



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
Биологически факултет, Катедра „Физиология на растенията“

Марко Илиев Колаксьзов

Хормонална регулация на устойчивостта към
нискотемпературен стрес на *Arabis alpina* от френските Алпи
и Рила планина

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

На дисертация за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Научна специалност:
04.03. Биологически науки (Физиология на растенията)

София, 2015г.

Дисертацията е изработена в Катедра „Физиология на растенията“ на Софийския университет „Св. Кл. Охридски“. Част от изследванията по дисертацията са финансирани по Френско-Български проект за двустранно сътрудничество РИЛА 01/7, 21.06.2013 към Фонд „Научни Изследвания“ при МОН, и по изследователски проект в подкрепа на докторанти № 20 / 28.04.2014 от СУ „Св. Кл. Охридски“.

Дисертационният труд е апробиран на 20.02.2015 г. на разширен катедрен съвет на Катедрата по Физиология на растенията на Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Дисертацията съдържа 131 страници и включва 35 фигури и 4 таблици. Списъкът на цитираната литература съдържа 180 заглавия на латиница и 3 на кирилица.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2015 г. от ч. в зала на Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ на разширено заседание на катедрен съвет на Катедрата по Физиология на растенията.

Бих искал да искам благодарности:

1. На научния си ръководител проф. д-р Е. Ананиев за цялостната и всеотдайната подкрепа и помощта за дисертацията
2. На колегите от Катедра „Физиология на растенията“ за колегиалното отношение и моралната подкрепа.
3. На колегите от ИФРГ за съдействието по експерименталната работа
4. На проф. Мишел Херцог и Фредерик Лапорт от LECA (Laboratoire d'Ecologie Alpine) при Ун-т “Joseph Fourier”, Гренобъл, Франция за приема и предоставената възможност за съвместната работа по транскрипционния анализ на гени (qRT-PCR анализ).
5. На д-р Вацлав Мотика, д-р Петре Добрев за HPLC/GS анализа на ендогенното съдържание на фитохормони на *A. alpina* в Института по Експериментална ботаника, Прага, Чешка Република.
6. На проф. В. Голцев и неговия екип от Катедра „Биофизика“ при БФ на СУ за предоставената възможност за работа с апарата М-РЕА.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ААО – abscisic acid oxidase

СК – cytokinins / цитокинини

СКХ – cytokinin oxidase/dehydrogenase

cZ – cis-zeatin

cZR – cis-zeatin riboside

cZRMP – cis-zeatin riboside monophosphate

DHZ – dihydrozeatin

DHZMP – dihydrozeatin riboside

monophosphate

DHZR – dihydrozeatin riboside

DPA – dihydrophaseic acid

iP – isopentenyladenine

iPR – isopentenyladenine riboside

iPRMP – isopentenyladenine riboside

monophosphate

IPT – isopentenyl transferase

LHCII – light harvesting complex II

MR – modulated 820 nm light reflection

NCED – 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase

NT – (non-tolerant) нетолерантни растения

P680 – реакционен център на ФСII

P700 – реакционен център на ФСI

PA – phaseic acid

PF – prompt fluorescence

PQ – пластохинон

PQH₂ – пластохинон в редуцирана форма
(пластохинол)

Q_A – първичния хинонов акцептор във ФСII

ROS – reactive oxygen species (активни
кислородни форми)

T – (tolerant) толерантни растения

tZ – trans-zeatin

tZR – trans-zeatin riboside

tZRMP – trans-zeatin riboside monophosphate

АБК – абсцизиева киселина

Рубиско – рибулозобисфосфат
карбоксилаза/оксигеназа

ФСI – фотосистема I

ФСII – фотосистема II

01. УВОД

Като неподвижни организми, растенията биват подложени на постоянни изменения в параметрите на околната среда – от денонощни и сезонни циклични промени до внезапни климатични флуктуации. Поради това растенията са развили богат набор от механизми за справяне с неблагоприятните условия на средата, в която живеят. В последните години е постигнат съществен прогрес по отношение на нашите знания за нискотемпературната устойчивост при растенията. Въпреки глобалното затопляне на климата на земята нискотемпературната устойчивост на растенията е особено актуална, тъй като се наблюдават все по-чести ранни затопляния през зимата, които водят до прекъсване на зимния покой на стопански значимите културни насаждения и поражения при тях след рязко връщане на ниските температури (Beniston, 2005; Eccel et al., 2009).

Нискотемпературния стрес оказва комплексно въздействие върху растенията. Основно той поражда клетъчните мембрани и протеини, причинявайки редица неблагоприятни ефекти върху растителната клетка, а оттам и върху растителният организъм като цяло (Nishida and Murata, 1996). В условия на ниски положителни температури растежът на растенията спира, фотосинтезата намалява, корените спират да поглъщат вода и минерални вещества и впоследствие листата губят тургора си и се индуцира хлороза. При по-продължително излагане на ниски температури или при третиране с отрицателни температури по листата започват да се появяват и некротични петна поради увреждането на мембраните, образуване на активни кислородни форми (ROS) и окисление на клетъчните структури и компоненти. Основно ниските температури оказват дехидратиращ ефект, поради увреждането на мембранните функции и на мембрано-асоциираните белтъци. Клетъчната пропускливост се уврежда, така че клетката започва да губи вода, а корените не успяват да възстановят водния баланс. Растителните клетки загубват тургора и растението завяхва. Освен това при излагане на светлинно въздействие в комбинация с ниски температури фотосинтезата не може да протича нормално. В резултат се образуват активни кислородни форми, които увреждат допълнително белтъците, ДНК и окисляват мембранните липиди. При по-сериозно нарушаване пропускливостта на мембраните съдържимото на вакуолите изтича (основната част от което са органични киселини) и клетъчната структура се уврежда.

Нискотемпературния стрес може да се раздели на два вида в зависимост дали ниските температури на които са изложени растенията на над нулата (стрес при температури от 15 °C до 0°C се нарича преохлаждане или chilling stress) или под нулата (замръзване или freezing stress). При температури под нулата освен действието на самите

ниски температури върху клетъчните компоненти се появява и опасността от образуване на ледени кристали и механично разкъсване на клетъчните мембрани.

Нискотемпературния стрес оказва най-големи поражения при растенията върху процеса фотосинтеза. Това беше причината за отделянето на голяма част от настоящата работа на фотосинтезата, фотосинтетичната активност, функционирането на фотосистемите в условия на стрес, както и на количествено определяне на структурни компоненти от фотосинтезата като фотосинтетични пигменти и гени. В условия на ниски температури в комбинация със светлина фотосинтезата не може да протича правилно, поради което се образуват активни кислородни форми (ROS) в големи количества. Въпреки антиоксидантната система на растенията ROS увреждат клетъчните компоненти с голяма скорост, когато образуването им във фотосинтетичния апарат не бъде овладяно. Затова в настоящата работа анализирахме ефекта на ниските температури върху фотосинтетичния апарат на растенията и ролята на ROS в реализация на уврежданията. Като основен хормон на стреса и привиждането на растенията в състояние на покой бе изследвана и АБК и нейните разградни продукти. Основно АБК влияе при затваряне на устицата и устойчивостта на растенията от засушаване (Beardsell and Cohen 1975). Тъй като част от ефектите на нискотемпературния стрес са сходни с ефектите на засушаването, АБК също се натрупва в растенията и регулира функциите им след нискотемпературен стрес. Установено е, че АБК е важна част от аклимацията на растенията за преодоляване на много ниски отрицателни температури (Mantyla et al. 1995; Gusta et al. 1996). Въпреки, че цитокинините, обратно на АБК са хормони на растежа и развитието на растенията, се оказва че те влияят върху процесите и в условия на стрес (Hare et al., 1997; Davies et al., 2004). Те са също така основни регулатори на процесите на стареене, както и на фотосинтезата. Специално при *Arabidopsis*, за разлика от голяма част от растенията от сем. Brassicaceae, например *Arabidopsis* cis-зеатините играят съществена част от хормоналната регулация при нискотемпературен стрес. Поради това, в допълнение към анализа на съдържанието на АБК и транскрипцията на гени от метаболизма на АБК, все по-голям интерес предизвиква и изучаването на участието и на цитокинините в регулацията на отговора на растенията към нискотемпературен стрес.

02. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

02.01. Цел на дисертационния труд:

Изследване механизмите на регулацията на устойчивостта на *Arabidopsis alpina* към нискотемпературен стрес.

02.02. Експериментални задачи:

1. Подбор на популации на *A. alpina* от френските Алпи и от Рила планина, които са толерантни към минусови температури (-7°C) чрез прилагане на сравнителен анализ, както се следва:
 - измерване на изтичането на електролити (electrolyte leakage) от растителните клетки като мярка за интегритета с цел определяне *A. alpina* от различни популации.
 - Определяне на нетната фотосинтетична активност по поглъщането на CO_2 .
2. Определяне на физиологични показатели, в това число:
 - Определяне съдържанието на фотосинтетични пигменти (хлорофил *a* и *b* и каротеноиди).
 - Изследване съдържанието на токофероли като неензимни показатели на антиоксидантната активност на клетките.
3. Определяне на функционалното състояние на ФСII и ФСI посредством методите на бързата хлорофилна флуоресценция (prompt fluorescence) и съответно разсейването на модулираната 820 nm светлина
4. Определяне ендогенното съдържанието на фитохормони (АБК, цитокинини, жасмонова киселина) в толерантната и нетолерантна към минусови температури растения.
5. Изследване скоростта на транскрипция (qRT-PCR анализ) на гени от метаболизма и сигналната трансдукция на АБК и цитокинините.
6. Транскрипционен (qRT PCR анализ) на фотосинтетични гени (гени от ФСII, ФСI и други фотосинтетични гени)

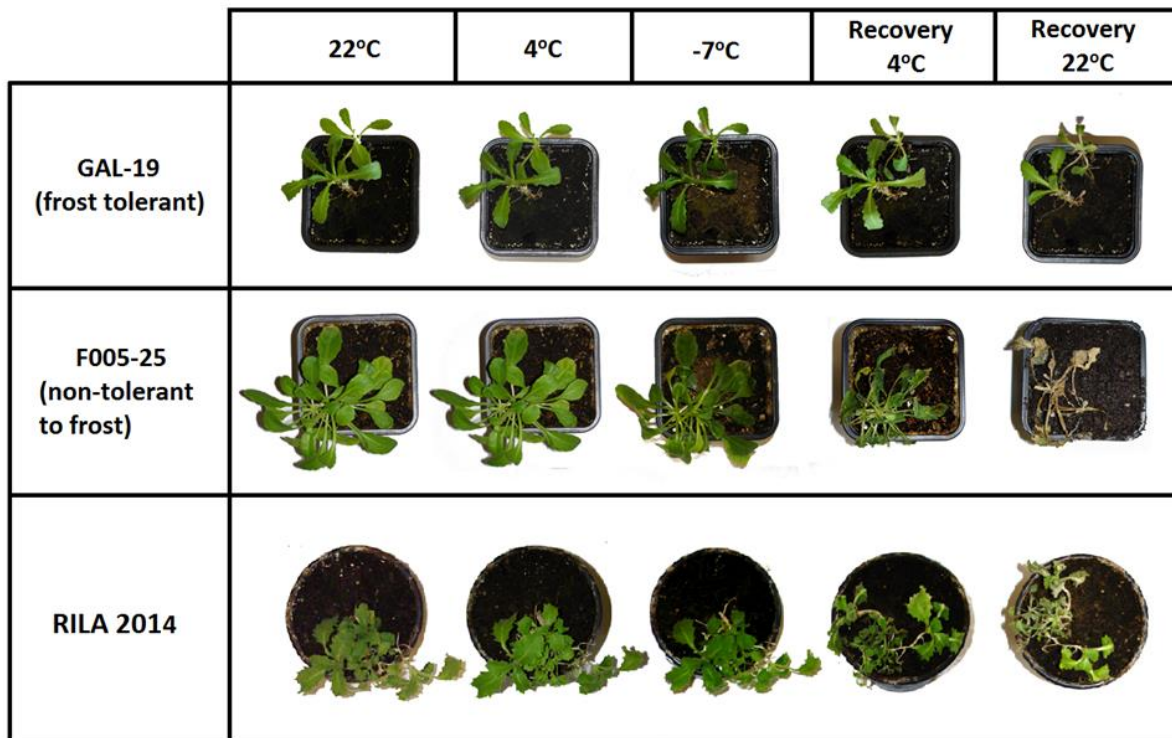
03. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В реализиране на настоящата дисертационна работа бяха използвани следните методи:

- **Измерване на изтичането на свободни електролити от листа третиран с различни отрицателни температури (Azzarello, 2009)**
- **Измерване на нетната фотосинтетична активност по метода на поглъщане на CO₂ и транспирацията (Hunt, 2003)**
- **Измерване на флуоресценцията на хлорофил а с апарати PEA и M-PEA и разсейване на модулирана светлина при 820 nm с апарат M-PEA (Strasser et al., 2010)**
- **Анализ на параметрите на бързата хлорофилна флуоресценция (Strasser et al., 2004; 2010)**
- **Определяне на количеството на фотосинтетични пигменти и токофероли, посредством HPLC анализ (Kunz)**
- **Екстракция и определяне съдържанието на фитохормони чрез HPLC (Dobrev and Kaminek, 2002)**
- **Изолване на тотална РНК и qRT-PCR анализ на експресията на гени от фотосинтетичния апарат и от метаболизма и сигналната трансдукция на фитохормони (Pfaffl, 2001)**

04. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

04.01. Ефект на ниските температури върху растенията от двете популации от Алпите и от популацията от Рила планина

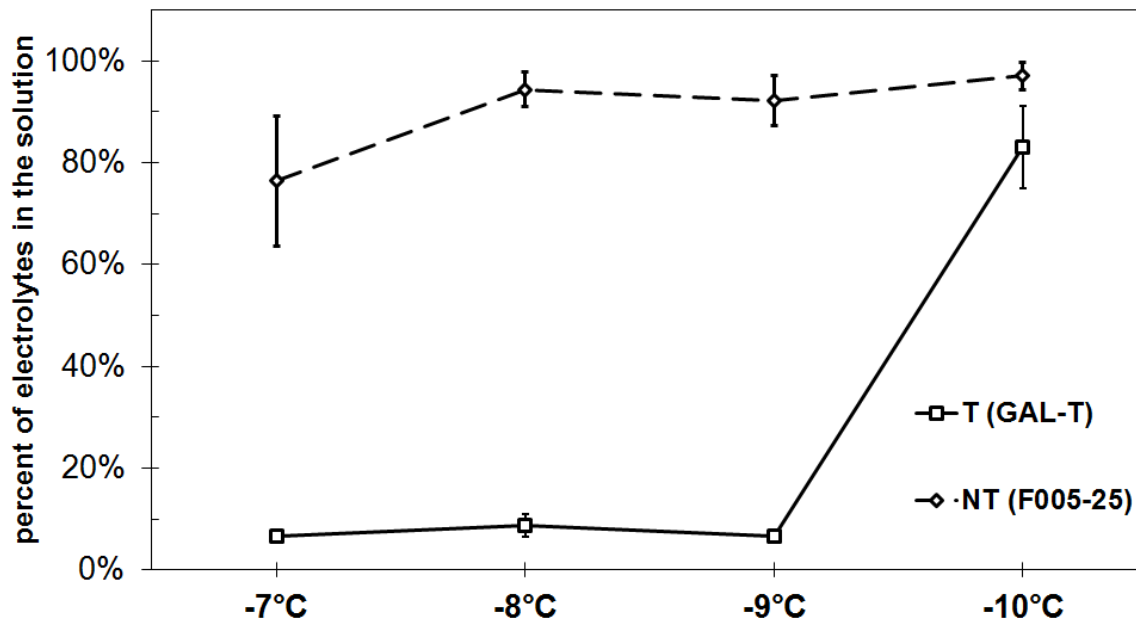


Фиг. 1 Ефект на нискотемпературния стрес върху *Arabis alpina*, растения от популациите GAL (толерантни) и F005 (не-толерантни) и от Рила планина (RILA). Растенията бяха отгледани при 22°C и изложени последователно на преохлаждане (4°C) и измръзване (-7°C), както и на възстановяване при 4°C и 22°C.

Растенията от двете френски (GAL и F005) популации и тези от Рила планина бяха изложени последователно на нискотемпературен стрес от преохлаждане при 4°C и измръзване при -7°C, както и на два периода на възстановяване при 4°C и 22°C (Фиг. 1). И трите типа популации *A. alpina* са толерантни към температура 4°C, както се вижда от Фиг. 11, но притежават различна толерантност по отношение на температури под 0°C. При -7°C растенията от популация GAL и растенията от Рила планина не показаха съществени промени във фенотипа. За разлика от тях, при растенията от популация F005 след третиране при -7°C беше наблюдавана много силно изразена загуба на тургора на листните петури, което е характерна промяна на фенотипа след нискотемпературен стрес (Фиг. 1). След двата периода на възстановяване, при растенията от нетолерантната популация (F005) уврежданията станаха ясно видими и накрая повечето от растенията загиваха. При някои от растенията от Рила планина бяха наблюдавани частични

увреждания след стрес от измръзване, които станаха ясно забележими след периодите на възстановяване.

04.02. Измерване изтичането на електролити (electrolyte leakage)



Фиг. 2 Процентно съотношение на освободени електролити в растения от популации *Arabis alpina* (T, GAL-T), (NT, F005-25). Листа от растенията са третирани при различни температури (-7°C, -8°C, -9°C и -10 °C) в продължение на 30 мин. Отчетени са количествата на освободени електролити като процент от контролата.

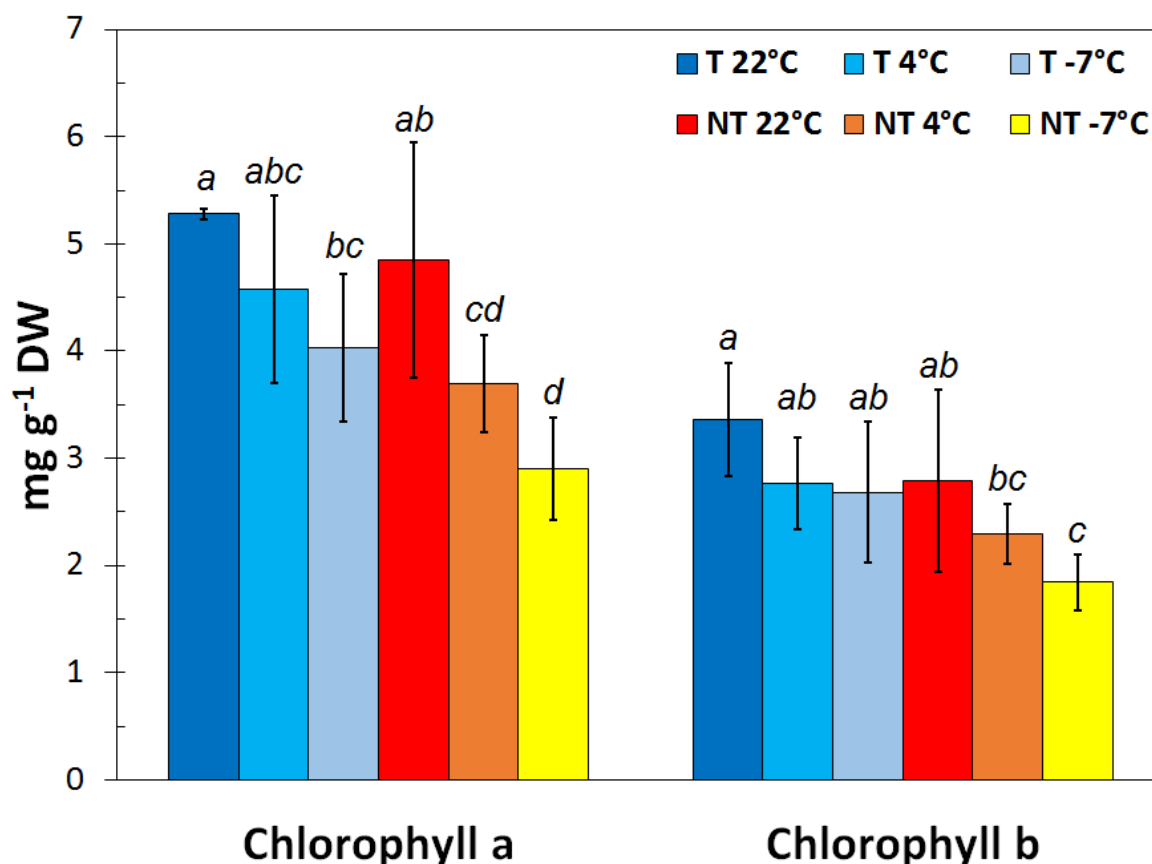
Изтичането на електролити от растителните клетки е пряк показател за жизнеността на клетката като функция от интегритета на мембранната система на клетката. В случай, че клетъчните мембрана и стена са с нарушена цялост, изтичането е по-голямо. По този начин може да се определят много точно границите на поносимостта на стрес при растенията. От Фиг. 2 се вижда, че при нетолерантната популация процентното изтичане на електролити е значително още при -7°C (около 80% при -7°C и над 90% при по-ниски температури), докато при толерантната популация електролитното изтичане е под 10% при -7°C, -8°C и -9°C, а след -10°C нараства до 80%.

04.03. Съдържание на хлорофил *a* и *b* и каротеноидни пигменти

- Съдържание на хлорофилни пигменти

Промените в съдържанието на хлорофил *a* и *b* под влиянието на различните температури са представени на Фиг. 3. В хода на третирането с ниски температури беше установено постепенно намаление в съдържанието и на двата типа хлорофил, като потискането на хлорофил *a* и при двете ниски температури беше по-силно изразено. След преохлаждане (4°C), намалението в съдържанието на хлорофил *a* и хлорофил *b* при

растенията от толерантната популация Т беше съответно 13% и 18%. След третирането с -7°C хлорофил *a* намалява в същата популация почти двойно (24%), докато хлорофил *b* остава почти непроменен (20%). При нетолерантната към измръзване популация NT се запазваше същата тенденция на по-силно намаляване на хлорофил *a* последователно след третиране с 4°C (потискане с 24%) и -7°C (потискане с 40%). Количеството на хлорофил *b* при популацията NT също намаляваше, но в много по-малка степен (18% след преохлаждане и 34% след -7°C , Фиг. 3).



Фиг. 3 Съдържание на хлорофил 'a' и 'b' при толерантна (T) и нетолерантна (NT) към замръзване популации от *Arabidopsis thaliana*, в условия на нискотемпературен стрес (*chilling* 4°C и *freezing stress* -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

Промените в съдържанието на хлорофилните пигменти след въздействие с ниски температури е типично за абиотичен стрес (стрес индуцирано стареене, например светлинен стрес, азотен дефицит), при който първоначално много по-силно намалява съдържанието на хлорофил *a* в сравнение с хлорофил *b*, както и в случая на естественото стареене (Kura-Hotta et al., 1987; Hidema et al., 1992). Тези промени в хлорофилното съдържание са свързани с разграждането на по-голяма част от реакционните центрове

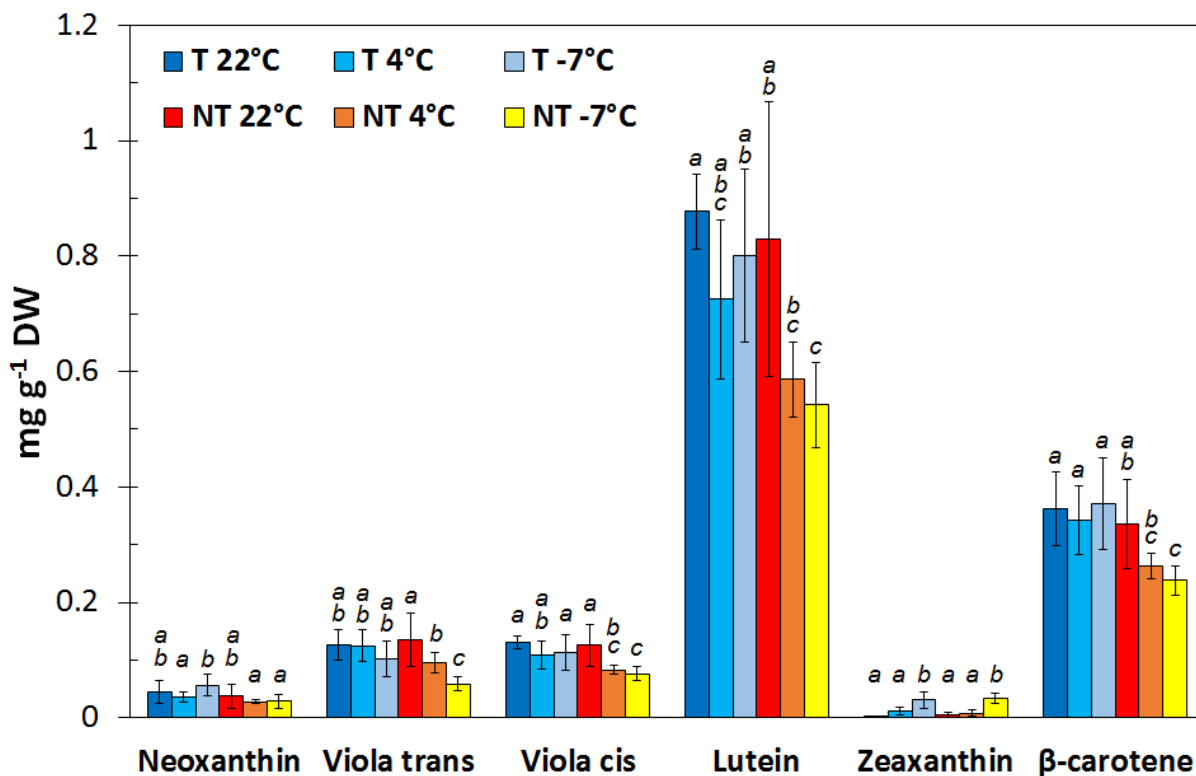
на двете фотосистеми, отколкото на антенните комплекси (Humbeck et al., 1996; Miersch et al., 2000).

- Съдържание на каротеноидни пигменти

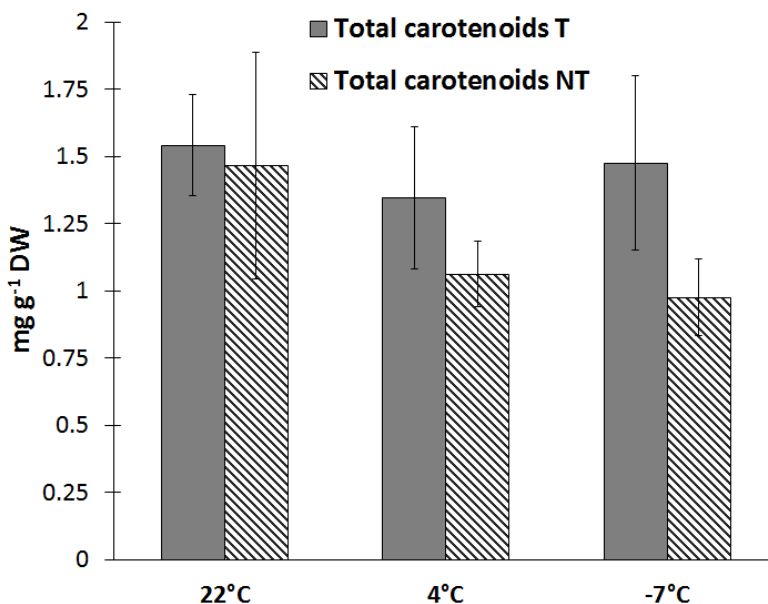
Според HPLC анализа на каротеноидните пигменти в листата на *A. alpina*, най-високо беше съдържанието на лутеин (краен продукт от метаболитната верига на α -каротена) и на β -каротена (Фиг. 4), като количество на лутеина е два пъти по-голямо от това на β -каротена. Ксантофиловите пигменти (зеаксантин, виолаксантин, неоксантин) бяха в значително по-малко количество, а съдържанието на антераксантина беше пренебрежимо малко и не е представено на графиката (Фиг. 4). След периодите на последователно преохлаждане (4°C) и замръзване (-7°C) на растенията, съдържанието на тоталните каротеноидни пигменти почти не се изменяше при популацията Т, докато при популацията NT то рязко намаляваше (с 28% след 4°C и с 34% след -7°C) (Фиг. 5). За разлика от популацията Т, където с понижението на температурата до 4 °C съдържанието на двата основни каротеноида лутеин и β -каротен се запазваше относително непроменено, при популацията NT се наблюдаваше тяхното отчетливо намаляване с около 20-25%, като при лутеина то беше по-силно изразено (30-35%). По-силното намаление на съдържанието на каротеноидни пигменти при NT беше наблюдавано и при пигмента от ксантофиловия цикъл *trans*-виолаксантин. Особено важно беше поведението на втория основен ксантофилов пигмент зеаксантин, чието съдържание се увеличаваше след нискотемпературния стрес и най-вече след третиране с -7°C.

Лутеинът, чието съдържание при висшите растения обикновено е в най-голямо количество, при двете изследвани популации на *A. alpina* възлизаше на 54 - 57% от тоталната пигментна концентрация (Фиг. 4). Следващият по процентно съдържание каротеноиден пигмент при висшите растения е β -каротена (Bungard et al., 1997). Неговият относителен дял при *A. alpina* беше между 23-25%. Неоксантинът при *A. alpina* представляваше около 3-4% и не се промени и при двете изследвани популации след третиране с ниски температури. Накрая, като последен представител на каротеноидните пигменти, 9-*cis*-виолаксантинът също не се променяше значително след нискотемпературния стрес, и неговото съдържание беше в рамките на 8-9%.

Що се отнася до каротеноидните пигменти от ксантофиловия цикъл (зеаксантин и *trans*-виолаксантин), тези пигменти претърпяха най-съществени промени след нискотемпературния стрес (Фиг. 4, 6). *Trans*-виолаксантинът, за който е широко



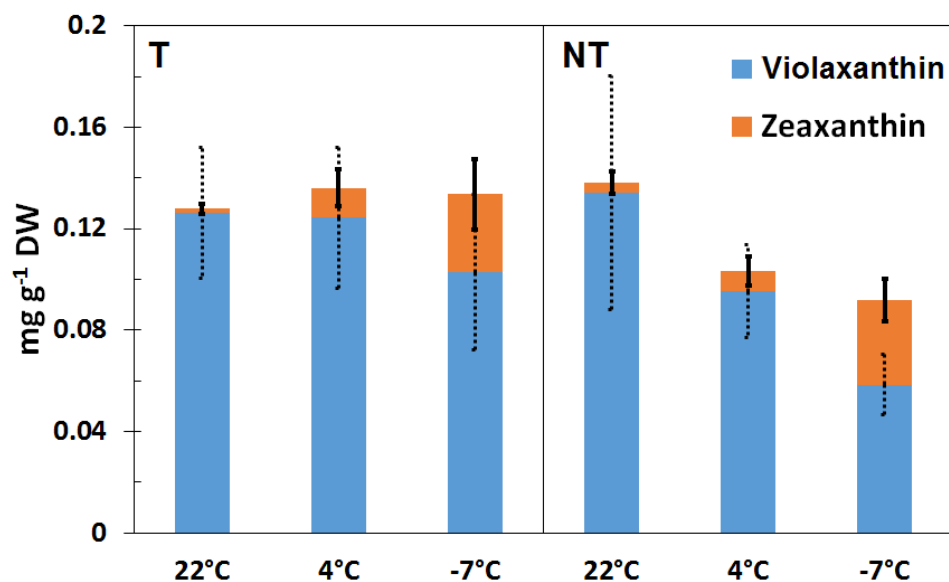
Фиг. 4 Съдържание на каротеноидни пигменти при T и NT популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (преохлаждане stress, +4°C и измръзване, -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.



Фиг. 5 Тотално съдържание на каротеноидни пигменти при T и NT популации от *Arabis alpina*, в условия на ниско температурен стрес (chilling stress, +4°C и freezing stress, -7°C).

известно, че в условия на стрес се де-епоксирира до зеаксантин (Niyogi et al., 1998), намаляваше след минусовия стрес за сметка на повишението в количеството на зеаксантина (Фиг. 6). Интересни са резултатите представени като отношение между

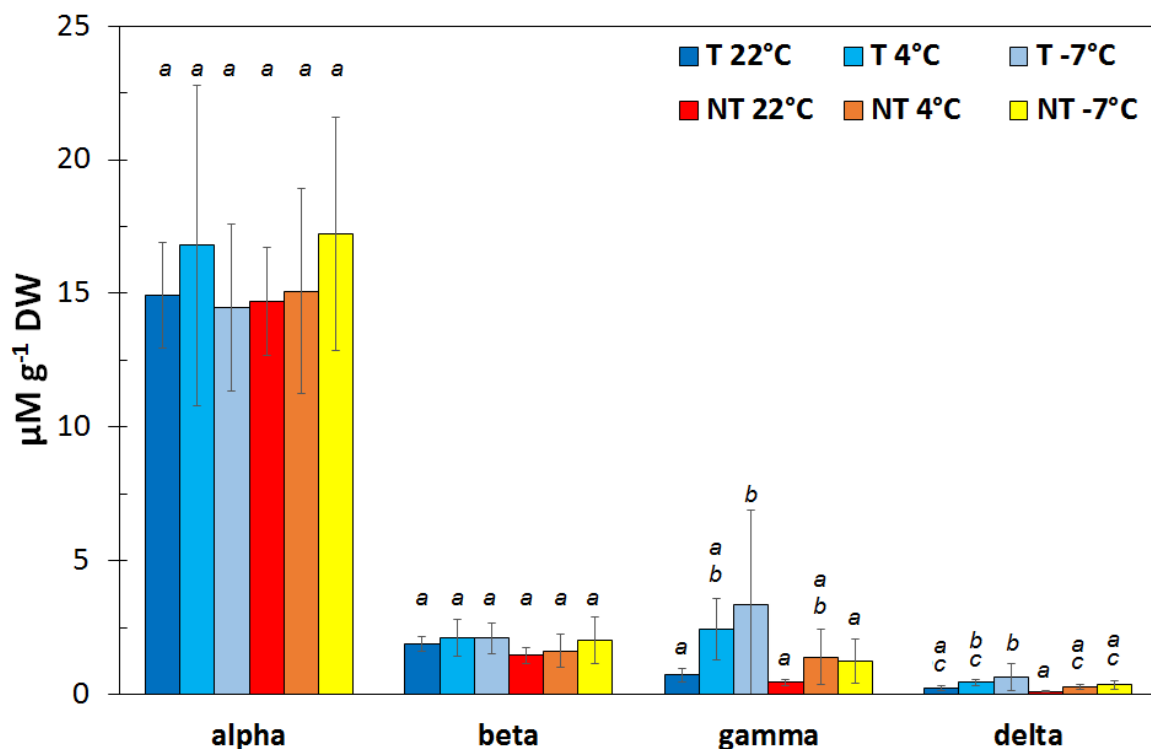
зеаксантина и тоталното количество на пигментите от ксантофиловия цикъл (Фиг. 6). Вижда се, че както при Т така и при NT то постепенно се изменя в полза на зеаксантина след последователно третиране с ниски температури.



Фиг 6 Отношение между съдържанията на зеаксантин и *trans*-виолаксантин (двата основни пигмента от ксантофиловия цикъл) при Т и NT популации от *Arabis alpina*, в условия на ниско температурен стрес (преохлаждане, +4°C и измръзване, -7°C).

Съществуват множество данни, че активирането на ксантофиловия цикъл се явява защитен механизъм срещу фотоувреждането, което обикновено настъпва при висока интензивност на осветяването в комбинация с абиотичен стрес (Sarry et al., 1994; Navaux et al., 2000). Известно е, че участието на зеаксантина като фотопротектор при растенията се изразява основно в нефотохимичното гасене на излишната енергия от фотосинтезата (Niyogi et al., 1998). Също така, зеаксантина може да оказва протекторно действие срещу фотоувреждането и по други начини, например като стабилизатор на тилакоидните мембрани (Gruszecki and Strzalka, 2004) и като гасител на активните кислородни форми (Navaux and Niyogi, 1999; Johnson et al., 2007). Според по-нови литературни данни, ксантофиловият цикъл може да се активира след абиотичен стрес дори в отсъствие на светлина (Fernandez-Marin et al., 2011). Трябва да се отбележи, че увеличеното съдържание на зеаксантин при *A. alpina* се наблюдава както при растенията от популацията Т, които оцеляват, така и при тези от NT, които загиват след -7°C. Динамиката в сумарното количество на пигментите от ксантофиловия цикъл обаче беше много близка до тази на тоталните каротеноидни пигменти (Фиг. 4, 6). Тъй като количество на каротеноидните пигменти при Т остана постоянно, а при NT намалю,

активирането на ксантофиловият цикъл при NT не може да компенсира цялостното отслабване на физиологична активност в резултат от нискотемпературния стрес.



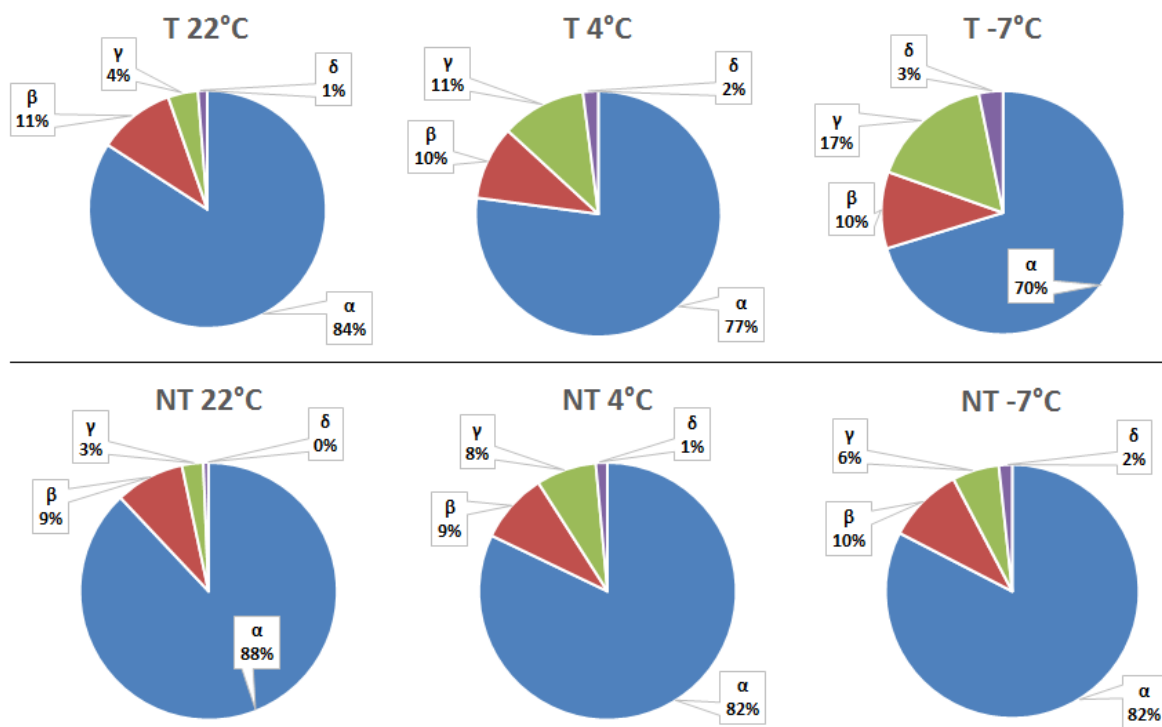
Фиг. 7 Съдържание на токофероли при T и NT популации от *Arabis alpina*, в условия на ниско температурен стрес (преохлаждане, +4°C и freezing stress, -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

- Съдържание на токофероли

Паралелно със съдържанието на хлорофилните и каротеноидни пигменти беше определено и съдържанието на различни форми на токоферол (вит. E) при *A. alpina*, като един от основните компоненти на неензимната антиоксидантна система, както при растенията, така и при животните. И при двете популации *A. alpina* количеството на α -токоферол беше многократно по-голямо (15 $\mu\text{M g}^{-1}$ DW или около 80%), отколкото на останалите видове токофероли (Фиг. 7). С намаляване на температурата количеството на α -токоферол остана непроменено както при T, така и при NT. Съдържанието на β -токоферол беше около шест пъти по-ниско от това на α -токоферол и също остана постоянно и при двете популации при двете стресови температури. Съдържанието на останалите два токоферола (γ и δ) бяха по-ниски от β -токоферола, като количеството на δ -токоферол се оказа най-ниско от всички останали форми на токоферола. За разлика от α - и β -токоферолите, количеството на γ - и δ - токофероли се повиши само в растенията от толерантната популация при последователното третиране с ниски температури. Според

някои изследвания γ -токоферола има подобно, а даже и по-силно протекторно въздействие от α -токоферола по отношение гасенето на ROS и предпазване от оксидативен стрес (Abbasi et al., 2007; Kruk et al., 2005).

Резултатите от процентното съдържание на четирите типа токофероли към общото им количество (Фиг. 8) показва запазване на количеството на основната форма α -токоферол, както и на β -токоферол и при двете популации *A. alpina*. Както беше казано по-горе, изключение прави съдържанието на γ -токоферол и в по-малка степен на δ -токоферол, които нарастват след нискотемпературния стрес, особено след -7°C . Нарастването на тези два типа токоферол е много по-силно изразено при популацията Т (3-4 пъти) в сравнение с популацията NT (около 2 пъти).



Фиг. 8 Процентно съдържание на количеството α -, β -, γ - и δ - токофероли към тоталното им количество. Измерени са индивидуални растения от популации Т и NT на *Arabis alpina*, в условия на ниско температурен стрес (chilling stress, $+4^{\circ}\text{C}$ и freezing stress, -7°C).

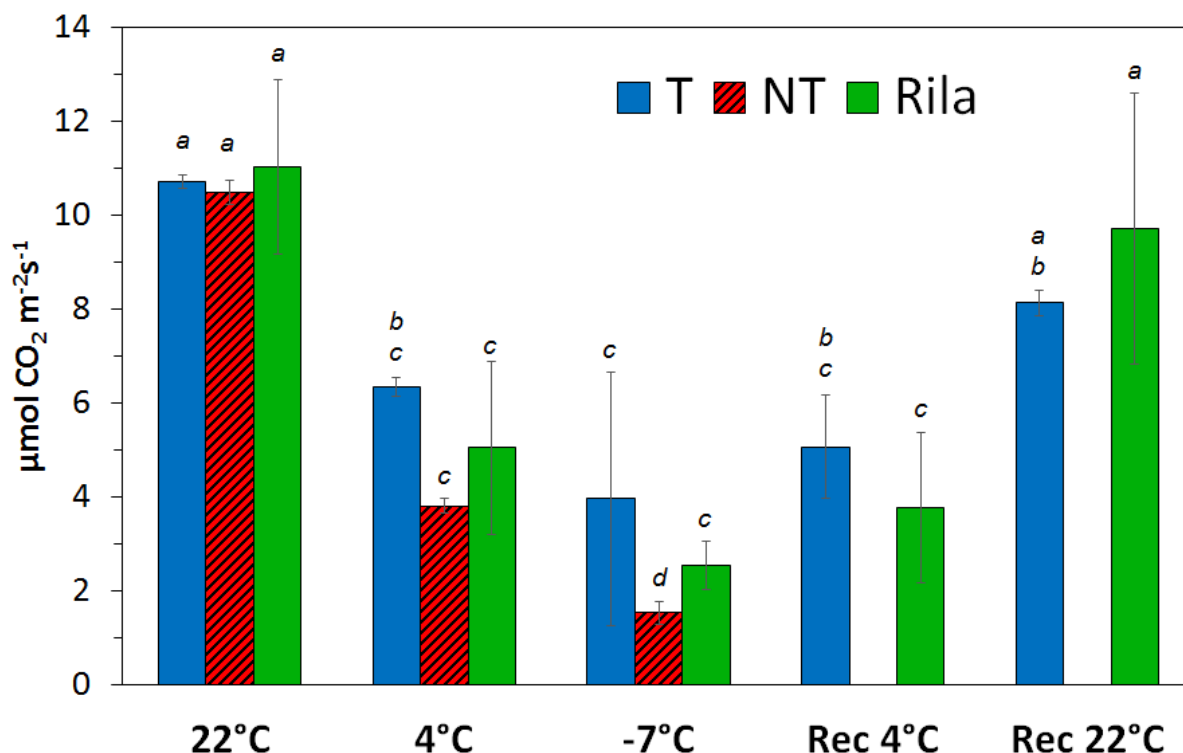
Известно е, че токоферолите, сред които е и жизнено необходимия за широк кръг организми (растения, животни, микроорганизми) витамин Е (α -токоферол) са изключително силни антиоксиданти. Една от най-важните функции на α -токоферол е тази на силен антиоксидант т.е. на гасител на ROS. При растенията, токоферолите заедно

с каротеноидите участват в протекцията на фотосинтетичния апарат от увреждане при различни видове абиотичен стрес (Szarka et al., 2012). Също така токоферолите стабилизират клетъчните и най-вече тилакоидните мембрани, предотвратявайки пероксидацията на мембранните липиди (Navaux et al., 2003). Функцията им по предпазване на клетката от ROS е свързана с деактивиране на синглетните кислородни радикали, така и чрез гасенето на излишната светлинна енергия при фотосинтезата (фотопротекция) (Kruk et al., 2005). Това е особено важно за функционирането на ФСII, в реакционния център на която, под действието на силна светлина се образуват триплетни форми на хлорофила от P680. Следователно токоферолите са основен фактор, който отговаря за устойчивостта на ФСII към влиянията на абиотичните стресови фактори и по-специално срещу фотоувреждането, което неминуемо съпровожда повечето видове стрес.

04.04. Нетна фотосинтетична активност

Нетната фотосинтетична активност, измерена чрез поглъщането на CO₂ е мярка за активността на цикъла на Калвин и реакциите от тъмнинната фаза на фотосинтезата. Резултатите от измерването на фотосинтетичната активност при френските популации T и NT показаха значителен спад след първото третиране с ниски положителни температури (chilling stress 4 °C) (фиг. 9). При тази температура се наблюдаваше инхибиране на фотосинтезата при растенията от T-популацията с 41% и още по-високо инхибиране при растенията от NT-популацията (64%). След третиране с ниски минусови температури (-7°C), инхибирането на фотосинтезата при T нарастна на 63%, а при NT – на 86%. Резултатите от опитите с растения, покълнали от семена от района на Седемте Рилски Езера показаха, че промените в нетната фотосинтетична активност следват същата степен на потискане, както при френската популация от толерантни растения T (Фиг. 9). Инхибирането на фотосинтезата на българските представители на *A. alpina* при 4°C и -7°C бе съответно 57% и 77%. Въз основа на тези резултати може да се направи извода, че популациите на *A. alpina* от Рила проявяват висока степен на толерантност към отрицателните температури, подобно на T-популацията от Алпите. Трябва да се отбележи, че фотосинтезата е сравнително високоефективен процес в светлинната си фаза, но при реакциите от тъмнинната фаза ефективността намалява значително (Taiz and Zeiger, 2006), което се потвърди и от резултатите. Ниската активност на фиксацията на CO₂ (например в условия на нискотемпературен стрес) влияе негативно върху метаболизма на растението и води до натрупване на голямо количество редуцирани

съединения като NADPH, което може да бъде причина за образуване на ROS (Szarka et al., 2012).



Фиг. 9 Нива на нетна фотосинтеза при популации *Arabis alpina* (T, GAL-T), (NT, F005-25) от Франция и от района на Седемте Рилски Езера (Rila). Растенията са третирани последователно с различни температури (22°C, 4°C и -7 °C) съгласно експерименталната схема и след период на възстановяване (Recovery) при 4°C и 22°C. Активността на фотосинтезата е измерена посредством апарата LCpro+ чрез метода на поглъщането на CO₂. Малките букви показват статистически значими разлики при P = 0.05.

04.05. Изследване физиологичното състояние на ФСII и ФСI по методите на флуоресценцията на хлорофил *a* и на разсейването на модулирана 820 nm светлина

Като мярка за изследване на активността на двете фотосистеми (ФСII и ФСI) бяха използвани съответно методите на бързата хлорофилна флуоресценция (prompt chlorophyll *a* fluorescence – PF) и разсейване на модулираната светлина при 820 nm (modulated reflection MR₈₂₀). Известно е, че PF се основава на излъчването на реакционните центрове на ФСII след облъчване с актинична червена светлина (около 650 nm) (Goltsev et al., 2010; Goltsev et al., 2014). Повишението на флуоресценцията след осветяване с период около една секунда се описва от т.нар. JIP крива, която минава през няколко характеристични точки (O, J, I и P според Strasser et al., 1995; 1997; 2004). Всяка

от тези точки представя квази-стационарно състояние във флуоресцентното излъчване и отговарят най-общо на последователните събития от улавянето на квант светлинна енергия от ФСЦ, транспорта на електрони по окислително-редукционната верига до крайните електронни акцептори на ФСЦ и тяхната редукция (Strasser et al., 2004).

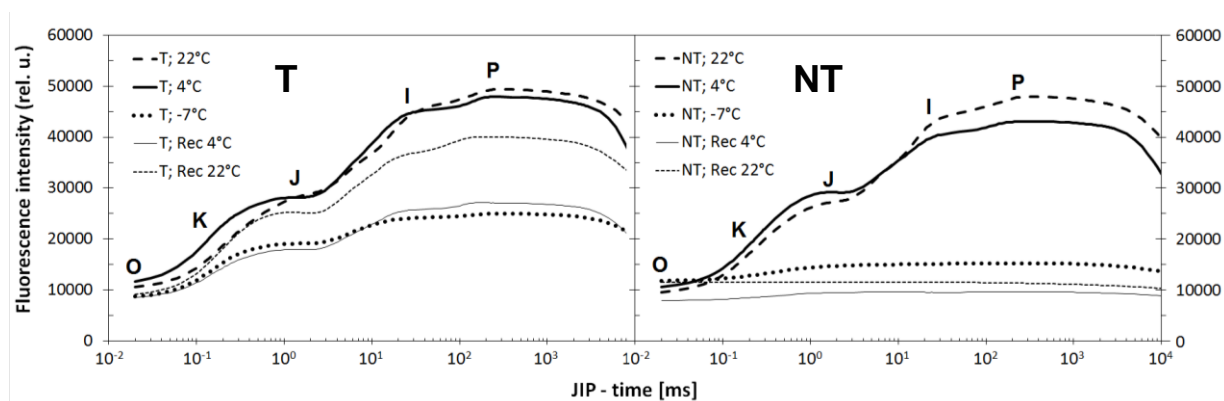
При контролната температура от 22°C Т и NT популациите на *A. alpina* (Фиг. 10), както и растенията от популацията от Рила планина (Фиг. 11) показаха идентични транзитни криви, притежаващи всички типични характеристики на класическата флуоресцентна ОЈР крива. След третиране с 4°C, максималната хлорофилна флуоресценция (F_M) намаляваше и при двете популации, като при нетолерантните растения (NT) намалението беше 10%, а при толерантните (Т) – само 2%. Намаляването на F_M при изследваните популации е характерно за условия на стрес (Strauss et al., 2007; Strasser et al. 2010, Mishra et al., 2011, Venkatesh et al., 2012). То се дължи най-вече на разграждане на протеините асоциирани с фотосинтетични пигменти като ЛНС и реакционните центрове на ФСЦ (Yamane et al., 1997) и резултатите от транзитните криви на хлорофилната флуоресценция (Фиг. 11), както и от пигментния анализ (Фиг. 5) потвърждават, че разграждането на тези компоненти от фотосинтетичния апарат вероятно настъпва при NT още след 4°C. Най-характерното изменение след 4°C при Т в хода на транзитната крива бе по-бързото достигане на J пика (изместване на експоненциалната част от кривата преди т. J наляво) (Фиг. 10, Т). Измененията на транзитната крива при растенията от Рила след 4°C силно наподобяваха тези при Т (Фиг. 11). Пикът J беше изместен наляво (т. е. настъпваше по-рано), а максималната флуоресценция намаляваше незначително. За разлика от Т, при NT беше наблюдавано повишаване на интензитета на флуоресценция на фазата J (Фиг. 10, NT), което е показано и в изследване на *Arabidopsis thaliana* при ниски температури (Nellaepalli et al., 2012). След приложения нискотемпературен стрес при 4°C беше наблюдавано също повишаване на F_0 при растенията от трите популации (Т, NT и Рила). При растенията от популация NT още по-голямо нарастване на началната флуоресценция се наблюдаваше след -7°C. Последното е регистрирано и от други автори след нискотемпературен стрес при *Arabidopsis thaliana* (Mishra et al., 2011, Nellaepalli et al., 2012), както и след засушаване при *Haberlea rhodopensis* (Strasser et al., 2010).

След измръзване промяната в индукционните криви при Т и особено при NT беше значителна (Фиг. 10). При популацията Т след -7°C стойностите на F_M намаляха два пъти в сравнение с 22°C, за разлика от NT (около три пъти). Силното понижение на F_M

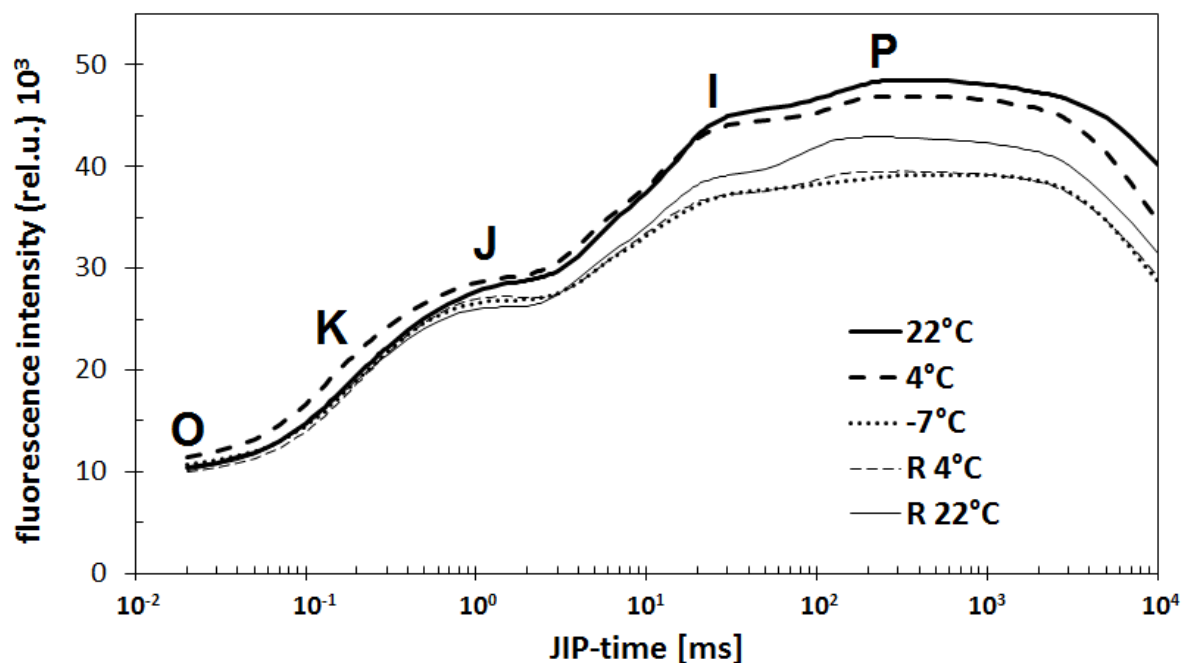
отразява количеството на активните реакционни центрове P680, което рязко намаля след -7°C . Макар, че активността на фотосинтезата и главно на ФСII беше намалена наполовина след измръзване при T, а отделните фази (O-J, J-I и I-P) силно инхибирани, нормалният вид на O-J-I-P кривата беше запазен при изследваните растения от тази популация. За разлика от T, където характерните фази на транзиентната крива O-J-I-P останаха ясно различими в условия на измръзване, при NT не беше наблюдавано такова запазване, а напротив – стига се до компроментиране на кривата (Фиг. 10, NT). След фазата J, следващите етапи се сливат и е невъзможно те да бъдат определени, което е индикация за блокиране на електронния транспорт след Q_A . Силното намаление на F_M което е със стойности, малко по-високи от F_0 показва силното увреждане на ФСII. При растенията от Рила бяха наблюдавани изменения в хода на транзиентната подобни на T. Стойностите на F_M и F_J бяха допълнително инхибирани след -7°C , но в по-ниска степен, отколкото при T. Отделните фази също така бяха запазени, но амплитудата на фазата I-P беше намалена, а точката P не беше на обичайното си място от 300 ms на абсцисата. Тези промени изразяват намалена способност на компонентите от ФСI за редукция (Bohme, 1978).

В периода на последователно възстановяване след приложението стрес от измръзване, съответно при температура 4°C и 22°C , разликите във външния вид и поведението на T и NT популациите се засилиха и станаха все по-големи. Докато толерантните растения T постепенно възвърнаха нормалния ход на транзиентните си O-J-I-P криви, при нетолерантните растения нормалният OJIP вид на транзиентните криви се загуби и кривата деградира (Фиг. 10). След възстановяването при 4°C , флуоресценцията се повиши в сравнение с -7°C , но остана по-ниска отколкото след първото третиране с 4°C . След възстановяването при 22°C интензивността на флуоресценцията се повиши още повече, но беше все още под стойностите на контролата или дори първото третиране с 4°C . При растенията от Рила планина също беше наблюдавано подобно на T бавно нарастване на максималната флуоресценция след периодите на възстановяване (Фиг. 11). Фазата I-P, както и местоположението на т. P от 300 ms обаче се възстановиха още след първото връщане на температурата при 4°C , а амплитудата на фазата I-P се възстанови на контролните си стойности след връщането при 22°C (Фиг. 11). Всички етапи на нарастване на флуоресценцията, включително фазата I-P при растенията от Рила се връщат в нормалните си стойности, което индикира възстановяване на крайните акцептори от ФСI и електронния транспорт между

фотосистемите. От друга страна интензивността на F_M при растенията и от двете толерантни популации е по-ниска от контролната, което показва по-бавното възстановяване на разградените антенни комплекси и реакционни центрове на ФСII, както и на кислород отделящия център.



Фиг. 10 Индукционни криви на бързата хлорофилна флуоресценция (prompt fluorescence – PF) като мярка за активност на ФС II. Измерването е проведено с индивиди от толерантна (T) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (chilling +4°C и freezing stress -7°C). Транзистентните флуоресцентни JIP-криви са регистрирани с помощта на M-PEA (Hansatech, UK) апарат при 650 nm след тъмнинна адаптация (30 мин) и интензитет на възбуждането 4000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

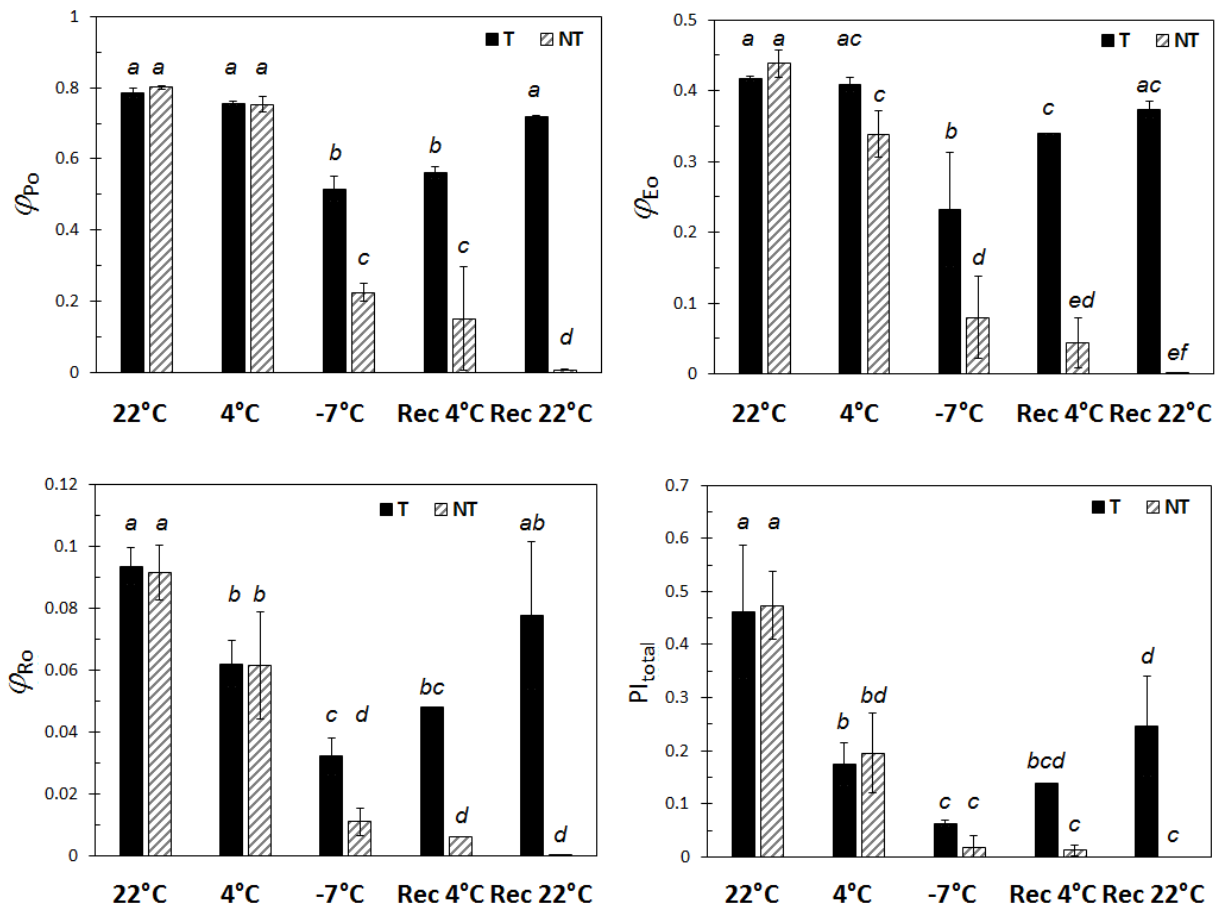


Фиг. 11 Индукционна JIP крива на бързата хлорофилна флуоресценция в листа от *A. alpina*, отглеждани в климатична камера от семена, събрани от Рила планина. Растенията бяха изложени на преохлаждане (4°C) и измръзване (-7°C) и след това на възстановяване при 4°C и 22°C (R – възстановяване).

- Параметри на бързата хлорофилна флуоресценция

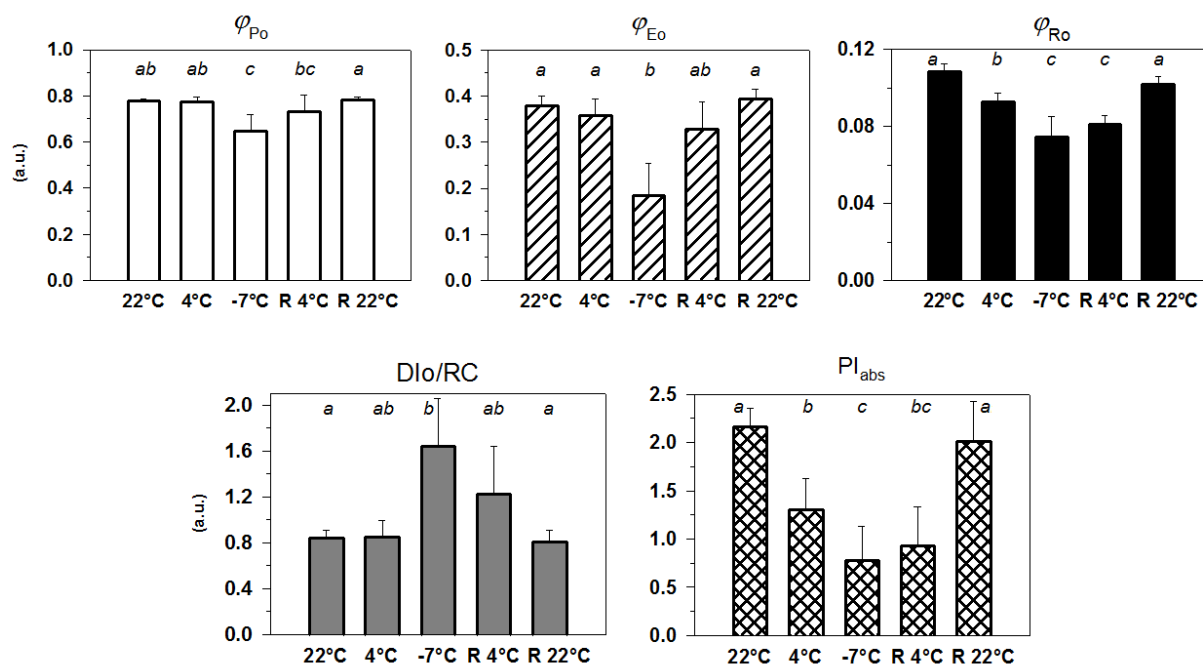
На фиг. 12 и 13 са представени параметрите на бързата флуоресценция на хлорофил *a*, изчислени на базата на транзиентните криви от фиг. 10 и 11. Параметрите φ (или т.нар. квантови добиви) представляват съотношения на разликите между максималната флуоресценция (F_M) от една страна и етапите на флуоресценцията от друга страна, отнесени към F_M . По-конкретно, те изразяват квантовите добиви от първичната фотохимична реакция до акцептора Q_A (φ_{P_0}), добива на електронния транспорт отвъд Q_A (φ_{E_0}) и редукцията на крайните електронни акцептори откъм акцепторната страна на ФСІ (φ_{R_0}).

Нашите резултати показаха (Фиг. 12), че с прилагането и на двата типа нискотемпературен стрес, стойностите на параметрите φ_{E_0} и φ_{R_0} постепенно намаляваха. Тези параметри показаха слабо потискане след 4°C , като то бе по-ясно изразено при φ_{R_0} в популацията NT. След измръзване и двата параметъра φ_{E_0} и φ_{R_0} намаляха значително, в много по-голяма степен при NT отколкото при T. Що се отнася до φ_{P_0} , този показател се запазваше на практика без промяна при 4°C , както при T, така и при NT. Това показва, че този тип нискотемпературен стрес не инхибира силно светлинната фаза на фотосинтезата при популациите *A. alpina* и по-специално ФСІІ. Трябва да се отбележи, че след измръзване φ_{P_0} намаляваше в много по-голяма степен отново при NT (30% инхибиране при T и 75% при NT), което показва деградация на коровия белтък D_1 от ФСІІ при този тип популация (Rintamäki et al., 1995; Pokorska and Romanowska, 2007). По отношение на φ_{E_0} , още след 4°C беше регистрирана по-голяма чувствителност при NT (22% инхибиране) и тя силно нарастна след -7°C (73% инхибиране), докато съответните стойности при T останаха сравнително по-високи (само 3% инхибиране след 4°C срещу 43% след -7°C). Тази тенденция беше най-силно изразена при показателя φ_{R_0} , при който след -7°C нарастването в инхибирането при NT беше 88% в сравнение с 61% при T. Следователно, параметрите φ_{E_0} и φ_{R_0} показаха много по-голяма чувствителност при NT и при двата вида стрес. От тези резултати се вижда, че параметрите които отразяват по-



Фиг. 12 Параметри на бързата хлорофилна флуоресценция (квантов добив – ϕ и индекс на производителността - PI) на ФС II. Измерването е осъществено посредством апарат M-PEA при толерантна (T) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес – chilling (4°C) и freezing stress (-7°C) и след период на последователно възстановяване (Recovery) при 4°C и 22°C. Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

близки процеси до ФС I са по-чувствителни към ниски температури. Анализа на параметрите на бързата хлорофилна флуоресценция при изследваните растения див тип от района на Седемте Рилски Езера показва ниски нива на инхибиране на светлинната фаза на фотосинтезата (Фиг. 13). Тези резултати се доближават до резултатите на френската популация T (Фиг. 12). Други анализирани параметри бяха индексите на производителност, performance index (PI_{abs} , PI_{total}) (Фиг. 12, 13), както и топлинната дисипация DI_0/RC , като последния е представен само за българската популация (Фиг. 13). Индексите на производителност, от своя страна отразяват съответно ефективността на запазване на енергията на уловения светлинния квант от ФС II до междинните електронни преносители (PI_{abs}) и до крайните електронни акцептори от ФС I (PI_{total}) (Strasser et al., 2010; Goltsev et al., 2010; Goltsev et al., 2014).

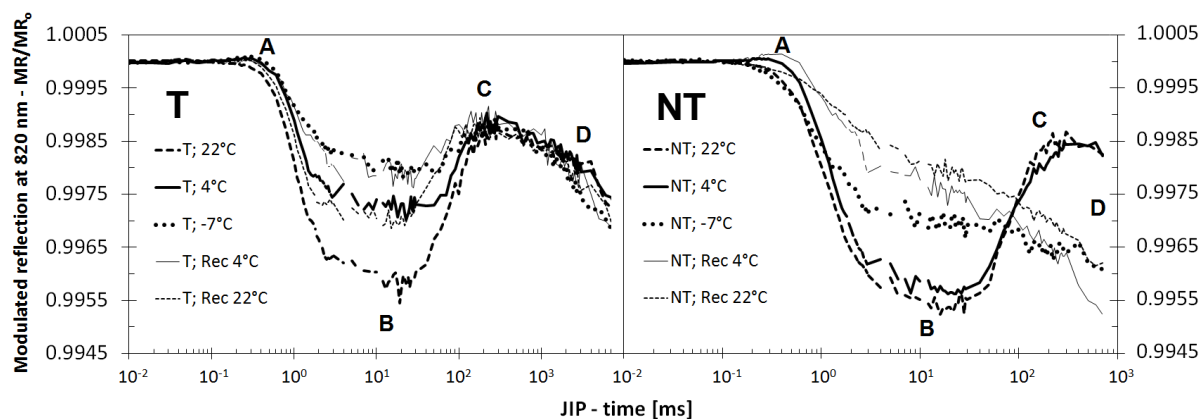


Фиг. 13 Параметри на бързата хлорофилна флуоресценция (квантов добив – ϕ и индекс на производителността - PI) на ФС II на интактни растения *Arabis alpina*, див тип от района на Седемте Рилски Езера. Измерването е осъществено посредством апарат M-PEA в условия на нискотемпературен стрес – chilling (4°C) и freezing stress (-7°C) и след период на последователно възстановяване (Recovery) при 4°C и 22°C. Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

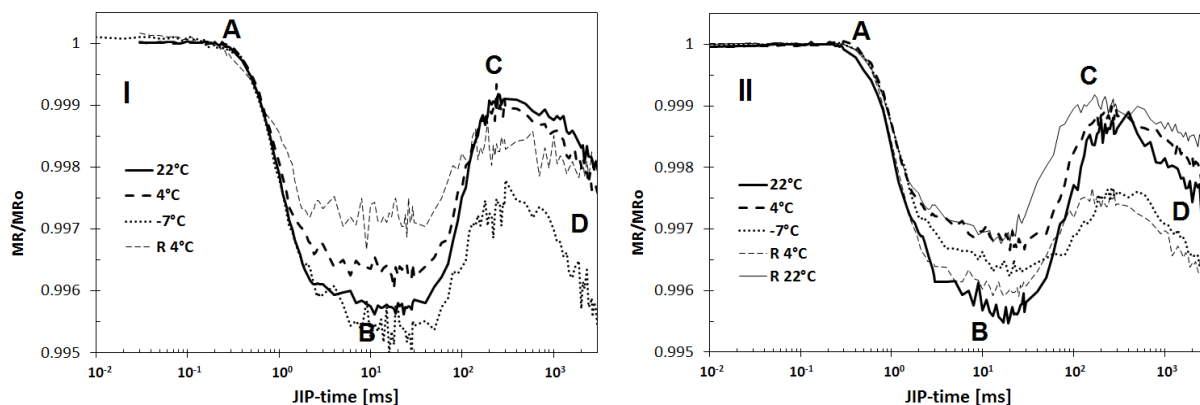
Резултатите от PI_{abs} много близко корелираха със стойностите на нетната фотосинтетична активност (поглъщането на CO_2), което е показано и в други изследвания (van Heerden et al., 2007). Резултатите, представени на Фиг. 12, илюстрират високата чувствителност на параметъра PI_{total} и при двете популации T и NT. За разлика от параметрите ϕ на квантовия добив (особено ϕ_{Po}), общия индекс на производителността показва много силно инхибиране още при +4°C и при двете популации, но за разлика от T, този показател не можа да се възстанови след минусовия стрес при NT. Параметрите на PF, получени от популацията от Рила планина показаха стойности, близки до тези от толерантната популация T от Алпите (Фиг. 12). Както при растенията и от двете френски популации, при растенията от рилската популация най-силно инхибиране беше наблюдавано при индекса на производителност PI, и съответно най-голямо запазване на стойностите и нечувствителност към ниски температури на параметъра ϕ_{Po} .

- **Разсейване на модулирана светлина при 820 nm**

Разсейването на модулирана при 820 nm светлина (MR_{820}) е показател, който анализира количеството на окислени/редуцирани форми чрез регистриране на



Фиг. 14 Индукционни криви на разсейването на модулирана светлина (*modulated reflection*) регистрирани с М-РЕА при 820 nm като мярка за активността на ФС I. Изследването е проведено с индивиди от толерантна (T) и нетолерантна (NT) популации на *Arabis alpina* в условия на нискотемпературен стрес – *chilling* (4°C) и *freezing stress* (-7°C) и след период на последователно възстановяване (*Recovery*) при 4°C и 22°C.



Фиг. 15 индукционни криви на разсейването на модулираната 820 nm светлина, измерени в *A. alpina* растения събрани в Rila Mountain: **I**) интактни диви растения. **II**) растения отгледани от семена в лаб. условия. Растенията бяха третирани с ниски температури (*преохлаждане*, 4°C и *измръзване*, -7°C) и възстановени при 4°C и 22°C, R - *recovery*.

разсейването на светлина с дължина на вълната 820 nm съответно от реакционния център на ФС I (P700/P700⁺), който отговаря за по-голямата част от разсейването и пластоцианина (PC/PC⁺), който отговаря за около 37% от разсейването (Oja et al., 2003). Интересно е да се отбележи, че апарата М-РЕА има възможност за отчитане едновременно на PF, както и на MR₈₂₀ и по този начин може да регистрира едновременно промените във ФСII и ФС I (Goltsev et al., 2010; Strasser et al., 2010). MR-кривата в нейната върхна част, съответства на включването на новосинтезираните съединения (АТР, NADPH) от светлинната фаза към цикъла на Калвин-Бенсон (фаза на въглеродните реакции) (Goltsev et al., 2014). На Фиг. 14 и 15, са представени MR-кривите на растенията съответно от популациите от френските Алпи и планината Веркор (Фиг. 14, T и NT),

както и растенията от популацията от Рила планина (Фиг. 15, I и II). Като мярка за окислени/редуцирани форми на P700 и PC, кривите на MR₈₂₀ отразяват степента на окислението (нисходяща част от кривата) и редукцията (възходяща част) на ФСІ.

При контролите, ясно може да се проследи окислението (в бързата част на модулираното разсейване – етап от А до В) и след това редукцията им (в по-бавната част – етап от В до С). Най-ниската точка от кривата (т. В) представлява достигането на равновесие между окислението и ре-редукцията на P700 и PC. Фиг. 14 показва, че тази точка се намира в най-ниско положение при контролната температура (22°C). Последователното третиране с ниски температури (4°C, -7°C) води до изместване на най-долната част от кривите във възходяща посока. Въздействието с -7°C (freezing stress) е фактор, който ясно демонстрира различието между двете популации на *A. alpina* (Фиг. 14). Запазването на активността на ФСІ (макар и в много по-ниска степен, отколкото при 22°C) се вижда при Т като повторното възстановяване на възходящата част на кривата (редукция на PC и реакционния център на ФСІ), което при NT липсва. След измръзване, в периода на възстановяване (4 дни на 4°C и 4 дни на 22°C), кривите на MR при толерантните растения почти възвръщат вида си до контролните растения (Фиг. 14). При популацията NT след измръзване се наблюдава все по-голямо увреждане на ФСІ, което се изразява само в низходящата част на кривата (процеса на окисление), но в много по-ниска степен отколкото при 4°C и при 22°C. За разлика от Т, тя не може да възстанови своя възходящ ход (фазата на редукция на ФСІ).

На Фиг. 15, панел I и II са представени кривите на MR₈₂₀ на растенията от Рила планина. След нискотемпературен стрес те показваха подобни на Т характеристики на реакцията на ФСІ, както и някои различия. MR-кривите им показваха сходни с Т тенденции на повишаване на стойностите на минимална редукция на P700 и PC в т. В след 4°C. Това се изразява като по-ниска степен на окисление на P700 след приложения стрес от преохлаждане в сравнение с контролата (Фиг. 15). В литературата са описани и други стресови въздействия (например засушаване при *Haberlea rhodopensis*, грах след топлинен стрес), при които кривата на MR₈₂₀ се повлиява по подобен начин (Strasser et al., 2010; Oukarroum et al., 2013). Окислението на P700 при растенията от Рила планина обаче беше инхибирано в по-малка степен, отколкото при Т (Фиг. 14). Както и при Т, при растенията от Рила беше показана способност на ФСІ за ре-редукция след прилагане на стрес от измръзване при -7°C. Амплитудите на ре-редукцията при растенията от Рила (Фиг. 15, фаза В-С) бяха наполовина по-ниски, отколкото при контролата, по същия начин, както при Т (Фиг. 14). Амплитудите на окисление във фаза А-В, обаче бяха много

близки до контролните (Фиг. 15) и по-високи отколкото тези при Т (Фиг. 14, Т), като се доближаваха до тези при NT (Фиг. 14, NT). Тези процеси се наблюдават на Фиг. 15 като по-ниски стойности на кривата във фаза В, както и двойно по-ниско ниво на ре-редукция (фаза С), за разлика от Т, където във фазата на ре-редукция Р700 и РС се ре-редуцират до началните си стойности (преди т. А). Добре известно е, че ФCI е основен източник на активни кислородни форми в условия на стрес поради липсата на достатъчно NADP⁺ като субстрат (ApeI and Hirt, 2004). Възможно е по-високото ниво на окисление (фаза А-В) да се дължи на такава загуба на електрони от ФCI които да образуват ROS при активиране на процеса по фоторедукцията на кислорода от FeS кълстер на ФCI (Stirbert et al., 2013).

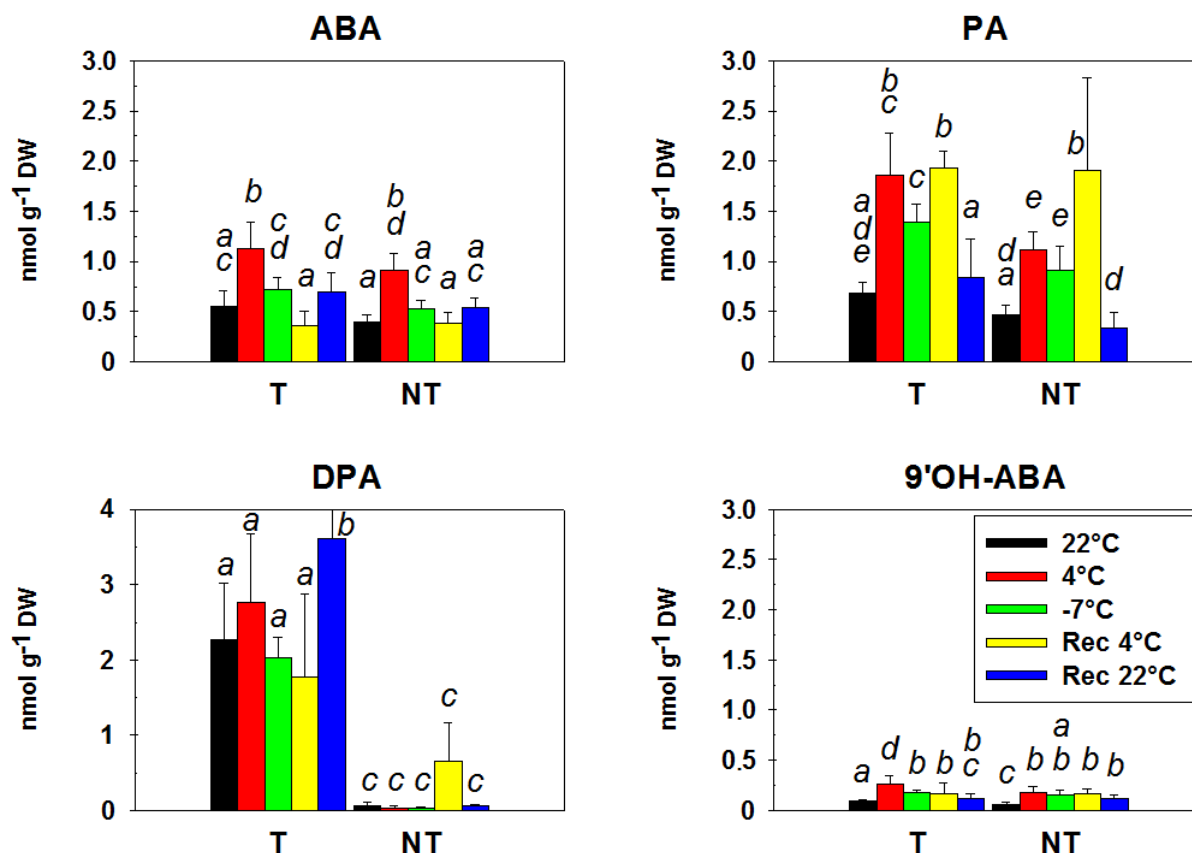
04.06. HPLC анализ на съдържанието на фитохормони

- Съдържание на АБК и съединения от метаболизма на АБК

Както е добре известно от литературата, АБК отговаря за привеждане на растенията в състояние на физиологичен покой, свързана е с намалена жизнена активност след стресови въздействия и е основният хормон, заедно с етилена, който е отговорен за преминаването на многогодишните растения от умерения климат в състояние на покой през зимния сезон (Zeevaart and Creelman, 1988; Nambara and Marion-Poll, 2005). Бяха изследвани съдържанията на АБК и продуктите на нейния катаболизъм – 9'-ОН-АВА, РА, DPA и АВА-GE. Първоначално АБК се окислява до фазеева киселина (РА). Преходното състояние на това разграждане е 8' –ОН-АВА. Представеното тук съединение 9'-ОН-АВА се явява преходно съединение при разграждането на АБК до неофазеева киселина. Дихидрофазеевата киселина (DPA) е крайният окислителен /разграден/ продукт на АБК. DPA не притежава АБК активност.

При контролната температура, количествата на АБК и РА са почти еднакви и при двете популации. Количествата на тези две съединения се увеличават почти около двукратно и при двете популации след преохлаждане, като най-много се увеличава съдържанието на РА при Т. Нормалната реакция на растителният организъм спрямо стресови фактори е увеличение в съдържанието на АБК. След -7°C, количеството на АБК намалява до контролните стойности, а на РА остава на същото ниво като след 4°C. Най-голяма разлика между двете популации се наблюдава при съдържанието на крайния разграден продукт на АБК – DPA, която е и неактивна. При Т DPA е съединението от метаболизма на АБК, което е представено в най-голяма концентрация, докато при NT

ДРА почти отсъства. Трудно е да се отговори на какво се дължи това, но най-вероятно причината е във по-високата степен на синтез, обмяна и разграждане на АБК при Т.

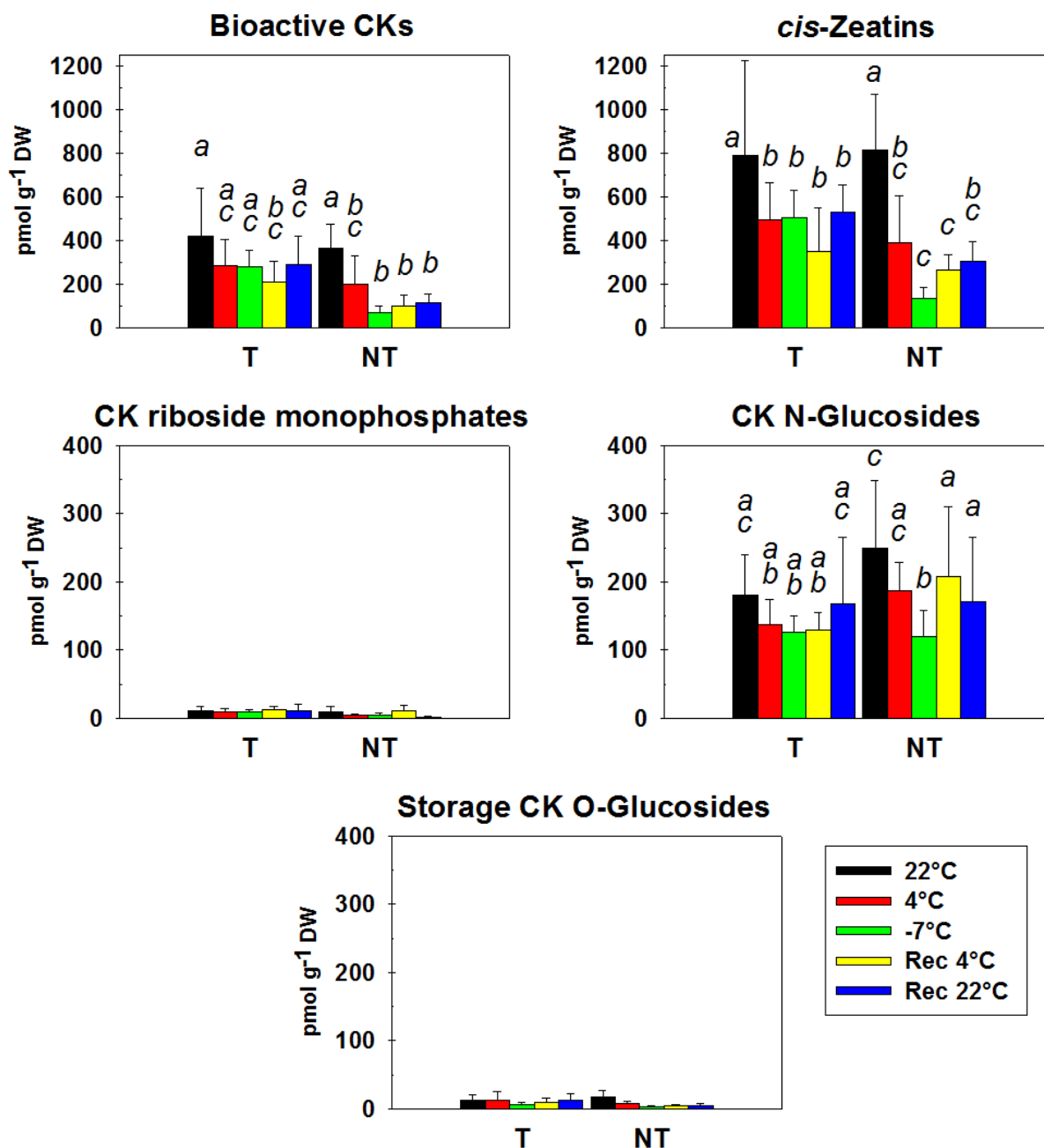


Фиг. 17 Съдържание на асцизиева киселина и нейните метаболити: А) АБК; В) фазеева киселина; С) дихидрофазеева киселина; D) 9' АБК хидроксид при толерантна (Т) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (chilling +4°C и freezing stress -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

- Сумарно съдържание на групи цитокинини

Както беше отбелязано по-рано в дисертационния труд, СК имат разнообразни функции в растителния организъм, основната от които е стимулиране на деленето на клетките. Съотношението между ауксини и цитокинини определя нарастването на подземната или надземните части на растението (Skoog and Miller, 1965). СК са хормони, които стимулират множество основни физиологични процеси в растението, за разлика от АБК, която е хормон на стреса и физиологичния покой. Освен това СК регулират фотосинтетичната активност, а също така влияят върху циркадния ритъм на растенията.

Чрез съвременният аналитичен метод на HPLC/MS-анализ бяха изследвани количествата на 5-те основни групи цитокинини. Първата включва биологично активните СК *trans*-зеатин (tZ), *trans*-зеатин-рибозид (tZR), изопентениладенин (iP) и

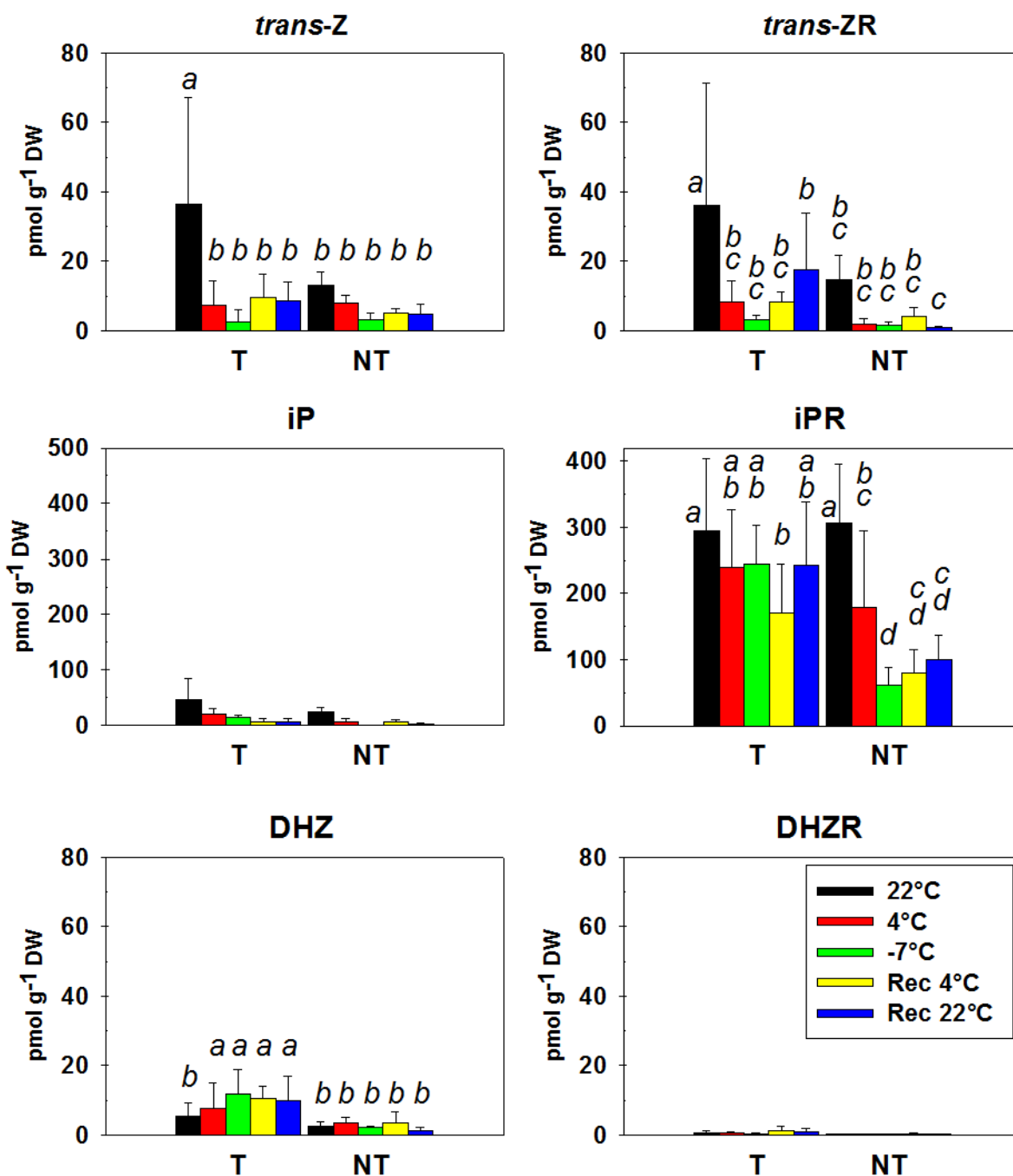


Фиг. 18 Съдържание на А) биологично активни цитокинини; В) *cis*-зеатини; С) рибозид-монофосфати; D) *N*-гликозиди; E) *O*-гликозиди при толерантна (Т) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (*chilling* +4°C и *freezing stress* -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

изопентненил-рибозид (iPR), дихидрозеатин (DHZ) и дихидрозеатин-рибозид (DHZR). Втората група се състои от считаните за неактивни *cis*-зеатини, вкл. *cis*-зеатин (cZ), *cis*-зеатин-рибозид (cZR), *cis*-зеатин-монофосфат (cZRM) и *cis*-зеатин-*O*-гликозид (*cis*-ZOG). Останалите три групи се състоят съответно от СК-рибозид-монофосфатите (СК riboside monophosphates), които са първите продукти от биосинтезата на СК, от

резервните форми СК-О-гликозиди и неактивните азот-гликозиди (СК-N-glucosides). Разгледани и представени в графичен вид са сумарно представените основни групи цитокинини според биологичната им роля, както поотделно изброените типове цитокинини от всяка от тези групи.

В най-голямо количество са представени *cis*-зеатините, следвани от сумарното количество на биологично активните цитокинини, неактивните форми азот-глюкозиди и накрая рибозит монофосфатите. Беше наблюдавана тенденция на намаляване на съдържание на цитокинините след нискотемпературен стрес. След охлаждане съдържанието на биологично активните СК намаля при NT, а след замръзване при NT беше наблюдавано силно намаление, докато при T нямаше значително намаляване в количеството им даже след -7°C (Фиг. 18). *Cis*-зеатините бяха представени в най-голямо количество, въпреки широко възприетото мнение, че са по-слабо активни от *trans*-Z, както и от iP изоформите (Spiess, 1975; Schmitz and Skoog, 1972). При някои видове и систематични групи обаче, например царевицата (Veitch et al., 2003) и ориза (Murofushi et al., 1983) тяхното съдържание е по-голямо и е установено, че при тези растения, за разлика от *Arabidopsis cis*-СК имат почти еднаква биологично активност в сравнение с *trans*-СК. Поведението на *cis*-зеатините беше много сходно с това на биологично активните цитокинини и е представено на следващата графика от фигурата (Фиг. 18, В). Както се вижда, промените в съдържанието на *cis*-зеатините повтаряха тенденцията на промени в концентрацията на биологично активните цитокинини с прилагане на нискотемпературен стрес. Трябва да се отбележи, че количеството им беше около два пъти по-високо отколкото това на биологично активните цитокинини при контролната температура от 22°C . Количеството на другите две групи СК – СК-рибозид-монофосфатите, които включват изопентенил-аденин-рибозид-монофосфат и *trans*-зеатин-рибозид-монофосфат, както и общото количество на резервните О-гликозидни форми на СК бе пренебрежимо малко в сравнение с нивата на останалите цитокинини (не повече от 20 pmol/g DW) (Фиг. 18 С, Е). Поради това ние няма да се спираме на тях. Съдържанието на N-гликозидните цитокинини е представено на Фиг. 18, D. Най-общо може да се каже, че то е близко до съдържанието на биологично активните СК и следваше същата като при тях тенденция на промени, но само при популацията T.

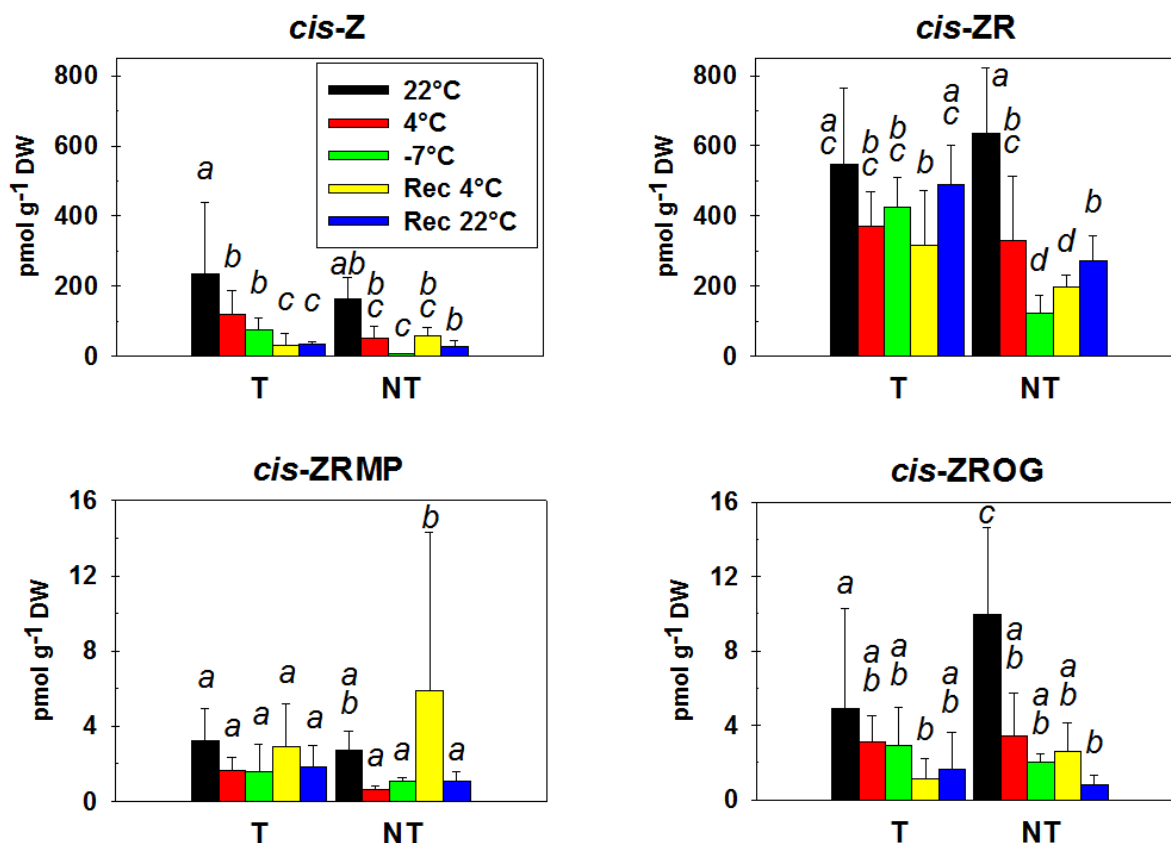


Фиг. 19 Съдържание на биологично активни цитокинини: А) *trans*-зеатин; В) *trans*-зеатин рибозид; С) изопентениладенин рибозид; D) изопентениладенин рибозид; Е) дихидро зеатин; F) дихидрозеатин рибозид при толерантна (Т) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (chilling +4°C и freezing stress -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при P = 0.05.

- **Съдържание на индивидуални типове цитокинини по отделните групи**

Съдържание на биологично активните цитокинини

Прави впечатление, че съдържанието на биологично активните цитокинини *trans*-Z и *trans*-ZR (Фиг. 19) беше доста ниско (под 40 pmol/g DW), като количествата и на



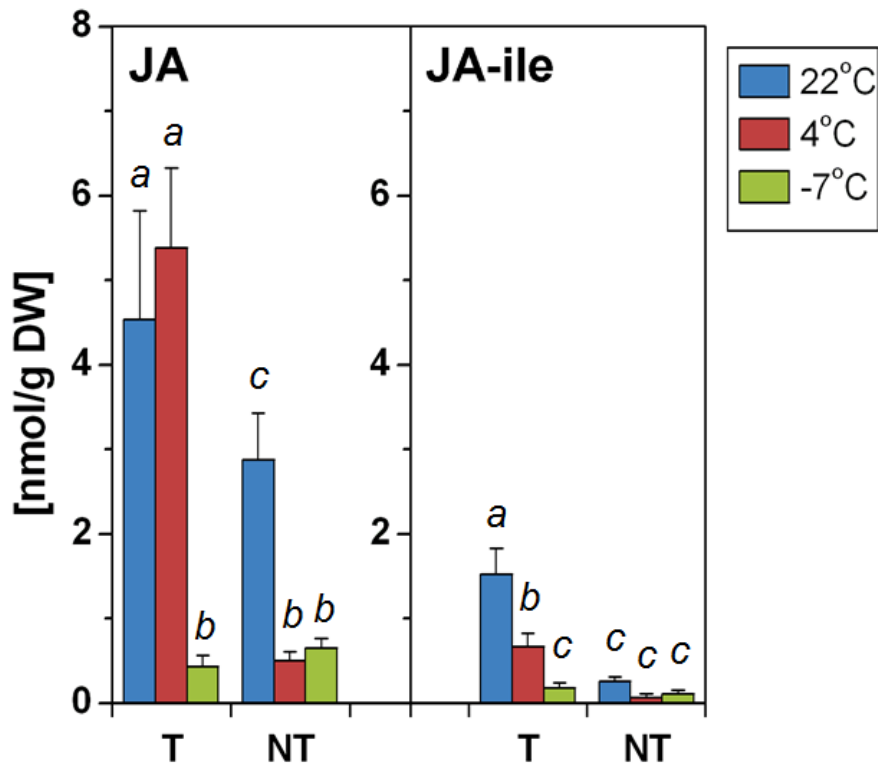
Фиг. 20 Съдържание на биологично активни цитокинини: А) *trans*-зеатин; В) *trans*-зеатин рибозид; С) изопентениладенин рибозид; D) изопентениладенин рибозид; E) дихидро зеатин; F) дихидрозеатин рибозид при толерантна (Т) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (*chilling* +4°C и *freezing stress* -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при P = 0.05.

двата типа намаляваха по един и същ начин след третиране с ниски температури. Съдържанието на *trans*-зеатина и неговият прекурсор *trans*-зеатин рибозида беше ниско и с много близки стойности и при двата цитокинина, като при Т, съдържанието им при контролата беше по-високо отколкото при NT (Фиг. 19). След стрес съдържанието на двата цитокинина намаля и при двете популации, в по-голяма степен при NT. Изопентенил аденина беше представен с незначителни стойности (Фиг. 19). Неговият прекурсор, изо-пентенил аденин рибозида беше най-силно застъпеният от всички биологично активни цитокинини и е определящ поведението на сумарното количество на биологично активните цитокинини. Количествата му и при двете контроли (Т и NT) имаха близки стойности, а след 4°C те слабо намаляха в еднаква степен. След замръзване обаче, количеството при Т се запази, докато при NT намаля значително (Фиг. 19). Дихидрозеатина и дихидрозеатин-рибозида бяха представени с незначителни стойности.

Съдържанието на *cis*-зеатините (Фиг. 18), и по-специално на *cis*-ZR (Фиг. 20) бе най-високо от това на всички разглеждани СК (почти два пъти по-високо от биологично активните СК при температура 22°C). От своя страна съдържанието на *cis*-ZR беше също два до три пъти повече от *cis*-Z. За разлика от NT, *cis*-ZR не се променяше под влияние и на двете ниски температури само при популацията T. В този смисъл, промените в *cis*-ZR под влияние на различните температури бяха сходни с тези на iPR (вж. Фиг. 19). Относно съдържанието на *cis*-ZRMP (първия продукт от биосинтезата на *cis*-Z) и *cis*-ZROG (който има резервни функции) (Фиг. 20), най-общо и двете форми на *cis*-зеатините намаляваха след двата вида нискотемпературен стрес и при двете изследвани популации на *A. alpina*.

- **Изследване на ендогенното съдържание на фитохормони (жасмонова киселина и жасмонат-изолевцин)**

Жасмоновата киселина (JA) и нейните производни съединения метил жасмонат (MeJA) и жасмонат изолевцин (JA-ile) са известни като активни медиатори на отговорите на растителната клетка към многобройни фактори на биотичен и абиотичен стрес, включително нараняване, растителноядни насекоми, патогени, засушаване и други видове стрес (Ding et al., 2001; Wasternack, 2007; Kosova et al., 2012). Ендогенното съдържание на жасмонати беше измерено посредством HPLC/MS анализ. Нашите резултати (Фиг. 31) показаха високо съдържание на JA (3-5 nmol g⁻¹ DW), (съизмеримо с АБК) (Фиг. 27) и в двете изследвани популации. След преохлаждане, съдържанието на JA при T-растенията не беше променено, за разлика от 10-кратното намаление на JA при NT-популацията (0,5 nmol g⁻¹ DW). Съдържанието на биологично активния жасмонат-изолевцин (JA-ile) беше значително по-високо при контролната температура при T- (1,5 nmol g⁻¹ DW), в сравнение с NT (0,26 g⁻¹ DW). JA-ile беше значително намалено след преохлаждане и при двете популации, оставайки относително високо при популацията T (0,67 nmol g⁻¹ DW) в сравнение с NT (0,07 nmol g⁻¹ DW). Третирането на растенията с отрицателни температури доведе до много рязко понижаване на JA и JA-ile при двете изследвани популации на *A. alpina*. Получените резултати показаха, че JA и неговия аминокиселинен конюгат JA-ile могат да участват при аклимацията на *Arabis alpina* към ниски температури.



Фиг. 21 Съдържание на жасмонова киселина (A) и жасмонат-изолевцин (B) при две популации на *Arabis alpina*: толерантна (T) и нетолерантна (NT) към отрицателни температури (-7°C). Растенията бяха отгледани при 22°C (контролни условия) и последователно изложени на chilling (4°C) и freezing stress (-7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

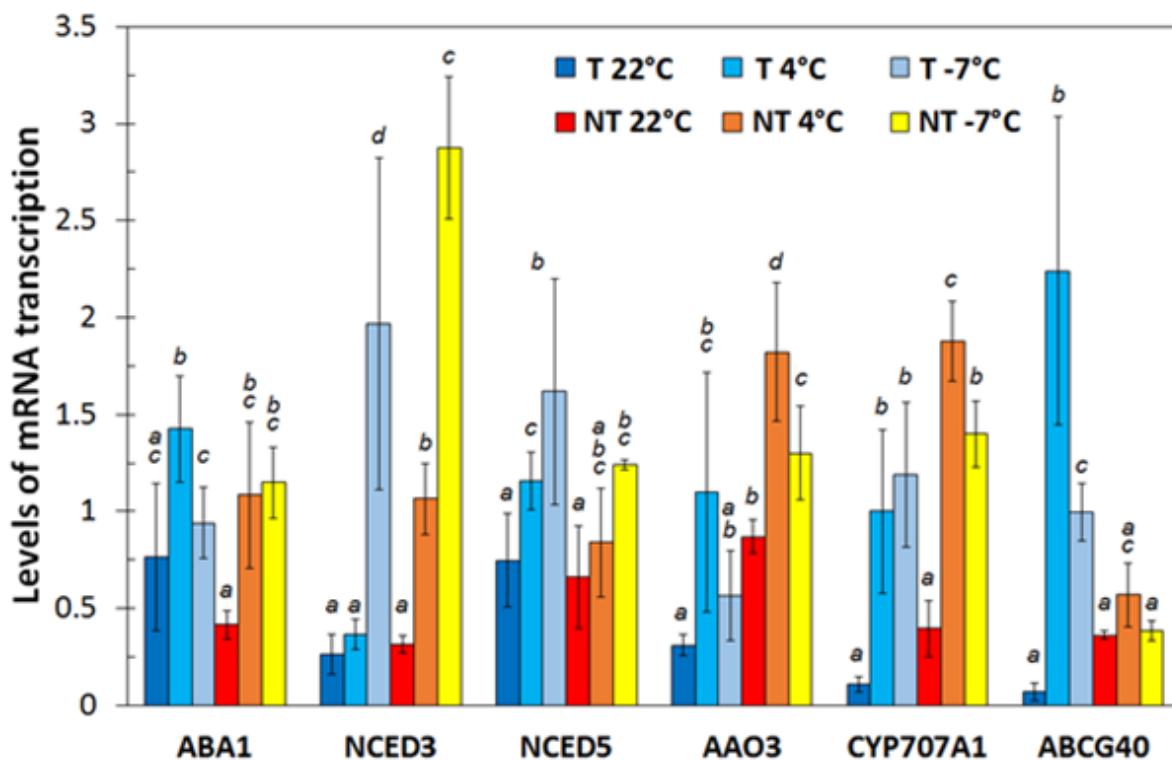
Оксилипиновите фитохормони, каквито са жасмоновата киселина и жасмонат-изолевцина са основно свързани с отговора към биотичен стрес (насекоми, патогени и нараняване). Някои изследвания показват връзка между тези хормони и устойчивостта към ниски температури. В пшеница, съдържанието на жасмонова и салицилова киселина се покачва след нискотемпературен стрес (Kosova et al., 2012). Също така Bharwaj et al. показват че LOX се активира и от други фактори като АБК, салицилова киселина и дори метил-жасмонова киселина, следователно жасмонатите могат да оказват влияние чрез усилване на сигнала и активно участват и в регулацията на съдържанието на други фитохормони. Поради това е твърде вероятно те да играят ключова роля при стрес наред с АБК. Взаимната регулация между фитохормоните се извършва чрез механизма cross-talk на биосигналните пътища. Също така, оксилипинови съединения се образуват след прекисно окисление на липидите (Berger et al., 2001, Demmig-Adams et al., 2012). При наличие на стрес, както биотичен, така и абиотичен или в отговор на определени процеси от развитието на растението (Bell et al., 1995) се окисляват мастни киселини от хлоропластните мембрани и след това в пероксизомите се синтезират оксилипини, които са главни прекурсори на жасмонатите (Chrispeels et al., 1999).

04.07. Транскрипционен (qRT-PCR) анализ на гени от метаболизма на фитохормоните АБК и СК

- qRT-PCR анализ на гени от метаболизма на АБК

Бяха изследвани 6 гена от метаболизма на АБК: четири гена от биосинтезата на АБК, два от които са изоформи от генната фамилия на *NCED* 3 и 5 (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, който катализира образуването на ксантоксин от виолаксантин, изоформи 3 и 5). Другите гени от метаболизма на АБК бяха *ABA1* (кодиращ ензима ZEP – zeaxanthine epoxidase, който катализира превръщането на зеаксантин във виолаксантин) и гена *AAO3*, който кодира АБК-алдехидоксидаза, отговорна за последната стъпка от образуването на АБК. В допълнение бяха изследвани гена *CYP707A1* отговорен за първата стъпка на разграждането на АБК, което представлява окислението на АБК до 8' и 9'ОН-АБК, както и гена *ABCG40* който кодира импортер на АБК от апопласта в клетката. Данните от qRT-PCR анализа са представени на Фиг. 32. Както се вижда, при почти всички изследвани гени скоростта на транскрипция нараства с понижаване на температурата, като най-силна е стимулацията на гените *NCED3* и при двете изследвани популации. Трябва да се отбележи намаляването в нивата на транскрипция при гените *ABA1* и *AAO3* след третиране с -7°C. Количеството на *ABA1* в началото на опита (при 22°C) е ниско и при двете популации, като е по-ниско при NT. След 4°C се увеличава почти два пъти както при Т, така и при NT. След измръзване експресията се запазва постоянна при NT, докато при Т намалява малко над равнището при контролната температура. Експресията на *NCED3* е по-ниска от *ABA1* и при двете популации при 22°C. В условия на преохлаждане (4°C) се запазва при Т и се повишава повече от два пъти при NT. Експресията на *NCED3* е със значителни стойности и най-голяма след отрицателни температури и при двете популации. Следващият изследван ген е *NCED5*. Експресията му при 22°C (контролни условия) е около два пъти по-висока отколкото при *NCED3* и при двете популации. Експресията на *NCED5* постепенно нараства с намаляването на температурата. По отношение на *CYP707A1*, който кодира ензим от окислението (разграждането) на АБК, беше наблюдавана стимулация на транскрипцията и при двете ниски температури. Особен интерес представляват данните за влиянието на ниските температури върху транскрипцията на гена *ABCG40*. С намаляване на температурата, при този ген се наблюдаваше много силно повишение на транскрипцията само при популацията Т. При контролни условия (22°C) нивата на експресия на този ген бяха много ниски и близки до тези на *CYP707A1*. След третиране последователно с 4°C и -7°C транскрипцията на *ABCG40* при популацията Т нарастваше многократно 10-20 пъти, за разлика от

популацията NT, където тя не се променяше. Тези данни показват възможното участие на този транспортен белтък за АБК преимуществено за популацията T, като една от възможностите за обезпечаване на толерантността на тази популация към нискотемпературния стрес.

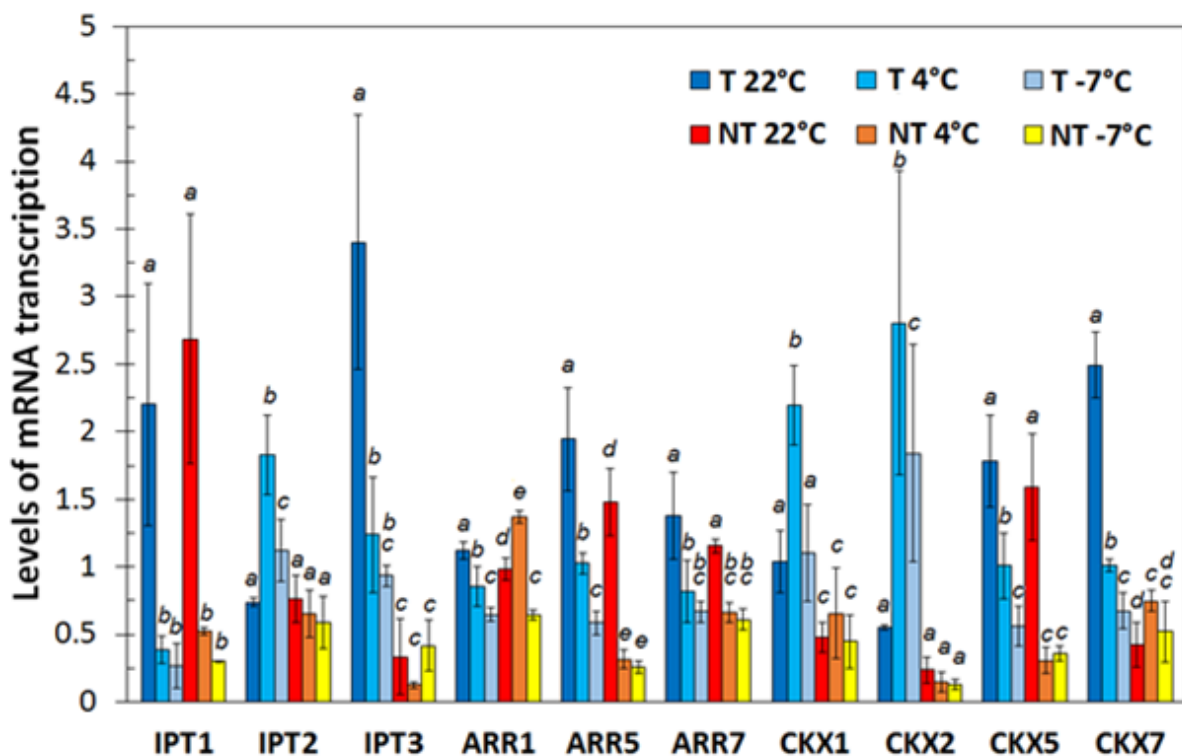


Фиг. 31 *qRT-PCR* анализ на гени от биосинтезата (*ABA1*, *NCED3*, *NCED5*, *AAO3*), разграждането (*CYP707A1*) и транспорта (*ABCG40*) на АБК. Използван е препарат от тотална РНК, изолиран от индивиди от толерантна (T, *GAL-T*) и нетолерантна (NT, *F005-25*) популации от *Arabidopsis thaliana*, в условия на нискотемпературен стрес (*chilling* +4°C и *freezing stress* -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

- **qRT-PCR анализ на гени от метаболизма на цитокинините**

Бяха изследвани 10 гена от метаболизма и сигналния път на цитокинините. Три от тях са от генната фамилия *IPT* (изопентенил аденин трансфераза - *IPT1*, 2, 3) за биосинтезата на цитокинините; четири гена от генната фамилия *CKX* (цитокнин оксидаза/дехидрогеназа - *CKX1*, 2, 5, 7), съответно за разграждането на СК; и три гена от сигналната трансдукция на СК – *ARR1*, 5, 7) (Фиг. 33). Най-общо, транскрипцията на *IPT1* се инхибира много силно (около 5 пъти, 2.2 / 0.4) веднага след третиране с 4°C, като това потискане се запазва и при -7°C в същата степен. Сходно е поведението и на гена *IPT3*, като трябва да се отбележи, че неговата много ниска степен на експресия при популация NT. Както е известно и двата гена участват в биосинтезата на биологично

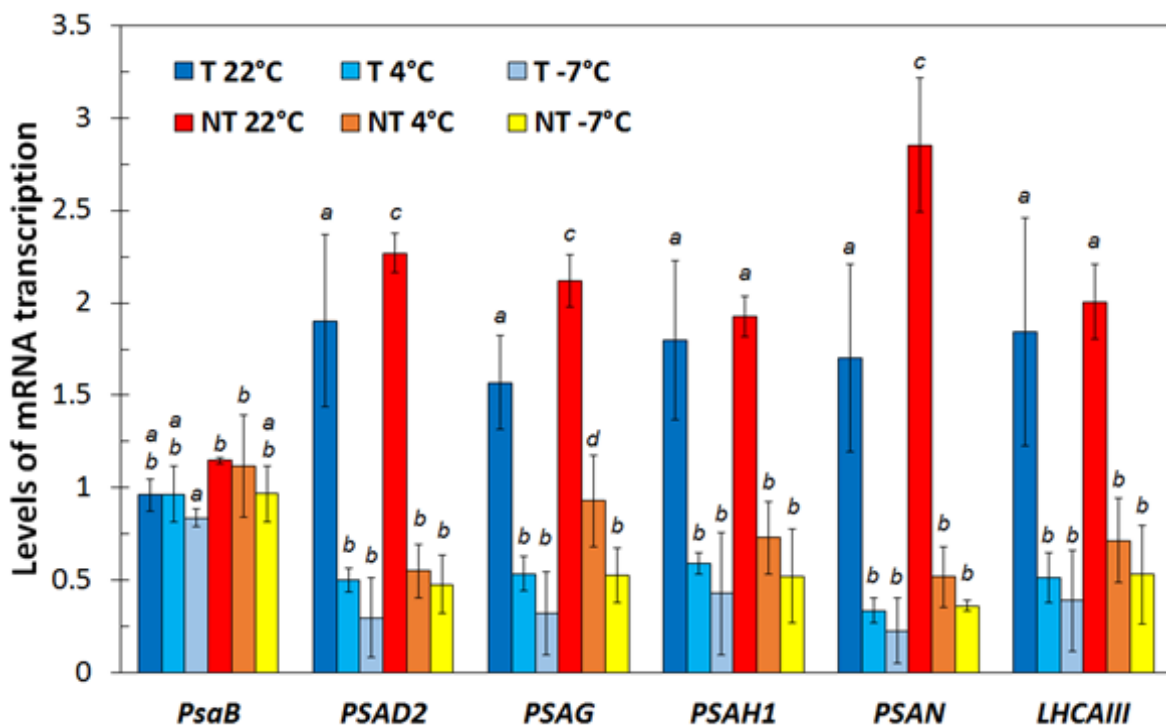
активни СК от МЕР пътя, с изходни субстрати АТФ/АДФ. За разлика от *IPT1* и *IPT3*, при гена *IPT2*, който кодира ензима тРНК-ИРТ, отговорен за продукцията на *cis*-зеатин от тРНК, беше наблюдавано повишение около два пъти в транскрипцията на този ген след третиране с ниски температури (особено при 4°C). Трябва да се отбележи, че това увеличение беше наблюдавано само при популацията Т, докато при популацията NT ниските температури практически не оказаха влияние. Що се отнася до транскрипцията на гените от тип ARR-а (*ARR1,5,7*), третирането с двата типа ниски температури доведе до инхибиране на гените *ARR1,5,7* и по-слаб ефект върху гена *ARR1*.



Фиг. 32 *qRT-PCR* транскрипционен анализ на гени от биосинтезата (*IPT1, 2, 3*), разграждането (*CKX1, 2, 5, 7*) и сигналната трансдукция (*ARR1, 5, 7*) на цитокинините. Като основа на молекулярния анализ е послужил препарат от тотална РНК, изолиран от индивиди от толерантна (Т, *GAL-T*) и нетолерантна (NT, *F005-25*) популации от *Arabidopsis thaliana*, в условия на нискотемпературен стрес (*chilling +4°C* и *freezing stress -7°C*). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

Особен интерес представляваше анализа на транскрипцията на гените от фамилията на СКХ, които кодират ключовия ензим СК-оксидаза /дехидрогеназа. Както е добре известно, този ензим се явява ключов по отношение съдържанието на СК в растенията, и респективно на тяхното физиологично действие. Отново беше наблюдаван различен отговор в поведението на тези гени при двете популации след третиране с двата типа ниски температури. Третирането с ниски температури доведе до стимулация (от два

до четири пъти) на гените *CKX1* и *CKX2* само при популацията T, докато при популацията NT не беше отчетена промяна в експресията на гените. Обратно на гените *CKX1* и *CKX2*, ниските температури предизвикаха силно намаляване в транскрипцията на гените *CKX5* и *CKX7* и при двете изследвани популации с изключение на *CKX7*, където не беше отчетена промяна в транскрипцията на гена само при популацията NT. Сумирайки резултатите от активността на IPT- и СКХ-гените при двете популации *A. alpina* в условия на нискотемпературен стрес, може да се каже, че тяхната активност корелира с нарастване на съотношението cis/транс зетини в условията на стрес.

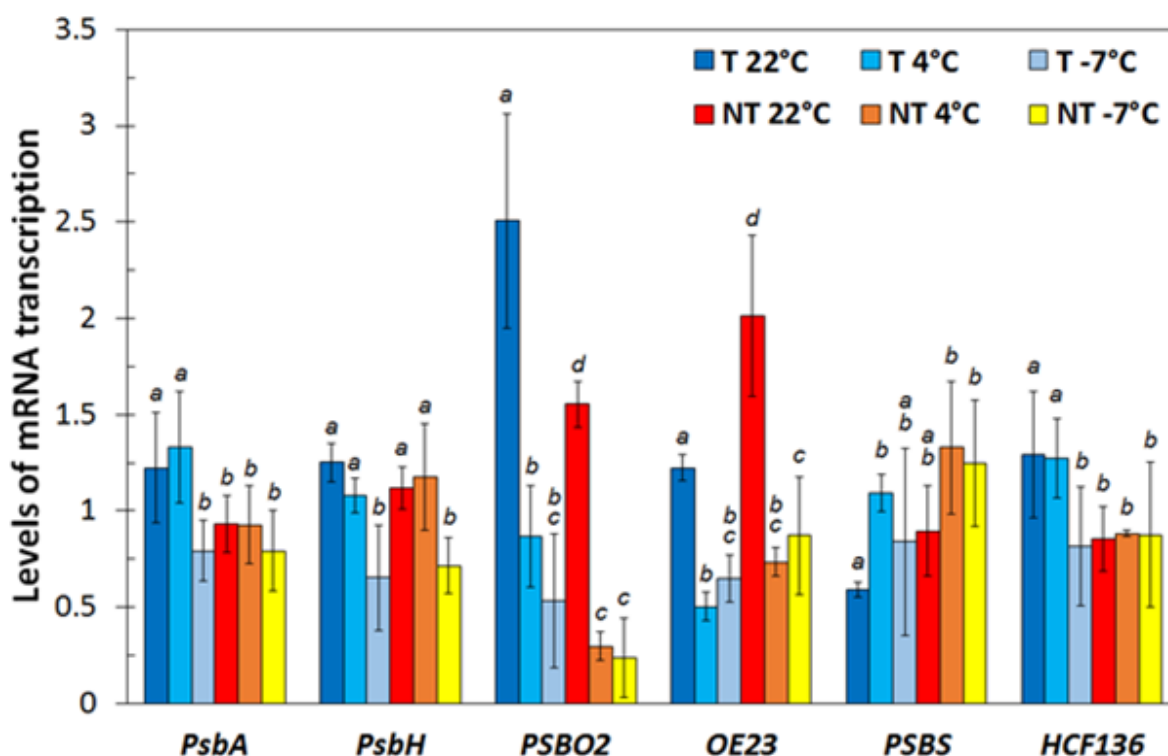


Фиг. 33 *qRT-PCR* анализ на гени, кодиращи белтъци от реакционния център и антенния комплекс на ФСІ. Като основа на молекулярния анализ е послужил препарат от тотална РНК, изолиран от индивиди от толерантна (T) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (chilling, +4°C и freezing stress, -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

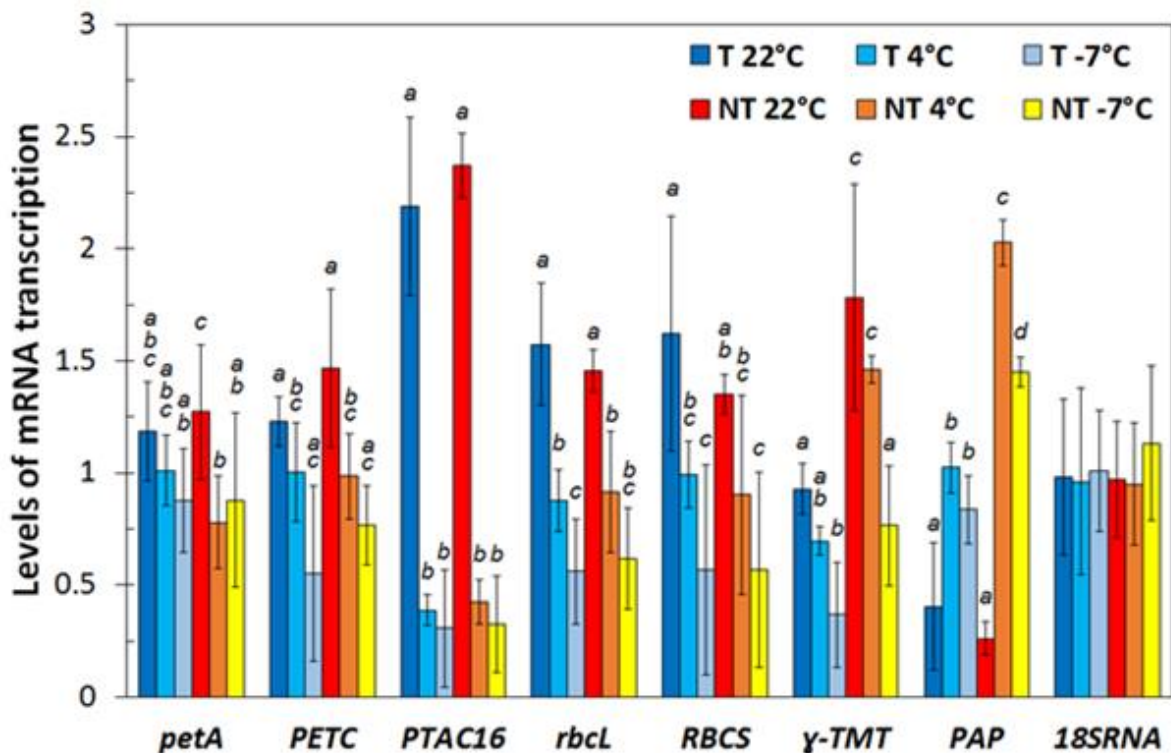
- **qRT-PCR анализ на гени, кодиращи фотосинтетични белтъци от двете фотосистеми**

qRT-PCR анализът показва, че охлаждането при 4°C води до силно намаляване на транскрипцията на изследваните гени на фотосинтетични белтъци от ФСІ и при двете популации, включително гена за третия белтъчен мономер на антенния комплекс на ФСІ (*LHCAIII*). Единствено изключение прави гена *psaB* за коровия белтък В на ФСІ, при който и двете приложени ниски температури практически не оказваха ефект (Фиг. 34).

Гените за белтъците от ФСII показаха по-сложно поведение след нискотемпературния стрес (Фиг. 35). Според отговора им спрямо ниските температури те могат да бъдат разделени на три групи: първата група, подобно на гените от ФСI, се потискат силно още след 4°C. Тук се включват гените *PSBO2* и *OE23*, които кодират два от белтъците на кислород отделящия център (ОЕС). Транскрипцията на тези гени се инхибира много силно още след 4°C (60-70%). Втората група гени демонстрираха висока степен на толерантност особено след третиране с 4°C, но които все пак бяха инхибирани при -7°C. Тук се включват двата хлоропластно кодирани гена *psbA* и *psbH*, съответно за коровия белтък D₁ на реакционния център на ФСII и периферния белтък H на ФСII, както и гена *HCF136*, който кодира белтък отговорен за асемблирането и стабилността на ФСII. Третата група беше представена от гена *PSBS*, който единствен показва стимулация след третирането с ниски температури. Този ядрен ген кодира белтъка PSBS (CP22), който е отговорен за нефотохимичното гасене на излишната светлинна енергия при светлинен стрес.



Фиг. 34 *qRT-PCR* анализ на гени, кодиращи белтъци от реакционния център, антенния комплекс и кислород-отделящия център на ФСII. Като основа на молекулярния анализ е послужил препарат от тотална РНК, изолиран от индивиди от толерантна (T) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, в условия на нискотемпературен стрес (chilling +4°C и freezing stress -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.



Фиг. 35 *qRT-PCR* анализ на други гени. *petA* и *PETC* - гени съответно за цитохром *f* и Rieske белтъка на Cytochrome *b6/f* комплекса; *PTAC16* - ген за хлоропластен транскрипционен фактор; *rbcL* и *RBCS* - гени съответно за голямата и малката субединица на Rubisco; γ -TMT (γ -tocopherol methyl transferase) - ген от биосинтеза на токоферол α и β ; *PAP* – ген за хлоропластен фосфолипид свързващ белтък (phospholipid associated protein). Като основа на молекулярния анализ е послужил препарат от тотална РНК, изолиран от индивиди от толерантна (Т) и нетолерантна (NT) популации от *Arabis alpina*, след нискотемпературен стрес (chilling +4°C и freezing stress -7°C). Малките букви показват статистически значими разлики при $P = 0.05$.

В допълнение беше изследвана транскрипцията и на други фотосинтетични гени (извън тези на ФCI и ФCII), както и някои нефотосинтетични гени. Като представители на последните бяха изследвани гена *PTAC16* за хлоропластен фактор на транскрипцията и гените γ -TMT (γ -tocopherol methyl transferase) и *PAP* (phospholipid associated protein), считани за маркери на стресовия отговор при растенията. От допълнителните фотосинтетични гени беше изследвана транскрипцията на гените *petA* и *PETC* от състава на Cytochrome *b6/f* комплекса, които кодират съответно белтъците Cytochrome *f* и белтъка на Rieske. Поради своята важност бяха изследвани и гените *rbcL* и *RBCS*, съответно за двете субединици на Рубиско. Резултатите показаха (Фиг. 36) че гените от cytochrome *b6/f* комплекса са сравнително толерантни към ниските температури, което беше изразено основно в популацията Т. За разлика от тези два гена, генът за хлоропластния фактор *PTAC16* показва изключително висока степен на инхибиране (около 80%) още след 4°C

което е идникация за възможно инхибиране на хлоропластната транскрипция още при тази температура. Що се отнася до гените за двете субединици на Рубиско, те бяха последователно инхибирани с намаляване на температурата и при двете популации в една и съща степен. Ниските температури стимулираха транскрипцията на гена *PAP* и в двете популации, с по-голяма степен в популацията NT. Транскрипцията на гена γ -*TMT* беше инхибирана и при двете популации постепенно след третиране с ниски температури.

05. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата работа бяха изследвани растения от две популации на *A. alpina* от френските Алпи и планината Веркор, съответно толерантна и нетолерантна към минусови температури и растения от Рила планина (толерантни). Бяха изследвани основни физиологични показатели като изтичане на електролити, както и фотосинтезата посредством методите на поглъщане на CO₂, хлорофилната флуоресценция и разсейването на модулирана 820 nm светлина. Също така беше изследвано съдържанието на пигменти от фотосинтетичния апарат, както и токоферолите като неензимни антиоксиданти. В допълнение беше изследвано съдържанието на важни фитохормони (АБК, СК, жасмонова киселина) и беше направен анализ скоростта на транскрипцията на гени от метаболизма на тези фитохормони и фотосинтетични белтъци.

Нашите резултати показаха силно намаление в съдържанието на фотосинтетичните пигменти след нискотемпературен стрес главно в нетолерантната популация от *A. alpina* и запазване на съдържанието им при T. От особено значение беше увеличението на пигмента от ксантофиловия цикъл зеаксантин в приблизително еднаква степен и при двете популации след ниски температури. Зеаксантинът е отговорен за нефотохимичното гасене на светлинна енергия и участва в протекцията от абиотичен стрес (Niyogi et al., 1998). Съдържанието на двата каротеноидни пигмента, които бяха в най-голямо количество лутеин и β -каротен се запази непроменено при T, докато при NT силно намалю още след 4°C. Лутеина е най-важния пигмент от състава на антенните комплекси (Standfuss et al., 2005). β -каротена е втория по съдържание пигмент в растителната клетка и участва в състава на тилакоидите стабилизирайки свойствата на мембраните (Gruzsecki and Strzalka, 2004).

Съдържанието на неензимните антиоксиданти токоферолите, които предпазват фотосинтетичния апарат от активни кислородни форми остана непроменено след

третиране с ниски температури и при двете популации освен на γ - и δ -токоферола, които нарастваха само при популацията Т. Анализът на хлорофилната флуоресценция и разсейването на модулираната 820 nm светлина показа по-висока чувствителност на ФСІ, отколкото на ФСІІ. Транскрипционният анализ на мРНК за белтъци от фотосистемите също демонстрира по-силно инхибиране на гените за ФСІ. Анализът на разсейването на модулираната светлина при 820 nm показва увеличение на редуцираните съединения след 4°C, както и блокиране на електронния транспорт до ФСІ при NT в сравнение с Т и силно потискане на функциите ѝ при NT след минусови температури. Параметрите на хлорофилната флуоресценция са индикация за по-висока толерантност на показателите, които са свързани с активността на ФСІІ, а параметрите, които отразяват близки явления до ФСІ бяха по-силно инхибирани. Тези резултати дават основание да се предположи, че ФСІ е по-чувствителна към ниски температури, отколкото ФСІІ, която понася по-голям дял от нискотемпературния стрес. Анализът на транскрипцията на гени от двете фотосистеми показва доста по-голямо инхибиране на гените от ФСІ, с изключение на гена за коровия белтък PsaB, чиято транскрипция не се променяше. Генът за коровия белтък от ФСІІ PsbA, както и генът за асемблиране и стабилност на ФСІІ HCF136 също не бяха променени значително след нискотемпературен стрес и при двете популации. Двата изследвани гена (PSBO2 и OE23) за белтъци от кислород отделящия център бяха инхибирани още след 4°C и при двете популации. Нетната фотосинтетична активност показва силно потискане и при трите изследвани популации (Т, NT и Рила) още след 4°C което е индикация за това, че тъмнинните реакции (фазата на въглеродните реакции) се инхибират значително по-силно отколкото светлинната фаза. Гените за малката и голямата субединица на Рубиско бяха инхибирани последователно след нискотемпературните третираня и при двете популации по сходен начин като нетната фотосинтеза.

Хормоналният анализ показва увеличение в съдържанието на АБК и нейните разградни продукти след третиране с ниски положителни температури и запазване на високото им съдържание и след -7°C. Съдържанието на последния продукт от инактивацията на АБК чрез окисление – DPA беше най-високо при Т и практически отсъстваше при NT, което вероятно е признак за по-високата метаболитна активност на АБК при Т. Анализа на съдържанието на цитокинините /СК/ показва два пъти по-високо количество на считаните за неактивни *cis*-зеатини в сравнение с биологично активните цитокинини. Най-високо беше съдържанието на *cis*-зеатин рибозида, следван от

изопентениладенин рибозида. Поведението на тези фитохормони при двете изследвани популации след ниски температури беше сходно и се запазваше сравнително постоянно след ниските температури при Т и намаляваше след 4°C и още по-силно след -7°C при NT. Високото съдържание на *cis*-зеатини дава основание да се предположи, че тези цитокинини имат висока биологична активност при *A. alpina*.

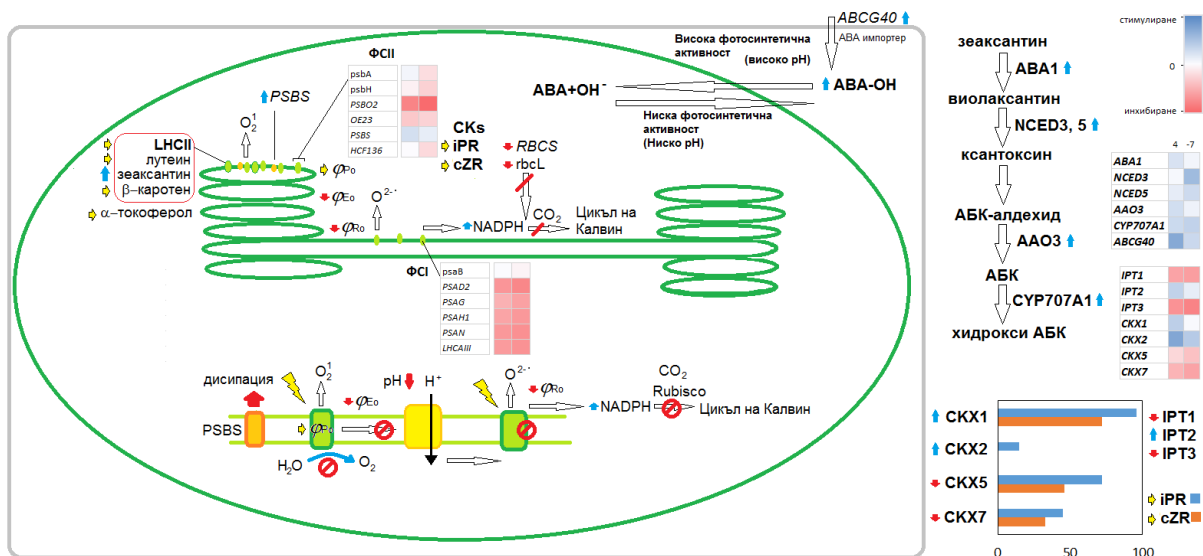
Транскрипционните нива на гените от метаболизма на АБК и цитокинините показваха корелация със съдържанието на тези фитохормони. Гените от биосинтетичния път на АБК показваха активиране след нискотемпературен стрес. Особено силно беше активиран генът за импорт на АБК в клетката при Т след ниски температури, за разлика от NT. Поради това е възможно при популацията Т АБК да има сигнална функция освен стресова. Що се отнася до гените за синтез на биологично активните цитокинини (IPT1 и 3) (Kasahara et al., 2004) те бяха инхибирани след ниските температури при двете популации, а IPT3 не беше представен при растенията от популация NT. Генът IPT2 (който осъществява биосинтеза на *cis*-зеатините от tPHK) (Miyawaki et al., 2006) беше стимулиран след ниски температури само при растенията от популация Т, което корелира с високото съдържание на тези цитокинини при Т. Ензимите, които се кодират от гените СКХ1 и 2 имат за субстрати биологично активните цитокинини, а СКХ1 също така и *cis*-зеатин (Gajdosova et al., 2011). Тези гени бяха стимулирани само при толерантната популация. СКХ5, който е един от другите два изследвани гена от деградационния път на цитокинините кодира ензим разграждащ биологично активните цитокинини и *cis*-зеатини. Ензимът който се кодира от последния изследван ген от генната фамилия СКХ7 разгражда в най-голяма степен *cis*-зеатин и след това изопентениладенин (Gajdosova et al., 2011). Тези гени бяха инхибирани при толерантната популация, а при NT СКХ7 отсъстваше.

Известно е, че процеса фотосинтеза се повлиява най-много от абиотичен стрес, в това число ниски температури (Theocharis et al., 2012). Фотосинтезата е основния анаболитен процес при растенията, а освен това е източник на активни кислородни форми (ApeI and Hirt, 2004). В условия на стрес от ниски температури се образуват по-голям брой активни кислородни форми, поради повреди в растителната клетка и основно във фотосинтетичния апарат (Krieger-Liszka, 2004). Първоначално се инхибира Рубиско и поглъщането на CO₂ се потиска, вследствие на което се натрупва редуциран NADPH. Когато в електрон-транспортните вериги се натрупат по-голямо количество редуцирани съединения, донираните от фотосистемите електрони не отиват за редукция на NADPH,

а се свързват с кислорода и се образуват активни кислородни форми (Szarka et al., 2012). Възможността за неутрализирането на тези активни кислородни форми чрез каротеноидните пигменти или антиоксидантната активност може да бъде вероятна причина за устойчивостта на толерантните популации растения (Jahns and Holzwarth, 2012). Тъй като цитокинините са регулатори на фотосинтетичния апарат, както и на активността на Рубиско (Lerbs et al., 1984), характерното запазване на съдържанието на цитокинини при Т вероятно е отговорно за запазването на фотосинтетичната активност при растенията от тази популация след нискотемпературен стрес. Активирането на специфични гени от биосинтеза на цитокинини като IPT2 за синтеза на *cis*-зеатини също беше по-високо при толерантната популация. Прави впечатление активирането на определени протекторни механизми срещу нискотемпературен стрес както при Т, така и при NT. Така например, след третиране с ниски температури се активира ксантофиловия цикъл при растенията и от двете популации. Също така, съдържанието на α -токоферол, чието количество беше най-голямо остана постоянно. Освен това, специфични гени за фотопротекторни белтъци като PSBS също се активираха и при двете популации в еднаква степен, както и гени от биосинтеза на АБК.

Като най-важен за метаболитната активност на растенията процес, фотосинтезата се повлиява в най-голяма степен от стреса, в това число и ниските температури. Фотосинтезата е високо енергиен процес, при който се образуват голямо количество активни кислородни форми. След нискотемпературен стрес, образуването на тези активни кислородни форми става все по-трудно за овладяване от растенията и те нанасят множество поражения върху клетъчните компоненти и фотосинтетичния апарат. Brestic et al., 2013 показват че АБК може да регулира позитивно устойчивостта на ФСII чрез повишаване на антиоксидантната активност. Трансгенен тютюн с IPT регулиран от стресов промотер на стареенето показва висока устойчивост към засушаване, дължащо се на повишаване на фотодишането регулирано от цитокинините (Rivero et al., 2009).

ОБЩА СХЕМА ЗА ФИЗИОЛОГИЧНИТЕ, БИОХИМИЧНИТЕ И МОЛЕКУЛЯРНИТЕ ПРОЦЕСИ В РАСТЕНИЯ ОТ ТОЛЕРАНТНА ПОПУЛАЦИЯ НА *A. ALPINA* СЛЕД НИСКОТЕМПЕРАТУРЕН СТРЕС.



Сините стрелки показват стимулиране, червените – инхибиране, а жълтите – без промяна.

06. ИЗВОДИ

1. Проведен е подбор на две толерантни към минусови температури (-7°C) популации на *A. alpina*, съответно от френските Алпи (Т) и Рила планина, както и една нетолерантна към този стрес популация (NT) от планината Веркор, Франция.
2. Ниските положителни (4°C , chilling stress) и отрицателните температури (-7°C , freezing stress) потискат нетната фотосинтезата и при трите популации на *A. alpina*, съответно средно с 55% и 75%, като отрицателния ефект е най-силно изразен при популацията NT. Само растенията от популациите Т и от Рила планина възстановиха нетната си фотосинтеза след минусовият стрес.
3. Установено е намаляване на хлорофилните пигменти (по-специално на хлорофил а) под влияние на двата типа ниски температури и при двете популации Т и NT, като това намаляване е по-силно при NT. За разлика от хлорофилите, каротеноидните пигменти намаляват след нискотемпературния стрес само при популацията NT, докато при популацията Т съдържанието им остава постоянно.

В рамките на ксантофиловия цикъл е установено увеличаване на зеаксантина и намаляване на виолаксантина (деепоксигениране на виолаксантина).

4. В сравнение с Φ_{P_0} , параметрите на бързата хлорофилна флуоресценция Φ_{E_0} , Φ_{R_0} и $P_{I_{total}}$ бяха инхибирани в по-висока степен и при двата вида нискотемпературен стрес, като потискането им при -7°C е по-силно изразено при популацията NT. По тези показатели, растенията от Рила планина демонстрираха по-висока толерантност спрямо нискотемпературния стрес в сравнение с популацията T.
5. MR_{820} , като мярка за активността на ФСІ беше инхибирана в по-висока степен при популацията NT. За разлика от популацията T, след третиране с минусови температури, активността на ФСІ не беше възстановена само в популацията NT. И по този показател растенията *A. alpina* от Рила планина показаха по-висока степен на толерантност спрямо двата вида нискотемпературен стрес.
6. За разлика от гените за ФСІІ и двата типа ниски температури (4°C и -7°C) потискат в по-висока степен и при двете популации T и NT транскрипцията на изследваните гени за белтъци от ФСІ (PSAD2, PSAG, PSAH, PSAN и LHCAIII). Транскрипцията на гените от ФСІІ (psbA, psbH и HCF136) е относително толерантна към третиране с ниски температури с изключение на PSBO2 и OE23. Единственият ген, от ФС2, който се стимулира след нискотемпературен стрес е PSBS.
7. Гените от Калвиновия цикъл за малката (RBCS) и голямата (rbcL) субединица на Рубиско се потискат в една и съща степен и от двата типа нискотемпературен стрес при двете изследвани популации T и NT на *A. alpina*.
8. Установено е нарастване на АБК и нейните окислени производни РА и DРА след нискотемпературен стрес 4°C и запазване на съдържанието им след -7°C и при двете изследвани популации T и NT. В съответствие с нарастналото съдържание на АБК и нейните катаболити, двата типа нискотемпературен стрес предизвикват нарастване в транскрипцията на гените от биосинтезата (ABA1, NCED3, NCED5, AAO3), инактивацията (CYP707A1) и транспорта на АБК (ABCG40).
9. За разлика от популацията NT, третирането както с 4°C , така и с -7°C не променя съдържанието на биологично активните цитокинини (главно iPR) и цитокинините от *cis*-зеатинов тип (главно *cis*-ZR). И двата типа нискотемпературен стрес

предизвикват потискане на транскрипция на гените IPT1 и IPT3 за биосинтез на биологично активни цитокинини при T и NT, докато транскрипцията на гена IPT2 за биосинтез на cis-зеатини се увеличава само при T, което корелира с високите съдържания на cis-зеатини в тази популация. Установена е стимулация на гените от фамилията SKX (главно SKX1 и SKX2) под влияние на ниските температури при T-популацията.

07. ПРИНОСИ

1. След период на аклимация при ниски положителни температури (4°C) е установена толерантна спрямо минусов стрес (-7°C) популация на *Arabis alpina* L. с местобитание Рила планина, район „Седемте рилски езера“. Тази популация е сходна с известна вече толерантна популация T на *A. alpina* от френските Алпи. Двете толерантни популации се различават от популация NT на *A. alpina* от планината Vercors (Франция), която е нетолерантна към минусовия стрес.

2. За първи път е показано, че за разлика от нетолерантната популация NT, толерантните към измръзване (chilling stress) популации T на *A. alpina* от френските Алпи и от Рила планина могат да възстановят интензивността на нетната фотосинтеза след третиране при -7°C отново чрез преминаване през период на аклимация при 4°C.

3. Сравнителният анализ между популациите T и NT на *A. alpina* показва, че за разлика от NT, където и двата типа нискотемпературен стрес при 4°C и -7°C водят до силно намаление главно на хлорофил *a* и основните каротеноидни пигменти лутеин и β-каротен, при толерантната популация T съдържанието им остава относително постоянно. На фона на еднаквите промени в пигментите на ксантофиловия цикъл (увеличение на зеаксантина за сметка на виолаксантина) и при двете популации, запазеното съдържание на лутеин и β-каротен при популацията T може да е свързано с обезпечаване на нейната толерантност към минусовия стрес.

4. Комплексният сравнителен анализ чрез методите на хлорофилната флуоресценция и транскрипционния (qRT-PCR) анализ на гени за белтъци от ФСІ и ФСІІ показва по-висока чувствителност на ФСІ към двата типа нискотемпературен стрес. Параметрите на хлорофилната флуоресценция и транскрипцията на гените от ФСІІ (psbA, psbH и HCF136) са относително толерантни към третиране с ниски температури само при популацията T, а генът за белтъка PSBS даже се стимулира при -7°C.

5. За първи път в две различни по своята толерантност към минусови температури (-7°C) популации на *A. alpina* е проведен комплексен анализ включващ определяне съдържанието на АБК и всички типове цитокинини, както и транскрипцията на основни гени на техния метаболизъм и сигнална трансдукция. Установено е запазване нивата на основния биологично активен цитокинин iPR заедно със *cis-ZR* само в популацията Т, докато АБК и нейните окислени форми РА и ДРА бяха запазени и в двете популации Т и NT. Промените в съдържанието на АБК и цитокинините корелираше със скоростта на транскрипция на гени от тяхната биосинтеза, разграждане и транспорт (ABA1, NCED3, NCED5, AAO3, CYP707A1 и ABCG40, съответно за АБК) и IPT1, IPT3, IPT2, CKX1 и CKX2 за СК.

6. Анализът на основни параметри на фотосинтезата, заедно със съдържанието на ключови хормони и експресията на гени от техния метаболизъм, ни дава основание да предположим, че толерантността към нискотемпературен стрес (-7°C) на популацията Т на *A. alpina* от френските Алпи може да се дължи на комплекс от фактори включващи високи нива на хлорофили и каротеноидни пигменти, вкл. тези от ксантофиловия цикъл, по-висока активност на електронен пренос във ФСII и по-високо съдържание на биологично активни и *cis*-форми на цитокинините като основни регулатори на процеса фотосинтеза.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ

1. **M. Kolaksazov**, F. Laporte, K. Ananieva, P. Dobrev, M. Herzog, E. D. Ananiev, 2013. Effect of Chilling and Freezing Stresses on Jasmonate Content in *Arabis alpina*. *Bulg. J. Agr. Sci.*, 19(2): 15–17
2. **Kolaksazov M.**, F. Laporte, V. Goltsev, M. Herzog, E. D. Ananiev. 2014. Effect of frost stress on chlorophyll fluorescence and modulated 820 nm reflection in *Arabis alpina* population from Rila mountain. *Genetics Plant Physiol.*, 4(1-2): 44-56
3. E. D. Ananiev., **M. Kolaksazov**, F Laporte, M Kunz, M Herzog, Effect of cold stress on photosynthesis in plants from two populations of *Arabis alpina*. (submitted)
4. Dolya Pavlova, Frédéric Laporte, **Marko Kolaksazov**, Evguéni D. Ananiev, Michel Herzog, 2014. Pollen morphological studies on *Arabis alpina* L. (Brassicaceae) populations from the Alps and Rila mounatin.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. **M. Kolaksazov**, F. Laporte, K. Ananieva, P. Dobrev, M. Herzog, E. D. Ananiev, 2013. Effect of Chilling and Freezing Stresses on Jasmonate Content in *Arabis alpina*. *Bulg. J. Agr. Sci.*, 19(2): 15–17
2. **Kolaksazov M.**, F. Laporte, V. Goltsev, M. Herzog, E. Ananiev. 2014. Effect of frost stress on chlorophyll fluorescence and modulated 820 nm reflection in *Arabis alpina* population from Rila mountain. *Genetics Plant Physiol.*, 4(1-2): 44-56
3. E. D. Ananiev., **M. Kolaksazov**, F Laporte, M Kunz, M Herzog, Effect of cold stress on photosynthesis in plants from two populations of *Arabis alpina*. (submitted)
- 4.

УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ КОНФЕРЕНЦИИ И СИМПОЗИУМИ:

1. **Marko Kolaksazov**, Frédéric Laporte, Kalina Ananieva, Petre Dobrev, Michel Herzog, Evguéni Ananiev. Effect of chilling and freezing stresses on jasmonate content in *Arabis alpina*. Youth Scientific Conference “Kliment days” 22-23 November 2012, Sofia, Bulgaria.
2. **Marko Kolaksazov**, Kiril Mishev, Frédéric Laporte, Michel Herzog, Evguéni D Ananiev. Comparative study of frost-tolerant *Arabis alpina* populations from the region of “The Seven Rila Lakes” and the French Alps. International conference “Kliment’s days”, 20-22 November 2013, Sofia, Bulgaria (Book of Abstracts MB3, p.35)
3. Ananiev E. D., Laporte F., Ananieva K., **Kolaksazov M.**, Dobrev P., Motyka V., Herzog M., 2014. Hormonal regulation of frost tolerance in populations of *Arabis alpina* L. from French Alps and Rila mountain. “Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges”, 24-26 September 2014, Sofia, Bulgaria (Book of Abstracts, O-08, p.18)
4. Pavlova D., Laporte F., **Kolaksazov M.**, Ananiev E. D., Herzog M., 2014. Pollen morphological studies on *Arabis alpina* L. (Brassicaceae) populations from the Alps and Rila mountain. “Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges”, 24-26 September 2014, Sofia, Bulgaria (Book of Abstracts, P-31-T1, p.42)

УЧАСТИЯ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ:

1. Френско-Български проект за двустранно сътрудничество РИЛА 01/7, 21.06.2013 към Фонд „Научни Изследвания“ при МОН. Тема на проекта: „**Хормонална регулация на толерантността към нискотемпературен стрес при *Arabis alpina*. Сравнителен анализ на популациите от Алпите и Рила планина.**“
2. Изследователски проект в подкрепа на докторанти № 20 / 28.04.2014 от СУ „Св. Кл. Охридски“ на тема: „**Устойчивост към нискотемпературен стрес на популации *Arabis alpina* от френските Алпи и Рила планина**“