата стресови фактора върху биохимията, физиологията и морфологията на растителните организми като цяло, така и конкретно по отношение на пшеницата, която се явява една от икономически най-важните за изхранването на човечеството селскостопански култури. Досега са провеждани предимно подробни транскриптомни анализи, частични физиологични проучвания и морфологични наблюдения, но с недостатъчни морфометрични измервания. Допълнителна, но изключително важна част от изследването ни, бе търсенето на специфични маркери за устойчивост към стрес при *Triticum aestivum* L., използвайки двата различни генотипа.

Получените резултати от направените изследвания ни дават основание да обобщим, че младите пшенични растения, повлияни от комбинирания стрес между засушаването и високите температури, показват характерни видово специфични белези, особено добре изразени на морфологично ниво и по отношение на изучавания протеинов профил. Те доказват невъзможността за предвиждане на стресовите промени, настъпващи при даден растителен вид, въз основа на аналогични изследвания при друг такъв. Паралелното проучване на индивидуално приложените стресови фактори и тяхната комбинация потвърди, че не можем да приложим елементарно сумиране на реакциите към самостоятелните стресови влияния, за да предвидим отговора на *Triticum aestivum* L. към едновременното им въздействие. Всички проведени експерименти недвусмислено показват, че комбинацията от двете третираня има най-силно изразен негативен ефект върху структурата и функциите на пшеничните растения. Самостоятелно приложеното засушаване повлиява *Triticum aestivum* L. по подобен начин, но в по-малка степен, докато ефектът на топлинния стрес, като индивидуално третиране, е доста по-мек, както по отношение на биохимичните и физиологичните, така и по отношение на морфологичните промени.

Погледнато по-детайлно, можем да кажем, че сравнителното изследване на стрес индуцираните ултраструктурни промени при пшеницата е най-показателно във връзка с установяването на междусортовите разлики и разкрива силно изразена генотипна зависимост. Като цяло, клетъчните органели (хлоропласти, митохондрии и пластоглобули) на устойчивия сорт Катя са по-малко негативно повлияни под въздействие на трите изследвани стресови фактора, в сравнение с органелите на чувствителния сорт Садово. Ултраструктурата на хлоропластите и митохондриите би трябвало да се счита за важна характеристика при оценяването на чувствителността към засушаване на различните сортове пшеница. Считаме, че междусортовите различия при пшеницата, документирани чрез трансмисионната електронна микроскопия и последващите морфометрични анализи могат да служат като надеждни стресови маркери за оценяване на толерантността на даден сорт към определен стрес. Направеният от нас ултраструктурен и морфометричен анализ на митохондриите, заедно с наличните литературни данни за проведени физиологични експерименти показват, че това са клетъчните органели, които в най-голяма степен успяват да запазят своите функционални възможности, независимо от драстичните ултраструктурни промени, настъпващи при тях като резултат от стреса. Това ни дава основание да заключим, че те имат изключително важно значение за преодоляване на въздействията, свързани със засушаването при пшеницата. Митохондриите имат голям принос за оцеляването на организмите в условията на силен стрес, тъй като реагират компенсаторно, стрес-специфично и дори генотип-специфично.

По отношение на първичните фотохимични реакции можем да кажем, че те са по-стабилен показател при стресовите, свързани със засушаването, и поради това за

правилното оценяване на чувствителния и устойчивия сорт при пшеницата, е необходимо да се изследват и свързаните с газообмена фотосинтетични параметри. Установихме, че освен намалената фотосинтетична активност, друг силно изразен компенсаторен механизъм за преодоляване на стреса при *Triticum aestivum* L. е усилената синтеза на HSPs. Тези протеини не само помагат за оцеляването на организмите в екстремни условия, но и подпомагат тяхното възстановяване след прекратяване на третирането. Основание за тези твърдения ни дават документираните многократно завишени нива на изследваните ниско и високо молекулни HSPs при стресовите, свързани със засушаването, както и специфичното натрупване на RLS и smHSPs във възстановените тъкани. Важно е да отбележим, че устойчивият пшеничен сорт индуцира синтезата на споменатите HSPs в много по-голяма степен от чувствителния. Нискомолекулните HSPs и HSP70 при пшеницата, освен с максимално завишена фракция при обезводняващите стресове, се отличават и със стабилна експресия в контролните и възстановените тъкани, което е напълно оправдано с оглед на биологичните им функции. Считаме, че усилената експресия на HSPs, понижената активност на ФСII, увеличеният брой митохондрии, хлоропласти и пластоглобули са сред докладваните в настоящата работа защитни механизми, даващи на двата изследвани пшенични сорта възможност за преодоляване на негативното въздействие на стреса.

Всички проведени от нас изследвания потвърждават, че Садово е по-малко устойчив на засушаване сорт от Катя. Резултатите ни показват, че под въздействие на наложените експериментални условия по-толерантният сорт е Катя.

Считаме, че направеното изследване има голямо практическо значение за определяне на растителната стратегия за оцеляване, както и за предварително проучване на сортовете пшеница, по отношение на различни биохимични, физиологични и морфологични параметри.

ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

1. Комбинираният стрес от засушаване и висока температура има най-силно изразен негативен ефект върху млади пшенични растения в сравнение със самостоятелно приложеното обезводняване и индивидуалното топлинно третиране:
 - а). Той иницира най-голям спад в RWC (18.5% на 8 ден от засушаването при чувствителния сорт Садово), най-голямо електролитно изтичане на йони през мембраната (84.3% при сорт Садово на 8 ден от засушаването), най-съществени деструктивни промени в хлоропластните и митохондриални ултраструктури;
 - б). При комбинирания стрес квантовият добив на електронния транспорт през ФСII в светлинно адаптирано състояние, който е показателен за фотохимичното използване на светлината, спада до най-ниските си стойности (0.2 при чувствителния сорт Садово), а скоростта на фотосинтеза се редуцира с 97% спрямо контролите;
 - в). При комбинирания стрес количеството на HSP70 протеина нараства максимално (имуноблот анализа показва четирикратно увеличение спрямо възрастовата контрола при Катя) и транскрипционните нива на *Hsp101b* са най-високи (2.4 пъти увеличение).
 - г). Самостоятелно приложеното засушаване при пшеницата води до подобни, но по-слабо изразени неблагоприятни промени в растенията, докато индивидуалният топлинен шок от 5 часа при 40°C се проявява като много различен и сравнително мек стресор.

2. Изследванията на биохимично, морфологично и физиологично ниво показват, че чувствителният на засушаване сорт Садово е по-силно негативно повлиян от устойчивия генотип Катя.
3. В сравнение с биохимичните и физиологични изследвания, стрес-индуцираните ултраструктурни изменения показват най-силно изразена генотипна зависимост. При самостоятелно приложените воден дефицит и топлинен стрес, броят на хлоропластите при сорт Катя нараства с около 40% в сравнение с около 20% ръст при сорт Садово, а броят на пластоглобулите се увеличава под въздействие на засушаването с 66% при сорт Катя, и само с 30% при чувствителния генотип. Сравнителният морфометричен анализ на митохондриалните повреди показва около 40% по-голям брой на митохондриите, лишени от кристи и по-големи електронно-празни участъци при сорт Садово, в сравнение със сорт Катя.
4. Ултраструктурата на хлоропластите и митохондриите е важна характеристика при оценяване на чувствителността към засушаване на различните сортове пшеница. Това ни дава основание да считаме, че междусортовите различия при пшеницата, документирани чрез трансмисионната електронна микроскопия, и последващите морфометрични анализи, могат да служат като надеждни стрес-маркери за оценяване на толерантността на даден сорт към определен стрес.
5. Комплексното изследване на първичните фотохимични реакции (инхибиране на Φ_{PSII} с близо 60% по време на комбинирания стрес при сорт Садово) и фотосинтетичните параметри, свързани с газообмена (спад до 97% на скоростта на фотосинтеза и при двата сорта по време на комбинирания стрес), дава важна информация за правилното и пълно оценяване на настъпващите фотосинтетични промени при пшеничните растения под въздействие на силен воден дефицит и неговата комбинация с високи температури.
6. Повишеният синтез на HSPs е един от основните механизми за преодоляване на силните стресови фактори при растенията. Имунодетекцията с използването на моно- и поликлонални антители, показва значителни завишения в нивата на smHSPs, HSP60 и HSP70 при растенията, подложени на 7-дневно засушаване и комбинирането му с високи температури в сравнение със съответните им възрастови контроли.
7. Нивото на експресия на HSPs е различно при двата сорта пшеница. Устойчивият сорт Катя показва около 20% по-високи експресионни нива по отношение на всички изследвани HSPs в сравнение с чувствителния сорт Садово, което ни дава основание да считаме, че тези протеини участват в механизмите на устойчивост към стрес.
8. Нискомолекулните HSPs и HSP70 при пшеницата се отличават със стабилна експресия в контролните и във възстановените тъкани, което доказва завишената необходимост от шапероновите им функции, в ранните и критични етапи от развитието на младите пшенични растения.
9. Повишеният синтез на HSPs (особено smHSPs, HSP60 и HSP70), намаленото хлорофилно съдържание (54% при чувствителния сорт Садово и 43% при устойчивия сорт Катя на 8 ден при комбинирания стрес), увеличението в каротиноидните нива (12% при чувствителния сорт Садово и 21% при устойчивия сорт Катя на 8 ден при комбинирания стрес), както и увеличеният брой митохондрии (63% ръст при комбинирания стрес), хлоропласти (60% ръст при комбинирания стрес) и пластоглобули (51% ръст при комбинирания стрес) са успешна комбинация от защитни механизми при пшеничните растения.

10. Комбинираният стрес при пшеничните растения има характерни видово специфични белези, отличаващи го от други проучвани растения, при същите екстремни условия. Комплексното изследване на водния дефицит и топлинния стрес показва, че не можем да екстраполираме реакциите на пшеницата към индивидуално приложените засушаване и висока температура, за да предвидим отговора на растението при комбинацията от двата стреса.

Оригинални приноси:

1. За първи път паралелно е проследена експресията на четири *Hsp* гена (*Hsp* 17.8, *Hsp* 26.3, *Hsp* 70 and *Hsp* 101b) при пшенични растения, под влияние на самостоятелно приложени засушаване (7-дневно), висока температура (5 часа при 40°C) и тяхната комбинация.
2. Извършено е паралелно (под въздействие на гореспоменатите три стресови фактора) проследяване на промяната в експресията на растителни HSPs чрез имунодетекция с поликлонално антитяло срещу α B-кристалин.
3. За първи път е направен подробен морфометричен анализ на основни клетъчни органели (митохондрии, хлоропласти и пластоглобули) от листа на пшенични растения, подложени на комбиниран стрес от засушаване и високата температура.
4. Извършено е комплексно характеризирание на морфологично, физиологично и биохимично ниво на комбинирания стрес от засушаване и висока температура при пшеница, като паралелно са проследявани и генотипните различия.

Потвърдителни приноси:

5. Обобщените експериментални резултати показват, че комбинираният стрес при растенията може да се счита за нов вид стрес, твърде различен от самостоятелно приложените засушаване и висока температура, с което твърдение се подкрепя теорията на Ron Mittler (2006).
6. Потвърждава се и се допълва с нови експериментални резултати фактът, че сорт Садово е по-чувствителен на засушаване от сорт Катя, което има практическо значение за селективното отглеждане на сортовете.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:

Статии в международни списания с ISI импакт-фактор

1. **Grigorova B.**, Vaseva I., Demirevska K., Feller U., **2011**, Combined drought and heat stress in wheat: changes in some heat shock proteins. **Biologia Plantarum** **55**(1):105-111. (SCI, 2011, IF=1.974).
2. **Grigorova B.**, Vaseva I., Demirevska K., Feller U., **2011**, Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress, **Acta Physiologia Plantarum** **33**(5):2041-2049. (SCI, 2011, IF=1.639).
3. **Grigorova B.**, Vassileva V, Klimchuk D., Vaseva I., Demirevska K., Feller U., **2012**, Drought, high temperature, and their combination affect ultrastructure of chloroplasts and mitochondria in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, **Journal of Plant Interactions** **7**(3):204-213. (SCI, 2011, IF=0.641).

Обзорна статия в списание с ISI импакт – фактор; глава от книга

4. **Nova Publishers, 2010**, Handbook of Molecular Chaperones: Roles, Structures and Mechanisms, Chapter 17 (pp 463-478) - Plant Heat Shock Proteins as Molecular Chaperones in Normal and Stress Conditions, **Authors/Editors: Biliana Grigorova**

ЗАБЕЛЯЗЯНИ ЦИТАТИ: Общо 11 цитата (9 цитата и 2 полуавтоцитата)

Grigorova B., Vaseva I., Demirevska K., Feller U., **2011**, Combined drought and heat stress in wheat: changes in some heat shock proteins. **Biologia Plantarum** 55(1):105-111. (SCI, 2011, IF=1.974).

1. Gong, H., Chen, G., Li, F., Wang, X., Hu, Y., Bi, Y., 2012, Involvement of G6PDH in heat stress tolerance in the calli from *Przewalskia tangutica* and *Nicotiana tabacum*. *Biologia Plantarum* 56(3):online
2. Tao, P., Liu, L., Wang, G.B., 2012, Characterization of eight cytosolic sHSP genes and their expression in *Capsella bursa-pastoris*. *Biologia Plantarum* 56(4):648-656;
3. Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012, The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63(10):3523-3543.
4. Song, H.M., Wang, H.Z., Xu, X.B., (2012), Overexpression of *AtHsp90.3* in *Arabidopsis thaliana* impairs plant tolerance to heavy metal stress. *Biologia Plantarum* 56(1):197-199.
5. Ye, ShuiFeng, 2012 Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. *Chinese Science Bulletin* 57(4):336-343.
6. Mirzaei, M., Soltani, N., Sarhadi, E., Pascovici, D., Keiqhley, T., Atwell, B.G., 2012, Shorgun proteomic analysis of long-distance drought signalling in rice roots. *Journal of Proteome Research* 11(1):348-358.
7. Vaseva, I., Sabotič, J., Suštar-Vozlič, J., Meglič, V., Kidrič, M., Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., 2011, Nova Science Publishers, In: Droughts: New Research, Chapter 11, The response of plants to drought stress-the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function.

Grigorova B., Vaseva I., Demirevska K., Feller U., **2011**, Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress, **Acta Physiologia Plantarum** 33(5): 2041-2049. (SCI, 2011, IF=1.639).

8. Ye, ShuiFeng, 2012 Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. *Chinese Science Bulletin* 57(4):336-343.
9. Pinho dos Reis, S., Lima, A.M., Batista de Souza, C.R., 2012, Recent Molecular Advances on Downstream Plant Responses to Abiotic Stress, *Int. J. Mol. Sci.* 13:8628-8647, doi: 10.3390/ijms13078628.
10. Vaseva, I., Sabotič, J., Suštar-Vozlič, J., Meglič, V., Kidrič, M., Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., 2011, Nova Science Publishers, In: Droughts: New Research, Chapter 11, The response of plants to drought stress-the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function.

Nova Publishers, 2010, Handbook of Molecular Chaperones: Roles, Structures and Mechanisms, Chapter 17- Plant Heat Shock Proteins as Molecular Chaperones in Normal and Stress Conditions, **Authors/Editors: Biliana Grigorova**

11. Vaseva, I., Sabotič, J., Suštar-Vozlič, J., Meglič, V., Kidrič, M., Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., 2011, Nova Science Publishers, In: Droughts: New Research, Chapter 11, The response of plants to drought stress-the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ:

1. 7th International Conference „Eco-Physiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors” September 19-22, 2007, Cracow, Poland.

Постер на тема: Effect of combined drought and heat stress on heat shock proteins in wheat varieties. **B. Grigorova**, I. Vaseva, K. Demirevska, U. Feller

2. International Conference “Responses of Plants to Environmental Stresses” 12-18 May 2008, Elena, Bulgaria. Organised by the Acad. M. Popov Institute of Plant Physiology – Bulgarian Academy of Sciences.

Постер на тема: Molecular and biochemical evidences for the influence of combined drought and heat stress on heat shock proteins in wheat varieties. **B. Grigorova**, I. Vaseva, K. Demirevska, U. Feller.

Устен доклад на тема: Drought induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. K. Demirevska, L. Simova-Stoilova, V. Vassileva, I. Vaseva, **B. Grigorova**, U. Feller.

3. XVI International Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB 2008), Tampere, Finland, 17-22 August 2008.

Постер на тема: Abscisic acid levels and dehydrin expression profiles as drought-tolerance markers in wheat. I. Vaseva-Gemisheva, **B. Grigorova**, K. Demirevska, U. Feller.

4. Seminar Ekologia-2009, 23-24 April 2009, Sofia.

Устен доклад на тема: Heat shock proteins as molecular anti-stress mechanisms. Plant responses during combined drought and heat shock. **Biliana Grigorova.**

5. XI Jubilee National Conference on Plant Physiology with International Participation, 19-20 November 2009, Sofia.

Устен доклад на тема: Heat shock proteins as molecular anti-stress mechanisms. Combined drought and heat stress in plants. **Biliana Grigorova**, Klimentina Demirevska, Urs Feller.

6. Изнесена лекция в Института по растителни науки в Университета в Берн (Швейцария) на тема: “Heat shock proteins during combined drought and heat stress in wheat plants”, **Biliana Grigorova**, април 2008.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ:

1. Участник в проект **DILPA**, финансиран от SCOPES (Scientific Cooperation between Eastern Europe and Switzerland) и осъществен със сътрудничеството на Института по Растителни Науки, Берн, Швейцария и ИФР, БАН, България, 2006-2008. Координатор от швейцарска страна –Проф.Урс Феллер.

2. Участник в проект: **CC1503**- “Drought induced changes in the leaf proteins of wheat varieties differing in drought resistance”. Фонд „Научни изследвания”, Министерство на образованието и науката, България, 2005-2008.



Биляна Стоилова Григорова е родена на **23 октомври 1972 г.** в гр. **София**.

Средно образование: 1986-1990 г.

Национална Природо Математическа Гимназия „Акад.Л.Чакалов”, София
Специалност Биотехнология

Висше образование: 1990-1995 г.

Биологически Факултет на Софийски Университет „Св.Климент Охридски”, София
Магистър Биотехнолог със специализация „Генно и Клетъчно Инженерство”

Септември 2006 – досега

Докторант в секция „Молекулярна Биология на Растителния Стрес”, ИФРГ, БАН