



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



Институт по физиология на растенията и генетика

Лаборатория „Фотосинтеза – активност и регулация”

Диляна Петрова Донева

**Роля на биогенните летливи органични
съединения (BVOC) в защитата и адаптацията на
растенията в условия на засушаване**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност: 01.06.16 – Физиология на растенията

Научен ръководител:

проф. д-р Виолета Великова

Рецензенти:

проф. д-р Катя Георгиева

проф. д-р Емилия Апостолова

София, 2017

СЪДЪРЖАНИЕ

Увод.....	3
Цел и задачи.....	3
Материали и методи.....	4
Резултати и обсъждане.....	6
Заклучение.....	35
Изводи.....	37
Приноси.....	39

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АБК – абсцисинова киселина	ОВС – относително водно съдържание
АКФ – активни кислородни форми	ССК2 – свестосъбиращ комплекс 2
БГ – български екотип	ФС1 – фотосистема 1
ГЗФ – глицералдеhid-3-фосфат	ФС2 – фотосистема 2
ДМАДФ – диметилалил дифосфат	BVOCs – биогенни летливи органични съединения
ИДФ – изопентинил дифосфат	НСА – хидрокси канелени киселини
ИТ – италиански екотип	SE – стандартна грешка
МЕФ – метилеритрол-4-фосфат	SOA – вторични органични аерозол
МВА – мевалонов биосинтетичен път	
МДА – малондиалдеhid	

УВОД

Летливите органични съединения, отделяни от растенията, притежават широк спектър от функции. Те играят важна роля в растителната екология и са важни фактори, определящи физичните и химичните качества на въздуха. От биогенните емисии в най-големи количества се отделя изопрен. Изопреновата емисия се контролира от факторите на околната среда (температура, светлина, водообезпечаване, атмосферна CO_2 концентрация). В много изследвания се правят прогнози за бъдещите глобални климатични промени, които се свързват с увеличаване на температурата на въздуха, все по-чести и продължителни периоди на засушаване и нарастване на въздушната концентрация на CO_2 . Следователно, тези промени ще оказват силен и постоянен ефект върху изопреновата емисия, която от своя страна има съществен принос за качеството на въздуха. От друга страна, изменението във физичните фактори на околната среда ще променят баланса между растителните видове в полза на растения, по-добре адаптирани към предвижданите климатични промени. В този смисъл, изследването на ролята на изопрена за повишаване устойчивостта на растенията се явява от изключителна важност.

Проведени са голям брой изследвания с цел да се изясни физиологичната роля на изопрена, неговите биосинтетични пътища, молекулните механизми, които регулират формирането и функциите му. Все още редица въпроси, свързани с връзката между изопреновата емисия от растенията и условията на околната среда, остават неизяснени. Как видовите характеристики, физиологичното състояние на растенията и условията на околната среда определят емисията на изопрена и неговата защитна роля е въпрос на който все още няма категоричен отговор.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на изследванията по дисертационния труд е изясняването на биологичната функция на изопреноидите (летливи и нелетливи) в представители от подсемейство *Arundinoideae* на семейство *Poaceae* в условията на екстремно засушаване.

За постигането на поставената цел бяха формулирани следните конкретни задачи:

- **Да се изясни ролята на изопреноидите за екологичната пластичност на два растителни вида (*Arundo donax* и *Hakonechloa macra*) от подсемейство Arundinoideae в условия на засушаване.** Изборът на видовете е направен въз основа на тяхната способност да отделят изопрен. За постигането на тази задача са изследвани функционалните различия във фотосинтетичния апарат на *A. donax* и *H. macra* в условия на оптимално водообезпечаване, при екстремно засушаване и възстановяване след приложения стрес. Изследвана е ролята на някои вторични метаболити (изопреноиди и фенилпропаноиди) за реакцията на растенията в процеса на засушаване и възстановяване. Нашата хипотеза е, че подобраните растителни видове ще имат различни отговори към засушаване и че растенията ще покажат различна пластичност и приспособяване към намалена водообезпеченост.
- **Да се изследват отговорите на два екотипа *A. donax*, произхождащи от райони с различни климатични условия (температура и наличие на вода), към екстремно засушаване.** Нашата хипотеза е че екотипът, произхождащ от район с по-висока температура на въздуха и по-ниска почвена водообезпеченост ще притежава по-висока сухоустойчивост. За решаването на тази задача са изследвани количествените различия между двата екотипа в тяхната способност да отделят изопрен, фотосинтетичната им активност и възможностите им да толерират екстремно почвено засушаване и да се възстановяват след приложения стрес.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Подход на работа

За постигане на поставените задачи бяха използвани два подхода:

- Сравнителен анализ на растителни видове от семейство Poaceae, с цел избор на видове с различен капацитет да отделят изопрен, и оценка на тяхната реакция към засушаване и способност да се възстановяват от приложения стрес. След скрининг на шест вида от семейство Poaceae, подсемейство Arundinoideae, бяха избрани два вида: *A. donax*, отделящ изопрен (Hewitt et al. 1990; Ahrar et al. 2015) и *H. macra*, при който не беше установена емисия на изопрен или други летливи изопреноиди в регистрируеми количества (Ahrar et al. 2015).
- Сравнителен анализ на популации *A. donax*, от райони с различни климатични характеристики - Сесто Фиорентино (Флоренция, Италия) и резерват „Сребърна”

(Силистра, България). Изследване отговора на растенията към засушаване и способността им да се възстановяват след прекратяване на стресовото въздействие.

Условия на отглеждане

Растенията са отгледани от ризоми, които за *A. donax* са събрани от единични растения в района на Сесто Фиорентино (Флоренция, Италия) и резерват „Сребърна” (Силистра, България), а растенията *H. macra* са закупени от Bowdens Nurseries (Norfolk, UK). За сравнителния анализ с *H. macra*, в първия етап на работата, е използвана италианската популация *A. donax*. Ризмоите са посадени в съдове с търговска почвена смес, с добавен 5-10% пясък. Растенията са отглеждани в климатична камера при контролирани условия (дневна/нощна температура 27-25°C, интензитет на светлината 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD и относителна въздушна влажност 70-80%). Растенията са поливани редовно до пълно овлажняване на почвата и подхранвани веднъж на всеки две седмици с хранителен разтвор на Хогланд (Hoagland & Arnon 1950).

Експериментална постановка

Експериментите са проведени с растения на възраст 5-6 седмици, за *A. donax*, и 7-8 седмици за *H. macra*. След направените измервания и замразяване на листни проби от контролни растения, поливането е преустановено. За оценка на засушаването е използван метода за изчисляване на водата в почвата, налична за използване от растенията (FTSW), описан от Brilli et al. (2007) и Centritto et al. (2010). Растенията са засушавани до достигане на FTSW=28% т.е. 2-3 седмици за *A. donax* и 3-4 седмици за *H. macra*. След като са направени измерванията и са събрани листни проби за биохимични анализи, растенията са рехидратирани и са възстановявани в продължение на 7 дни. На последния ден от възстановяването са направени измервания и са събрани листни проби за биохимични анализи.

При втория подход на изследване, сравняващ два екотипа *A. donax*, беше използвана същата експериментална постановка, но са направени допълнителни недеструктивни измервания и при умерен воден дефицит (FTSW=48%). Листни проби за биохимични анализи са събрани само от контролни, засушени (FTSW=28%) и рехидратирани растения.

Използвани методи

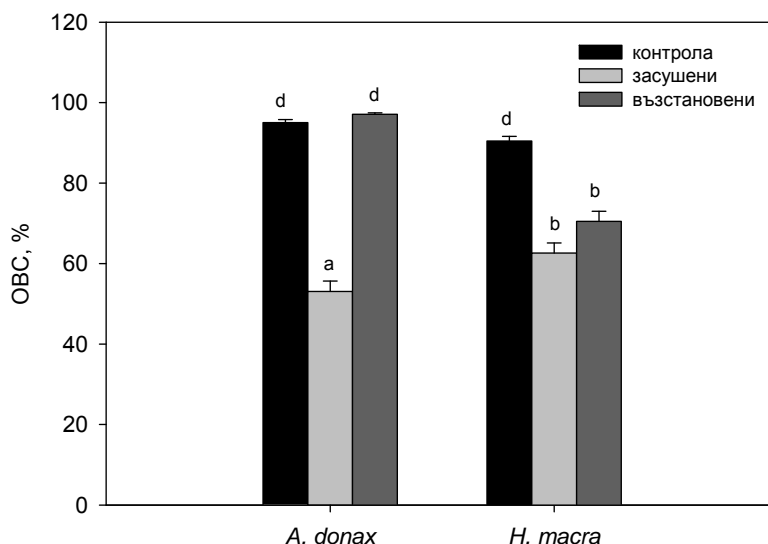
- Определяне на количеството вода в почвата, налично за растенията (FTSW)
- Регистриране на параметрите на фотосинтезата
- Зависимост на скоростта на фотосинтезата от междуклетъчната концентрация на CO₂ (A/C_i криви)
- Ефективност на използване на водата (WUEi)
- Хлорофилна флуоресценция
- Анализ на изопреновата емисия (GC-MS анализ)
- Определяне на относително водно съдържание (ОВС)
- Определяне на количеството малондиалдехид (МДА) по метода на Heath & Packer (1968)
- Определяне на количеството свободен пролин по метода на Bates et al. (1973)
- Анализ на фотосинтетични пигменти чрез HPLC
- Анализ на фенилпропаноиди (с помощта на HPLC)
- Светлинна микроскопия
- Статистически анализ - ANOVA тест, последван от Tukey тест

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Сравнителен физиологичен и структурен анализ на *A. donax* и *H. macra*.

Промени в относителното водно съдържание в листата

Листата на *A. donax* и *H. macra* имат сходно ОВС при контролни условия (Фиг. 1). В резултат на засушаването загубата на вода от листата на *A. donax* е по-голяма (ОВС е около 53%) в сравнение с *H. macra* (ОВС е около 63%). След рехидратация листата на *A. donax* възстановяват напълно своя тургор, докато при *H. macra* водният статус на листата не се възстановява (ОВС=70,5%).



Фиг. 1 Относително водно съдържание (ОВС) при *A. donax* и *H. macra* в контролни, засушени и възстановени растения. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

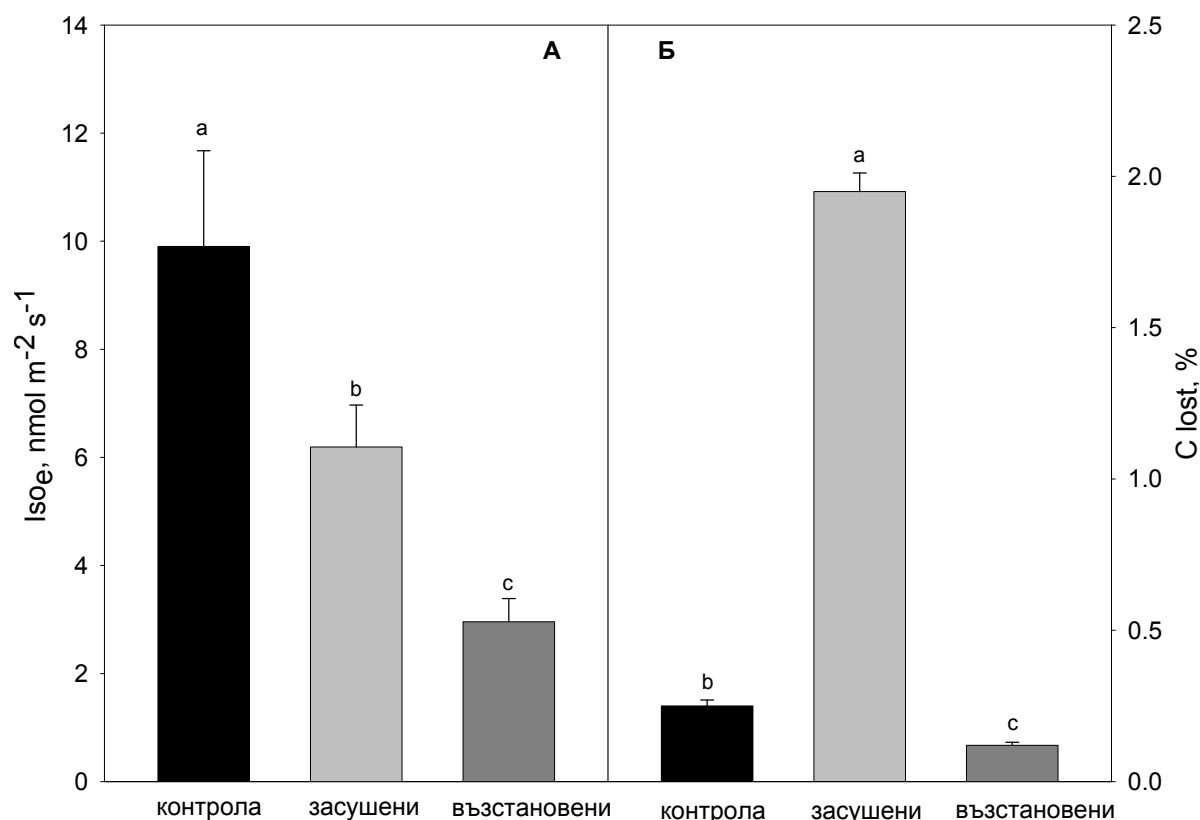
Промени в изопреновата емисия

При *A. donax* изопреновата емисия е висока (Фиг. 2А), докато при *H. macra* не беше регистрирана такава. Засушаването инхибира изопреновата емисия в листата на *A. donax*, която остава значително потисната и след последваща рехидратация (Фиг. 2А).

Установихме, че при силен воден дефицит, когато фотосинтезата е силно потисната, изопреновата емисия намалява в значително по-слаба степен отколкото асимилацията на CO₂. Това е в съответствие с резултатите на Tattini et al. (2014) и Ryan et al. (2004) при трансгенно-модифицирани изопрен-отделящи тютюневи растения и естествени изопренови емитери (Brüggemann & Schnitzler 2002; Brill et al. 2007; Fortunati et al. 2008), изложени на засушаване. Изопреновата емисия при воден дефицит основно е лимитирана от притока на въглерод и енергия към фотосинтезата (Brill et al. 2007; Fortunati et al. 2008; Tattini et al. 2014).

След рехидратиране изопреновата емисия при *A. donax* не се възстановява, дори продължава да намалява. Това е в съответствие с резултати, получени при *Populus niger*, изложени на воден дефицит (Fortunati et al. 2008). Изследвания върху изопреновата емисия на *Populus alba* при засушаване показват, че активността на изопрен синтазата, ензимът който превръща ДМАДФ в изопрен, е чувствителна на

засушаване и изопреновата емисия може да бъде лимитирана на пост-транскрипционно ниво (Brilli et al. 2007). Промяна в активността или в количеството на ензима изопрен синтаза (Fortunati et al. 2008) е вероятната причина изопреновата емисия при *A. donax* да не се възстанови след рехидратиране. Друго възможно обяснение за потиснатата емисия на изопрен при рехидратираните растения е, че притокът на въглерод през МЕФ биосинтетичния път може да е временно пренасочен към биосинтезата на други изопреноиди или вещества с антиоксидантна функция.



Фиг. 2 Скорост на изопреновата емисия (I_{soe}) (А) и загуба на въглерод под формата на изопрен (C_{lost} , %) (Б) при контролни, засушени и възстановени растения *A. donax*. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE ($n=3$). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

Редица изследвания показват, че растенията, отделящи изопрен, проявяват висока устойчивост към различни стресови фактори (Singsaas et al. 1997; Velikova et al. 2006; Peñuelas et al. 2005; Vickers et al. 2009b). Предполага се, че механизмът, по който изопренът предпазва листата от стресови въздействия е свързан със стабилизиране на фотосинтетичните мембрани (Velikova et al. 2011) и/или предотвратяване образуването

на АКФ (Affek & Yakir 2002; Loreto & Schnitzler 2010). Двата механизма не са взаимноизключващи се, тъй като стабилизирането на мембраните позволява на фотосинтетичния апарат да функционира по-добре в условия на стрес, и на свой ред да ограничи натрупването на АКФ (Velikova et al. 2011).

Промени във фотосинтетична активност на *A. donax* и *H. macra*

Двата изследвани растителни вида се характеризират с различна фотосинтетична активност, като фотосинтезата (A_n) при *A. donax* е значително по-висока, в сравнение с тази при *H. macra* (Фиг. 3А). Засушаването инхибира фотосинтезата и при двата вида, но тя се възстановява значително по-добре при *A. donax*. След рехидратиране скоростта на фотосинтезата при *A. donax* се възстановява на 73% от тази при контролните растения, докато при *H. macra* не се възстановява и остава почти непроменена.

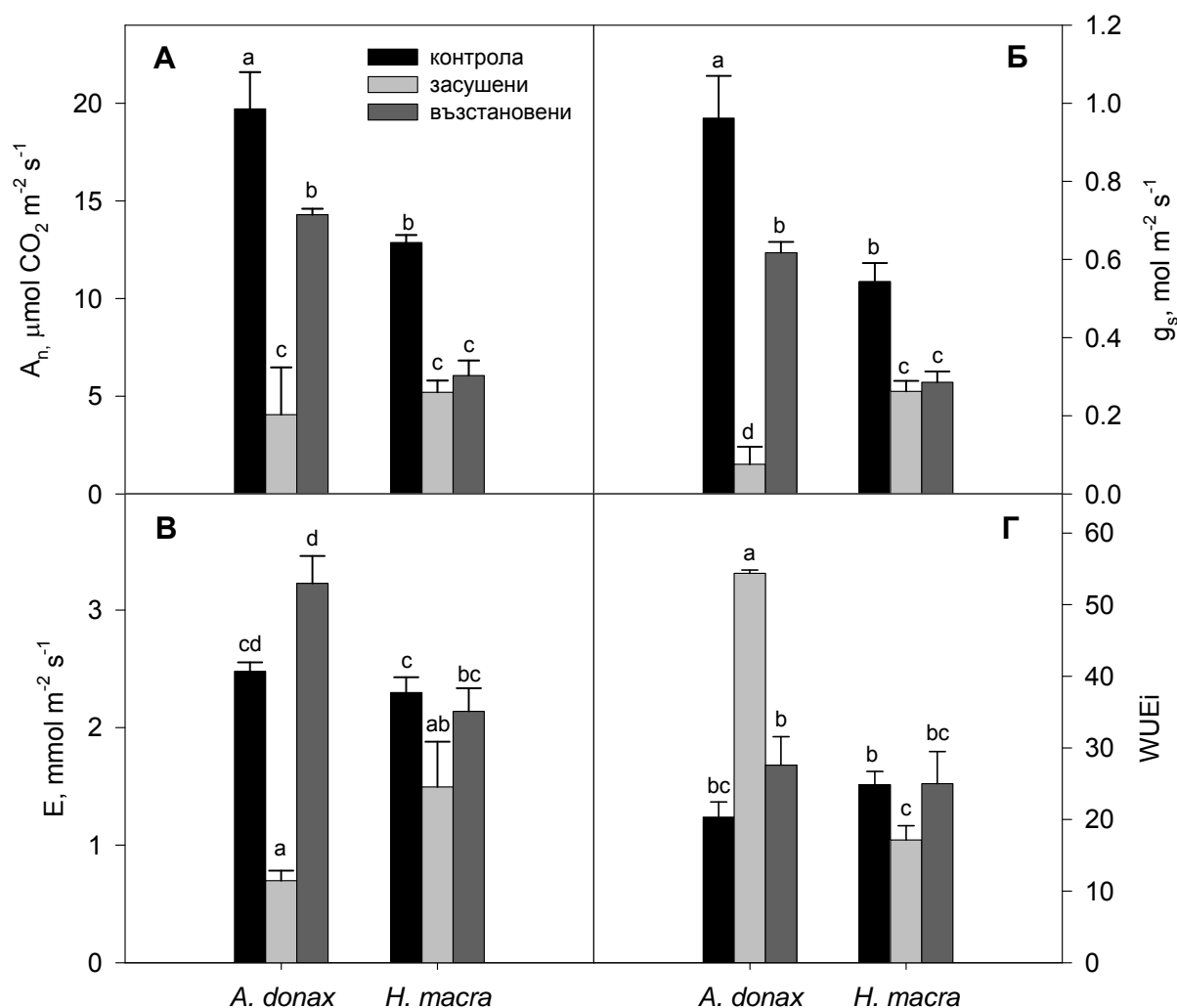
Недостигът на вода води до затваряне на устицата, оценено по силно намалената устична проводимост (g_s) и при двата вида. Подобно на фотосинтезата, g_s се възстановява до значителна степен при *A. donax* след рехидратиране, докато при *H. macra* g_s остава непроменена спрямо стойностите, измерени при засушените растения (Фиг. 3Б).

При оптимални условия на отглеждане *A. donax* и *H. macra* се характеризират със сходна скорост на транспирация (E). Водният дефицит понижава E , което е по-силно изразено при *A. donax*, в сравнение с *H. macra*. След рехидратиране E се възстановява до нивата, измерени при контролните растения и при двата вида (Фиг. 3В).

Контролните растения *A. donax* и *H. macra* имат сходни нива на ефективност на използване на водата (WUE_i), изчислена като отношение на нетната фотосинтеза към устичната проводимост (A_n/g_s). В резултат на засушаването WUE_i нараства значително само при *A. donax*, докато при *H. macra* се наблюдава потискане (Фиг. 3Г). След рехидратиране на растенията WUE_i достига контролните стойности и при двата вида.

Известно е, че фотосинтезата намалява заедно с намаляване на ОВС в листата на растенията и е един от първите физиологични процеси, който се повлиява от недостига на вода (Lawlor & Cornic 2002). *A. donax* показва по-голяма устойчивост на фотосинтезата към засушаване, тъй като се възстановява по-добре след преустановяване на стреса, в сравнение с *H. macra*. Това би могло да се дължи на способността на *A. donax* да отделя изопрен. Показано е, че при изопрен-неотделящи тютюневи растения, инхибирането на фотосинтезата в резултат на воден дефицит е по-

силно, в сравнение с трансгенни такива, които отделят изопрен (Tattini et al. 2014). Тъй като в засушените растения *A. donax* фотосинтезата не е напълно инхибирана, а изопреновата емисия, макар и намалена, е запазена (Фиг. 2А), може да се предположи, че фотосинтезата все още предоставя въглерод за биосинтезата на изопрен.



Фиг. 3 Нетна фотосинтеза (A_n) (А), устична проводимост (g_s) (Б), транспирация (E) (В) и реална ефективност на използване на водата (WUE_i) (Г) при контролни, засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra*. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE ($n=6$). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

Изхождайки от множеството доказателства за положителния ефект на изопрена върху растенията в условия на стрес, се предполага, че изопреновата емисия при *A. donax* спомага за почти пълното възстановяване на фотосинтетичната активност след рехидратация, докато липсата на изопренова емисия при *H. macra* ограничава

физиологичните възможности на това растение да преживява екстремно засушаване, както и да се възстанови след приложения стрес.

Фотосинтезата в условия на воден дефицит се лимитира или устично или от настъпващи биохимични увреждания (Tezara et al. 1999). Засушаването индуцира силно намаляване на g_s при *A. donax*. Затварянето на устицата при засушените растения *A. donax* предполага, че лимитацията на фотосинтезата при този вид е основно устична. Значителното затваряне на устицата намалява транспирацията, което спомага за по-ефективно използване на водата в условия на воден дефицит. Доказателство за това е значителното нарастване на WUE_i при засушените растения *A. donax*. Понижаването на g_s в ранните етапи на засушаването може да има защитен ефект за растенията, позволявайки им да пестят вода и да подобрят своята WUE (Chaves et al. 2009). Затварянето на устицата при *A. donax* предполага, че този растителен вид е по-добре адаптиран към намалена водообезпеченост, което се подкрепя от почти пълното възстановяване на фотосинтетичната активност след рехидратиране. Докато при *H. macra* фотосинтезата не се възстановява след отстраняване на стреса, което вероятно е свързано с настъпили необратими функционални и структурни увреждания на фотосинтетичния апарат.

Увеличаването на WUE_i, което се наблюдава само при растенията *A. donax*, изложени на засушване предполага, че листата на *A. donax* имат структурни или физиологични особености, които позволяват по-добра адаптация към недостига на вода, в сравнение *H. macra*. Намалената WUE_i в засушените растения *H. macra* вероятно се дължи на необратимо увреждане на фотосинтетичния апарат.

За изясняване на факторите, лимитиращи фотосинтезата при двата изследвани вида бяха регистрирани A/C_i криви. Началният наклон на A/C_i кривите е различен при контролните растения на двата растителни вида, предполагащ различна активност на Рубиско (Фиг. 5 от дисертацията). Скоростта на фотосинтезата при насищаща концентрация на CO₂ (A_{max}) също е различна при двата вида (Табл. 1). По-високата A_n при *A. donax*, в сравнение с *H. macra*, подсказва по-голям капацитет за регенерация на Рубиско, поддържан от високата скорост на електронния транспорт. Изчисляването на максималната скорост на карбоксилиране (V_{cmax}) и максималната скорост на електронния транспорт (J_{max}) потвърждава тези видово-специфични особености, като V_{cmax} и J_{max} са значително по-високи при *A. donax* при оптимални условия на отглеждане. Нивото на триозо-фосфат утилизация е сходно при двата растителни вида

(Табл. 1). Водният дефицит води до понижаване на наклона и платото на A/C_i кривите в листата на *A. donax* и *H. macra* (Фиг. 5 от дисертацията), предполагайки отрицателен ефект на стреса както върху карбоксилиращата ефективност, така и върху скоростта на регенериране на Рубиско. След рехидратиране V_{cmax} , J_{max} и ТРУ се възстановяват до контролните нива само при *A. donax*, докато при *H. macra* тези параметри не се възстановяват (Табл. 1).

Мезофилната проводимост (g_m) също е значително по-ниска при *H. macra* в сравнение с *A. donax* дори в контролни условия. Този параметър силно намалява по време на засушаването и при двата растителни вида и при нито един от видовете g_m не се възстановява след рехидратиране (Табл. 1).

Значителното намаляване на устичната (Фиг. 3Б) и мезофилната проводимост (Табл. 1) по време на засушаването е съпроводено със съществено повишаване на CO_2 концентрацията в междуклетъчните пространства (C_i) и хлоропластната CO_2 концентрация (C_c), но само при *H. macra*. При *A. donax* C_i и C_c не се повлияват от процесите на де- и рехидратация (Табл. 1). Затварянето на устицата, освен до намаляване на транспирацията и подобряване на ефективността на използване на водата, води и до ограничаване на дифузията на CO_2 през листата, което от своя страна е причина за намаляване на фотосинтетичната дейност, така нареченото дифузно лимитиране на фотосинтезата (Evans & Loreto 2000; Medrano et al. 2002, 2009; Flexas & Medrano 2002; Flexas et al. 2008, 2016). За разлика от *A. donax* при *H. macra* това не се наблюдава, тъй като C_i и C_c са по-високи при засушаване, показвайки наличие на субстрат за фотосинтеза. Това дава основание да се предположи, че инхибирането на фотосинтезата при *H. macra*, вследствие на засушаването, се дължи на биохимични и фотохимични фактори.

Табл. 1 Промени във фотосинтетичните параметри, изчислени от A/C_i кривите (отговора на фотосинтезата към различна вътрешна CO_2 концентрация) при контролни, засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra*. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE ($n=6$). A_{max} – нетна фотосинтеза при насищаща $[\text{CO}_2]$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), V_{cmax} –максимална скорост на карбоксилиране ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), J_{max} –максимална скорост на електронния транспорт при насищаща концентрация на CO_2 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ТРУ–скорост на използване на триозо-фосфата ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), g_m –мезофилна проводимост ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), C_i – $[\text{CO}_2]$ в междуклетъчните пространства ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), C_c –

хлоропластна CO₂ концентрация (μmol mol⁻¹). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, съгласно проведения Tukey тест с $P < 0.05$

<i>A. donax</i>									
	контролни			засушени			възстановени		
A _{max}	33.6	±	3.9 ^a	7.5	±	2.4 ^c	30.3	±	0.3 ^a
V _{cmax}	177	±	15 ^a	93	±	8 ^c	151	±	16 ^a
J _{max}	155	±	19 ^a	62	±	5 ^c	146	±	14 ^a
TPU	11.2	±	2.1 ^a	4.3	±	0.1 ^b	11.0	±	1.1 ^a
g _m	0.37	±	0.01 ^{bc}	0.19	±	0.01 ^a	0.20	±	0.03 ^b
C _i	236	±	1 ^c	260	±	13 ^{bc}	225	±	8 ^c
C _c	183	±	7 ^b	239	±	26 ^{ab}	177	±	14 ^b
<i>H. macra</i>									
	контролни			засушени			възстановени		
A _{max}	24.2	±	1.4 ^b	10.1	±	0.6 ^c	11.1	±	1.1 ^c
V _{cmax}	110	±	7 ^b	47	±	9 ^d	69	±	9 ^c
J _{max}	116	±	7 ^b	52	±	6 ^c	54	±	6 ^c
TPU	8.6	±	0.6 ^a	4.6	±	0.5 ^b	4.0	±	0.5 ^b
g _m	0.16	±	0.02 ^b	0.08	±	0.01 ^c	0.10	±	0.03 ^{bc}
C _i	277	±	2 ^b	329	±	6 ^a	323	±	9 ^a
C _c	197	±	7 ^b	256	±	18 ^a	224	±	32 ^{ab}

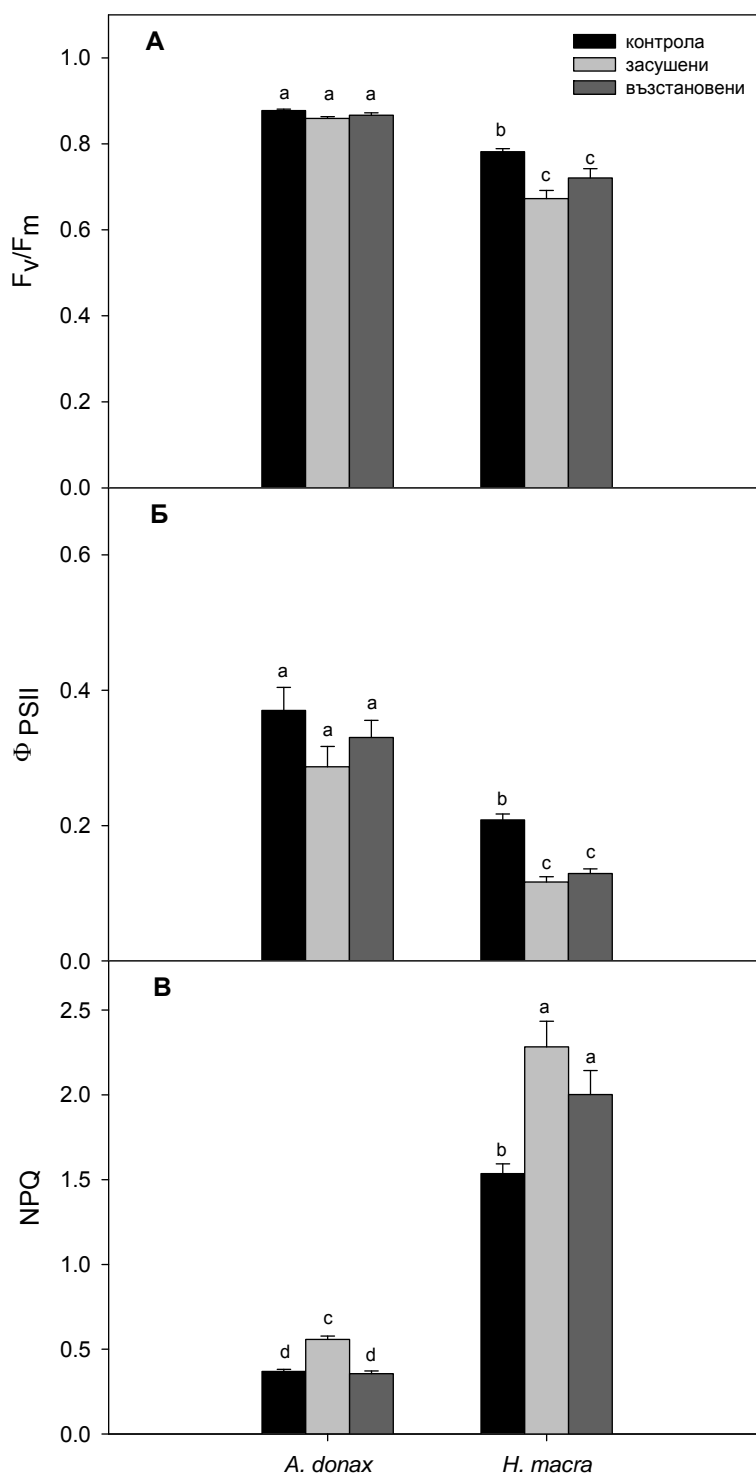
Анализът на A/C_i кривите показва намаляване както на активността на Рубиско, така и на скоростта на регенерация на рибулозо-1,5-бисфосфат. Засушаването води и до намаляване на V_{cmax} и при двата растителни вида, което е по-силно при *H. macra*, отново предполагайки преобладаващата роля на биохимичните фактори, лимитиращи фотосинтезата при *H. macra*. V_{cmax} и J_{max} също така са отговорни за WUE_i (Flexas et al. 2016). Намаленото WUE_i в засушените растения *H. macra* (Фиг. 3Г) вероятно е в

резултат от настъпили увреждания на фотосинтетичния апарат, което се потвърждава и от промените в параметрите на хлорофилната флуоресценция.

Промени във фотохимичната активност на ФС2 при A. donax и H. macra

В проведените експерименти установихме, че максималният квантов добив на ФС2 (F_v/F_m) не се повлиява в резултат на засушаването при *A. donax*, докато при *H. macra* е съществено понижен (Фиг. 4А). Ефективният квантов добив на ФС2 (Φ_{PSII}) и нефотохимичното гасене на флуоресценцията (NPQ) са различни при *A. donax* и *H. macra* в контролни условия, като Φ_{PSII} е по-висок при *A. donax*, а NPQ – по-високо при *H. macra* (Фиг. 4Б, В). Засушаването предизвика значително намаляване на Φ_{PSII} само при *H. macra*, достигайки 56% от контролните стойности. Стойността на Φ_{PSII} при *H. macra* не се възстановява след рехидратиране и това е съпътствано със съществено повишаване на NPQ, което е показател за биохимично увреждане, засягащо линейния електронен транспорт, свързан с дисипацията на излишна енергия (Фиг. 4Б, В). Като цяло влиянието на водния дефицит върху фотохимичните параметри е по-слабо при *A. donax*.

Изследванията показват, че изопрен-отделящите растения, в сравнение с изопрен-неотделящите, имат по-ниско NPQ и по-висок Φ_{PSII} , както в контролни, така и в стресови условия (Behnke et al. 2007). В друг експеримент е установено повишаване на NPQ в листа от топола след инхибиране на изопреновата емисия чрез фосмидомицин (Pollastrì et al. 2014). Авторите демонстрират, че изопреновата емисия спомага за по-голяма ефективност на фотохимичните реакции на ФС2 и намалява нуждата от топлинна дисипация на излишната енергия от хлоропластите при нормална и висока температура (Pollastrì et al. 2014). Тези доказателства са в корелация с нашите резултати, а именно, че изопрен-отделящият вид *A. donax* има по-висока фотохимична ефективност на ФС2 и по-ниско NPQ, в контролни и стресови условия, в сравнение с *H. macra*, който не отделя изопрен. Резултатите от измерената хлорофилна флуоресценция потвърждават нашите наблюдения, че *A. donax* е по-устойчив на засушаване и се възстановява по-добре след отстраняване на стреса, а при *H. macra* настъпват увреждания на фотосинтетичния апарат, които не позволяват пълното възстановяване на растенията след рехидратиране.



Фиг. 5 Максимален квантов добив на ФС2 (F_v/F_m) (А), фотохимична квантова ефективност на ФС2 (Φ_{PSII}) (Б) и нефотохимично гасене на флуоресценцията (NPQ) (В) при контролни, засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra*. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE (n=6). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

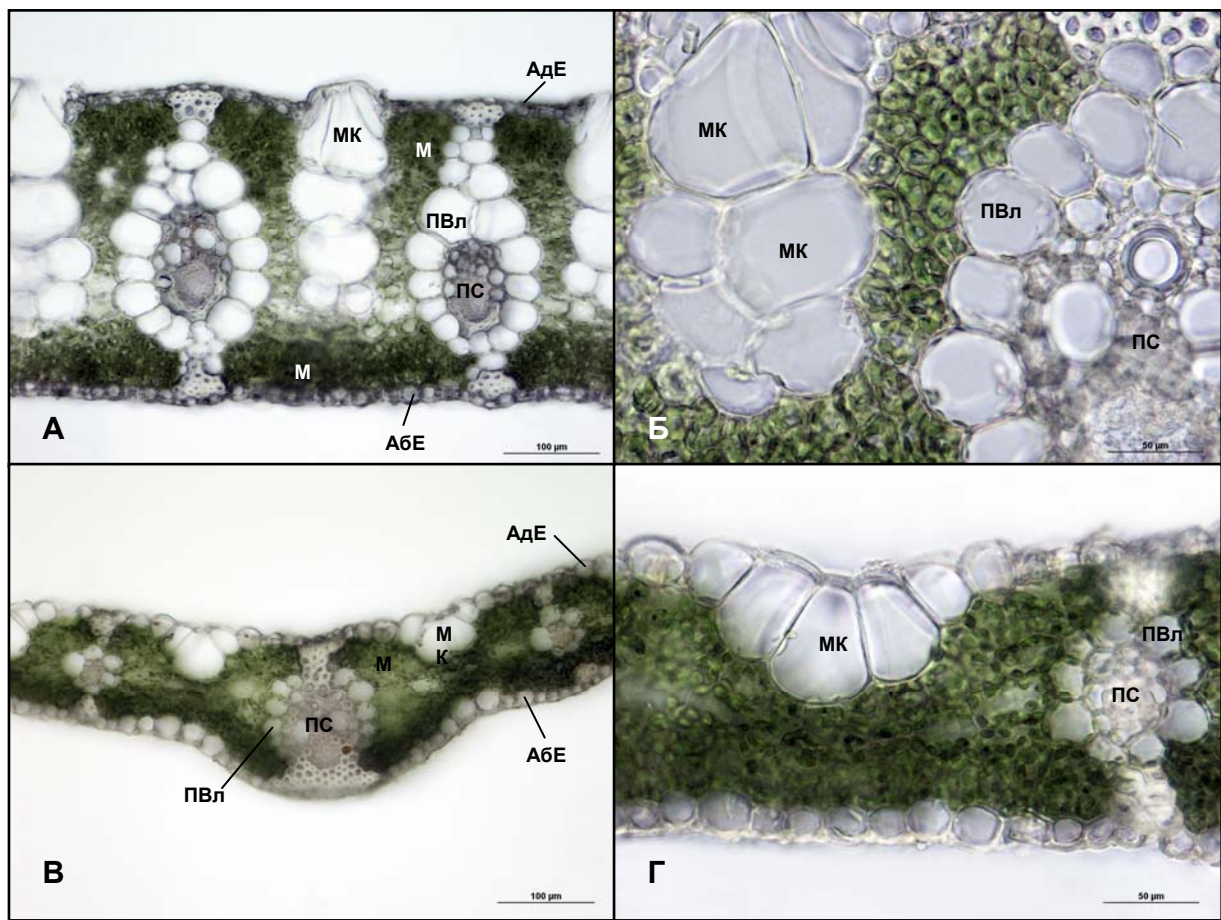
Анатомия на листа при A. donax и H. macra

Светлинно-микроскопският анализ показва, че листът при *A. donax* и *H. macra* се характеризира с типична за житни растения (Poaceae) хистологична организация (Фиг. 5А-Г). И при двата вида мезофилът е еднородно структуриран, изграден от фотосинтезиращи клетки с почти кръгла форма в пререз и малки междуклетъчни пространства. Проводящите сночета са затворени, колатерални, с двойно влагалище. Механичните тъкани са представени от групи от клетки, разположени от горната и долната страна на проводящите сночета, между тях и епидермата. Структурни различия между двата вида се наблюдават само при епидермалните тъкани и се изразяват в броя и разположението на мехурестите (моторни) клетки в адаксиалната епидерма.

Хистологичният анализ на лист от *A. donax* показва, че адаксиалната и абаксиалната листна повърхност са гладки или леко оребнени. Листът е амфистоматичен. Основните епидермални клетки са дребни. Мехурестите клетки са колонообразно разположени и проникват в мезофила по-дълбоко от средата на листа. Централната жилка е добре изразена. Около проводящите сночета има двойно влагалище. Клетките на ендодермалното (местомно) влагалище са повече или по-малко склерифицирани. Клетките на паренхимното влагалище са много едри с голяма централна вакуола и без хлоропласти.

Адаксиалната листна повърхност на *H. macra* е вълновидно нагъната поради изпъкналите жилки и потъналите мехурести клетки. Абаксиалната листна повърхност е гладка. Листът е епистоматичен. Мехурестите клетки са организирани по 4-5 във ветрилообразни групи. Фотосинтетичния паренхим е еднородно структуриран с клетки близко разположени една до друга. Централната жилка е добре изразена с едно голямо проводящо сноче, малките проводящи сночета са успоредно разположени. Както малките, така и големите проводящи сночета имат двойно влагалище. Склеренхимната тъкан представлява групи от клетки, разположени между проводящите сночета и долната и горната епидерма. Склеренхимните групи от двете страни на проводящите сночета имат еднаква ширина и височина (3-4 клетки и 3-4 слоя).

Светлинно-микроскопският анализ на листа от засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra* показва, че на тъканно ниво няма съществени различия от контролните растения както в организацията на фотосинтезиращия паренхим и епидермалните тъкани, така и в морфологичната характеристика на клетките.



Фиг. 5 Светлинно микроскопски снимки на напречен пререз на листа от *A. donax* (А, Б) и *H. macra* контролни растения (В, Г). АдЕ, адаксиален епидермис; АбЕ, абаксиален епидермис; МК, моторни клетки; М, мезофил; ПС, проводящо снопче; ПВл, паренхимно влагалище.

Хистологичният анализ показва, че има различия между двата вида в структурната характеристика на листата. Това може да има връзка с растителния отговор към засушаване (Terashima et al. 2011; Peguero-Pina et al. 2012; Tamàs et al. 2013). Единствената структурна характеристика, която е различна за двата вида в условията на експеримента и има функционално значение е количеството и разположението на моторните клетки. При *A. donax* тези клетки са по-голям брой в сравнение с *H. macra* и са организирани в колони, които навлизат в мезофила, по-дълбоко от средата на листната петура. Докато при *H. macra* са ветрилообразно разположени. Физиологичното значение на моторните клетки все още подлежи на обсъждане. Те представляват клетки без хлоропласти и съдържат основно вода (Evert 2006).

Необходимо е да се отбележи, че потенциално по-високата фотосинтетична активност при изопрен-отделящия вид се придружава с анатомични разлики. Големият брой мехурести клетки при *A. donax*, подредени в колони, могат да повишат ефективността на пългъщане на светлината (Lambers et al. 2008; Vogelmann & Gorton 2014), което е свързано с по-високите стойности на фотосинтезата, измерена при този вид. Възможно е богатите на вода моторни клетки и тяхното разположение в колона, навлизаща дълбоко в мезофила, да има отношение към преразпределението на вода в условия на воден дефицит при този растителен вид.

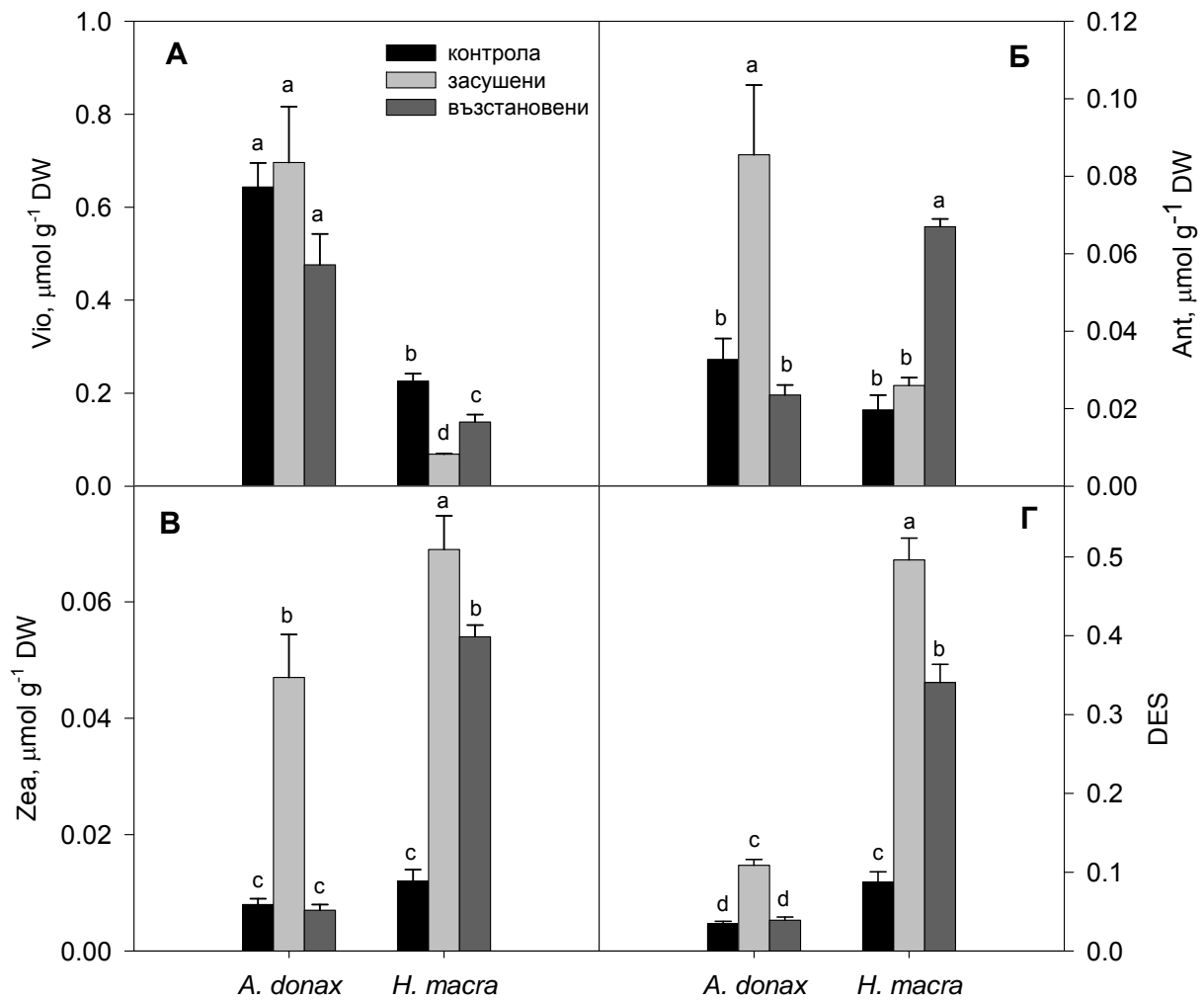
Пигментно съдържание в листата на *A. donax* и *H. macra*

Летливите (изопрен) и нелетливи (каротеноиди) изопреноиди в растенията се синтезират чрез МЕФ биосинтетичен път в хлоропластите (Lichtenthaler 1999). Нелетливите изопреноиди, каквито са каротеноидите имат добре установена биологична роля за толерантността към стрес при растенията (Demmig-Adams & Adams 1996). Ксантофиловият цикъл включва обратимото превръщане на виолаксантин в зеаксантин, през антераксантин. Това светлинно-зависимо превръщане е от изключителна важност за адаптацията на растенията в условия на стрес (Jahns et al. 2009).

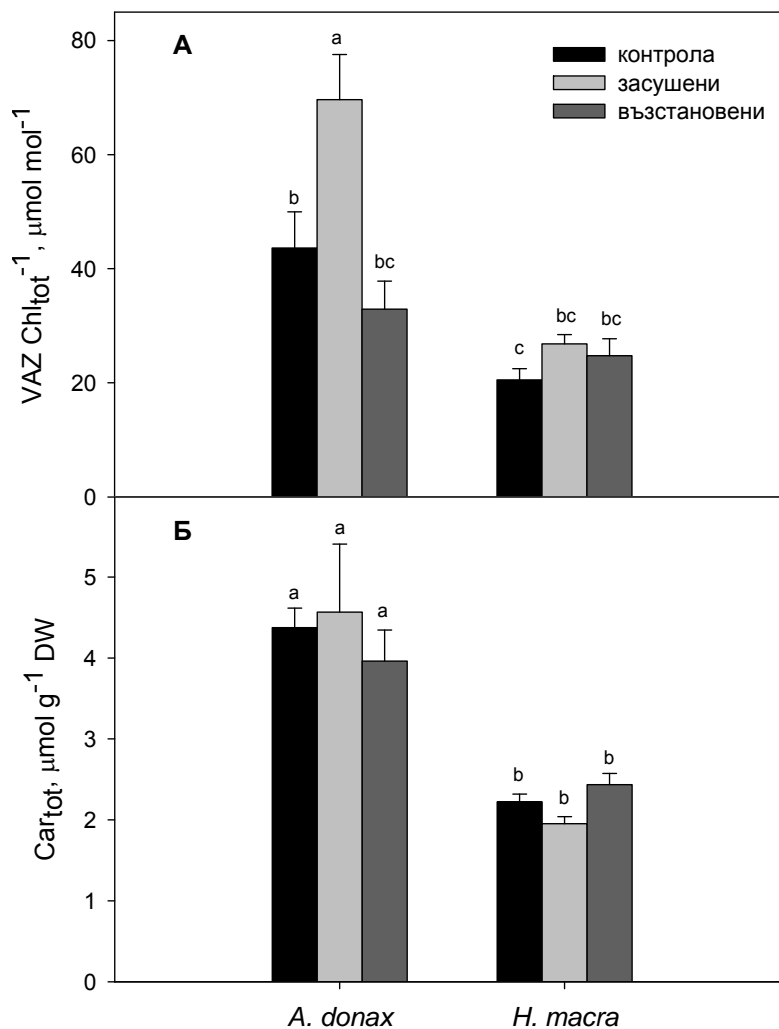
Промените в ксантофиловия пул на двата растителни вида в хода на експеримента са показани на Фиг. 6 (А-В) и Фиг. 10. Съдържанието на виолаксантина намалява само в листата на засушените растения *H. macra*. Нивата на антераксантина нарастват при засушване и при двата вида, въпреки че различията не са статистически достоверни при *H. macra*. Концентрацията на зеаксантина е значително по-висока при засушените растения, както при *A. donax*, така и при *H. macra*, но остава висока след рехидратиране само в листата на *H. macra*. Състоянието на деепоксидация на ксантофилите (DES) и съдържанието на ксантофилите отнесено към общото ниво на хлорофил (VAZ/Chl_{tot}) се различават при двата изследвани растителни вида дори в контролни условия, а именно, DES е по-ниско, а VAZ/Chl_{tot} – по-високо, при *A. donax*, в сравнение с *H. macra* (Фиг. 6Г, Фиг. 7А).

Засушаването повишава нивото на DES при *A. donax* и *H. macra* (Фиг. 6Г), докато за VAZ/Chl_{tot} не бяха открити значими различия при засушените растения *H. macra* (Фиг. 7А). При *A. donax* DES намалява до контролните стойности, следвайки промените в зеаксантина. Като цяло общата концентрация на каротеноидите (Car_{tot}) е значително

по-висока при *A. donax*, в сравнение с *H. macra*, и остава без съществена промяна в резултат на засушаването (Фиг. 7Б).



Фиг. 6 Съдържание на виолаксантин (Vio) (А), антераксантин (Ant) (Б) и зеаксантин (Zea) (В) и деепоксидационно състояние на ксантофилите (DES) (Г) в листата на контролни, засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra*. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.



Фиг. 9 Съотношение на ксантофилите към общото количество хлорофил (VAZ Chl_{tot}⁻¹) (А) и обща концентрация на каротеноидите (Car_{tot}) (Б) в листата на контролни, засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra*. Резултатите са представени като средна стойност ± SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведеня Tukey тест с $P < 0.05$.

Пигментите от ксантофиловия цикъл, особено зеаксантинът, имат добре известна антиоксидантна функция, която е от първостепенно значение при преодоляване на различни стресови фактори (Brunetti et al. 2014). В нашето изследване *A. donax* и *H. macra* показват съществени различия в съдържанието на нелетливите изопреноиди. Концентрацията на каротеноидите в листата на *A. donax* (изразена на база единица сухо тегло) е около 90% по-висока от тази в листата на *H. macra*, независимо от водния статус на растенията. Количеството на пигментите от ксантофиловия цикъл (изразено на база единица сухо тегло и на база хлорофил) при *A. donax* също е по-високо, в

сравнение с *H. macra*, докато деепоксидацията на ксантофилите е значително по-висока при *H. macra*. Тези резултати показват, че механизмите на дисипация на излишната енергия, са много по-активни в *H. macra*, в сравнение с *A. donax*. За индуцираното повишаване на DES и NPQ в резултат на засушаване се съобщава от редица автори и се счита, че е резултат от силно намалената способност да се използва слънчевата енергия в процеса на фотосинтеза (Lawlor & Tezara 2009; Fini et al. 2012). Нарастване на DES и NPQ се наблюдава и при двата растителни вида, но в много по-голяма степен при *H. macra*. Възстановяването на фотосинтетичната активност при *A. donax* след рехидратация е свързано с понижаване на NPQ и DES до стойности, характерни за контролните растения. За разлика от *A. donax*, фотосинтетичната активност при *H. macra* не се възстановява след рехидратиране и нивата на DES и NPQ остават високи.

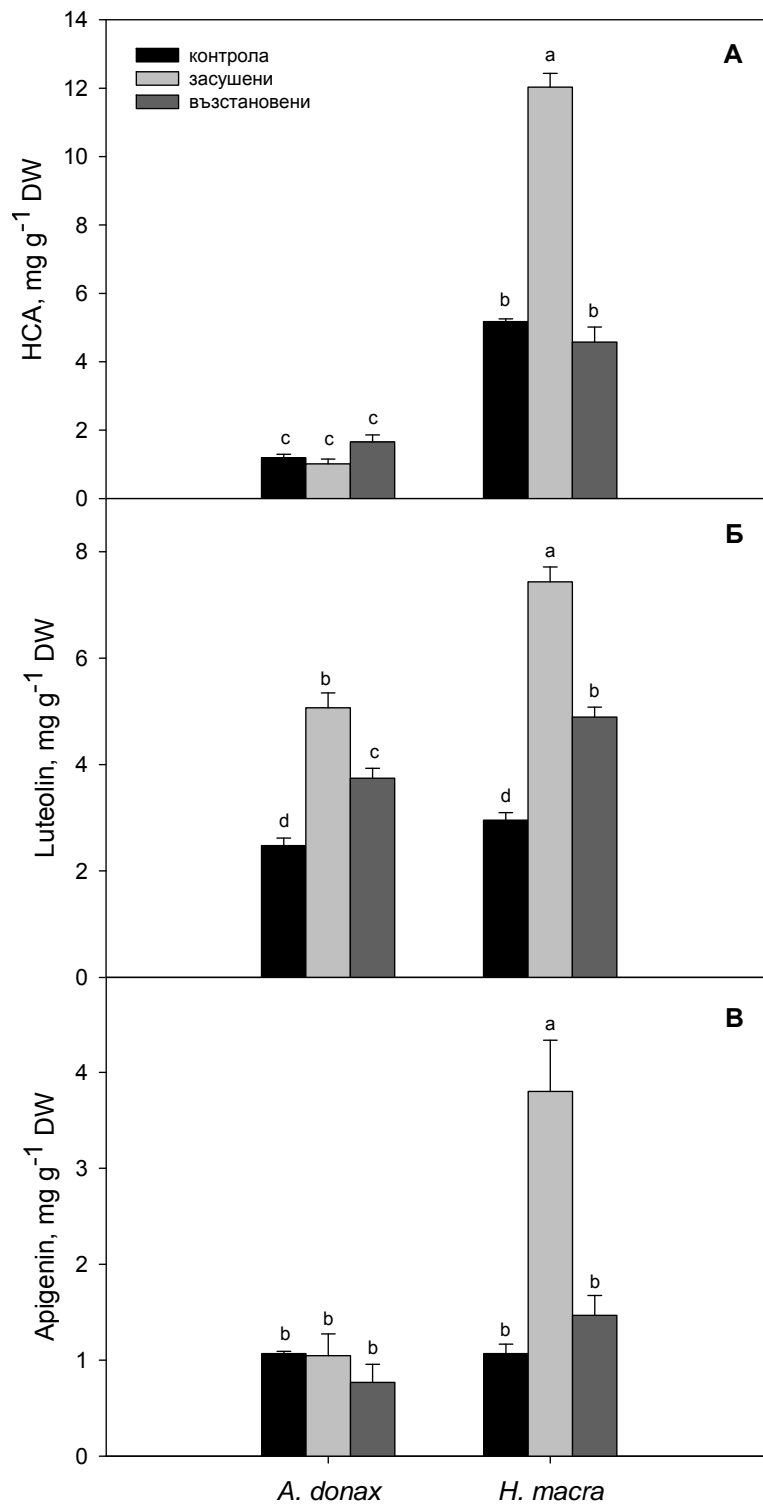
Стимулирането на МЕФ биосинтетичния път в процеса на засушаване, има редица важни положителни последици, които са свързани с наблюдаваната при *A. donax* толерантност/пластичност към стрес. А именно, изопренът и пигментите от ксантофиловия цикъл действат като мощни антиоксиданти (Loreto & Velikova 2001; Vickers et al. 2009a; Behnke et al. 2007; Loreto & Schnitzler 2010), намаляващи негативното влияние от натрупването на АКФ. Интересно е да се отбележи, че стимулирането на МЕФ пътя, свързано с повишена биосинтеза на ксантофили и АБК, се наблюдава предимно в изопрен-отделящи видове. Според Barta & Loreto (2006) изопренът може да действа като сигнал за биосинтезата на АБК, която на свой ред да осигури затваряне на устицата. Ghirardo et al. (2014) демонстрират, че в генно-модифицирана топола, която е с понижена или напълно потисната изопренова емисия, се засилва повече биосинтезата на нелетливи изопреноиди.

Съдържание на фенилпропаноиди в листата на *A. donax* и *H. macra*

Съдържанието на хидроксиканелените киселини (НСА), кафеена и ферулова киселина, в листата е значително по-високо при *H. macra*, в сравнение с това при *A. donax* (Фиг. 10А). Нивото на НСА нараства драстично при *H. macra*, в резултат на засушаването, докато при *A. donax* не се откриват достоверни различия. След рехидратиране количеството НСА и при двата растителни вида е близко до това, измерено при контролните растения (Фиг. 8А).

При оптимални условия нивата на флавоноидите лутеолин и апигенин в листата са сходни и при двата растителни вида (Фиг. 8Б, В). Водният дефицит значително

повишава съдържанието на флавоноиди при *A. donax* и *H. macra*, но то е много по-ясно изразено при *H. macra*. След рехидратиране нивата на лутеолин остават по-високи в сравнение с контролните растения, както при *A. donax*, така и при *H. macra* (Фиг. 8Б). Количеството апигенин при възстановените растения намалява до контролните стойности и при двата растителни вида (Фиг. 8В).



Фиг. 8 Съдържание на хидроксиканелени киселини (HCA) (А), лутеолин (Luteolin) (Б) и апигенин (Apigenin) (В) в листата на контролни, засушени и възстановени растения *A. donax* и *H. macra*. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

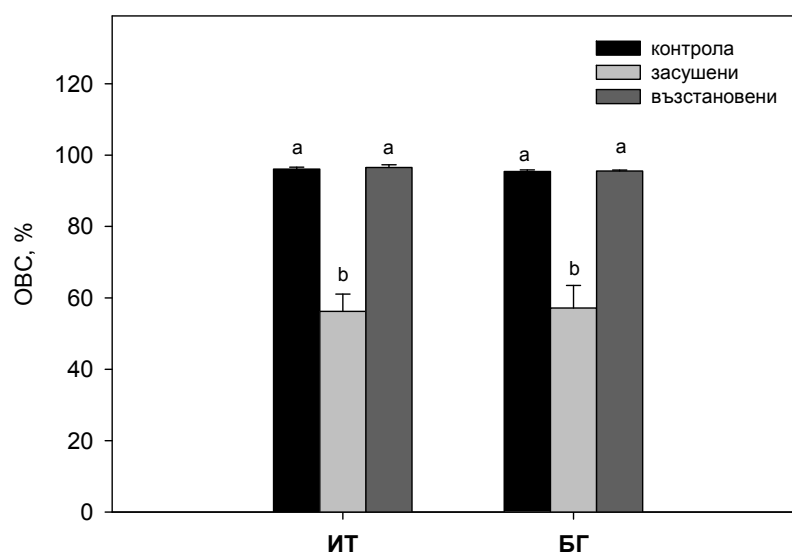
Засушаването, както и много други стресови фактори, повишава биосинтезата на фенолпропаноиди (Olsen et al. 2009; Tattini et al. 2004; Agati et al. 2012), най-вероятно вследствие на нарушаване на фотохимичната активност на фотосинтетичната електрон-транспортна верига (Aktar et al. 2010) или хомеостаза на АКФ (Babu et al. 2003; Pollastri & Tattini 2011; Agati et al. 2012). Получените от нас резултати показват значително увеличаване на съдържанието на фенолните съединения (HCA, лутеолин и апигенин) в отговор на засушаването, особено при *H. macra*, потвърждавайки, че водният дефицит индуцира по-сериозни увреждания при *H. macra*, в сравнение с *A. donax*, в резултат на които се активира по-мощен арсенал от защитни реакции (Agati et al. 2012). А именно, при засушените растения *H. macra* е измерена значително по-висока концентрация на фенолпропаноиди ($\approx 93 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), в сравнение с *A. donax*. Предполага се, че голяма част от тези метаболити се натрупват предимно в мезофилните, а не в епидермалните клетки (Agati et al. 2009, 2012).

Изопреноидите и фенолпропаноидите се синтезират и разпределят в различни листни компартменти и защитават листата от стресови въздействия (Tattini et al. 2015). Съществуват експериментални данни, доказващи съществуването на функционален синергизъм между тези метаболити, а именно растения с потисната изопренова емисия продуцират по-малко фенолпропаноиди (Behnke et al. 2010b), и растения, при които изопреновата емисия е стимулирана образуват повече фенолпропаноиди (Tattini et al. 2014; Harvey & Sharkey 2016). Обаче нашите резултати показват, че в условия на воден дефицит растенията, инвестиращи в изопреноиди, активират защитни механизми, които позволяват по-голяма пластичност към временно състояние на стрес, както е отбелязано от Loreto & Fineschi (2015) за изопреновите емитери, докато растенията, които инвестират повече в биосинтезата на фенолпропаноиди, не успяват да избегнат увреждане на фотосинтетичния апарат, но успяват да се справят с продължителното излагане на оксидативен стрес. Тъй като нашият експеримент се ограничава до контрастиращи видове от подсемейство *Agundoideae*, тази идея трябва да бъде потвърдена от допълнителни експерименти при различни растителни видове.

Сравнителен физиологичен анализ на два екотипа *A. donax* – Сребърна (Силистра, България) (БГ) и Сесто Фиорентино (Флоренция, Италия) (ИТ)

Относително водно съдържание в листата на два екотипа *A. donax*

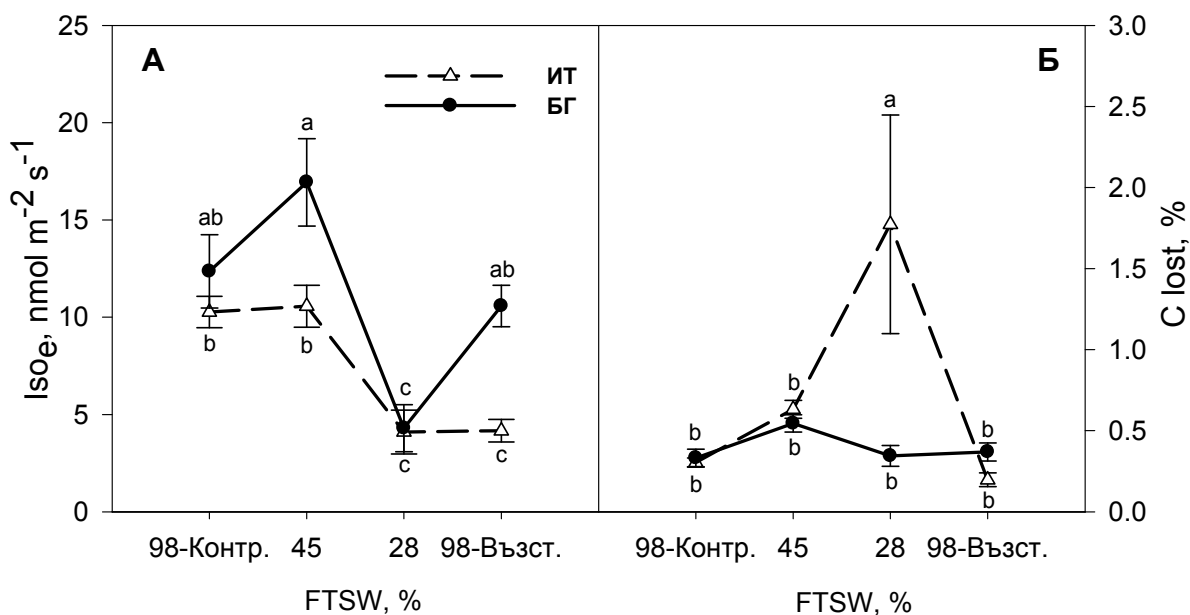
В резултат на силния воден дефицит ОВС в листата намалява в еднаква степен и при двата екотипа ($\approx 55\%$). След рехидратиране водният стаутс на листата се възстановява, достигайки нивото в контролните растения (Фиг. 9), въпреки че отвореността на устицата се възстановява много по-бавно и не напълно.



Фиг. 9 Относително водно съдържание (ОВС) при два екотипа *A. donax* (БГ и ИТ) контролни, засушени (28% FTSW) и възстановени растения. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE ($n=3$). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

Ефект на засушаването върху изопреновата емисия при два екотипа *A. donax*

При контролни условия двата екотипа *A. donax* имат сходна изопренова емисия (Фиг. 10А). При БГ умереното засушаване стимулира изопреновата емисия, докато при ИТ тя остава непроменена и значително по-ниска от тази при БГ екотип. В резултат на силния воден дефицит изопреновата емисия и при двата екотипа е значително подтисната – с около 60%. След рехидратиране при БГ екотип изопреновата емисия се възстановява до 85% от тази при контролните растения, докато при ИТ екотип тя остава ниска.



Фиг. 10 Промени в скоростта на изопренова емисия (Iso_e) (А) и процента на загуба на въглерод под формата на изопрен ($C\ lost\ \%$) (Б) в два екотипа *Arundo donax*, ИТ (Δ) and БГ (\bullet), в контролни условия, изложени на умерен воден дефицит (45% FTSW), силен воден дефицит (28% FTSW) и след рехидратиране. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE ($n=10$). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$

Стимулирането на изопреновата емисия при БГ екотип, в резултат на умереното засушаване, вероятно е свързано с активиране на изопреноидния биосинтетичния път в хлоропластите, което от своя страна защитава фотосинтетичния апарат от образувалите се, вследствие на засушаването, АКФ. Тези резултати са в съгласие с предишни изследвания, проведени с трансгенни растения (Behnke et al. 2007; Ryan et al. 2014; Tattini et al. 2014), в които е установено, че в присъствие на изопренова емисия фотосинтетичният апарат е по-добре защитен и се образуват по-малко АКФ, което от своя страна намалява мембранните увреждания. Нашите резултати също така потвърждават антиоксидантната функция на изопрена в условия на стрес вследствие на засушаването (Vickers et al. 2009b; Velikova et al. 2011; Selmar & Kleinwachter 2013). Считаме, че повишената изопренова емисия при БГ екотип, в ранните етапи на засушаването, има защитна роля, което се потвърждава и от по-доброто възстановяване на този екотип.

Силният воден дефицит инхибира значително емисията на изопрен и при двата екотипа. Потискането на изопреновата емисия основно се свързва с недостатъчно

наличие на въглерод и енергия (АТФ и НАДФН) за биосинтезата на изопрен, които се осигуряват от фотосинтезата (Brilli et al. 2007; Fortunati et al. 2008; Tattini et al. 2014). Алтернативни източници на въглерод като захари (Kreuzwieser et al. 2002; Schnitzler et al. 2004), скорбяла в хлоропластите (Karl et al. 2002) или рефиксиране на CO₂ в процеса на дишане на светло (Anderson et al. 1998; Loreto et al. 2004), също могат да доставят въглерод за изопреновата биосинтеза, когато фотосинтезата е напълно инхибирана. Но в нашия експеримент с *A. donax* фотосинтезата не е напълно потисната и ние считаме, че други източници на въглерод, различни от процеса фотосинтеза, не са активирани за неговата биосинтеза. След рехидратиране изопреновата емисия се възстановява само при БГ, докато при ИТ екотип тя остава потисната, вероятно поради настъпили промени в активността на ензима изопрен синтаза (Fortunati et al. 2008).

Някои изследвания показват, че фотосинтезата е много по-чувствителна на умерено засушаване в сравнение с изопреновата емисия (Brüggemann & Schnitzler 2002; Brilli et al. 2007; Fortunati et al. 2008), каквото се наблюдава при ИТ екотип в условия на силен воден дефицит. Това води до повишаване на процента C lost в условия на стрес (Centritto et al. 2011). Фактът, че изложени на воден дефицит, растенията продължават да използват фиксирания въглерод за биосинтеза на изопрен, води до предположението, че изопреновата емисия дава преимущество на растенията и подпомага преодоляването на стресовите условия (Brüggemann & Schnitzler 2002). Предполага се, че изопреновата емисия повишава толерантността на растенията към засушаване чрез регулиране образуването на АКФ и стабилизиране на тилакоидните мембрани в условия на окислителен стрес (Loreto & Velikova 2001; Vickers et al. 2009; Velikova et al. 2011, 2015; Ryan et al. 2014; Tattini et al. 2014).

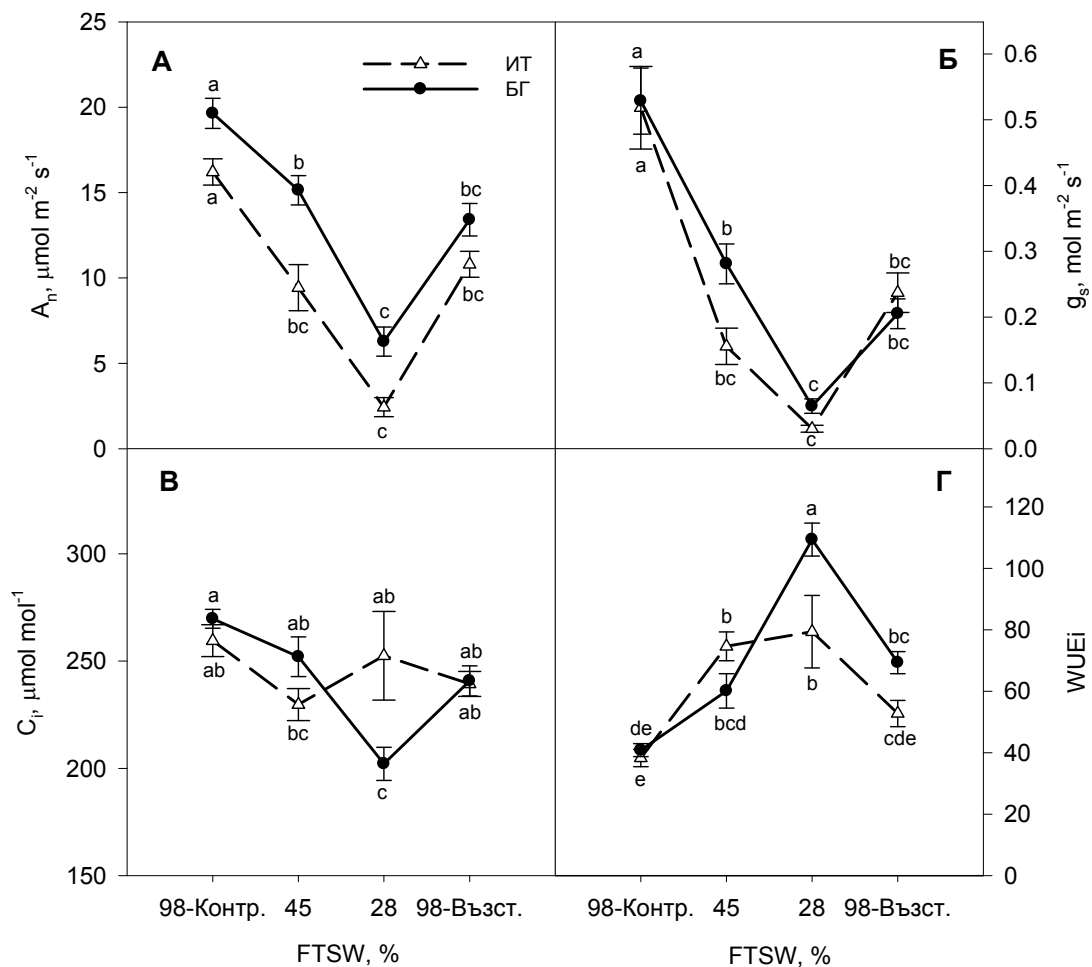
Промени във фотосинтетичната активност на два екотипа A. donax

В условията на пълна почвена влажност БГ екотип се характеризира с по-висока скорост на фотосинтезата в сравнение с ИТ, макар тази разлика да не е статистически достоверна (Фиг. 11А). Двата екотипа реагират на засушаването с понижаване на фотосинтезата, което при умерения стрес е значително по-слабо при БГ екотип в сравнение с ИТ. В крайния етап на засушаването фотосинтезата и при двата екотипа е потисната със 70-80%, спрямо контролните растения. След рехидратиране фотосинтезата се възстановява и при двата екотипа, но не достига тази, измерена в контролните растения.

Промените в g_s следват тези на фотосинтезата по време на дехидратацията на растенията. Устичната проводимост е значително намалена още в ранните етапи на засушаването, по-ясно изразено при ИТ (Фиг. 11Б). Силният воден дефицит драстично понижава g_s и при двата екотипа и след рехидратиране не се възстановява при нито един от тях.

В контролни условия е измерена сходна вътреклетъчна концентрация на CO_2 (C_i) и при двата екотипа (Фиг. 11В). Умереното засушаване води до понижване на C_i . При силен воден дефицит ВГ има значително по-ниска C_i , докато при ИТ екотип C_i слабо се повишава, макар и статистически недостоверно. При възстановените растения C_i е близко до това при контролните растения и при двата екотипа.

Ефективността на използване на водата (WUE_i) в контролни условия е сходна при двата екотипа (Фиг. 11Г). Засушаването значително стимулира WUE_i както при БГ, така и при ИТ. При силен воден дефицит БГ екотип се характеризира с по-висока WUE_i . След рехидратиране WUE_i намалява, но и при двата екотипа остава по-висока в сравнение с контролите.



Фиг. 11 Промени в скоростта на фотосинтезата (A_n) (A), устичната проводимост (g_s) (Б), концентрацията на CO_2 в междуклетъчните пространства (C_i) (В), ефективността на използване на водата (WUE_i) (Г) в два екотипа *Arundo donax*, ИТ (Δ) and БГ (\bullet), в контролни условия, изложени на умерен воден дефицит (45% FTSW), силен воден дефицит (28% FTSW) и след рехидратиране. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE ($n=10$). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$

За разлика от изопреновата емисия, която е устойчива на засушаване, фотосинтезата е един от първите физиологични процеси, които се повлияват от водния дефицит (Lawlor & Cornic 2002; Munns 2002; Signarbieux & Feller 2011). Понижаването на фотосинтезата при засушаване може да се дължи както на дифузионни, така и на метаболитни ограничения (Cornic 2000; Centritto et al. 2003; Chaves et al. 2009, 2011; Evans et al. 2009). Дифузионната лимитация ограничава фотосинтезата чрез понижаване на CO_2 концентрацията в хлоропластите. Затварянето на устицата е основната причина за намаляване на фотосинтезата в ранните етапи на засушаване. При по-силен воден дефицит прогресивно се увеличава значението на метаболитните увреждания, настъпили вследствие на промени във фосфорилирането и цикъла на Калвин, за потискане на фотосинтезата (Long & Bernacci 2003; Chaves et al. 2011).

Двата екотипа реагират на засушаването с понижаване на фотосинтезата, но при умерен воден дефицит това е значително по-слабо изразено при БГ екотип в сравнение с ИТ. Инхибирането на фотосинтезата в ранните етапи на засушаване е свързано преди всичко с намалена устична проводимост и при двата екотипа (Фиг. 11Б), което се явява и общ отговор на растенията към засушаване. Затварянето на устицата ограничава постъпването на CO_2 в листата и води до намаляване на наличния CO_2 , използван в процеса на карбоксилиране (Flexas et al. 2004; Grassi & Magnani 2005; Erismann et al. 2008; Chaves et al. 2009). В нашия експеримент с *A. donax* се установява намаляване на C_i (Фиг. 11В), което е в синхрон със затварянето на устицата. Следователно, при умерен воден дефицит намаляването на фотосинтезата при *A. donax* е свързано преди всичко с дифузионно лимитиране на фотосинтезата, и отсъствие на биохимични фактори, ограничаващи фотосинтезата (Cornic 2000). Намалената устична проводимост също се свързва и с нарастване на съдържанието на абцисиновата киселина (АБК) (Zhang & Davies 1990). Наскоро, Haworth et al. (2016), сравнявайки отговорите на два екотипа *A. donax* към засушаване, показват, че по-толерантният от изследваните

екотипове натрупва повече свободна и свързана АБК, и предполагат че по-високата толерантност към засушаване е свързана с натрупването на по-високи нива на АБК (Barta & Loreto 2006).

Силният воден дефицит инхибира фотосинтезата с около 70-80% и при двата екотипа, което е съпроводено с почти напълно затваряне на устицата. Трябва да се отбележи, че при тези условия C_i намалява значително при БГ, докато при ИТ екотип остава високо и е близко до стойностите, измерени при контролните растения. Следователно, силно потиснатата фотосинтеза при БГ екотип е в резултат преди всичко на дифузионни фактори. От друга страна, C_i при ИТ екотип остава непроменено, което показва превес на метаболитните фактори, ограничаващи фотосинтезата (Lawlor & Cornic 2002; Centritto et al. 2011), и по-ниска адаптационна способност на този екотип към засушаване. Често при растения, които са чувствителни към засушаване, се наблюдават метаболитни нарушения във фотосинтезата (Ashraf et al. 2004; Ashraf & Harris 2013). Това би могло да се дължи на намаляване на карбоксилиращата активност на Рубиско (Parry et al. 2002) или на намалена регенерация на субстрата рибулозо-1,5-бисфосфат (Medrano et al. 2002). И при двата екотипа се установява значително инхибиране на фотосинтетичните параметри J_{max} , V_{cmax} и TPU в резултат на силния воден дефицит (Табл. 2 от дисертацията), но след рехидратиране фотосинтетичните параметри се възстановяват по-добре при БГ екотип.

Предполага се, че по-добро възстановяване на растенията от приложения стрес протича, само когато преобладават дифузионните фактори, лимитиращи фотосинтезата (както е при БГ екотип), а не когато са налице биохимични увреждания на фотосинтетичния апарат (както е при ИТ екотип) (Flexas & Medrano 2002; Flexas et al. 2004). За по-доброто възстановяване на БГ екотип вероятно спомага възстановената изопренова емисия, която достига нивата, измерени преди стреса, докато при ИТ екотип емисията на изопрен остава ниска и след рехидратирането на растенията. Фотосинтезата не се възстановява напълно при нито един от изследваните екотипове, но фотосинтетичните параметри, V_{cmax} , J_{max} и TPU (Табл. 2 от дисертацията), достигат контролните стойности само при БГ растения след рехидратиране. Отново важна роля за това може да има по-високата изопренова емисия при БГ екотип.

Съществуват експериментални доказателства, че присъствието на изопрен увеличава флуидността на тилакоидните мембрани и спомага за поддържане потока на електрони между ФС2 и ФС1, особено при стрес (Velikova et al. 2011), но също така и при оптимални физиологични условия (Pollastri et al. 2014). Затова ние предполагаме,

че наблюдаваните различия между екотиповете вероятно се дължат на по-ефективния електронен транспорт при БГ екотип, който се характеризира и с по-висока изопренова емисия при умерено засушаване и след възстановяване (Lawlor & Cornic 2002; Wentworth et al. 2006; Ashraf & Harris 2013).

Ефективността на използването на водата, изчислена като отношение между фотосинтезата и устичната проводимост (WUE_i), е важна екофизиологична характеристика, която е и надежден показател доколко растенията ефективно използват водата при воден дефицит (Medrano et al. 2009). Двата изследвани екотипа *A. donax* имат сходни стойности WUE_i , измерени в контролни условия (Фиг. 11Г). Умереното засушаване чувствително стимулира WUE_i , което е свързано с по-силното намаляване на устичната проводимост, в сравнение с инхибирането на фотосинтезата. Нашите резултати ясно показват стриктния устичен контрол в началните етапи на засушаване (Ma et al. 2014; Velikova et al. 2016). Измерените стойности в условията на засушаване са значително по-високи в сравнение с други тревисти растения ($25-70 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (Medrano et al. 2009), особено при БГ екотип, което подчертава потенциалът на *A. donax* да се справя с почвеното засушаване и успешно да преживява големи колебания във водообезпечаването (Sánchez et al. 2015). Със засилване на водния дефицит WUE_i продължава да нараства само при БГ, докато при ИТ остава на нивата, измерени в условията на умерен стрес. След рехидратиране стойностите на WUE_i се запазва високо при БГ, а при ИТ екотип намалява до стойностите, измерени при добре оводнените растения, показвайки по-добра стратегия за използването на водата (Bacelar et al. 2012) и по-добра адаптационна способност към намалена водообезпеченост на БГ екотип, в сравнение с ИТ (Ares et al. 2000; Chaves et al. 2009).

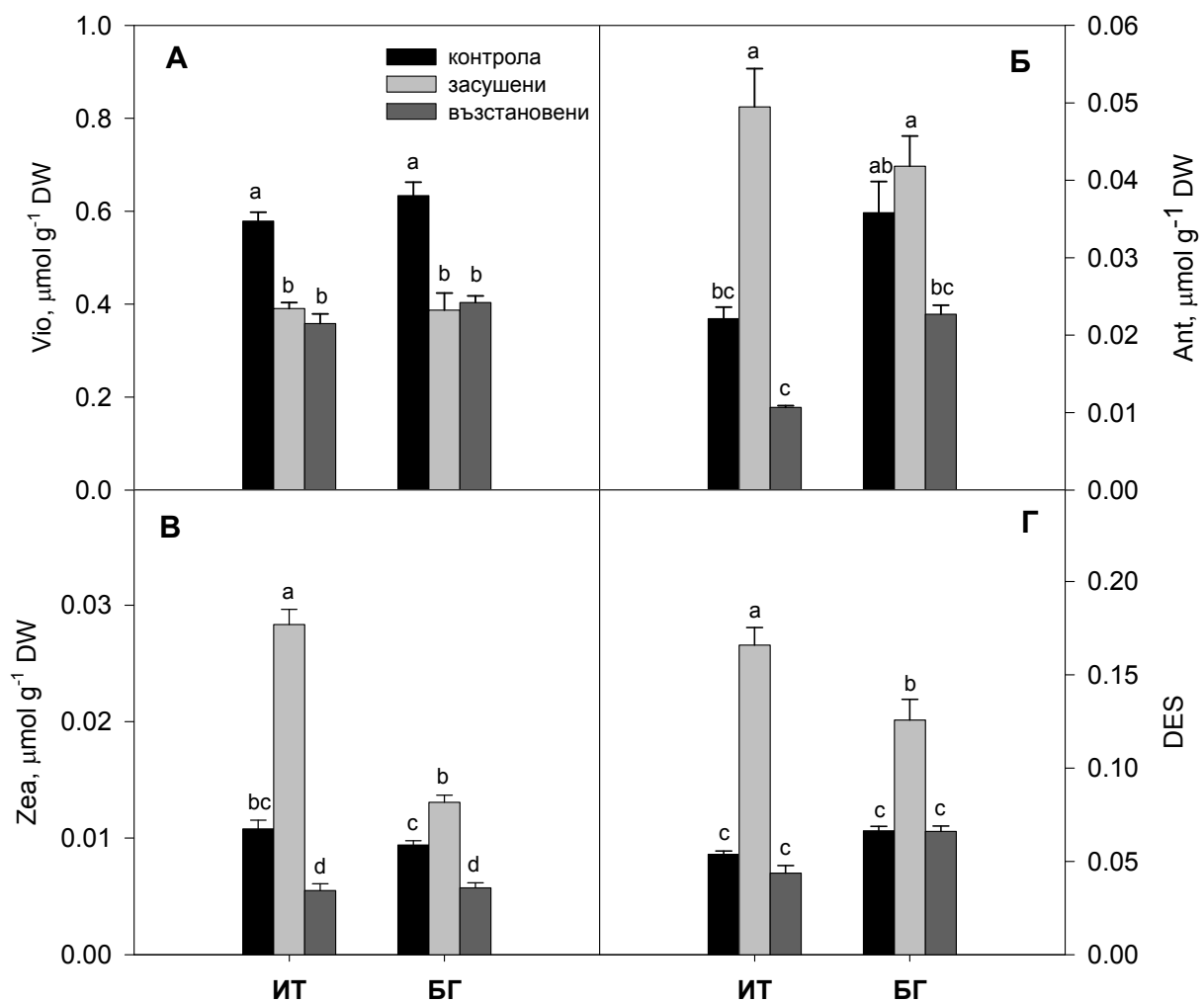
Пигментно съдържание в листата на два екотипа A. donax

Нивото на пигментите от ксантофиловия цикъл е сходно и при двата екотипа в началото на експеримента, преди прилагане на засушаването (Фиг. 12А-В). Водният дефицит намалява в еднаква степен съдържанието на виолаксантин в БГ и ИТ екотипове (Фиг. 12А). Нивата на антераксантин значително нарастват само при ИТ екотип в отговор на засушаването (Фиг. 12Б). Засушаването е причина за увеличаване на зеаксантина в листата на ИТ екотип (2.6 пъти), докато натрупването на зеаксантин в листата на БГ екотип е по-слабо (Фиг. 12В). След рехидратиране, съдържанието на виолаксантин не се възстановява и остава ниско и при двата екотипа, а съдържанието

на антераксантин и зеаксантин значително намалява в сравнение с нивата, измерени преди началото на стреса.

Ролята на нелетливите изопrenoиди (каротеноидите) в отстраняването на АКФ в условия на окислителен стрес, до какъвто води засушаването, е добре известна (Munné-Bosch & Alegre 2000; Navaux et al. 2007; Du et al. 2010). При силен или продължителен воден дефицит нелетливите изопrenoиди могат да заместят изопрена като антиоксиданти, предоставяйки по-добра защита срещу продължителния окислителен стрес (Tattini et al. 2014; Loreto & Fineschi 2015).

Депоксидацията на пигментите от ксантофиловия цикъл (DES) представлява механизъм за дисипация на излишната енергия в условия на стрес, и има важна роля при стрес и пряка връзка с нефотохимичното гасене (Cazzonelli 2011; Jahns & Holzwarth 2012).



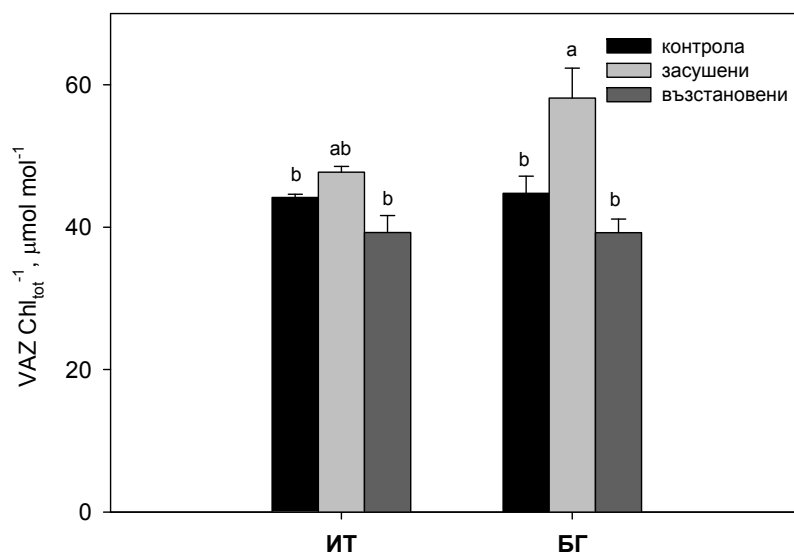
Фиг. 12 Съдържание на виолаксантин (Vio) (А), антраксантин (Ant) (Б), зеаксантин (Zea) (В) и деепоксидация на ксантофилите (DES) (Г) в листата на контролни, засушени (28% FTSW) и възстановени растения от два екотипа *A. donax* (ИТ и БГ). Резултатите са представени като средна стойност \pm SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

Нивото на деепоксидация на ксантофилите е сходно при двата екотипа в условията на пълно водно обезпечаване, преди засушаване и след рехидратиране (Фиг. 12Г). Значителното увеличаване на антраксантина и зеаксантина при засушаване е причина и за по-високото ниво на DES, което е по-ясно изразено при ИТ екотип, и предполага, че този екотип изпитва по-силен окислителен стрес (Munné-Bosch & Peñuelas 2004). След рехидратиране DES намалява до контролните стойности и при двата екотипа.

Повишаването на нивата на зеаксантина и антраксантина, което обаче не е съпроводено с увеличаване на количеството виолаксантин, според някои автори може да се разглежда като механизъм за поддържане стабилността на мембраните (Navaux et al. 2007; Tattini et al. 2014). В частност, повишаването на съдържанието на зеаксантин в условия на силен стрес, когато изопреновата емисия е потисната, подсказва съществуването на тясна кооперация между летливите и нелетливите изопреноиди при запазването целостта на тилакоидните мембрани (Singsaas et al. 1997; Beckett et al. 2012), вероятно чрез ограничаване на пероксидирането на липидите в мембраните (Ramel et al. 2012). Тъй като изопренът и каротеноидите имат общ биосинтетичен път, според някои автори изопреновата биосинтеза в условия на засушаване може да стимулира целия изопреноиден метаболизъм в хлоропластите (МЕФ пътя), водейки до повишена биосинтеза на каротеноиди (Brunetti et al. 2014; Tattini et al. 2014).

В добре оводнените листа, преди и след засушаване, отношението между ксантофили и хлорофили ($VAZ \text{ Chl}_{\text{tot}}^{-1}$) е сходно и при двата екотипа (Фиг. 13). В условията на засушаване това отношение значително нараства само в БГ екотип, но не и в ИТ, потвърждавайки общото стимулиране на изопреноидния биосинтетичен път в хлоропластите, и възможно коопериране между летливите и нелетливите изопреноиди (Velikova et al. 2016). Повишаването на $VAZ \text{ Chl}_{\text{tot}}^{-1}$ при БГ при силен воден дефицит, може да се свърже с неговата по-голяма адаптационна способност за разсейване на излишната енергия в условия на стрес (Fini et al. 2014). Неотдавна беше изказано предположението, че летливите изопреноиди (например изопрен) предпазват фотосинтезата от увреждане при умерен стрес, докато ксантофилите са по-ефективни,

когато фотосинтезата е силно инхибирана и нивото на окислителен стрес е по-високо (Beckett et al. 2012). Това предположение е в съответствие с нашите резултати.



Фиг. 13 Съотношение на ксантофилите към общото количество хлорофил ($VAZ\ Chl_{tot}^{-1}$) в листата на контролни, засушени (28% FTSW) и възстановени растения от два екотипа *A. donax* (ИТ и БГ). Резултатите са представени като средна стойност \pm SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведеня Tukey тест с $P < 0.05$.

Според изследвания на Ghirardo et al. (2014), натрупването на ДМАДФ в листата на изопрен-неотделяща топола може да предизвика инхибиране на активността на 1-деокси-D-ксилулозо-5-фосфат синтазата (първия ензим от МЕФ пътя), което от своя страна да доведе до потискане на целия МЕФ биосинтетичен път. Поради това се предполага, че при изопрен отделящите растения използването на ДМАДФ за синтеза на изопрен, намалява запаса от ДМАДФ в хлоропластите и по този начин стимулира изопреноидната биосинтеза (Tattini et al. 2014). Това би могло да даде логично обяснение за по-високите нива на нелетливи изопреноиди в БГ екотип, който екотип се характеризира и с по-висока изопренова емисия.

Съдържание на фенолпропаноиди при два екотипа *A. donax*

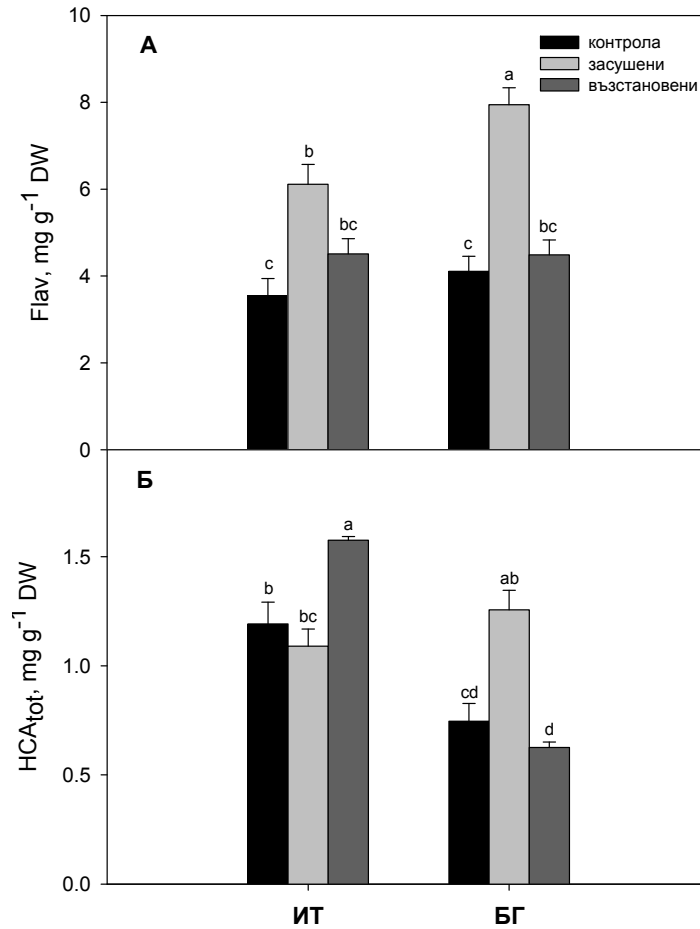
При контролни условия съдържанието на флавоноиди е сходно и при двата екотипа (Фиг. 14А). В отговор на засушаването тяхното съдържание се увеличава, по-

значително при БГ екотип, в сравнение с ИТ. След рехидратация, концентрацията на флавоноиди намалява до нивата, измерени преди началото на засушаването.

Фенилпропаноидите, в частност флавоноидите, играят фундаментална роля в защитата на растенията от фотоинхибиране (Agati et al. 2007, 2012; Brunetti et al. 2015). При растенията, изложени на засушаване, често количеството на слънчевата светлина, достигаща листната повърхност, превишава това, което растенията могат да усвоят, което води до фотоокислителен стрес. Според съвременни изследвания излишната слънчева енергия води до образуване на АКФ, което стимулира биосинтезата на флавоноиди с цел предотвратяване генерирането на големи количества АКФ (Agati & Tattini 2010). Установено е, че биосинтезата на флавоноиди се стимулира при същите условия, при които се инактивират антиоксидантните ензими, потвърждавайки способността на флавоноидите да гасят АКФ, когато растенията са подложени на силен стрес (Agati et al. 2011; Fini et al. 2011). Въз основа на нашите резултати се предполага, че натрупването на флавоноиди вероятно благоприятства толерантността на *A. donax* към засушаване (Hernández et al. 2004), в съчетание с други вторични метаболити, а именно изопреноидите (Tattini et al. 2004).

Хидроксиканелените киселини са друга група фенилпропаноиди, някои от които са силни UV-B абсорбенти и предоставят ефективна защита срещу UV увреждания и спомогнат за по-добра адаптация на растенията към условия на силна светлина (Landry et al. 1995; Kolb et al. 2001; Tattini et al. 2004).

В листата на контролните растения *A. donax* съдържанието на хидроксиканелените киселини (НСА) е значително по-високо при ИТ екотип, в сравнение с БГ (Фиг. 14Б). Засушаването индуцира увеличаване на концентрацията на НСА в листата на БГ екотип, но не и при ИТ екотип. След рехидратиране, съдържанието на НСА при БГ екотип намалява до нивата, измерени преди стреса, докато при ИТ екотип то значително нараства, в сравнение с контролните и засушените растения.



Фиг. 14 Съдържание на флавоноиди (Flav) (А) и хидроксиканелени киселини (HCA_{tot}) (Б) в листата на контролни, засушени (28% FTSW) и възстановени растения от два екотипа *A. donax* (ИТ и БГ). Резултатите са представени като средна стойност ± SE (n=3). С букви са означени статистическите различия в средните стойности, въз основа на проведения Tukey тест с $P < 0.05$.

Предполагаме, че значителното стимулиране на HCA при БГ в засушените растения е защитен механизъм за преодоляване на вредното действие на излишната светлина в листата, подложени на воден дефицит. Резултатите потвърждават идеята, че при БГ екотип антиоксидантната система действа по-ефективно и успешно помага на растението да се възстанови от влиянието на стресовия фактор. При ИТ количеството на HCA в листата се повишава само след рехидратиране на растенията, което вероятно се дължи на по-силен окислителен стрес, който изпитва този екотип. Това от своя страна затруднява ефективното действие на антиоксидантната защитна система.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящата дисертационна работа представя нов подход за изучаване на физиологичната роля на биогенния изопрен, а именно чрез сравняване на близкородствени растителни видове, които се характеризират с различен капацитет да отделят изопрен, каквито са изследваните видове от подсемейство *Arundinoideae*. Този сравнителен подход може да се използва и при растителни видове от други семейства.

В заключение, трябва да се отбележи, че проведеното сравнително изследване между *A. donax* и *H. macra* даде възможност да се изяснят функционалните и метаболитни особености при двата вида, които определят тяхната реакция към засушаване. Получените резултати обясняват по-голямата пластичност и широко разпространение на *A. donax*, в сравнение с *H. macra*. Именно, *A. donax* по-ефективно ограничава загубата на вода при засушаване посредством координирано намаляване на устичната и мезофилна проводимост, като по този начин се постига значително по-добра ефективност на използване на водата при стрес; *A. donax* притежава и по-активна антиоксидантна система, която защитава фотосинтетичния апарат от увреждане. Тези особености при *A. donax* спомагат за по-доброто възстановяване след засушаване, достигайки почти пълно възстановяване на фотосинтетичната активност, близка до тази на нестресираните растения.

Предполага се, че основна причина (или една от причините) за повишената толерантност към засушаване на *A. donax*, в сравнение с *H. macra*, може да се дължи на неговата способност да отделя изопрен. Доказано е, че изопренът подобрява стабилността и интактността на тилакоидните мембрани и регулира количеството на стрес-индуцирани АКФ (Tattini et al. 2014). Стимулирането на МЕФ биосинтетичния път в условия на засушаване може да доведе до редица положителни последствия, отговорни за наблюдаваната устойчивост на *A. donax*. Установено е, че способността на изопрен-отделящия вид *A. donax* да се възстановява по-добре от продължително засушаване се асоциира с повишена продукция на нелетливи изопреноиди (т.е. каротеноиди), мощни антиоксиданти, докато изопрен неотделящият вид *H. macra* инвестира повече в синтезата на фенилпропаноиди, които са по-слабо ефективни в защитата на фотосинтетичния апарат. Получените резултати за *A. donax* и *H. macra* потвърждават предположението на Loreto & Fineschi (2015), че растенията „инвестиращи” въглерод и енергия в биосинтезата на изопреноиди, активират по-

ефективни защитни механизми, които им позволяват по-бързо и по-добро възстановяване от продължителното въздействие на стресовия фактор. Докато растенията образувачи повече фенилпропаноиди не успяват да предотвратят настъпване на увреждания на фотосинтетичния апарат, причинени от излагането на оксидативен стрес, и се възстановяват по-слабо. Освен това нашите резултати потвърждават предположената съвместна регулация на биосинтезата на изопреноиди и фенилпропаноиди (Brunetti et al. 2015a; Harvey & Sharkey 2016; Tattini et al. 2014).

С проведените експерименти върху два екотипа *A. donax* установихме, че засушаването води до значително потискане на фотосинтетичната активност и при двата екотипа. Те показаха съществени различия в биосинтезата на вторични метаболити в условия на воден дефицит. Предполагаме, че стимулирането на биосинтезата на изопреноиди и фенилпропаноиди (флавоноиди и хидроксиканелени киселини) в BG екотип може да се свърже с по-голямата устойчивост на фотосинтетичния апарат при засушаване, както и по-доброто възстановяване на метаболизма на Калвиновия цикъл след рехидратиране (Tattini et al. 2014, 2015; Brunetti et al. 2015). В резултат на това можем да заключим, че компонентите на антиоксидантната система кооперират по-ефективно в BG екотип, за да предотвратят летален ефект от оксидативния стрес, настъпващ при продължително засушаване.

Като се вземат предвид глобалните проблеми с недостиг на вода и интереса към *A. donax* за култивиране (Pilu et al. 2013), установяването на устойчиви на засушаване екоципове се явява от голямо практическо и икономическо значение. Поради стерилността на семената на *A. donax*, конвенционалното размножаване чрез полова хибридизация не може да бъде осъществено. От друга страна вегетативното размножаване на *A. donax* води до ниско генетично разнообразие и понижава шансовете за откритие на нови генотипове или подвидове (Ahmad et al. 2008; Marini et al. 2010; Pilu et al. 2012, 2013). Затова изясняването на различията в толерантността към засушаване на изследваните екоципове *A. donax* е практически уместно и значимо за култивирането на *A. donax* в региони с намалена водообезпеченост.

ИЗВОДИ

- Установено е, че изопрен-отделящият вид *Arundo donax* при оптимални условия на отглеждане се характеризира с по-добра фотосинтетична активност, по-

висока концентрация на каротеноиди и съответно значително по-ниско нефотохимично гасене и деепоксидиране на ксантофилите, както и по-ниско съдържание на фенилпропаноиди, в сравнение с изопрен-неотделящия вид *Hakonechloa macra*.

- *A. donax* постига по-добра ефективност на използване на водата в период на засушаване, в сравнение с *H. macra*, посредством координирана регулация на устичната и мезофилната проводимост.
- Продължителното засушаване инхибира фотосинтетичната активност и при двата изследвани вида (*A. donax* и *H. macra*), но само изопрен-отделящият *A. donax* се възстановява напълно след рехидратиране на растенията.
- Засушаването води до по-съществено потискане на максималната скорост на карбоксилиране на Рубиско и фотосинтетичния електронен транспорт при *H. macra*, като тези параметри не се възстановяват след прекратяване на стреса, което показва наличието и на биохимично лимитиране на фотосинтезата при растителния вид, който не отделя изопрен. При *A. donax* инхибирането на фотосинтезата се дължи преди всичко на устични фактори.
- Установени са фенотипни различия при растения *A. donax*, произхождащи от среда с различни климатични условия, които обуславят отговора на растенията към засушаване и способността им да се възстановяват.
- Растения *A. donax*, адаптирани към по-сурови условия на околната среда (БГ екотип) се характеризират с по-висока изопренова емисия и фотосинтетична активност и „инвестират“ повече в биосинтезата на нелетливи изопреноиди и флавоноиди, в сравнение с растения, адаптирани към по-благоприятни условия на средата (ИТ екотип).
- Инхибирането на фотосинтезата при БГ екотип в отговор на засушаване е свързано основно с устични фактори, докато причина за намалената фотосинтетична активност при ИТ екотип са и биохимични нарушения.

- По-доброто възстановяване на БГ екотип се дължи на по-високите нива на летливи и нелетливи изопреноиди в сравнение с ИТ екотип.

ПРИНОСИ

- Представен е нов подход за изучаване на физиологичната роля на биогенния изопрен, а именно чрез сравняване на близкородствени растителни видове, които се характеризират с различен капацитет да отделят изопрен.
- Представена е детайлна физиологична, фотохимична и биохимична характеристика на растения с различен капацитет да отделят изопрен, тяхната реакция към засушаване и способност да се възстановяват след прекратяване на стреса.
- Установено е, че летливите и нелетливите изопреноиди ефективно защитават фотосинтетичния апарат при *A. donax* в условията на засушаване и допринасят за пълното възстановяване на растенията след рехидратиране. Неотделящият изопрен вид (*H. macra*) реагира на приложения стрес със стимулиране биосинтезата на фенилпропаноиди.
- Установена е взаимовръзката между изопреновата емисия и биосинтезата на други вторични метаболити (каротеноиди и фенилпропаноиди), а именно изопрен-отделящият *A. donax* има по-активен МЕФ биосинтетичен път, докато при *H. macra* по-активен е фенилпропаноидния биосинтетичен път.
- Установени са физиологични и метаболитни различия при растения *A. donax*, произхождащи от местообитания с различни условия на средата. Тези фенотипни различия определят отговорите на растенията към засушаване и способността им да се възстановяват след приложения стрес.

Публикации на научни резултати по темата на дисертацията:

Velikova V, Brunetti C, Tattini M, **Doneva D**, Ahrar M, Tsonev T, ..., Varotto C (2016) Physiological significance of isoprenoids and phenylpropanoids in drought response of Arundinoideae species with contrasting habitats and metabolism. *Plant, Cell & Environment*, **39** (10), 2185-2197

Doneva D, Ahrar M, Tsonev T, Loreto F, Varotto C, Velikova V (2017) The role of isoprene in two Arundineae species exposed to progressive drought. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, **70** (2), 203-212

Участия в научни мероприятия:

- Plant Volatiles, Exploring the Plant Headspace: Functional Analysis and Emerging Applications, Ventura, CA, 26-31 January, 2014
 - Velikova V, Ahrar M, Romano A, Doneva D, Yordanova V, Michelozzi M, Centritto M, Loreto F. Isoprene emission in Arundinoideae that have potential as biofuel plant species.
- Plant Biology Europe FESPB/EPSO 2014 Congress, 22-26 June 2014, Dublin, Ireland
 - Biogenic Isoprene – Tool for Stress Protection in Arundineae Plants Species.
- Biogenic Hydrocarbons & the Atmosphere, Gordon Research Conference, June 29-July 4, 2014, Girona, Spain
 - Ahrar M, Doneva D, Koleva D, Romano A, Rodeghiero M, Biasioli F, Stefanova M, Wohlfahrt G, Loreto F, Varotto C, Velikova V. Tradeoffs between isoprene emission, carbon gain and water use among different genera of Arundineae.
 - Brunetti C, Doneva D, Gori A, Tattini M, Ferrini F, Koleva D, Stefanova M, Loreto F, Velikova V. Biogenic isoprene – tool for stress protection in Arundineae plant species.
- Plant Physiology and Genetics, Achievements and Challenges, 24-26 September 2014, Sofia, Bulgaria
 - Ahrar M, Doneva D, Koleva D, Stefanova M, Romano A, Biasioli F, Wohlfahrt G, Varotto C, Velikova V. Physiological and structural characteristics of different genera of Arundineae.
- European Plant Phenotyping Network, Plant Phenotyping Symposium, 11-12 November 2015, Barcelona, Spain
 - Ahrar M, Doneva D, Brunetti C, Gori A, Wohlfahrt G, Varotto C, Loreto F, Velikova V. Effect of isoprene on drought tolerance of *Arundo* ecotypes.