



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по физиология на растенията и генетика



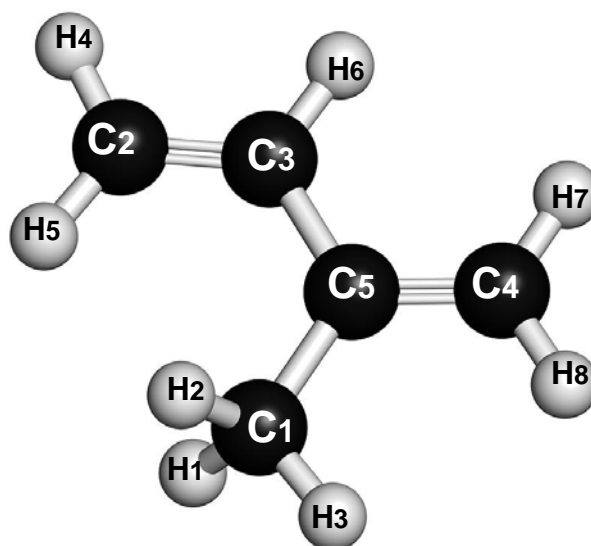
проф. д-р Виолета Борисова Великова

**Физиологична роля на биогенния изопрен
в растенията**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на научната степен
“Доктор на науките”**

професионално направление 4.3. Биологически науки,
научна специалност „Физиология на растенията”



София, 2019



проф. д-р Виолета Борисова Великова

**Физиологична роля на биогенния изопрен в
растенията**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на научната степен
“Доктор на науките”**

професионално направление 4.3. Биологически науки,
научна специалност Физиология на растенията

Научно жури:

1. проф. д-р Катя Георгиева
2. проф. д-р Лиляна Гигова
3. проф. дбн Стефка Танева
4. проф. д-р Андон Василев
5. проф. д-р Антоанета Попова
6. проф. д-р Василий Голцев
7. проф. д-р Емилия Апостолова

София, 2019

Дисертацията е обсъдена и допусната до защита на заседание на разширен научен семинар на лаборатория „Фотосинтеза – активност и регулация” към Института по физиология на растенията и генетика при Българска академия на науките.

Дисертацията се състои от 422 страници. Основният текст е изложен в 7 части, онагледен с 67¹ фигури. Цитирани са 379 литературни източника. Обобщени са приносите от 20 научни публикации (19 в Q1 и 1 в Q2, с общ импакт фактор 86.851).

Научните изследвания, включени в дисертационния труд станаха възможни благодарение на финансовата подкрепа от: **НАТО** (индивидуални стипендии 2000-2001, 2002; проекти LST.CLG 978838/2002-2003; EAP.RIG 981279/2004-2007); **Фонд „Научни изследвания”** (ТКБ-1604/2007-2010; Б02-8/2014-2017); **МОН** (Д01-168/2014-2016); **ЕБР проекти с Италия** (2004-2006; 2007-2009; 2010-2012) и **Унгария** (2010-2012); **ЕК “Мария Кюри”** (2011); **Фондация „Александър фон Хумболт”** (2012-2014).

Изказвам моята благодарност на проф. Франческо Лорето, от Националния Изследователски Център на Италия, не само за това, че ме въведе в областта на биогенните органични съединения, но и за ценните му напътствия и постоянна подкрепа. Положителното му отношение и постоянното му желание за нови открития в науката ме мотивираха по пътя ми на изследовател през всичките тези години. Благодарна съм за възможността да си сътруднича с него.

Сърдечна благодарност и на проф. Йорг-Петер Шницлер, който ми даде възможност да се присъединя към неговата група в Хелмхолц център – Мюнхен, за неговата безусловна подкрепа и съвети за успешното реализиране на проекта финансиран от фондация „Александър фон Хумболт”.

Специална благодарност на моето семейство и приятели за тяхната постоянна подкрепа.

Защитата ще се състои на г. от ч. в заседателната зала на Института по физиология на растенията и генетика - БАН. Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в канцеларията на Института по физиология на растенията и генетика, гр. София, ул. ”Акад. Г. Бончев” бл. 21, ет.2.

¹ Номерацията на фигурите в автореферата съответства на тази в дисертацията и съответните статии.

УВОД

В световен мащаб растенията отделят огромни количества летливи органични съединения, еквивалентни на около 1300 Tg въглерод за една година, и тези съединения са около 10 пъти повече от други класове летливи вещества. Изчислените общи антропогенни емисии на органични съединения са около 150 Tg въглерод за една година. Изопренът е най-широко разпространеният биогенен летлив въглеводород. Изчисленията показват, че глобалните емисии на изопрен (360-750 Tg C yr⁻¹) представляват приблизително 44% от общите емисии на биогенни летливи органични съединения. Растенията не притежават структури, в които да съхраняват изопрена и след образуването му той се отделя в околната среда. Поради силната си реактивоспособност, изопренът играе важна роля в атмосферната химия и качеството на въздуха. След постъпването му в атмосферата, в присъствието на слънчева светлина и азотни оксиди, от хидроксилните радикали се инициират реакции, които водят до превръщане на изопрена в токсични фотохимични продукти (формалдехид, метакролеин и метилвинилкетон). Окислението на изопрена в присъствието на азотни оксиди също води до образуването на огромно количество пероксиди (~ 100 Tg C yr⁻¹), органични нитрати и пероксиацилнитрати, които са токсични в концентрации от няколко ppb. В присъствието на азотни оксиди и хидроксилни радикали изопренът реагира в атмосферата, което води до образуването на въглероден оксид, органични пероксиди и тропосферен озон. Въпреки, че изопренът не е парников газ, поради високия му афинитет към хидроксилните радикали, той може да промени времето на престой на газовете, които допринасят за парниковия ефект, като например метана. Продуктите от окислението на изопрена са важни съставки на вторичните органични аерозолни частици (SOA). Счита се, че SOA с биогенен произход са около 10 пъти повече в сравнение с тези от антропогенен произход. Увеличаването на биогенните органични емисии с 50%, свързано с промените в климата, ще доведе до нарастване на SOA с 19%, със сериозни последствия за радиационния баланс на земята чрез разсейване и абсорбиране на светлина и участие в образуването на облаци. По този начин, емисиите на изопрен имат осезаемо въздействие върху качеството на въздуха, глобалната тропосферна химия и изменението на климата, което означава, че изучаването на въздействието на факторите на околната среда върху изопреновата емисия е от съществено значение, при прогнозиране на глобалното изменение на климата, както и при предлагане на адекватни политики за контрол върху качеството на въздуха в бъдеще.

Имайки предвид същественото значение на биогенния изопрен за физичните и химични свойства на атмосферата, в това число и качеството на въздуха, разбирането как факторите на средата контролират изопреновата емисия от растенията е от особена важност за точни прогнози на промените в атмосферната химия, за адекватна оценка на уязвимостта и гъвкавостта на сухоземните екосистеми в условията на глобалните климатични промени, както и за създаване на концепция за подбор на подходящи растителни видове за залесяване на райони с различно антропогенно и индустриално замърсяване.

Интересът към изучаване на биогенния изопрен е свързан не само със значението му за атмосферната химия, но и с предполагаемата защитна роля в растенията, изпитващи различни стресови въздействия. В растенията, изопреновата емисия е свързана със значителен разход на енергетични метаболити (20 АТФ и 14 НАДФ.Н молекули за една молекула изопрен) и въглерод. При оптимални условия на развитие растенията, които синтезират изопрен като естествен метаболит "губят" между 0.5 до 1-2% от фиксирания в процеса фотосинтеза въглерод под формата на изопрен, а при стрес този процент многократно се увеличава, което предполага основна роля на изопрена в защитата на растенията срещу различни неблагоприятни фактори на околната среда. Логично възниква въпросът "защо" растенията образуват изопрен. Причината за тази разточителна метаболитна емисия привлича вниманието на много изследователи. Поради строгия контрол на изопреновата емисия от светлината и температурата се предполага, че изопренът има термозащитен ефект върху основния физиологичен процес в растенията - фотосинтезата. Изказана е и друга хипотеза, според която изопренът като антиоксидант може да бъде универсален механизъм на действие, който да обясни както антиоксидантните му свойства, така и термозащитата му функция. Но остава неизяснено защо някои растения биха използвали този антиоксидантен механизъм, докато други не, особено като се имат предвид антиоксидантните системи в хлоропластите и митохондриите.

В настоящия дисертационен труд са обобщени приносите на автора към изясняване на физиологичната роля на биогенния изопрен. Чрез прилагането на разнообразни подходи на изследване (проведени са изследвания на физиологично, биофизично, биохимично и структурно ниво), дисертационният труд предоставя доказателства за способността на ендогенния изопрен да повишава устойчивостта на растенията към абиотични стресови въздействия, както и на възможните механизми, свързани със защитната роля на изопрена. Изучавано е взаимодействието между ендогенния изопрен и азотния оксид *in planta* с цел изясняването на възможно съвместно действие на двете молекули

при стрес (**статии V, VIII и XIII**). Обобщени са изследванията, посветени на изучаването на ролята на биогенния изопрен за намаляване на негативните последици от окислителен стрес (**статии I, II, и IX**). Съществена част от диертационния труд е посветена на термозащитната роля на изопрена (**статии III, IV, VI, X и XII**). Приносът му за повишена термотолерантност на растенията се обяснява с повишена стабилност на фотосинтетичните мембрани. Предполага се, че хидрофобната изопренова молекула се “вмъква” в липидния бислой на тилакоидните мембрани и повлиява динамиката на мембранно свързаните белтъци. Изяснени са последиците от инхибирането на изопреновата биосинтеза върху белтъчния и липидния състав и ултраструктурата на хлоропластите (**статии XIV, XVII и XVIII**). За първи път е предложена схема за ролята на изопрена, като част от цялата защитна система на растенията (**статии XVI**). Установена е и взаимовръзката му както с нелетливи изопреноиди, така и с метаболити, продукти на други биосинтетични пътища (напр. фенилпропаноиди) (**статии XV, XIX и XX**). Като важен фактор в атмосферната химия е изследвана и ролята на биогенния изопрен при антропогенно замърсяване на околната среда (**статии VII и XI**).

ЦЕЛ:

Основната научна цел на дисертационния труд е изясняването на физиологичната роля на биогенния изопрен като средство за защита на растенията срещу абиотичен стрес.

ХИПОТЕЗИ:

- I.** Тъй като факторите на околната среда оказват силно влияние върху емисията на биогенен изопрен, а в същото време тя представлява нетривиална загуба на въглерод за растенията, изопренът има съществено значение за толерантността на растенията, което се проявява на функционално, протеомно, метаболитно и структурно ниво.
- II.** Ендогенният изопрен влияе върху акумулирането на реактивни азотни и кислородни продукти в клетките, и по този начин определя отговора на растенията при стрес.
- III.** Биогенният изопрен като част от антиоксидантната система на растенията действа синхронизирано с други защитни метаболити, осигурявайки по-добра протекция на растенията при стрес.

ЗАДАЧИ:

За постигане на поставената цел са формулирани следните **специфични задачи**:

- Изследване на възможния защитен ефект на изопрена срещу различни абиотични фактори (озон, синглетен кислород, висока температура, висока концентрация на CO₂ в атмосферния въздух, засушаване, антропогенно замърсяване).
- Изясняване на взаимодействията между ендогенния изопрен и азотния оксид (NO) и възможното им участие в реакцията на растенията при окислителен стрес.
- Изучаване на последствията от инхибирането на изопреновата емисия върху протеома, липидния и мастнокиселинен състав на фотосинтетичните мембрани, както и върху ултраструктурата на вътрешно-мембранната система на хлоропластите.
- Изясняване на взаимовръзката между изопреноидите и фенилпропаноидите при оптимални и стресови условия.

3. ПОДХОДИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

3.1. Растителен материал

Използваният растителен материал включва **(1)** видове, които отделят изопрен като естествен метаболит (*Phragmites australis*, *Platanus orientalis* L., *Platanus x acerifolia* L., *Populus nigra*, *Populus x canescens*, *Arundo donax*); **(2)** видове, които не отделят изопрен (*Hakonechloa macra*), и **(3)** такива с променена способност да отделят изопрен като естествен метаболит в резултат на генна манипулация (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun; *Populus x canescens*); **(4)** листа с манипулирана изопренова емисия: по химичен път с фосмидомицин, който специфично блокира MEP биосинтетичния път в хлоропластите (Zeidler et al. 1998); листа, развити в атмосфера с повишена [CO₂]; листа в различен етап на онтогенетичното развитие, както и в различни по възраст растения. На Фиг. 3 схематично е представено разпределението на растителния материал по категории.

РАСТИТЕЛЕН МАТЕРИАЛ

Изопрен-отделящи видове

(*Phragmites australis*, *Platanus orientalis*, *Platanus x acerifolia*, *Populus nigra*, *Populus x canescens*, *Arundo donax*)

P. australis



P. orientalis



Populus



A. donax



Изопрен-неотделящи видове

(*Hakonechloa macra*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*)



Hakonechloa macra

N. tabacum

P. x canescens

Трансгенни растения с променена способност да отделят изопрен

(*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Populus x canescens*)

A. thaliana



N. tabacum



Листа с манипулирана изопренова емисия:

(1) по химичен път с фосмидомицин; (2) листа, развити в атмосфера с повишена $[CO_2]$; и (3) листа в различно оттогенетично развитие, или различни по възраст растения.



Фиг. 3. Използван растителен материал

3.2. Методи

3.2.А. Физиологични анализи

3.2.А1. Фотосинтетичен газообмен

3.2.А2. Хлорофилна флуоресценция

3.2.А3. Емисии на летливи изопреноиди

3.2.А4. Кръгов дихроизъм

3.2.А5. Електрохромно отместване при 515 nm (ΔA_{515})

3.2.А6. Термолуминесценция

3.2.А7. Анализи на азотния оксид (NO): емисия, компенсационна точка, потокът, концентрация в листа, локализация в листа.

3.2.Б. Протеомни анализи

3.2.Б1. SDS-PAGE и Label-Free LC-MS/MS анализи

3.2.Б2. Изотоп-кодирано белязване на белтъци (ICPL)

3.2.Б3. Blue Native PAGE (BN-PAGE)

3.2.Б4. Acid-Urea-PAGE на хистонови белтъци

3.2.Б5. S-нитрозилирани белтъци

3.2.В. Липиден анализ

3.2.Г. Биохимични анализи

3.2.Г1. Абсцисиева киселина

3.2.Г2. Каротеноиди (пигменти от ксантофиловия цикъл - виолаксантин, антраксантин и зеаксантин; неоксантин, лутеин и β -каротен).

3.2.Г3. Фенилпропаноиди (хидроксиканелени киселини - кафеена, ферулова киселини; деривати на кверцетин, камферол, лутеолил и апигенин).

3.2.Г4. Разтворими въглехидрати (глюкоза, фруктоза)

3.2.Г5. Аскорбинова киселина

3.2.Г6. Концентрация на никел (Ni) в листа

3.2.Г7. Неорганичен фосфор (P) в листа

3.2.Г8. Скорбяла

3.2.Г9. Количество на H_2O_2

3.2.Г10. Ниво на липидно пероксидиране

3.2.Г11. Каталаза (EC 1.11.1.6)

3.2.Г12. Гваякол пероксидаза (EC 1.11.1.7)

3.2.Г13. Аскорбат пероксидаза (EC 1.11.1.11)

3.2.Г14. Супероксиддисмутаза (EC 1.15.1.1)

3.2.Г15. Антиоксидантна (FRAP) и антирадикална активност (DPPH[•]).

3.2.Д. Структурни анализи – светлинна и трансмисионна електронна микроскопия.

3.2.Е. Статистически анализи

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

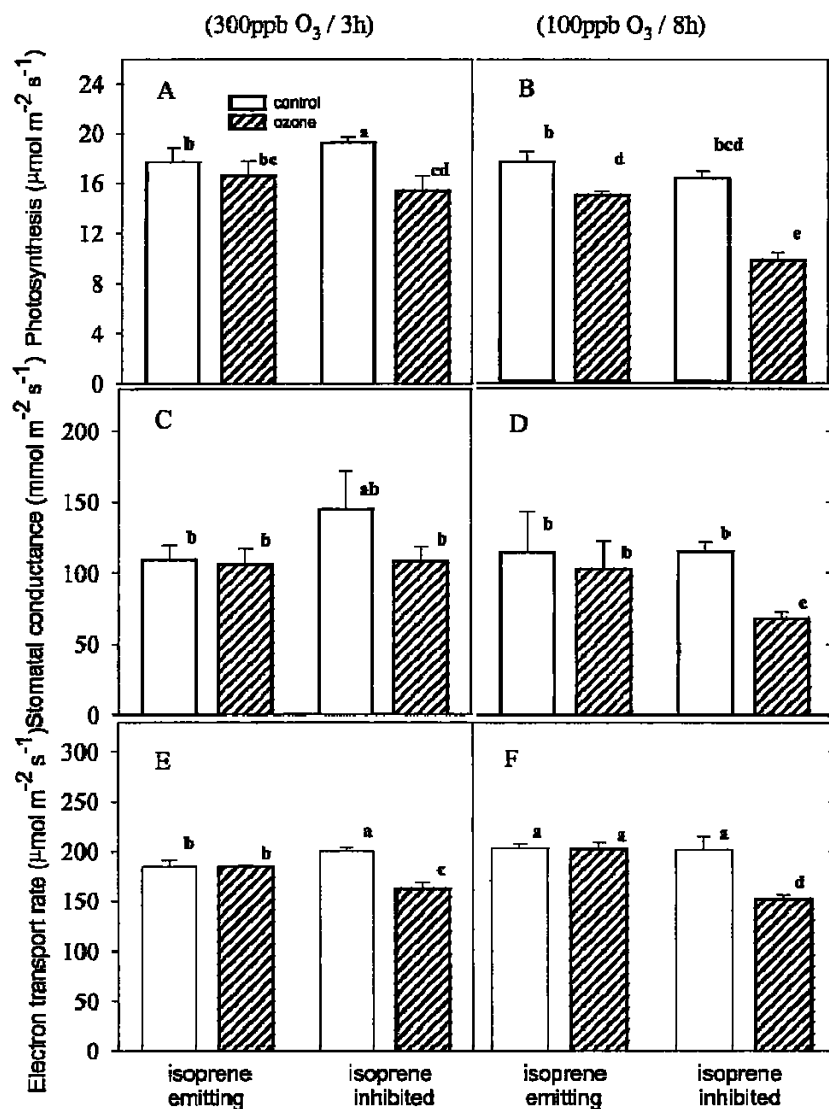
4.1. Антиоксидантна роля на биогенния изопрен

Много растения инвестират въглерод, за да образуват изопрен. Ролята на изопрена в растенията е неясна, но съществуват експериментални данни, които показват, че изопренът може да участва в защитата на растенията от високотемпературни увреждания. Показано е, че екзогенният изопрен предотвратява появата на видими увреждания в неотделящи изопрен растения, изложени на високи дози озон. Тези резултати дават основание да се предположи, че изопренът вероятно има антиоксидантни свойства.

Антиоксидантният капацитет на биогенния изопрен е изучаван в редица експерименти, използвайки различни растителни видове (*Phragmites australis*, и трансгенен тютюн). Окислителният стрес е индуциран чрез обгазяване с озон или чрез третиране с Rose Bengal (боя, която генерира синглетен кислород при осветяване).

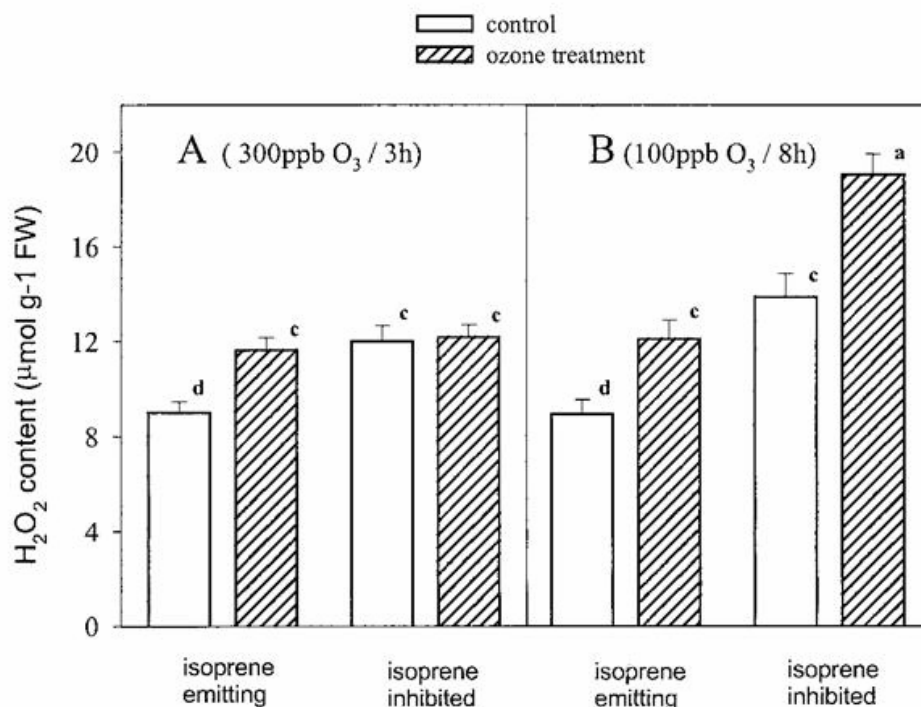
4.1.A. Ендогенният изопрен защитава фотосинтетичния апарат срещу окислителен стрес вследствие на третиране с озон (статия I. Loreto & Velikova – Plant Physiology 127:1781-1787, 2001)

Листата на *Phragmites australis*, чиято изопренова синтеза е инхибирана с подаване на фосмидомицин посредством транспирационния поток, са по-чувствителни към озон в сравнение с изопрен-отделящите листа. Параметрите на фотосинтезата, устичната проводимост и хлорофилната флуоресценция са значително повлияни от озона само в листата с инхибирана изопренова емисия (Фиг. I.2). Защитният ефект на изопрена е по-ясно изразен, когато листата са изложени на озон за дълго време (8 h) при относително ниска концентрация (100 nL L^{-1}), в сравнение с краткотрайното, но интензивно третиране (3 h при 300 nL L^{-1}).

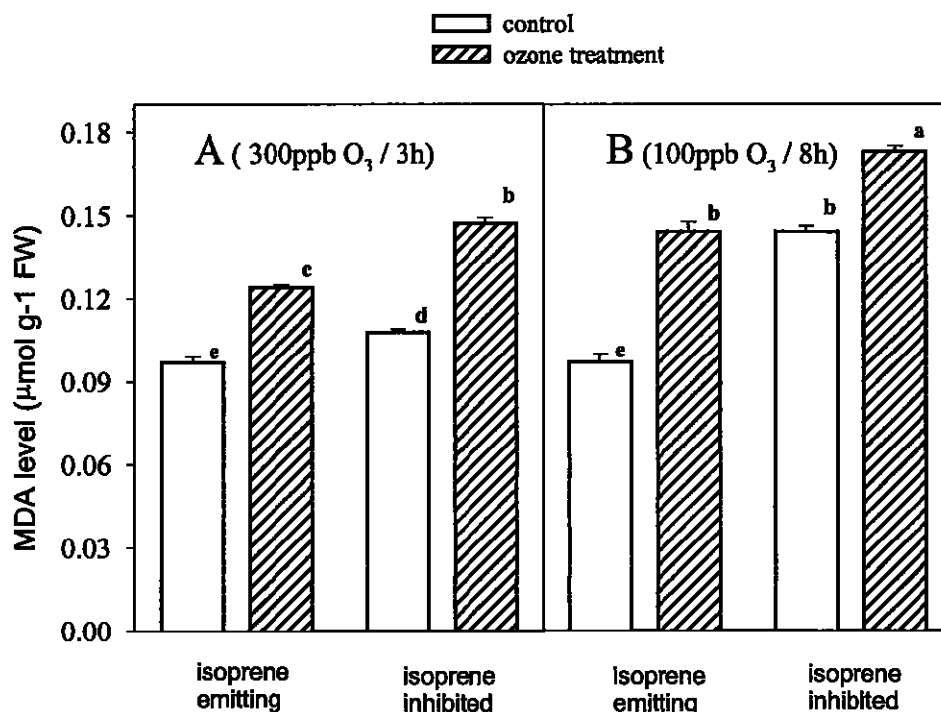


Фиг. 1.2. Ефект на акутно (3 h, 300 nL L⁻¹; ляво) и продължително (8 h, 100 nL L⁻¹; дясно) третиране с озон върху фотосинтезата (A,B), устичната проводимост (C,D) и скоростта на електронния транспорт (E,F) в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* (Loreto & Velikova – *Plant Physiology* 127:1781-1787, 2001).

Изопренът предотвратява натрупването на H₂O₂ в листата (Фиг. 1.5), и намалява липидната пероксидация (Фиг. 1.6) на клетъчните мембрани, причинена от озон. Тези резултати показват, че ендогенният изопрен може да упражнява защитното си действие на ниво мембрана, въпреки че подобен ефект може да се постигне, ако изопренът реагира с озон, преди да образува активни кислородни форми.



Фиг. 1.5. Ефект на акутно (3 h, 300 nL L⁻¹; ляво) и продължително (8 h, 100 nL L⁻¹; дясно) третиране с озон върху съдържанието на водороден пероксид в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* (Loreto & Velikova – Plant Physiology 127:1781-1787, 2001).



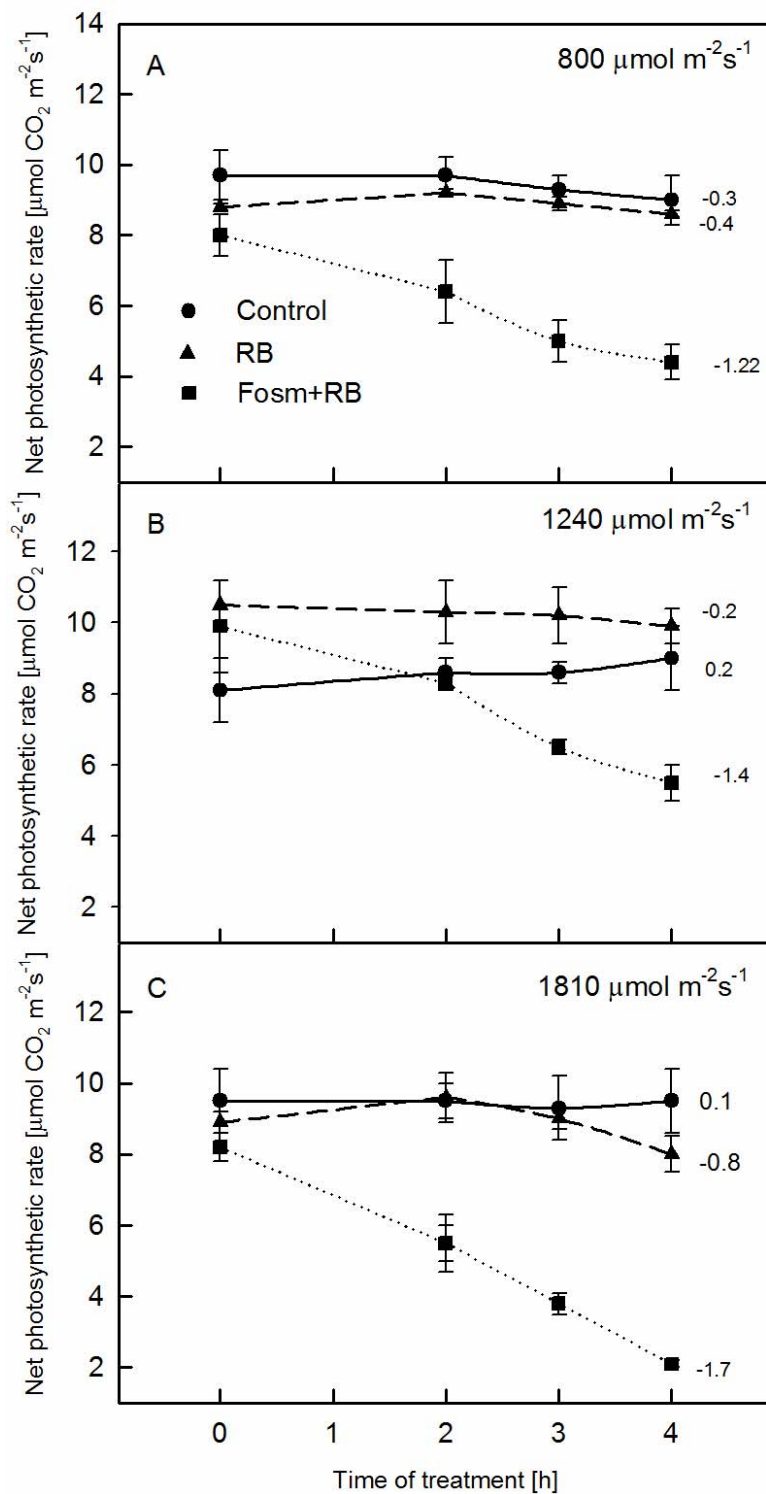
Фиг. 1.6. Ефект на акутно (3 h, 300 nL L⁻¹; ляво) и продължително (8 h, 100 nL L⁻¹; дясно) третиране с озон върху съдържанието на MDA в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* (Loreto & Velikova – Plant Physiology 127:1781-1787, 2001).

За първи път е показано, че независимо от механизма, ендогенният изопрен има важна антиоксидантна роля в растенията като ограничава продукцията на реактивни кислородни форми и по този начин намалява уврежданията на мембранно ниво, а вероятно и последващите увреждания на биохимично и физиологично ниво (статия I. Loreto & Velikova 2001).

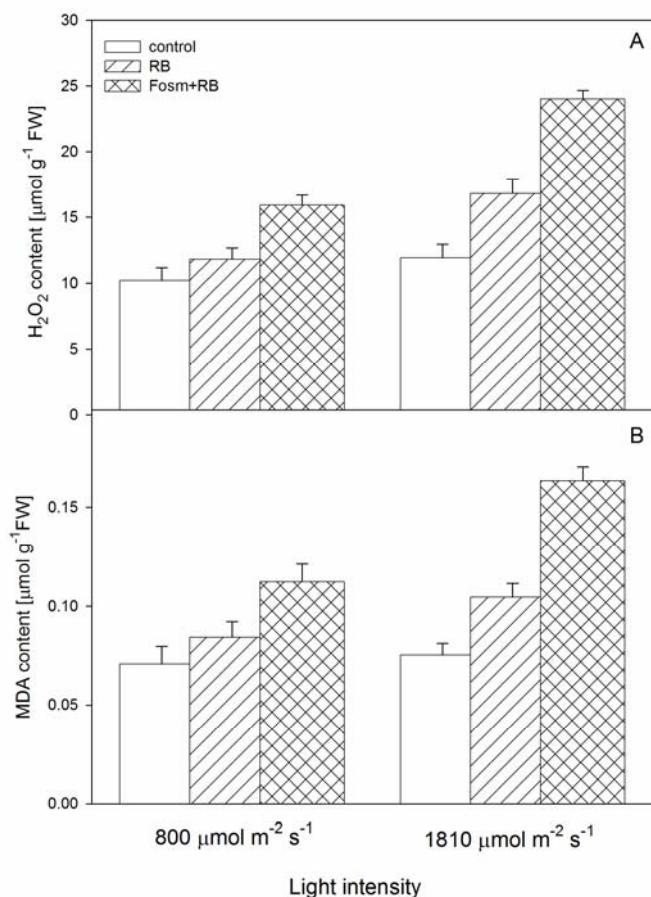
4.1.В. Ендогенният изопрен защитава фотосинтетичния апарат срещу синглетен кислород (статия II. Velikova et al. – *Physiologia Plantarum*122:219-225, 2004)

Генерирането на синглетен кислород ($^1\text{O}_2$) е локализирано главно в хлоропластите. Неговото ниво не се контролира по ензимен път, за разлика от другите активни кислородни форми (H_2O_2 и $\text{O}_2^{\bullet-}$), които се отстраняват от пероксидази, каталаза и супероксид дисмутаза. Растенията са развили други механизми за отстраняването на синглетен кислород, а именно мрежа от молекули с конюгирани (спрегнати) двойни връзки (делокализирани π електрони), които могат лесно да приемат и пренасят електрони, като например каротеноидите и производните на хинона. Нашата **хипотеза** е, че наличието на спрегнати двойни връзки в молекулата на изопрена, подобно на каротеноидите, способства за участието на изопрена в защитата срещу синглетен кислород.

Възможната защитна роля на ендогенния изопрен срещу окислителен стрес, причинен от синглетния кислород ($^1\text{O}_2$), е проучена във *Phragmites australis* - растение, отделящо изопрен. Изопрен-отделящи листа, и листа с инхибирана изопренова биосинтеза посредством фосмидомицин са изложени на увеличаващи се концентрации на $^1\text{O}_2$, генерирани от сенсibiliзатора Rose Bengal (RB) при различна интензивност на светлината. В изопрен-отделящите листа ниските и умерените концентрации на $^1\text{O}_2$, генерирани при светлинна интензивност от 800 и 1240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ не оказват съществено влияние върху фотосинтезата (**Фиг. II.2А,В**) и нивото на водороден пероксид (H_2O_2 , **Фиг. II.4А**) и малонилдиалдехид (MDA, **Фиг. II.4В**)



Фиг. П.2. Ефект на третирането с Rose Bengal (RB) върху фотосинтезата в листа на *P. australis*. Измерванията са проведени при 30°C и различен интензитет на светлината (800, 1200 и 1810 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Control – изопрен-отделящи листа; RB – изопрен-отделящи листа третиранни с RB; Fosm + RB – изопрен-инхибирани листа третиранни с RB (Velikova et al. – *Physiologia Plantarum*122:219-225, 2004).

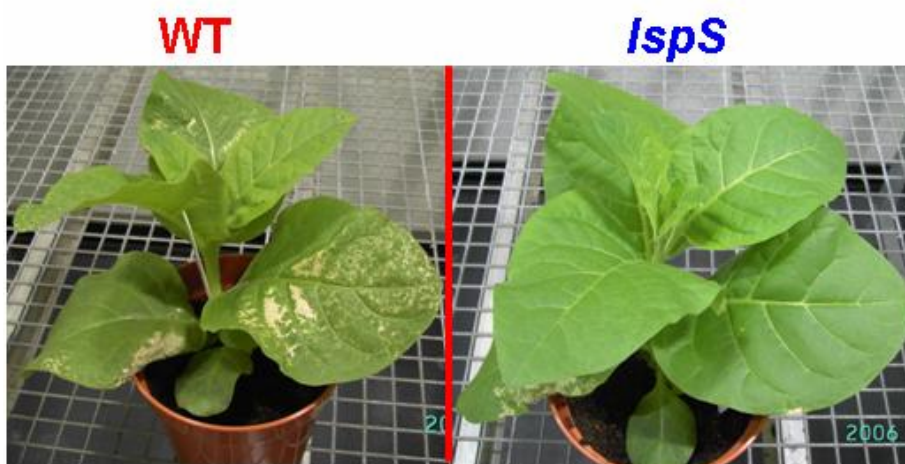


Фиг. II.4. Ефект на третирането с Rose Bengal (RB) върху акумулирането на водороден пероксид (A) и нивото на липидно пероксидиране (B) в листа на *P. australis*. Пробите са събрани след 4-часово третиране с RB при 30°C и при 800 и 1810 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ светлинен интензитет; Control – изопрен-отделящи листа; RB – изопрен-отделящи листа третирани с RB; Fosm + RB – изопрен-инхибирани листа третирани с RB (Velikova et al. – *Physiologia Plantarum* 122: 219-225, 2004).

В изопрен-отделящите листа симптоми на увреждане на фотосинтезата (Фиг. II.2A,B) и натрупване на реактивни форми на кислород започват да се наблюдават когато са генерирани високи нива на $^1\text{O}_2$, т.е. при най-високата интензивност на светлината (1810 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Чувствително инхибиране на фотосинтезата (Фиг. II.2C) и повишаване на нивата на H_2O_2 и MDA (Фиг. II.4) са измерени в изопрен-инхибираните листа, третирани с RB. Но когато пулът от изопрена в изопрен-инхибираните листа е възстановен чрез обгазяване с екзогенен изопрен, фотосинтезата е незначително инхибирана в тези листа. Потискането на фотосинтезата в изопрен-инхибираните листа е линейно свързано с интензивността на светлината и съответно на образувания $^1\text{O}_2$. Следователно, физиологичните нива на ендегенен изопрен могат да осигурят защита срещу $^1\text{O}_2$. Защитните механизми могат да включват директна реакция на изопрена с $^1\text{O}_2$. Изопренът като малка липофилна молекула може да подпомогне хидрофобните взаимодействия в мембраните, което води до тяхното стабилизиране. Присъствието на двойни връзки в молекулата на изопрена вероятно улеснява преноса на енергия и разсейването на топлината, действие което е типично за други изопреноиди (каротеноидите). Предполага се, че изопренът може да осигури по-динамичен защитен механизъм, тъй като се синтезира бързо, когато високата интензивност на светлината произвежда $^1\text{O}_2$ (II. Velikova et al. 2004).

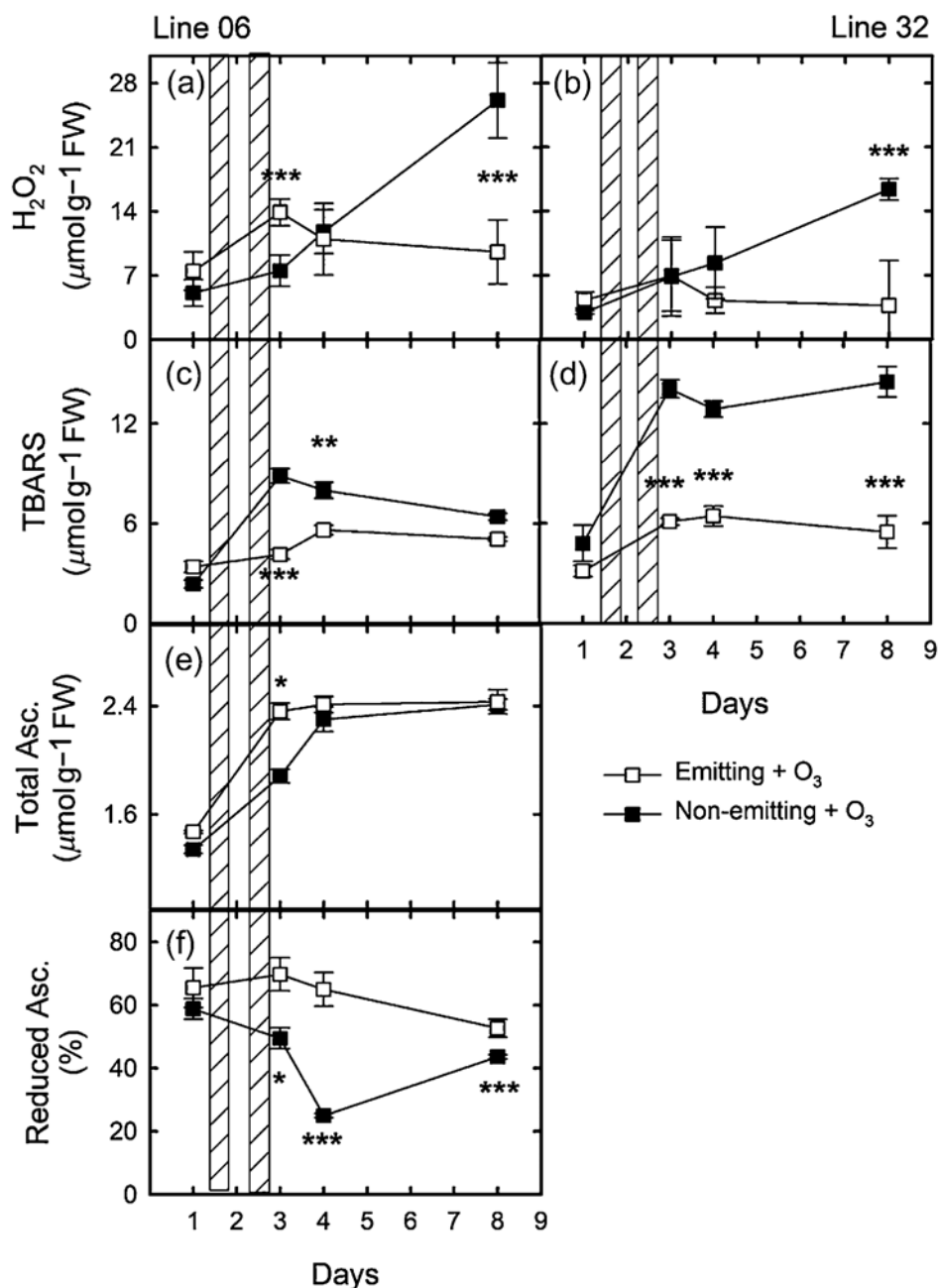
4.1.С. Биогенният изопрен защитава трансгенни растения тютюн срещу окислителен стрес (статия IX. Vickers et al. – Plant, Cell and Environment 32:520-531, 2009)

Трансгенни тютюневи растения (*IspS*), способни да отделят изопрен като естествен метаболит, са използвани с цел по-нататъшно изясняване на антиоксидантните свойства на ендогенния изопрен. Отговорите на тези растения към озон са сравнявани с тези на изопрен-неотделящите тютюневи растения (WT). Неотделящите растения се характеризират с типични видими увреждания в резултат на третирането с озон, докато изопрен-отделящите растения са по-добре защитени и показват незначителни видими увреждания (Фиг. IX.3).



Фиг. IX.3. Фенотипни различия между изопрен-неотделящи (WT) и изопрен-отделящи (*IspS*) тютюневи растения след третиране с 200 ppb озон в продължение на 6 ч. на ден, в рамките на два дни (Vickers et al. – Plant, Cell and Environment 32:520-531, 2009).

Неотделящите изопрен растения показват и по-силни увреждания на фотосинтезата (статия IX. Vickers et al. 2009). Не са наблюдавани разлики между изопрен-отделящи и неотделящи растения по отношение на устичната проводимост, което показва, че отвореността на устицата не влияе съществено върху постъпването на озон в листата. Изопрен-отделящите растения натрупват значително по-малко H_2O_2 в сравнение с неотделящите, което предполага, че растенията, синтезиращи изопрен, или по-ефективно отстраняват H_2O_2 , или генерират по-малко H_2O_2 (Фиг. IX.5a,b). Възможно обяснение за различията в наблюдаваните фенотипни промени между отделящите- и неотделящите изопрен растения е че в трансгенния изопрен-отделящ тютюн, нивото на H_2O_2 не превишава праговата стойност над която се инициират процеси на клетъчна смърт.



Фиг. IX.5. Биохимични данни, получени при трансгенни тютюневи растения (линии 6 и 32) третиран с 120 ppb озон 6 ч на ден, в продължение на 2 дни. Измерванията са проведени преди третирането с озон, непосредствено след прекратяване на обгазяването, и 1, 3 и 5 дни след третирането; (a, b) съдържание на водороден пероксид, (c,d) ниво на липидно пероксиране (TBARS); (e) общо съдържание на аскорбат; (f) редуциран аскорбат (Vickers et al. – *Plant, Cell and Environment* 32:520-531, 2009).

В подкрепа на изказаните предположения, че изопренът допринася за физическото стабилизиране на мембраните и/или действа като антиоксидант, намалявайки липидната пероксидация, е установено, че нивото на липидно пероксиране в изопрен-отделящите растения третиран с озон е значително по-ниско в сравнение с това при изопрен-неотделящите растения (Фиг. IX.5c,d). Като хидрофобна молекула

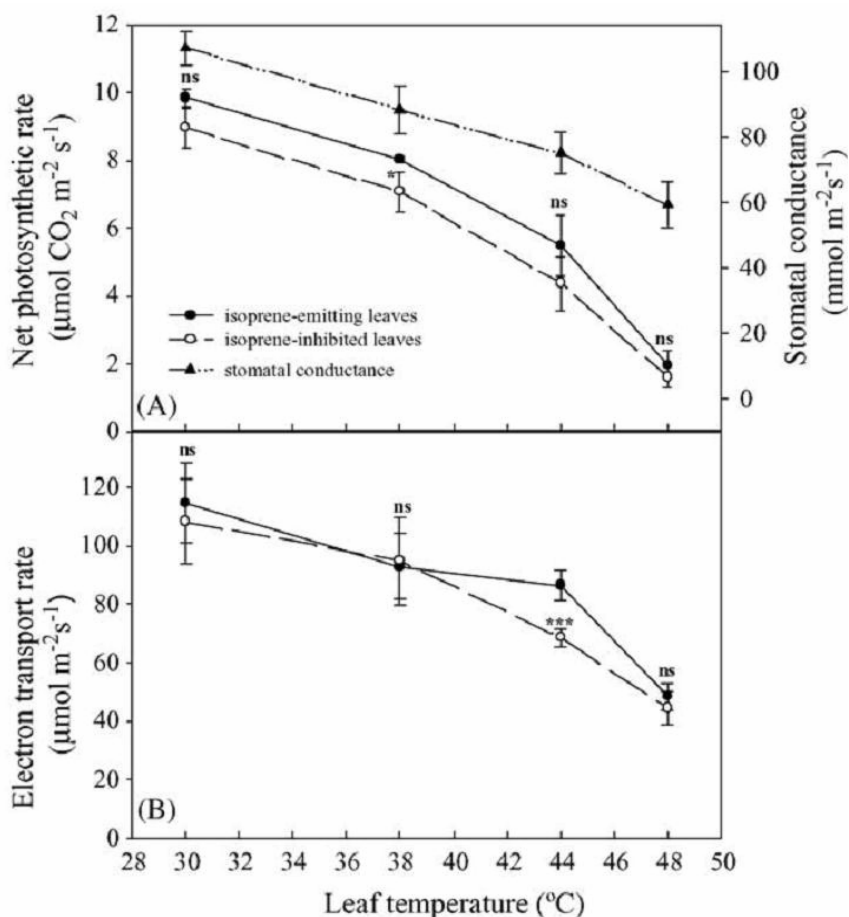
изопренът е малко вероятно да бъде ефективен антиоксидант във водна фаза, и следователно е малко вероятно директно да улавя H_2O_2 . Въпреки това, антиоксидантният капацитет във водната и липидната фаза са свързани (напр. чрез регенерация на токоферолите посредством аскорбата) (Foyer et al. 2006), така че може да се очаква увеличаването на антиоксидантния капацитет на липидната фаза да повлияе на този на водната фаза. Въпреки че общият пул на аскорбата показва относително малка промяна в трансгенния тютюн (Фиг IX.5e), количеството на редуцирания аскорбат в изопрен-отделящите растения е значително по-високо в сравнение с изопрен-неотделящите растения след третирането с озон (Фиг. IX.5f). Това показва, че изопрен-отделящите растения имат намалено изискване за антиоксидантна активност във водната фаза, което най-вероятно е следствие от защитата на липидната фаза, свързана с наличието на изопрен (статия IX. Vickers et al. 2009).

4.2. Термозащитна роля на биогенния изопрен

4.2.A. Инхибирането на изопреновата емисия е причина за посъществени нарушения във фотосинтетичните функция след третиране с висока температура (статии III. Velikova et al. – *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106: 209-217, 2005; IV. Velikova & Loreto – *Plant, Cell and Environment* 28: 318-327, 2005; VI. Velikova et al. – *Functional Plant Biology* 33: 931-940, 2006)

Термозащитната роля на биогенния изопрен е изучавана в листа на *Phragmites australis* и *Platanus orientalis*. Експериментите са проведени с (1) листа, в които емисията на изопрен е химически манипулирана с фосмидомицин (Velikova et al. 2005; Velikova & Loreto 2005, статии III и IV), и (2) листа, произхождащи от различни по възраст растения *P. orientalis*, които естествено отделят различно количество изопрен (Velikova et al. 2006, статия VI).

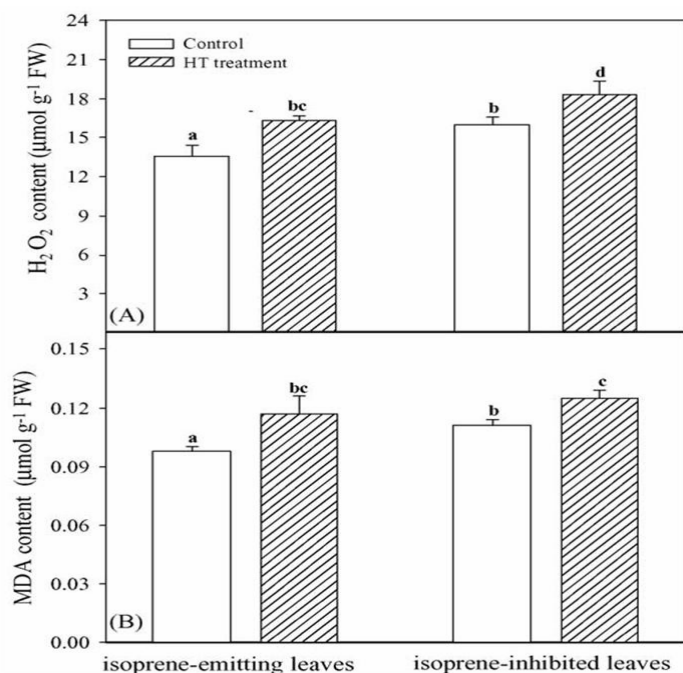
В първия експеримент е сравнявана реакцията на изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis*, които са подлагани на различни температури (30, 38, 44 and 48°C в продължение на 15 мин при всяка) и осветявани с $840 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. При тази експериментална постановка не е индуцирана термотолерантност чрез манипулиране на синтеза на изопрен. При увеличаване на температурата от 30 до 48°C, фотосинтезата намалява и в двата типа листа (изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани) (Фиг. III.2A), а съдържанието на H_2O_2 и MDA нараства също и в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа, показвайки че няма съществени промени в термотолерантността при специфичните условия на експеримента (Фиг. III.3).



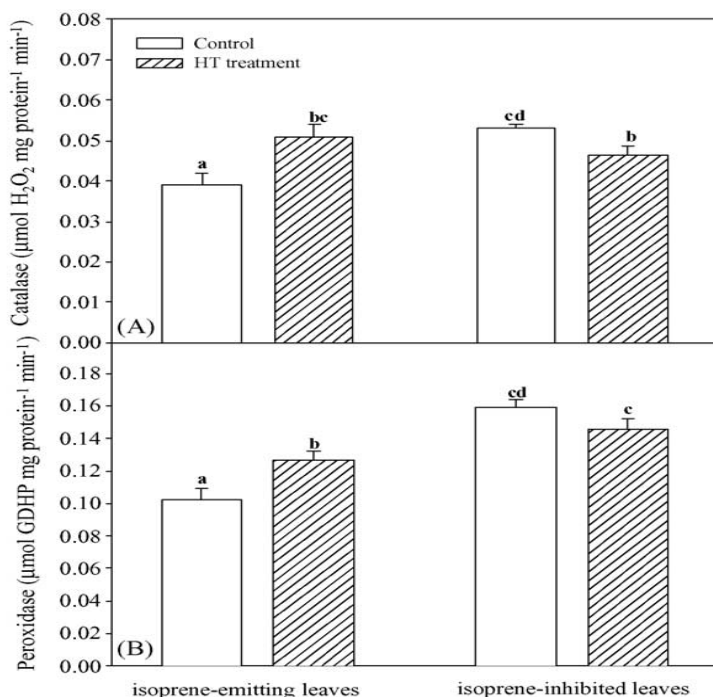
Фиг. III.2. Промени в скоростта на фотосинтезата, устичната проводимост (A) и скоростта на електронния транспорт в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* в резултат на третиране с висока температура (30, 38, 44 и 48°C) в продължение на 15 мин за всяка температура. Експериментът е проведен при интензитет на светлината 840 μmol m⁻² s⁻¹ (Velikova et al. – *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106:209-217, 2005).

Необходимо е да се отбележи, че фосмидомицинът не инхибира напълно изопреновата биосинтеза, независимо от концентрацията на инхибитора. Остатъчната емисия изопрен има същата температурна зависимост, както тази на неинхибираните листа, и значително нараства при температури между 38 and 44°C, достигайки максимални стойности при 44°C. При тази температура се наблюдава значително по-висока скорост на електронния транспорт в изопрен-отделящите листа, в сравнение с листата с инхибирана изопренова синтеза (Фиг. III.2B), което предполага, че изопренът може да улеснява потока на електрони през фотосинтетичните / фотореспираторните цикли. При оптимална температура (30°C) изопрен-инхибираните листа натрупват повече H₂O₂ (Фиг. III.3A) и малонилдиалдехид (Фиг. III.3B), и се характеризират със значително по-високи каталазна и пероксидазна активности (Фиг.

III.4), в сравнение с изопрен-отделящите листа. Интересно е, че тези различия между двата типа листа са по-малко очевидни след излагане на висока температура до 48°C. Това предполага, че изопренът, независимо от температурния стрес, ефективно намалява натрупването на реактивни кислородни форми и предпазва мембраните от денатурация.



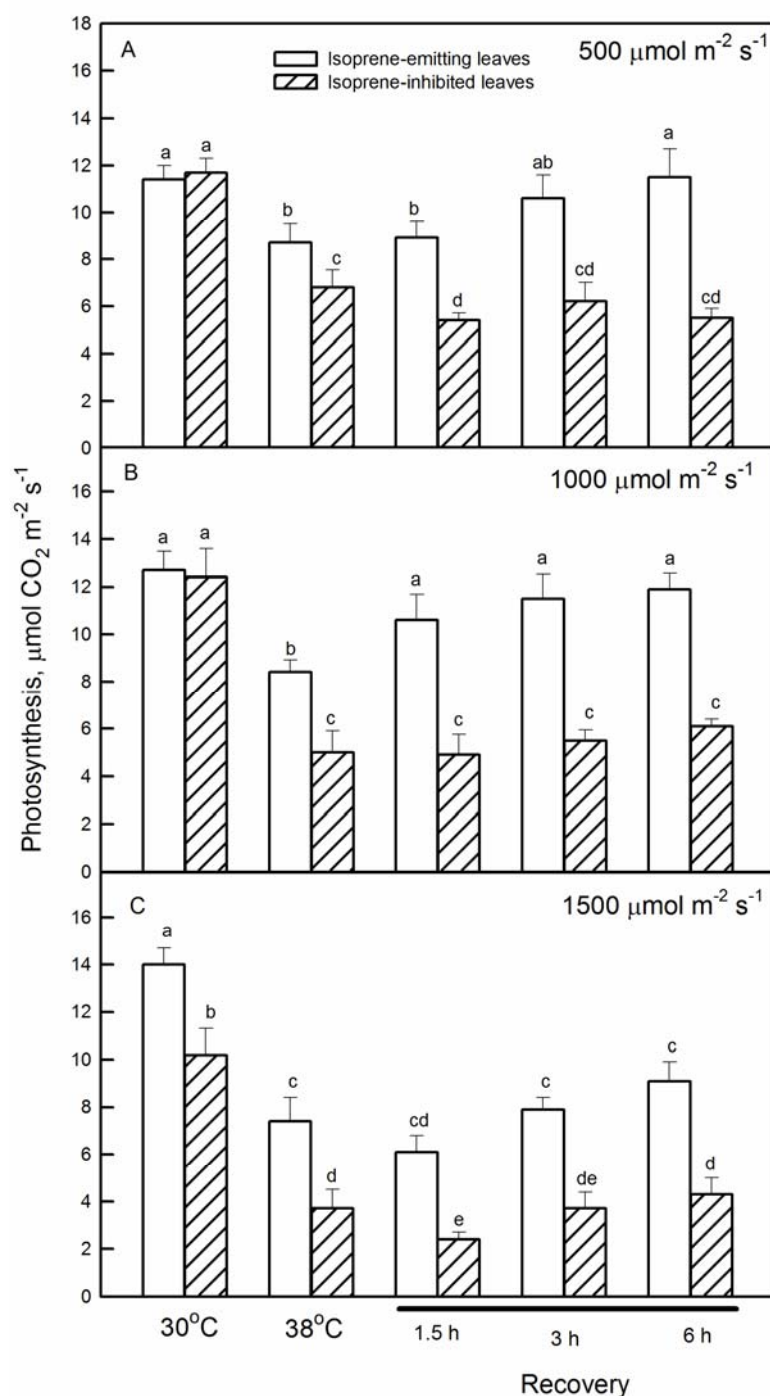
Фиг. III.3. Съдържание на водороден пероксид (A) и ниво на липидно пероксидиране (MDA) (B) в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* в резултат на третиране с висока температура (30, 38, 44 и 48 °C) в продължение на 15 мин за всяка температура. Биохимичните анализи са проведени след последното температурно третиране (48°C). Експериментът е проведен при интензитет на светлината 840 μmol m⁻² s⁻¹ (Velikova et al. – *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106:209-217, 2005).



Фиг. III.4. Промени в активността на каталазата (A) и гваякол пероксидазата (B) в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* в резултат на третиране с висока температура (30, 38, 44 и 48° C) в продължение на 15 мин за всяка температура. Биохимичните анализи са проведени след последното температурно третиране (48°C). Експериментът е проведен при интензитет на светлината 840 μmol m⁻² s⁻¹ (Velikova et al. – *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106:209-217, 2005).

Резултатите от първия експеримент (статия III. [Velikova et al. 2005](#)) ни дадоха основание да потърсим друг подход и да продължим изследванията си върху термозащитната роля на изопрена. Изучавана е реакцията на изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* към температура от 38°C приложена при различни интензитети на светлината (500, 1000 и 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Третиранията са в продължение на 1.5 ч - времеви период, който често се наблюдава в природата. Целта на изследването е да се разбере дали изопреновата защита засиси от светлинния интензитет и дали изопренът индуцира по-бързо и по-добро възстановяване от стреса.

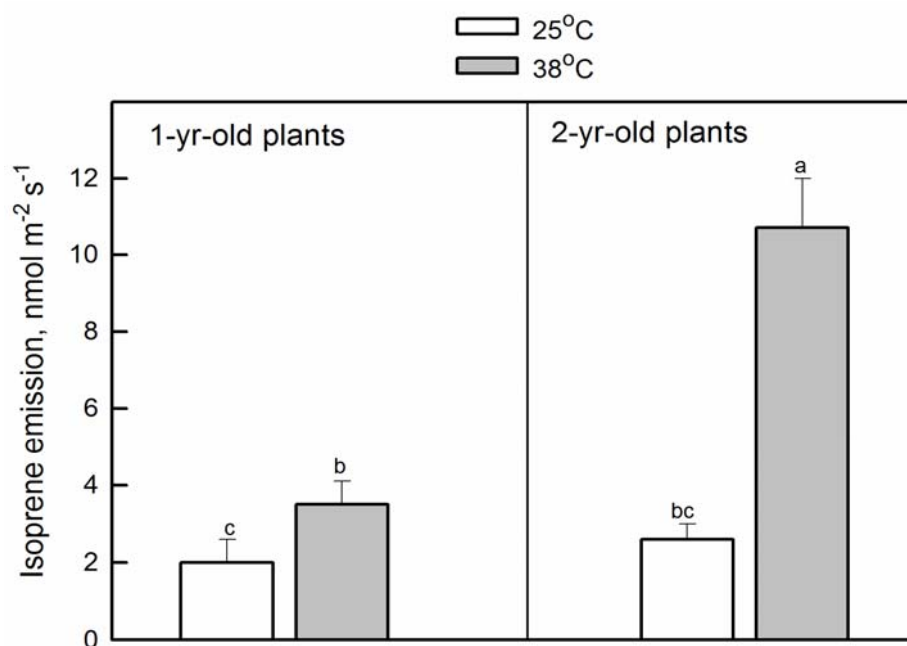
Третирането с умерено висока температура за този растителен вид (38°C в продължение на 1,5 часа) инхибира скоростта на фотосинтезата (**Фиг. IV.2**), намалява устичната проводимост и фотохимичната ефективност на фотосистема II в изопрен-отделящи листа на *Phragmites australis*, но в значително по-ниска степен, отколкото в изопрен-инхибираните листа. Инхибирането на изопрена и високата температура, приложени независимо, както и в комбинация, индуцират липидна пероксидация, повишено съдържание на H_2O_2 и повишени активности на каталазата и пероксидазата. Но листата с предварително инхибирана емисията на изопрен развиват по-силен окислителен стрес при висока температура в сравнение с изопрен-отделящите листа. Най-чувствителна е реакцията на растенията при най-високия светлинен интензитет (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Общо, наблюдаван е адитивен ефект на светлината и високата температура върху акумулирането на реактивни кислородни форми, стимулирането на ензимните активности и увреждането на мембраните. Получените данни (статия IV. [Velikova & Loreto 2005](#)) потвърждават предишни изследвания за намаляване на термотолерантността, когато изопреновата синтеза е инхибирана ([Sharkey & Singaas 1995](#); [Singaas et al. 1997](#)) и разкриват, че възстановяването от високотемпературен стрес е по-слабо в отсъствието на изопрен. Тези данни дават основание отново да се предположи, че повишената термотолерантност на изопрен-отделящите листа се дължи на способността на изопрена да стабилизира мембраните и/или да не позволява натрупването на вредни кислородни форми. Независимо от механизма, по който изопренът намалява високотемпературния стрес, листата, отделящи изопрен, са в състояние бързо да се възстановят след прекратяване на стреса. Това може да е важна характеристика на растенията, които трябва се справят с честите и преходни температурни колебания в природата (статия IV. [Velikova & Loreto 2005](#)).



Фиг. IV.2. Промени в скоростта на фотосинтезата в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *P. australis* след третиране с висока температура (38°C / 1.5 h) при различни интензитети на светлината (500, 1000 и 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) и след възстановяване от високотемпературния стрес (Velikova & Loreto – Plant, Cell and Environment 28:318-327, 2005).

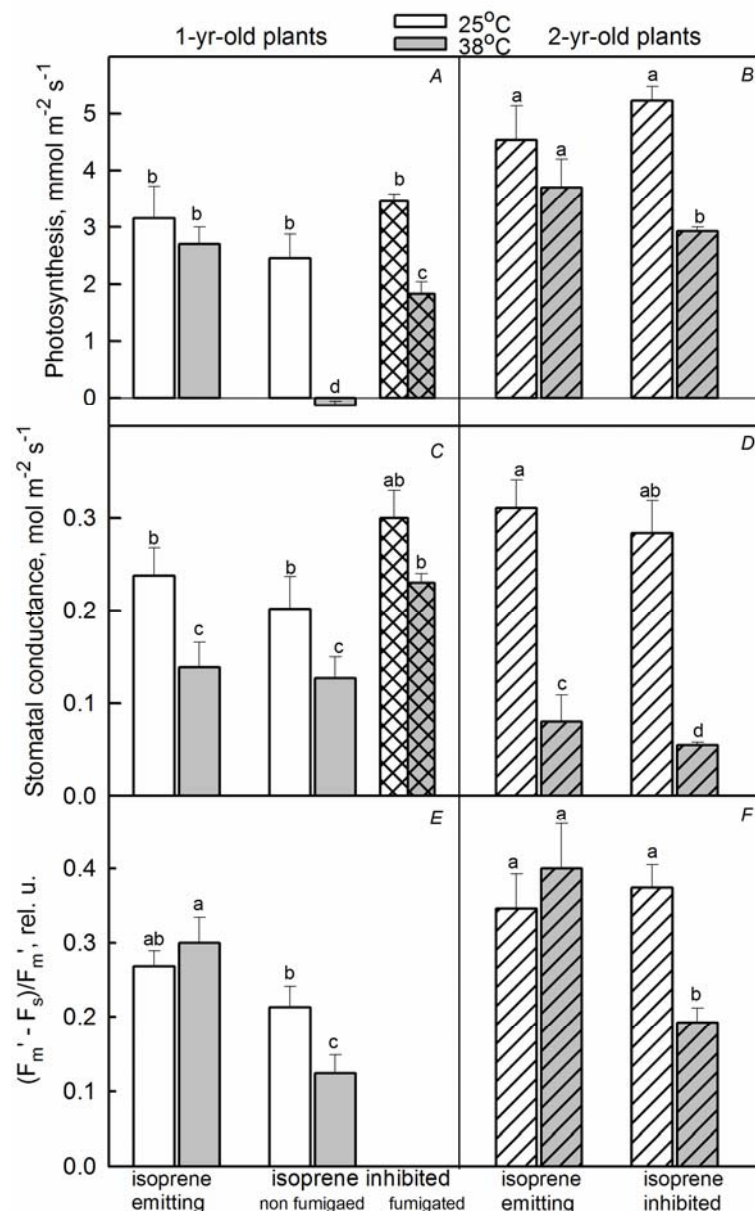
Феноменът на повишаване на термотолерантността от изопрена е проучван и при *Platanus orientalis* (статия VI. Velikova et al. 2006). Целта на изследването е да сравни термозащитната роля на изопрена в листа, характеризиращи се с различна скорост на изопреновата емисия.

Използвани са (1) листа от 1- и 2-годишни фиданки, (2) листа, чиято изопренова емисия е манипулирана с фосмидомицин, и (3) изопрен-инхибирани листа третирани с екзогенен изопрен. Целта на изследването е да се определи дали емисиите на изопрен зависят от възрастта на растението и дали различните по интензивност емисии могат да повлияят върху устойчивостта растенията към висока температура. Установено е, че двугодишните растения отделят по-големи количества изопрен (**Фиг. VI.1**) и притежават по-добър капацитет за справяне с топлинния стрес от едногодишните растения.



Фиг. VI.1. Ефект на високата температура (38°C за 4 h) върху изопреновата емисия от едно- и двугодишни фиданки *Platanus orientalis* (Velikova et al. – *Functional Plant Biology* 33:931-940, 2006).

След високотемпературна обработка (38°C в продължение на 4 часа), фотосинтетичната активност (**Фиг. VI.2**), съдържанието на водороден пероксид, липидната пероксидация и антирадикалната активност (статия VI. Velikova et al. 2006) се запазват в изопрен-отделящите едногодишни и двугодишни растения.



Фиг. VI.2. Промени във фотосинтезата (A,B), устичната проводимост (C,D) и фотохимичната ефективност на PSII (E,F) в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на едно- и двугодишни фиданки *Platanus orientalis* в отговор на високата температура (38°C за 4 h) (Velikova et al. – [Functional Plant Biology 33:931-940, 2006](#)).

В изопрен-инхибираните листа посредством фосмидомицин, намаляването на фотосинтезата и фотохимичната активност на фотосистема II се съпровожда с натрупване на H₂O₂, увеличаване на липидното пероксидиране и антиоксидантния капацитет в листата на растенията и от двете възрасти. Намаляване на отрицателните последствия от високотемпературното третиране се наблюдава при изопрен-инхибираните листа, които са фумигирани с екзогенен изопрен по време на топлинната обработка.

Тези резултати допълнително подкрепят идеята, че изопренът играе важна роля за защита на фотосинтезата срещу увреждане при висока температура. Предполага се, че изопренът е важен компонент на неензимната защита на растенията срещу термален стрес, като допринася за редуциране на активните кислородни форми и за стабилността на мембраните, особено в двугодишните растения (статия VI. Velikova et al. 2006).

4.2.В. Комбинираното въздействие на повишена атмосферна [CO₂] и висока температура има неблагоприятен ефект върху изопреновата емисия, функционалните и структурните характеристики на растенията (X. Velikova et al. – Environmental Pollution 157: 2629-2637, 2009)

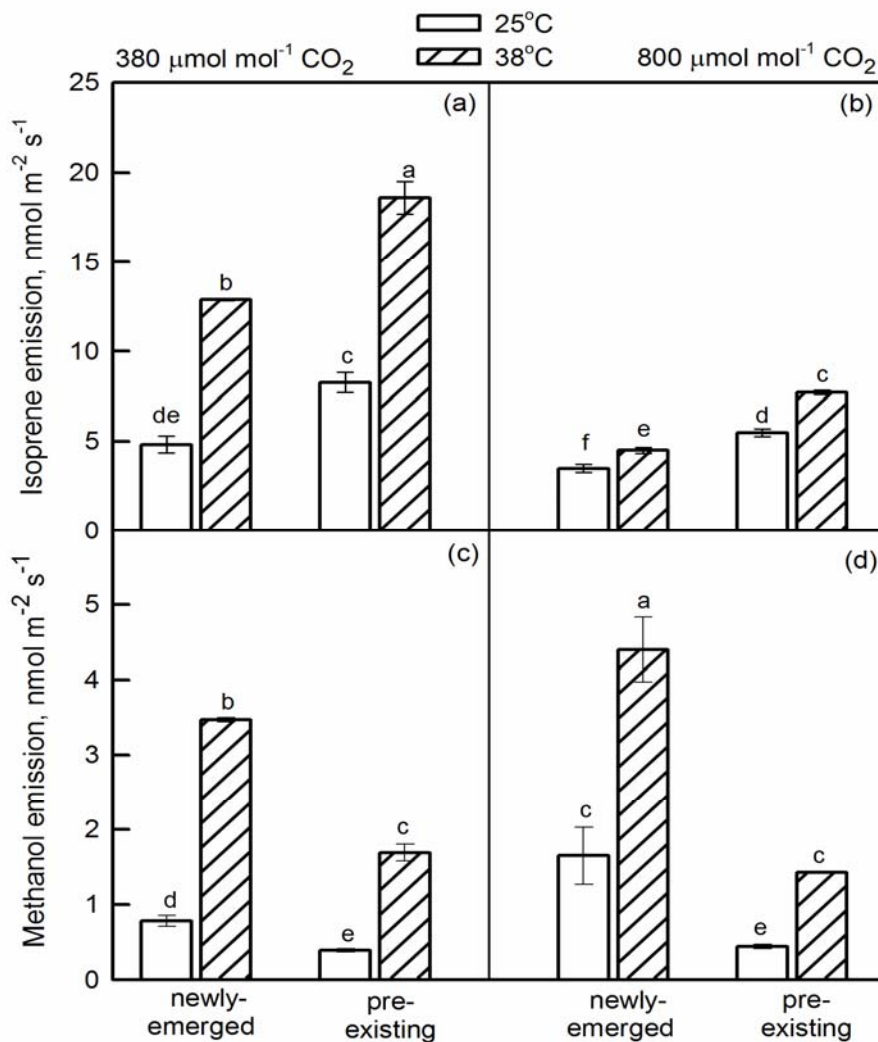
За да се изследват ефектите от комбинираното въздействие на повишена атмосферна концентрация на CO₂ и висока температура върху емисиите на изопрен и метанол, растения *Platanus orientalis* са отглеждани в продължение на един месец при естествена (380 μmol mol⁻¹) или повишена (800 μmol mol⁻¹) [CO₂] и са излагани на висока температура (НТ) (38°C/4h). Листата, които вече са достигнали своето напълно развитие преди поставянето на растенията в среда с повишена [CO₂] са наречени "предварително съществуващи", а листата, които са се развили по време на третирането с повишена [CO₂], са наречени "новопоявили се" (Фиг. X.1).



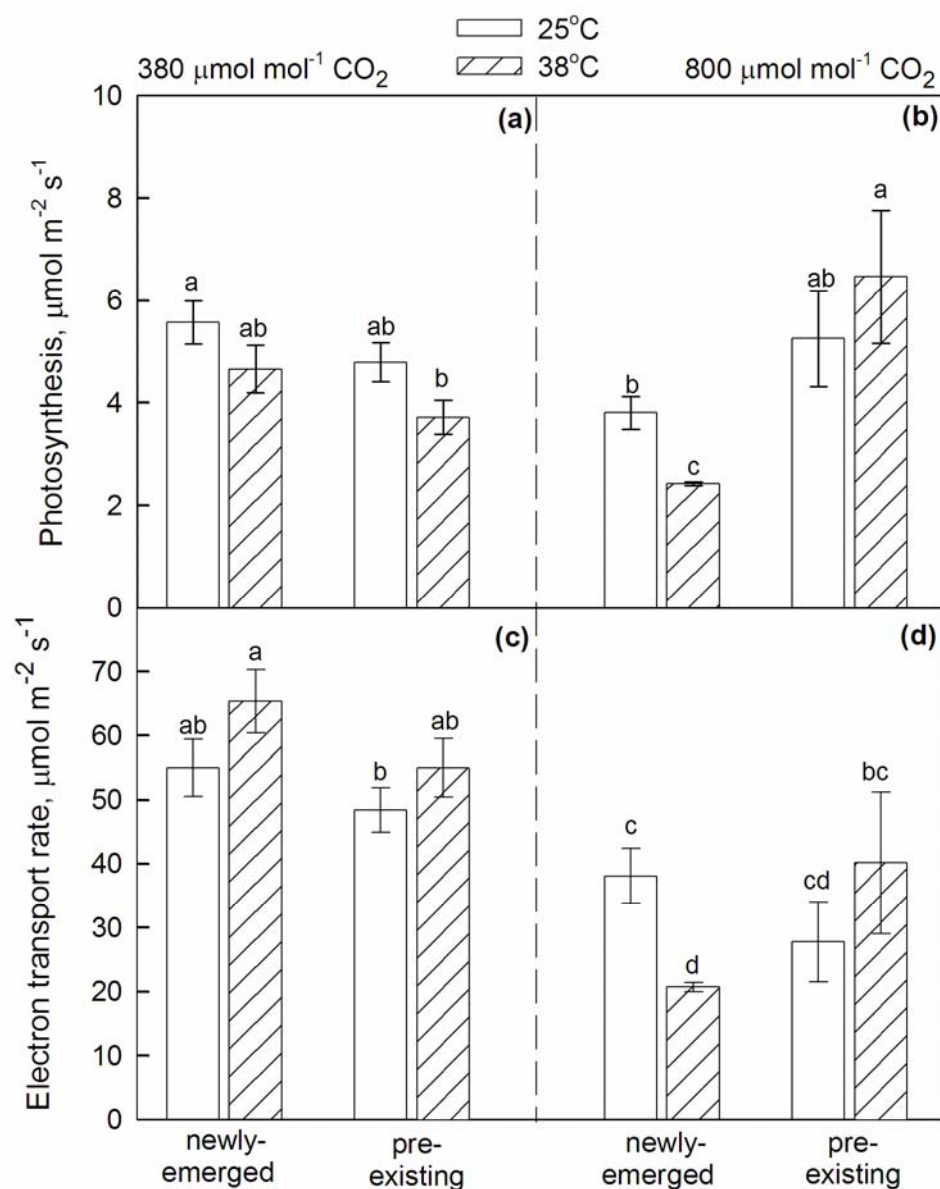
Фиг. X.1. Двугодишна фиданка *Platanus orientalis* след един месец развитие при 800 μmol mol⁻¹ [CO₂]. В експеримента са използвани два типа листа: такива, които са достигнали физиологична зрялост преди излагането на висока [CO₂], наречени "предварително съществуващи", и такива които са се развили и са достигнали физиологична зрялост по време на третирането с висока [CO₂], наречени "новопоявили се" (Velikova et al. – Environmental Pollution 157:2629-2637, 2009).

Хипотезите са, че (1) продължителното третиране с повишена [CO₂] може да повлияе положително върху фотосинтезата и че това би могло да намали отрицателния ефект на високата температура върху въглеродния метаболизъм; (2) повишената [CO₂] може да инхибира биосинтезата на изопрен, което от своя страна да намали термотолерантността на растенията и да засили неблагоприятния ефект на високата температура върху фотосинтезата

В предварително съществуващите листа емисиите на изопрен са високи, а тези на метанол са по-ниски в сравнение с новопоявилите се листа (**Фиг. X.4**). Повишената [CO₂] значително инхибира изопреновата емисия и при двата типа листа, докато увеличава емисията на метанол само при новопоявилите се листа.



Фиг. X.4. Промени в емисиите на изопрен (a, b) и метанол (c, d) в новопоявили се и предварително съществуващи листа на *Platanus orientalis* преди (бели стълбчета) и след 4-часово третиране с висока температура (38°C) (защриховани стълбчета) (Velikova et al. – *Environmental Pollution* 157:2629-2637, 2009).



Фиг. X.2. Промени във фотосинтезата (a, b) и скоростта на електронния транспорт (c, d) в новопоявили се и предварително съществуващи листа на *Platanus orientalis* преди (бели стълбчета) и след 4-часово третиране с висока температура (38°C) (защриховани стълбчета) (Velikova et al. – *Environmental Pollution* 157:2629-2637, 2009).

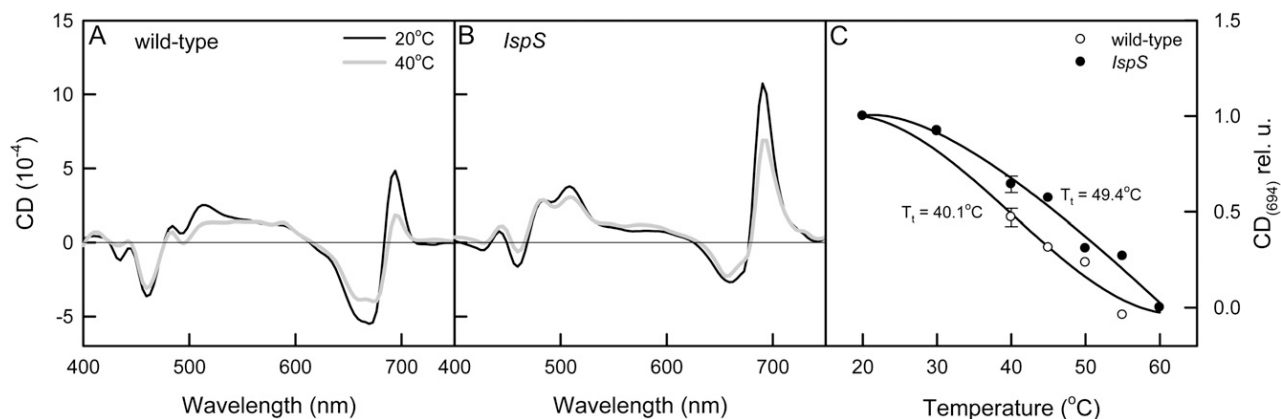
Не е установен ясен стимулиращ ефект на повишената $[\text{CO}_2]$ върху растежа, както се очакваше, но в съгласие с първата хипотеза, повишената $[\text{CO}_2]$ допринася за намаляване на негативното въздействие на високотемпературния стрес в предварително съществуващите листа. В контраст, третирането с висока температура значително потиска фотосинтезата и скоростта на електронния транспорт (Фиг. X.2), увеличава емисията на метанол (Фиг. X.4c,d) и променя хлоропластната ултраструктура и мембрания интегритет в новопоявилите се листа, особено в условията на повишена $[\text{CO}_2]$. Тези резултати подкрепят

втората хипотеза, че листата с инхибирана изопренова биосинтеза са по-чувствителни на топлинен стрес. **Следователно**, в по-топла и с повишена [CO₂] среда, *Platanus orientalis* вероятно ще бъде по-чувствителен, отколкото към настоящия климат. Освен това, повишената [CO₂] не само инхибира изопреновата емисия, но и стимулира емисията на метанол, и тези резултати биха били полезни за по-точна прогноза на биогенните емисии в условия на бъдещи климатични промени, както и за включването им в модели за въздействието на тези емисии върху качеството на въздуха в регионален и глобален мащаб (статия [X. Velikova et al. 2009](#)).

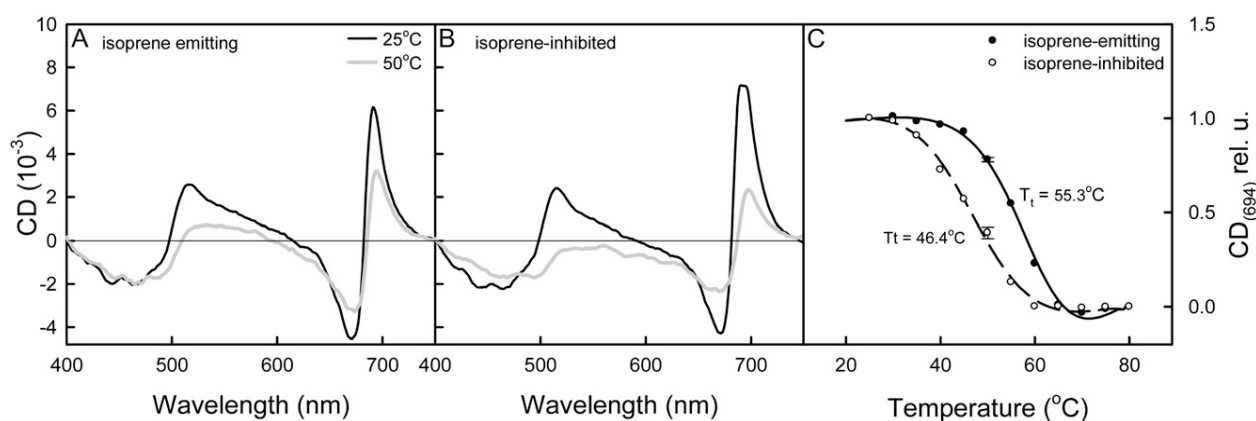
4.2.С. Биогенният изопрен има стабилизиращ ефект върху фотосинтетичните мембрани – биофизични подходи (статия [XII. Velikova et al. – Plant Physiology 157: 905-916, 2011](#))

С помощта на съвременни биофизични техники е изследван ефектът на биогенния изопрен върху функциите на тилакоидните мембрани. Използвани са два растителни вида като модел. *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), който не отделя изопрен като естествен метаболит, е генномодифициран с ген на изопрен синтаза от кудзу, така че дивият тип (неотделящ изопрен) е сравняван с мутантните растения (*IspS*), които отделят изопрен като естествен метаболит. Листа от *Platanus orientalis*, които отделят изопрен са сравнявани с такива, чиято изопренова биосинтеза е била инхибирана с фосмидомицин. Термостабилността на тилакоидните мембрани е оценявана с три биофизични техники, които са **използвани за първи път** при изясняване на физиологичната роля на изопрена, а именно кръгов дихроизъм (CD), електрохромно отместване при 515 nm (ΔA_{515}) и термолуминесценция (TL).

Установени са съществени различия в CD спектрите, регистрирани в дивия тип и *IspS Arabidopsis* при 20°C, а именно амплитудата на основната CD ивица ([+] 694 nm) е по-ниска в дивия тип в сравнение с *IspS* растения (**Фиг. XII.2А,В**). Докато, CD спектрите при *P. orientalis*, измерени при 25°C, не се различават при изопрен-отделящите и изопрен-инхибираните листа (**Фиг. XII.3А,В**).



Фиг. XII. 2. CD спектри регистрирани в *Arabidopsis* (A) див тип, който не отделя изопрен и (B) *IspS* изопрен-отделящи растения; (C) T_t – transition temperature, температурата при която интензитета на CD ивица при (+)694 nm е 50% от стойността измерена при 20°C (Velikova et al – *Plant Physiology* 157:905-916, 2011).



Фиг. XII. 3. CD спектри регистрирани в (A) изопрен-отделящи и (B) изопрен-инхибирани листа на *Platanus orientalis*; (C) T_t – transition temperature, температурата при която интензитета на CD ивица при (+)694 nm е 50% от стойността измерена при 25°C (Velikova et al – *Plant Physiology* 157:905-916, 2011).

За да се изследва възможната роля на изопрена в конформационната стабилност на тилакоидните мембрани подложени на висока температура, измерванията на CD спектрите са проведени при серия от различни температури (от 20 до 60°C). От тези спектри е изчислена т. нар. T_t – transition temperature, т.е. температурата при която интензитета на CD ивицата при (+)694 nm е 50% от стойността измерена при физиологична температура (20 и 25°C, при *Arabidopsis* и *Platanus*, съответно). Резултатите показват, че T_t при *IspS Arabidopsis* се измества към по-висока стойност и тя е 49.4°C, а при дивия тип е 40.1°C (Фиг. XII.2C), докато при изопрен-инхибираните листа на *P. orientalis* тя се

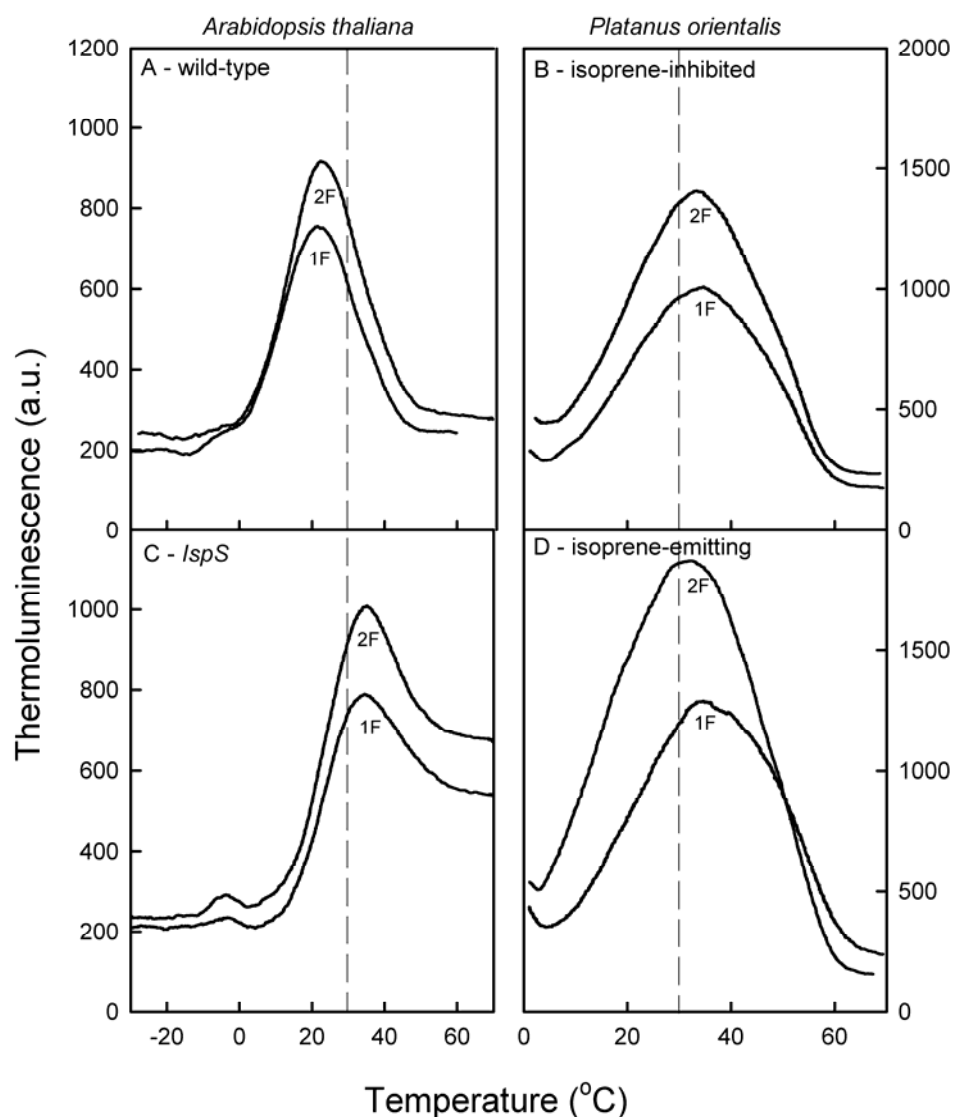
измества към по-ниски стойности и е 46.4°C, а в изопрен-отделящите листа тази температура е 55.3°C (**Фиг. XII.3C**). Тези резултати ясно показват, че температурната стабилност на хиралните макродомени на хлоропластните мембрани, и по-специално стабилността на подреденост на светосъбиращи комплекси на фотосистема 2 в граналните тилакоиди се подобрява в присъствието на изопрен. CD спектрите показват, че изопренът може да повлияе организацията на тилакоидните мембрани.

Електрохромното отместване при 515 nm (ΔA_{515}), което отразява формирането на протонен градиент през тилакоидните мембрани, е използвано за оценка на мембрания интегритет. Установено е, че спадът на ΔA_{515} е по-бърз в отсъствието на изопрен, когато листата на *Arabidopsis* и *Platanus* са подложени на висока температура, показвайки че изопренът защитава тилакоидните мембрани срещу повишена пропускливост при високи температури, т.е. фотосинтетичните мембрани имат по-добра способност да поддържат индуцирано от светлината трансмембранно електрическо поле при повишена температура (**Таблица XII.1**).

<i>Arabidopsis thaliana</i>				<i>Platanus orientalis</i>			
<i>IspS</i>		Див тип		Изопрен-отделящи		Изопрен-инхибирани	
20°C	40°C	20°C	40°C	25°C	45°C	25°C	45°C
57.8±6.5	52.0±6.0	61.2±2.8	37.1±3.8*	83.3±5.4	65.2±2.4*	74.5±4.4	45.0±1.1**

Таблица XII.1. Промени в електрохромните отмествания при 515 nm (ΔA_{515}), регистрирани в листа на изопрен-отделящи (*IspS*) и див тип неотделящи изопрен растения *Arabidopsis thaliana* при температури от 20°C и 40°C; и в листа на изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа на *Platanus orientalis* при температури от 25°C и 45°C (**Velikova et al – Plant Physiology 157:905-916, 2011**).

Измерванията на термолуминесценцията разкриха, че позицията на В-пика се измества към по-висока температура в присъствието на изопрен и при двата растителни вида (**Фиг. XII. 4**). Получените данни доказват, че рекомбинацията на зарядите на донорната и акцепторната страна на фотосистема 2 протича при по-висока температура, позволявайки на изопрен-отделящите растения да осъществяват ефективна първична фотохимия при по-високи температури.



Фиг. XII. 4. Термолуминесцентни (TL) криви регистрирани в *Arabidopsis* (A) див тип, който не отделя изопрен и (C) *IspS* изопрен-отделящи растения; и в (B) изопрен-отделящи и (D) изопрен-инхибирани листа на *Platanus orientalis* (Velikova et al – *Plant Physiology* 157:905-916, 2011).

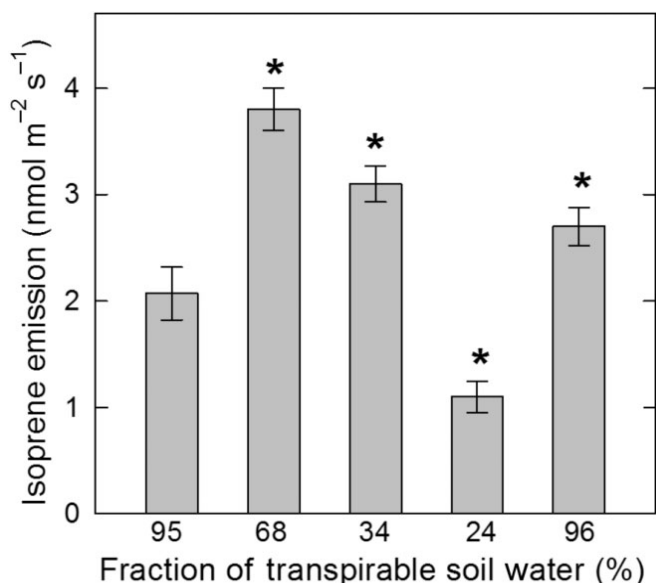
Получените резултати за първи път предоставят експериментални доказателства за това, че изопренът повишава термотолерантността на растенията (Sharkey & Singaas 1995; Loreto & Schnitzler 2010), подобрявайки интегритета и функционалността на фотосинтетичните мембранни в условия на висока температура (статия XII. Velikova et al. 2011).

4.3. Ефект на засушаването върху изопреноидите в трансгенни тютюневи растения (статия XV. Tattini et al. – *Plant, Cell and Environment* 37:1950-1964, 2014)

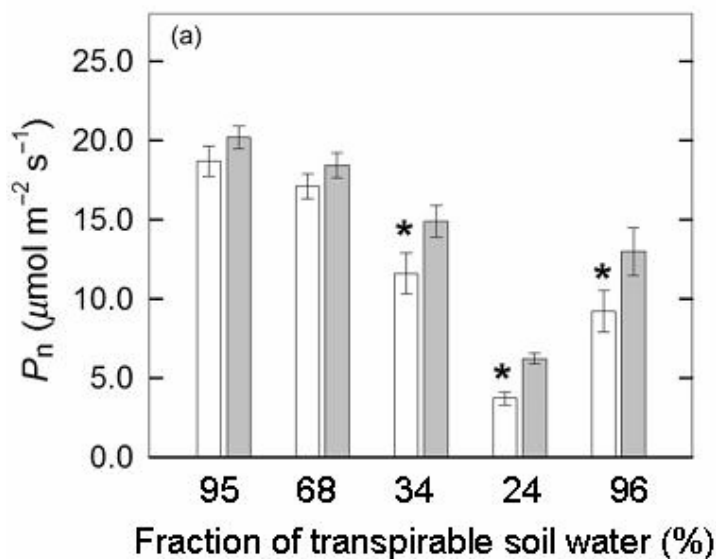
Като моделна система е използван трансгенен тютюн, който отделя изопрен като естествен метаболит с цел да се изясни дали ендегенният

изопрен има защитен ефект при засушаване, и също така да се разбере каква е взаимовръзката му с нелетливите изопреноиди (каротеноиди и абсцисиева киселина) и други вторични метаболити със защитна функция (въглехидрати и фенилпропаноиди) при оптимални условия и при стрес. Растенията са подложени на прогресиращо засушаване (68, 34 и 24 % FTSW) с последващо рехидратиране (FTSW = 96%)

В процеса на засушаване изопреновата емисия се увеличава почти двойно в началните етапи на засушаване, и намалява значително само при най-силната степен на засушаване (FTSW = 24%) (**Фиг. XV.1**), когато фотосинтезата е значително инхибирана (**Фиг. XV.2a**).



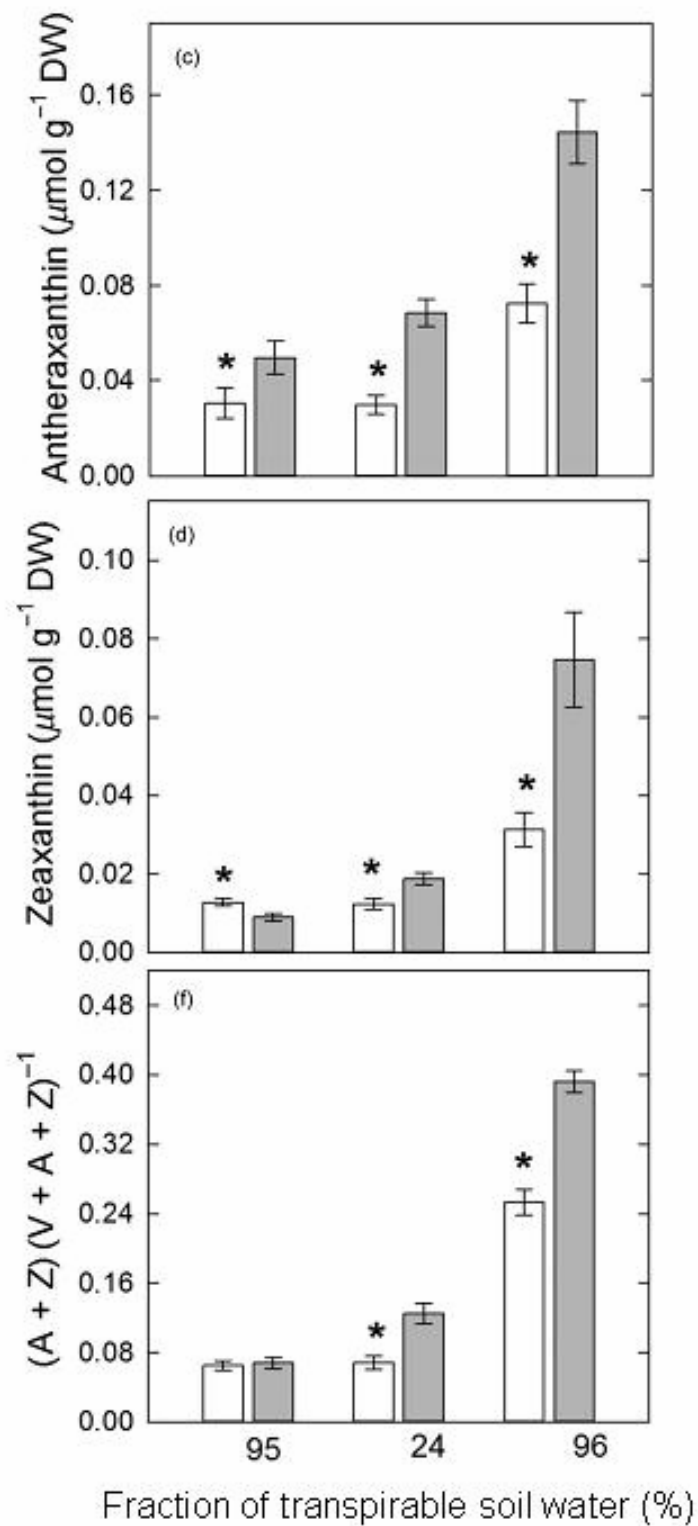
Фиг. XV.1. Промени в изопреновата емисия при изопрен-отделящи тютюневи растения (линия 12) по време на засушаване (FTSW=68, 34 и 24%) и последващо рехидратиране (FTSW=96%) (Tattini et al. – *Plant, Cell and Environmnet* 37:1950-1964, 2014).



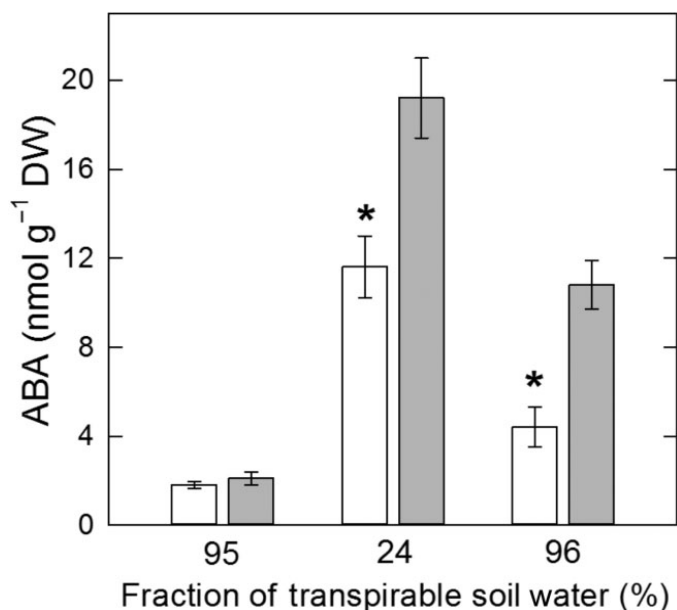
Фиг. XV.2. Промени в скоростта на фотосинтезата (P_n , a) в изопрен-неотделящи (бели стълбчета) и изопрен-отделящи (сиви стълбчета) растения тютюн (линия 12) по време на засушаване (FTSW=68, 34 и 24%) и последващо рехидратиране (FTSW=96%) (Tattini et al. – *Plant, Cell and Environmnet* 37:1950-1964, 2014).

Засушаването има слаб ефект върху листните каротеноиди в неотделящите изопрен растения, докато в изопрен-отделящите растения биосинтезата на антераксантин и зеаксантин са стимулирани и съответно състоянието на деепоксидиране (**Фиг. XV.4c,d,f**). Тези резултати ни дават основание да заключим, че индуцираната от засушаване изопренова биосинтеза стимулира изопреноидния метаболизъм през метил-еритрол-фосфатния биосинтетичния път (MEP), посредством който се синтезират и каротеноидите.

При умерена степен на засушаване нивото на абсцисиевата киселина е сходно в изопрен-отделящите и неотделящите растения (**Ryan et al. 2014**), но при силен воден дефицит ние установихме по-значително натрупване на абсцисиева киселина в изопрен-отделящия тютюн в сравнение с неотделящия и тази тенденция се запазва и след възстановяване от стреса (**Фиг. XV.5**). Това може да се дължи, както на стимулирането на биосинтетичния метил-еритрол-фосфатен път (в листата изопренът и абсцисиевата киселина се синтезират през един и същ метаболитен път, MEP пътя в хлоропластите, **Lichtenthaler et al. 1997**), така и на транспортирането на абсцисиева киселина, синтезирана в корените (**Simonneau et al. 1998**) или стъблата (**Christmann et al. 2005**).

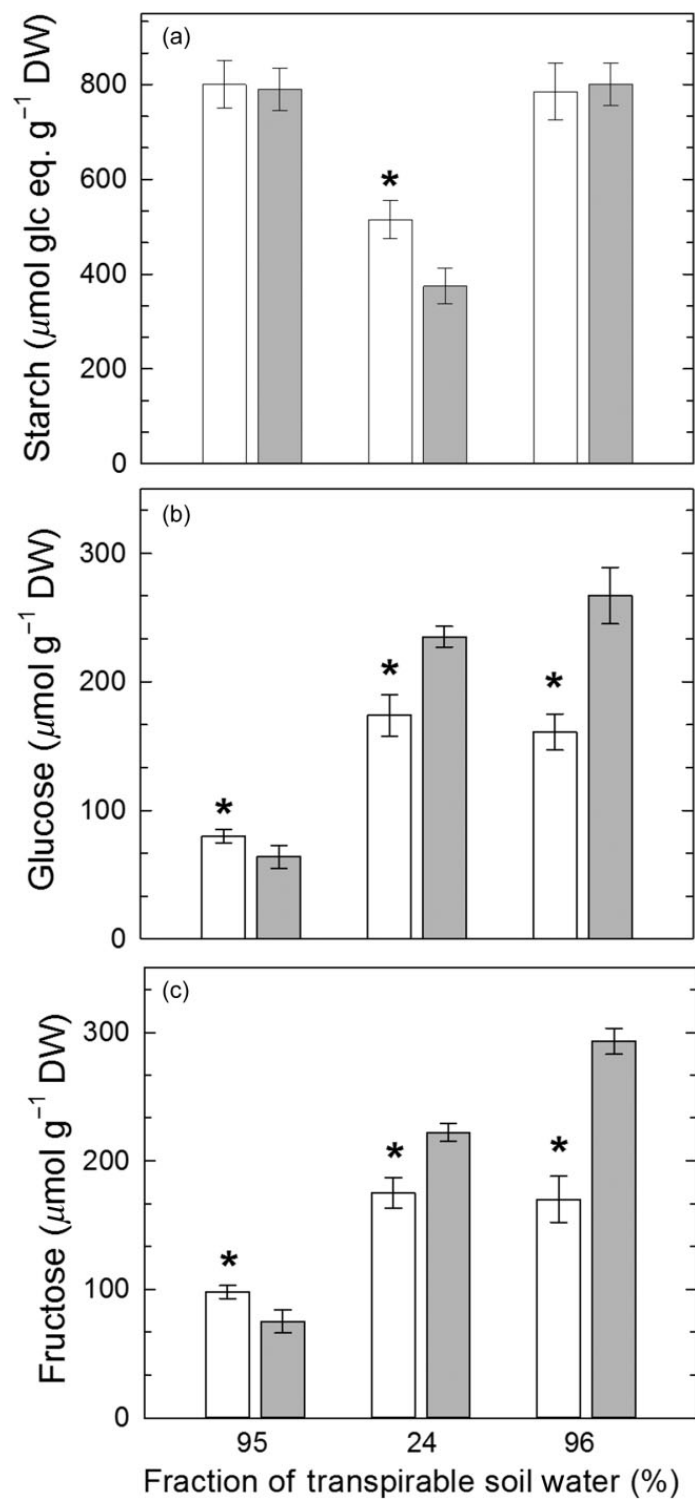


Фиг. XV.4. Промени в съдържанието на антераксантин (c), зеаксантин (d) и състоянието на деепоксидация (f) в изопрен-неотделящи (бели стълбчета) и изопрен-отделящи (сиви стълбчета) растения тютюн (линия 12) при силно засушаване (FTSW=24%) и последващо рехидратиране (FTSW=96%) (Tattini et al. – *Plant, Cell and Environmnet* 37:1950-1964, 2014).

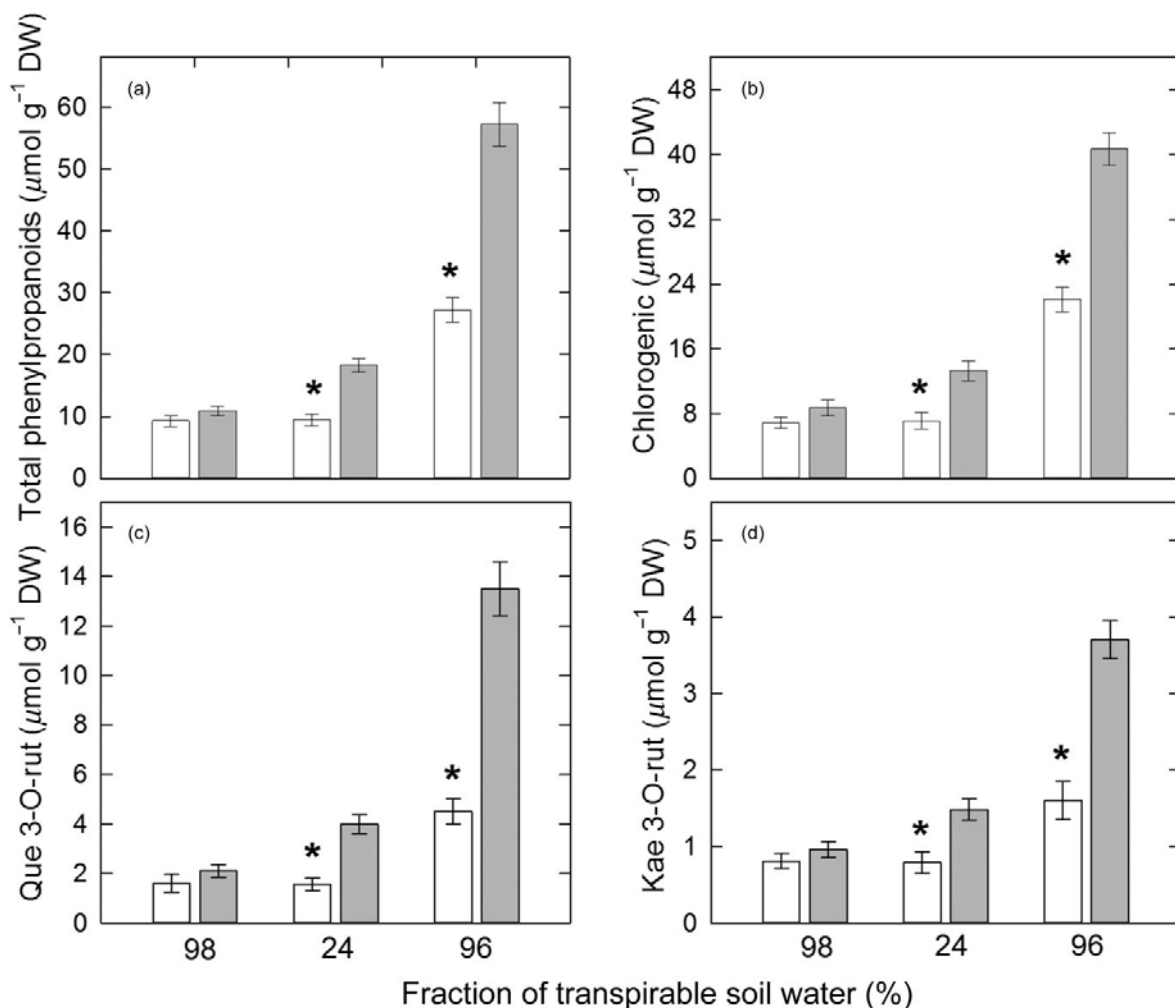


Фиг. XV.5. Промени в съдържанието на абсцисиева киселина в листа на изопрен-неотделящи (бели стълбчета) и изопрен-отделящи (сиви стълбчета) растения тютюн (линия 12) при силно засушаване (FTSW=24%) и последващо рехидратиране (FTSW=96%) (Tattini et al. – *Plant, Cell and Environmnet* 37:1950-1964, 2014).

По-високите нива на абсцисиевата киселина при изопрен-отделящите в сравнение с неотделящите растения в условията на силно засушаване, корелира с увеличеното разграждане на скорбяла и повишаване на нивата на хексозите (глюкоза и фруктоза) при изопрен-отделящите растения (Фиг. XV.6). Съдържанието на хексози се запазва високо и след възстановяване на растенията, въпреки че нивото на скорбялата се възстановява до това измерено в контролните добре оводнени растения. Това е в съответствие с частичното възстановяване на фотосинтезата, което очевидно е достатъчно, за да се запаси отново със скорбяла. Абсцисиевата киселина и разтворимите захари могат да действат поотделно и/или съвместно, стимулирайки биосинтезата на фенолпропаноиди, по-специално на флавоноидите (Koch 1996; Abe et al. 1997; Tossi et al. 2009; Luo et al. 2012). В нашия експеримент концентрацията на фенолпропаноидите (изомери на хлорогеновата киселина и на кверцетин 3-О-рутинозида) е значително по-висока в изопрен-отделящите растения в сравнение с неотделящите в условията на засушаване и след възстановяване от стреса (Фиг. XV.7).



Фиг. XV.6. Промени в съдържанието на скорбяла (a), глюкоза (b) и фруктоза (c) в изопрен-неотделящи (бели стълбчета) и изопрен-отделящи (сиви стълбчета) растения тютюн (линия 12) при силно засушаване (FTSW=24%) и последващо рехидратиране (FTSW=96%) (Tattini et al. – *Plant, Cell and Environment* 37:1950-1964, 2014).



Фиг. XV.7. Промени в съдържанието на общи (a) и индивидуални изомери на хлорогеновата киселина, (b); кверцетин 3-О-рутинозид, (c); камферол 3-О-рутинозид, (d) фенилпропаноиди в изопрен-неотделящи (бели стълбчета) и изопрен-отделящи (сиви стълбчета) растения тютюн (линия 12) при силно засушаване (FTSW=24%) и последващо рехидратиране (FTSW=96%) (Tattini et al. – *Plant, Cell and Environmnet* 37:1950-1964, 2014).

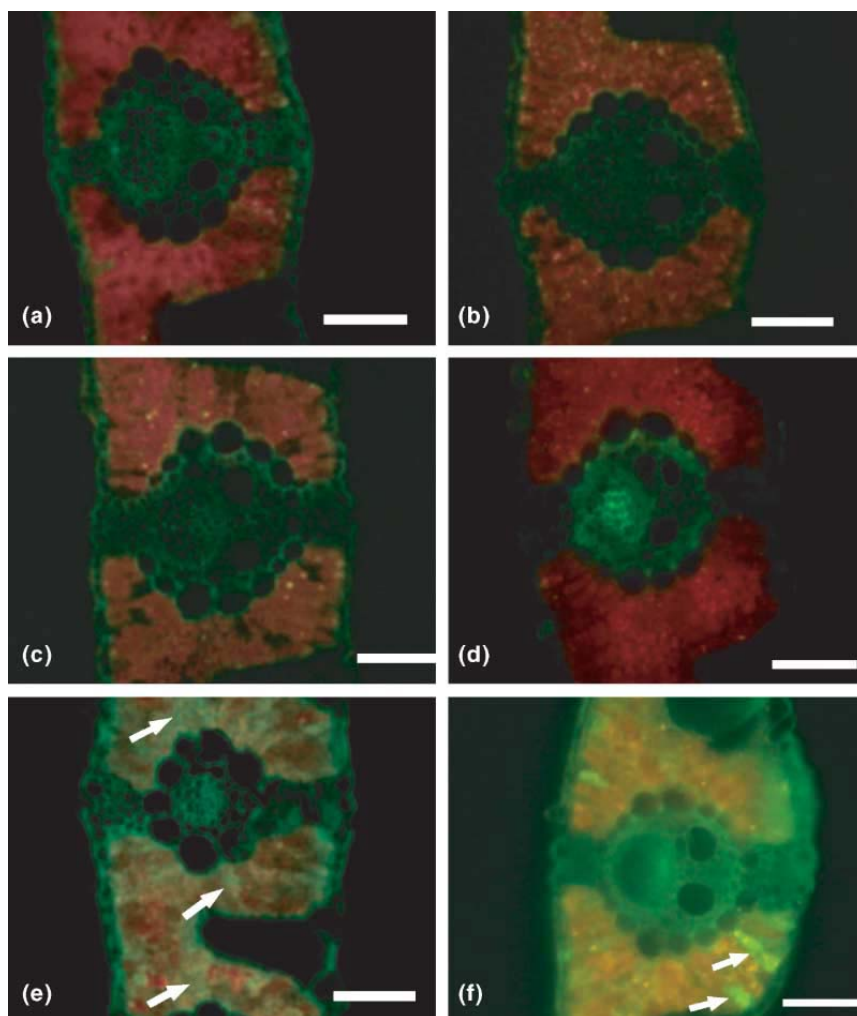
Резултатите ни дават основание да заключим, че в трансгенния тютюн се индуцират различни отговори в зависимост от степента на засушаването. Установена е взаимовръзка между изопрена и нелетливите изопреноиди, а именно че при изопрен-отделящия тютюн изопренът е ефективен при краткотрайно стресово въздействие, докато нелетливите изопреноиди защитават растенията при продължителен и силен стрес. Показано е, че при растенията, отделящи изопрен се стимулира образуването на нелетливи изопреноиди и фенилпропаноиди, които допълнително могат да защитават растенията в условия на стрес.

4.4. Взаимодействие между ендогенния изопрен и азотния оксид *in planta* (статии **V. Velikova et al. – New Phytologist 166:419-426, 2005;** **VIII. Velikova et al. – Plant, Cell and Environment 31:1882-1894, 2008;** **XIII. Velikova et al. – Plant Signaling & Behavior 7:139-141, 2012**)

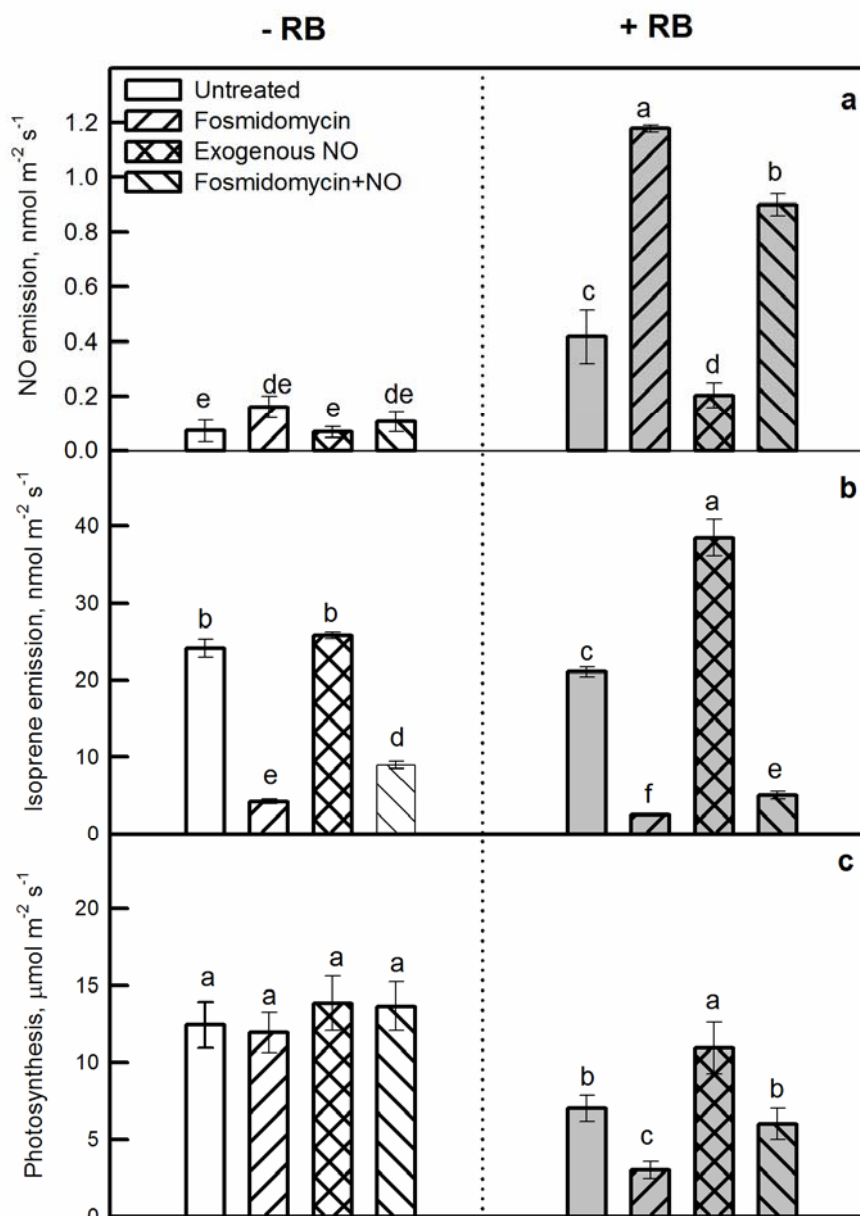
Изопренът е силно реактивна молекула и взаимодействия с други газообразни съединения, отделяни от растенията, са теоретически възможни.

Установено е, че изопренът редуцира нивото на H₂O₂ в третиран с озон листа (статия **I. Loreto & Velikova 2001**), и намалява съдържанието на синглетен кислород (**Affek & Yakir 2002**; статия **II. Velikova et al. 2004**), осигурявайки обща защита срещу активни кислородни форми (**Vickers et al. 2009b**). Нашата **хипотеза** е, че изопренът би могъл да взаимодейства с азотния оксид (NO) или с пероксинитрити (ONOO⁻), образувани в резултат на NO-ROS взаимодействието и по този начин да намалява съдържанието им, които във високи концентрации са токсични за много биологични молекули (**Lipton et al. 1993**), а също индиректно да модулира количеството на азотния оксид, който реагирайки с ROS, може да инициира свръхчувствителни отговори. **За първи път** е демонстрирано, че азотен оксид се натрупва само в изопрен-инхибирани листа на *P. australis* третиран с озон, докато азотен оксид не е локализиран в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа, неизпитващи озонов стрес, нито в изопрен-отделящите листа третиран с озон (**Фиг. V.3**). Установено е, че изопрен-инхибирани листа на топола, изпитващи окислителен стрес (Rose Bengal), отделят по-големи количества азотен оксид, и че най-добра защита на фотосинтетичния апарат се постига при NO-обогатени изопрен-отделящи листа (**Фиг. VIII.4**).

Ако изопренът модулира количеството на азотния оксид в листата, то той не само защитава листата срещу стрес, но може и косвено да въздейства върху реакцията на растението към стреса. Азотен оксид се индуцира при почти всеки стресов отговор (**Grün et al. 2006**), освен това той е сигнална молекула и сигнализацията зависи от баланса между скоростта на образуване и премахване (отстраняване) на азотния оксид (**Wilson et al. 2008**). В 4.5.B. е дискутирано взаимодействието между изопрена и азотния оксид при нитрозилиране на белтъците (статия **XVIII**). Екзогенният азотен оксид, подаден като газ или чрез донора SNP, има благоприятен ефект върху листата, които са изложени на окислителен стрес, намалявайки инхибирането на фотосинтезата (**Фиг. VIII.4c**), натрупването на реактивни кислородни форми и продукти от увреждане на мембраните.



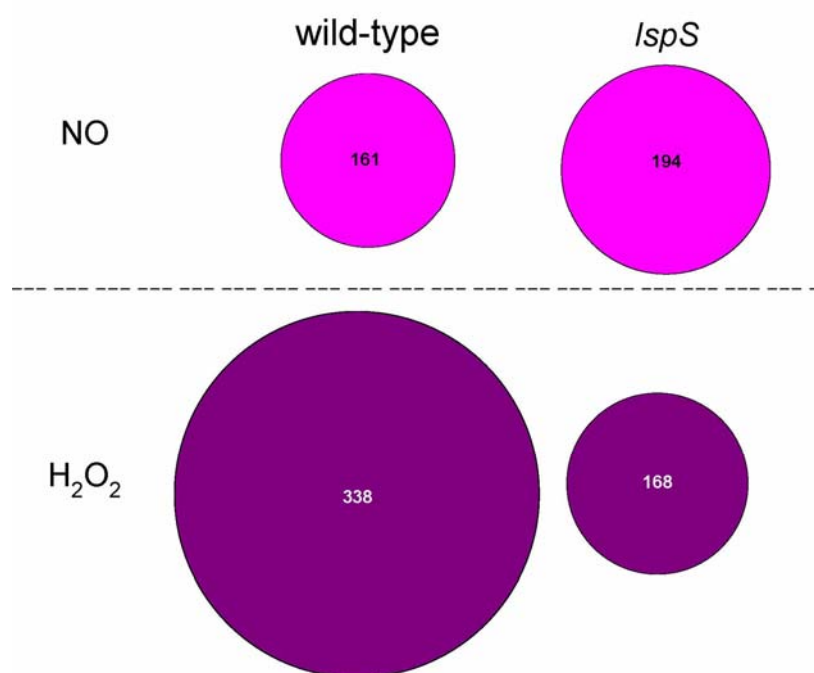
Фиг. V.3. Локализиране на азотен оксид (NO, жълно-зелена флуоресценция) в мезофилна тъкан на листа *Phragmites australis*. (a) изопрен-отделящи листа, (b) изопрен-инхибирани листа, (c) изопрен-отделящи листа + O₃, (d) изопрен-инхибирани листа + cPTIO + O₃, изопрен-отделящи листа + O₃ (e, f). [c-PTIO – 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide – уловител на азотен оксид] (Velikova et al. – *New Phytologist* 166:419-426, 2005).



Фиг. VIII.4. Ефект на Rose Bengal върху скоростта на емисиите на азотен оксид (a) и изопрен (b), и на фотосинтезата (c) в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа от *Populus nigra* (Velikova et al. – Plant, Cell and Environment 31:1882-1894, 2008).

Количествата азотен оксид и H₂O₂, две ключови молекули в сигнализацията на растенията, предизвикващи свръхчувствителни реакции при стрес (Delledonne et al. 2001; Delledonne 2005), са анализирани в див тип (WT) и трансгенен (*IspS*) *Arabidopsis*, който отделя изопрен като естествен метаболит, при температурата на растеж (22°C) и след излагане на висока температура (38°C) (Фиг. XIII.1). Съществено увеличаване на азотния оксид и H₂O₂ е установено и в двата типа растения, като количеството на H₂O₂ е значително по-високо при дивия тип в сравнение с *IspS*, докато азотният оксид нараства почти

в еднаква степен при дивия тип и трансгенния *Arabidopsis (IspS)*. Чрез промяна на баланса между азотния оксид и H_2O_2 при условия на топлинен стрес, изопреновата емисия може да промени схемата на сигнализация на тези молекули (Delledone et al. 2001). Когато изопренът отсъства (див тип *Arabidopsis*), едновременното натрупване на H_2O_2 и азотен оксид може да предизвика клетъчна смърт, докато при изопрен-отделящите растения (*IspS*), акумулирането на H_2O_2 и азотен оксид може да не достигне токсични нива или тяхното съотношение може да не е адекватно и свръхчувствителните реакции да бъдат предотвратени.



Фиг. XIII.1. Увеличаване на нивото на азотен оксид (NO) и водороден пероксид (H_2O_2) в изопрен-неотделящи (wild-type) и изопрен-отделящи (*IspS*) растения *Arabidopsis* след въздействие с висока температура ($38^{\circ}C$ за 4 h). Числата са процент на увеличаване на NO и H_2O_2 , в сравнение със стойностите, измерени в растенията на $22^{\circ}C$ (Velikova et al. – *Plant Signaling & Behavior* 7:139-141, 2012).

Прави впечатление, че нивото на H_2O_2 е значително по-ниско при изопрен-отделящите растения *Arabidopsis*, докато по отношение на концентрацията на азотния оксид разликите между дивия тип и мутанта са значително по-малки. Сравнително по-слабото нарастване (168%) на H_2O_2 в *IspS* би могло да бъде косвена последица от запазената функционалност на фотосинтетичните регулаторни механизми в тези растения, която се дължи на способността на изопрена да стабилизира мембраните (статия XII. Velikova et al. 2011).

Ако активните кислородни форми (ROS) увреждат мембраните и увредените мембрани водят до образуването на ROS, може да се получи самозхранващ се затворен цикъл. Стрес, който генерира ROS (напр. озон) и стрес, който уврежда мембраните (напр. висока температура) ще активират появата на затворен цикъл, и ще доведат до натрупването на H₂O₂, и евентуално до клетъчна смърт. Изопренът може да спре този затворен цикъл, по един от двата начина: (1) гасейки ROS, и (2) стабилизирайки мембраните (статия XIII. Velikova et al. 2012). Ако изопренът гаси ROS, то продуктите от взаимодействието изопрен / ROS също трябва да се имат предвид. Такъв продукт е метилвинилкетонът, който може да бъде цитотоксичен (Vollenweider et al. 2000). Резултатите дават основание да се предположи, че основен механизъм, чрез който изопренът помага на растенията да понасят абиотичния стрес е стабилизирането на мембраните (статия XII. Velikova et al. 2011).

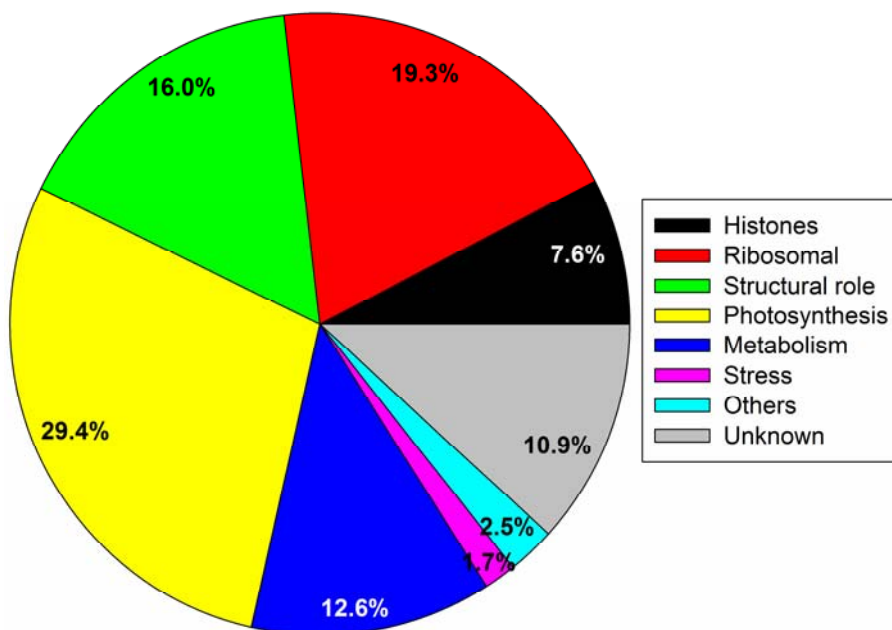
4.5. Белтъци, липиди и ултраструктура на хлоропластите в растения с инхибирана изопренова емисия (статии XIV. Velikova et al. – Journal of Proteome Research 13:2005-2018, 2014, XVII. Velikova et al. – Plant Physiology 168: 859-870, 2015, XVIII. Vanzo et al. – Plant Physiology 170: 1945-1961, 2016)

4.5.A. Генното манипулиране на изопреновата емисия в топола променя хлоропластния протеом (статия XIV. Velikova et al. – Journal of Proteome Research 13:2005-2018, 2014)

Тествана е хипотезата, че потискането на изопреновата емисия в растения на топола посредством генна манипулация променя хлоропластния белтъчен профил, по начин, който да компенсира промените във функционалността на хлоропластите, и реакцията на растенията при абиотичен стрес. Това е **първото изследване**, което се занимава конкретно с промените в белтъчния профил на хлоропластите вследствие на променената възможност на растенията да отделят изопрен.

Приложеният ICPD подход ни позволи количествена оценка на 119 хлоропластни белтъци, които са анотирани в базата данни за секвенирания геном на *Populus trichocarpa* (Phytozome v9.1, <http://www.phytozome.net>). Анотираните 119 белтъци са разпределени в 8 функционални категории. Основната група (29.4% от общия брой белтъци) включва белтъци, свързани с фотосинтетични светлинни реакции, протонен транспорт, окислително-редукционни реакции, цикъл на Калвин, и окислителния пентозо-фосфатен път. „Рибозомалните белтъци“ (19.3%) е следващата по големина група, следвана от категорията белтъци със „структурна роля“ (16.0%), обединяваща белтъци участващи в синтезата, свързването и нагъването

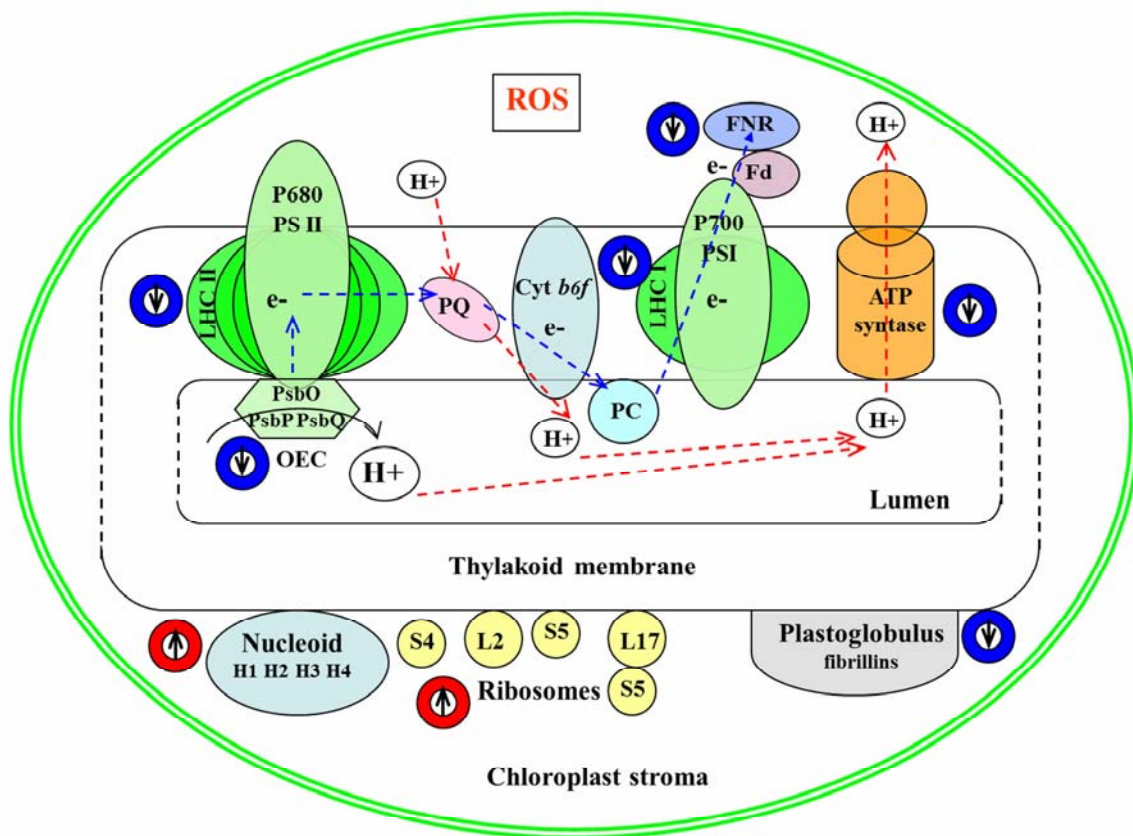
на белтъците. В групата „Метаболизъм“ (12,6%) са обособени белтъци, свързани с различни метаболитни процеси. „Хистоните“ представляват 7.6% от общия брой белтъци. Само няколко белтъка са свързани със „Стрес“ (1.7%) и „Други“ (2.5%). Общо 10.9% от белязаните белтъци не са функционално анотирани или не са идентифицирани (**Фиг. XIV.2**).



Фиг. XIV.2. Идентифицирани белтъци с помощта на ICPL техниката, които са категоризирани въз основа на тяхната функция ([Velikova et al. – Journal of Proteome Research 13:2005-2018, 2014](#)).

Проведеният протеомен анализ показва, че инхибирането на изопреновата емисия в листа на топола променя белтъчния профил в хлоропластите, така че растенията да могат да преодоляват окислителен стрес. Резултат от инхибирането на изопреновата емисия в топола е намаляване на белтъците, свързани със светлинните реакции на фотосинтезата, редокс-регулацията, и защитата срещу окислителен стрес, както и на няколко белтъка със структурна активност, които са свързани с липидния метаболизъм (**Фиг. XIV. 5**). Тези промени обуславят развитието на алтернативни защитни механизми като фотодишане, нефотохимично гасене, които компенсират липсата на изопрен. Получените данни силно подкрепят идеята, че изопренът подобрява структурата на тилакоидната мембрана и модулира генерирането на активни кислородни форми.

Non-isoprene emitting poplar chloroplast



Фиг. XIV. 5. Суборганелна хлоропластна структура на неотделяща изопрен топола. Сините символи със стрелка, сочеща надолу, обозначават пространствените локуси в които белтъците са инхибирани, а червените символи със стрелка, сочеща нагоре, обозначават пространствените локуси в които белтъците са стимулирани (Velikova et al. – *Journal of Proteome Research* 13:2005-2018, 2014).

4.5.В. Инхибирането на изопреновата емисия в топола променя S-нитрозилирането на белтъците (статия XVIII. Vanzo et al. – *Plant Physiology* 170: 1945-1961, 2016)

Установено е, че азотен оксид (NO) се акумулира само в изопрен-инхибирани листа третирани с озон (статия V. Velikova et al. 2005), тези листа отделят по-големи количества азотен оксид (статия VIII. Velikova et al. 2008). Азотният оксид изпълнява сигналната си функция, променяйки директно белтъците посредством посттранслационни модификации (PTM; т.е. S-нитрозилиране, метално нитрозилиране и Tyrosine нитриране). S-нитрозилирането (ковалентно свързване на NO с тиоловата страна на протеин-сус остатъци и образуване на

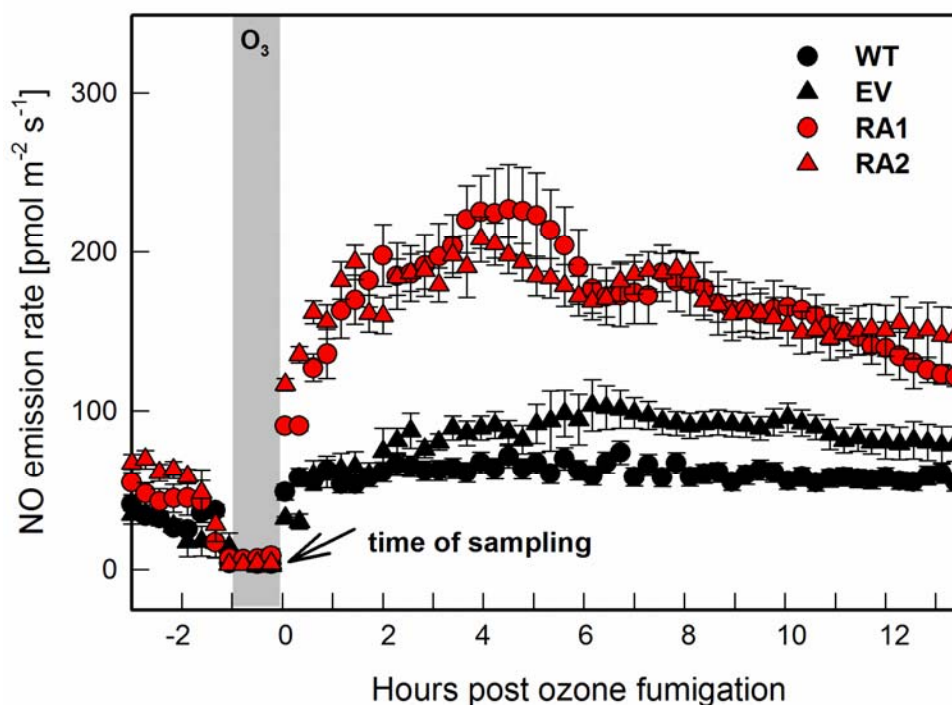
нитрозотиоли) се счита за най-важната РТМ на NO-сигнализацията в растенията (Moreau et al. 2010).

- ***Потискането на изопреновата емисия слабо променя S-нитрозопротеома на растения топола при контролни условия***

Двата генотипа тополи показват малки различия в модела на S-нитрозилирането при контролни условия. Установено е, че пет от дискриминиращите белтъци са повече S-нитрозилирани в неотделящите изопрен растения. Това са Рубиско активаза, α -N-арабинофуранозидаза (ARA), фосфорибулокиназа (PRK), HSP70 и O-ацетилсерин(тиол)лиаза (OAS-TL). За разлика от това, само един белтък (структурен белтък в PSII) е по-слабо S-нитрозилиран в неотделящия в сравнение с отделящия изопрен генотип.

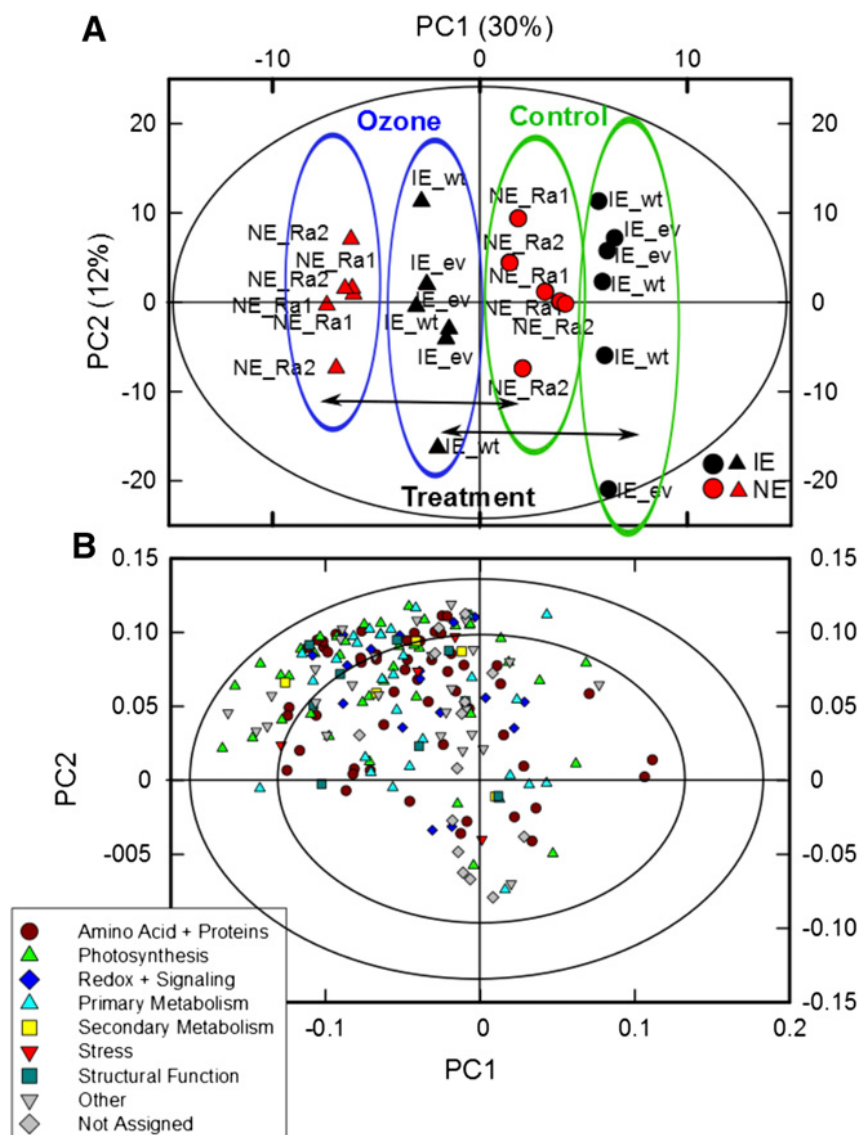
- ***Акутно третиране с озон стимулира NO емисиите и променя S-нитрозопротеома на изопрен-отделящите и неотделящите изопрен тополи***

В контролни условия, емисиите на NO не се различават значително между неотделящите и отделящите изопрен генотипове, въпреки че се наблюдава тенденция към по-висока емисия от генно модифицираните, неотделящи изопрен тополи (Фиг. XVIII.3). След третирането с озон емисиите на NO бързо се индуцират и в двата генотипа, но те са значително по-високи при неотделящите изопрен растения. Фактът, че неотделящите изопрен тополи излъчват значително по-високи нива на NO след третиране с озон в сравнение с изопрен-отделящия генотип, предполага, че изопренът се намесва в сигналния път, активиран от взаимодействията между NO и ROS.



Фиг. XVIII.3. Кинетика на емисията на азотен оксид от **изопрен-отделящи** (черни символи) и **неотделящи изопрен** (червени символи) растения преди и след третиране с озон (Vanzo et al. – *Plant Physiology* 170:1945-1961, 2016).

Независимо от генотиповете топола, озонът предизвиква значителни промени в *S*-нитрозопротеома. Ясно изразените количествени разлики между озонираните неотделящи и отделящи изопрен растения в *S*-нитрозилираните белтъци са показани чрез разделяне по първата и втората главни компоненти (Фиг. XVIII.S1A, съпътстваща информация). Функционалната категоризация на 203 *S*-нитрозилирани белтъци разкрива силно доминиране на белтъците, свързани с фотосинтетичните процеси (21%), следвани от белтъците свързани с процесите на синтез, разграждане и нагъване (19%) и редокс регулация и сигнализация (8%) (Фиг. XVIII.S1B; Таблица XVIII.S2, съпътстваща информация). За яснота на Фиг. XVIII.5 са представени резултатите от OPLS анализа (Orthogonal Partial Least Squares, анализ на ортогоналните частни най-малки квадрати), чрез който са установени дискриминиращите белтъци в профилите на неотделящите и отделящите линии топола. Разделянето между третиранията и генотиповете се основава на 63 дискриминиращи *S*-нитрозилирани белтъци от общо 203 (Таблица XVIII.S4, съпътстваща информация).

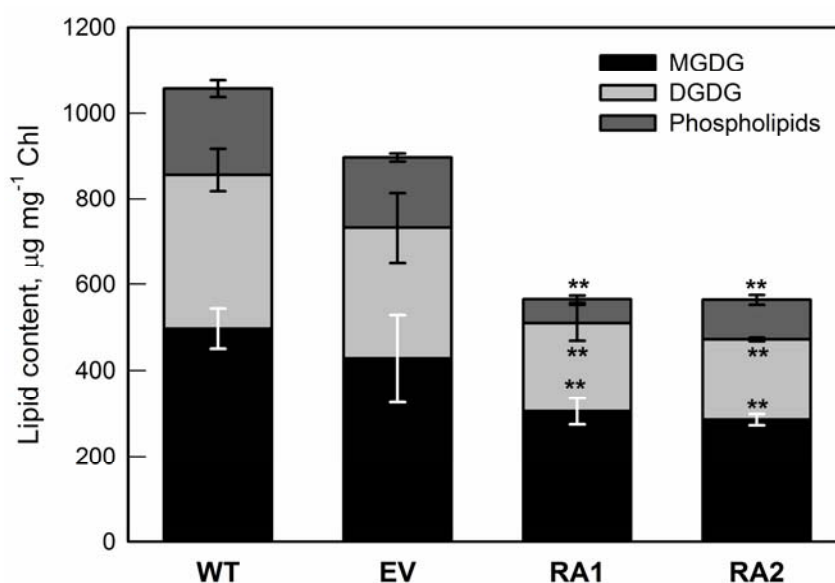


Фиг. XVIII.5. Резултати от OPLS анализа, илюстриращ количеството на *S*-нитрозилираните белтъци при контролни и озонирани изопрен-отделящи (IE; wt и ev) и неотделящи изопрен (NE; Ra1 и Ra2) растения. (A) Растенията са разделени в две групи – озон (триъгълници; $n=12$) и контрола (кръгове; $n=12$); (B) Всяка функционална група белтъци е представена с различен цвят. Външната и вътрешната елипси показват 100% и 75% промяна, съответно. Всяка точка представлява отделно растение в плот A и индивидуален белтък в плот B (Vanzo et al. – *Plant Physiology* 170:1945-1961, 2016).

Данните убедително подкрепят хипотезата (Vickers et al. 2009b), че ненаситените летливи изопреноиди, като изопренът, могат да променят сигналните пътища, като модулират степента и скоростта на генериране на сигналните молекули ROS и NO в клетката, като по този начин вероятно променят физиологичния отговор на растенията при биотичен и абиотичен стрес (Ahlfors et al. 2009; Wang et al. 2013).

4.5.С. Инхибирането на изопреновата емисия променя липидния матрикс на тилакоидните мембрани и оказва въздействие върху ултраструктурата на хлоропластите в топола (статия XVII. Velikova et al. – Plant Physiology 168: 859-870, 2015)

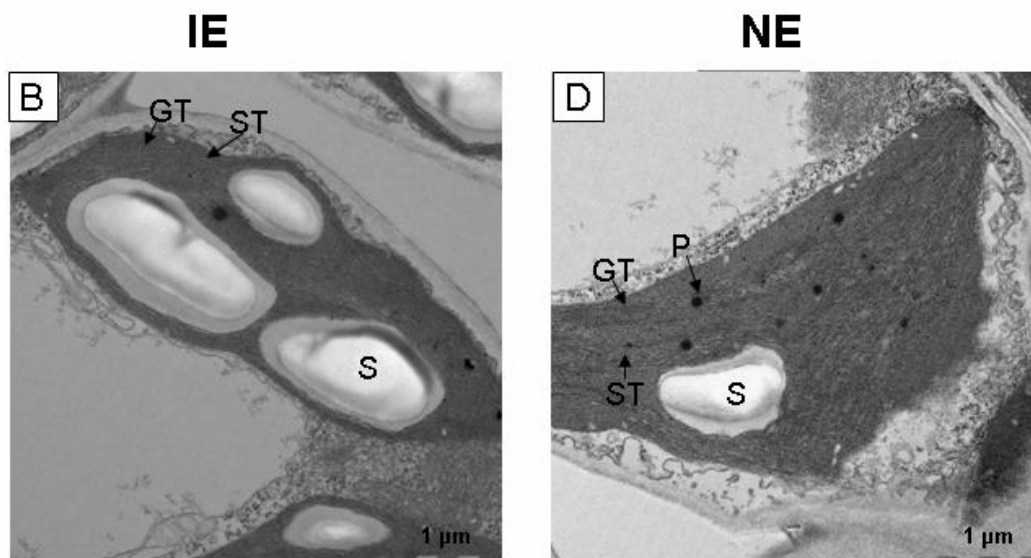
Една от предложените биологични функции на изопрена е стабилизирането на тилакоидните мембранни структури чрез модифициране на липидната среда и организацията на пигмент-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани (статия XII. Velikova et al. 2011). Установено е значително намаляване на абсолютното съдържание на галактолипидите (MGDG и DGDG) и фосфолипидите чрез понижаване на ненаситената мастна киселина 18:3 (линоленова киселина) (Фиг. XVII.1).



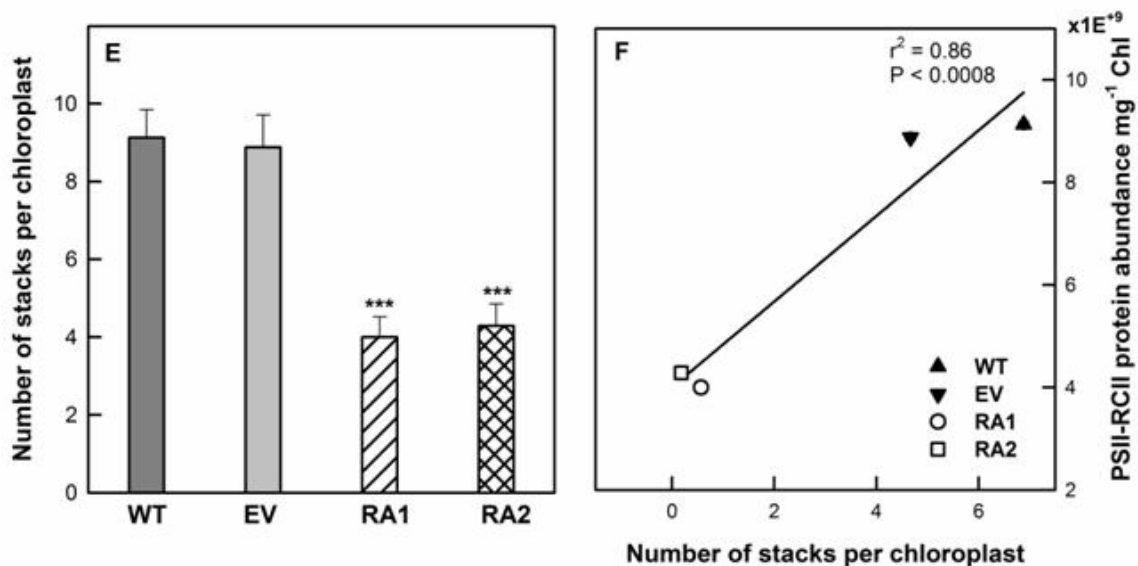
Фиг. XVII.1. Липидно съдържание в изолирани хлоропласти от изопрен-отделящи (WT, EV) и неотделящи изопрен (RA1, RA2) тополи. Със звездички са отбелязани статистически достоверните разлики в сравнение с дивия тип (WT) изопрен-отделящи тополи (Velikova et al. – Plant Physiology 168:859-870, 2015).

Намалените нива на липидите и белтъците (статия XIV. Velikova et al. 2014) обуславят промени в ултраструктурата на хлоропластите на неотделящите изопрен растения, което предполага важната роля на изопрена в структурната организация на пластидните мембрани (Фиг. XVII.3B,D). Действително, хлоропластите на неотделящите изопрен растения се характеризират с по-слабо развита вътрешна мембранна система, с по-къси и по-малко на брой грани, с по-дълги стромални тилакоиди и съдържат по-малки скорбелни зърна в сравнение с изопрен-отделящите растения (Фиг. XVII.3B,D; Фиг. XVII.4E,F). Важен резултат в това изследване е увеличеното съдържание на пластоглобули

в хлоропластите, изолирани от неотделящите изопрен растения в сравнение с изопрен-отделящите (Фиг. XVII.3B,D).

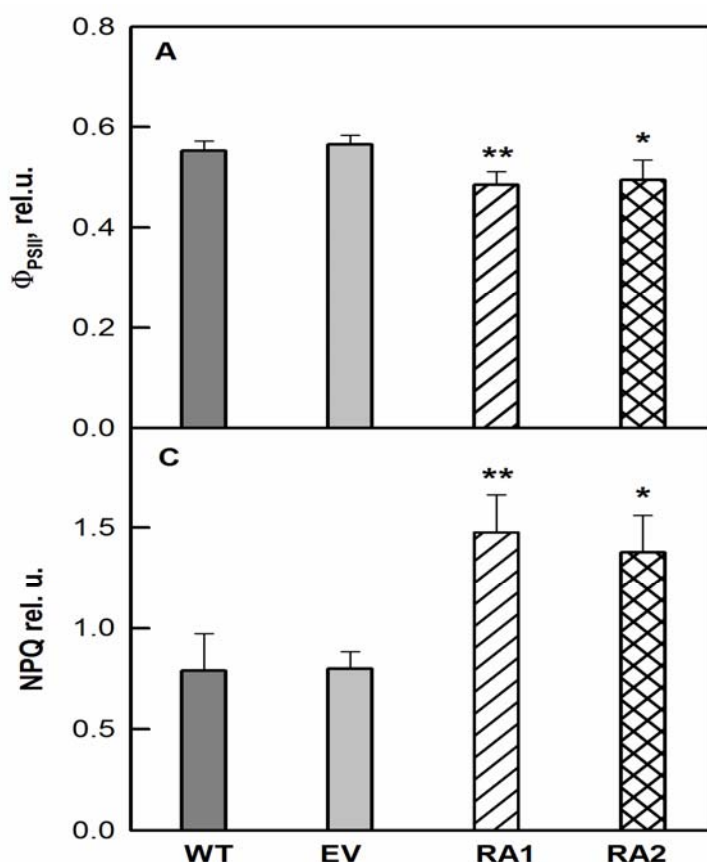


Фиг. XVII.3. Представителни електронно-микроскопски снимки на хлоропласти от изопрен-отделящи (B) и неотделящи изопрен (D) тополи. GT – гранални тилакоиди, P- пластоглобули, ST – строма, S – скорбелни зърна. Бар = 1μm при увеличение 6300X (Velikova et al. – *Plant Physiology* 168:859-870, 2015).



Фиг. XVII.4. (E) Среден брой на гранални тилакоиди, изразени на един хлоропласт в изопрен-отделящи (WT, EV) и неотделящи изопрен (RA1, RA2) тополи. (F) Корелация между количеството на PSII-RCII белтъци и броя на граналните тилакоиди при изопрен-отделящи (WT, EV) и неотделящи изопрен (RA1, RA2) тополи. Със звездички са отбелязани статистически достоверните разлики в сравнение с дивия тип (WT) изопрен-отделящи тополи (Velikova et al. – *Plant Physiology* 168:859-870, 2015).

Ниското съдържание на линоленова киселина (18:3) във всички липидни фракции на изолирани хлоропласти от неотделящи изопрен растения (**Фиг. XVII.S1**, съпътстваща информация) показва, че при липса на изопрен флуидността на тилакоидните мембрани намалява, което от своя страна се отразява негативно върху фотохимичната ефективност на PSII. А именно, неотделящите изопрен растения се характеризират с по-ниска фотохимична активност на PSII (Φ_{PSII}) и по-високо нефотохимично гасене флуоресценцията (NPQ) в сравнение с изопрен-отделящите тополи, което е в съгласие с предишни наши резултати (**Фиг. XVII.6A,C**).



Фиг. XVII.6. Фотохимична ефективност на PSII (A) и нефотохимично гасене (C) в изопрен-отделящи (WT, EV) и неотделящи изопрен (RA1, RA2) тополи. Със звездички са отбелязани статистически достоверните разлики в сравнение с дивия тип (WT) изопрен-отделящи тополи ([Velikova et al. – Plant Physiology 168:859-870, 2015](#)).

За първи път проведеното изследване предоставя директни доказателства за връзката между отделянето на изопрен и нивото на основните липидни класове, техния мастно-киселинен състав и структурната организация на фотосинтетичния апарат в изопрен-

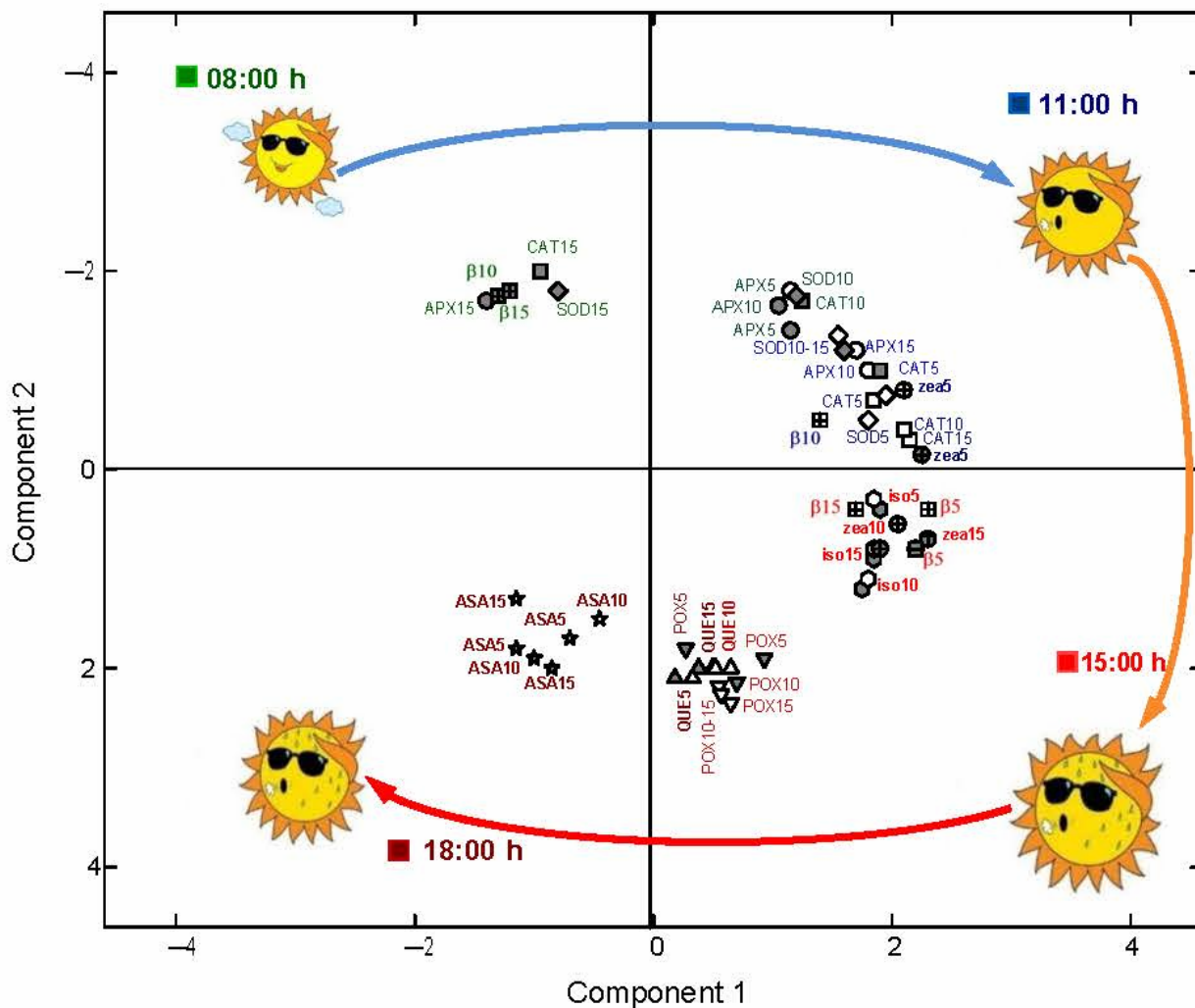
отделящи и неотделящи изопрен генотипове топола. Въз основа на получените до сега резултати (Way et al. 2013; статия XIV. Velikova et al. 2014; Kaling et al. 2015) е направено предположение за ретроградна сигнализация (Pfannschmidt 2010), според която се осъществява обмен на информация между клетъчните органели и ядрото. Прецизните механизми за предаване на информация за промените в хлоропласта към ядрото в неотделящите изопрен растителните клетки са неясни.

4.6. Корелация между действието на изопреноидите и фенилпропаноидите при стрес (статии XVI. Tattini et al. - *New Phytologist* 207: 613-626, 2015, XIX. Velikova et al. - *Plant, Cell and Environment* 39: 2185-2197, 2016, XX. Ahrar et al. - *Journal of Experimental Botany* 68(9): 2439-2451, 2017)

4.6.A. Синхронизирано действие на изопреноидите и фенилпропаноидите в условията на индуцирано засушаване при чинар (*Platanus x acerifolia*) (статия XVI. Tattini et al. - *New Phytologist* 207: 613-626, 2015)

В това изследване е установено, че растението инвестира значително в биосинтезата на изопреноиди и фенилпропаноиди, за да компенсира намаляването на първичните антиоксиданти, когато фотосинтезата е силно инхибирана при засушаването. Предоставени са **нови убедителни доказателства** за това, как ежедневно растенията синхронизират отделните компоненти на тяхната антиоксидантна система, за да предотвратят необратими промени, вследствие на комбинираното действие на високи температура и светлинен интензитет, и засушаване.

Като цяло, антиоксидантните ензими (с изключение на гваякол пероксидазата) реагират най-чувствително на засушаването през сутрешните часове (8: 00–11: 00 ч.; горните панели на **Фиг. XVI.10**), докато летливите и нелетливи изопреноиди (изопрен и зеаксантин) реагират по-чувствително на засушаването рано следобед (15:00 ч.). Изопренът, чиято биосинтеза е силно температурно зависима (Loreto & Sharkey 1990), може да допълва антиоксидантните функции на зеаксантина, а именно да подобри термостабилността на тилакоидните мембрани (Peñuelas et al. 2005; статия XII. Velikova et al. 2011), особено когато намаляването на интензитета на светлината е съчетано с повишаваща се температура на въздуха, ситуация, която се наблюдава в ранния следобед. След изчерпването на антиоксидантната ензимна активност, в късния следобед се засилва значението на „вторична“ H_2O_2 -детоксикираща система, състояща се от кверцетин 3-*O*-гликозиди, гваякол пероксидаза и аскорбат, което е особено ясно изразено при силно засушените листа.



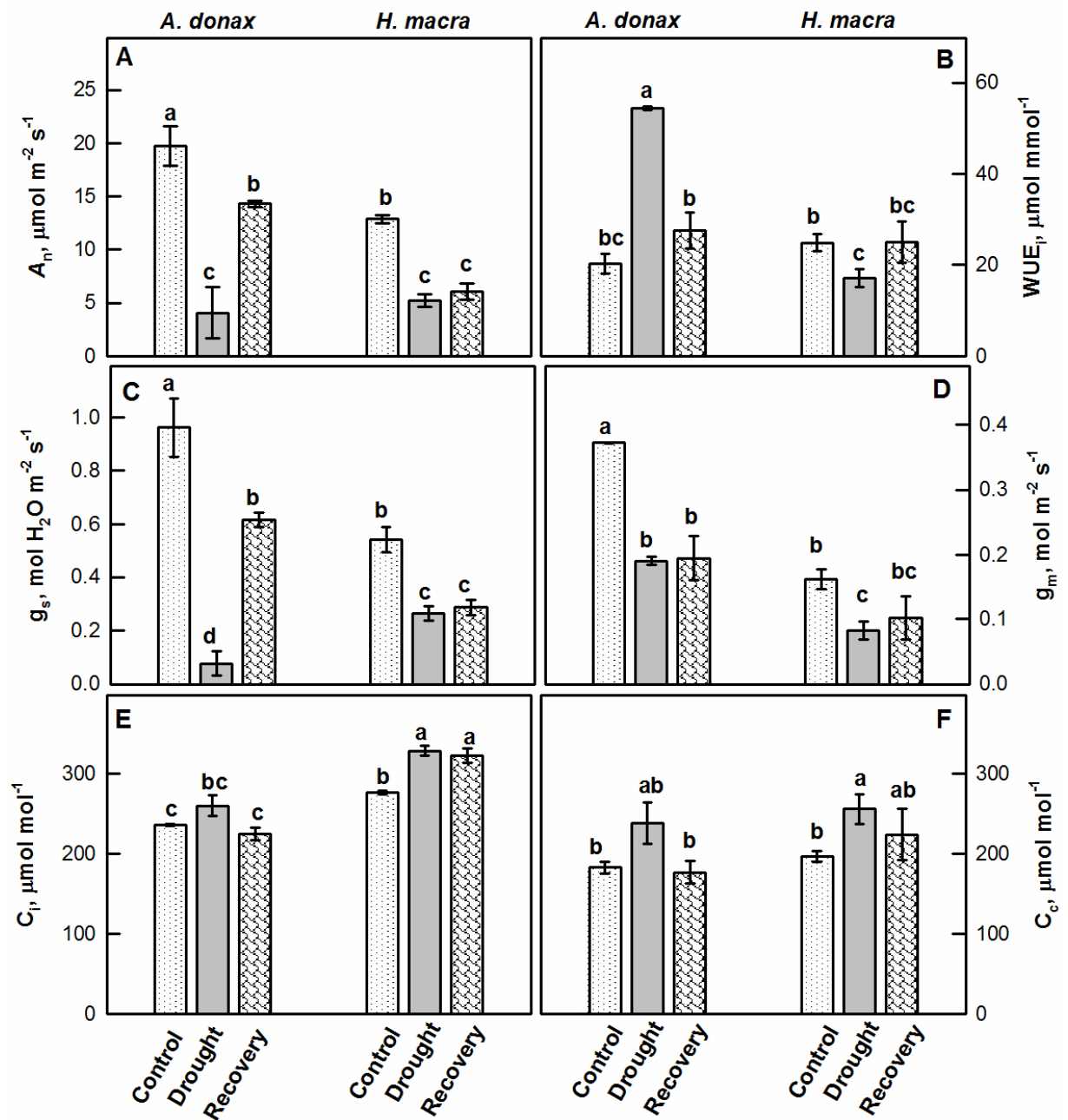
Фиг. XVI.10. Схема, описваща синхронизираното действие на отделни компоненти на антиоксидантната защита на оптимално оводнени (кухи символи) и засушени (плътни символи) растения *Platanus x acerifolia*, изпитващи комбинираното въздействие на високите светлина и въздушна температура. Схемата е изготвена въз основа на резултатите от анализа на главните компоненти (PCA). *APX*, аскорбат пероксидаза; *ASA*, аскорбат; β , β -каротин; *CAT*, каталаза; *iso*, изопрен; *POX*, гваякол пероксидаза; *QUE*, производни на кверцетин; *SOD*, супероксид дисмутаза; *zea*, зеаксантин (Tattini et al. – *New Phytologist* 207:613-626, 2015).

4.6.В. Физиологично значение на изопреноидите и фенилпропаноидите при видове от под-семејство *Arundinoideae* с различен метаболизъм в условия на засушаване (статия XIX. Velikova et al. - *Plant, Cell and Environment* 39: 2185-2197, 2016)

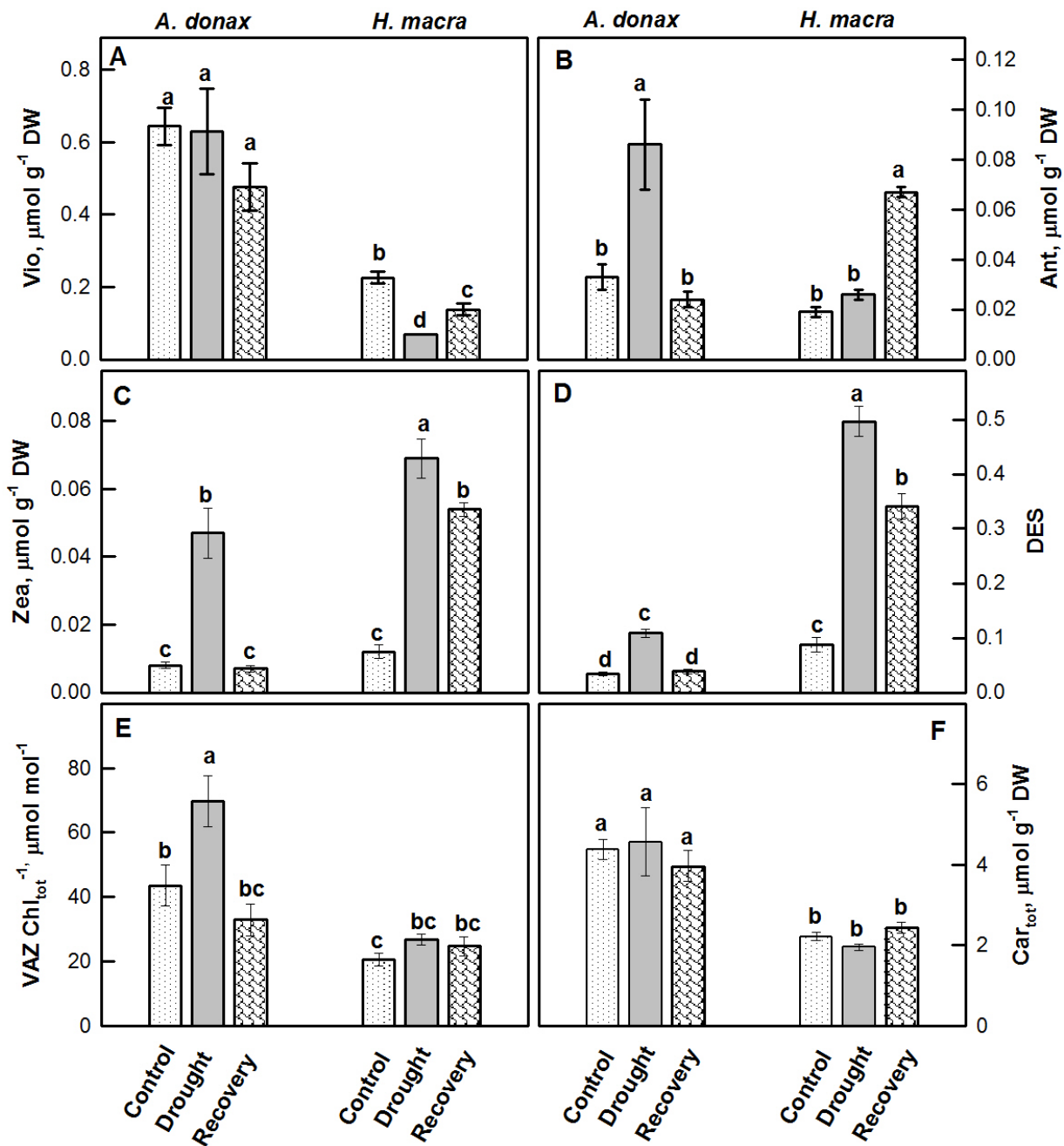
Физиологичната роля на изопреноидите и фенилпропаноидите е изследвана във видове от подсемејство *Arundinoideae*, с контрастен

капацитет да отделят изопрен – *Arundo donax* (силен емитер на изопрен) и *Hakonechloa macra* (неотделящ изопрен) (Ahrar et al. 2015). Хипотезата е, че *A. donax* и *H. macra* реагират на засушаване, активирайки алтернативна мрежа от антиоксиданти, като изопреноидите допринасят за по-добрата сухоустойчивост при *A. donax*, и фенилпропаноидите допринасят за антиоксидантната защита при *H. macra*.

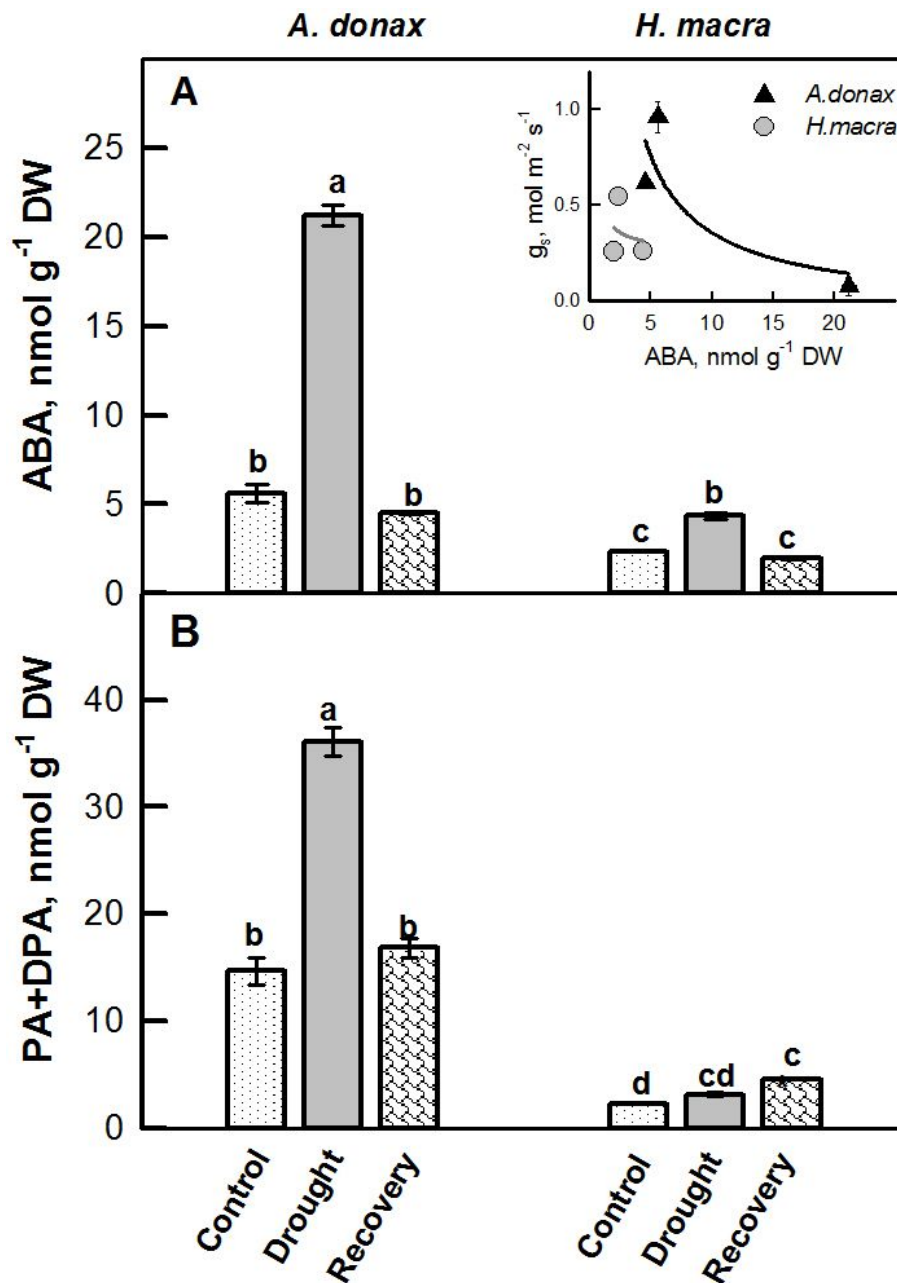
Проведеното изследване предоставя функционални (Фиг. XIX.1) и метаболитни (Фиг. XIX.4; Фиг. XIX.5; Фиг. XIX.6) доказателства за устойчивостта на *A. donax* към засушаване и по-добра пластичност в сравнение с *H. macra*. Демонстрирано е, че *A. donax* (1) е в състояние ефективно да ограничи загубата на вода чрез координирано намаляване на мезофилната (g_m) и устичната (g_s) проводимост, като по този начин постига значително по-добра ефективност на използване на водата (WUE) при стрес; (2) притежава антиоксидантна система, която защитава структурата и фото- и биохимичната активност на фотосинтетичния апарат; и (3) се възстановява от приложени стрес, достигайки по-бързо фотосинтетични и структурни характеристики, близки до тези на добре оводнените растения.



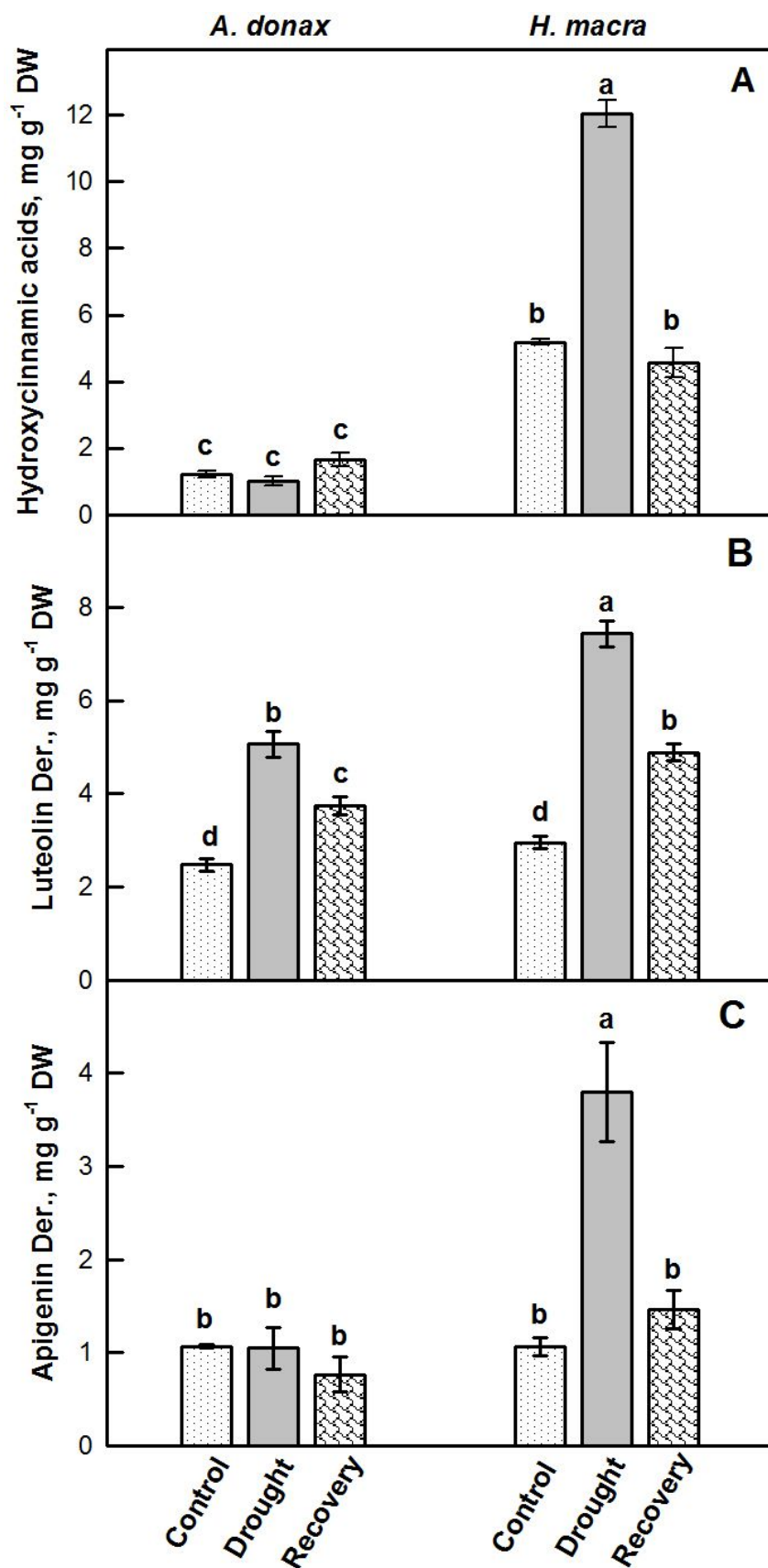
Фиг. XIX.1. Промени в скоростта на фотосинтезатата (A_n , a), ефективността на използване на водата ($iWUE$, b), устичната (g_s , c) и мезофилната (g_m , d) проводимост, и междуклетъчната (C_i , e) и хлоропластната (C_c , f) концентрация на CO_2 в контролни, засушени и рехидратирани растения *Arundo donax* и *Hackonechloa macra* (Velikova et al. – Plant, Cell and Environment 39:2185-2197, 2016).



Фиг. XIX.4. Промени в концентрацията на виолаксантина (Vio, a), антераксантина (Ant, b), зеаксантина (Zea, c), състоянието на деепоксидация (DES, d), отношението на ксантофиловите пигменти към хлорофилното съдържание (VAZ Chl⁻¹, e), и общото съдържание на каротеноиди (Car_{tot}, f) в контролни, засушени и рехидратирани растения *Arundo donax* и *Hackonechloa macra* (Velikova et al. – Plant, Cell and Environment 39:2185-2197, 2016).



Фиг. XIX.5. Промени в съдържанието на абсцисиевата киселина (ABA, a) и общото съдържание на фазеева и хидрофазеева киселини (PA-DPA, b) в контролни, засушени и рехидратирани растения *Arundo donax* и *Hackonechloa macra* (Velikova et al. – *Plant, Cell and Environment* 39:2185-2197, 2016).



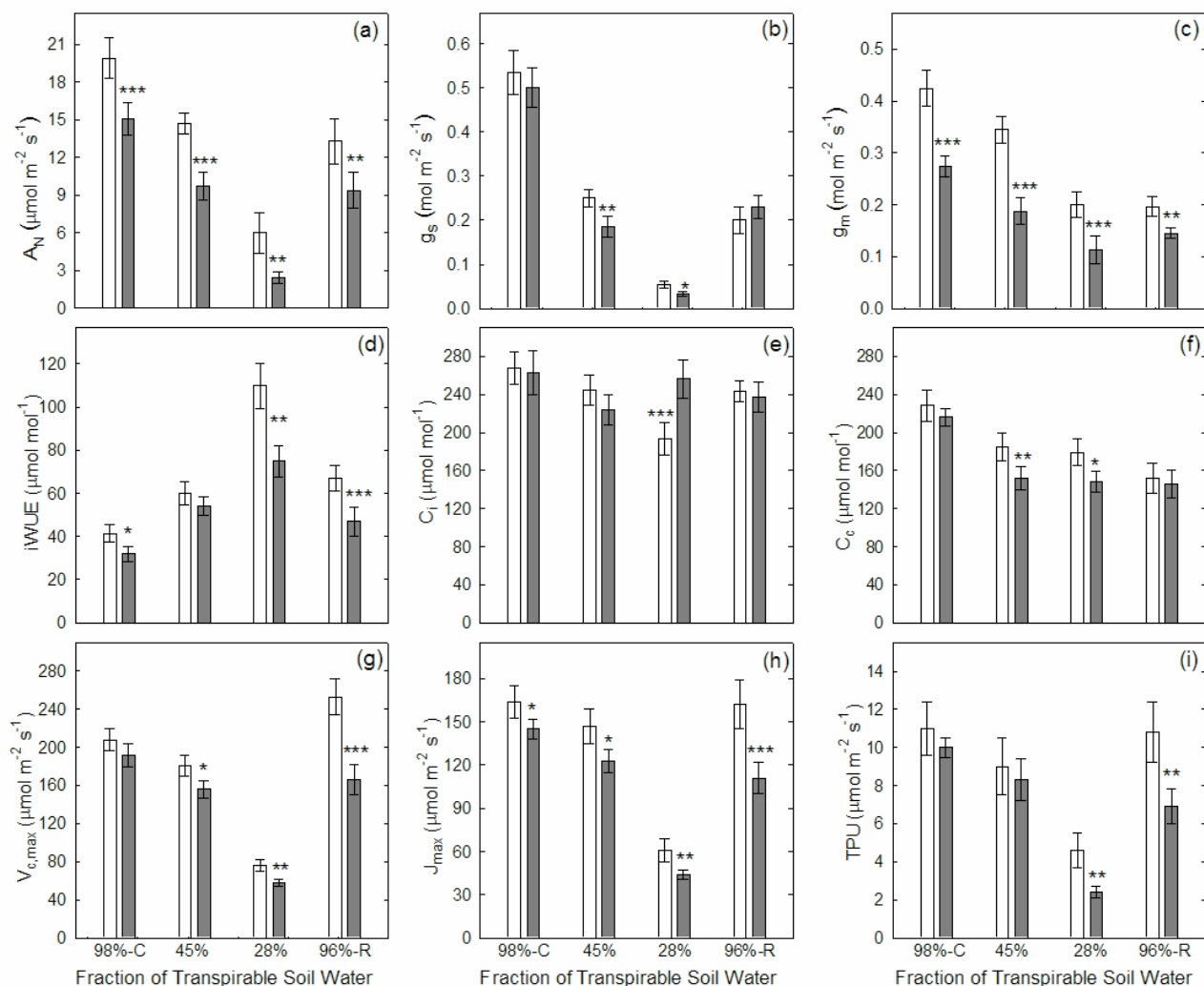
Фиг. XIX.6. Промени в хидроксиканелените киселини (a), и производни на лутеолин (b) и апигенин (c) в контролни, засушени и рехидратирани растения *Arundo donax* и *Hackonechloa macra* (Velikova et al. – Plant, Cell and Environment 39:2185-2197, 2016).

Получените резултати демонстрират, че (1) изопрен-отделящият вид има по-активен МЕР биосинтетичен път и по-добър капацитет за активиране на цялостния метаболитен път в отговор на стрес; и (2) видове, които не отделят изопрен и количеството на метаболити, синтезирани посредством МЕР път е по-ниско, произвеждат по-високи нива на деепоксидирани ксантофили, които вероятно защитават растенията, когато фотосинтезата е инхибирана при стрес, но допълнително намаляват наличния субстрат за синтез на абсцисиевата киселина (Lichtenthaler 2007). От друга страна, растенията, инвестиращи във фенолпропаноиди (*H. macra*), не са в състояние да избегнат увреждане на фотосинтетичния апарат, но са в състояние да се справят с продължително излагане на стрес.

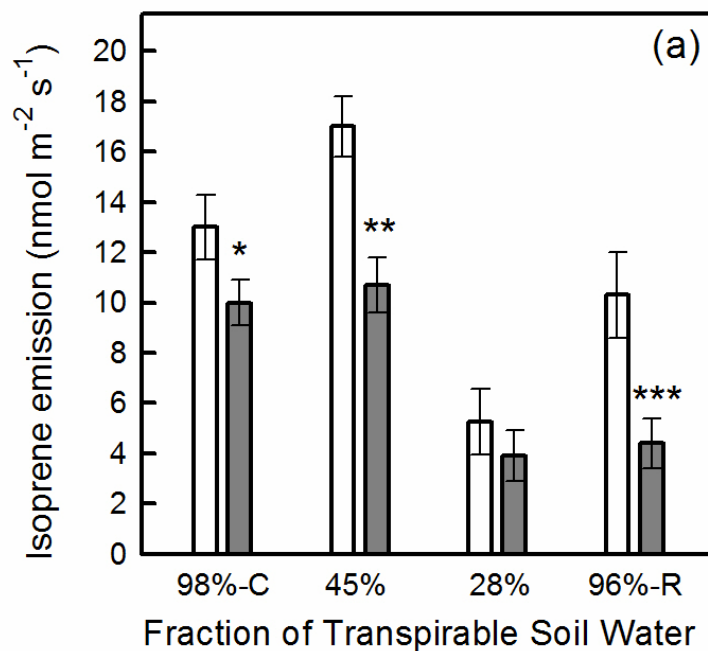
4.6.C. Фенотипните разлики определят екотипните отговори към засушаване на *Arundo donax* (статия XX. Ahrar et al. - Journal of Experimental Botany 68(9): 2439-2451, 2017)

С цел задълбочаване на познанията относно взаимно допълващите се действия на летливите и нелетливите изопреноиди и фенолпропаноидите при стрес, са изследвани отговорите към засушаване на два екотипа *Arundo donax*, които са адаптирани към контрастни условия на околната среда. **Хипотезата** е, че българският (BG) екотип, с произход от райони с по-малки количества годишни валежи, проявява по-голяма устойчивост към засушаване от италианския (IT) екотип и че това е свързано с фенотипни промени.

В условия на оптимално водоснабдяване българският екотип се характеризира с по-високи фотосинтеза, мезофилна проводимост, ефективност на използване на водата, фотохимична ефективност на PSII, изопренова емисия и каротеноиди (Фиг. XX.1; Фиг. XX.3а; Фиг. XX.4), докато при италианския екотип съдържанието на хидроксиканелените киселини е по-високо (Фиг. XX.5).



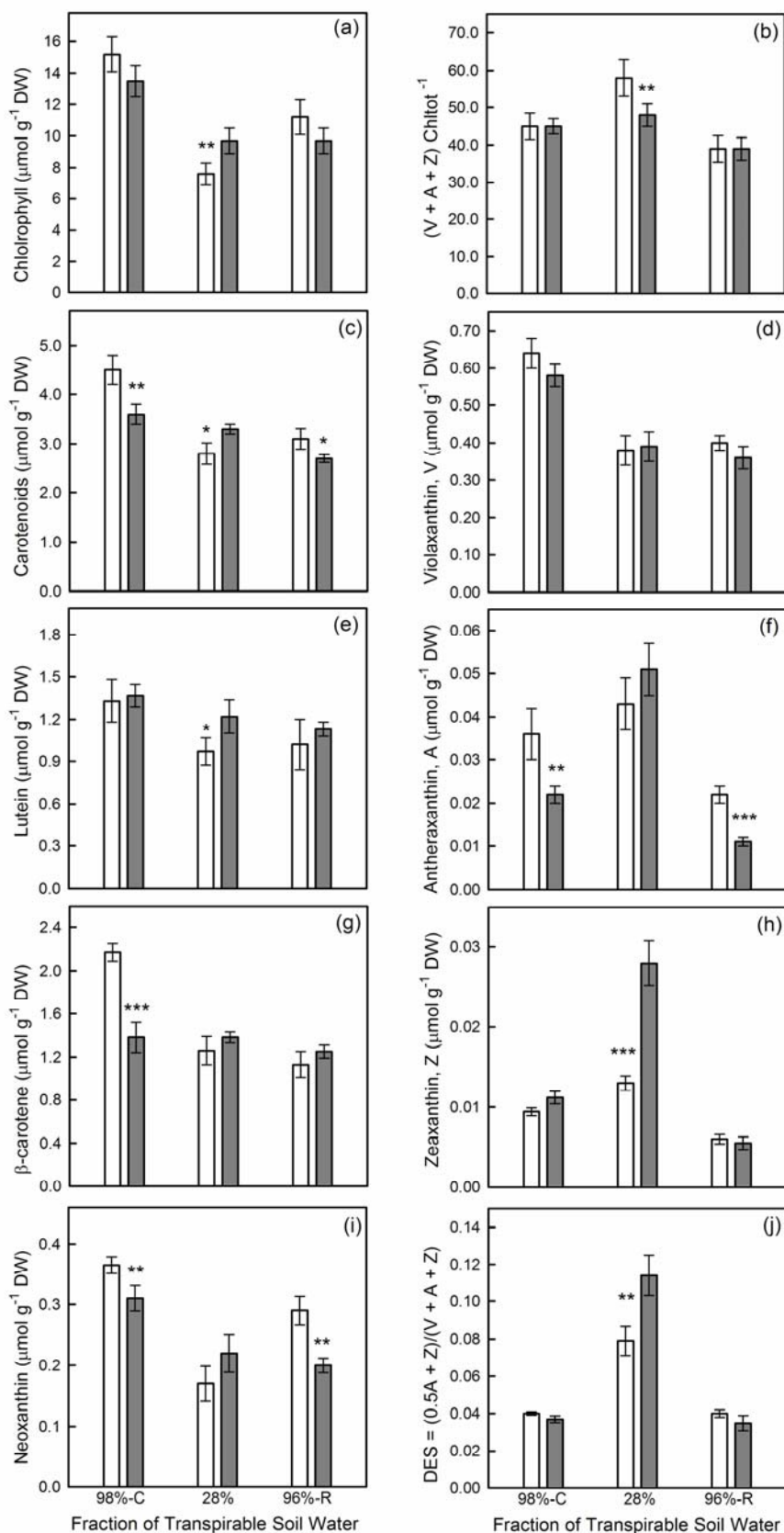
Фиг. XX.1. Промени във фотосинтезата (A_N , a), устичната (g_s , b) и мезофилната (g_m , c) проводимост, ефективността на използване на водата ($iWUE$, d), междуклетъчната (C_i , e) и хлоропластната (C_c , f) концентрация на CO_2 , максималната скорост на карбоксилиране ($V_{c,max}$, g), максималната скорост на фотосинтетичния електронен транспорт (J_{max} , h) и лимитирането на фотосинтезата от триозофосфатите (TPU, i) в български (бели колонки) и италиански (сиви колонки) екотипове на *Arundo donax* преди засушаване (FTSW=98%-C), по време на засушаване (FTSW=45 и 28%), и след рехидратиране (FTSW=96%-R) (Ahrar et al. – [Journal of Experimental Botany 68:2439-2451, 2017](#)).



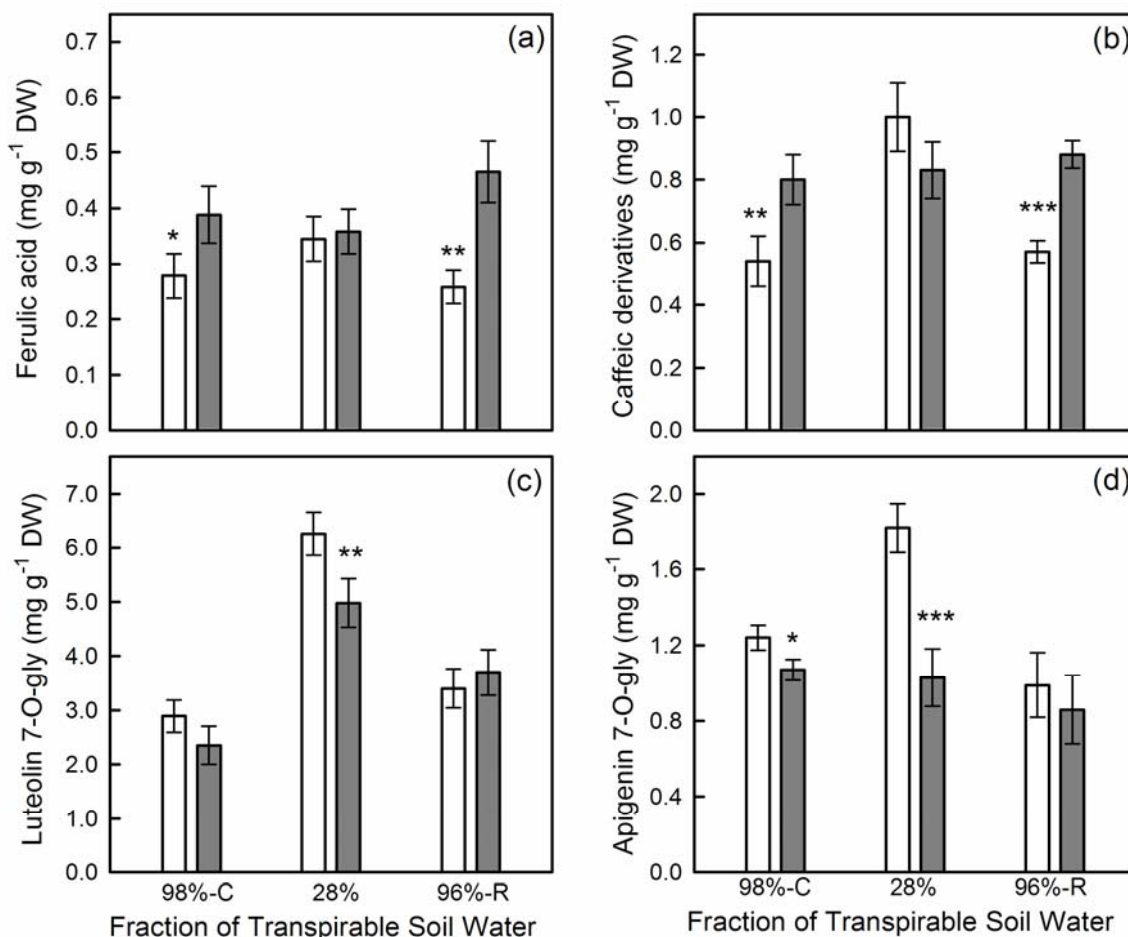
Фиг. XX.3а. Промени в скоростта на изопреновата емисия в български (бели колонки) и италиански (сиви колонки) екотипове на *Arundo donax* преди засушаване (FTSW=98%-C), по време на засушаване (FTSW=45 и 28%), и след рехидратиране (FTSW=96%-R) (Ahrar et al. – *Journal of Experimental Botany* 68:2439-2451, 2017).

Инхибирането на фотосинтезата при засушаване се дължи предимно на дифузионни ограничения при постъпването на CO₂, докато при италианския екотип и биохимични фактори са причина за намалената фотосинтеза.

Възстановяването на фотосинтезата е по-бързо и по-добро в българския екотип, в сравнение с италианския, което се свързва с по-добрата стабилност на фотосинтетичния апарат вследствие на индуцирането на летливи и нелетливи изопреноиди и фенилпропаноиди.



Фиг. XX. 4. Промени в количеството на общ хлорофил (a), пигментите от ксантофиловия цикъл (b), каротеноидите (c), виолаксантин (d), лутеин (e), антераксантин (f), β -каротин (g), зеаксантин (h), неоксантин (i), и депоксидираното състояние на ксантофиловите пигменти (j) в български (бели колонки) и италиански (сиви колонки) екотипове на *Arundo donax* преди засушаване (FTSW=98%-C), в края на периода на засушаване (FTSW=28%), и след рехидратиране (FTSW=96%-R) (Ahrar et al. – *Journal of Experimental Botany* 68:2439-2451, 2017).



Фиг. XX.5. Промени в концентрацията на хидроксиканелените киселини (a,b) производните на лутеолин (c) и апигенин (d) в български (бели колонки) и италиански (сиви колонки) екотипове на *Arundo donax* преди засушаване (FTSW=98%-C), в края на периода на засушаване (FTSW=28%), и след рехидратиране (FTSW=96%-R) (Ahrar et al. – *Journal of Experimental Botany* 68:2439-2451, 2017).

Резултатите от изследването за проявата и значението на различна фенотипна пластичност могат да се използват при подбор на растителни видове, които да се отглеждат в среда с неблагоприятни климатични условия.

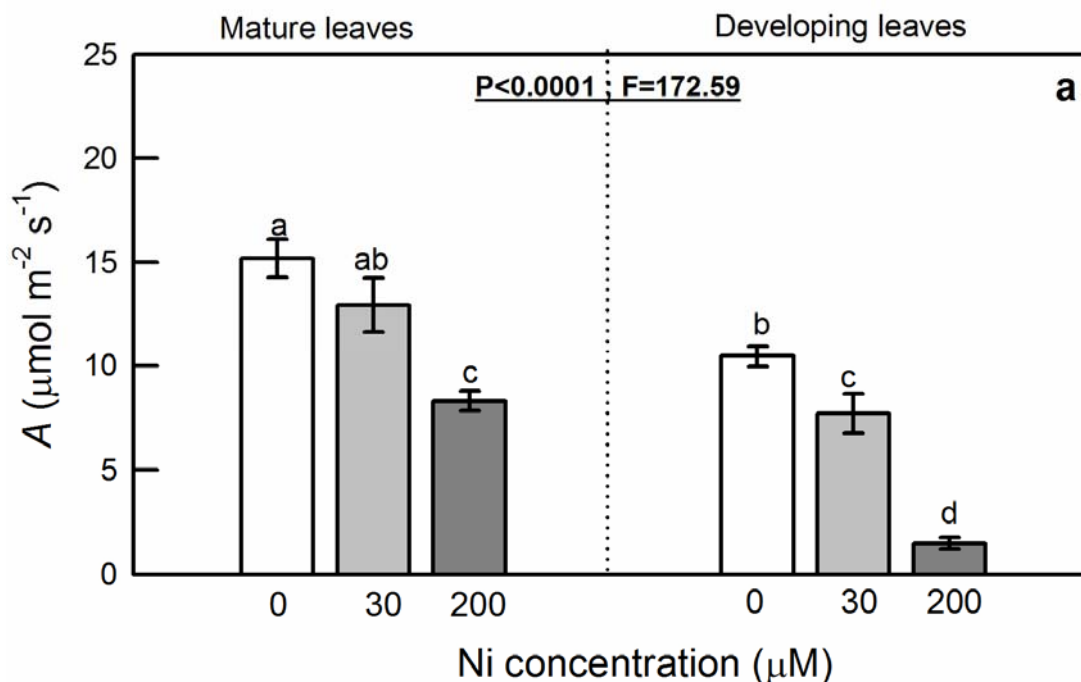
4.7. Ефект на антропогенно замърсяване на околната среда върху емисията на изопрен

4.7.A. Влияние на никел върху фотосинтезата, мезофилната проводимост и изопреноидните емисии в *Populus nigra* (статия XI. Velikova et al. – *Environmental Pollution* 159:1058-1066, 2011)

Замърсяването на почвите и водите с тежки метали е проблем, чиято важност все повече нараства. Повечето тежки метали са достъпни в различна степен за живите клетки, а също така могат да бъдат и важни

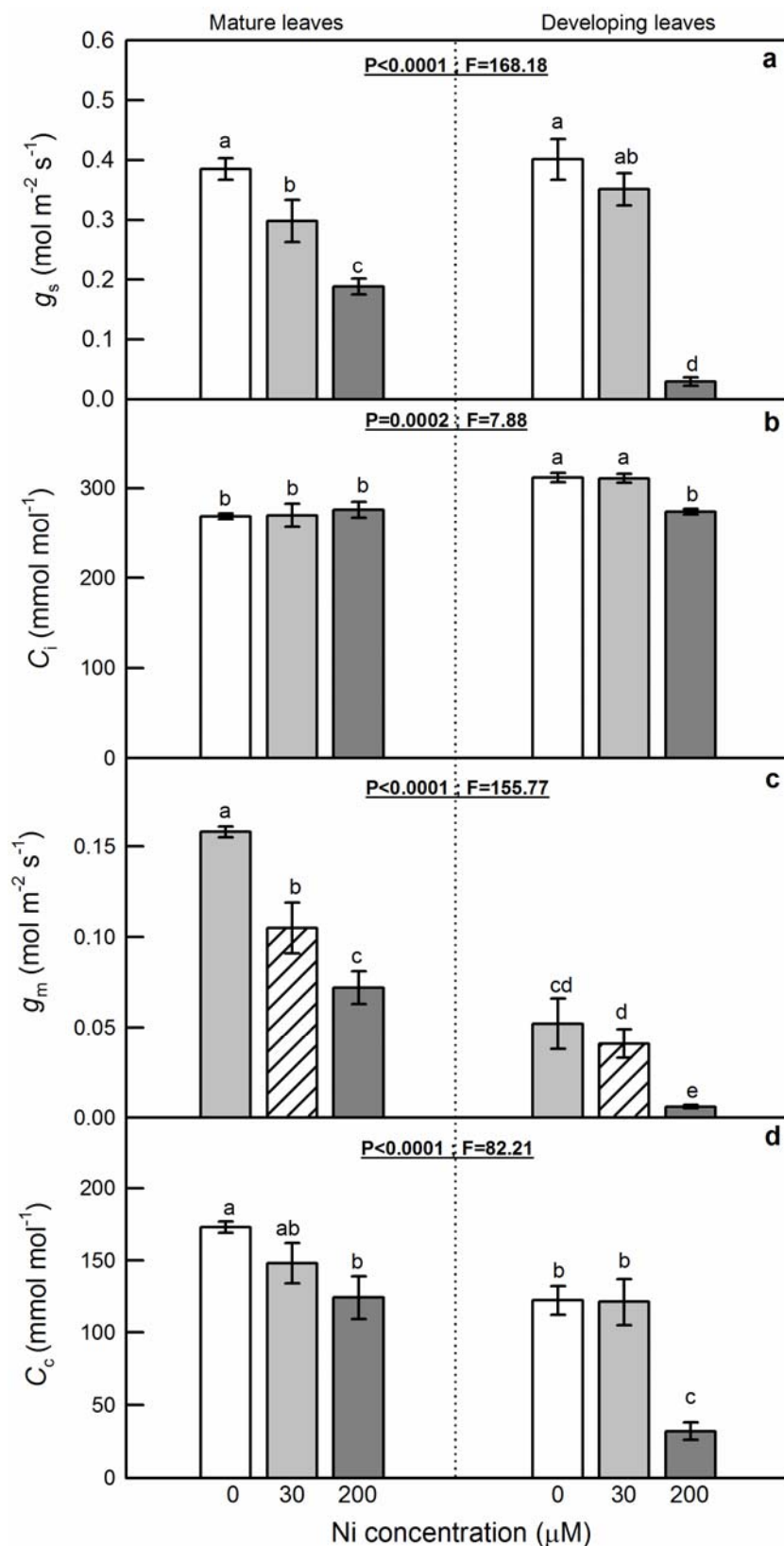
за функционирането на организмите, а от там и на екосистемите (Weast 1984). Никелът, който е 24-ят елемент по разпространение в земната кора, е хранителен микроелемент, който се съдържа в повечето естествени почви в много ниски концентрации (Bai et al. 2006). В природата естествено повишени концентрации на Ni са измерени в почви, образувани от серпентинни минерали (т. нар. ultramafic soils) (Kopittke et al. 2007). Проучванията показват, че излишъкът на Ni инхибира фотосинтезата (Clijsters & Van Assche 1985; Seregin & Kozhevnikova 2006; Ahmed & Häder 2010) и това е свързано с вредните ефекти на Ni върху устичната проводимост и ензимния капацитет на фотосинтетичния апарат (Bertrand & Poirier 2005; Seregin & Kozhevnikova 2006). Известно е, че освен от устичната лимитация, фотосинтезата може да бъде ограничена и от мезофилната проводимост (Loreto et al. 1992; Evans et al. 2009). В достъпната литература е описан само ефектът на цинк върху мезофилната проводимост за CO₂ (g_m) (Sagardoy et al. 2010) и нашата първа цел беше да се изследва ефекта на излишъка от Ni върху мезофилната проводимост и връзката с фотосинтетичния капацитет. Изучаването на въздействието на стресови фактори с антропогенен произход е от съществено значение за създаването на модели с правилна и точна прогноза за количеството и качеството на биогенните емисии в условията на стрес. Необходимостта от такива изследвания определи и втората цел на нашето изследване, а именно да се установят промените в изопреноидните емисии във фиданки на *Populus nigra*, подложени на излишък от Ni. Нашата хипотеза е, че излагането на Ni във високи дози повлиява дифузионните лимитации на фотосинтезата, както и конститутивните и индуцираните изопреноидни емисии.

В нашето изследване ние се съсредоточихме върху отговора на зрелите и развиващите се листа по време на третирането с Ni, тъй като е известно, че листата на тополата отделят изопрен с различна скорост в зависимост от етапа на развитието си (Centritto et al. 2004). Акумулирането на никел в листата (статия XI. Velikova et al. 2011) значително инхибира фотосинтезата (Фиг. XI.3). Вътреклетъчната [CO₂] слабо намалява (тя е по-ниска само при развиващите се листа третирани с 200 μM Ni), което показва, че устичната проводимост има минимална роля при лимитирането на фотосинтезата (Фиг. XI.4a,b). Значителното намаляване на мезофилната проводимост вследствие на третирането с Ni, свързано със силното намаляване на [CO₂] в хлоропластите, особено в развиващите се листа, е основна причина за лимитирането на фотосинтезата (Фиг. XI.4c,d).

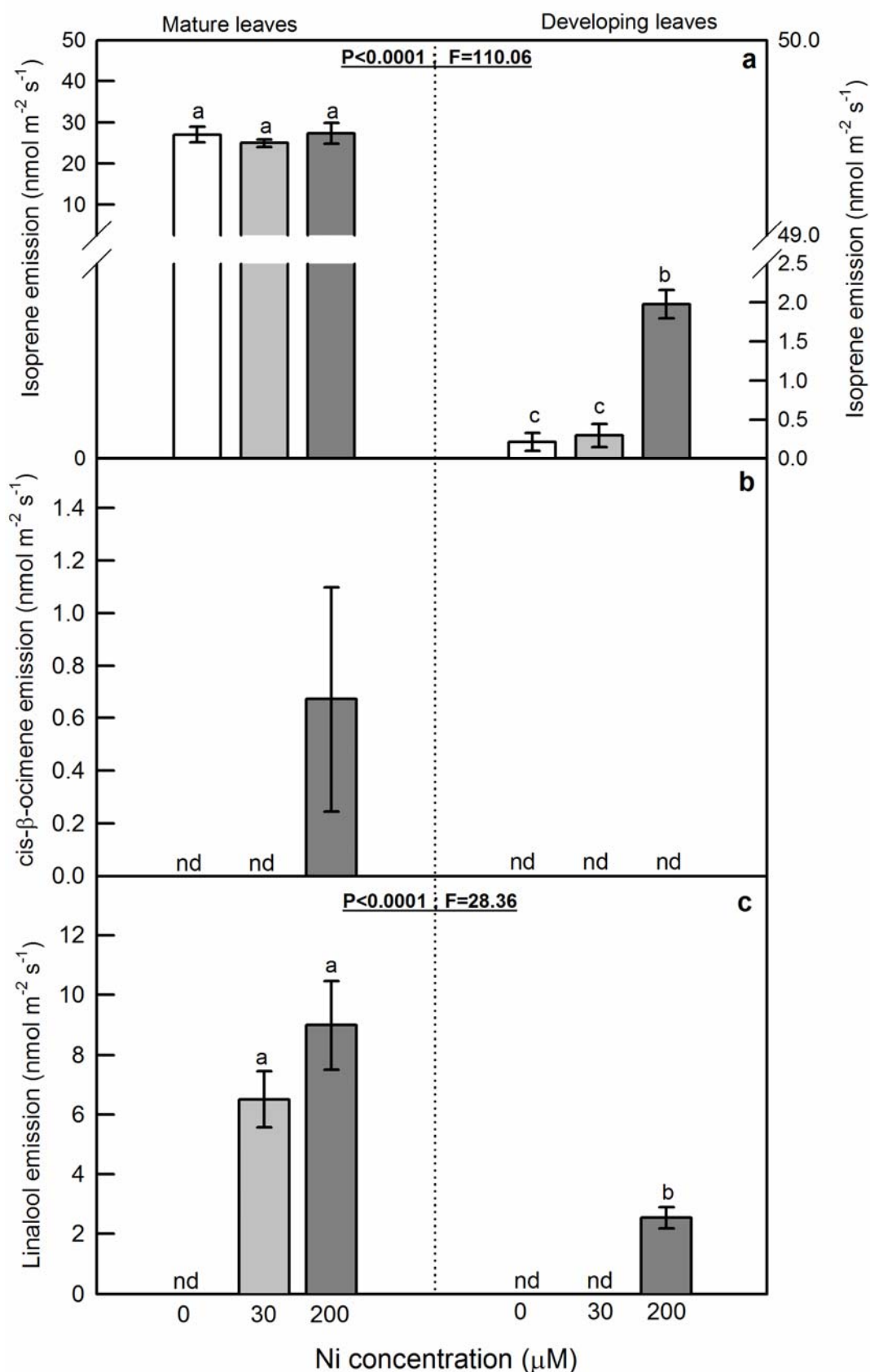


Фиг. XI.3. Промени в скоростта на фотосинтезата, регистрирани в листа на топола след третиране с различни концентрации на никел в продължение на 14 дни. 0 µM (бели), 30 µM (светло сиви) и 200 µM (тъмно сиви) (Velikova et al. – *Environmental Pollution*159:1058-1066).

Третирането с Ni не повлиява отделянето на изопрен от зрелите листа, докато то значително нараства при развиващите се листа (**Фиг. XI.6a**). Това стимулиране на изопреновата емисия не е свързано с висока фотосинтеза, подвърждавайки че стресовите въздействия могат да увеличат дела на фиксирания в процеса фотосинтеза въглерод, използван за биосинтезата на изопрен, или да стимулират обмяната на алтернативни източници на въглерод (Fares et al. 2006; Brillì et al. 2007). Нашите резултати показват, че Ni индуцира отделянето на различни изопреноиди. Установено е индуциране на цис-β-осцимен в зрелите листа и на линалол в двата типа листа в резултат на третирането с Ni (**Фиг. XI.6b,c**). При контролни условия не са измерени други изопреноидни емисии, освен изопрен, от двата типа листа.



Фиг. XI.4. Промени в устичната проводимост (g_s , a), междуклетъчната концентрация на CO_2 (C_i , b), мезофилната проводимост (g_m , c) и концентрацията на CO_2 в хлоропластите (C_c , d), в резултат на третиране на топола с различни концентрации на никел в продължение на 14 дни. 0 μM (бели), 30 μM (светло сиви) и 200 μM (тъмно сиви) (Velikova et al. – [Environmental Pollution 159:1058-1066](#)).



Фиг. XI.6. Промени в емисиите на изопрен (а), цис-β-осцимен (b) и линалол (c) в резултат на третиране на топола с различни концентрации на никел в продължение на 14 дни. 0 μM (бели), 30 μM (светло сиви) и 200 μM (тъмно сиви) (Velikova et al. – *Environmental Pollution*159:1058-1066).

В заключение, установено е, че листа от топола на различни етапи от онтогенетичното си развитие реагират по различен начин на третирането с Ni по отношение на мезофилната дифузионна лимитация на фотосинтезата и емисията на конститутивни и индуцирани изопреноиди. Зрелите листа са по-слабо увредени от Ni в сравнение с развиващите се, което вероятно се дължи както на по-малкото количество на Ni, акумулирано в тези листа, така и на техния по-висок капацитет да отделят изопрен и индуцирани изопреноиди. За първи път е показано, че конститутивната изопренова емисия и индуцираните (цис- β -осцимен и линалол) изопреноидни емисии са повлияни от стресово въздействие с Ni. Тези резултати са важни при изготвянето на модели, прогнозиращи емисиите на конститутивни и индуцирани изопреноиди в условията на стрес.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изопренът е най-широко разпространения биогенен летлив въглеводород, който се отделя от много растения и който играе важна роля в атмосферната химия и качеството на въздуха. В растенията, изопреновата емисия е свързана със значителен разход на енергетични метаболити и въглерод, което предполага че той играе важна роля в защитата на растенията срещу различни неблагоприятни фактори на околната среда.

Чрез прилагането на разнообразни подходи на изследване (проведени са изследвания на физиологично, биофизично, биохимично и структурно ниво), дисертационният труд предоставя доказателства за способността на ендегенния изопрен да повишава устойчивостта на растенията към окислителен стрес, причинен от озон, синглетен кислород, висока температура, засушаване, антропогенно замърсяване с тежки метали (Ni). Защитната роля на изопрена се свързва със способността на тази молекула да влияе върху организацията на тилакоидните мембрани и да намалява образуването на реактивни кислородни и азотни форми, допринасяйки за повишената термотолерантност и устойчивост на растенията към абиотичен стрес. Като част от защитната система на растенията, изопренът играе допълнителна „антиоксидантна“ роля заедно с други летливи и нелетливи изопреноиди и фенилпропаноиди, осигурявайки по-добра защита при стресови условия.

Предоставена е нова информация, че биогенният изопрен допринася за по-високата устойчивост на растенията към неблагоприятни фактори на средата и неговият ефект се проявява на различни нива. Експерименталните резултати ясно показват, че в присъствието на изопрен фотосинтетичната активност на растенията е по-слабо

нарушена при различни стресови въздействия, за разлика от растенията с инхибирана изопренова емисия. (статии I, II, IV, V, VI, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVII, XVIII, XIX, XX)

Изопренът подобрява термостабилността на тилакоидните мембрани (статия XII), като влияе върху липидния им състав (статия XVII). Предоставени са директни доказателства за връзката между отделянето на изопрен и нивото на основните липидни класове и техния мастнокиселинен състав, както и за структурната организация на фотосинтетичния апарат в изопрен-отделящи и изопрен-неотделящи генотипове топола (статия XVII). Инхибираната изопренова биосинтеза се свързва с по-ниското количество на галактолипиди, фосфолипиди и линоленова мастна киселина (18:3) и с променената хлоропластна ултраструктура. Установени са и значителни изменения в хлоропластния протеом (статия XIV).

Тези резултати подкрепят първата хипотеза, че изопренът има съществено значение за повишената толерантност на растенията, оказвайки ефект на функционално, протемно, метаболитно и структурно ниво.

Ендогенният изопрен е важен компонент от защитната система на растенията, регулирайки нивото на активните кислородни и азотни форми (статии V, VIII, XIII), чрез контрол на нивата на S-нитрозилиране на ензими метаболизиращи реактивните форми (статия XVIII). Тези резултати подкрепят втората хипотеза, че изопренът модулира отговора на растенията към стрес индиректно посредством регулираното генериране на активни кислородни и азотни форми (статия XIII).

Представени са експериментални доказателства, подкрепящи третата хипотеза, че биогенният изопрен е част от антиоксидантната система на растенията и действа синхронизирано с други защитни метаболити, осигурявайки по-добра защита на растенията при стрес (статии XIX, XX).

6. ПРИНОСИ:

- За първи път е демонстрирано, че ендогенният изопрен има важна защитна роля при *Phragmites australis* в условията на озонов стрес, като ограничава натрупването на водороден пероксид и ограничава липидното пероксидиране на клетъчните мембрани. (статия I)
- Показано е, че генномодифицирани тютюневи растения, отделящи изопрен като естествен метаболит, са по-добре защитени от окислителен стрес вследствие на третиране с озон в сравнение с неотделящия изопрен див тип тютюн. (статия IX)

- Установено е, че изопренът има протектиращо действие срещу синглетен кислород. Защитният механизъм включва пряко взаимодействие на изопрена със синглетния кислород. Гасенето на синглетен кислород от изопрена се обяснява с наличието на спрегнати двойни връзки в изопреновата молекула, което улеснява преноса на енергия и топлинната дисипация. **(статия II)**
- Феноменът на повишена термоустойчивост от изопрена е демонстриран в листа на *Phragmites australis*, след химическо инхибиране на неговата синтеза с фосмидомицин, както и при различни по възраст растения *Platanus orientalis*. Изопренът не само защитава срещу топлинен стрес, но също така способства за по-бързото възстановяване на растенията след прекратяване на въздействието. **(статии IV, VI)** Значително по-високата скорост на електронния транспорт в изопрен-отделящите листа, изпитващи високотемпературен стрес, предполага, че изопренът благоприятства потока на електрони през фотосинтетичните / фотодихателните пътища. **(статии III)**
- За първи път са представени експериментални данни, пряко подкрепящи хипотезата за мембранно-стабилизиращата роля на изопрена. Чрез използването на различни биофизични техники (кръгов дихроизъм, електрохромно изместване при 515 nm, термолуминесценция) е показано, че изопренът подобрява интегритета и функционалността на тилакоидните мембрани при високотемпературен стрес. Установено е, че изопренът (1) способства за повишаване на температурната стабилност на светосъбиращия комплекс на PSII в стикованите области на граналните тилакоиди; (2) намалява флуидността на тилакоидните мембрани при високи температури; (3) измества с около 10°C към високотемпературния диапазон основния В пик от термолуминесцентните спектри, което отразява стабилизирането на зарядите в S_2Q_B - състоянието на реакционните центрове при изопрен-отделящите растения. Тези резултати предполагат модификационни промени в липидния бислой на тилакоидните мембрани. **(статия XII)**
- За първи път са представени експериментални данни, доказващи че потискането на изопреновата емисия води до съществени изменения в липидния и мастнокиселинен състав на тилакоидните мембрани и промени в ултраструктурата на хлоропластите. **(статия XVII)** Тези данни подкрепят хипотезата за мембранно-стабилизиращата роля на изопрена.

- За първи път чрез прилагането на нов метод за протеомни изследвания (изотопно кодирана техника за маркиране на белтъци) (isotope-coded protein-labeling technique, ICPL) е установено, че инхибирането на изопреновата биосинтеза и емисия променя хлоропластния белтъчен профил, което е свързано със структурни промени във фотосинтетичните мембрани и намаляване на устойчивостта на растенията към окислителен стрес. Доказано е, че при неотделящите изопрен генотипове топола намаляват нивата на хлоропластните белтъци, участващи във фотосинтезата, особено белтъците, свързани със светлинните реакции, редукионното регулиране и защитата от окислителен стрес, и се повишават нивата на хистоните и рибозомалните белтъци. **(статия XIV)**
- За първи път е показано, че изопренът ограничава натрупването на азотен оксид (NO) в листа на *Phragmites australis*, изпитващи озон стрес. Значително количество NO се акумулира само в мезофилната тъкан на изопрен-инхибираните листа, но не и в изопрен-отделящите листа, показвайки възможността на изопрена да регулира нивото на активни кислородни и азотни форми. Това може да бъде ефективен механизъм за контрол на нивото на вредни реактивни форми при стрес. **(статии V, VIII)**
- За първи път е показано, че генно модифицирани растения *Arabidopsis thaliana*, които отделят изопрен като естествен метаболит, имат по-малък пул на активни кислородни и азотни форми в сравнение с дивия тип, който не отделя изопрен. **(статия XIII)**
- Предложеният модел за молекулен диалог между изопрена и NO **(статии V, VIII)** експериментално е демонстриран в неотделящите изопрен генотипове топола **(статия XVIII)**. Изопренът влияе върху емисиите на NO, индуцирани при стрес, а по този начин и върху *in vivo* S-нитрозопротеома. Основни мишени на действие на NO в неотделящите изопрен генотипове топола са белтъците, свързани със светлинните и тъмнинните реакции на фотосинтезата, цикъла на трикарбоновите киселини, белтъчния метаболизъм и редокс регулацията. Показано е, че изопренът индиректно регулира образуването на активни кислородни форми чрез контрола на нивата на S-нитрозилиране на ензими метаболизиращи реактивните форми. **(статия VXIII)**
- Трансгенни тютюневи растения, които отделят изопрен, по-добре толерират силна степен на засушаване и се възстановяват по-добре след прекратяване на стреса. За първи път е демонстрирано, че в

присъствие на изопрен се иницира действието и на други защитни метаболити (нелетливи изопреноиди и фенилпропаноиди), осигурявайки допълнителна защита на растенията. Резултатите подчертават централната роля на изопрена в индуцираната от стрес метаболитна настройка. **(статия XV)**

- Предложено е ново доказателство за синхронизираното действие на антиоксидантните защитни средства през деня и е установена интеграция между летливите и нелетливите изопреноиди и флавоноидите в растения, подложени на комбинирано въздействие на висока температура, висок светлинен интензитет и засушаване. **(статия XVI)**
- Показано е, че растения *Arundo donax*, инвестиращи в изопреноиди (изопрен, каротеноиди, абсцисиева киселина и нейни катаболити), проявяват по-добра издръжливост през периоди на временно засушаване. Докато растения *Nakonechloa macra*, инвестиращи във фенилпропаноиди (хидроксиканелени киселини и деривати на лутеолин и апигенин), не са в състояние да избегнат увреждането на фотосинтетичния апарат вследствие на засушаване, но са в състояние да се справят с продължително излагане на окислителен стрес. Изопрен-отделящото растение *A. donax* по-ефективно регулира загубата на вода посредством координирано намаляване на мезофилната и устичната проводимост, в сравнение с *N. macra*. **(статия XIX)**
- Показано е наличие на висока фенотипна пластичност между екотипове на *A. donax*, която може да бъде използвана за компенсирание на ниската генетична изменчивост на този вид, когато се подбират растения, характеризирани се с по-голяма продуктивност. Растения, произхождащи от райони с неблагоприятни условия, значително увеличават биосинтезата на изопреноиди, които допринасят за защитата на фотосинтетичните мембрани при силно засушаване и за по-доброто и бързо възстановяване на растенията след рехидратиране. **(статия XX)**
- Получени са оригинални експериментални доказателства, че инхибирането на фотосинтезата от високи дози никел се дължи преди всичко на намалена мезофилна проводимост и метаболитни нарушения. Неблагоприятният ефект е по-силно изразен при младите, развиващи се, листа които отделят незначителни количества изопрен в сравнение с напълно развитите листа, и натрупват по-високи нива на Ni. Показано е, че не само изопренът,

но и други високомолекулни изопреноиди, като цис- β -осцимен и линалол, могат да играят важна роля в защитните механизми на растенията срещу тежки метали. (статия XI)

Списък на научните публикации обхванати в дисертационния труд доцент (I - V), професор (VI - XIII)

I. Loreto F, Velikova V - Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787, 2001. ИФ 5.105 (Q1); цитирана 561 пъти.

II. Velikova V, Edreva A, Loreto F - Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen. *Physiologia Plantarum* 122: 219-225, 2004. ИФ 2.017 (Q1); цитирана 55 пъти.

III. Velikova V, Pinelli P, Loreto F - Consequences of inhibition of isoprene synthesis in *Phragmites australis* leaves exposed to elevated temperatures. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 106 (2-3): 209-217, 2005. ИФ 1.495 (Q1); цитирана 19 пъти.

IV. Velikova V, Loreto F - On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant Cell and Environment* 28: 318-327, 2005. ИФ 3.601 (Q1); цитирана 119 пъти.

V. Velikova V, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F, Loreto F – Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytologist* 166: 419-426, 2005. ИФ 4.285 (Q1); цитирана 81 пъти.

VI. Velikova V, Loreto F, Tsonev T, Brillì F, Edreva A – Isoprene prevents the negative consequences of high temperature stress in *Platanus orientalis* leaves. *Functional Plant Biology* 33: 931-940, 2006. ИФ 2.272 (Q1); цитирана 17 пъти.

VII. Fares S, Brillì F, Noguès I, Velikova V, Tsonev T, Dagli S, Loreto F – Isoprene emission and primary metabolism in *Phragmites australis* grown under different phosphorus levels. *Plant Biology* 10: 38-43, 2008. ИФ 1.944 (Q1); цитирана 16 пъти.

VIII. Velikova V, Fares S, Loreto F – Isoprene and nitric oxide reduce damages in leaves exposed to oxidative stress. *Plant Cell and Environment* 31: 1882-1894, 2008. ИФ 4.666 (Q1); цитирана 35 пъти.

IX. Vickers CE, Possell M, CI Cojocariu, **Velikova VB**, Laothawornkitkul J, Ryan A, Mullineaux PM, Hewitt CN – Isoprene synthesis protects transgenic plants from oxidative stress. *Plant Cell and Environment* 32: 520-531, **2009**. ИФ **5.081 (Q1)**; цитирана **125** пъти.

X. **Velikova V**, Tsonev T, Barta C, Centritto M, Koleva D, Stefanova M, Busheva M, Loreto F – BVOC emissions, photosynthetic characteristics and changes in chloroplast ultra-structure of *Platanus orientalis* L. exposed to elevated CO₂ and high temperature. *Environmental Pollution* 157: 2629-2637, **2009**. ИФ **3.42 (Q1)**; цитирана **31** пъти.

XI. **Velikova V**, Tsonev T, Loreto F, Centritto M - Changes in photosynthesis, mesophyll conductance to CO₂, and isoprenoid emissions in *Populus nigra* plants exposed to excess nickel. *Environmental Pollution* 159: 1058-1066, **2011**. ИФ **3.746 (Q1)**; цитирана **58** пъти.

XII. **Velikova V**, Várkonyi Z, Szabó M, Maslenkova L, Nogues I, Kovács L, Peeva V, Busheva M, Garab G, Sharkey TD, Loreto F - Increased thermostability of thylakoid membranes in isoprene-emitting leaves probed with three biophysical techniques. *Plant Physiology* 157: 905-916, **2011**. ИФ **6.535 (Q1)**; цитирана **67** пъти.

XIII. **Velikova V**, Sharkey TD, Loreto F - Stabilization of thylakoid membranes in isoprene-emitting plants reduces formation of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* 7(1): 139-141, **2012**. ИФ **1.395 (Q2)**; цитирана **47** пъти.

XIV. **Velikova V**, Ghirardo A, Vanzo E, Merl J, Hauck SM, Schnitzler J-P - The genetic manipulation of isoprene emissions in poplar plants remodels the chloroplast proteome. *Journal of Proteome Research* 13 (4): 2005-2018, **2014**. ИФ **4.245 (Q1)**; цитирана **17** пъти.

XV. Tattini M, **Velikova V**, Vickers C, Brunetti C, Di Ferdinando M, Trivellini A, Fineschi S, Agati G, Ferrini F, Loreto F - Isoprene production in transgenic tobacco alters isoprenoids, non-structural carbohydrates and phenylpropanoids metabolism, and protects photosynthesis from drought stress. *Plant, Cell and Environment* 37 (8): 1950-1964, **2014**. ИФ **6.960 (Q1)**; цитирана **14** пъти.

XVI. Tattini M, Loreto F, Fini A, Guidi L, Brunetti C, **Velikova V**, Gori A, Ferrini F - Isoprenoids and phenylpropanoids are part of the antioxidant defense orchestrated daily by drought stressed *Platanus x acerifolia* plants during Mediterranean summers. *New Phytologist* 207: 613-626, **2015**. ИФ **7.210 (Q1)**; цитирана **30** пъти.

XVII. **Velikova V**, Müller C, Ghirardo A, Rock TM, Aichler M, Walch A, Schmitt-Kopplin P, Schnitzler JP - Knocking down isoprene emission modifies the lipid matrix of thylakoid membranes and influences the

chloroplast ultrastructure in poplar. *Plant Physiology* 168: 859-870, 2015. ИФ 6.280 (Q1); цитирана 13 пъти.

XVIII. Vanzo E, Merl-Pham J, Velikova V, Ghirardo A, Lindermayr C, Hauck SM, Bernhardt J, Riedel K, Durner J, Schnitzler J-P – Modulation of protein S-nitrosylation by isoprene emission in poplar. *Plant Physiology* 170 (4): 1945-1961, 2016. ИФ 6.456 (Q1); цитирана 8 пъти.

XIX. Velikova V, Brunetti C, Tattini M, Doneva D, Ahrar M, Tsonev T, Stefanova M, Ganeva T, Gori A, Ferrini F, Varotto C, Loreto F - Physiological significance of isoprenoids and phenylpropanoids in drought response of Arundinoideae species with contrasting habitats and metabolism. *Plant, Cell and Environment* 39: 2185-2197, 2016. ИФ 6.173 (Q1); цитирана 8 пъти.

XX. Ahrar M, Doneva D, Tattini M, Brunetti C, Gori A, Rodeghiero M, Wohlfart G, Biasioli F, Varotto C, Loreto F, Velikova V – Phenotypic differences determine drought stress responses in ecotypes of *Arundo donax* adapted to different environments. *Journal of Experimental Botany* 68(9): 2439-2451, 2017. ИФ 5.354 – 2017 (Q1); цитирана 5 пъти.

No		ИФ*	Q	Цит.**
I	<i>Plant Physiology</i> 127: 1781-1787, 2001	5.105	Q1	561
II.	<i>Physiologia Plantarum</i> 122, 219-225, 2004	2.017	Q1	55
III	<i>Agriculture, Ecosystems & Environment</i> 106 (2-3): 209-217, 2005	1.495	Q1	19
IV	<i>Plant Cell and Environment</i> 28, 318-327, 2005	3.601	Q1	119
V	<i>New Phytologist</i> 166: 419-426, 2005	4.285	Q1	81
VI	<i>Functional Plant Biology</i> , 33: 931-940, 2006	2.272	Q1	17
VII	<i>Plant Biology</i> 10: 38-43, 2008	1.944	Q1	16
VIII	<i>Plant Cell and Environment</i> 31: 1882-1894, 2008	4.666	Q1	35
IX	<i>Plant Cell and Environment</i> 32: 520-531, 2009	5.081	Q1	125
X	<i>Environmental Pollution</i> 157: 2629-2637, 2009	3.426	Q1	31
XI	<i>Environmental Pollution</i> 159, 1058-1066, 2011	3.746	Q1	58
XII	<i>Plant Physiology</i> 157, 905-916, 2011,	6.535	Q1	67
XIII	<i>Plant Signaling & Behavior</i> 7(1), 139-141, 2012 IF(2017)	1.395	Q2	47
XIV	<i>Journal of Proteome Research</i> 13 (4),	4.245	Q1	17

	2005-2018, 2014			
XV	<i>Plant, Cell and Environment</i> 37 (8), 1950-1964, 2014	6.960	Q1	14
XVI	<i>New Phytologist</i> 207, 613-626, 2015	7.210	Q1	30
XVII	<i>Plant Physiology</i> 168: 859-870, 2015	6.280	Q1	13
XVIII	<i>Plant Physiology</i> 170 (4), 1945-1961, 2016	6.456	Q1	8
XIX	<i>Plant, Cell and Environment</i> 39, 2185-2197, 2016	6.173	Q1	8
XX	<i>Journal of Experimental Botany</i> 68(9): 2439-2451, 2017	5.354	Q1	5
	Общо	86.851		1326

* - Импакт фактор в годината на публикуване

** - цитирания към 01.11.2019 г.

Цитирания

Общият брой забелязани цитати на публикациите, включени в дисертационния труд, към 01.11.2019 г. е **1326**, от тях 1159 – в издания реферирани и индексирани в Web of Science и Scopus, 75 – в други научни издания, и 92 – в чуждестранни дисертации за получаване на научната степен ”доктор”.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА:

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9: 1859– 1868.

Affek HP Yakir D (2002) Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiology* 129: 269–277.

Ahlfors R, Brosché M, Kollist H, Kangasjärvi J (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 58: 1–12.

Ahmed H, Häder D-P (2010) Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany* 69: 68-75.

Ahrar M, Doneva D, Koleva D, Romano A, Rodeghiero M, Tsonev T, ... Velikova V (2015) Isoprene emission in the monocot Arundineae tribe in relation to functional and structural organization of the photosynthetic apparatus. *Environmental and Experimental Botany* 119: 87–95.

- Bai C, Reilly CC, Wood BW (2006) Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. *Plant Physiology* 140: 433-443.
- Bertrand M, Poirier I (2005) Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* 43: 345-353.
- Brilli F, Barta C, Fortunati A, Lerdau M, Loreto F, Centritto M (2007) Response of isoprene emission and carbon metabolism to drought in white poplar (*Populus alba*) saplings. *New Phytologist* 175, 244–254.
- Centritto M, Nascetti P, Petrilli L, Raschi A, Loreto F (2004) Profiles of isoprene emission and photosynthetic parameters in hybrid poplars exposed to free-air CO₂ enrichment. *Plant, Cell and Environment* 27: 403–412.
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of waterstressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137: 209–219.
- Clijsters H, Van Assche F (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research* 7: 31-40.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13454–13459.
- Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 390–396.
- Evans JR, Kaldendorf R, Genty B, Terashima I (2009) Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany* 60:2235-2248.
- Fares S, Barta C, Brilli F, Centritto M, Ederli L, Ferranti F, Pasqualini S, Reale L, Tricoli D, Loreto F (2006) Impact of high ozone on isoprene emission, photosynthesis and histology of developing *Populus alba* leaves directly or indirectly exposed to the pollutant. *Physiologia Plantarum* 128: 456-465.
- Foyer C, Trebst A, Noctor G (2006) Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. In *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (eds B. Demmig-Adams, W.W. Adams III & A.K. Mattoo), pp. 241–268. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 507–516.

- Kaling M, Kanawati B, Ghirardo A, Albert A, Winkler JB, Heller W, Barta C, Loreto F, Schmitt-Kopplin P, Schnitzler JP (2015) UV-B mediated metabolic rearrangements in poplar revealed by non-targeted metabolomics. *Plant Cell Environment* 38: 892–904.
- Koch KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509–540.
- Kopittke PM, Asher CJ, Menzies NW (2007) Toxic effects of Ni₂O on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil* 292: 283–289.
- Lichtenthaler HK (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alfa-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92: 163–179.
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonateindependent pathway. *FEBS Letters* 400: 271–274.
- Lipton SA, Yun-Beom C, Pan Z, Le SZ, Chen HS, Sucher SJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 364: 626–632.
- Loreto F, Schnitzler J-P (2010) Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science* 15: 154–66.
- Loreto F, Sharkey TD (1990) A gas-exchange study of photosynthesis and isoprene emission in *Quercus rubra* L. *Planta* 182: 523–531.
- Loreto F, Harley PC, Di Marco G, Sharkey TD (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by different methods. *Plant Physiology* 98: 1437–1443.
- Luo QJ, Mittal A, Jia F, Rock CD (2012) An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 80: 117–129.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF (2010) NO synthesis and signaling in plants: where do we stand? *Physiol Plant* 138: 372–383.
- Peñuelas J, Llusia J, Asensio D, Munne-Bosch S (2005) Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. *Plant Cell Environ* 28: 278–286.
- Pfannschmidt T (2010) Plastidial retrograde signalling: a true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends in Plant Science* 15: 427–435.
- Sagardoy R, Vázquez S, Florez-Sarasa ID, Albacete A, Ribas-Carbó M, Flexas J, Abadía J, Morales F (2010) Stomatal and mesophyll conductances to CO₂ are the main limitations to photosynthesis in sugar

- beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. *New Phytologist* 187: 145-158.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 257-277.
- Sharkey TD, Singaas EL (1995) Why plants emit isoprene. *Nature* 374: 769.
- Simonneau T, Barrieu P, Tardieu F (1998) Accumulation rate of ABA in detached maize roots correlates with root water potential regardless of age and branching order. *Plant, Cell & Environment* 21: 1113–1122.
- Singaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD (1997) Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiology* 115: 1413–1420.
- Tossi V, Lamattina L, Cassia R (2009) An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *New Phytologist* 181: 871–879.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009b) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology* 5: 283–291.
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat A, Farmer EE (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal* 24: 467-476.
- Wang Y, Lin A, Loake GJ, Chu C (2013) H₂O₂-induced leaf cell death and the crosstalk of reactive nitric/oxygen species. *Journal of Integrative Plant Biology* 55: 202–208.
- Way DA, Ghirardo A, Kanawati B, Esperschütz J, Monson RK, Jackson RB, Schmitt-Kopplin P, Schnitzler JP (2013) Increasing atmospheric CO₂ reduces metabolic and physiological differences between isoprene and non-isoprene-emitting poplars. *New Phytologist* 200: 534–546.
- Weast RC (1984) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, sixty fourth ed. CRC Press, Boca Raton.
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock HT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* 31: 622–631.
- Zeidler J, Schwender J, Müller C, Wiesner J, Weidemeyer C, Back E, Jomaa H, Lichtenthaler HK (1998) Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z Naturforsch* 53: 980–986.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ – аденозинтрифосфат

НАДФ-Н – никотинамид- β -аденин динуклеотид фосфат

Φ_{PSII} – действителна ефективност на фотосистема 2

$^1\text{O}_2$ – синглетен кислород

CD – кръгов дихроизъм

C_i – междуклетъчна концентрация на CO_2

C_c – концентрация на CO_2 в хлоропластите

FTSW – фракция на транспирираната вода в почвата

g_m – мезофилна проводимост

g_s – устична проводимост

MDA – малонилдиалдехид

MEP – 2-С-метилетитритол 4-фосфатен път

NO – азотен оксид

NPQ – нефотохимично гасене

PSII – фотосистема 2

RB – Rose Bengal

ROS – реактивни кислородни форми

SOA – вторичните органични аерозолни (стр. 6)

TL – термолуминесценция

WUE – ефективност на използване на водата

ΔA_{515} – електрохромно отместване при 515 nm

OPLS анализ – Orthogonal Partial Least Squares, анализ на ортогоналните частни най-малки квадрати

