

ОТЧЕТ

за изпълнение на втората година от докторантура

Тема на дисертационен труд:

**Толерантност на *Arabis alpina* към нискотемпературен
стрес – хормонална регулация.**

редовен докторант: М. Колаксьзов

научен ръководител: проф. д-р. Е. Ананиев

Катедра Физиология на растенията, БФ на СУ „Св. Кл. Охридски“

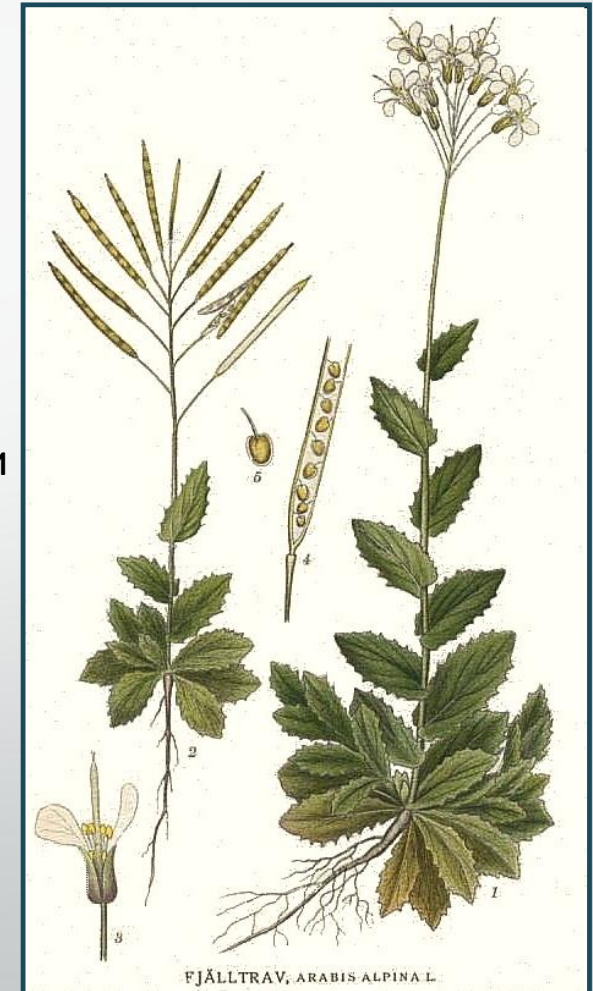
Основни експериментални задачи за 2013г.

- I. Селектиране на интактни растения (*A. alpina*) и събиране на семена (siliques) от района на **„Седемте Рилски Езера“**. Пренасяне и култивиране на растенията при контролирани лабораторни условия. Развитие на *A. alpina* от семена в лабораторни условия.
- II. Сравнителен анализ на *A. alpina* от района на „Седемте Рилски Езера“ и растения от **Френските Алпи** – района на **Col du Galibier** в Алпите (популация T - tolerant) и от **планината Vercors** (популация NT – non tolerant)
 1. Определяне съдържанието на зелени пигменти (Хл. „a“ и Хл. „b“) и каротеноиди, вкл. пигменти от ксантофиловия цикъл (зеаксантин, антераксантин, виолаксантин)
 2. Изследване на активността на ФС II (флуоресцентен анализ, както и на активността на ФС I
 3. Изследване експресията на ключови гени от метаболизма и сигналния път на ABA (NCED - 9-цис епоксикаротеноид диоксигеназа ABA – алдехид оксидаза), СК (IPT – изопентенил аденин трансфераза) посредством RT-qPCR анализ.

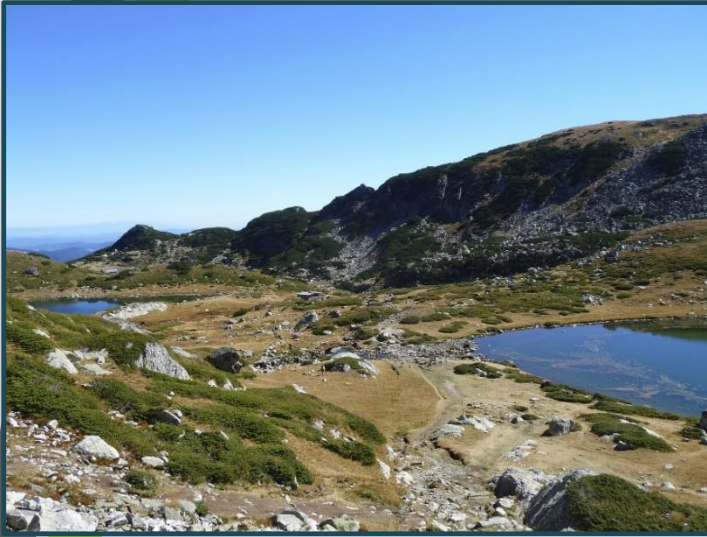
Обект на изследването:
Моделното растение *Arabis alpina* L.
за изследване на адаптацията към нискотемпературен стрес

- Многогодишно планинско растение от сем. Brassicaceae
- Растящо от 500 m до 3200 m надморска височина (в зависимост от географската ширина)
- Среща се в повечето европейски страни, на Канарските острови, северна и източна Африка, Етиопия, Арабския полуостров и централна Азия. В България – Рила, Пирин и Средна Стара Планина
- Геномния размер е около 375 Mb ($n = 8$ хромозоми)

Самооплождащ се диплоид



Селектиране на интактни растения *A alpina* в Рила и събиране на зрели семена (siliques)



- Района на „Седемте Рилски Езера“, участъка между езерата „Близнака“ и „Трилистника“



Диви пресадени растения от Рила

Отглеждане на растенията в лабораторни условия

- В култивационно помещение при 22°C – 25°C, 12/12h фотопериод, 60-70% отн. вл., светлинен интензитет $\sim 150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, в продължение на 2 1/2 месеца

Растения от семена от Франция



GAL "E"
(tolerant)

F005
(non-tolerant)

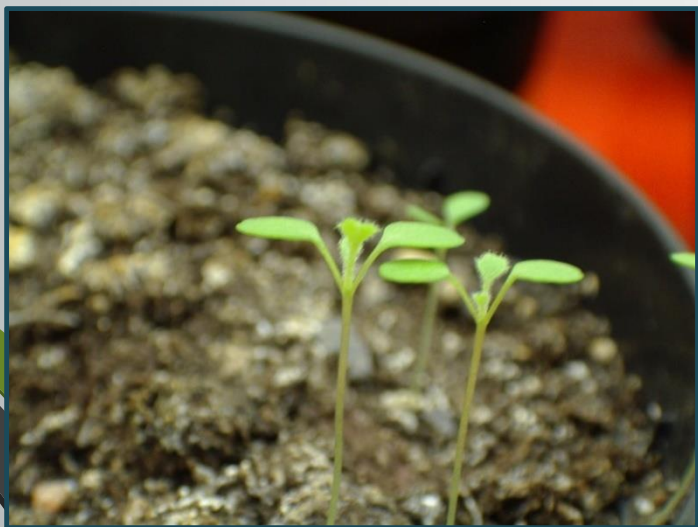
F109
(short hypocotyl)

Развитие на *A. alpina* от семена (Седемте Рилски Езера)



10 ДНИ

20 ДНИ



15 ДНИ



20 ДНИ



1 месец

Легенда към експеримента

Третиране	22°C Control	4°C; 4 дни (chilling stress)	–6°C, 12h на тъмно (freezing stress)	Възста- новяване (recovery) 4°C; 4 дни	Възста- новяване (recovery) 22°C; 4 дни
Толерантни	T_{22}	T_4	T_{4S}	Rec T_4	Rec T_{22}
Нетолерантни	NT_{22}	NT_4	NT_{4S}	Rec NT_4	Rec NT_{22}
Нискостъблени	SH_{22}	SH_4	SH_{4S}	Rec SH_4	Rec SH_{22}

Резултати – ефект на chilling и freezing stress. Възстановяване

Control: 22°C



T (GAL "E") NT (Foo5)

Chilling stress



T (GAL "E") NT (Foo5)

Freezing stress



T (GAL "E") NT (Foo5)

Freezing stress



Recovery 4°C



T (GAL "E") NT (Foo5)

Recovery 22°C



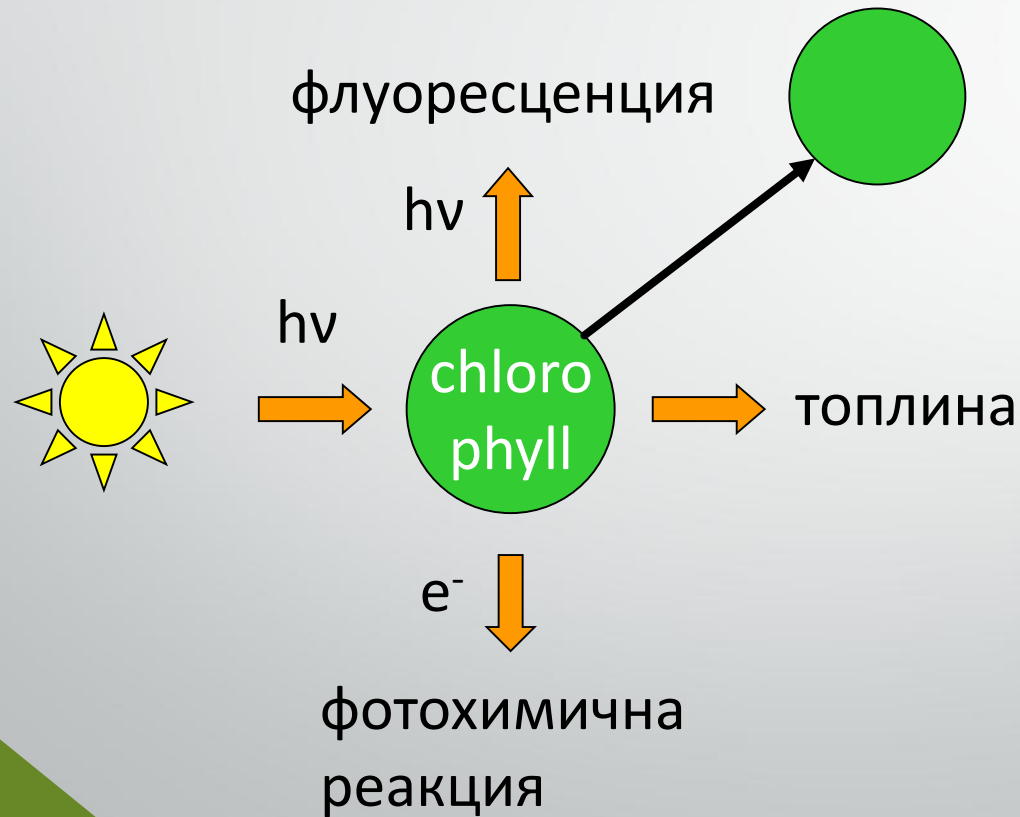
T (GAL "E") NT (Foo5)

Извод – фенотипни прояви на Т- и NT-популациите след нискотемпературен стрес

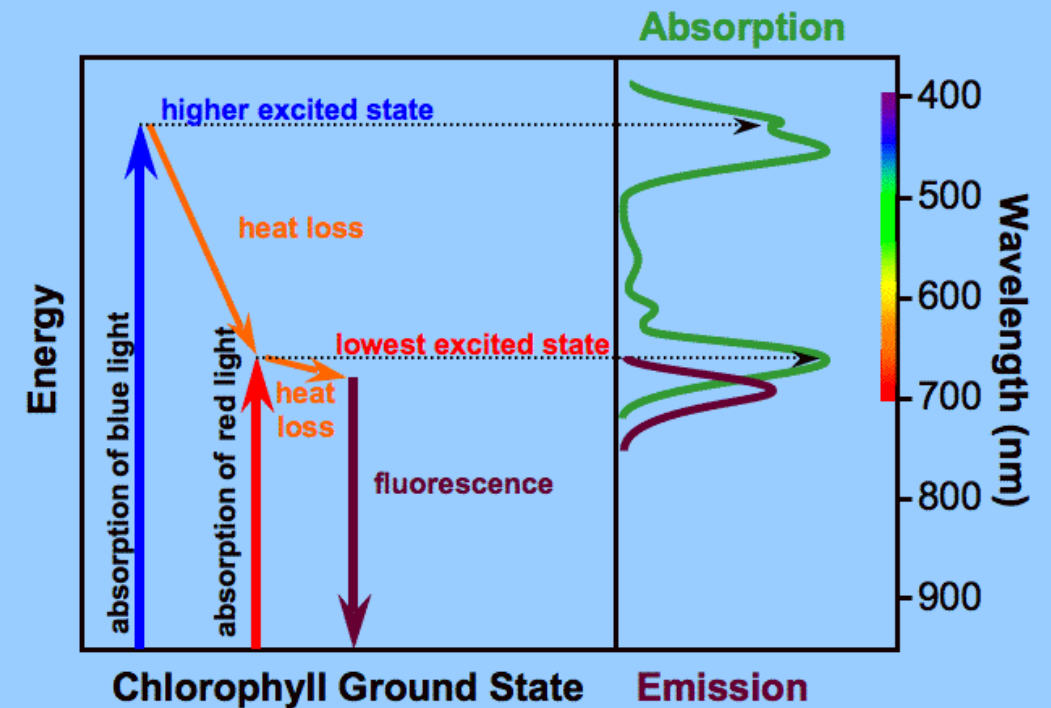
Т- популацията преодолява влиянието на ниските минусови температури (freezing stress), докато при NT-популацията повечето от индивидите загиват след този стрес. В условия на ниски положителни температури (chilling stress), двете популации проявяват сходни фенотипни прояви на толерантност.

Изследване на ФС - флуоресцентен анализ на хлорофила

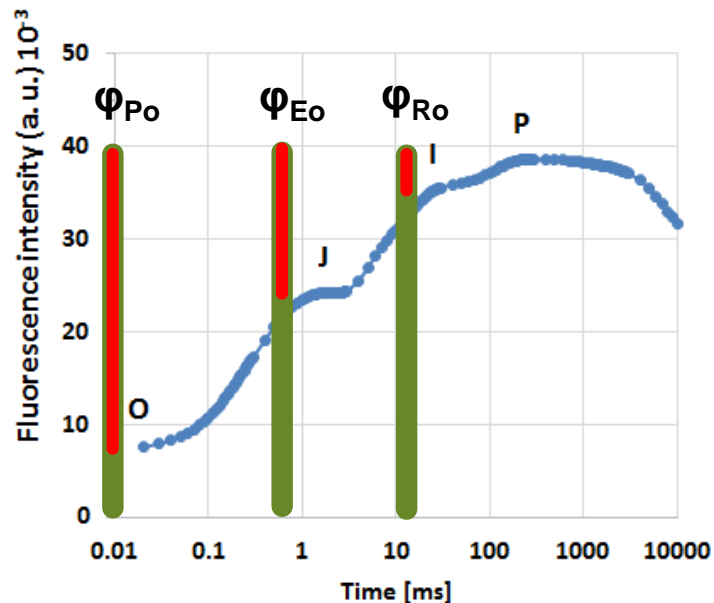
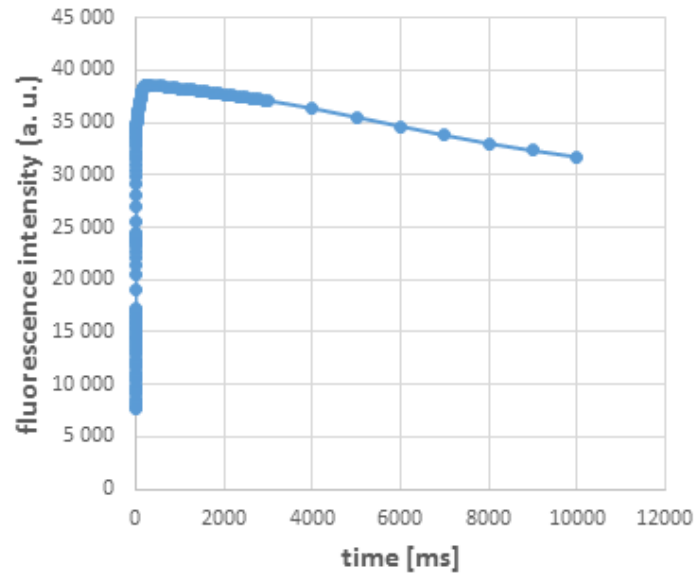
Абсорбция и излъчване на светлината от хлорофилните молекули



The absorption of light relates to electron excitation states



Крива на Каутски и параметри на флуоресценция



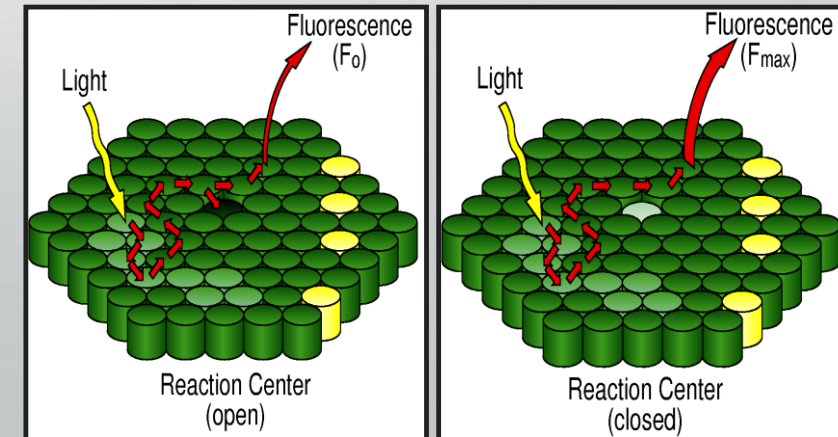
- **Флуоресцентната индукционна кинетика** - при осветяване с непрекъсната светлина има бърза, по-малко от сек, експоненциална фаза и една бавна фаза на спадане, с продължителност от няколко минути.
- От F_o до F_m (бърза фаза) флуоресценцията се повишава в следствие на намаляване на фото-химичното насищане (PQ), затваряне на реакционните центрове и редуциране на QA
- Бавната фаза се приписва на различни фактори – енергиен пренос, синтез на АТФ, CO₂ фиксация, нефотохимично гасене (NPQ).
- OJIP прехода и стойностите на F_o , F_m , F_v и F_v/F_m (максимален квантов добив, 0.78-0.84) дава директна информация за фотохимията на ФС₂

Φ_{P_o} – макс. кв. добив на първ. ФХ

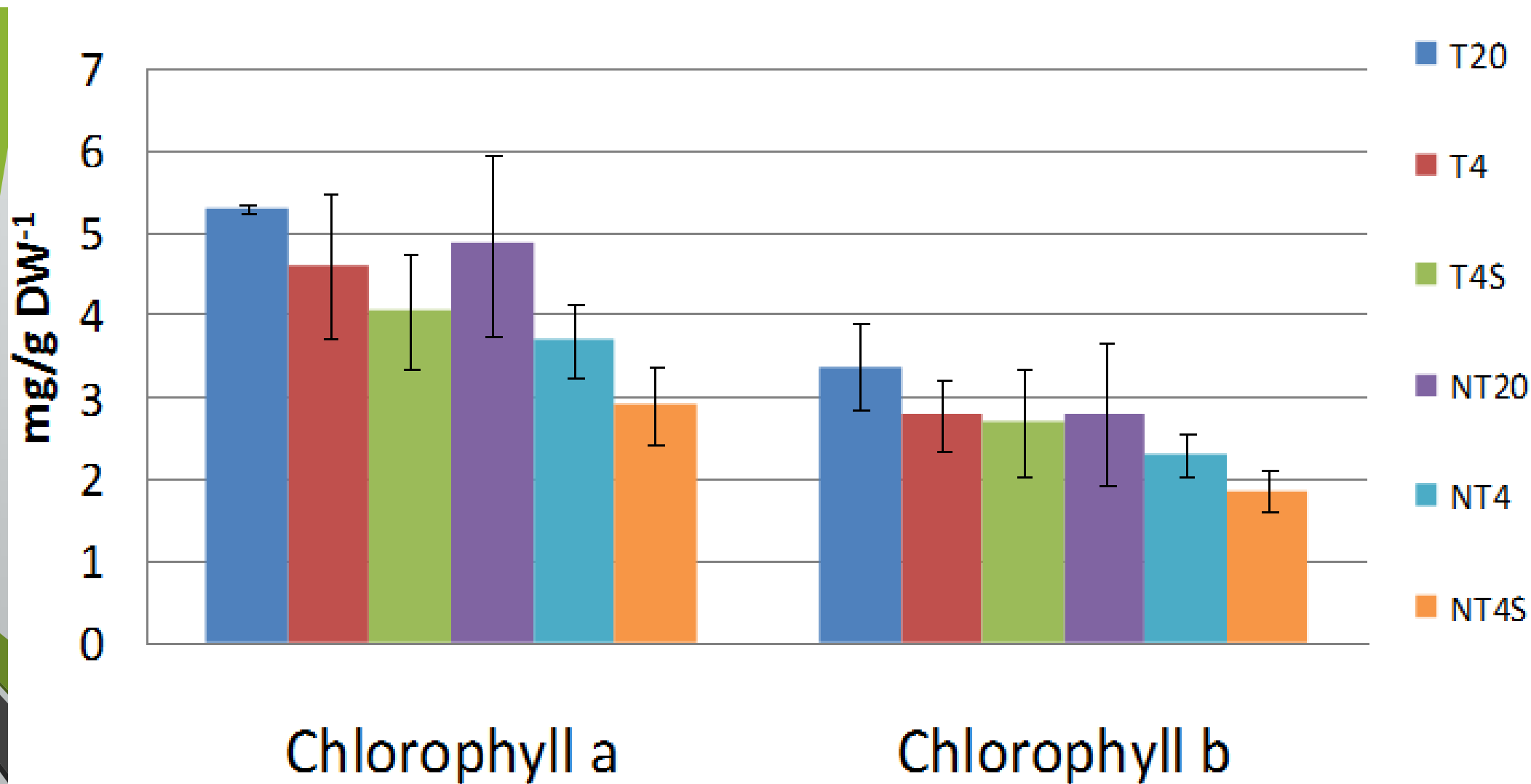
Φ_{E_o} – кв. добив на е⁻ транспорт след QA

Φ_{R_o} – кв. добив на е⁻ транспорт след PQ

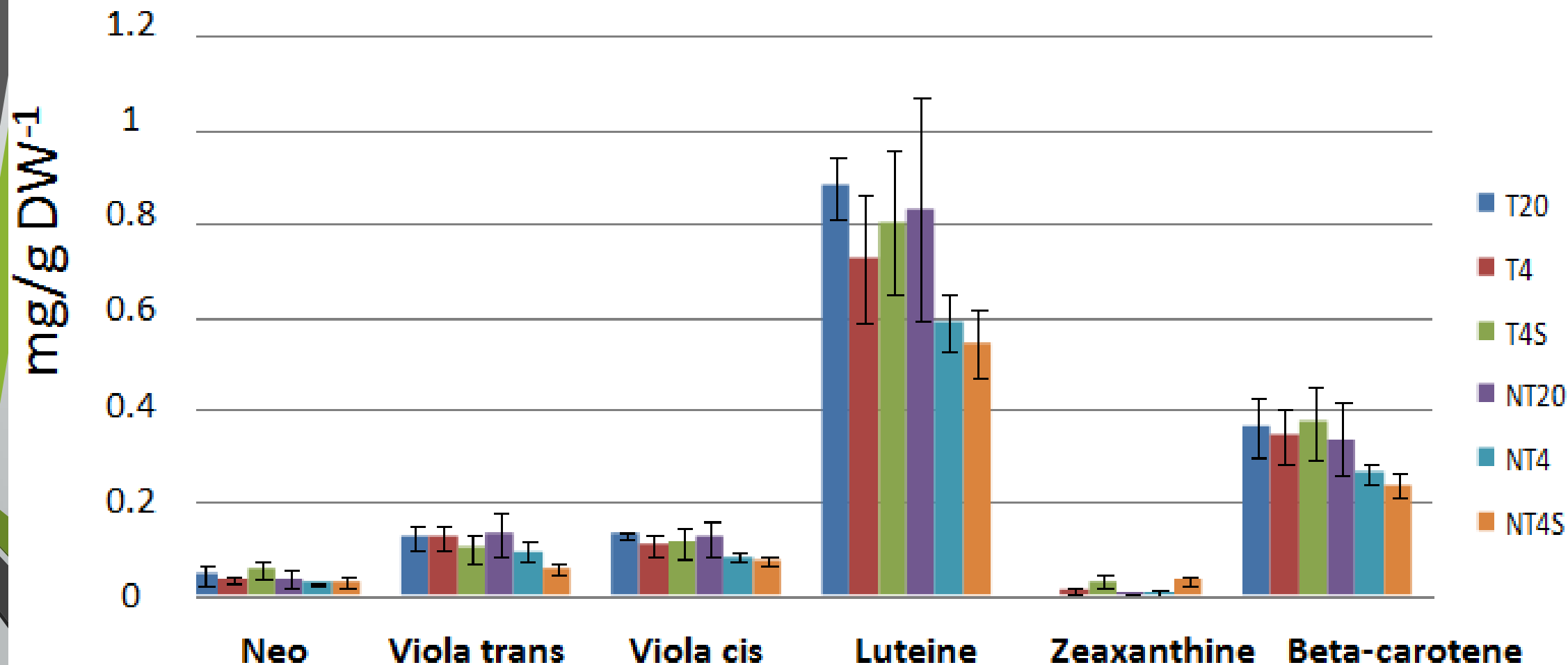
Φ_{D_o} – кв. добив на топл. дисипация



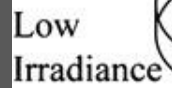
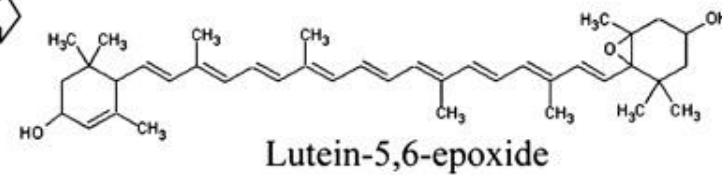
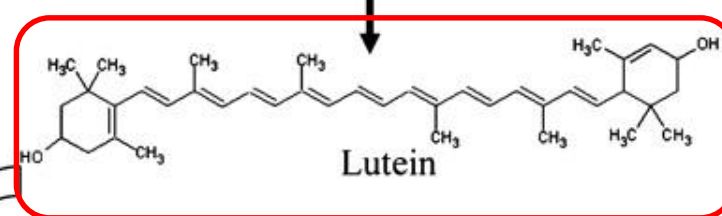
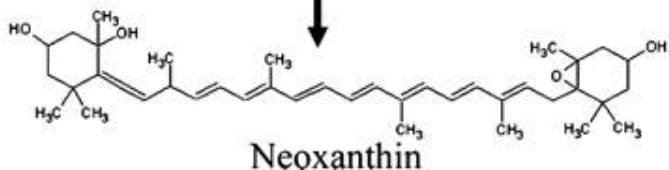
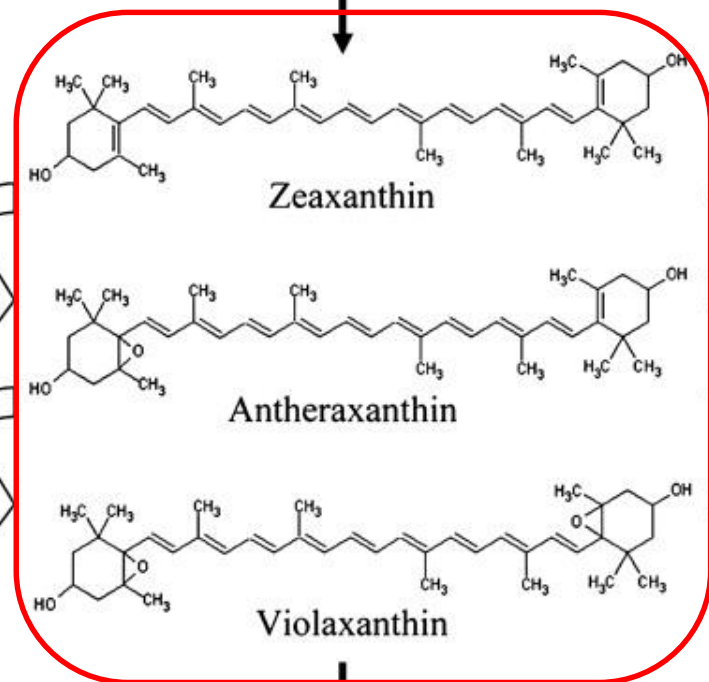
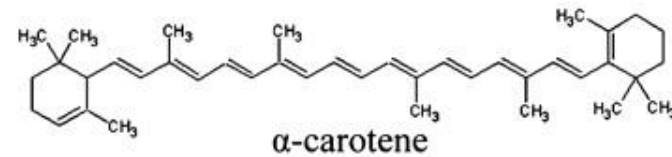
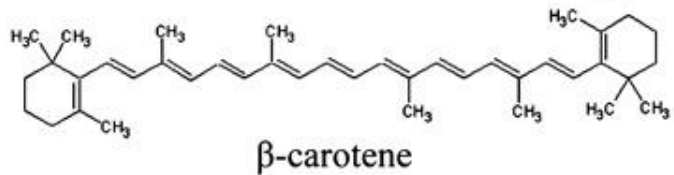
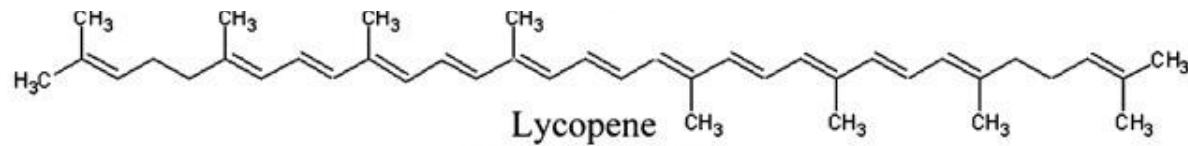
Резултати – съдържание на хлорофил



Резултати – съдържание на каротеноиди



Биосинтеничен път на каротеноидите



Low Irradiance

High
Irradiance

High
Irradiance

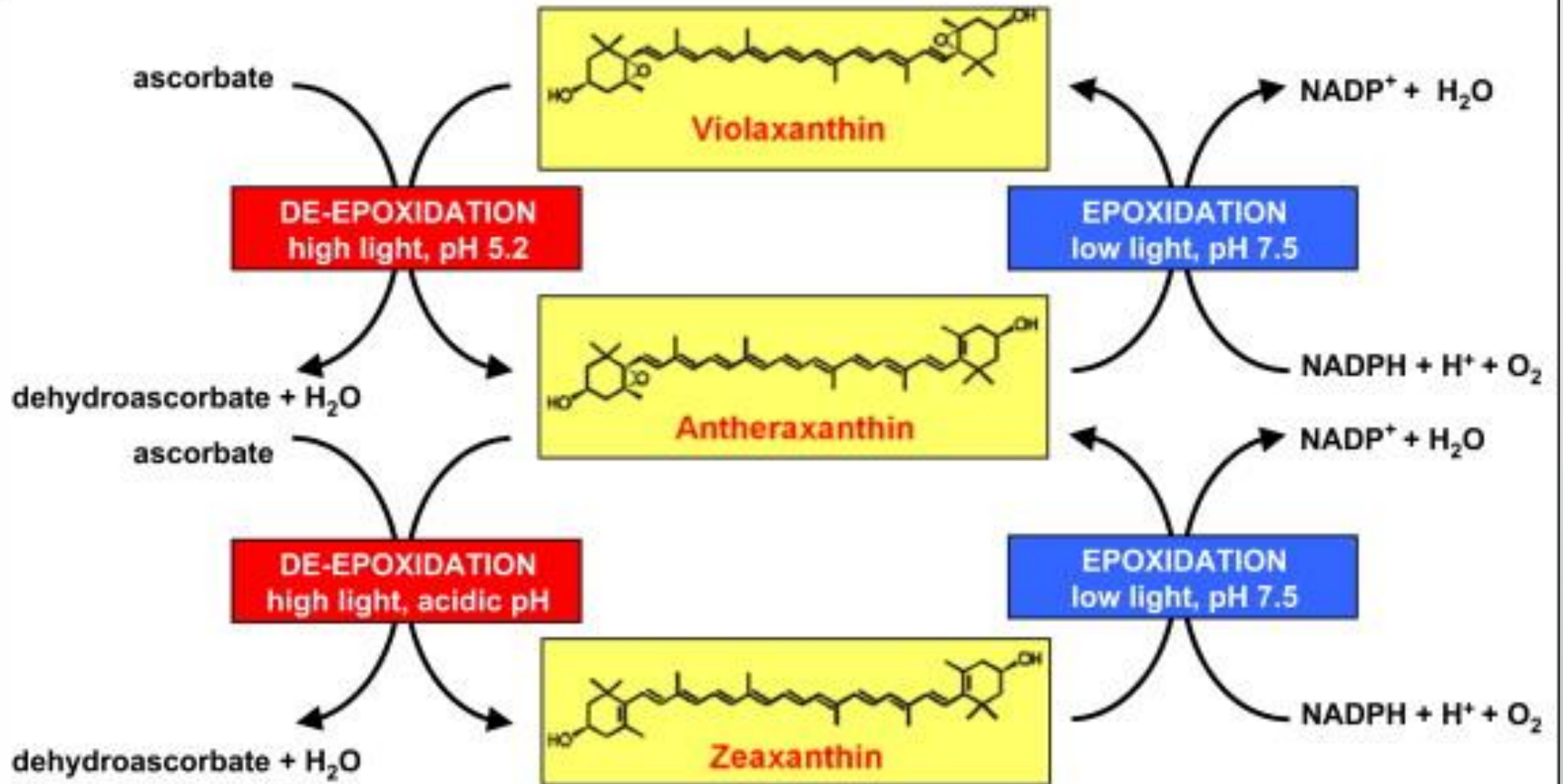
Low
Irradiance

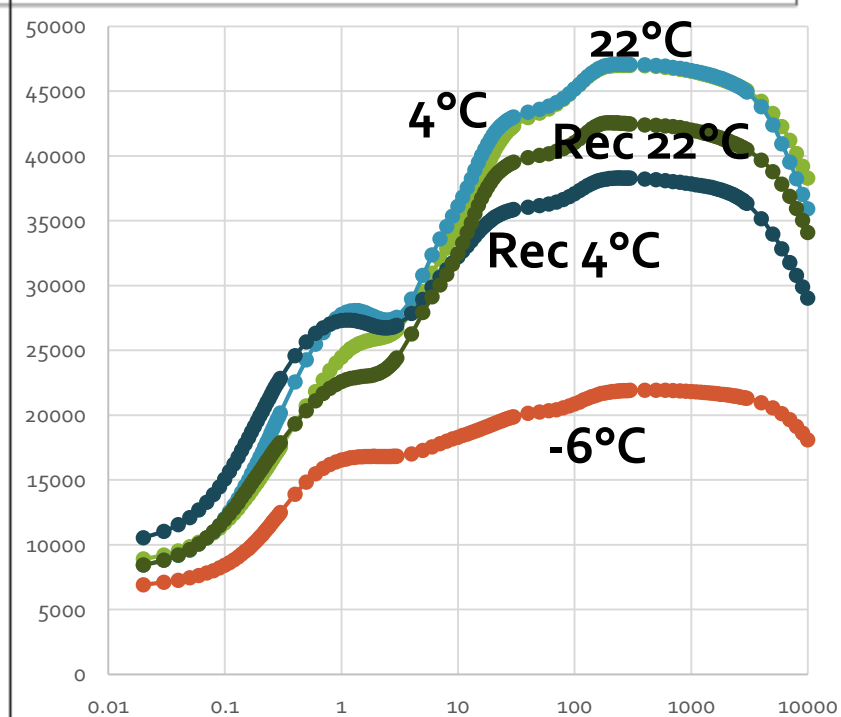
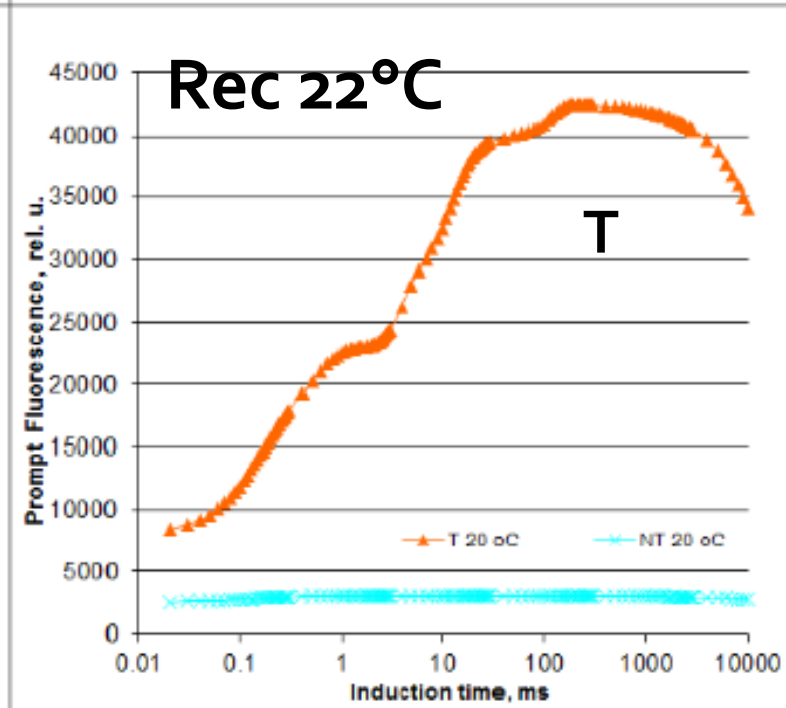
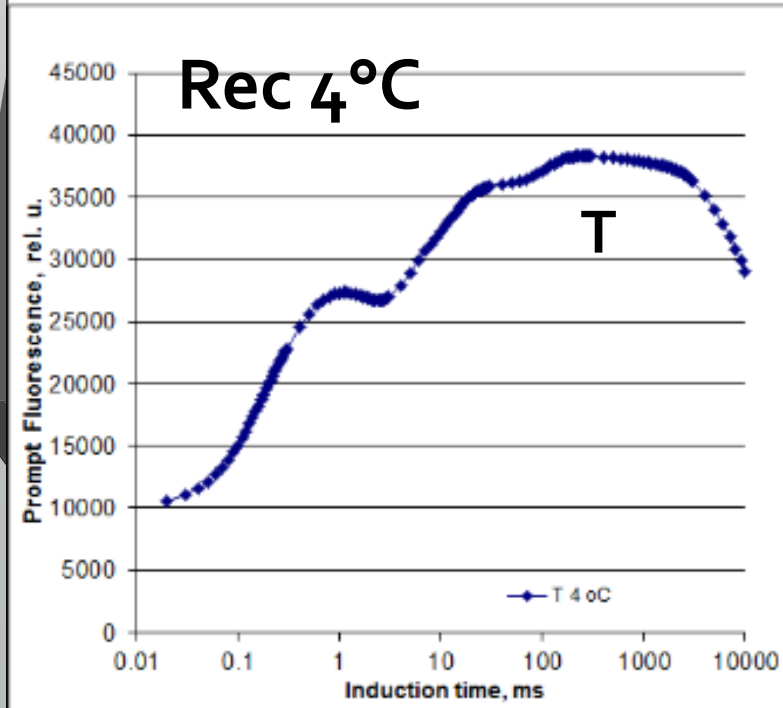
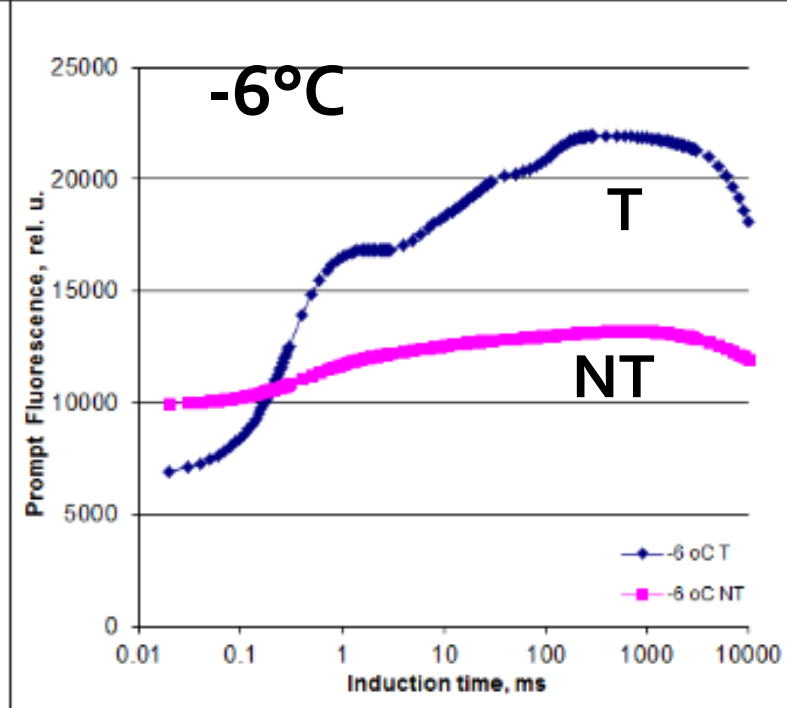
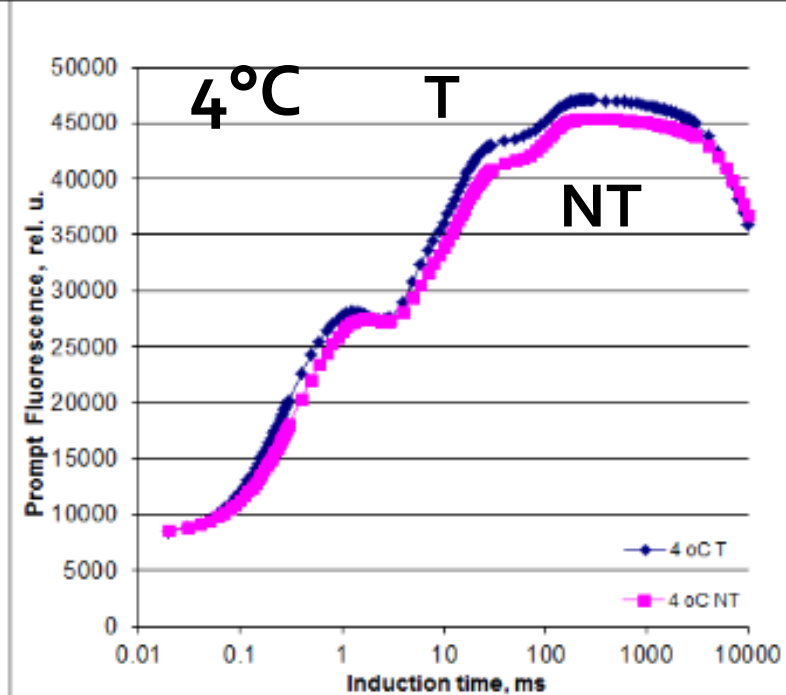
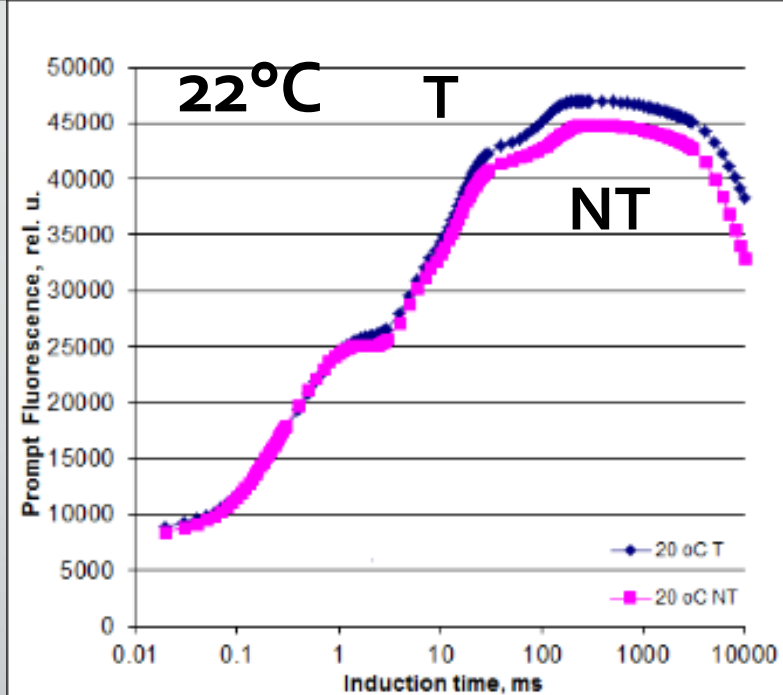
High
Irradiance

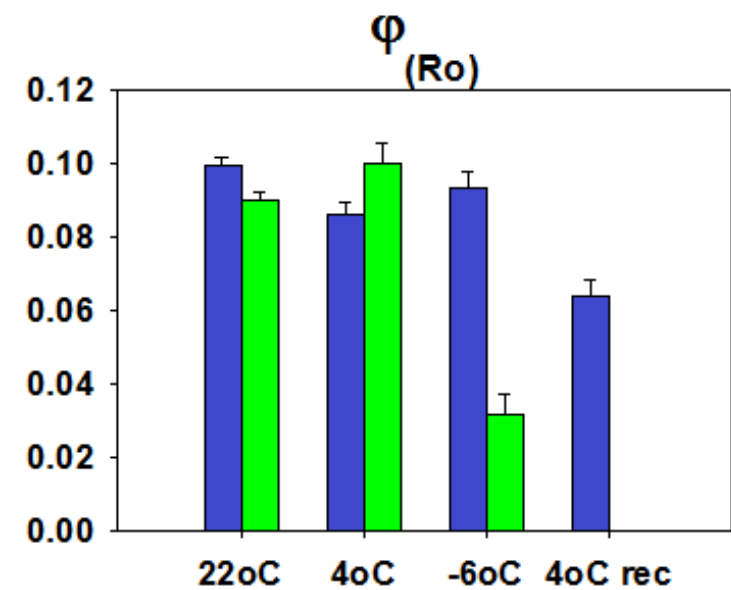
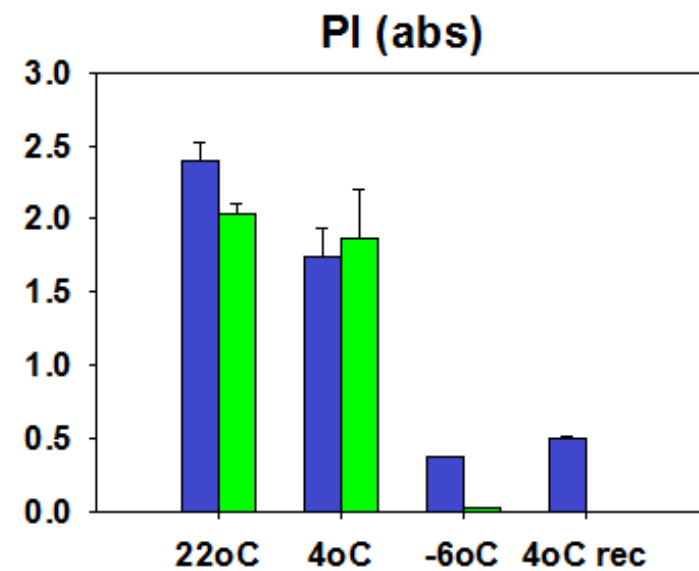
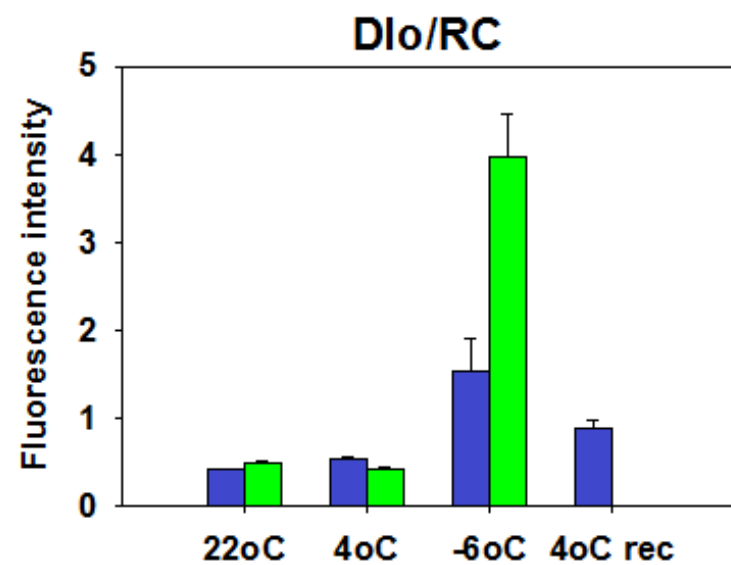
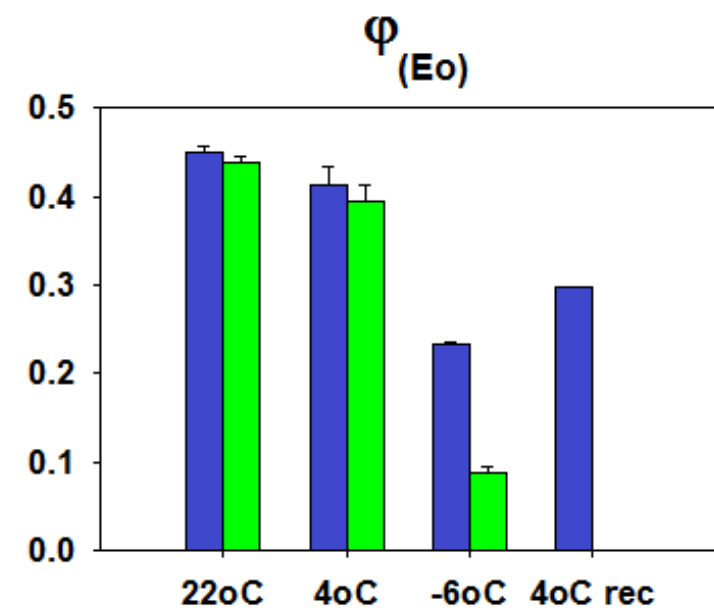
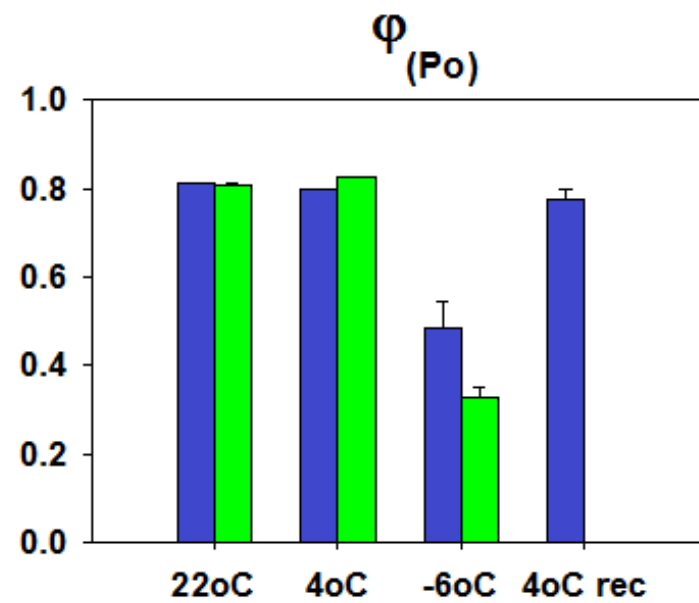
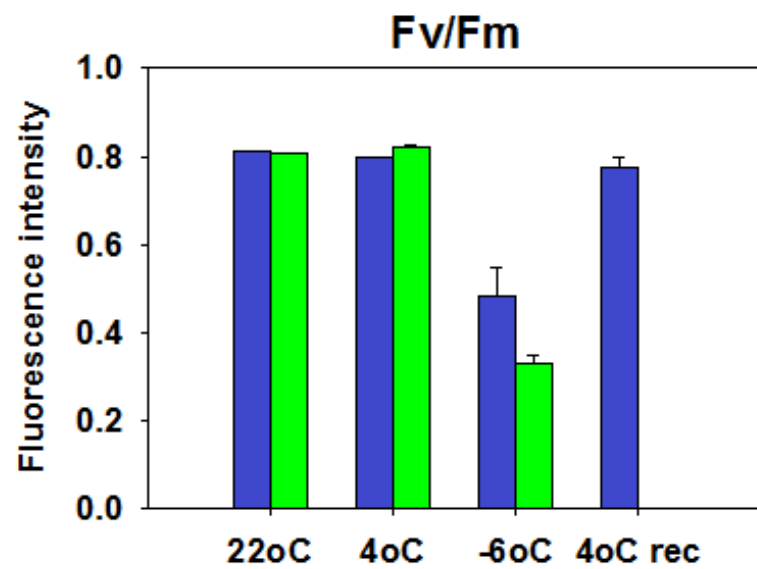
Изводи по съдържание на пигменти (хлорофили и каротеноиди) при *A. alpina* след нискотемпературен стрес

- Общото съдържание на хлорофил (Хл. "a" + Хл. "b") намалява след нискотемпературния стрес (chilling and freezing stress), като това се дължи в по-голяма степен на намалението на хлорофил „a“. **Намалението на хл. „a“ е по- силно изразено при нетолерантните (NT) в сравнение с толерантните към freezing stress растения (T), което е типично за множество типове стрес.**
- Количеството на лутеина и β -каротена остава сравнително постоянно при T-популацията, както след chilling, така и след freezing stress, докато при NT-популацията, съдържанието на двата основни каротеноида намалява в по-голяма степен. При пигментите от ксантофиловия цикъл (zea-, anthera- и violaxanthin), в резултат на нискотемпературния стрес се наблюдава увеличаване съдържанието на zeaxanthin за сметка на намаляване съдържанието на виолаксантин, както при T- така и при NT-популацията на *A. alpina* (де-епоксидация в условия на стрес).

Ксантофилов цикъл

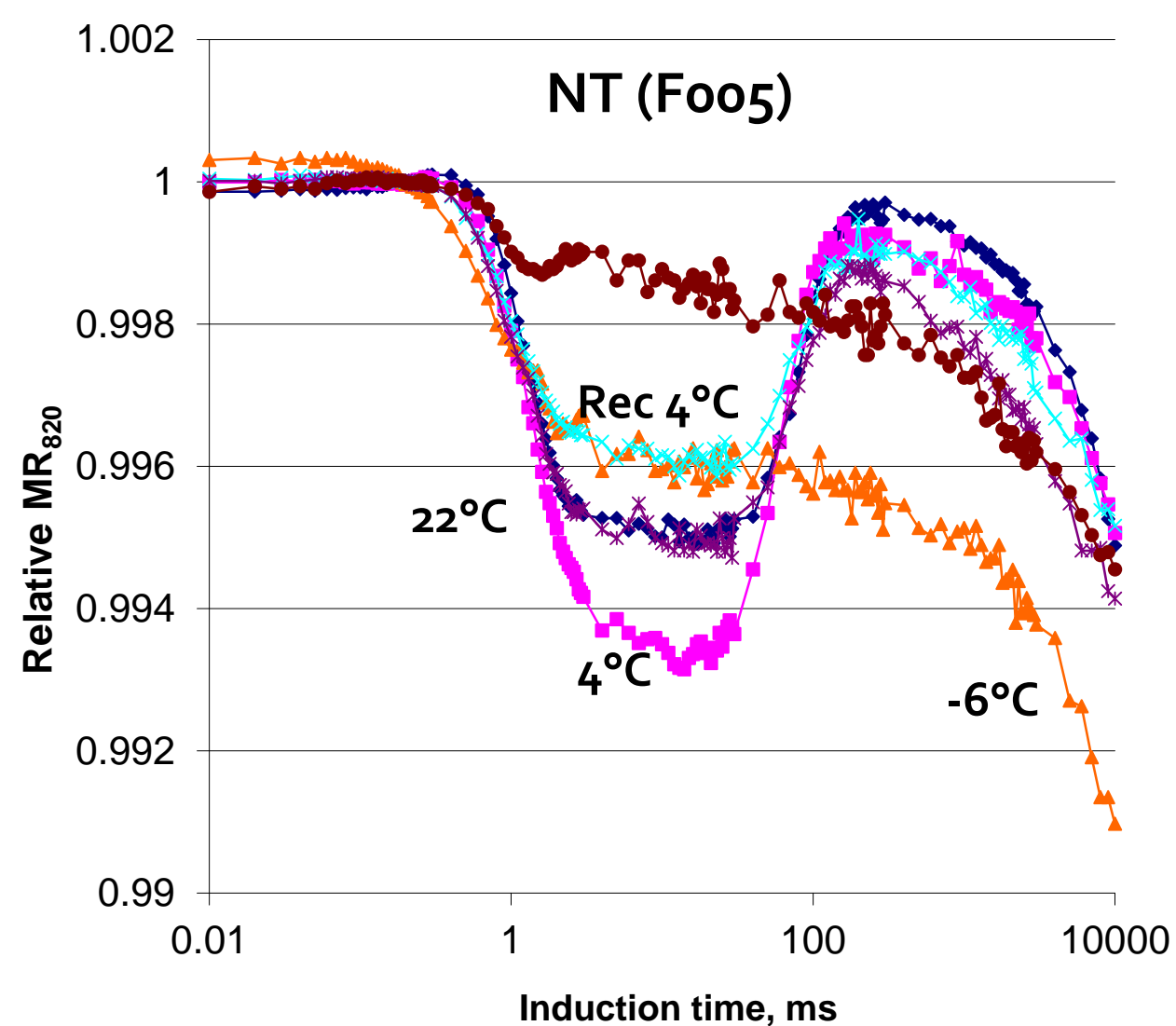
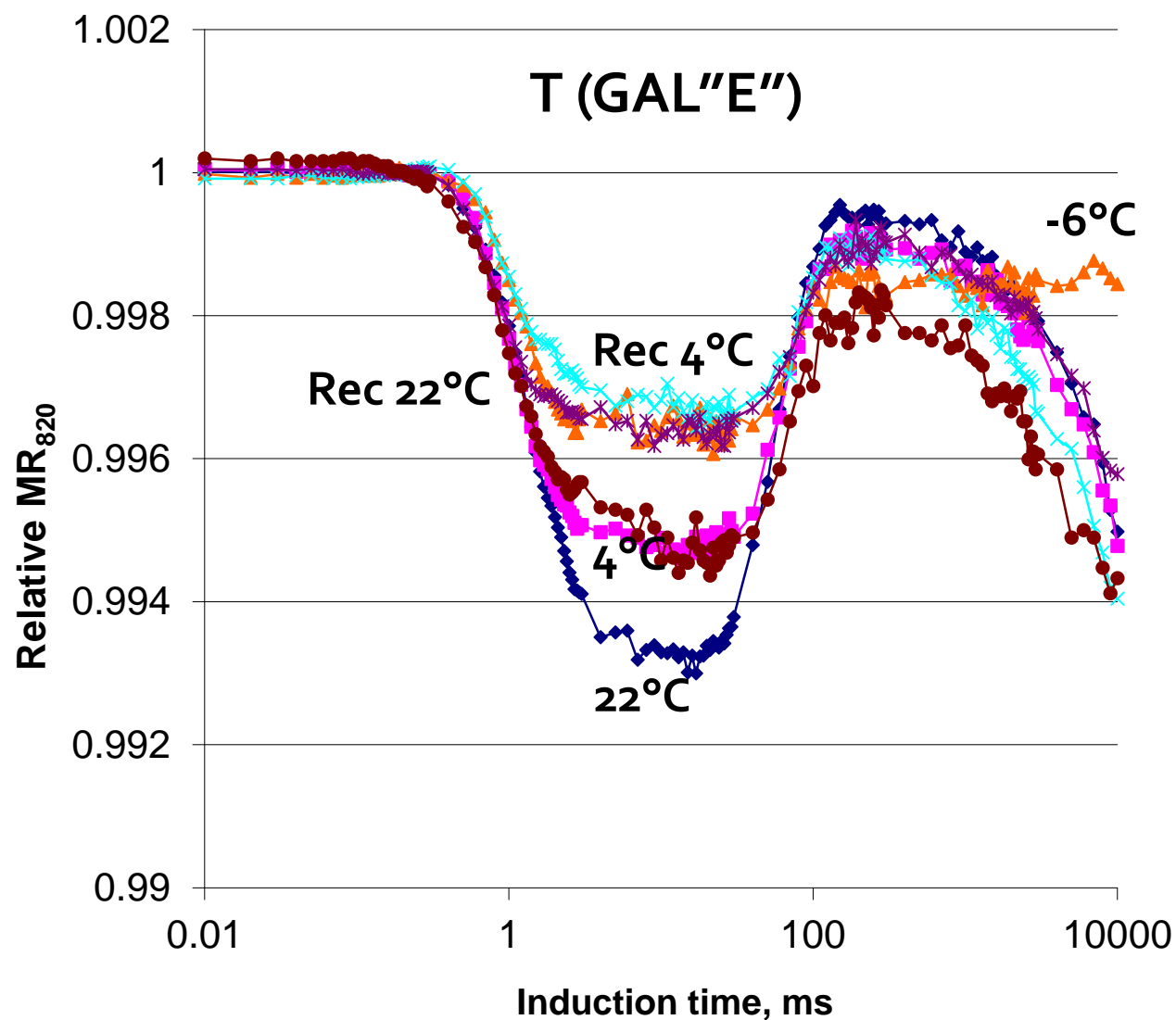




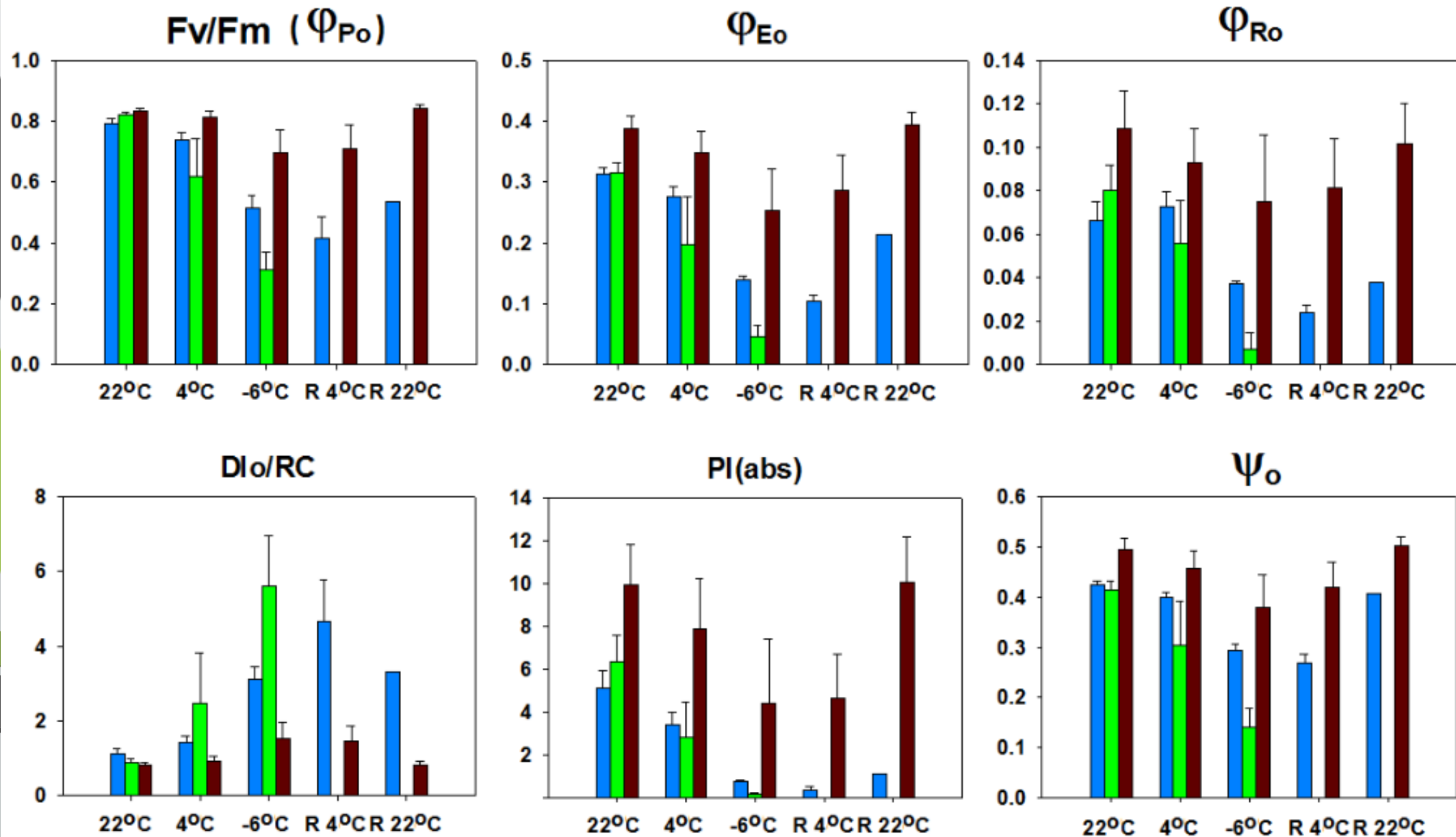


— Tolerant (GAL "E")
— Non-tolerant (F005)

Анализ на активността на ΦCI (M-PEA, multi-functional PEA) чрез MR_{820} (modulated reflection at 820 nm)



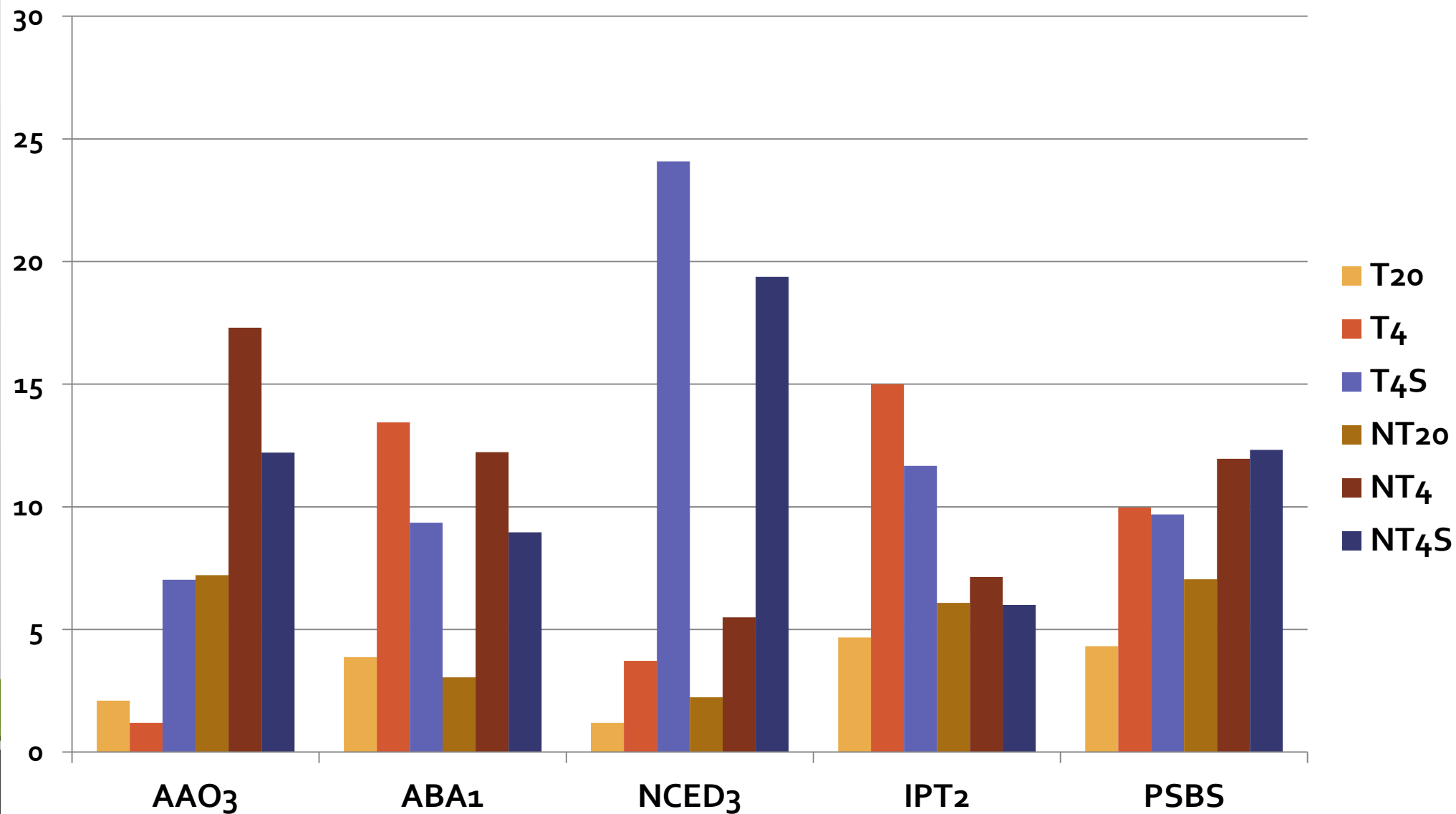
Сравнителен анализ на активността на ФСII (бърза флуоресценция на хлорофила) между френските популации T и NT и диви растения *A. alpina* от района на „Седемте Рилски Езера“



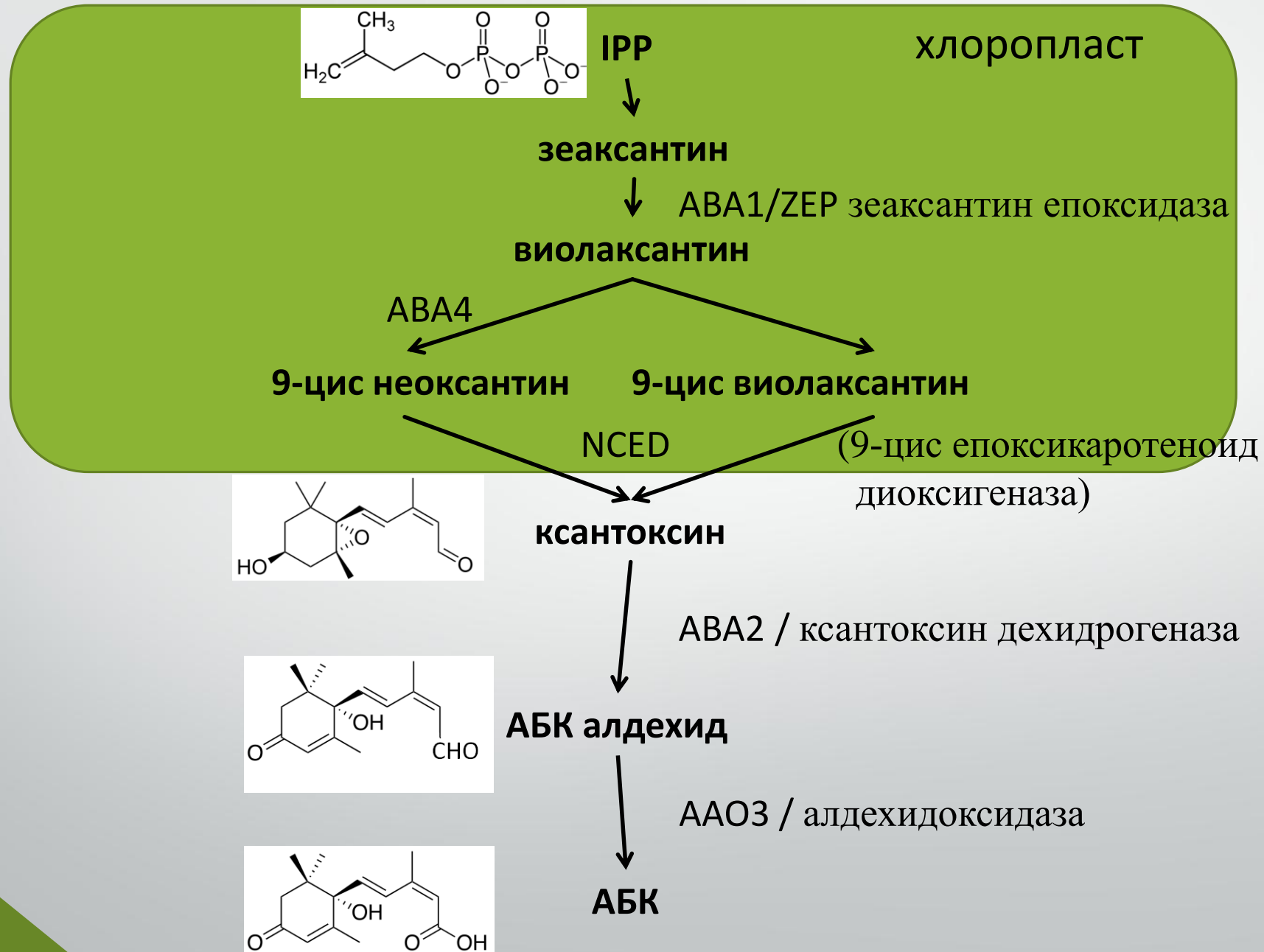
Изводи от анализа на prompt fluorescence на хлорофила на ФCII при *A. alpina* (Т и NT)

- Резултатите от JIP теста показват, че активността на ФCII не се променя в значителна степен след третиране с ниски положителни температури (chilling stress) и при двете изследвани популации Т и NT.
- Третирането с минусови температури (freezing stress) води до силно инхибиране на ФCII при Т и до нейното инактивиране при NT. В периода на възстановяване при 4°C и 22°C, нормалния ход на OJIP кривата се възстановява, респективно възстановява се активността на ФCII.
- Анализът на отделните стадии на OJIP кривата показва, че фотохимичната реакция на ФCII до първичния акцептор на електрони QA (параметър ϕ_{P_0}) се инхибира в по-малка степен в сравнение с квантовия добив на електрони от QA до PQ и Cyt-b₆f комплекса (параметър ϕ_{E_0}), както и последващият пренос на електрони към ФCI (параметър ϕ_{R_0}). В периода на възстановяване с положителни температури се възвръщат стойностите на тези показатели само при популацията Т.
- За разлика от ФCII, ниските положителни температури инхибират в по-голяма степен преноса на електрони при ФCI, което се изразява в промяната на низходящата (окисление) и възходящата (редукция) крива на реакционния център на ФCI. Минусовите температури водят до пълно увреждане на ФCI при NT и до силно инхибиране при Т.
- Най-общо, в сравнение с ФCII, активността на ФCI е по-чувствителна към нискотемпературния стрес, както при Т, така и при NT. Толерантността на популацията Т към минусови температури се определя главно от по-високата резистентност на ФCI.

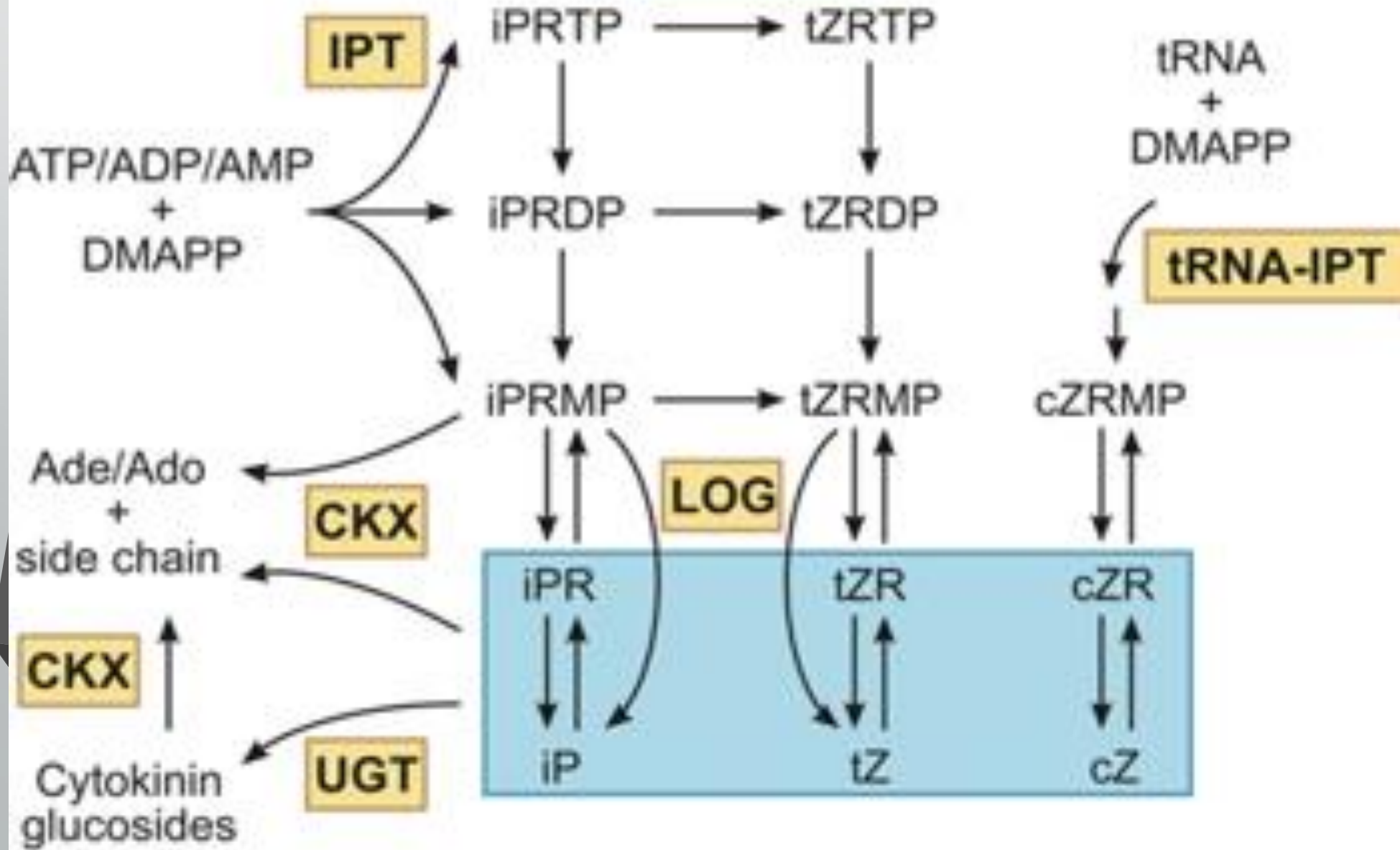
RT-qPCR анализ на гени от биосинтетичния път на АБК и ЦК



БИОСИНТЕТИЧЕН ПЪТ НА АБК




CYP735A



Изводи

- С намаляване на температурата на третиране се увеличава активността на гените от биосинтетичния път на АБК, което показва ролята на този фитохормон в регулацията на нискотемпературния стрес. При нетолерантните растения ААОз е почти 2 пъти по-активен.
- Активността на IPT₂, който отговаря за синтеза на цис-ЦК е по-активен при толерантните. Това корелира с по-високите нива на цис-ЦК при третиране с ниски температури.



Благодаря за вниманието!
