



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



**ИНСТИТУТ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЕКОСИСТЕМНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Цвета Владимирова Ангелова

**Биохимични и молекулни маркери за
устойчивост към окислителен стрес**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за придобиване на образователна и научна степен
„Доктор“

Научна специалност: “Генетика”, шифър 01.06.06.

Научен ръководител: проф. д-р Стефка Чанкова
Консултант: гл. ас. д-р Петя Първанова

София
2018

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на колегиума на отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология” към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, състояло се на 2.05.2018 г.

Дисертационният труд е с общ обем от 160 страници, 2 приложения, 10 таблици, 29 фигури с обяснителен текст. Списъкът на цитираната литература включва 377 заглавия, от тях 7 на кирилица и 370 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 3. 09. 2018 г. от 11.00 часа в Заседателната зала на База 1, на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, ул. „Майор Ю. Гагарин“ № 2, на открито заседание на Научно жури (назначено със заповед на Директора на ИБЕИ-БАН № 61/20.06.2018 г.), в състав:

Вътрешни членове:

1. проф. д-р Стефка Георгиева Чанкова-Петрова (ИБЕИ-БАН) - научен ръководител
2. доц. д-р Десислава Димитрова Петкова Варадинова (ИБЕИ-БАН) - председател

Външни членове:

3. проф. д-р Дияна Лилова Светлева (Аграрен университет-Пловдив) - рецензент
4. проф. д.б.н. Аглика Минева Едрева (пенсионер, ИФРГ-БАН) - рецензент
5. проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева (Софийски университет-БФ)

Материалите по защитата са на разположение на всички интересувачи се в библиотеката на ИБЕИ, База 1, София, ул. „Майор Ю. Гагарин” № 2.

I. Увод

Растенията са изложени на различни абиотични и биотични стресови фактори, които се дължат на глобалните климатични промени, както и на антропогенното действие. Известно е, че постепенните промени в околната среда, сред които е повишеното UV-B лъчение на повърхността на Земята, в резултат на изтъняване на озоновия слой е реална заплаха за съществуващите организми. Засушаването като един от най-значимите типове стрес от околната среда, води до серия от морфологични, физиологични, биохимични и молекулни промени в растенията, които могат неблагоприятно да се отразят върху растежа, продуктивността и често са сериозна заплаха за селското стопанство (Wang et al., 2001; Anjum et al., 2012). Ето защо през последните години вниманието на учените е насочено към повишените нива на ултравиолетовото-B (UV-B) облъчване и засушаването, поради потенциала им да нанасят щети на много икономически важни растителни видове (Chartzoulakis and Psarras, 2005; Agrawal et al., 2009).

Растенията, отглеждани в полеви условия, обикновено изпитват влиянието на повече от един стресов фактор, поради което този проблем е широко изследван в световен мащаб. Има данни, че отговорът на растенията, подложени на комбинирано въздействие, на два различни абиотични фактора (например засушаване и UV-B облъчване) е уникален и не може да бъде екстраполиран към отговора на растенията, когато факторите действат самостоятелно. Резултатите, свързани с изследването на комбинираното действие между UV-B и засушаването са противоречиви. Ето защо са необходими повече изследвания за изясняване на това взаимодействие.

Както засушаването, така и облъчването с UV-B, а така също и комбинираното им въздействие водят до акумулиране на активни кислородни форми (АКФ), които могат да доведат до окислително увреждане (Alderfasi et al., 2017). АКФ са силно реактивоспособни и при липса на ефективен защитен/и механизъм/и могат да нарушат нормалния метаболизъм чрез окислително увреждане на пигменти, липиди, протеини и нуклеинови киселини (Jansen et al., 1998; Gill and Tuteja, 2010; Ranjbarfordoei et al., 2011; Alderfasi et al., 2017).

Добре известно е, че отговорът на растенията към абиотичен стрес силно зависи от генотипа, етапите на развитие на растенията, вида на стресовия фактор, неговата интензивност и продължителност, експерименталния дизайн и т.н. (Chankova et al., 2000; Demirevska et al., 2009; Chankova et al., 2013; Li et al., 2013) и т.н.

По време на еволюцията в растенията са разработени различни механизми за справяне със стреса от околната среда като активиране на антиоксидантната, шаперонната, ДНК-репаративната системи и др.

Основният подход за оценка на стресовия отговор и адаптивния потенциал на клетките/организмите към абиотичен стрес, включва мутантни форми, които се различават по чувствителност/устойчивост към окислителен стрес; генотипове от контрастни местообитания или трансгенни растения (Teoule and Cadet, 1978; Verslues and Sharp, 1999; Chankova et al., 2000, 2013, 2014; Chankova et al., 2012, 2013; Khomdram et al., 2013; Ouvrard et al., 1996; El Rabey et al., 2012).

В настоящия дисертационен труд ние предлагаме друг подход на изследване-използване на генетично близкородствени генотипове, базирайки се на **хипотезата, че близките в генетично отношение форми биха имали приблизително подобен стресов отговор и адаптивен потенциал към индуктори на окислителен стрес.**

С тази разработка ние се надяваме да получим допълнителна и/или нова информация относно:

- разрешителната способност на най-често използваните маркери за окислителен стрес;
- някои от основните механизми, участващи във формирането на адаптивния потенциал на избрания от нас растителен модел към самостоятелно действащи екологични фактори;
- някои от основните механизми, участващи във формирането на адаптивния потенциал към комбинираното действие на два екологични фактора.

III. Цел и задачи на изследването

Настоящото изследване има за **цел** да се анализира и сравни: 1) стресовият отговор на близкородствени генотипове обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L) към окислителен стрес, индуциран от засушаване; 2) адаптивния потенциал на близкородствени генотипове обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L), десет дни след премахване на индукторите на окислителен стрес - самостоятелно и комбинирано прилагане на засушаване и UV-B облъчване. Да се разработи система от биохимични и молекулни маркери за ранна диагностика на устойчивостта на различни растителни генотипове към окислителен стрес, индуциран от засушаване, UV-B и комбинираното им въздействие.

Като моделна тест система са използвани три близкородствени генотипа *P. vulgaris* L. (сорт Добруджански 2, сорт Добруджански 7 и сорт Добруджански ран). За постигане на целта са поставени следните задачи:

Задачи на изследването:

1. Биохимичен и молекулен отговор на трите генотипа към окислителен стрес, индуциран от ПЕГ (експериментална схема 1):

1.1. Биохимични маркери

1.1.1. Съдържание на МДА

1.1.2. Съдържание на общи пероксиди

1.1.3. Съдържание на пролин

1.1.4. Съдържание на редуциращи захари

1.1.5. Съдържание на фотосинтетични пигменти

- общи хлорофили (a+b)

-хлорофил *a*

-хлорофил *b*

-съотношение на хлорофил *a/b*

-общи каротеноиди

1.2. Молекулни маркери

1.2.1. HSP70B

2. Биохимичен и молекулен отговор на трите генотипа, десет след премахване на самостоятелните и комбинираните въздействия с ПЕГ, UV-B (експериментална схема 2).

2.1. Биохимични маркери

2.1.1. Съдържание на МДА

2.1.2. Съдържание на общи пероксиди

2.1.3. Съдържание на пролин

- 2.1.4. Съдържание на редуциращи захари
- 2.1.5. Съдържание на фотосинтетични пигменти
 - общи хлорофили (a+b)
 - хлорофил *a*
 - хлорофил *b*
 - съотношение на хлорофил *a/b*
 - общи каротеноиди

2.1.6. Супероксид дисмутазна активност

2.1.7. Каталазна активност

2.2. Молекулни маркери

2.2.1. HSP70B

3. Сравнение и анализ на получените резултати; подбор на най-чувствителните маркери за ранна диагностика на чувствителността/адаптивния потенциал на изследваните генотипове.

4. Статистическа обработка на получените резултати.

5. Съпоставяне на експерименталните данни и приложените математически методи за анализ.

IV. Материали и методи

Изследванията са проведени през периода 01.01.2014-15.03.2016 г. в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания-БАН, секция «Мутагенеза от околната среда». Разработката е финансирана от Министерство на образованието и науката, Фонд „Научни изследвания“, проект „Комплексна морфометрична, физиологична, биохимична и молекулярна оценка на сухоустойчивостта при български генотипове фасул (*P. vulgaris* L.)”.

1. Обект на изследването

В настоящият дисертационен труд са използвани три генетично близкородствени сорта *P. vulgaris* L.: Добруджански 2, Добруджански 7 и Добруджански ран. Семената от трите генотипа са любезно предоставени от проф. Диана Светлева, от Аграрен Университет-Пловдив. По-рано е установена близката генетична родственост на тези три генотипа (Svetleva et al., 2006; Apostolova et al., 2014).

3. Експериментални схеми

В настоящият дисертационен труд бяха използвани две експериментални схеми, за да бъде изяснен биохимичният и молекулярният отговор на генотиповете, както и адаптивният им потенциал (таблица 3).

Таблица 3. Условия на отглеждане и третиране на *P. vulgaris* L. при двете експериментални схеми.

Схема	Експериментална схема 1	Експериментална схема 2
Обект	Добруджански 2, Добруджански 7, Добруджански ран	Добруджански 2, Добруджански 7, Добруджански ран
Стерилизиране на семена	1. Стерилизиращ разтвор (3 ml H ₂ O ₂ + 27 ml H ₂ O + 30 ml 95%	1. Стерилизиращ разтвор (3 ml H ₂ O ₂ + 27 ml H ₂ O + 30

	алкохол), 5 мин. 2. Промиване: три пъти със стерилна чешмяна вода.	ml 95% алкохол), 5 мин. 2. Промиване: три пъти със стерилна чешмяна вода. 3. Престой в стерилна чешмяна вода, 2ч.
Покълване в растежна камера (Phytotron, Growth Chamber, GC 400, NÜVE Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.S., Ankara/Turkey) при стандартни условия: 23±0.2°C, (ден/нощ) с фотопериод 12 ч., 70% относителна влажност, при постоянно осветяване - 11,7 W/m ²	В свитъци, по 10 семена се поставят в стъклени съдове със стерилна чешмяна вода, от 3-5 дни.	В петри по 25 броя семена, на тъмно, от 3-5 дни.
Отглеждане на прорастъци в контролирани условия до фаза	на хранителна среда Sager Granick (SG) до физиологично развит трети лист	на стерилна чешмяна вода, до котиледон
Третиране на фаза	трети лист	Котиледон
Третиране	1. Засушаване за 24 часа с 8% ПЕГ 2. Засушаване за 24 часа с 16% ПЕГ	1. Облъчване с три дози UV-B 2. Засушаване за 24 часа с 16% ПЕГ 3. Комбинирано третиране (засушаване за 24 часа с 16% ПЕГ, на 12ти час облъчване с 100 J/m ² , 250 J/m ² , 500 J/m ²)
Отглеждане след третирането, при контролирани условия във фитотрон	-	Отглеждане до фаза първи лист .
Биохимични и молекулни анализи	Веднага след третирането (трети лист).	Десет дни след третирането (първи лист).
Изследвания	1. МДА 2. H ₂ O ₂ 3. пролин 4. редуциращи захари 5. общи хлорофили (a+b) 6. хлорофил a 7. хлорофил b 8. общи каротеноиди	1. МДА 2. H ₂ O ₂ 3. пролин 4. редуциращи захари 5. общи хлорофили (a+b) 6. хлорофил a 7. хлорофил b 8. общи каротеноиди

	9. съотношение хлорофил a/b 10. HSP70B	9. съотношение хлорофил a/b 10. HSP70B 11. СОД 12. Каталаза
цел на схема	биохимичен и молекулен отговор	адаптивен потенциал

4. Методи

- 4.1. Съдържание на малондиалдехид (МДА), (Dhindsa et al., 1981).
- 4.2. Съдържание на общи пероксиди (Роx), (Jessup et al., 1994).
- 4.3. Съдържание на пролин (Pro), (Bates et al., 1973).
- 4.4. Съдържание на редуциращи захари (RS), (Combes and Manson, 1983).
- 4.5. Съдържание на фотосинтетични пигменти, (Arnon, 1949).
- 4.6. Топлинно стресови белтъци (HSP70B), (Chankova et al., 2013) и <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=850>.
- 4.7. Антиоксидантна система
 - 4.7.1. Ензимна активност на супероксид дисмутаза (СОД), (Beauchamp and Fridovich, 1971).
 - 4.7.2. Каталазна активност, (Aebi, 1981).

5. Статистически анализ

За обработката на данните при експериментална схема 1 са използвани следните анализи: One-way ANOVA анализ с Tukey множествен сравнителен пост тест и Two-way ANOVA анализ с пост тест Bonferroni's (GraphPad Prism 6.04 software, San Diego, USA).

При експериментална схема 2 са използвани следните анализи: One-way ANOVA, Tukey множествен сравнителен посттест, Two-way ANOVA с посттест Bonferroni's (GraphPad Prism 6.04 software, San Diego, USA); ANOVA (Excel 2007); Analysis ToolPak за извършване на сложен анализ на данни (Excel 2007) и Булева алгебра.

Обработката на данните е направена от докторанта и от биоинформатик гл. ас. д-р Валерия Симеонова, ФМИ на СУ "Св.Климент Охридски". Резултатите са анализирани с GraphPad Prism и са потвърдени с ANOVA (Excel 2007), Analysis ToolPak и Булева алгебра.

V. Резултати и обсъждане

A. Експериментална схема 1.

1. Конститутивни нива на изследваните параметри-няма статистическидоказани, значими разлики в конститутивните нива на гореспоменатите параметри в зависимост от генотипа.

2. Индуцирани нива на изследваните параметри

2.1. Биохимични показатели:

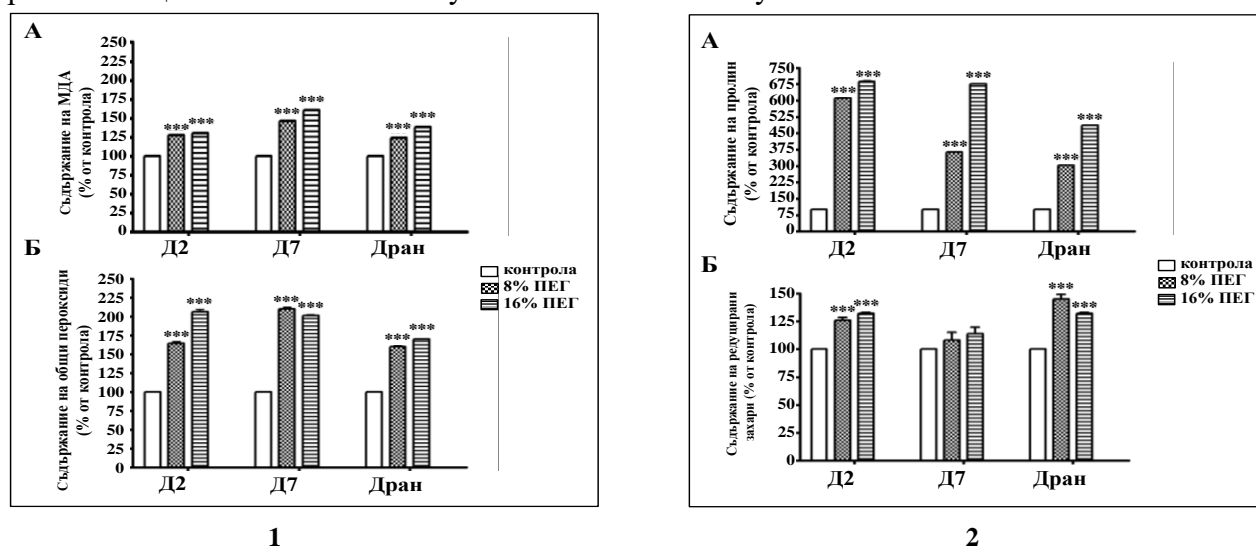
2.1.1. Съдържание на малондиалдехид (МДА)

При експерименталните условия на схема 1, нивата на МДА след третирането с двете концентрации ПЕГ са повишени с 24%-60% ($p < 0.001$) в сравнение с контролните нива (Фиг. 1А). Получените резултати за леко увеличени нива на МДА в сравнение с

контролните след засушаване, може да са индикация, че двете концентрации ПЕГ (8% и 16%) индуцират “слаб/умерен стрес” (mild/moderate stress) от засушаване в изследваните генотипове. Изчислено е, че около 80% от ефекта се дължи на използваната концентрацията (79,48%, $p < 0,0001$), а влиянието на генотипа е само около 13% (12,96%, $p < 0,0001$), вероятно поради близкото генетично родство на изследваните от нас генотипове.

2.1.2. Съдържание на общи пероксиди (Pox)

Наблюдавано е статистически значимо повишаване на нивата на общите пероксиди в сравнение с нетретираните контролни варианти и при трите генотипа ($p < 0.001$) (Фиг. 1 Б). Липсата на разлика в отговора на генотиповете и не добре изразеният ефект на генотипа, може да се обяснят с факта, че генотиповете са генетично близкородствени. Вероятно този биохимичен параметър, ще е показателен само в случаи на ясно различаващи се генотипове по чувствителност към засушаване.



Фигура 1. Съдържание на МДА(А) и Pox (Б) при три генотипа обикновен фасул (Добруджански 2, Добруджански 7и Добруджански ран) измерено веднага след третиране с две концентрации ПЕГ (процент от контролата).Данните са средни стойности от пет независими експеримента с тяхната стандартна грешка. Статистически значими разлики са открити с One-way ANOVA анализ. В случаите, когато не се виждат стандартни грешки, то те са равни или по-малки от символите на графиката.

Фигура 2. Съдържание на пролин (А) и редуциращи захари (Б) при три генотипа обикновен фасул измерено веднага след третиране с две концентрации ПЕГ (процент от контролата). А-Статистически значими разлики са открити с One-way ANOVA анализ между: контрола и 8% ПЕГ; контрола и 16% ПЕГ; 8% ПЕГ и 16% ПЕГ (***, $p < 0.001$) при трите генотипа. В случаите, когато не се виждат стандартни грешки, то те са равни или по-малки от символите на графиката. Б-Статистически значими разлики са открити с One-way ANOVA анализ между: контрола и 8% ПЕГ при Д2, ДР; контрола и 16% ПЕГ при Д2, ДР (***, $p < 0.001$).

2.1.3. Съдържание на пролин (Pro)

Повишено съдържание на пролин е установено след третиране с две концентрации ПЕГ в сравнение с контролата и при трите генотипа ($p < 0.0001$) (Фиг. 2 А). Спрямо пролиновата си акумулация след стрес, индуциран от третиране с 16% ПЕГ, изследваните генотипове *P. vulgaris* L. могат да се подредят по следния начин: Добруджански 2 = Добруджански 7 > Добруджански ран. Като се има предвид, че повишеното пролиново съдържание често се използва като маркер за стресов отговор към засушаване може да се

предположи, че пролинът позволява да се отдиференцира стресовият отговор дори на близкородствени генотипове.

2.1.4. Съдържание на редуциращи захари (RS)

Статистически значима повишена акумулация на редуциращи захари (25%-50%) се наблюдава при двата генотипа – Добруджански 2 и Добруджански ран след третирането с ПЕГ в сравнение с контролите и в сравнение с генотип Добруджански 7 (Фиг. 2 Б). Вероятно двете ПЕГ концентрации причиняват окислителен стрес, но този стрес не е достатъчен да индуцира съдържание на редуциращи захари в Добруджански 7. Вероятно редуциращите захари могат успешно да бъдат използвани като маркер за клетъчна чувствителност на генотипове с контрастна толерантност.

2.1.5. Съдържание на фотосинтетични пигменти

▪ *Съдържание на общи хлорофили (a+b)*

По-високи нива на общи хлорофили в сравнение с контролните нива са измерени и при трите изследвани генотипа, след третиране и с двете концентрации ПЕГ.

▪ *Съдържание на хлорофил a и хлорофил b*

В нашата експериментална схема съдържанието на хлорофил *a* и хлорофил *b* се увеличава след 24 часова третиране с ПЕГ. По-високи нива на хлорофил *a* и хлорофил *b* са измерени при Добруджански 2 и Добруджански ран в сравнение с генотип Добруджански 7, след третиране с 16 % ПЕГ.

▪ *Съотношение на хлорофил a/b*

В нашите експерименти не е установена промяна в хлорофилното съотношение след третирането и с двете изследвани концентрации ПЕГ и при трите генотипа. Вероятно при тези експериментални условия, засушаването не оказва влияние върху хлорофилното съотношение. От друга страна може да се предположи, че вероятно хлорофилното съотношение не се променя при изследваните генотипове, защото условията не са достатъчно стресиращи.

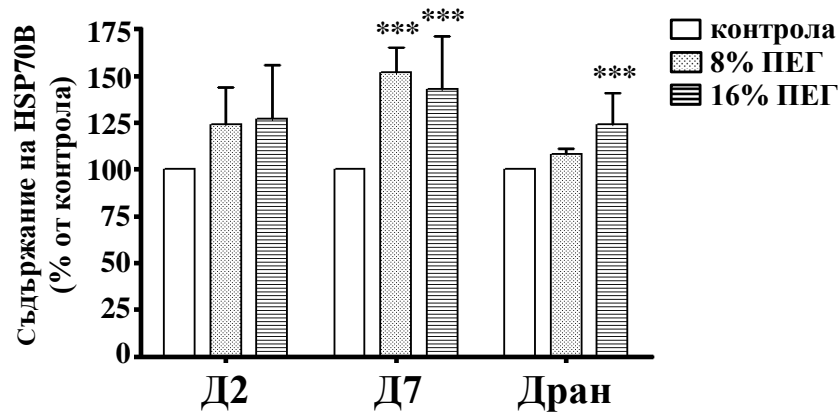
▪ *Съдържание на общи каротеноиди*

В условията на експериментална схема 1, съдържанието на общи каротеноиди в третираните проби се увеличава спрямо контролите по статистически значим начин ($p < 0.001$). Съществува връзка между степента на увеличаване на общите каротеноиди и генотипа по концентрации 8 и 16 % ПЕГ. Нивата на индуцираните общи каротеноиди и при трите изследвани генотипа са приблизително еднакви.

2.2. Молекулни показатели:

2.2.1. Съдържание на топлинно стресови белтъци (HSP70B)

В настоящия дисертационен труд използваните генотипове, макар и близкородствени, по този показател показват известни различия в отговора (Фиг. 3). С най-добре изразен отговор е Добруджански 7, следван от Добруджански ран, а при Добруджански 2 няма доказани разлики между индуцираните и контролните нива.



Фигура 3. Съдържание на топлинно стресови белтъци при три генотипа обикновен фасул (Добруджански 2, Добруджански 7 и Добруджански ран) измерено веднага след третиране с две концентрации ПЕГ (процент от контролата). Данните са средни стойности от поне три независими експеримента с тяхната стандартна грешка. Статистически значими разлики са открити с One-way ANOVA анализ между: контрола и 8% ПЕГ при Д7; контрола и 16% ПЕГ при Д7 и ДР (***) $p < 0.001$). В случаите, когато не се виждат стандартни грешки, то те са равни или по-малки от символите на графиката.

Тези резултати потвърждават предишни изследвания, че индукцията на HSP70B може да се използва като ранен маркер за ПЕГ-индуциран окислителен стрес (Chankova et al., 2013) при разграничаване на стресовия отговор дори при генетично близкородствени генотипове.

Б. Експериментална схема 2.

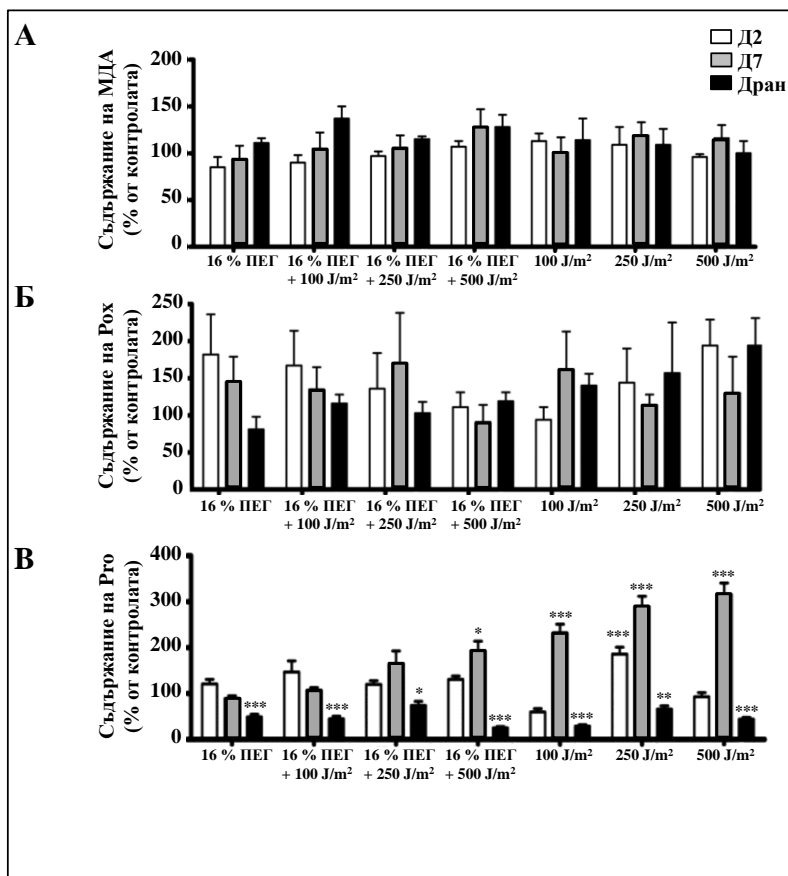
1. Конститутивни нива на изследваните параметри

Няма статистически доказани, значими разлики между стойностите на конститутивните нива на изследваните генотипове за показателите: МДА, общи пероксиди, общи хлорофили (a+b), хлорофил *a*, хлорофил *b*, общи каротеноиди, HSP70B, СОД и каталазна активност, с изключение на два параметъра пролин и редуциращи захари.

2. Индуцирани нива на изследваните параметри

2.1. Биохимични показатели:

При сравняване на стойностите на МДА и общи пероксиди, измерени десет дни след снемане действието на стреса, не е установена вариабилност в адаптивния потенциал на трите изследвани генотипа (Фиг. 4 А, Б). Получените от нас резултати биха могли да се анализират в две посоки: двата параметъра МДА и P_{ox} не са достатъчно информативни за анализ на адаптивния потенциал на близкородствени в генетично отношение генотипове; десет дневният възстановителен период е достатъчен генотиповете да преодолеят окислителния стрес индуциран от засушаване, UV-B облъчване и комбинирано въздействие.



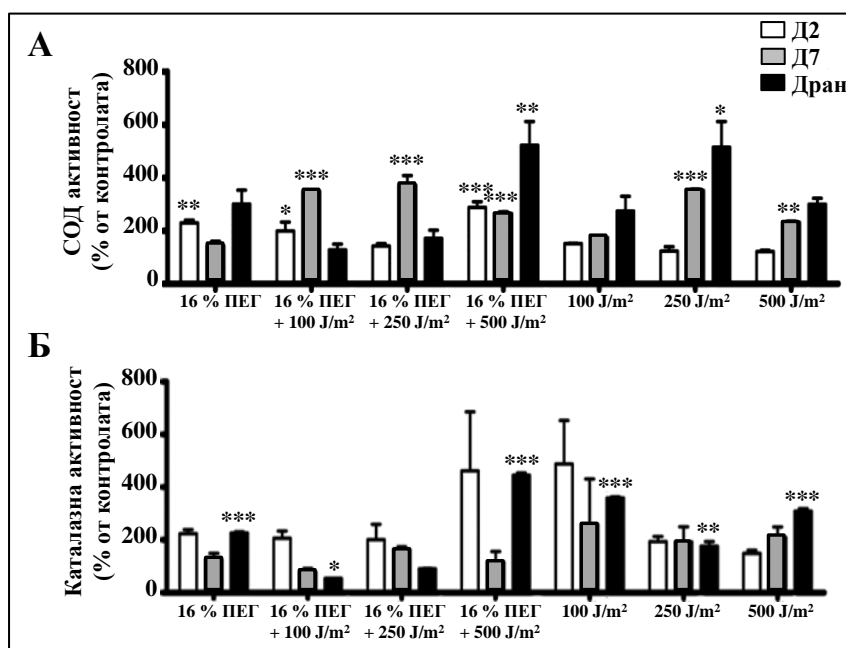
Фигура 4. Влияние на 16% ПЕГ, UV-B лъчи и комбинирано въздействие върху съдържанието на МДА (А), пролин (В) при три генотипа фасул (*P. vulgaris* L.), представени като процент от контролата (100%). Данните са средни стойности от четири независими експеримента с тяхната стандартна грешка. 4В-Статистически значими разлики са изчислени чрез One-way ANOVA между: 16% ПЕГ и контрола (***, $p < 0.001$)-ДР; 100 J/m² и контрола, (***, $p < 0.001$)-Д7, ДР; 250 J/m² и контрола, (***, $p < 0.001$)- Д2, Д7; (**, $p < 0.01$)- ДР; 500 J/m² и контрола, (***, $p < 0.001$)- Д7, ДР; 16% ПЕГ+100 J/m² и контрола, (***, $p < 0.001$)-ДР; 16% ПЕГ+250 J/m² и контрола, (*, $p < 0.1$)-ДР; 16% ПЕГ+500 J/m² и контрола, (***, $p < 0.001$)-ДР; (*, $p < 0.1$)-Д7. В случаите, когато не се виждат стандартни грешки, то те са равни или по-малки от символите на графиката.

2.1.3. Съдържание на пролин (Pro)

След десет дневен възстановителен период от засушаването няма статистически значими разлики в измерените количества пролин при Добруджански 2 и Добруджански 7 ($p < 0.5$; One-way ANOVA анализ, Analysis ToolPak (Excel 2007), ANOVA (Excel 2007)), и пренебрежимо по-ниски при Добруджански ран ($p < 0.001$) (Фиг. 4В). Подобна тенденция се наблюдава в пролиновите нива след десет дневен период на възстановяване от UV-B облъчването при Добруджански 2 и Добруджански ран ($p < 0.5$). Интересен е фактът, че единствено при Добруджански 7 при тези експериментални условия се регистрира дозово зависимо увеличаване на пролин. Ефектът на претретирането с ПЕГ оказва влияние върху пролиновата акумулация. Измерено е намалено пролиново съдържание в сравнение с това в UV-B облъчените проби близки ($p > 0.5$) или по-ниски стойности до контролните, и при трите генотипа, с изключение на вариант 16% ПЕГ+500 J/m² ($p < 0.1$), при Добруджански 7.

Вероятно за генотип Добруджански 7 повишената пролинова акумулация е един от защитните му механизми.

След десет дневен възстановителен период от засушаване, UV-B облъчване и комбинирано въздействие не са установени статистически доказани разлики с контролите, по параметрите редуциращи захари и фотосинтетични пигменти, и за трите генотипа.



Фигура 5. Влияние на 16% ПЕГ, UV-B лъчи и комбинирано въздействие върху СОД (А) и каталазна активност (Б), при три генотипа фасул (*P. vulgaris* L.), представени като процент от контролата (100%). Данните са средни стойности от три независими експеримента с тяхната стандартна грешка. А- Статистически значими разлики са изчислени чрез One-way ANOVA между: 16% ПЕГ и контрола (** p<0.01)-Д2; 250 J/m² и контрола (***, p<0.001)-Д7, (*, p<0.1)-ДР; 500 J/m² и контрола (**, p<0.01)-Д7; 16% ПЕГ+100 J/m² и контрола (* p<0.1)-Д2, (***, p<0.001)-Д7; 16% ПЕГ+250 J/m² и контрола (***, p<0.001)-Д7; 16% ПЕГ+500 J/m² и контрола (***, p<0.001)-Д2, Д7, (** p<0.01)-ДР. Б- Статистически значими разлики са установени чрез One-way ANOVA между: 16% ПЕГ и контрола; 100 J/m² и контрола; 500 J/m² и контрола; 16% ПЕГ+500 J/m² и контрола (***, p<0.001)-ДР; 250 J/m² и контрола (**, p<0.01)-ДР; 16% PEG+100 J/m² и контрола (*, p<0.1)-ДР. В случаите, когато не се виждат стандартни грешки, то те са равни или по-малки от символите на графиката.

2.1.5. СОД активност

Статистически доказана по-висока стойност на СОД активност в сравнение с контролната е отчетена десет дни след отстраняване на засушаването с 16% ПЕГ при генотип Добруджански 2 (Фиг. 5А). При Добруджански 7 и Добруджански ран, не са установени статистически значими разлики спрямо контролите (p>0.5), с анализите One-way ANOVA, Analysis ToolPak (Excel 2007) и ANOVA (Excel 2007) (Фиг. 20). Нива на СОД близки до контролните биха могли да се дължат на средната продължителност/сила на засушаването, индуцирано от 16% ПЕГ, както и на това, че десет дни след отстраняване на стресовия фактор, двата генотипа Добруджански 7 и Добруджански ран са преодолели ефекта на въздействието на ПЕГ (разликите с контролите, измерени десет дни след отстраняването на 16% ПЕГ не са статистически доказани). Въпросът остава отворен.

Облъчването с UV-B не води до промени в СОД активността при генотип Добруджански 2. Нивата на СОД са сравними с контролните, след десет дневен възстановителен период от облъчването. Данните от One-way ANOVA анализът, Analysis

ToolPak (Excel 2007) и ANOVA (Excel 2007) показаха, че няма статистически значими разлики с контролите ($p > 0.5$). При другите два генотипа се наблюдават по-високи от контролните и статистически значими стойности за СОД, десет дни след премахване на UV-B въздействието, като в зависимост от генотипа се наблюдава и не добре изразен дозово зависим ефект. Този ефект е най-ясно изразен при Добруджански 7. В това изследване се опитахме да анализираме колко стресиращи са засушаването и UV-B облъчването за генотипа. Нашите данни показват, че трите генотипа отговарят различно на двата типа самостоятелно приложен стрес.

Може да се предположи, че в нашите експериментални условия, поддържането на повишени нива на СОД при генотип Добруджански 7, след десет дневен възстановителен период, вероятно е свързано с по-добра стрес-толерантност на генотипа към UV-B.

На базата на активността на СОД, се наблюдават някои различия между изследваните генотипове, десет дни след премахване на комбинираното въздействие. При анализ на данните с комбинирано въздействие става ясно, че претретирането с ПЕГ повишава защитния потенциал на Добруджански 7. При този генотип, по-висока СОД активност в сравнение с контролите е измерена десет дни след премахване действието на комбинираното въздействие (349%-16% ПЕГ+100 J/m²; 372%-16% ПЕГ+250 J/m²; 265%-16% ПЕГ+500 J/m²). При генотип Добруджански 2, СОД активността, остава най-висока, десет дни след комбинираното въздействие с 16% ПЕГ+500 J/m². Не са установени статистически значими разлики след сравняване на ПЕГ въздействието, с комбинираното въздействие при този генотип. При генотип Добруджански ран единствената висока стойност за СОД (около 5-пъти) е измерена десет дни след премахване на комбинираното въздействие с 16% ПЕГ+500 J/m².

Може да се предположи, че поддържаните повишени нива на СОД, десет дни след премахването на комбинирания стрес, вероятно осигуряват по-добра адаптация на генотип Добруджански 7 в сравнение с Добруджански 2 и Добруджански ран, като не може да се пренебрегне и сложността на механизмите на толерантност при растенията и особено когато въздействията са комбинирани.

2.1.6. Каталазна активност

За Добруджански 2 и Добруджански 7 не са - открити статистически значими различия ($p > 0.5$) с контролите в зависимост от вида на стресовия фактор (Фиг. 5Б), при използване на анализите One-way ANOVA, Analysis ToolPak (Excel 2007) и ANOVA (Excel 2007). Отговорът на Добруджански ран е много различен в сравнение с този на Добруджански 2 и Добруджански 7. Добре изразени повишени нива на каталаза са измерени десет дни след премахването на UV-B облъчването (около 2-3,5 пъти) и около (около 2 пъти), след премахване на индуцирания от ПЕГ, стрес от засушаване. Различното в нашата експериментална схема е, че Добруджански ран поддържа високи нива на каталаза за дълго време, вероятно като защитен механизъм. Въпросът остава отворен. На базата на тези данни за генотип Добруджански ран, може да се предположи, че UV-B облъчването е по-силният стресов фактор в сравнение със засушаването.

Каталазна активност близка до тази в контролите е измерена десет дни след премахването на всички комбинирани въздействия при Добруджански 2 и Добруджански 7. Не са установени статистически значими разлики спрямо контролите и комбинираните въздействия ($p > 0.5$) при тези два генотипа, десет дни след премахване на въздействията. Резултатите получени за генотип Добруджански ран са различни от тези при другите два

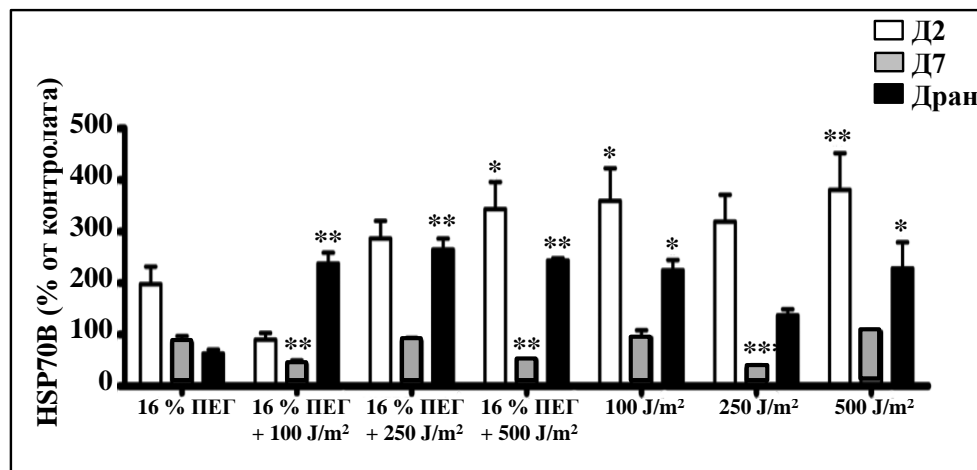
генотипа. За повечето от вариантите, данните са статистически доказани, както и разликите с контролата. Най-добре изразено повишение в нивата на каталазната активност е измерено при комбинираното прилагане на 16% ПЕГ+500 J/m².

2.2. Молекулни показатели:

2.2.1. Съдържание на топлинно стресови белтъци (HSP70B)

В приложената от нас експериментална схема 2, изследваните параметри се измерват след десет дневен възстановителен период. Тази експериментална постановка, позволява да се получи нова информация за участието на HSP70B във възстановителните процеси, протичащи след отстраняване на стресовия/те фактор/и.

Нашите резултати показват, че няма статистически доказани разлики в конститутивните нива на HSP70B на различните генотипове, което вероятно се дължи на тяхното близко генетично родство.



Фигура 6. Влияние на 16% ПЕГ, UV-B лъчи и комбинирано въздействие върху съдържанието на белтъци на топлинния стрес (HSP70B), при три генотипа фасул (*P. vulgaris* L.), представени като процент от контролата (100%). Данните са средни стойности от четири независими експеримента с тяхната стандартна грешка. Статистически значими разлики са установени чрез One-way ANOVA анализ между: 100 J/m² и контрола-Д2, ДР; 500 J/m² и контрола-ДР; 16% ПЕГ+500 J/m² и контрола-Д2 (*, p<0.1); 500 J/m² и контрола-Д2; 16% ПЕГ+100 J/m² и контрола-Д7, ДР; 16% ПЕГ+250 J/m² и контрола-ДР; 16% ПЕГ+500 J/m² и контрола-Д7, ДР (**, p<0.01); 250 J/m² и контрола-Д7 (***, p<0.001). В случаите, когато не се виждат стандартни грешки, то те са равни или по-малки от символите на графиката.

Чрез анализите One-way ANOVA, Analysis ToolPak (Excel 2007) и ANOVA (Excel 2007) е изчислено, че след десет дневен възстановителен период след засушаване с 16% ПЕГ и при трите изследвани генотипа разликите с контролите не са доказани статистически (p>0.5) (Фиг. 6). Няма изразен ефект на приложената доза UV-B при всички изследвани генотипове, като при Добруджански 2 и Добруджански ран, не навсякъде повишените стойности на HSP70B са статистически доказани в сравнение с тези в контролите. Отчетените повишени нива на HSP70B при Добруджански 2 (около 3.5-4-пъти) и Добруджански ран (около 2,5-3 пъти), илюстрират, че дори след десет дневен възстановителен период, стойностите на HSP70B могат да останат високи. На базата на експериментално получените данни за нива на HSP70B, измерени след възстановителен период от десет дни, може да се предположи, че UV-B облъчването е по-силният стресов фактор за Добруджански 2 и Добруджански ран, отколкото засушаването.

Количествата на HSP70B в комбинираните варианти при Добруджански 7, както при самостоятелните въздействия остават отново близки до тези в контролата. Единствено във вариант 16% ПЕГ+500 J/m², акумулацията на топлинно стресови белтъци е по-висока от контролните (около 3.5–4 пъти), но приблизително еднакви с тези от самостоятелното UV-B въздействие. Въпреки, че са изминали десет дни след премахване на комбинирания стрес, Добруджански ран все още реагира с повишено съдържание на HSP70B, в сравнение с контролата и със самостоятелното UV-B облъчване.

Вероятно трите изследвани генотипа активират различни защитни механизми, десет дни след премахване на комбинираното въздействие. Би могло да се предположи, че при комбинираните варианти лекият стрес от засушаване води до адаптация в определена степен (около 3.5 – 4 пъти) и в тези варианти, лекият стрес от засушаване увеличава адаптивния потенциал на Добруджански 2 и Добруджански ран /особено при 16% ПЕГ+500 J/m²/ в сравнение със самостоятелното засушаване и техният защитен механизъм е свръхпродукция на HSP70B.

3. Математически установени критерии за адаптивен потенциал

Получените резултати са обработени статистически с програмата Graphpad Prism, като са използвани One-way ANOVA анализ с Tukey multiple comparison posttest и Two-way ANOVA анализ с Bonferoni posttest. Само за маркерите пролин, СОД активност, каталазна активност и HSP70B се получиха статистически значими разлики. Това наложи консултация с биоинформатик и допълнителна обработка на данните с други програмни продукти.

3.1. ANOVA /Excel/-Pro, HSP70B, RS, CAT и SOD.

3.2. Analysis ToolPak /Excel 2007/-Pro, RS, HSP70B, CAT, SOD.

3.3. Булева алгебра-обобщава резултатите от ANOVA и Analysis ToolPak. С помощта на Булевата алгебра са изчислени възможните комбинации за определяне на възможните маркери за адаптивен потенциал на съответния генотип, като са използвани булевите оператори AND, OR, XOR.

Направените стандартни тестове показаха различни нива на p-value при трите изследвани сорта. Поради тази причина се наложи допълнителна обработка на получените статически измервания чрез Булева алгебра. С нейна помощ се установиха критерии за разграничаване на генотиповете.

На базата на експерименталните данни и стандартния пост-тест при ANOVA анализите-Tukey's HSD, може да се обобщи, че при тези условия редуциращите захари не се показателни като маркер за адаптивен потенциал, тъй като десет дни след премахването на всички въздействия се връщат до първоначалното /контролно/ състояние. От друга страна, тъй като е известно, че Tukey's HSD е "меродавният" пост-тест, въз основа на който може да се определи значимостта на резултатите, допълните статистически измервания за маркера-редуциращи захари, не са необходими за целите на настоящия дисертационен труд, но могат да бъдат използвани в друго разширено математическо изследване. В това изследване, ние предполагаме, на базата на получените резултати за този параметър, че стресът не е бил толкова силен, че да предизвика акумулация на редуциращи захари.

VI. Заключение

В настоящия дисертационен труд беше предположена хипотезата, че близкородствени генотипове, биха имали сравнително подобен биохимичен и молекулен отговор (веднага след действието на стреса) и сравнително подобен адаптивен потенциал (след десет дневен възстановителен период). На базата на хипотезата, бяха формулирани целите на изследването: да се анализира и сравни: 1) стресовият отговор на близкородствени генотипове обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L) към окислителен стрес, индуциран от засушаване; 2) адаптивният потенциал на близкородствени генотипове обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L), десет дни след премахване на индукторите на окислителен стрес - самостоятелно и комбинирано прилагане на засушаване и UV-B облъчване, както и да се разработи система от биохимични и молекулни маркери за ранна диагностика на устойчивостта на различни растителни генотипове към окислителен стрес, индуциран от засушаване, UV-B и комбинираното им въздействие.

Близката генетична родственоост на изследваните генотипове в първата експериментална схема се потвърди и от получените в това изследване резултати за конститутивните нива на изследваните параметри. Не са установени статистически доказани разлики между конститутивните нива на генотиповете по всички изследвани параметри (таблица 6).

По-високото съдържание на МДА и Рох са показатели за наличие на окислителен стрес от околната среда (Valifard et al., 2012; Gill and Tuteja, 2010; Pandey and Chakraborty, 2015; Li et al., 2013; Fan et al., 2014; Du et al., 2014). След засушаване с две концентрации ПЕГ, са установени не много високи нива на МДА и при трите изследвани генотипа. Статистическите данни за МДА, показват, че 80% от ефекта се дължи на използваната концентрацията (79,48%, $p < 0,0001$), а влиянието на генотипа е само около 13% (12,96%, $p < 0,0001$). На базата на литературните данни и получените резултати за МДА (Фиг. 5), и при трите изследвани генотипа, веднага след засушаването, ние предполагаме, че двете концентрации ПЕГ индуцират лек/умерен стрес, но отговорът на генотиповете не може да бъде разграничен, поради близкото генетично родство на изследваните генотипове.

По отношение нивата на общи пероксиди, установяваме липса на разлика в отговора на генотиповете, не добре изразен ефект на генотипа и повишени нива на прекиси веднага след действието на стреса (Фиг. 6). По-високите нива на пероксиди и при трите генотипа показват наличие на стрес, веднага след засушаването. Проведеният Two-way ANOVA анализ потвърждава експериментално получените данни. Ефектът на концентрацията е по-силно изразен (85,54%, $p < 0,0001$) в сравнение с ефекта на генотипа (6,31%, $p < 0,0001$). Експериментално и статистически получените данни за съдържание общи пероксиди, потвърждават близкото генетично родство на изследваните генотипове. По този параметър не може да се разграничи ясно отговора на генетично близкородствени генотипове, но може успешно да се използва при генотипове с контрастен отговор.

В сравнение с биохимичните показатели-МДА и общи пероксиди, генотиповете напълно се различават в отговора си (Фиг. 7), измерен като пролиново съдържание. Известно е, че в отговор на стрес от околната среда в много растения се натрупва пролин (Irogoyen et al., 1992; Carletti et al., 2003; Turkan et al., 2005; Verbruggen and Hermans, 2008; Mahdavian et al., 2008; Mohammadkhani and Heidari, 2008; Valifard et al., 2012; Pandey and Chakraborty, 2015; Rajabbeigi et al., 2013; Dwivedi et al., 2015). Нивата на пролин са много високи и при трите генотипа, когато са измерени веднага след действието на стреса

(засушаване с 8% и 16% ПЕГ). Експериментално получените данни за пролиново съдържание се потвърждават и от Two-way ANOVA анализа. Най-добре изразен е ефектът на ПЕГ концентрацията (83.85 %, $p < 0.0001$) в сравнение с ефекта на генотипа (8.81 %, $p < 0.0001$) и взаимодействието между двата фактора (7.27 %, $p < 0.0001$). Освен като маркер за стрес от околната среда, пролинът може да бъде и маркер за стрес толерантност при изследване на генотипове с контрастен отговор. При използваният тук подход, който включва използването на генетично близкородствени генотипове и комплекс от биохимични/молекулни маркери, ние търсим най-надеждния/те маркер/и, по който да разграничим отговора дори и на генетично близкородствени генотипове. Според Xiao et al. (2008) различните генотипове развиват различни стратегии за адаптиране към естествените им местообитания при засушаване. Такава стратегия е повишената пролинова акумулация, която често се използва като маркер за повишена толерантност към засушаване (Turkan et al., 2005; Valifard et al., 2012; Pandey and Chakraborty, 2015). Дори и близкородствени, изследваните генотипове показват разлика в отговора, изразена като нива на пролин. Добруджански 2 и Добруджански 7 са с по-високи нива на пролин и вероятно това е един от защитните механизми, осигуряващи по-голямата им способност да се справят със засушаването, в сравнение с Добруджански ран.

На базата на литературните данни и полученото от нас, може да се обобщи, че пролинът може да бъде използван като надежден маркер, както за отдалечени в генетично отношение генотипове, така и за близкородствени генотипове.

Следващият изследван биохимичен параметър са редуциращите захари. Известно е, че акумулацията на редуциращи захари може да се разглежда, както като растителен отговор към условията на стрес, така и като защитен механизъм на растенията. Нашите резултати за редуциращи захари, измерени веднага след засушаването показваха повишено съдържание на захари при Добруджански 2 и Добруджански ран, и сравними с контролните нива- Добруджански 7. Чрез Two way ANOVA анализа е установено, че около 50% (51.70 %, $p < 0.0001$) от ефекта се дължи на концентрацията на ПЕГ, (19.64%)- на ролята на генотипа, и взаимодействието между двата фактора е 14.36%, $p = 0.0007$. При изследване на отдалечени в генетично отношение генотипове, редуциращите захари могат да се използват за разграничаване на отговора (Naser et al., 2010; Padmavathi and Rao, 2013; Yang et al. 2015). Известно е, че по-толерантните генотипове не реагират на “лекият стрес” от засушаване с повишаване на редуциращите захари (Xiao et al., 2008). Вероятно в нашето изследване, Добруджански 7 е по-малко чувствителен към стрес, предизвикан от двете използвани концентрации. Редуциращите захари не могат да се препоръчат като маркер, който да разграничи отговора на генетично близкородствени генотипове, тъй като лекият стрес от засушаване, индуцира леко повишени нива на захарите в трите генотипа.

Следващите изследвани параметри са фотосинтетичните пигменти. Намаленото хлорофилно съдържание е индикация за окислителен стрес (Mohammadkhani and Heidari, 2008; Anjum et al., 2011c; Li et al., 2013; Fan et al., 2017).

Известно е, че каротеноидите предпазват хлорофилите от фотоокисление и са част от не-ензимната антиоксидантна система (Peterman et al., 1995; Mohammadkhani и Heidari, 2008). Веднага след засушаване ние, получаваме повишени нива на общи хлорофили (a+b), хлорофил а и хлорофил b и общи каротеноиди и при трите генотипа. Въпреки, че отчитаме повишени нива за тези параметри, и при трите генотипа не се наблюдава разлика в биохимичния отговор. При хлорофилите, Two-way ANOVA анализът показва, че ефекта на концентрацията е по-добре изразен (40,64%, $p < 0,0001$) в сравнение с влиянието на

генотипа (3,67%, $p=0.5420$). Ето защо общите хлорофили (a+b), хлорофил а и хлорофил b и общите каротеноиди, не позволяват разграничаването на биохимичния отговор на използваните от нас генетично близкородствени генотипове.

Следващият изследван параметър при тези условия е съотношението на хлорофил a/b. Известно е, че хлорофилното съотношение a/b се променя при наличие на окислителен стрес (Ashraf et al., 1994; Kitajima and Hogan 2003; Farooq et al., 2009). Според някои автори, хлорофилното съотношение се увеличава в зависимост от продължителността на стреса и в зависимост от генотипа (Lui et al., 2011). Известно е, че редуцията на хлорофилното съотношение се дължи на повишаването на хлорофил b (Sapeta et al., 2013; Yang et al, 2015; Fan et al., 2017). При нашите експериментални условия хлорофилното съотношение a/b и при трите генотипа не показва промени (Таблица 7). Отговорът на трите генотипа е подобен. На базата на получените резултати по този показател и литературните данни, предполагаме, че двете концентрации ПЕГ, които сме използвали (8 и 16% ПЕГ) предизвикват лек/умерен стрес от засушаване. Ето защо не се наблюдават промени в хлорофилното съотношение.

Молекулен маркер за сравняване на окислителния стресов отговор в генотипове и много надежден ранен маркер за стрес предизвикан от фактори от околната среда са HSP70B (Chankova et al., 2013; 2014; Chankova and Yurina, 2016). Молекулният параметър, който показва разлика в отговора на трите генетично близкородствени генотипа е съдържание на топлинно стресови белтъци-HSP70B. В условията на експериментална схема 1 (Фиг. 12) се наблюдава индукция на HSP70B само при Добруджански 7 и Добруджански ран (само след третиране с 16 % ПЕГ), а при Добруджански 2 липсва такава. Експериментално получените данни се потвърждават и статистически (Two-way ANOVA анализ, с посттест Bonferroni показана). Ефектът на генотипа е най-добре изразен (34.47% of the total variation 57.77%, $p<0,0001$) в сравнение с ефекта на концентрацията ПЕГ (13.51% of the total variation 57.77%, $p=0,0004$) и взаимодействието на двата фактора (9.79% of the total variation 57.77%, $p=0,0168$). Получените резултати потвърждават предишни изследвания, че акумулацията на HSP70B би могла да се използва като ранен и надежден маркер за индуциран от ПЕГ окислителен стрес (Chankova et al., 2013; 2014; Chankova and Yurina, 2016), който позволява разграничаване на стресовия отговор, дори при генетично близкородствени генотипове.

На базата на експериментално получените данни, от използвания комплекс от маркери, единствено пролина и HSP70B биха могли да се препоръчат, като маркери за разграничаване на биохимичния и молекулен отговор, дори на генетично близкородствени генотипове.

Целта на втората експериментална схема беше да се намерят биохимични и молекулни маркери за разграничаване на адаптивния потенциал на генетично близкородствени генотипове. На базата на получените резултати от тези изследвания беше направен опит да се сравни адаптивният потенциал на трите генотипа, както и да се провери дали умереният стрес от засушаване би увеличил адаптивния потенциал на растенията към UV-B облъчване.

При тези експериментални условия са установени статистически доказани разлики в конститутивните нива, между генотиповете само по показателите пролин и редуциращи захари (таблица 8). Липсата на установени статистически доказани разлики в конститутивните нива, между генотиповете, по всички останали, изследвани параметри, при тези експериментални условия, потвърждава тяхната близка генетична родственост.

Известно е, че повишените нива на МДА и общи пероксиди са показатели за наличие на окислителен стрес. Има данни, че за формиране на крайния биологичен отговор, значение има продължителността на стресовия фактор, периода на възстановяване и спецификата на анализирания орган (Filippou et al., 2011; Dwivedi et al., 2015; Yang et al., 2015). След десет дневен възстановителен период, след премахване действието на засушаването (с 16% ПЕГ), облъчването и комбинираното въздействие нивата на МДА и общи пероксиди, са близки до контролните (Фиг. 13, 14) и при трите генотипа. Чрез Two-way ANOVA анализ не е установен ефект на третирането, ефект на генотипа, и ефект на взаимодействието между тях, и по двата параметъра. В нашите условия периодът на стрес е кратък. Ние предполагахме, че десет дневният възстановителен период е достатъчен генотиповете да преодолеят окислителния стрес, предизвикан от самостоятелните и комбинирани въздействия. Поради този факт не бихме могли да препоръчаме двата параметъра МДА и пероксиди за анализ на адаптивния потенциал.

Следващият изследван параметър и в тази експериментална схема е пролинът. Както беше споменато по-горе, повишени нива на пролин се наблюдават след въздействие с различни абиотични фактори (Irogoyen et al., 1992; Carletti et al., 2003; Verbruggen and Hermans, 2008; Mahdavian et al., 2008; Mohammadkhani and Heidari, 2008; Rajabbeigi et al., 2013; Dwivedi et al., 2015) и са един от защитните механизми на растенията срещу окислителен стрес (Balakumar et al., 1992; Carletti et al., 2003; He et al., 2011; Dwivedi et al., 2015). В нашите експериментални условия, дори след десет дневен възстановителен период е установена вариабилност в нивата на пролин, в зависимост от генотипа и вида на въздействието (Фиг. 15). Единствения генотип, който реагира с високи нива на пролин след десет дневния възстановителен период, след засушаването и UV-B облъчването е Добруджански 7. При другите два генотипа са установени по-ниски/близки до контролните стойности след всички самостоятелните въздействия. Когато двата стресови фактора са комбинирани се наблюдава същата тенденция. Two-way ANOVA анализа, показва, че ефектът на генотипа е сравнително по-добре изразен (46,70 %, $p < 0,0001$) в сравнение с ефекта на въздействията (13,45 %, $p < 0,0001$) и ефекта на тяхното взаимодействие (31,47 %, $p < 0,0001$). На базата на получените резултати за пролиново съдържание след възстановителен период и на литературните данни за защитната роля на пролина, ние предполагахме, че високите нива на пролин, десет дни след премахване на въздействията, при Добруджански 7 е един от защитните му механизми. От всичко казано до тук може да се обобщи, че пролинът е надежден биохимичен маркер, който успешно би могъл да се използва като маркер в разграничаването на адаптивния потенциал.

Има данни, че натрупването на осмолити, като редуциращите захари е един от механизмите на генотиповете да реагират и се адаптират към засушаването (Naser et al., 2010; Padmavathi and Rao, 2013; Yang et al., 2015). В нашите условия, десет дни след премахване действието на засушаването, облъчването и комбинираното въздействие, трите генотипа са с близки до контролните нива на редуциращи захари, и не доказани статистически разлики с контролите ($p < 0,5$) (Фиг. 16). Съществува връзка между съдържанието на редуциращи захари, периода на въздействие и периода на възстановяване, но изследванията по този параметър са недостатъчни и за пълното изясняване на приноса на редуциращите захари в изработване на адаптивния потенциал на генетично близкородствени генотипове след комбинирано въздействие са необходими допълнителни проучвания.

Следващите изследвани параметри са фотосинтетичните пигменти. Yang et al. (2015) установява, че след пет дневен период на възстановяване от дълготраен стрес от засушаване, общото хлорофилно съдържание, хлорофил а, хлорофил b, хлорофилно съотношение и общи каротеноиди почти се връщат до контролното състояние. Нашите резултати са в съгласие с установените тенденции от тези автори и потвърждават изказаното от тях предположение, че връщането до контролното състояние на тези параметри, се дължи на факта, че стресовите въздействия не водят до трайни увреждания на листната фотохимична система и вероятно възстановителният период е достатъчен за преодоляване на въздействията. За съжаление данните в литературата са противоречиви. Има и данни, че период на възстановяване от две седмици, не е достатъчен за пълно възстановяване на негативните ефекти на приложения стрес (Esmaelipour et al., 2015). При тези изследвания от значение са много фактори-генотипа, силата на стресовия фактор, периода на възстановяване и т.н. Two-way ANOVA анализът потвърждава експериментално получените данни за тези параметри (няма установен ефект на въздействието, ефект на генотипа и ефект на взаимодействието между тях). Вероятно в нашите условия, възникналите повреди са възстановени след десет дневния възстановителен период. Вероятно фотосинтетичните пигменти при тези експериментални условия не биха могли да послужат за маркер за оценка на адаптивния потенциал на генетично близкородствени генотипове.

В експериментална схема 2 са изследвани и два основни антиоксидантни ензима супероксид дисмутаза и каталаза. Според ензимната номенклатура на Комитета по номенклатурата на Международния съюз по биохимия и молекулярна биология (NC-IUBMB), ензимите супероксид дисмутаза и каталаза се отнасят към ензимите оксиредуктази. В това изследване е отчитана специфичната активност на супероксид дисмутазата и каталазата десет дни след самостоятелно и комбинирано въздействие. СОД активността се увеличава в условия на стрес (Yazici et al., 2007; Mishra et al., 2009; Zu et al., 2011). След възстановителен десет дневен период, след премахване на засушаване, облъчване и комбинирано въздействие са наблюдавани повишени нива на СОД, както и вариабилност в нивата на СОД активността при трите близкородствени генотипа. При къпина са установени по-високи от контролните нива на СОД, след 5-дневен възстановителен период от дълготрайно засушаване (Yang et al., 2015). Тези високи нива на СОД дори след възстановителен период се дължат на невъзможност на къпината да преодолее стреса от засушаване. Добруджански 2 е с най-високи нива на СОД, десет дни след възстановяване от засушаването, докато Добруджански 7 и Добруджански ран са с близки до контролните нива. Вероятно за този десет дневен период Добруджански 7 и Добруджански ран преодоляват стреса от засушаване. Проведеният Two-way ANOVA анализ установява, че ефектът на взаимодействието между генотипа и въздействието е по-силно изразен (40,87 %, $p < 0,0001$) в сравнение с ефекта на въздействието (35,60 %, $p < 0,0001$) и ефекта на генотипа (15,74 %, $p < 0,0001$). Известно е, че влияние в нивата на СОД оказва, както експерименталния дизайн, така и използвания генотип (Yang et al., 2015; Dwivedi et al., 2015). Трите генотипа са близкородствени, но се наблюдава вариабилност в нивата на СОД. Използваният от нас стрес от засушаване е само 24 часа, в сравнение с този при (Yang et al., 2015).

От друга страна UV-B облъчването не води в промени в нивата на СОД при Добруджански 2, докато при Добруджански 7 и Добруджански ран, те са повишени, дори и след десет дни. Добруджански 2 и Добруджански 7 отговарят по различен начин на

засушаването и UV-B облъчването. Засушаването е по-силния стресов фактор (по-високи нива на СОД), в сравнение с UV-B облъчването, при Добруджански 2, докато при Добруджански 7 наблюдаваме обратната зависимост-UV-B облъчването е по-силния стресов фактор.

Според Caverzan et al. (2016), повишените нива на СОД не са единственият фактор, който определя нивото на толерантност, тъй като в растителната стрес толерантност участват много фактори, както и различни генни пътища. Когато двата фактора са комбинирани, нивата на СОД също са повишени в различна степен, в зависимост от генотипа. Ние предполагаме, че в комбинирания вариант, умерения стрес от засушаване променя адаптивния потенциал на генотиповете към UV-B облъчване. Поддържаните високи нива на СОД, десет дни след премахването на въздействието, служат за по-добра адаптация на Добруджански 7 в сравнение с Добруджански 2 и Добруджански ран, като влияние оказва и сложността на механизмите на растителна толерантност при комбиниране на въздействията.

Следващият изследван изследван параметър в експериментална схема 2 е каталазна активност. Известно е, че каталазната активност се увеличава в условия на стрес (Alexieva et al., 2001; Yazici et al., 2007; Mishra et al., 2009; Zu et al., 2011; Basahi et al., 2014; Köhler et al., 2017). По този показател отново се наблюдава вариабилност в зависимост от генотипа и от въздействието. Повишена каталазна активност е измерена десет дни след премахване на засушаването, облъчването и комбинираното въздействие само при Добруджански ран, докато при Добруджански 2 и Добруджански 7-са измерени близки до контролните нива. Интересното в нашата експериментална схема е, че тези нива остават повишени дори и десет дни след стреса и вероятно са един от защитните механизми на Добруджански ран. При този генотип UV-B облъчването е по-силният стресов фактор в сравнение със засушаването. В комбинирания вариант (16% ПЕГ+500 J/m²), лекия/умерения стрес от засушаване увеличава адаптивния потенциал на Добруджански ран. На базата на Two-way ANOVA анализ е установено, че ефектът на въздействието е по-силно изразен (43,85 %, $p < 0,0001$) в сравнение с ефекта на генотипа (8,44 %, $p < 0,0001$). Не е установен доказан ефект на взаимодействие между генотипа и въздействията (22,01 %, $p > 0,5$).

Молекулният маркер използван и в експериментална схема 2 е съдържание на топлинно стресови белтъци (HSP70B). Установено е, че HSP70B е много надежден маркер за стрес предизвикан от околната среда (Chankova et al., 2013; Chankova and Yurina, 2016). При предишни изследвания в нашата лаборатория с други генотипове и при други експериментални условия е установено, че по-високите конститутивни нива и свръхпродукцията на HSP70B при *Chlorella vulgaris*, позволяват на този генотип да оцелее в екстремни антарктически условия (Chankova et al., 2013). От друга страна, високите индуцирани нива на HSP70B са бърз стресов отговор, който обикновено се идентифицира на 2-ия/4-ия час след въздействието на стресовия фактор (Chankova et al., 2009). В експериментална схема 2 се наблюдават по-високи индуцирани нива на HSP70B, след десет дневен възстановителен период след премахване на въздействията. Няма установени статистически доказани разлики с контролите и при трите генотипа, десет дни след премахване на засушаването. Въпреки, че изследваните генотипове са близкородствени, по този показател, дори и след 10 дни, след премахване на облъчването и комбинираното въздействие е отчетена разлика в адаптивния потенциал на изследваните генотипове. Според Hazlina et al. (2013), съдържанието на стрес протеини веднага след въздействието, както и след период на възстановяване, е индикация за наличие на защитни механизми при

водораслите. Нивата на HSP70B, остават високи при Добруджански 2 и Добруджански ран, дори след възстановителен период от десет дни след облъчването и комбинираното въздействие. На базата на експериментално получените данни за нива на HSP70B, измерени след възстановителен период от десет дни и установеното от Chankova et al., (2009), че HSP70B са бърз стресов отговор /идентифициран на 2-ия/4-ия час/ след въздействието на стресовия фактор, HSP70B биха могли да се препоръчат като надежден маркер за оценка на адаптивния потенциал на генетично близкородствени генотипове, както и като маркер за оценка на възстановителните процеси, след премахване на стресовите фактори. Според Hazlina et al. (2013) високото съдържание на HSP70B подпомага възстановяването на увредените протеини, и възстановителните процеси, протичащи след стреса. Получените по-високи нива на HSP70B, десет дни след UV-B облъчването, при Добруджански 2 и Добруджански ран, са индикация, че по-силният стресов фактор за Добруджански 2 и Добруджански ран е облъчването, отколкото засушаването.

Високите нива на HSP70B са индикация за наличие на защитни механизми (Wahid et al., 2007; Timperio et al., 2008; Hazlina et al., 2013; Chankova and Yurina, 2016). Ние предполагаме, че трите генотипа активират различни защитни механизми след десет дневен възстановителен период. В комбинираните варианти лекият стрес от засушаване води до адаптация в определена степен и в тези варианти, лекият стрес от засушаване увеличава адаптивния потенциал на Добруджански 2 и Добруджански ран, в сравнение със самостоятелното засушаване. За десет дневен възстановителен период, Добруджански 7 успява да преодолее комбинирания стрес в голяма степен. Чрез Two-way ANOVA анализ е потвърдено, че ефектът на генотипа е по-добре изразен (43,23 %, $p < 0,0001$) в сравнение с ефекта на въздействието (19,91 %, $p < 0,0001$) и взаимодействието между тях (23,46 %, $p < 0,0001$).

На базата на получените данни по двете експериментални схеми, пролинът и HSP70B биха могли да се препоръчат като надеждни маркер за разграничаване на биохимичния/молекулен отговор и на адаптивния потенциал дори при генетично близкородствени генотипове.

Също така от получените експериментално резултати в схема 2, чрез използвания комплекс от показатели, може да се обобщи, че по-силния екологичен фактор и при трите генотипа е UV-B облъчването, в сравнение със засушаването (Добруджански 2: СОД активност-по-силен екологичен фактор е засушаването, в сравнение с UV-B облъчването; HSP70B-UV-B облъчването е по-силен екологичен фактор, в сравнение със засушаването; Добруджански 7: СОД активност, пролин-по-силен екологичен фактор е UV-B облъчването в сравнение със засушаването; Добруджански ран: HSP70B, СОД и каталазна активност-по-силен екологичен фактор е UV-B облъчването, в сравнение със засушаването).

Друго заключение, което може да се направи в резултат на експериментално получените данни по схема 2 и от използвания комплекс от биохимични и молекулни параметри, като маркери за адаптивен потенциал, за разграничаване на близкородствени генотипове биха могли да се препоръчат пролин, СОД активност, каталазна активност и HSP70B.

В експериментална схема 2 беше направено допълнително математическо изследване на резултатите от биоинформатик, тъй като от комплекса използвани маркери, само за маркерите пролин, СОД активност, каталазна активност и HSP70B се получиха

статистически значими разлики. След допълнителна математическа обработка на експериментално получените данни, като маркери за адаптивен потенциал на генетично близкородствени генотипове са препоръчани пролин, редуциращи захари, СОД активност, каталазна активност и HSP70B.

За всеки отделен генотип е установен комплекс от маркери, които да се използват в комбинация и самостоятелно. За Добруджански 2 комплекса от маркери за адаптивен потенциал, включва-пролин, редуциращи захари, топлинно стресови белтъци и СОД активност. Маркер, който може да се използва самостоятелно за Добруджански 2 са редуциращите захари. Тези данни противоречат на експериментално получените данни за редуциращи захари. При математическите изследвания, чрез Булевата алгебра са използвани комбинации от различни маркери, независимо от показаната статистическа достоверност. При този подход са използвани различни комбинации от маркери, за установяване на значими разлики. Булевата алгебра е приложима за случаи, при които съществуват маркери, които сами по себе си не дават добри статистически резултати. Такъв маркер са редуциращите захари. Полученото за този параметър може да се продължи в допълнително и по-детайлно математическо изследване, но за целите на настоящия дисертационен труд не е необходим този подход.

На базата на експерименталните данни и стандартният пост-тест при ANOVA анализите-Tukey's HSD, се установи, че при тези условия редуциращите захари не са показателни като маркер за адаптивен потенциал, тъй като трите генотипа реагират по подобен начин след десет дневния възстановителен период /няма статистически доказани разлики с контролните нива/. Ето защо комплексът от маркери за определяне на адаптивен потенциал при Добруджански 2, включва пролин, топлинно стресови белтъци и СОД активност и няма маркер, който може да се използва самостоятелно, само за този генотип. При Добруджански 7, комплексът от маркери за определяне на адаптивен потенциал включва пролин, топлинно стресови белтъци и СОД активност. При Добруджански ран-комплекс от маркери за адаптивен потенциал са СОД активност, каталазна активност и топлинно стресови белтъци, а маркер, който може да се използва самостоятелно е каталазната активност.

Когато се комбинират експериментално получените данни и математически получените данни, може да се обобщи, че комплексът от маркери за адаптивен потенциал на генетично близкородствени генотипове обикновен фасул, включва пролин, СОД активност, каталазна активност и HSP70B.

До

Декларация за оригиналност

от

Цвета Владимирова Ангелова

Във връзка с провеждането на процедура за защита на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор” в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, еднозначно декларирам:

Резултатите, обсъжданията и изводите в научната продукция, които предоставям в процедурата, са оригинални и не са заимствани без цитиране от изследвания и публикации, в които нямам участие.

Декларатор: Цвета Ангелова

С уважение:

Изводи

А. Изводи с потвърдителен характер:

1. Установено е, че лекият до умерен стрес, индуциран от 8% и 16% ПЕГ не предизвиква сериозни мембранни увреждания в изследваните от нас генотипове.
2. Установено е, че Pro и HSP70B са надеждни маркери за биохимичен/молекулен отговор към окислителен стрес дори при генетично близкородствени генотипове.
3. Засушаването в лабораторни условия повишава нивата на общи пероксиди и при трите генотипа, но този биохимичен параметър не разграничава ясно отговора на трите близкородствени генотипа. Този показател би бил информативен само в случай на ясно различаващи се по чувствителност/устойчивост генотипове към засушаване.
4. Свръхпродукцията на пролин и HSP70B може да се използват като надежден маркер за оценка на адаптивния потенциал дори при генетично близкородствени генотипове.
5. Установено е, че използваните от нас генетично близкородствени генотипове се различават по адаптивен потенциал и по защитни механизми (защитен механизъм за Добруджански 2- HSP70B, СОД активност; Добруджански 7-пролин, СОД активност; Добруджански ран - HSP70B, СОД активност, каталазна активност).
6. На базата на комплекс от маркери е установено, че UV-B действа като посилен стресов фактор в сравнение със засушаването в условията на експериментална схема 2.
7. Получени са потвърдителни резултати в подкрепа на съществуващото предположение, че лекият до умерен стрес от засушаване, може да увеличи адаптивния потенциал към друг стресов фактор, в случая UV-B облъчване.
8. Установена е, съществената роля на генотипа, лекия/умерен стрес от засушаване увеличава адаптивния потенциал генотиповете към UV-B облъчване, включвайки различни защитни механизми (Добруджански 2 и Добруджански ран-свръхпродукцията на HSP70B; Добруджански 7-свръхпродукция на пролин).

Б. Изводи с оригинален характер:

1. Комбинирането на биологични и статистически/математически (ANOVA /Excel/, Analysis ToolPak /Excel/, Булева алгебра) методи на експерименталните данни е добър подход, който може да се използва за анализ на адаптивен потенциал на генетично близкородствени генотипове.
2. Приложената от нас експериментална схема 2, позволява да се получи нова информация за участието на HSP70B във възстановителните процеси, протичащи след отстраняване на стресовия/те фактор/и.

Приноси

1. Разработен е нов подход за оценка на стресовия отговор и адаптивния потенциал на клетките/организмите на базата на близкородствени в генетично отношение форми.
2. Пролин и HSP70B могат да бъдат препоръчани като надеждни маркери за идентифициране на генетично близкородствени генотипове в различни експериментални условия /веднага след стрес и след възстановителен период/.

3. Комбинирането на експериментално получените данни, включващи комплекс от биохимични/молекулни маркери (пролин, HSP70B, СОД и катазна активност) с математически методи може да бъде препоръчано за получаването на по-надеждна информация, свързана с адаптивния потенциал на генотиповете.

Списък на участията в научни форуми с доклади, отразяващи изследванията по дисертацията

Ts. Angelova, Z. Mitrovska, P. Parvanova, S. Chankova. Biochemical responses of three genotypes of *Phaseolus vulgaris* L. to single and combined treatment with polyethylene glycol and UV-B irradiation. Seminar of Ecology - 2016 with international participation, 21-22 April, Sofia.

Angelova T., Simeonova V., Parvanova P., S. Chankova. Genotypes susceptibility and adaptive potential of *Phaseolus vulgaris* L. to drought stress. III-та международна КОНФЕРЕНЦИЯ „ХРАНИ“, НОВ БЪЛГАРСКИ УНИВЕРСИТЕТ, СОФИЯ, 23 - 25 МАРТ, 2017 г.

Tsveta Angelova and Stephka Chankova. Adaptive potential of two *Phaseolus vulgaris* L. genotypes to single and combined PEG and UV-B treatments. Seminar of Ecology - 2017 with international participation, 27-28 April, Sofia.

Angelova Ts., V. Simeonova, Z. Mitrovska, S. Chankova. Biological and statistical comparison of experimental results - good approach for analyzing adaptive potential of genetically closely related genotypes. Seminar of Ecology-2018 with international participation, 26-27 April, Sofia.

Списък на публикациите по темата на дисертацията

Angelova Ts., P. Parvanova, D. Miteva, S. Chankova (2017). Set of reliable markers for the evaluation of drought induced stress in *Phaseolus vulgaris* L. genotypes. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 70 (10), 1411-1420.

Angelova Ts., V. Simeonova, P. Parvanova, S. Chankova. Genotype's susceptibility and adaptive potential of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes to drought stress. Сборник на III-та международна конференция „ХРАНИ“, НБУ, СОФИЯ, 23 - 25 Март, 2017 (приета за печат).

Angelova Ts. and S. Chankova. Adaptive potential of two *Phaseolus vulgaris* L. genotypes to single and combined PEG and UV-B treatments. Seminar of Ecology-2017 with international participation, Proceedings, 27-28 April, Sofia, Bulgaria, 79-88. ISBN:979-853-476-132-4.

Biochemical and molecular markers for genotype's susceptibility to oxidative stress

Tsveta Vladimirova Angelova
Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences,
2 Gagarin Street, 1113 Sofia, Bulgaria
PhD Thesis

Sofia, 2018

In the recent years drought and UV-B becoming more harmful to worldwide agro ecosystems. During the evolution plants have developed different adaptive mechanisms to cope with drought and UV-B irradiation. Some data illustrate that plants response to UV-B irradiation, or drought highly depends on genotype, plant tissue, developmental stage and/or interactions among environmental factors. The mechanisms of sensitivity/tolerance of crop plants to drought and UV-B are still not completely known. Therefore, clarification of these mechanisms is needed for their better understanding.

Generally, the main approach for assessment of stress response and adaptive potential of cells/organisms to abiotic stress includes mutant forms that differ in their sensitivity/resistance to oxidative stress, genotypes from contrasting habitats or transgenic plants. In the present work we propose another approach. Here we hypothesize that genetically closely related genotypes would have approximately similar stress response and adaptive potential to inducers of oxidative stress. To check our hypothesis a complex of biochemical/molecular markers were used.

The **aim** of the present study was to analyze and to compare: 1) biochemical/molecular response of three genetically closely related genotypes common bean (*Phaseolus vulgaris* L) to drought induced oxidative stress; 2) the adaptive potential of three genetically closely related genotypes, ten days after the removal of single and combined treatment with drought and UV-B. To elaborate a complex of biochemical and molecular markers for the evaluation of genotype's susceptibility to oxidative stress induced by single and combined drought and UV-B light. As a model system, three local genotypes of *P. vulgaris* L. were used: Dobrudjanski 2, Dobrudjanski 7 and Dobrudjanski ran. Previously, based on molecular analyses it was found that they are genetically closely related. Two experimental schemes were used: 1) PEG treatment on the third-leaf phase; 2) single and combined PEG and UV-B treatment at cotyledon phase. Several commonly used biochemical and molecular parameters as malondialdehyde (MDA), total peroxides (Pox), proline (Pro), reducing sugars (RS), photosynthetic pigments (total chlorophylls ($a+b$), chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total carotenoids, chlorophyll a/b ratio), heat shock proteins (HSP70B), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were assessed. Measurements were carried out immediately after the treatment and after ten days recovery time at physiological conditions. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison posttests, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison posttest (GraphPad Prism 6.04 software, San Diego, USA), ANOVA (EXCEL 2007) and Analysis ToolPak were applied to assess differences among samples. To identify the most reliable marker/s statistical data were summarized with Boolean algebra. Further possible combinations were analyzed using Boolean operators AND, OR, XOR. Our results indicate that drought simulated by polyethylene glycol (PEG) resulted in an increase of all tested parameters (MDA, Pox, Pro, RS, total chlorophylls ($a+b$), chlorophyll *a*,

chlorophyll *b*, total carotenoids, HSP70B). Pro and HSP70B were the only parameters strongly enhanced after PEG treatments depending on the genotype. There is no change in chlorophyll *a/b* ratio just after the treatment and after ten days recovery time. Different genotype response was established concerning content of Pro, SOD activity, CAT activity and HSP70B, even ten days after single and combined treatments. On the other hand, genotypes response was similar (no effect of the genotype) ten days after the removal of single and combined, PEG and UV-B treatment measured as MDA, Pox, RS, total chlorophylls, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids. Despite the fact that genotypes are genetically closely related they differ in their adaptive potential and the main protective strategies (Pro, HSP70B, SOD and CAT activity). Pro accumulation probably is one of protective mechanisms for Dobrudjanski 7 and HSP70B for Dobrudjanski 2 and Dobrudjanski ran.

Confirmatory conclusions: 1. It was found that mild/moderate stress induced by both PEG concentrations of 8% and 16% does not cause serious membrane damage in investigated genotypes.

2. It was found that Pro and HSP70B are reliable markers for the evaluation of the magnitude of biochemical/molecular response to oxidative stress even in genetically closely related genotypes.

3. Simulated in lab conditions drought can increase the levels of Pox in three genotypes, but this biochemical parameter does not clearly distinguish the response of three closely related genotypes. This parameter would be informative only in cases when genotypes differ distinctly in their susceptibility to drought stress.

4. Overproduction of Pro and HSP70B could be used as reliable markers for assessment of adaptive potential even in genetically closely related genotypes.

5. It was established that genetically closely related genotypes used by us differ in their adaptive potential and protective mechanisms (Dobrudjanski 2- HSP70B, SOD activity; Dobrudjanski 7-Pro, SOD activity; Dobrudjanski ran-HSP70B, SOD and CAT activity).

6. The most pronounced stressful effect of UV-B was obtained in comparison with those of simulated drought stress using a complex of markers.

7. Supporting data were found that mild to moderate drought stress could increase the adaptive potential to another type of stress factor.

8. The role of the genotype was confirmed-the mild/moderate drought stress can provoke increased adaptive potential of genotypes involving different mechanisms-Dobrudjanski 2 and Dobrudjanski ran-overproduction of HSP70B; Dobrudjanski 7- overproduction of Pro.

Original conclusions: 1. Mutual use of experimental data and statistical/mathematical (ANOVA/Excel/Analysis ToolPak /Excel/Boolean Algebra) methods could be recommended as a good approach for the evaluation and comparison of the adaptive potential of genetically closely related genotypes.

2. New information revealing the contribution of HSP70B in recovery processes after the removal of stress factor (s) was obtained using experimental scheme 2.

Contributions: 1. A new approach was elaborated for the assessment of stress response and adaptive potential of cells/organisms based on genetically closely related genotypes.

2. Both Pro and HSP70B could be recommended as reliable markers to distinguish stress response and adaptive potential of genetically closely related genotypes.

3. Complex of biochemical/molecular markers (Pro, HSP70B, SOD activity, CAT activity) in a combination with mathematical methods could be recommended in order to obtain reliable information concerning adaptive potential of genotypes.

