

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И
ГЕНЕТИКА

ВЕСЕЛИН АТАНАСОВ СТОЙЧЕВ

БЕЛТЪЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ ЗАБЛАТЯВАНЕ НА
БЯЛА (*TRIFOLIUM REPENS* L.) И ЧЕРВЕНА
(*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ДЕТЕЛИНА

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

Научна специалност:

01-06-10 – Биохимия

София, 2015

Дисертацията е написана на 115 страници и включва 22 фигури и 4 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 169 източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Разширен Научен Съвет на секция „Молекулярна биология на растителния стрес“ при Института по физиология на растенията и генетика – БАН, заповед № 424/13.05.2015 проведено на 29.05.2015 г.

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 Университета в Кордоба, Испания – UCO, протеомно звено SCAI, член на протеомната мрежа Carlos III-ProteoRed-ISCI.

Често от работата по дисертационния труд е проведена благодарение на финансовата подкрепа на Проект BG051PO001-3.3-05/0001 по схема “Наука-бизнес”, финансирана от Оперативна програма “Развитие на човешките ресурси”.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2015 год. отчаса на открито заседание на жури, избрано от научния съвет на Института по физиология на растенията и генетика – БАН с протокол № 1/25.06.2015 и утвърдено със Заповед № 534/23.06.2015 на Директора на Института по физиология на растенията и генетика – БАН.

Материали 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**

Веселин Атанасов Стойчев

**БЕЛТЪЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ ЗАБЛАТЯВАНЕ НА
БЯЛА (*TRIFOLIUM REPENS* L.) И ЧЕРВЕНА
(*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ДЕТЕЛИНА**

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

Научен ръководител:
проф. дбн. Климентина Демиревска

Консултант:
доц. д-р Людмила Симова-Стоилова

Рецензенти:
проф. д-р Мариела Оджакова
доц. д-р Лиляна Гигова

Научна специалност:
01-06-10 – Биохимия

София, 2015 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ABA – абсцисова киселина
RLS - Рубиско голяма субединица
RSS - Рубиско малка субединица
Asp – аспартат
АФК– активни форми на кислорода.
SOD – супер оксид дисмутаза
ЕТС – електрон-транспортни вериги
АДХ – алкохол дехидрогеназа
ФСІ – фотосистема първа
ФСІІ – фотосистема втора
NPQ – нефотохимично гасене
мРНК – матрична РНК
ПА – почвен азот
РСТ - Рубиско съдържащи телца
ССВ - свързани със стареенето вакуоли
SA – салицилова киселина
АК – аминокиселини
NPN – небелтъчен азот
РРО – поли фенол оксидаза
ПСВ – протеин складираща вакуола
ПКС– програмирана клетъчна смърт
N – азот
C – въглерод
ПИ - протеазни инхибитори

УВОД

Проблемите пред изхранването на човечеството са пряко свързани с влошаващите се условия за селското стопанство. Масовата индустриализация и урбанизация доведоха до дисбаланс на климатичните явления свързани с продължителни периоди на засушавания и наводнения с остатъчни заблатявания на огромни масиви от обработваеми площи. Най-засегнати от преовладяване са тревистите фуражи - основни както за зърнопроизводството, така и за животновъдството. За да преживеят стреса растенията преустановяват натрупването на суха маса, променят и редуцират синтеза на белтъци до нива нужни само за поддържане на жизнените им функции. Много от функционалните и запасните белтъци биват разграждани като източници на енергия и свободни аминокиселини за синтез на други необходими белтъци. Наблюдава се сериозен спад на общото белтъчно съдържание, а от там и на хранителната стойност на фуражите. Детелините (*Trifolium*) са род с около 300 вида, принадлежащи към семейство бобови (*Fabaceae*). Имат космополитно разпространение и проявяват многообразие в гено- и фено- типове. По съдържание на усвояеми протеини, детелините са на водещи позиции по хранителна стойност сред тревните фуражи. От тях, най-широко застъпени са бялата (*Trifolium repens*) и червената (*Trifolium pratense*) детелина. Липсата на информация за въздействието на заблатяването върху надземната част на детелинови растения ни подтикна към задълбоченото сравнително изследване на бели и червени детелини на биохимично, молекулярно, физиологично и морфологично ниво. Заблатяването беше приложено върху два сорта бели детелини и един сорт червена детелина. Основната цел на молекулярното и биохимичното изследване беше установяването на белтъчните профили и тяхната динамика в условия на стрес и след периода на възстановяване. Изясняването на белтъчните промени и сравняването на различни сортове фуражни растения в условия на стрес и възстановяване има както фундаментален принос за изясняване на динамиката на метаболизма, така и чисто практическо приложение за селското стопанство и оптимизиране насажденията на терените, застрашени от заблатяване.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация беше изследването на основните белтъчни промени в листа на бяла (*Trifolium repens* L.) и червена (*Trifolium pratense* L.) детелина, възникнали вследствие заблätяване и последващо възстановяване. За постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

Задача 1 - Разработване подходяща опитна постановка на заблätяване и последващо възстановяване върху почвени култури бяла и червена детелини в контролируеми условия. Проследяване интензивността на стреса по морфологични и биохимични показатели на контролни и стресирани растения - дължина на стъблото, листна площ, воден статус, пигментно и белтъчно съдържание в листата.

Задача 2 - Определяне хлорофилната флуоресценция с оглед установяване на промените на фотосинтетичните параметри в листата на изследваните растения в резултат на приложения стрес и при възстановяване.

Задача 3 - Характеризиране на главните протеазни активности в листата на контролни, заблатени и възстановени растения - определяне на общата протеолитична активност и визуализиране на някои протеази след SDS-PAGE.

Задача 4 - Изследване на белтъчните профили в листата на контролни, заблатени и възстановени растения чрез едномерна и двумерна електрофорези.

Задача 5 - Идентифициране на белтъци от интерес, повлияни от приложения стрес, посредством имуноблотинг, мас-спектрометрия и търсене в бази данни.

Предметът на настоящата дисертация е в синхрон с Националния и Европейски приоритет за устойчиво земеделие, а получените резултати са включени в научни статии. Информацията относно динамиката на белтъчното съдържание (например на Цитохром b6/f комплекса и визуализираните чрез анти-РА поликлонални антитела ивици с относителна маса около 110 kDa), както и за общата протеолитична активност (която се увеличава в пъти повече при заблатени червени в сравнение с бели детелини), могат да се използват като маркери за устойчивост към този вид стрес. Информацията би била полезна за селекционерите, чиято дейност е свързана със сравнителна оценка и селекция на стресоустойчиви сортове. По този начин резултатите биха намерили бъдещо практическо приложение.

ОПИТНА ПОСТАНОВКА И ОТГЛЕЖДАНЕ НА РАСТЕНИЯТА

Обект на изследване на настоящата работа бяха детелинови растения от един среднолистен сорт червена детелина (*Trifolium pratense* L, сорт “Старт”) и два сорта бяла детелина (*Trifolium repens* L, среднолистен сорт “Хайфа” и дребнолистен сорт „Дебют”). Семената им бяха накиснати във вода за 2 часа, след което бяха поставени за прорастване върху навлажнена филтърна хартия за период от 3 дни на тъмно в термостат при температура 25 °C. След покълване на растенията до 2.5 – 3.0 см, те бяха посадени и отглеждани в съдове съдържащи 500g почва (с рН 6.5; електропроводимост 470 $\mu\text{S}/\text{cm}$; плътност $\rho \approx 0.45$; органична материя 25%; суха материя 35%) при 25/21 °C дневна/нощна температура, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ фотосинтетично активна светлина и 16 часов фотопериод. Водното съдържание в съдовете беше поддържано всекидневно до относителна влажност на почвата 65% от максималното ѝ водозадържане измерено гравитометрично. Във всеки съд бяха отглеждани по шест растения. За всеки тип и фаза на третиране и съответстващите им контроли бяха разпределени по двадесет съда. Заблацияването беше започнато при растения на възраст 21 дни след посадване, с напълно развит първи трилистен лист (трилистник) и продължи 14 дни, с последващ период на възстановяване от 21 дни (Фиг. 1)



Фиг. 1. Експериментална схема на почвено заблацияване на един сорт червена детелина (*Trifolium pratense* L, сорт “Старт”) и два сорта бяла детелина (*Trifolium repens* L, сорт “Хайфа” и сорт „Дебют”). Заблацияването започна на етап 21 дни след посадване на растенията, продължи 14 дни, а възстановителния период беше с продължителност 21 дни.

ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ

1. Измерване на дължина на стъблото и листна площ;
2. Определяне на относително сухо тегло на листната материя съгласно Barts и Watherley (1962);
3. Определяне на пигментно съдържание по протокола на Ni et al., (2009);
4. Определяне на хлорофилна флуоресценция чрез FMS флуориметър (Hansatech Instruments, Norfolk, UK);
5. Определяне на количеството на разтворимите листни белтъци по метода на Bradford (1976);
6. Разделяне на разтворими листни белтъци чрез едномерна 12% SDS-PAGE в система Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad) съгласно Laemmli (1970);
7. Имуноблот анализи, използвайки Trans Blot система (Bio-Rad) по метода описан от Mitsuhashi и Feller (1992) и с първични антитела (продуцирани от заек) срещу Рубиско (RLS и RSS), RA, RBP, ClpA и ClpP (Demirevska et al. 2008a);

8. Определяне на общата протеолитична активност на листен екстракт, използвайки азоказеин като субстрат, както описват Fisher и Feller (1993);
9. Визуализиране на протеазите след електрофоретичното им разделяне в 10% PAGE съдържащ желатин съгласно Beyene et al. (2006);
10. Провеждане на двумерна SDS-PAGE съгласно модифицираните протоколи на Wang et al., (2006) и Maldonado et al., (2008);
11. Провеждане на MALDI-TOF/TOF MS идентификация на белтъци от петна избрани на базата на PDQuest™ 2-D софтуерен анализ (Bio-Rad). В процеса бяха използвани ProPic установка (Genomic Solutions, UK); ProPrep II установка (Digilab Genomic Solutions Inc., UK); μ C-18 ZipTip колони (Millipore); MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) мас спектрометър m/z обхвата 800 - 4000, с ускорителен волтаж 20 kV. За белтъчната идентификация беше ползвана програмата Mascot 2.0 (Matrix Science Ltd., London) и софтуера GPS Explorer™ v3.5 (Applied Biosystems), и търсене в пълните бази данни на NCBI и Uniprot. Описание на биологичните им функции беше направено съгласно Bevan et al. (1998). За предпологане на най-вероятната им вътреклетъчна локализация беше използван софтуерът WoLF PSORT (National Institute of Advanced Science and Technology, Japan) съгласно (Horton et al. 2007).

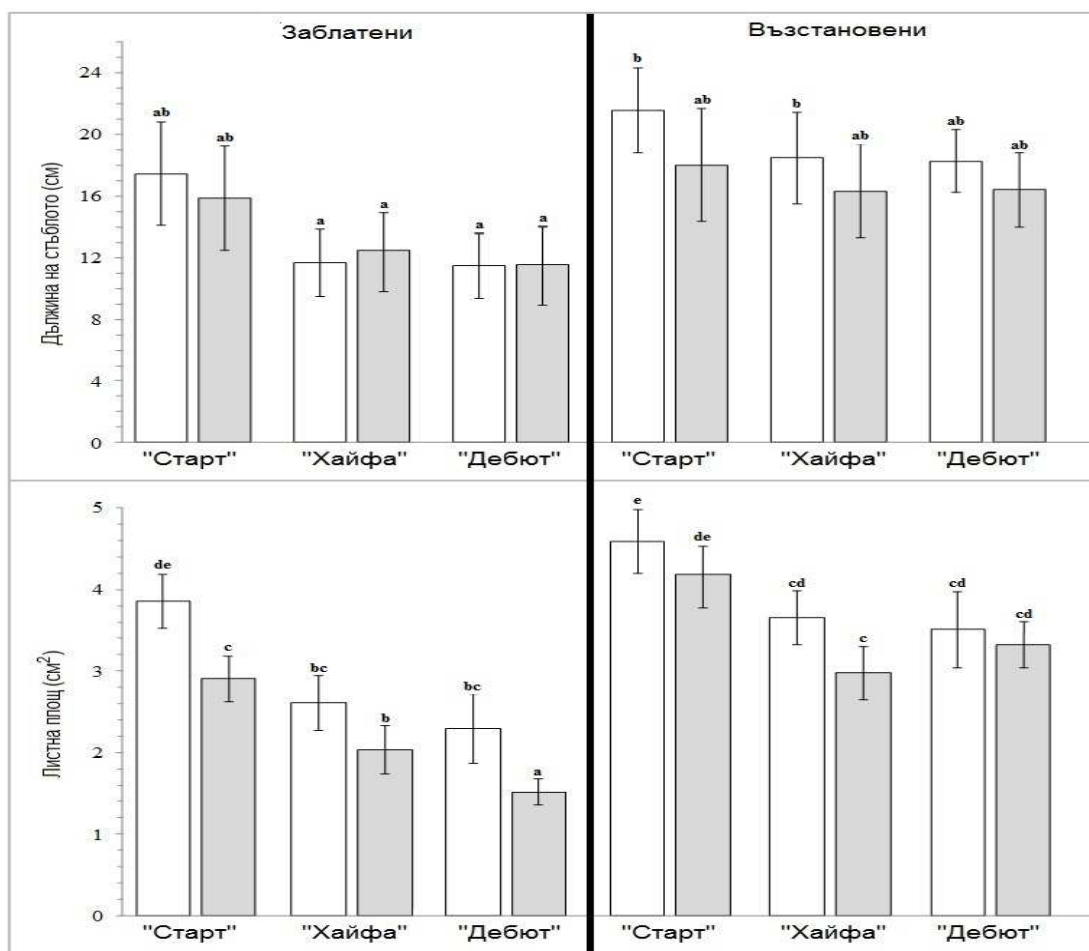
СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Растежните параметри, водното съдържание, общо белтъчно съдържание и пигментно съдържание, както и азоказеинолитичната активност бяха получени от усредняването на три технически повторения от по три независими експеримента и подложени на мултифакторен ANOVA анализ (MSTAT-C). Средните стойности бяха разделени като група чрез Duncan's Multiple Range Test при достоверна разлика $P \leq 0.05$. Стандартните отклонения са отбелязани чрез вертикални чертички. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$. В табличните данни, стандартното отклонение е представено с $\pm$. SDS-PAGE разделянето, имуноблотове, визуализирането на протеазната активност в гелове бяха повторени три пъти, а получените резултати бяха подобни. На фигурите са показани представителни изображения. Бяха проведени две електрофоретични разделяния чрез Додека PROTEAN® Plus Cell (Bio-Rad) (2x10 плаки) и са приложени представителни изображения на гелове.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Биометрични показатели

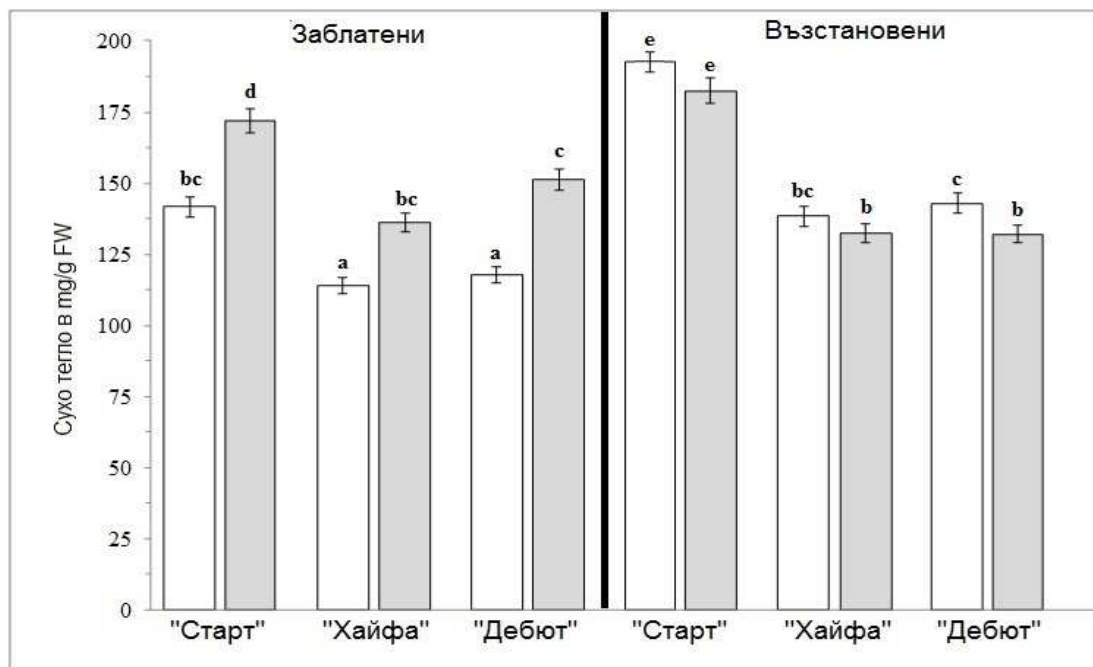
На Фиг. 2 се вижда незначително намаляване на дължината на стъблото при заблатена червена детелина сорт „Старт“ с 8.5%, докато при сравнение между контролни и стресирани растения този параметър при двата сорта бяла детелина “Хайфа” и “Дебют” остава почти без промяна (едва 3.2% и 1.1%). По отношение на листната площ заблацияването оказва по-силен стрес и беше наблюдавано изоставане и при трите сорта детелини. След периода на възстановяване се установи слабо изоставане в дължината на стъблото при всички третиранни растения, както и изоставане по отношение на листната площ при сортове „Старт“ и „Хайфа“.



Фиг. 2. Дължина на стъблото и листна площ на червена (*Trifolium pratense* L., сорт “Старт”) и бяла (*Trifolium repens* L., сортове “Хайфа” и “Дебют”) детелина, при контролни (бели колонки) и стресови (сиви колонки) условия. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения от измерване на по 20 растения от три независими експеримента. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$

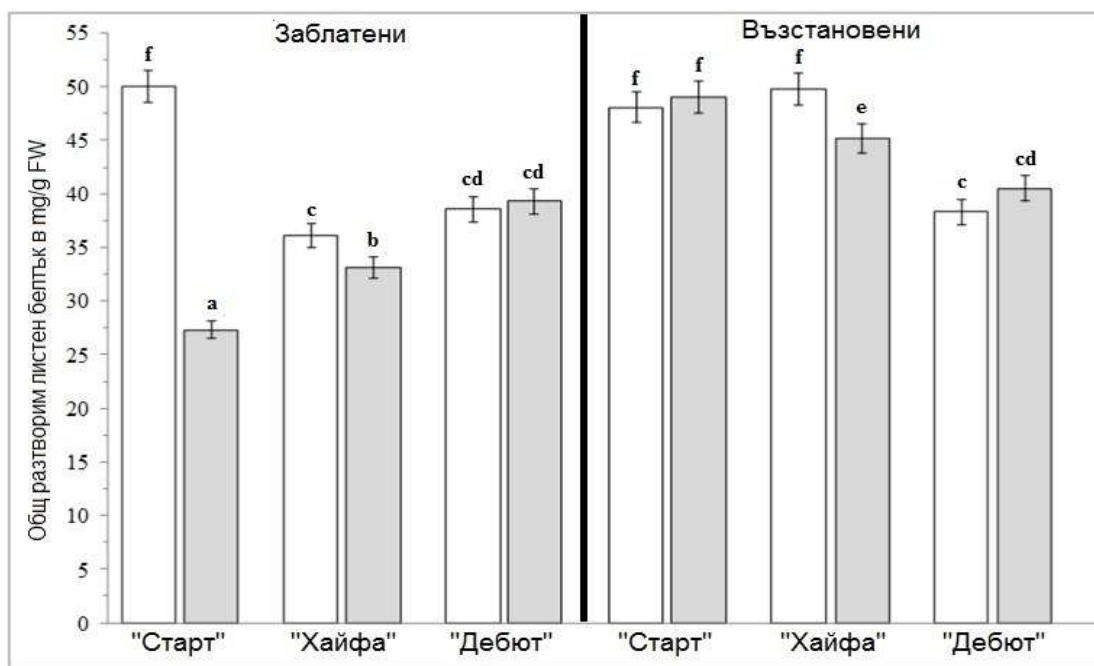
Сухо тегло и общ разтворим листен белтък

Повишаване на сухата маса на листата също беше установено при всички заблатени растения (Фиг. 3). Разликите между контролни и третирані растения варираха в границите 19.5% - 28.4%, а между контролни и възстановени в границите 4.2% - 7.6%.



Фиг. 3. Относително сухо тегло на листната материя на червена (*Trifolium pratense* L., сорт „Старт“) и бяла (*Trifolium repens* L., сортове „Хайфа“ и „Дебют“) детелина, при контролни (бели колонки) и стресови (сиви колонки) условия. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$

Вследствие заблатяването беше наблюдавано двукратно намаляване на общите разтворими белтъци в листата на червената детелина сорт „Старт“, а от двата сорта бели детелини, само при сорт „Хайфа“ бяха доказани различия между контролни и третирані растения (Фиг. 4). След периода на възстановяване нивата на общ разтворим белтък в листата на третирані и контролни растения бяха приблизително изравнени.



Фиг. 4. Общ разтворим листен белтък на червена (*Trifolium pratense* L., сорт „Старт“) и бяла (*Trifolium repens* L., сортове „Хайфа“ и „Дебют“) детелина, при контролни (бели колонки) и стресови (сиви колонки) условия. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения от три повторения, получени от три независими експеримента. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$.

Установеното от нас завишаване на сухото тегло на листата (Фиг. 3) на заблатените растения може да е свързано с променения воден баланс и предизвиканото вторично вътреклетъчно засушаване, вследствие намалената пропускливост на кореновите клетки. Множество автори доказват, че заблатяването води до повишена протеолитична активност (Feller et al. 2008; Bailey-Serres and Voesenek 2008) свързана с отстраняването и рециклирането на увредени и/или ненужни белтъци. При създадената експериментална постановка общото съдържание на разтворим листен белтък (Фиг. 4) беше най-негативно повлияно при заблатените червени детелини сорт „Старт“, което корелира с най-изявените промени наблюдавани в белтъчния им профил установени чрез SDS-PAGE електрофорези (Фиг. 8). В предишни изследвания Vaseva et al. (2012) откриват, че *Trifolium repens*, сортове „Хайфа“ и „Дебют“ са по-толерантни и към засушаване, което предполага, че промените в количеството на общия разтворим белтък и в белтъчните профили са важен индикатор за устойчивостта на белите детелини спрямо този стрес. Въз основа на нашите резултати и тези получени от Vaseva et al. (2012), може да се заключи, че както при преоводняване, така и при недостиг на вода, двата сорта бели детелини са по-устойчиви от червената детелина сорт „Старт“. Детайлното анализиране на белтъчните профили на сортове „Старт“ и „Хайфа“ посредством 2-DE PAGE, дадоха възможност да се проследи динамиката на белтъчните им профили по време на заблатяване и възстановяване и бяха установени количествено най-силно засегнатите от стреса белтъци и тяхната индивидуална динамика.

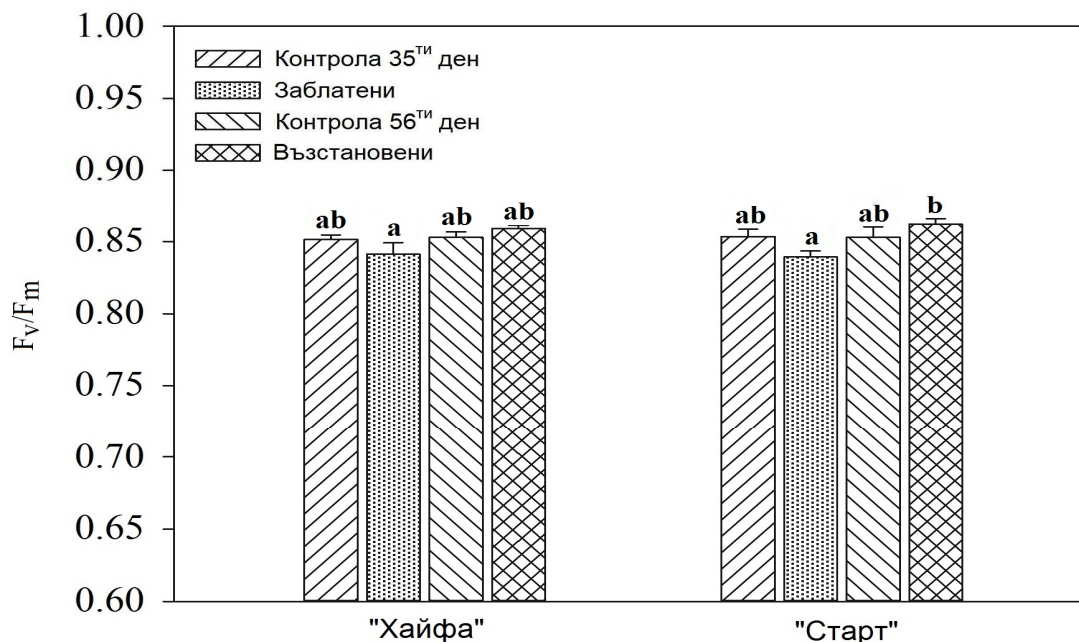
Общо пигментно съдържание и фотосинтетична ефективност на сорт „Старт“ и сорт „Хайфа“

В резултат на стреса беше наблюдаван съществен спад в общото съдържание на каротеноиди и хлорофил *a/b* пресметнати на база свежа листна маса. След възстановителния период, съдържанието на пигменти в сорт „Хайфа“ се възвърна до контролните нива, но при сорт „Старт“ разликите бяха запазени в известни граници (Таблица 1). Наблюдаваните промени в листната площ и водно съдържание, количеството общ разтворим листен белтък и пигменти в двата сорта потвърдиха, че надземната част на растенията страда в различна степен от заблацияването на почвата. Подобни промени в листа вследствие заблацияване са описани в соя (Zhou et al. 2012) и папуда (Kumar et al. 2013). Относителното водно съдържание в листата леко намаля, най-вероятно поради влошен воден транспорт до листната тъкан (Aroca et al. 2012). След 14-дневно заблацияване, намалената листна площ и в двата сорта е ясен показател за причиненото редуциране на растежа на листата. Спадът на хлорофил *a/b* и общото съдържание на каротеноиди беше по-изразено при червената детелина, а възстановяването достигна едва до 80% от стойностите на контролните растения. В бялата детелина, спадът беше по-малък, а възстановяването пълно. Тези наблюдения са в пълно съответствие с вече получените резултати, показващи различия в чувствителността към заблацияване на червената и бялата детелини (Simova-Stoilova et al. 2012). Очаквано, намаленото количество фотосинтетични пигменти в условия на стрес е в синхрон с установеното чрез 2-DE анализи намаление на белтъци, свързани с фотосинтезата (Фиг. 12,13,14,15 и Таблица 2,3,4). Базирайки се на тези резултати, може да се направи извода, че те са взаимно подкрепящи се, а адаптирането на фотосинтетичния апарат към стреса води до каскада от промени както в белтъчните, така и в свързаните с тях небелтъчни структури, каквито са пигментите.

Листна площ; листно водно съдържание; разтворими листни белтъци и листни пигменти на контролни, стресирани и възстановени растения																
	<i>T. pratense</i> сорт Старт								<i>T. repens</i> сорт Хайфа							
Възраст на растението	35 ^{ти} ден				56 ^{ти} ден				35 ^{ти} ден				56 ^{ти} ден			
Състояние	Контрола		Заблатени		Контрола		Възстановени		Контрола		Заблатени		Контрола		Възстановени	
Листна площ (cm ²)	3.85de	± 0.33	2.9bc	± 0.28	4.59e	± 0.39	4.18de	± 0.6	2.29b	± 0.34	1.51a	± 0.3	3.58cd	± 0.33	3.31cd	± 0.97
Листно водно съдържание в %	86.8a	± 2.6	82.4a	± 10.4	82.3a	± 1.1	83.2a	± 4	88.4a	± 6.1	82.5a	± 12.6	88.1a	± 9.1	87.1a	± 9.5
Разтворими листни белтъци mg/g FW	50.02d	± 2.1	27.33a	± 0.6	48.07d	± 1.3	49.04d	± 1.4	36.11bc	± 0.9	33.18b	± 1.1	49.78d	± 2.3	45.14cd	± 1.8
Хлорофил <i>a</i> mg/g FW	0.131c	± 0.009	0.086a	± 0.016	0.184d	± 0.017	0.153d	± 0.014	0.1ab	± 0.015	0.084a	± 0.006	0.121bc	± 0.005	0.131c	± 0.008
Хлорофил <i>b</i> mg/g FW	0.049b	± 0.006	0.032a	± 0.006	0.075c	± 0.009	0.062c	± 0.007	0.043ab	± 0.020	0.037ab	± 0.008	0.049b	± 0.001	0.054c	± 0.004
Хлорофил <i>a+b</i> mg/g FW	0.182b	± 0.015	0.12a	± 0.022	0.262c	± 0.026	0.217bc	± 0.021	0.145ab	± 0.035	0.122a	± 0.015	0.171b	± 0.007	0.187bc	± 0.012
Общи каротеноиди C _(x+c) mg/g FW	0.035c	± 0.002	0.025ab	± 0.004	0.049de	± 0.003	0.04cd	± 0.003	0.026ab	± 0.003	0.021a	± 0.000	0.031c	± 0.001	0.031c	± 0.004

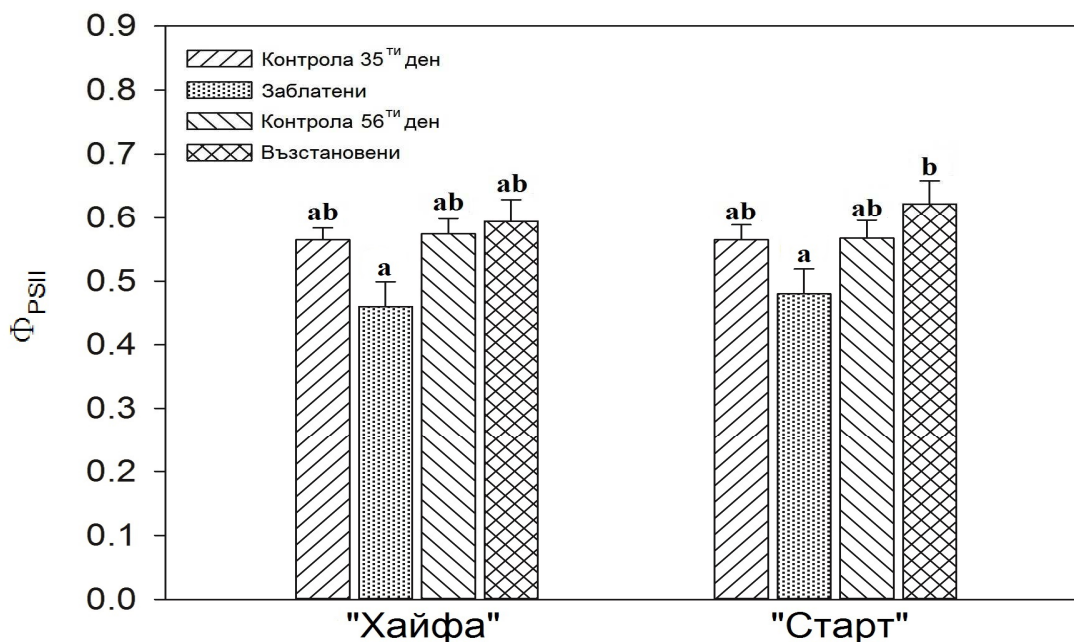
Таблица 1. Листна площ; водно съдържание в листата; общ разтворим листен белтък и листни пигменти на контролни, стресирани и възстановени растения сорт “Старт” (*Trifolium pratense* L.) и сорт “Хайфа” (*Trifolium repens* L.) ± стойностите представляват стандартните отклонения от измерване на по 20 растения от три независими експеримента Различните букви след стойностите показват статистическата разлика между групите при P < 0.05

Измерената максимална ефективност на ФСII (отношението вариабилна към максимална хлорофилна флуоресценция на тъмнинно адаптирани листа, F_v/F_m) на контролни, заблатени и възстановени растения (Фиг. 5) показва незначително влияние на заблатяването върху този параметър. Статистически доказуема разлика има само при възстановени растения сорт „Старт“, като 21 дни след премахване на заблатяването, възстановяването на фотосинтетичния апарат на растенията е пълно. По отношение на този параметър, ФСII показва пълно възстановяване от претърпения стрес.



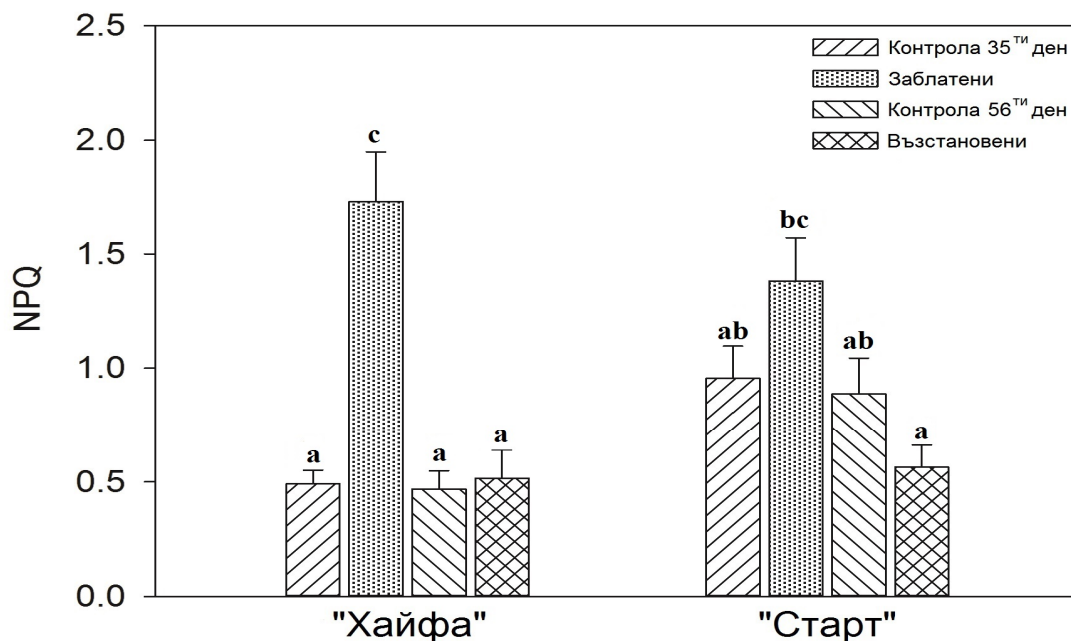
Фиг. 5. Максимална ефективност на ФСII (F_v/F_m) (отношението вариабилна към максимална хлорофилна флуоресценция) на (контролни, заблатени и възстановени) растения. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения от три повторения, получени от три независими експеримента. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$.

Измерената квантова ефективност на фотохимията на ФСII на контролни, заблатени и възстановени растения (Фиг. 6) показва слабо изразени разлики между заблатени и контролни растения, но статистически достоверна разлика има само между заблатени и възстановени растения от сорт „Старт“. Този параметър е показателен за нивото на CO_2 асимилацията, с който има добра корелация.



Фиг. 6. Квантова ефективност на фотохимията на ФСII на контролни, заблатени и възстановени растения. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения от три повторения, получени от три независими експеримента. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$

При изследване на нефотохимичното гасене (NPQ) на флуоресценцията се наблюдава значителното му повишение при стресираните растения. По този начин светлинната енергия, която не се оползотворява във фотосинтезата се отделя като топлина, а това се явява базов защитен механизъм при растения подложени на светлинен стрес. След възстановяване този параметър достига контролните нива (Фиг. 7).

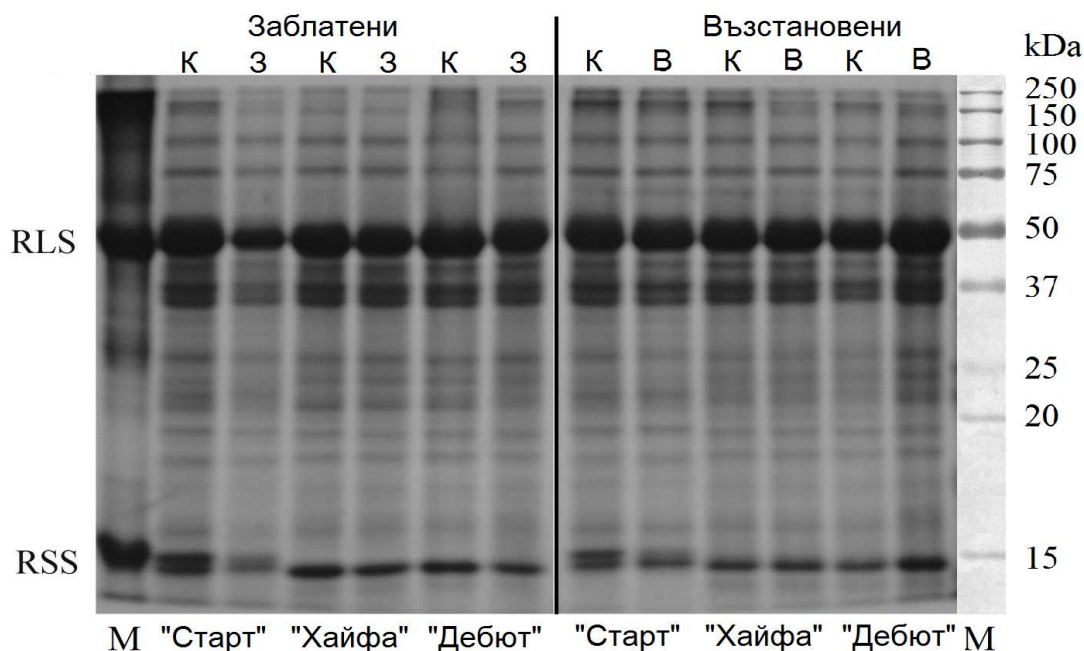


Фиг. 7. Нефотохимичното гасене на флуоресценцията на (контролни, заблатени и възстановени) растения. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения от три повторения, получени от три независими експеримента. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$

Фотосинтезата е един от най-чувствителните към абиотичен стрес процеси, а при тежки условия, фотосинтезиращите белтъци са съществено засегнати, особено в чувствителни видове/сортове (Bocian et al. 2011; Zadražnik et al. 2013; Demirevska et al. 2008a/b). Негативното влияние на стреса заблътяване върху скоростта на фотосинтезата е анализирано в различни научни доклади, като е установено, че основно засегната е фотосистема II (Ahmed et al. 2006; Pocięcha et al. 2008; Zheng et al. 2009). Нашите изследвания върху параметрите на фотосинтезата показаха, че стресът не оказва значимо влияние върху максималната (F_v/F_m) и действителната (ФПСII) ефективност на ФСII и при двата сорта. Въпреки това, нефотохимичното гасене (NPQ) нарасна значително при заблатените бели детелини, което е знак за по-добро разсейване на излишната фотонна енергия от хлорофил *a*. Тези резултати потвърждават по-високата пластичност на растенията от сорт „Хайфа“, което предполага, че те имат по-голям капацитет да тушират възникналите при абиотичен стрес фотоувреждания. Белтъците D1 и D2 от ФСII са най-застрашени по време на стрес, особено при преосветеност или повишена температура (Sainz et al. 2010), но при нашите експерименти не бяха идентифицирани. Въпреки, че ФСII не беше сериозно засегната от заблътяването, голяма част от уловената светлина беше разпиляна чрез нефотохимичен механизъм. Пълното възстановяване на хлорофилната флуоресценция показва че функциите на ФСII са били по-скоро адаптирани към стреса отколкото тя да е пострадала структурно.

Белтъчни профили установени чрез едномерна SDS-PAGE електрофореза и имуноблотинг за идентифициране на някои белтъци от интерес.

Пробите от стресираните растения *Trifolium pratense* се отличаваха от останалите по това, че показваха съществено намалена интензивност на ивиците съответстващи на RLS и RSS (Фиг. 8), както и, че само при червените детелини (контролни и заблатени), SDS-PAGE електрофорезите показваха две близко разположени ивици на позиции съответстващи на RSS.

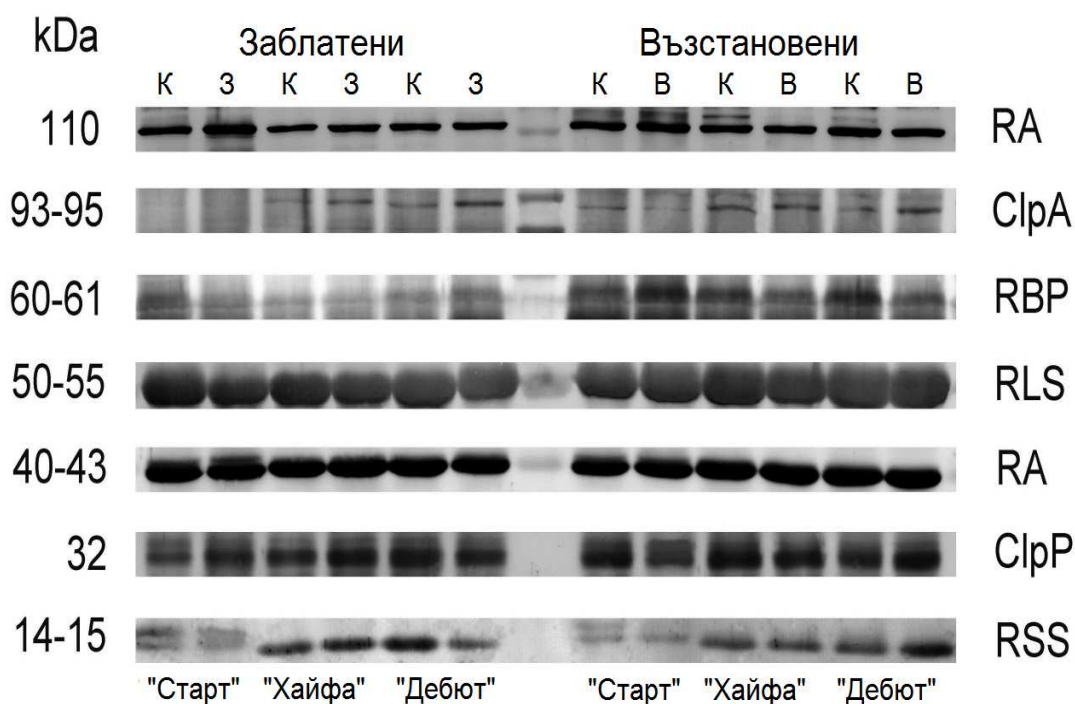


Фиг. 8. Профил на общ разтворим листен белтък на червена (*Trifolium pratense* L., сорт „Старт“) и бяла (*Trifolium repens* L., сортове „Хайфа“ и „Дебют“) детелина, чрез 12% SDS-PAGE при контролни (К), заблатени (З) и възстановени (В) условия. В първата М стартова пътека е нанесен Рубиско маркер (RLS и RSS). Втората маркерна „М“ стартова пътека е молекулен маркер Precision Plus Protein Prestained Standards Dual Color (BIO-RAD). Във всяка линия са нанесени изравнени по белтъчно съдържание проби от 10 µg.

Множество експерименти доказват, че при различни абиотични стресове най-силно засегнатият белтък е голямата субединица на Рубиско (Kokubun et al. 2002; Demirevska et al. 2008a; Feller et al. 2008; Nakano et al. 2010; Vassileva et al. 2011). Получените от нас резултати и установената динамика на белтъчните профили са в съответствие с тези наблюдения. SDS-PAGE разделянето (Фиг. 8) и имуноблот анализите (Фиг. 9) също така потвърждават, че нивата на RLS в червената детелина сорт „Старт“ спадат в условията на заблатяване, докато при двата сорта бяла детелина не се повлияват съществено. Това може да се тълкува като индикация за по-висока толерантност на *Trifolium repens* спрямо този вид стрес.

Проведените имуноблотове потвърдиха, както наличието на тези две RSS ивици със слаб интензитет, така и две изоформи на RA при червените детелини (Фиг. 9). Като цяло нивата на RA (40–43 kDa) не бяха значимо повлияни от заблатяването и се запазиха непроменени след периода на възстановяване.

Заблацияването предизвика известно намаляване на количеството на RLS и RSS, както и на RBP в сорт „Старт“. Намалена интензивност на ивиците на RSS беше наблюдавана и при заблатена бяла детелина, дребнолистния сорт „Дебют“, но с изключение на сорт „Дебют“, при всички останали заблатени растения се наблюдаваше съществено повишаване на количеството на ClpP спрямо контролите. От друга страна, само ClpA беше леко повишена в сорт „Дебют“ след заблацияването. Сигналите за ClpA и ClpP намаляха след възстановяването на сорт „Старт“ и сорт „Хайфа“, но останаха устойчиво високи при сорт „Дебют“. В сорт „Старт“ заблацияването предизвика силно повишаване на 110 kDa ивица, която беше проявена чрез имуноблот и поликлонални антители срещу RA. Същите нива се запазиха и след периода на възстановяване.



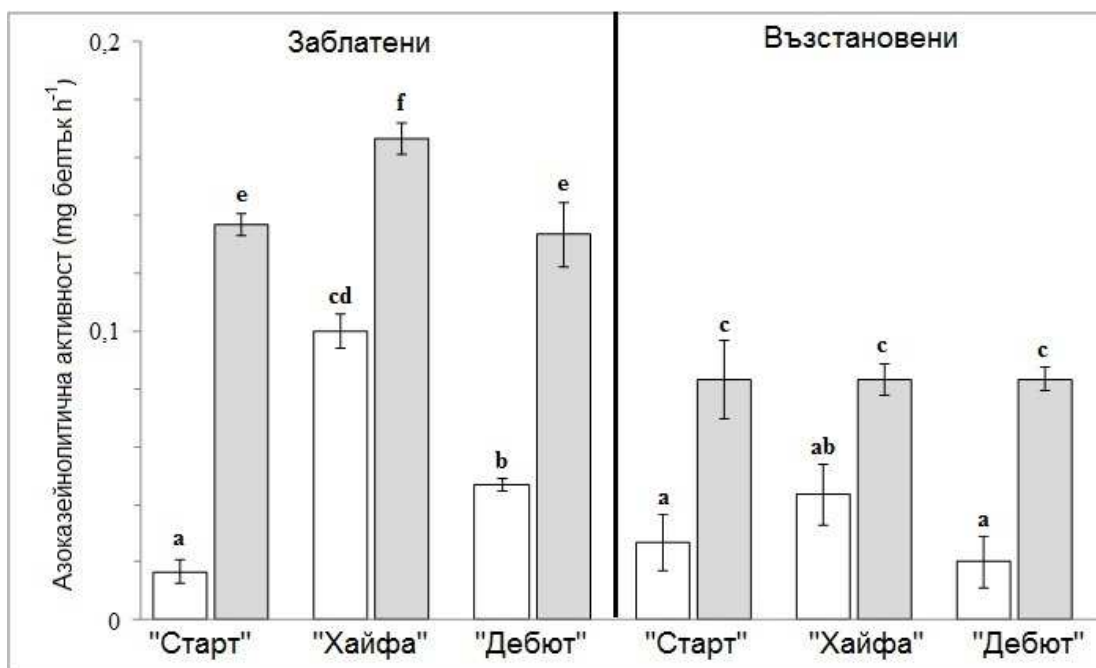
Фиг. 9. Имуноблотинг на белтъчни екстракти от червена (*Trifolium pratense* L., сорт „Старт“) и бяла (*Trifolium repens* L., сортове „Хайфа“ и „Дебют“) детелина, при контролни (К), заблатени (З) и възстановени (В) условия с поликлонални антители срещу RLS, RSS, RA, RBP, ClpA и ClpP. Във всяка линия са нанесени изравнени по белтъчно съдържание проби от 10 µg

Визуализираният завишен интензитет на ClpA имуносигналите при стресирани растения от двата сорта бяла детелина и завишеният интензитет на ClpP имуносигналите (Фиг. 9) в пробите от заблатени сорт „Старт“ и сорт „Хайфа“, показват промяна в пластидната Clp система и предполагат промени в пластидната АТФ-зависима протеолиза.

Силно повлияната в червена детелина, 110 kDa ивица, визуализирана чрез анти-RA поликлонални антители, може да послужи като допълнителен кандидат-маркер за нивото на стреса в този по-чувствителен сорт.

Обща протеолитична активност в екстракт на разтворими листни белтъци и визуализиране на протеазна активност в гелове съдържащи желатин.

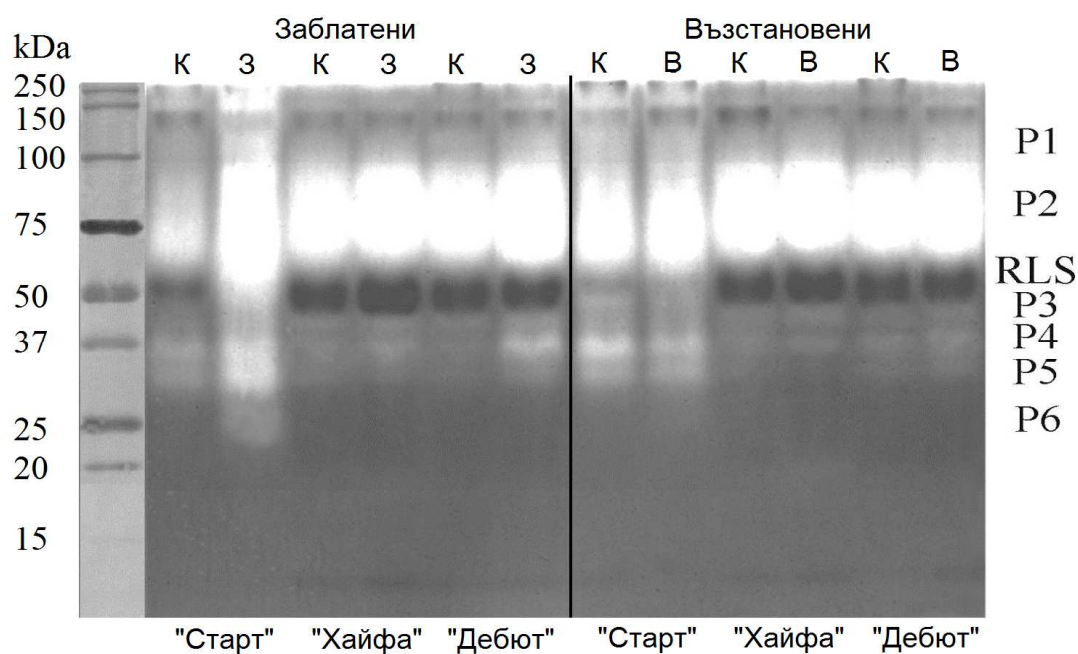
Общата азоказеинолитична активност в проби от заблатени растения беше увеличена от 1.7 пъти (сорт „Хайфа“) до 8.2 пъти (сорт „Старт“) (Фиг. 10). Всички възстановени растения проявяваха по-ниски нива на обща азоказеинолитична активност спрямо етапа на заблатяване, но по-високи спрямо съответстващите им възрастови контроли.



Фиг. 10. Азоказеинолитична активност на листен екстракт от червена (*Trifolium pratense* L., сорт "Старт") и бяла (*Trifolium repens* L., сортове "Хайфа" и "Дебют") детелина, при контролни (бели колонки) и стресови (сиви колонки) условия. Малките чертички в горната част на колонките, представляват стандартните отклонения. Различните букви над колоните показват статистически достоверна разлика между групите при $P < 0.05$.

Намаляването на нивата на някои ключови белтъци в условия на абиотичен стрес може да е в резултат и на автопротеолиза (освен на редуцирана *de novo* синтеза), за чиято инициация затрудненото хранене и транспорт между корените и надземната част са достатъчни сигнали. *Trifolium pratense*, сорт „Старт“ също така показва и по-ниски нива на RLS, който пък е основна мишена за рециклираща автопротеолиза в условията на азотен дисбаланс, чрез която могат да се усвояват вътремолекулни компоненти като хранителни източници (Feller 2004; Feller et al. 2008). Установеното повишаване на общата протеолитична активност в заблатени растения чрез използването на стандартен субстрат азоказеин показва, че и при трите сорта, заблатяването води до силно завишаване на протеолизата, но най-силен сигнал се получава за сорт „Старт“, докато в по-толерантните сортове бяла детелина („Хайфа“ и „Дебют“) се наблюдава по-ниска протеолитична активност (Фиг. 10).

След електрофоретичното разделяне на белтъците от листни проби чрез желатин съдържащи SDS PAGE при нередуциращи условия с pH 6.8 и последващото им оцветяване с Coomassie brilliant blue R-250 (Laemmli 1970), в сорт „Старт“ бяха проявени шест ивици с протеолитична активност (Фиг. 11). При белите детелини тези ивици бяха пет. Във всички проби беше проявена значителна протеолитична активност в зоната на белтъчната ивица P2 (с относителна молекулна маса 75 kDa). Заблатените червени детелини показаха най-високи протеолитични нива в зони P4 и P5. При тях единствено беше наблюдавана протеолитична активност и в зоната на ивица P6. При белите детелини заблатяването повлия най-съществено активността в ивица P4, като при вътрешна съпоставка между тях, тя беше по-висока при сорт „Дебют“. След периода на възстановяване на сорт „Старт“, протеолитичната активност в ивици P2, P3, P4 и P5 не показва различия, а в ивица P6 не беше наблюдавана активност. Възстановените от стреса и прилежащите им контролни 56-дневни растения показаха снижени нива на RLS. След възстановителния период белите детелини не демонстрират различия в протеолитичната активност между контролни и възстановени растения във всички проявени зони.



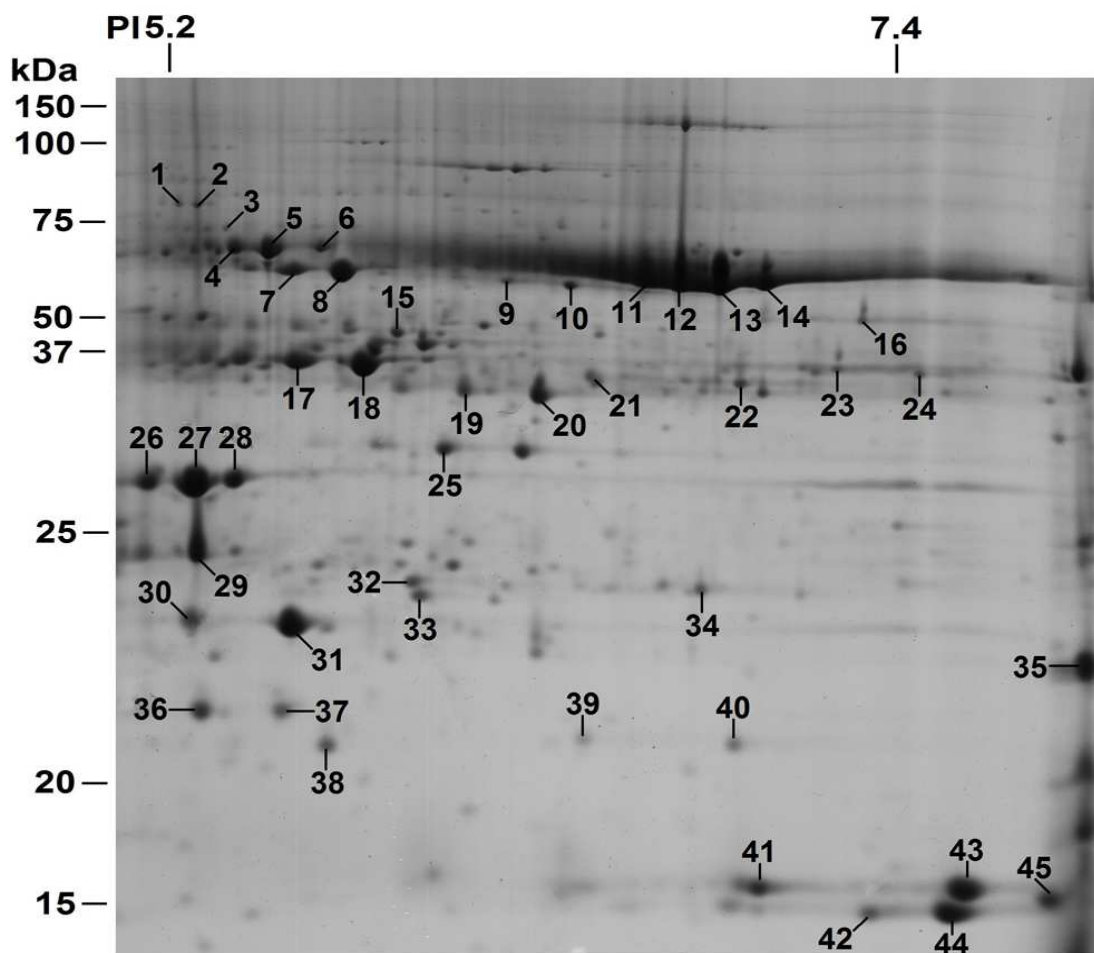
Фиг. 11. Оцветяване в гел, на протеолитичната активност на листен екстракт от червена (*Trifolium pratense* L., сорт „Старт“) и бяла (*Trifolium repens* L., сортове „Хайфа“ и „Дебют“) детелина, чрез 10 % SDS-PAGE съдържащ желатин при контролни (К), заблатени (З) и възстановени (В) условия. В първата стартова пътека е нанесен молекулен маркер Precision Plus Protein Prestained Standards Dual Color (BIO-RAD), а в останалите пътеки са нанесени изравнени по белтъчно съдържание проби от 10 µg

Проявяването на протеолитичната активност в SDS гел, съдържащ желатин като субстрат показва, че основната мишена на протеолизата в сорт „Старт“ е RLS. В предишни изследвания Vaseva et al. (2012) откриват, че *Trifolium repens*, сортове „Хайфа“ и „Дебют“ са по-толерантни и към засушаване, което предполага, че промените в количеството на общия разтворим белтък и в белтъчните профили са важен индикатор за устойчивостта на белите детелини спрямо този стрес. Въз основа на нашите резултати и тези получени от Vaseva et al. (2012), може да се

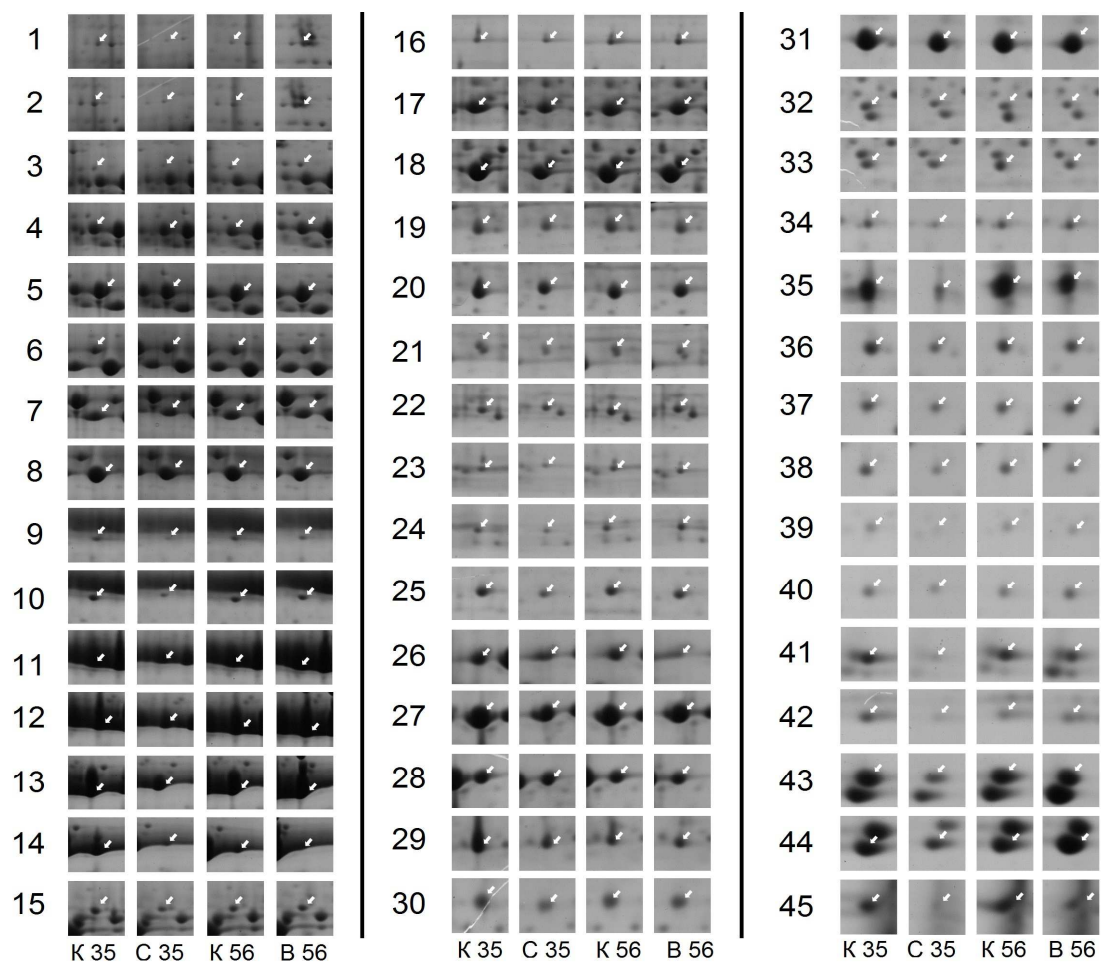
заклучи, че както при преоводняване, така и при недостиг на вода, двата сорта бели детелини са по-устойчиви от червената детелина сорт „Старт“.

2-DE SDS-PAG електрофоретично разделяне, оцветяване и софтуерно анализиране на разтворими листни белтъци от бяла (*Trifolium repens* L.) и червена (*Trifolium pratense* L.) детелина при контролни, заблатени и възстановени растения

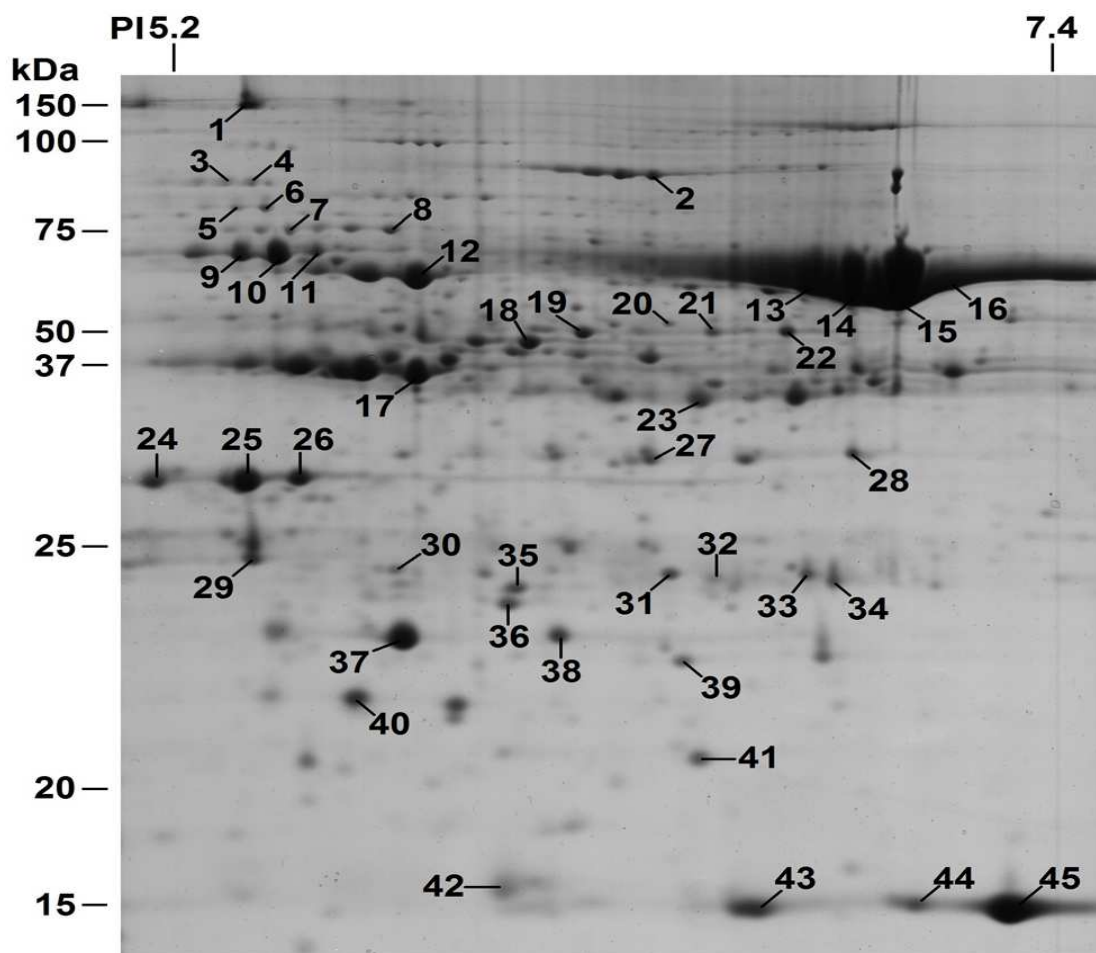
В гелове оцветени с колоидно комаси, чрез софтуера PDQuest™ (Bio-Rad) бяха възпроизводимо открити повече от 800 белтъчни петна. Въпреки някои различия в профилите на двата сорта детелини, разпределението на петната в геловите беше подобно. Изображенията на всички 2-DE гелове бяха анализирани в един експеримент. Общо 90 ясно изразени и добре разделени белтъчни петна (по 45 от сорт) с вариращ интензитет в условия на заблатяване и възстановяване бяха избрани за MALDI-TOF/TOF идентификация. Промените предизвикани от заблатяването и последващото го възстановяване в белтъчните профили на двата сорта детелина са представени на Фиг. 12,13,14 и 15.



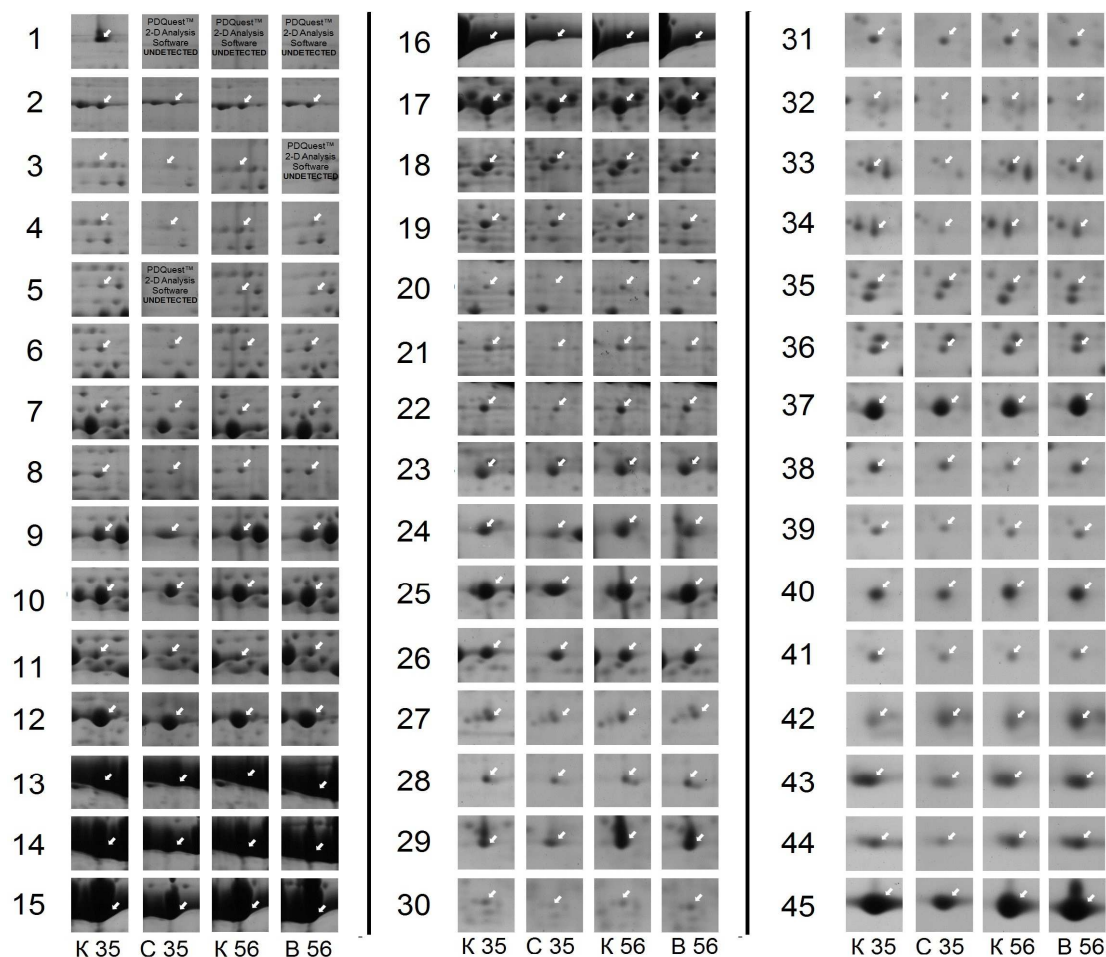
Фиг. 12. 2-DE белтъчен профил на екстракт от червена детелина (*Trifolium pratense* L. Сорт „Старт“). Белтъчна проба еквивалентна на 2000 µg белтъчно съдържание беше нанесена на IPG стрип (pH 5–8), а белтъчните петна бяха визуализирани чрез колоидно Комаси G-250. 45 различни петна бяха избрани за идентификация и номерирани на 2-DE гела



Фиг. 13. Сорт „Старт“. Четиридесет и петте избрани петна във всяка фаза: Контролни 35^{ти} ден (К 35), Стресирани 35^{ти} ден (С 35), Контролни 56^{ти} ден (К 56) и Възстановени 56^{ти} ден (В 56) са аранжирани в числов ред, по петнадесет петна в три колони. С бели стрелки е посочено съответното петно.



Фиг. 14. 2-DE белтъчен профил на екстракт от бяла детелина (*Trifolium repense* L. Сорт „Хайфа“). Белтъчна проба еквивалентна на 2000 μ g белтъчно съдържание беше нанесена на IPG стрип (pH 5–8), а белтъчните петна бяха визуализирани чрез колоидно Комаси G-250. 45 различни петна бяха избрани за идентификация и номерирани на 2-DE гела



Фиг. 15. Сорт „Хайфа“. Четиридесет и петте избрани петна във всяка фаза: Контролни 35ти ден (К 35), Стресирани 35ти ден (С 35), Контролни 56ти ден (К 56) и Възстановени 56ти ден (В 56) са аранжирани в числов ред, по петнадесет петна в три колони. С бели стрелки е посочено съответното петно.

От тези петна, 83 бяха успешно идентифицирани (Таблица 2 и 3), а 7 не показаха статистически достоверна идентификация спрямо базата данни и не бяха включени в анализите.

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини *T. pratense* сорт “Старт“

Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
Белтъци свързани със светлинната фаза на фотосинтезата и АТФ синтезата															
35	Photosystem I reaction center subunit II, putative	<i>Ricinus communis</i>	tr B9S408 B9S40	13	391	100	9.68/23.13	7.9/22.2	265	100	1867.53	201.33	2562.98	1585.22	Хлоропластен
32	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tr Q2V2R9 Q2V2R	2	49	6.743	5.62/23.85	6.0/24.0	41	98.8	241.83	127.79	176.12	132.15	Хлоропластен
33	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tr Q2V2R9 Q2V2R	3	186	100	5.62/23.85	6.0/23.7	172	100	281.04	201	306.33	197.89	Хлоропластен
26	Oxygen-evolving enhancer protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7ZVI4 G7ZVI	13	555	100	6.25/35.15	5.2/28.5	450	100	1002.34	726.23	768.25	179.25	Хлоропластен
27	Oxygen-evolving enhancer protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7ZVI4 G7ZVI	16	561	100	6.25/35.15	5.4/28.5	410	100	3596.73	1753.81	1081.07	2522.14	Хлоропластен
28	Oxygen evolving enhancer protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7K9H5 G7K9H	4	68	99.046	6.04/35.07	5.5/28.6	51	99.9	1086.69	986.84	428.44	832.77	Хлоропластен
30	Putative PSII-P protein (Fragment)	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PET1 Q2PET	12	621	100	7.12/28.41	5.4/23.2	516	100	517.85	291.14	451.01	388.5	Хлоропластен
31	Putative PSII-P protein (Fragment)	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PET1 Q2PET	14	570	100	7.12/28.41	5.7/23.1	436	100	2690.63	1812.7	2234.38	1061.02	Хлоропластен
40	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	<i>Medicago truncatula</i>	tr B7FGU7 B7FGU	6	366	100	7.56/24.34	6.9/20.8	326	100	167.1	69.61	136.92	188.46	Хлоропластен
4	ATP synthase subunit alpha	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R487 B8R48	18	489	100	5.15/55.73	5.5/66.9	345	100	603.52	452.06	606.58	630.66	Хлоропластен
5	ATP synthase subunit alpha	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R487 B8R48	20	660	100	5.15/55.73	5.6/66.3	488	100	1207.16	266.02	1156.55	1249.05	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. pratense</i> сорт “Старт“															
Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
6	ATP synthase subunit alpha	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R487 B8R48	20	549	100	5.15/55.73	5.7/66.5	386	100	381.27	285.44	440.75	270.2	Хлоропластен
7	ATP synthase subunit beta	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R4D1 B8R4D	21	969	100	5.36/53.27	5.7/60.8	767	100	591.46	28.78	458.55	555.24	Хлоропластен
8	ATP synthase subunit beta	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R4D1 B8R4D	21	960	100	5.36/53.27	5.8/60.4	759	100	524.12	185.37	218.29	618.75	Хлоропластен
Рубиско и белтъци свързани с него															
9	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)	<i>Lobelia zeylanica</i>	tr H1ADB8 H1ADB	14	253	100	6.28/48.41	6.3/57.6	156	100	126.11	55.38	170.88	88.01	Хлоропластен
11	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)	<i>Trifolium pratense</i>	tr G0WZP4 G0WZP	24	857	100	6.23/50.65	6.6/58.8	628	100	1615.72	1050.21	2466.67	2889.51	Хлоропластен
12	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R4D2 B8R4D	27	759	100	6.33/53.00	6.8/57.6	497	100	2463.45	720.95	2818.73	4040.26	Хлоропластен
13	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R4D2 B8R4D	26	898	100	6.33/53.00	6.9/57.3	649	100	2588.24	938.17	2435.92	3106.34	Хлоропластен
14	Ribulose bisphosphate carboxylase large subunit (Fragment)	<i>Trifolium burchellianum</i>	tr A2VAT5 A2VAT	24	621	100	6.13/51.96	7/59.5	392	100	1737.71	182.18	541.45	379.99	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. pratense</i> сорт “Старт“															
Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
41	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Medicago truncatula</i>	tr B7FMC2 B7FMC	5	175	100	8.73/20.38	7/15.8	146	100	783.6	81.12	674.67	522.63	Хлоропластен
42	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Trifolium repens</i>	sp P17673 RBS_T	4	59	90.674	8.86/20.25	7.3/15.0	36	95.4	433.66	51.52	136.13	188.45	Хлоропластен
43	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (Fragment)	<i>Pisum sativum</i>	tr Q9ZRI4 Q9ZRI	7	105	100	7.86/16.36	7.6/15.8	54	99.9	1648.59	504.47	2027.47	1715.15	Хлоропластен
44	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (Fragment)	<i>Medicago sativa</i>	tr Q945R2 Q945R	7	247	100	6.15/12.01	7.5/15	181	100	1281.59	470.19	1120.76	3887.54	Хлоропластен
45	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (Fragment)	<i>Pisum sativum</i>	tr Q9ZRI4 Q9ZRI	7	140	100	7.86/16.36	7.9/15.3	88	100	868.74	145.58	1617.62	506.05	Хлоропластен
3	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta	<i>Pisum sativum</i>	sp P08927 RUBB_	16	355	100	5.85/63.29	5.5/72.2	246	100	36.97	76.39	38.01	50.16	Хлоропластен
17	Rubisco activase (Fragment)	<i>Medicago sativa</i>	tr Q8GTY4 Q8GTY	13	522	100	5.63/30.17	5.7/36.3	419	100	280.93	698.99	1006.2	355.51	Хлоропластен
18	Rubisco activase (Fragment)	<i>Medicago sativa</i>	tr Q8GTY4 Q8GTY	12	295	100	5.63/30.17	5.9/35.6	201	100	1347.83	1041.4	1310.83	360.56	Хлоропластен
Други белтъци свързани с Калвиновия цикъл															
24	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	<i>Pisum sativum</i>	sp P12858 G3PA_	21	427	100	8.8/43.60	7.5/35.6	233	100	144.39	47.88	134.28	172.56	Хлоропластен
19	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PER4 Q2PER	23	866	100	6.86/43.23	6.2/34.2	616	100	429.8	260.82	429.6	353.56	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. pratense</i> сорт “Старт“															
Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
20	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PER4 Q2PER	22	858	100	6.86/43.23	6.4/33.6	627	100	338.53	592.41	789.99	706.8	Хлоропластен
34	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	<i>Pisum sativum</i>	tr Q8S4X2 Q8S4X	4	236	100	8.3/30.11	6.8/24.0	214	100	188.06	74.82	185.13	208.41	Хлоропластен
Белтъци свързани с аминокиселинния метаболизъм															
10	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sp Q9LR30 GGT1	8	314	100	6.49/53.78	6.5/56.8	278	100	280.22	68.35	221.95	180.64	Пероксизамен
15	Glutamine synthetase	<i>Medicago truncatula</i>	tr Q84UC1 Q84UC	13	239	100	6.29/47.38	6/43.1	147	100	224.37	107.4	140.19	158.93	Митохондриялен или хлоропластен
16	Alanine glyoxylate aminotransferase	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7J013 G7J01	16	721	100	6.62/44.12	7.3/50.4	583	100	109	84.07	174.28	143.43	Цитоплазмен
Белтъци свързани с протеолизата															
2	Putative zinc dependent protease	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PEV7 Q2PEV	23	302	100	5.48/75.41	5.4/79.4	122	100	71.89	18.29	33.01	49.59	Хлоропластен
Други белтъци															
21	Fructose-bisphosphate aldolase, isozyme 1	<i>Pisum sativum</i>	sp P46256 ALF1_	7	324	100	6.38/38.71	6.5/35.3	279	100	201.69	48.94	171.65	113.44	Цитоплазмен
22	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sp Q9SA52 CP41B	8	372	100	8.19/42.76	6.9/34.9	333	100	179.81	134.67	213.8	216.14	Хлоропластен
23	Putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase	<i>Glycine max</i>	tr Q84SM7 Q84SM	10	256	100	7.02/42.42	7.2/35.8	194	100	124.65	44.6	70.86	96.29	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. pratense</i> сорт “Старт“															
Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
36	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Lotus japonicus</i>	tr I3SRL0 I3SRL	3	63	96.535	4.92/20.41	5.4/21.4	46	99.6	532.47	182.82	410.34	331.07	Хлоропластен или цитоплазмен
37	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Lotus japonicus</i>	tr I3SRL0 I3SRL	3	77	99.859	4.92/20.41	5.7/21.4	59	99.9	297.87	152.86	240.68	298.84	Хлоропластен или цитоплазмен
38	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q6T624 Q6T62	6	394	100	5.79/20.76	5.8/20.6	343	100	266.33	91.64	216.1	136.53	Хлоропластен
Петна със статистически недостоверна идентификация															
1	NADH dehydrogenase subunit F (Fragment)	<i>Bromus japonicus</i>	tr Q49TR2 Q49TR	5	30	0	9.4/23.79	5.3/79.8	0	0	49.12	40.84	20.62	148.83	Митохондриален
25	Putative uncharacterize protein OSJNBa0014K0 8.1	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	tr Q5JKW6 Q5JKW	4	32	0	11.48/12.16	6.1/30.1	0	0	413.52	151.82	335.01	268.86	Хлоропластен
29	BON1-associated protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sp Q941L2 BAP1_	5	38	0	9.42/22.15	5.4/24.7	0	0	854.99	299.13	451.04	405.48	Ядрен
39	Maturase K (Fragment)	<i>Dampiera conospermoides</i>	tr H9NKH2 H9NKH	10	51	49.918	9.53/50.99	6.4/20.7	0	0	95.1	17.17	61.15	44.66	Ядрен

Таблица 2. Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини *Trifolium pratense* сорт “Старт“. За определяне на белтъчните количества беше използван софтуерът PDQuest™ 2-D Analysis и генерираният от него относителен параметър Количествена оптична плътност * площта на всяко петно

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. repens</i> “Хайфа“															
Петн о №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифицира н по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 [™] ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 [™] ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 [™] ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 [™] ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
Белтъци свързани със светлинната фаза на фотосинтезата и АТФ синтезата															
1	Chloroplast chlorophyll a/b binding protein	<i>Pisum sativum</i>	tr A3F6K2 A3F6K	8	482	100	5.47/28.42	5.4/142.4	426	100	165.01	N/A	N/A	N/A	Хлоропластен
29	Chlorophyll a/b binding protein	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q6T705 Q6T70	6	444	100	5.47/28.29	5.4/24.7	408	100	284.74	211.62	110.98	665.72	Хлоропластен
24	Oxygen-evolving enhancer protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7K9H5 G7K9H	14	589	100	6.04/35.07	5.2/28.5	470	100	665.1	330.53	538.5	445.49	Хлоропластен
25	Oxygen-evolving enhancer protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7K9H5 G7K9H	14	636	100	6.04/35.07	5.4/28.5	517	100	1933.38	1327.08	2012.9	1126.56	Хлоропластен
26	Oxygen-evolving enhancer protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7K9H5 G7K9H	14	793	100	6.04/35.07	5.5/28.6	672	100	777.55	540.79	767.22	865.23	Хлоропластен
36	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tr Q2V2R9 Q2V2R	3	177	100	5.62/23.85	6.0/23.7	164	100	297.68	147.5	308.51	161.36	Хлоропластен
37	Putative PSII-P protein (Fragment)	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PET1 Q2PET	10	333	100	7.12/28.41	5.7/23.1	254	100	1900.74	1281.15	1568.35	1111.75	Хлоропластен
38	Putative PSII-P protein (Fragment)	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PET1 Q2PET	10	271	100	7.12/28.41	6.1/23.0	189	100	369.19	197.65	131.8	291.97	Хлоропластен
42	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	<i>Medicago truncatula</i>	tr B7FGU7 B7FGU	10	434	100	7.56/24.34	6.0/16.1	347	100	421.85	529.76	522.21	926.72	Хлоропластен
9	ATP synthase subunit alpha	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R487 B8R48	21	782	100	5.15/55.73	5.5/66.9	600	100	822.97	532.97	970.33	930.56	Хлоропластен
10	ATP synthase subunit alpha	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R487 B8R48	22	782	100	5.15/55.73	5.6/66.3	585	100	621.47	809.43	1899.61	1655.64	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. repens</i> “Хайфа“															
Петн о №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифицира н по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани рI/MW (kDa)	Получени рI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35™ ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35™ ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56™ ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56™ ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
11	ATP synthase subunit alpha	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R487 B8R48	20	690	100	5.15/55.73	5.7/66.5	515	100	314.65	166.56	248.28	103.18	Хлоропластен
12	ATP synthase subunit beta	<i>Trifolium subterraneum</i>	tr B8R4D1 B8R4D	23	939	100	5.36/53.27	5.9/56.9	716	100	1531.98	251.35	1534.94	1403.35	Хлоропластен
Рубиско и белтъци свързани с него															
13	Ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)	<i>Trifolium repens</i>	tr G0WZP5 G0WZP	23	752	100	6.24/50.73	6.6/58.8	535	100	132.26	2125.6	141.62	3273.69	Хлоропластен
14	Ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)	<i>Trifolium repens</i>	tr G0WZP5 G0WZP	26	821	100	6.24/50.73	6.8/57.6	556	100	2959.89	2487.12	6741.71	6082.77	Хлоропластен
15	Ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)	<i>Trifolium repens</i>	tr G0WZP5 G0WZP	27	902	100	6.24/50.73	6.9/57.3	628	100	8393.79	2675.31	4951.2	6218.92	Хлоропластен
16	Ribulose 1,5- biphosphate carboxylase large subunit (Fragment)	<i>Cercis canadensis</i>	tr Q31746 Q3174	25	708	100	6.22/50.79	7.0/59.5	470	100	657.41	572.68	763.29	626.4	Хлоропластен
41	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Trifolium repens</i>	sp P17673 RBS_T	8	428	100	8.86/20.25	6.4/20.7	351	100	258.62	116.33	142.21	167.6	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. repens</i> “Хайфа“															
Петн о №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифицира н по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очаквани pI/MW (kDa)	Получени pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35™ ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35™ ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56™ ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56™ ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
43	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Trifolium repens</i>	sp P17673 RBS_T	11	419	100	8.86/20.25	6.5/15.7	316	100	929.84	310.48	671	1016.84	Хлоропластен
44	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Trifolium repens</i>	sp P17673 RBS_T	13	480	100	8.86/20.25	7.0/15.8	349	100	485.27	155.24	506.51	609.26	Хлоропластен
45	Ribulose biphosphate carboxylase small chain	<i>Trifolium repens</i>	sp P17673 RBS_T	17	633	100	8.86/20.25	7.2/15.5	436	100	4452.48	1566.48	2174.72	3072.86	Хлоропластен
7	Rubisco large subunit- binding protein subunit beta	<i>Pisum sativum</i>	sp P08927 RUBB_	17	732	100	5.85/63.29	5.6/73.1	606	100	94.64	29.69	55.6	84.4	Хлоропластен
8	Rubisco large subunit- binding protein subunit beta	<i>Pisum sativum</i>	sp P08927 RUBB_	17	683	100	5.85/63.29	5.8/69.7	561	100	133.33	42.62	66.15	79.68	Хлоропластен
17	Ribulose-1 5- biphosphate carboxylase/oxygenase activase	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7KGT1 G7KGT	12	298	100	6.1/52.54	5.9/35.6	232	100	639.33	873.67	1568.8	1688.13	Хлоропластен
Други белтъци свързани с Калвиновия цикъл															
21	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7J5Y4 G7J5Y	24	746	100	6.76/48.42	6.5/44.7	521	100	149.13	36.29	129.82	76.23	Хлоропластен
22	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7J5Y4 G7J5Y	25	821	100	6.76/48.42	6.7/45.5	572	100	268.37	69.25	264.06	183.84	Хлоропластен
23	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q6T706 Q6T70	20	829	100	6.86/43.18	6.5/34.0	638	100	488.13	402.57	619.25	372.43	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. repens</i> “Хайфа“															
Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очакван рI/MW (kDa)	Получен рI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
30	Triosephosphate isomerase	<i>Glycine max</i>	tr C6TK33 C6TK3	11	341	100	6.24/32.76	5.7/24.5	258	100	100.17	21.79	70.74	96.71	Хлоропластен
2	Transketolase	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7IF28 G7IF2	25	520	100	6.0/80.09	6.3/87.5	327	100	199.23	85.01	166.36	108.67	Хлоропластен
Белтъци свързани с гликолизата															
31	Triosephosphate isomerase	<i>Glycine max</i>	tr Q38IW8 Q38IW	9	414	100	5.87/27.42	6.4/24.4	346	100	194.35	123.88	151.79	129.77	Цитоплазмен
Белтъци свързани с аминокиселинният метаболизъм															
18	Glutamine synthetase leaf isozyme	<i>Medicago sativa</i>	sp Q9XQ94 GLNA2	12	634	100	6.29/47.43	6.0/40.3	549	100	552.76	197.35	475.01	341.94	Хлоропластен
Белтъци свързани с протеолизата															
5	Putative zinc dependent protease	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PEV7 Q2PEV	9	86	99.98	5.48/75.41	5.4/78.8	49	99.9	50.93	N/A	32.06	50.86	Хлоропластен
6	Putative zinc dependent protease	<i>Trifolium pratense</i>	tr Q2PEV7 Q2PEV	20	396	100	5.48/75.41	5.5/78.6	250	100	90.57	31.31	81	82.92	Хлоропластен
Други белтъци															
3	Heat shock protein 70	<i>Medicago sativa</i>	tr Q5MGA8 Q5MGA	15	275	100	5.08/71.35	5.4/84.8	191	100	57.72	37.84	79.01	N/A	Цитоплазмен
40	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Vicia faba</i>	sp Q41651 CYPB_	3	224	100	8.61/26.76	5.6/21.8	211	100	566.54	350.63	667.8	734.78	Хлоропластен
32	Carbonic anhydrase	<i>Pisum sativum</i>	sp P17067 CAHC_	7	437	100	7.01/35.64	6.5/24.2	395	100	136.17	8.11	116.55	40.3	Хлоропластен
33	Carbonic anhydrase	<i>Pisum sativum</i>	sp P17067 CAHC_	9	519	100	7.01/35.64	6.8/24.2	460	100	229.88	22.35	246.82	152.83	Хлоропластен

Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини <i>T. repens</i> “Хайфа“															
Петно №	Наименование на хомоложен белтък	Идентифициран по принадлежност към вид	Идентификационен №	Брой секвенирани пептиди	Белтъчен резултат	Белтъчен резултат С.І.%	Очакван pI/MW (kDa)	Получен pI/MW (kDa)	Общ йонен резултат	Общ йонен резултат С.І.%	Количествена оптична плътност * площ Контроли 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Заблатени 35 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Контроли 56 ^{ти} ден	Количествена оптична плътност * площ Възстановени 56 ^{ти} ден	Предполагаема вътреклетъчна локализация
34	Carbonic anhydrase	<i>Pisum sativum</i>	sp P17067 CAHC_	13	507	100	7.01/35.64	6.8/24.0	404	100	222.5	59.79	347.28	172.76	Хлоропластен
27	Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme	<i>Pisum sativum</i>	sp P10933 FENR1	14	486	100	8.56/40.45	6.4/29.7	372	100	164.47	94.17	206.79	129.43	Хлоропластен
19	Elongation factor Tu	<i>Pisum sativum</i>	sp O24310 EFTU_	23	729	100	6.62/53.13	6.1/42.8	515	100	327.44	136.91	156.6	173.81	Хлоропластен
20	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	<i>Glycine max</i>	tr F4ZZ27 F4ZZ2	8	160	100	5.93/50.76	6.3/47.9	122	100	45.19	5.99	63.77	23.19	Хлоропластен
39	Putative uncharacterized protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr G7JKL5 G7JKL	2	57	85.22	6.54/11.61	6.4/22.3	43	99.2	162.9	74.34	127.23	140.72	Пластиден
Петна със статистически недостоверна идентификация															
4	Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17 (Fragments)	<i>Pinus strobus</i>	sp P84733 PS17_	2	34	0	9.63/1.71	5.4/85.3	0	0	81.15	11.5	60.39	46.14	N/A
28	Maturase K (Fragment)	<i>Calluna vulgaris</i>	tr H9AV72 H9AV7	8	44	0	9.94/31.89	6.9/30.0	0	0	180.24	102.13	153.45	183.86	Хлоропластен
35	Uncharacterized protein	<i>Medicago truncatula</i>	tr I3SDC2 I3SDC	8	59	92.243	6.26/24.04	6.0/24.0	0	0	247.38	199.27	216.38	216.05	Хлоропластен

Таблица 3. Разтворими листни белтъци с вариращи количества при контролни заблатени и възстановени условия в червени детелини *Trifolium repens* сорт “Хайфа“. За определяне на белтъчните количества беше използван софтуерът PDQuest™ 2-D Analysis и генерираният от него относителен параметър Количествена оптична плътност * площта на всяко петно.

Вследствие проведените анализи бяха идентифицирани 48 индивидуални белтъка, от които 22 в сорт „Старт“ и 26 в сорт „Хайфа“. Над 60% от тях се отнасят към фотосинтезата (светлинна реакция, АТФ синтеза в хлоропластите и Калвиновия цикъл, включително Рубиско и свързаните с него белтъци. Според техните метаболитни функции, идентифицираните белтъци се разпределят в шест метаболитни групи: Белтъци свързани със светлинната реакция на фотосинтезата и АТФ продуцирането; Рубиско и свързаните с него белтъци; други белтъци свързани с въглехидратния метаболизъм от Калвиновия цикъл; белтъци свързани с аминокиселинния метаболизъм; белтъци свързани с протеолизата, а разнородните белтъци са обединени в последната група. Детайлният анализ показва, че някои белтъци като например голямата и малката субединици на Рубиско, α и β субединиците на АТФ синтетазата и кислород-отделяне усилващият белтък мигрират в повече от едно петно. При червената детелина, Рубиско молекулата беше идентифицирана в 10 петна, а при бялата детелина - в 8 петна. Повечето от белтъците с променящи се количества бяха идентични при двата сорта. Промените в количествата на белтъците открити в повече от едно петно бяха пресметнати при сумирани данни от всички петна, а резултатите са преизчислени като проценти спрямо съпоставимите им възрастови контроли, които бяха приети за 100%. Рубиско LS и SS спадна от два до три пъти и при двата сорта, но по-чувствително при червената детелина, с тенденция за леко свръхвъзстановяване след периода на регенерация на растенията, докато при Рубиско активизата при сорт Старт се наблюдаваше незначително увеличение, докато при сорт „Хайфа“ имаше четирикратен спад. Рубиско свързващият белтък показва разнопосочно поведение в двата сорта: увеличение при сорт Старт и понижение в сорт Хайфа. Някои други представители на Калвиновия цикъл, показали промяна вследствие заблътването бяха идентифицирани и в двата сорта: рибулозо-5-фосфат-3-епимераза, фруктозо-бисфосфат алдолаза, глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, транскетолаза и триозофосфат изомераза. Колкото до белтъците от светлинната реакция на фотосинтезата и АТФ синтеза, интересни резултати показва β субединицата на АТФ синтетазата. И при двата сорта тя намаля пет пъти по време на стреса, но показва потенциал да се възстанови до контролни нива за 21 дни култивиране след стреса при оптимални условия. Желязо-сърната субединица на Цитохром b6-f комплекса намаля повече от два пъти при сорт Старт, но се натрупа над контролни нива след възстановителния период, докато при сорт Хайфа стресът предизвика нейното повишаване, което се запази и след възстановяването на стресираните растения. Спад при някои белтъци беше наблюдаван само при едния от двата сорта. Субединица II на реакционния център на FCI и CuZn супероксид дисмутаза при червената детелина, а при бялата карбоанхидразата и 1-дезоксид-Д-ксилоулозо-5-фосфат редуктоизомеразата. От идентифицираните белтъци отнесени към аминокиселинния метаболизъм беше глутамат-глиоксалат аминотрансферазата, която е пероксизомален ензим от фотодишането и глутамин синтетазата, която е отговорна за реасимиляцията на амоняка генериран при фотодишането. Бяха регистрирани промени и в количествата на аланин глиоксалат аминотрансферазата и аминотрансфераза с трансаминазна активност. При това изследване беше идентифицирана само една протеаза (Zn зависима), но и при двата сорта. Допълнително идентифициране посредством базите данни на NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) и предполагагане на вътреклетъчната ѝ локализация посредством софтуера WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org>) я определиха като хлоропластна FtsH протеаза.

Сред разнородните белтъци беше открит цитоплазмен HSP 70 при стресирани бели детелини, както и пептидил-пролил цис-транс изомераза при двата сорта. Същата, след регенерация беше напълно възстановена при червената даталина и леко свръхвъзстановена при бялата детелина. Като цяло бяха открити пет типа на поведение след периода на възстановяване на стресираните растения: пълно възстановяване на количеството белтък (хлоропластна АТФ синтетаза α -субединица при сорт Старт); непълно възстановяване (кислород-отделяне усилващият белтък при сорт Хайфа); свръхвъзстановяване (кислород-отделяне усилващият белтък и желязо-свързаната субединица от цитохром b6-f комплекса при сорт Старт); прогресивно намаляване (нативен Р- протеин от ФСII при *T. pratense*); неповлияване на стресираните белтъци от периода на регенерация на растенията (хлорофил a/b свързващият белтък от светлоулавящ комплекс I и при двата сорта).

При проведените анализи, няколко белтъка бяха идентифицирани на повече от едно място. В червената детелина, молекулата на Рубиско беше идентифицирана в десет различни петна, а при бялата детелина в осем. Няколко други белтъка също бяха идентифицирани в повече от едно петно, като например АТФ синтетазата (пет петна при сорт „Старт“ и четири петна при сорт „Хайфа“) и кислород-отделяне усилващ белтък (по три петна във всеки сорт). Подобно разпределение на ключови листни белтъци на повече от едно място, се наблюдава често, особено в сравнителните протеомни изследвания върху растенията подложени на различни видове стрес (Hajduch et al. 2001; Swami et al. 2011; Zdražnik et al. 2013). Въз основа на изложеното до тук, трябва да се има предвид, че поведението на единични петна не е показателно за стрес-индуцираните промени в определен белтък, и за тяхното пълноценно установяване трябва да се проследи сумарната динамика на всички белтъчни петна, съдържащи даденият белтък. С изключение на хлорофил a/b свързващият белтък при сорт „Хайфа“, където той беше идентифициран в едно петно при контролни растения, но в две петна при заблатени, ние не открихме никакви промени в броя на петната на идентифицираните протеини, както в условия на заблатяване, така и след периода на възстановяване. Стрес-индуцирано увеличаване на броя на петната може да се дължи на белтъчна фрагментация, която да е резултат от непълна протеолитична деградация (Feller et al. 2008). Наблюдаваният при детелините цялостен спад в интензивността на белтъчните петна, без увеличаване на броя на петната съответстващи на определени индивидуални белтъци, вероятно се дължи на понижени нива на транслация или на пълно протеолитично разграждане на маркираните за деградация молекули, но не на частична протеолиза. Въз основа на наблюдаваната тенденция в количествените изменения на идентифицираните белтъци, можем да заключим наличието на многостранно регулиране на белтъчното поведение в условия на стрес. В подкрепа на направените изводи са резултатите получени от изследването на фотосинтезата.

Детайлна информация за разпределението на отделните белтъчни видове в повече от едно петно и тяхната количествена динамика е представена в таблица 4. Функционално разпределение на идентифицираните белтъци като процент от общия брой идентифицирани белтъци са представени графично на фиг. 16 и фиг. 17.

Количествени промени и разпределение по петна на идентифицираните листни белтъци в условия на заблзяване и възстановяване					
Сорт	Хомоложен белтък	Идентифициран в петно №	Най-вероятна вътреклетъчна локализация според WoLF PSORT	Количество белтък* 35 ^{ти} ден, стресирани	Количество белтък* 56 ^{ти} ден, възстановени
Белтъци свързани със светлината фаза на фотосинтезата и АТФ продуцирането					
сорт "Старт"	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 3	32, 33	Хлоропластен	63%	68%
	Oxygen-evolving enhancer protein	26, 27, 28	Хлоропластен	61%	155%
	Putative PSII-P protein (Fragment)	30, 31	Хлоропластен	66%	54%
	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subuni	40	Хлоропластен	42%	138%
	ATP synthase subunit alpha	4, 5, 6	Хлоропластен	46%	98%
	ATP synthase subunit beta	7, 8	Хлоропластен	19%	173%
	Photosystem I reaction center subunit II, putative	35	Хлоропластен	11%	62%
сорт "Хайфа"	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 3	36	Хлоропластен	50%	52%
	Chlorophyll a/b binding protein	29	Хлоропластен	74%	600%
	Oxygen-evolving enhancer protein	24, 25, 26	Хлоропластен	65%	73%
	Putative PSII-P protein (Fragment)	37, 38	Хлоропластен	65%	83%
	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subuni	42	Хлоропластен	126%	177%
	ATP synthase subunit alpha	9, 10, 11	Хлоропластен	85%	86%
	ATP synthase subunit beta	12	Хлоропластен	16%	91%

Рубиско и свързаните с него белтъци					
сорт "Старт"	Rubisco large subunit	9, 11, 12, 13, 14	Хлоропластен	35%	125%
	Rubisco small subunit	41, 42, 43, 44, 45	Хлоропластен	25%	122%
	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta	3	Хлоропластен	207%	132%
	Rubisco activase (Fragment)	17, 18	Хлоропластен	107%	31%
сорт "Хайфа"	Rubisco large subunit	13, 14, 15, 16	Хлоропластен	65%	129%
	Rubisco small subunit	41, 43, 44, 45	Хлоропластен	35%	139%
	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta	7, 8	Хлоропластен	32%	135%
	Rubisco activase (Fragment)	17	Хлоропластен	25%	66%
Белтъци свързани с въглехидратния метаболизъм от Калвиновия цикъл					
сорт "Старт"	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	24	Хлоропластен	33%	129%
	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	34	Хлоропластен	40%	113%
	Fructose-bisphosphate aldolase	19, 20	Хлоропластен	111%	87%
сорт "Хайфа"	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	21, 22	Хлоропластен	25%	66%
	Triosephosphate isomerase	30	Хлоропластен	22%	137%
	Fructose-bisphosphate aldolase	23	Хлоропластен	82%	60%
	Transketolase	2	Хлоропластен	43%	65%

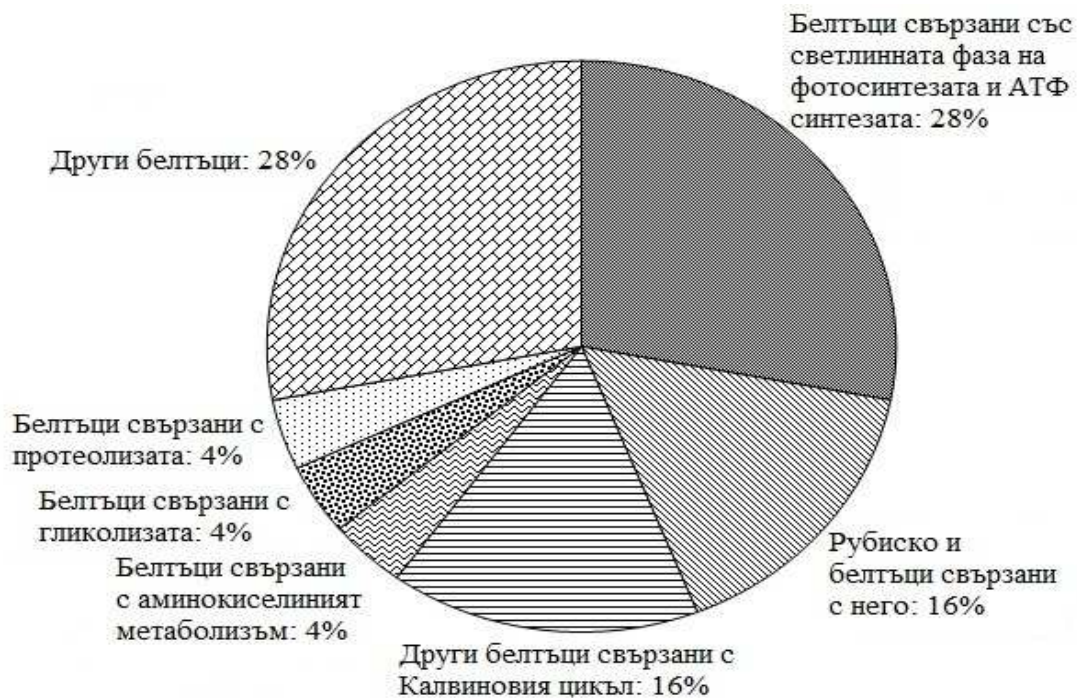
Белтъци свързани с метаболизма на аминокиселини					
сорт "Старт"	Glutamate-glyoxylate aminotransferase 1	10	Пероксизомен	24%	81%
	Glutamine synthetase	15	Митохондриален или хлоропластен	48%	113%
	Alanine glyoxylate aminotransferase	16	Цитоплазмен	77%	82%
сорт "Хайфа"	Glutamine synthetase leaf isozyme,	18	Хлоропластен	36%	72%
Белтъци свързани с протеолизата					
сорт "Старт"	Putative zinc dependent protease	2	Хлоропластен	25%	150%
сорт "Хайфа"	Putative zinc dependent protease	5, 6	Хлоропластен	22%	118%
Разнородни белтъци					
сорт "Старт"	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	21	Цитоплазмен	24%	66%
	Chloroplast stem-loop binding protein b of 41 kDa	22	Хлоропластен	75%	101%
	Putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase	23	Хлоропластен	36%	136%
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	36, 37	Хлоропластен или цитоплазмен	40%	97%
	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	38	Хлоропластен	34%	63%

сорт "Хайфа"	Heat shock protein 70	3	Цитоплазмен	62%	неоткрит
	Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme	27	Хлоропластен	57%	63%
	Carbonic anhydrase	32, 33, 34	Хлоропластен	15%	51%
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	40	Хлоропластен	62%	110%
	Elongation factor Tu	19	Хлоропластен	42%	111%
	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	20	Хлоропластен	13%	36%
	Putative uncharacterized protein	39	Пластиден	46%	111%
* В проценти сравнени със съответстващата им възрастова контрола приета за 100 %					

Таблица 4. Количествени промени и разпределение по петна на идентифицираните листни белтъци в контролни, заблатени и възстановени растения от двата сорта.



Фиг. 16. Функционално разпределение на идентифицираните белтъци, екстрахирани от листа на червена детелина (*Trifolium pratense* L. Сорт „Старт“) представени като процент от общия брой идентифицирани белтъци.



Фиг. 17. Функционално разпределение на идентифицираните белтъци, екстрахирани от листа на бяла детелина (*Trifolium repens* L. Сорт „Хайфа“) представени като процент от общия брой идентифицирани белтъци.

Освен петната, изброени в таблица 4, бяха наблюдавани и такива със статистически недостоверна идентификация. Въпреки това, те показаха определена степен на хомология, според която сме ги идентифицирали. В сорт „Старт“ те са общо четири. Един от тях съответства на фрагмент от НАДН дехидрогеназа; един на предполагаемият нехарактеризиран белтък OSJNBa0014K0 8.1; един на BON1 асоциираният белтък 1 и един на фрагмент от Матураза К. В сорт „Хайфа“ тези петна бяха три. Съответно подобен на субединица II PS17 от предполагаема цитохром С оксидаза; Матураза К и един нехарактеризиран белтък.

Като цяло, голяма част от избраните за идентификация белтъци, са свързани с фотосинтезата (Таблица 2 и Таблица 3). Беше установено намаляване на количеството на някои белтъци, принадлежащи към ФСІ и ФСІІ (светлоулавящ комплекс І хлорофил а/в свързващ белтък 3, кислород-отделяне усилващ белтък, ФСІІ-Р белтъка), което може да е свързано с координираното стехиометрично адаптиране на фотосинтетичните белтъци към стрес-индуцираното понижение на нивата на фотосинтезата. Стрес-индуцираните промени в количеството на желязо-сърната субединица на Цитохром b6-f комплекса показаха противоположна тенденция: намаляване при сорт „Старт“ и увеличаване при сорт „Хайфа“, за което допустимо обяснение е различната чувствителност на двата сорта. Цитохром b6/f комплексът е интегрално-мембранен белтък осъществяващ строг контрол върху капацитета на електронния транспорт и нивата на фотосинтезата (Yamori et al. 2011). Има съобщения за положителен контрол върху нивата на белтъците от Цитохром b6/f комплекса при хлоропласти на пшеница подложена на засушаване и солеви стрес (Kamal et al. 2012/2013). Нарастващите количества на Цитохром b6/f комплекса бе предложен като полезен молекулен маркер за повишаване на фотосинтезата и стабилизирането на фуражните добиви в условия на стрес (Yamori et al. 2011). Различаващото се поведение на Цитохром b6/f в нашето изследване може да се дължи на различния потенциал на белите и червените детелини да се справят със заблацияването. След етапа на възстановяване, при сравнение с възрастово съответстващите им контроли, третираните растения показаха различен потенциал да възстановят идентифицираните белтъци, свързани с фотосинтезата. Могат да се разграничат пет различни типа на възстановени белтъци: пълно възстановяване на количеството (хлоропластна АТФ синтаза при сорт „Старт“); частично възстановяване на количеството белтък (кислород-отделяне усилващ белтък при сорт „Хайфа“); свръхвъзстановяване (кислород-отделяне усилващият белтък и желязо-сърната субединица на Цитохром b6-f комплекса при сорт „Старт“); прогресивно намаляване на количеството на белтъка след периода на възстановяване (предполагаемия Р протеин от ФСІІ при сорт „Старт“) и петата група на запазилите намаленото си количество на нива от периода на стреса (хлорофил а/в свързващият белтък от светлоулавящия комплекс І и при двата сорта). Тези наблюдения могат да се обяснят с различна чувствителност на отделните белтъци към стреса и/или тяхната специфична роля при възстановяването. В следствие на стреса АТФ синтазата (идентифицирани α и β -субединици), осъществяваща процеса на АТФ синтезиране беше редуцирана почти три пъти, като след възстановителния период, нивата ѝ бяха запазени по-ниски от съответните им контроли, с изключение на свръхвъзстановената β -субединица при сорт „Старт“. Един от най-съществените отговори към заблацияване е

повишеното ниво на АФК, което води до инхибиране на хлоропластния АТФ синтез (Zheng et al. 2009). Установено е, че излагането на тилакоидите на синглетен кислород засяга тяхната способност да синтезират и хидролизират АТФ, като в същото време тилакоидния лумен се подкислява чрез механизъм консумиращ АТФ (Buchert 2012). Наблюдаваното при сорт „Хайфа“ леко забавяне във възстановяването на АТФ синтетазата потвърждава наличието на увреждания в хлоропластите. Не трябва да се пренебрегва възможността това да се дължи на идентифицирането само на специфични изоформи или някои *in vivo* възникнали деривати. И в двата сорта количеството на Рубиско намаля в диапазона от два до три пъти, но при сорт „Старт“ количеството на РА остана почти непроменено, показвайки съвсем слабо увеличение, докато при сорт „Хайфа“ имаше четирикратен спад. Разграждането на Рубиско има важна роля за поддържане на азотния баланс в растенията по време на стрес, поради което, може да заключим, че наблюдаваният спад в количеството му е следствие от тази му роля (Feller et al. 2008). Разграждането на Рубиско и други хлоропластни белтъци по време или след подлагането на абиотичен стрес позволява повторното използване на азота за подновяване на повредени белтъци и синтезата на стрес-индуцируеми такива. РА е АТФ-зависим чапероноподобен белтък от ААА+ семейството, който премахва инхибиторните молекули от активния сайт на Рубиско. Ahsan и колектив (Ahsan et al. 2007) са установили в условия на заблътване, спад в нивата на РА в листа от домати. От друга страна, Asghari и колектив (Asghari et al. 2006) са наблюдавали увеличаване в нивата на РА в пшеничени листа при стреса засушаване. Поради разнопосочните данни от различни източници, към днешна дата все още няма ясен модел описващ зависимостта между активираното състояние на Рубиско и капацитета на РА (Sage et al. 2008), както и поведението ѝ в условия на стрес. Допълнителна възможност е молекулата на Рубиско да е основната мишена за протеолитично разграждане в листата, което не засяга белтъка на РА, както и възможността нивата на *de novo* синтеза ѝ да компенсират нивата на протеолитичното ѝ разграждане. Рубиско-свързващият белтък (RBP) е олигомерен белтък свързващ RLS и RSS с което участва в сглобяването на олигомерната молекула на Рубиско. RBP е и един от най-силно засегнатите белтъци в условия на абиотични стресове (Demirevska-Kerova et al. 2005). В изследваните сортове, RBP показва противоположни тенденции: повишаване на нивото си в сорт „Старт“, и намаляване в сорт „Хайфа“. Това най-вероятно също се дължи на различните механизми за адаптация на двата сорта. На базата на наблюдаваното възобновяване до над контролни нива на количеството на Рубиско след 21-дневния период на възстановяване, и с оглед неговата вторична роля на АК буфер в условия на стрес, може да предположим, че това се дължи на след стресово презапасяване, подготвящо растението за бъдещи стресови събития (Kosová et al. 2011; Bruce et al. 2007). В единия или в двата сорта бяха идентифицирани и други ензими от Калвиновия цикъл с променящи се количествата вследствие заблътването. Например рибулозо-5-фосфат-3-епимеразата, притежаваща рацемазна и епимеразна активност. Тя е активна спрямо ваглехидратите и техните деривати в редукирания Калвинов пентозо фосфатен цикъл; глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназата (идентифицирана в сорт „Старт“ като хлоропластен тип А), която катализира редукцията на карбоксилната група от 1,3-бисфосфоглицерата до алдехид и способстваща получаването на глицералдехид-3-фосфат; транскетолаза, притежаваща транскетолазна активност и участваща в пентозофосфатния път на всички организми; триозофосфат изомераза, ензимът от първата стъпка

на регенериращият етап. Той конвертира Г-3-Ф до дихидроксиацетон фосфат. Този ензим има цитозолен вариант (TRI), който катализира взаимното превръщане между дихидроксиацетон фосфата и глицералдехид-3-фосфата в гликолитичния път (Dorion et al. 2012). Фруктозо-бисфосфат алдолазата катализира последната стъпка в редукцията на три-фосфоглицерата до фруктозо 1,6-бисфосфат, генерирайки 1,7-бисфосфат от дихидроксиацетон фосфат и еритрозо-4-фосфат. Като цяло, може да се заключи, че редуцирането на първият ензим от Калвиновия цикъл причинява каскадна редукция и на ензимите от последващите го реакции. В потвърждение на тази концепция е наблюдението, че след периода на регенерация, всички ензими бяха възстановени в нива съответстващи на нивото на Рубиско. Вследствие на продължително заблстяване, инхибираната фотосинтеза нарушава въглехидратния метаболизъм, така че за да се справят със стреса растенията трябва да настроят целия си метаболизъм в режим на пестене на енергия (Kong et al. 2010). В някои случаи на тежък стрес, растенията ограничават своите енергийни разходи чрез подтискане на белтъчната синтеза (Rocha et al. 2010). Идентифицираната глутамат-глиоксалат аминокотрансфераза е пероксизомен ензим участващ във фотодишането. Тя катализира реакцията между глутамат и глиоксалат за да се образуват 2-оксоглутарат и глицин (Igarashi et al. 2006). От друга страна глутамин синтетазата участва в глутаминовата биосинтеза и е отговорна за реасимилирането на азота освободен от фотодишането. Листния, хлоропластен изоензим на глутамин синтетазата е светлинно регулируем, кодиран е в ядрения геном и се експресира основно в листа където е отговорен за тази реасимилация. Също така беше установена промяна в количествата на аланин глиоксалат аминокотрансферазата, която също е аминокотрансфераза, но с трансаминазна активност. За протеомните изследванията в настоящата дисертация, беше използван единствено листен материал, а наблюдаваният спад в количествата на протеините отнесени към аминокиселинният метаболизъм е в съгласие с изследванията на Komatsu и екип (Komatsu et al. 2013b), които са установили, че белтъци отнесени към метаболизма повишават нивата си в корените, но намаляват в котиледоните и листата. Адаптацията към стреса е базирана на строго регулирани метаболитни промени, водещи до настройка на белтъчните съотношения на засегнатите клетки, която често е резултат от повишена протеолитична активност (Van der Hoorn 2008). Със сигурност крайната динамика на количествата на отделните белтъци е сумарно следствие от различни причини, като повлияна транскрипция или транслация (Ricard et al. 1991; Branco-Price et al. 2005), промени във флоемния транспорт на аминокиселини, нужни за белтъчния синтез (Feller et al. 2008), както и променена протеазна активност. И при двата сорта наблюдавахме силно понижение в нивата на първоначално непотвърдена цинк зависима протеаза, чиято последващата идентификация чрез базата данни на NCBI и установяване на най-вероятната ѝ вътреклетъчна локализация посредством софтуера WoLF PSORT, я определиха като хлоропластната FtsH. FtsH е цинкова, АТФ зависима металопротеаза, принадлежаща към AAA семейството на АТФазите. Тя е стабилно свързана към тилакоидната мембрана, а функционалните ѝ домени са разположени от страната на стромата. FtsH се намира само в стромално експонираните райони на тилакоидната мембрана (Lindahl et al. 1996), и е отговорна за разграждането както на свободните, разтворими, така и на мембранно-свързаните некомплектовани форми на Rieske Fe-S протеина (Lindahl et al. 2000). Някои скорошни проучвания с *Arabidopsis* показват, че при *in vivo* репарацията на ФСII, ендо- типа Deg протеаза и екзо- типа FtsH протеаза

кооперативно разграждат D1 белтъка (Kato et al. 2013). Същите автори са наблюдавали и повишаване на няколко други хлоропластни протеази като Clp и тилакоидно свързаната SppA. Особено интересно е, че част от Clp е делегирана от стромата към тилакоидната мембрана. Като се имат в предвид функционалните прилики между Clp и FtsH 23, то може да се предположи, че Clp частично замества FtsH. Това предполага наличието на компенсаторни механизми между хлоропластните протеази. Clp е стромална, мулти-субединична протеаза, която и структурно, и функционално е съпоставима с FtsH (Kato et al. 2013). Такова предположение е много примамливо и корелира с нашите резултати (Фиг. 10 и Фиг. 11). След възстановяване от стреса, FtsH показва свръх-възстановяване на количествата си, вероятно или поради вече споменатия презапасителен подход за подготовка към предстоящ стрес (Bruce et al. 2007), или поради забавено адаптиране на количествата ѝ спрямо липсата на стрес. И в двата сорта беше открита пептидил-пролил цис-транс изомеразата от циклофилиновата суперфамалия (идентифицирана като хлоропластна в сорт „Хайфа“). Това са фолдази откривани в различни растителни органели. Някои от тях са константно експресирани, а други са стрес-индуцируеми (Kurek et al. 1999; Breiman et al. 1992). Те ускоряват нагъването на белтъците и катализират цис-транс изомеризацията на пролин имидни пептидни връзки в олигопептиди. Техните хлоропластни форми са нужни за комплектовката и стабилизирането на ФСII (Romano et al. 2004), което пък обяснява намаляването им при условия в които количествата на фотосинтетичните белтъци са редуцирани. Тези ензими показаха пълно възстановяване при сорт „Старт“, и слабо над-възстановяване при сорт „Хайфа“. В сорт „Хайфа“ беше идентифициран и чаперона HSP 70 (heat shock protein 70), който в сътрудничество с други чаперони стабилизира нативните белтъци, като така ги предпазва от агрегиране. Също така участва в нагъването на новотранслираните полипептиди в цитозола и органелите. Според софтуера WoLF PSORT, идентифицираният HSP 70 най-вероятно е цитоплазмена форма. Възможно обяснение за понижените му нива в условия на стрес е, че някои представители на HSP 70 семейството се експресират конститутивно и като ангажирани с асистиране нагъването на новосинтезираните полипептиди и внасянето/транслокацията на прекурсорни протеини (Wang et al. 2004), те са стехиометрично обвързани с нивата на *de novo* синтезираните белтъци, които в условията на заблätяване спадат. На базата на проведените сравнителни анализи между растения на една и съща възраст: контролни и заблатени; контролни и възстановени, както и между заблатени и възстановени растения на различни възрасти, беше пренебрегнато общоизвестното влияние на стареенето върху белтъчните профили (Zhang et al. 2010; Wilson et al. 2002). Въз основа двумерните електрофорези и последващите ги анализи, наблюдаваните различия между двата сорта детелина еднозначно потвърдиха извода, че червената детелина сорт „Старт“ е по-чувствителна към заблätяване от бялата детелина сорт „Хайфа“. Очевидно, четиринадесет дни заблätяване на почвата е достатъчно силен стрес за да доведе до промяна в количествата на редица белтъци, потвърждавайки чувствителността на надземните части на фуражните растения към почвено преовлажняване. Преходното редуциране на ефективността на фотонната абсорбция от хлорофил а намали общият фотонен добив, но предпази фотосинтетичните структури. След възстановителния период се наблюдаваше силно застъпено свръхвъзстановяване на редица белтъци при съпоставянето им със съответстващите им възрастови контроли. Това може да се интерпретира в две направления – като

подготовка за бъдещ стрес или като забавено настройване на протеома към липсата на стрес. Разнопосочното поведение на Цитохром b6/f Fe-S субединицата я обособи като потенциален маркер за сравняване на устойчивостта спрямо заблацияване.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

През последните десетилетия заблацияването се оформя като все по-нарастващ проблем с катастрофални последствия за земеделието и екологичното равновесие (Humphrey et al. 2008). В глобален аспект, на фона на дисбалансираното преразпределяне на водните ресурси, породено от климатичните промени и антропогенната дейност (Bernstein et al. 2007), заблацияването може да се разглежда като взаимосвързано със засушаването. И двете водят до сериозни загуби на почвени качества, земеделска продукция, а оттам и на животински белтък, което причинява значими икономически загуби. Изследването на промените на белтъчното съдържание в условия на стрес и възстановяване, в частност в условията на заблацияване, може да обогати познанията върху процесите, контролиращи количеството на усвоемите белтъци във фуражните насаждения, което е от практическо значение за животновъдството. Не на последно място са екологичните проблеми, възникващи от заблацияванията, които причиняват екологична реорганизация на засегнатите растителни и животински видове (Rosenzweig et al. 2008). Разкриването на механизмите водещи до толерантност към заблацияване ще допринесе както за разработването на подходи за повишаване на фуражните добиви, така и за разбиране разпространението на дивите видове (Colmer and Voesenek 2009). За територията на България, както и на други места с умерен климат и разпространение на различни сортове детелини, изучаването на толерантността им към заблацияване е от съществено значение както от икономическа, така и от екологична гледна точка. Интерпретирането на получените резултати може да бъде полезно и при други, подобни на детелината фуражи като например люцерната.

ИЗВОДИ

- 1) При заблätяване на почвата само при червената детелина сорт „Старт“ се наблюдава статистически достоверно понижаване на листната площ, съдържанието на общ листен белтък и пигменти.
- 2) При червената детелина сорт „Старт“ нивата на голямата субединица на Рубиско спадат двукратно в условия на преовлажняване, докато при двата сорта бяла детелина не се повлияват толкова значително.
- 3) В условия на воден стрес се наблюдава по-висок интензитет на С1рР ивиците, особено изразено при червената детелина сорт „Старт“ показвайки промяна в пластидната С1р система, а оттам и в пластидната АТФ-зависима протеолиза.
- 4) При заблätяване се наблюдава значително повишаване на общата протеолитична активност. В заблатения сорт „Старт“ на червената детелина тя достига осемкратно увеличение, докато при двата сорта бели детелини „Хайфа“ и „Дебют“ повишението е в рамките на един-два пъти.
- 5) Установените различия в белтъчната динамика между сорт „Старт“ и сорт „Хайфа“, както и между заблатени и възстановени растения от един и същ сорт са указание за различия в регулацията и метаболитните подходи за адаптация на протеома.
- 6) След три седмичен период на възстановяване се наблюдава свръх акумулиране на някои от идентифицираните индивидуални белтъци.
- 7) На базата на резултатите от проведените комплексни сравнителни анализи можем да заключим, че червената детелина сорт „Старт“ е по-чувствителна към заблätяване от бялата детелина сортове „Хайфа“ и „Дебют“.

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

- 1) Успешно са идентифицирани 48 белтъка - 22 от червена и 26 от бяла детелина, разпределени в шест метаболитни групи. Установени са количествените им промените при стрес от заблätяване и при възстановяване.
- 2) Установено е свръхвъзстановяване на определени белтъци, проявили спад в количествата си под въздействие на заблätяване.
- 3) При сорт „Старт“ са характеризирани две изоформи на RSS. При същия сорт е установена и характерна протеолитична зона Р6, отсъстваща при двата сорта бели детелини.
- 4) Разнопосочното поведение на Цитохром b6/f Fe-S субединицата в двата сорта детелини я обособява като потенциален маркер за сравняване на устойчивостта спрямо заблätяване.

Приноси с потвърдителен характер

- 5) Основният дял от идентифицираните листните разтворими белтъци, избрани по критерия „понижено количество в условия на заблätяване“ имат отношение към фотосинтезата. Това потвърждава, че фотосинтезата е един от най-чувствителните към абиотичен стрес процеси, а при тежки условия, фотосинтезиращите белтъци са съществено засегнати, особено в чувствителни

видове/сортове (Bocian et al. 2011; Zdražnik et al. 2013; Demirevska et al. 2008a/b).

б) Наблюдаването от нас значително повишаване на общата протеолитична активност в режим на заблатяване и при трите сорта детелини подкрепя установеният от други автори факт, че заблатяването води до повишена протеолитична активност (Feller et al. 2008; Bailey-Serres and Voesenek 2008).

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:

1) PROTEIN CHANGES AND PROTEOLYTIC DEGRADATION IN RED AND WHITE CLOVER PLANTS SUBJECTED TO WATERLOGGING

Stoychev V., L. Simova-Stoilova, I. Vaseva, A. Kostadinova, R. Nenкова, U. Feller, K. Demirevska 2013 Acta Physiol. Plant., 35(6) pp 1925-1932.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-013-1231-z>

2) WATERLOGGING STRESS IN WHITE (TRIFOLIUM REPENS L.) AND RED (TRIFOLIUM PRATENSE L.) CLOVER AND THE ROLE OF PROTEOLYSIS

Stoychev V., I. Vaseva, L. Simova-Stoilova, K. Demirevska 2013 Gen. Plant Physiol. 3 (3–4), pp. 204–218.

http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/wp-content/uploads/2014/11/GPP_3_3-4_204-218.pdf

3) CHANGES IN 2-DE PROTEIN PROFILE OF WHITE AND RED CLOVER LEAVES IN RESPONSE TO WATERLOGGING STRESS AND RECOVERY

Stoychev V., L. Simova-Stoilova, V. Vassileva, J. V. Jorrín Novo, I. Vaseva, V. Velikova, T. Tsonev, K. Demirevska 2015 Advances in Environmental Research Vol. 39 Chap. 9 pp 131-162, Nova Science Publishers Ed. J.A.Daniels.

http://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=54009

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ : ОБЩО 3

Общо намерени три цитата на публикация по дисертацията:

Stoychev V, Simova-Stoilova L, Vaseva I, Kostadinova A, Nenкова R, Feller U, Demirevska K. Protein changes and proteolytic degradation in red and white clover plants subjected to waterlogging. Acta Physiol. Plant. 2013, 35: 1925-1932. ISSN: 0137-5881.

1. Chen, Y., Chen, X, Wang, H., Bao, Y., Zhang, W. Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death (2014) Proteome Sci.12:33 <http://www.proteomesci.com/content/12/1/33>
2. Velychko O.I. The Influence of the Oil Polluted Soil Conditions on the Red Clover Protein Spectral Composition (2014). Науковий вісник НЛТУ України. – Вип. 24.9 УДК 581.[144.2+524+55] p115-118 [in Ukrainian]
3. Zong, J., Gao, Y. , Chen, J., Guo, H. , Wang, Y., Meng, F. , Jiang, Y. , Liu, J. Growth and enzymatic activity of four warmseason turfgrass species exposed to waterlogging (2015) J. Amer.Soc. Hort. Sci. 140 (2), pp. 151162.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ:

1. Международна конференция 100 години почвена наука в България 16-20 май 2011. Постер на тема: DYNAMICS OF PROTEIN CONTENT IN RED AND WHITE CLOVER UNDER WATERLOGGING STRESS. Veselin Stoychev, L. Simova-Stoilova, Ts. Mihovski, K. Demirevska
2. Международна Конференция: Molecular Basis of Plant Stress 21-23.09.2011. Постер на тема: STRESS-INDUCIBLE PROTEINS IN CLOVER PLANTS UNDER WATERLOGGING. Veselin Stoychev, I. Vaseva, L. Simova-Stoilova, U. Feller, K. Demirevska
3. PLANT PHYSIOLOGY AND GENETICS Achievements and Challenges 24–26 September 2014. Постер на тема: PROTEIN PROFILE OF WHITE AND RED CLOVER LEAVES IN RESPONSE TO WATERLOGGING STRESS AND RECOVERY. Stoychev V., Simova-Stoilova L., Jorrín-Novo J. V., Vassileva V., Vaseva I. I., Velikova V., Tsonev T., Demirevska K.
4. PLANT PHYSIOLOGY AND GENETICS Achievements and Challenges 24–26 September 2014. Постер на тема: EXPRESSION OF CERTAIN TRITICUM AESTIVUM PROTEINASE INHIBITOR GENES IN WHEAT VARIETIES IN RELATION TO DROUGHT SENSITIVITY. Vaseva I. I., Zehirov G., Stoychev V., Kirova E., Simova-Stoilova L., Sabotič J., Šuštar-Vozlič J., Meglič V., Kidrič M.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ :

1. Проект BG051PO001-3.3-05/0001 по схема “Наука-бизнес”, финансирана от Оперативна програма “Развитие на човешките ресурси”
2. Проект BG051PO001-3.3.06-0025 по схема „Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентоспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми“. Европейски социален фонд, Министерство на образованието, младежта и науката, Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013 БЕНЕФИЦИЕНТ Институт по физиология на растенията и генетика – Българска академия на науките ПАРТНЬОРИ Софийски университет „Св. Климент Охридски“ – Биологически факултет, Катедра „Генетика“, Катедра „Зоология и антропология“ Институт по органична химия с център по фитохимия - Българска академия на науките
3. “Регулация на протеолизата при воден стрес на дву- и едносемеделни растения” (REPRODIMO). Финансиран от MOMH двустранен проект със Словения (2011-2013) с партньори от словенска страна - Аграрен Институт на Словения в сътрудничество с Йозеф Стефан Институт в Любляна. Координатор от българска страна д-р Ирина Васева, от словенска - д-р Йелка Сустар-Возлич.