



ТУАН АН ЧАН

**ЗАЩИТНА РОЛЯ НА АЗОТНИЯ ОКСИД
ВЪРХУ ФОТОСИНТЕЗАТА И АНТИОКСИДАНТНИЯ КАПАЦИТЕТ
НА ГРАХОВИ РАСТЕНИЯ ПРИ КАДМИЕВ СТРЕС**

АВТОРЕФЕРАТ

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

**Научна специалност
01.06.16. – Физиология на растенията**

СОФИЯ, 2013

Дисертацията е написана на 99 печатни страници и е онагледена с 2 снимки, 12 фигури и 4 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 328 източника.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на / /2013г. от.....часа в заседателната зала на Институт по физиология на растенията и генетика – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, на открито заседание на Научното жури, назначено със заповед на директора на ИФРГ – БАН № 397/22.05.2013г. в състав:

Вътрешни членове:

1. Проф. дн Лиляна Масленкова – ИФРГ – БАН
2. Проф. дн Лозанка Попова–Стаевска – научен ръководител

Външни членове:

1. Проф. дн Диана Петкова – ИБФБМИ – БАН
2. Проф. д-р Емилия Апостолова – ИБФБМИ – БАН
3. Доц. д-р Юлиана Марковска –БФ–СУ

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в библиотеката на Институт по физиология на растенията и генетика, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, стая 225 и на Web-страницата на Институт по физиология на растенията и генетика, БАН: <http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/>

ТУАН АН ЧАН

**ЗАЩИТНА РОЛЯ НА АЗОТНИЯ ОКСИД
ВЪРХУ ФОТОСИНТЕЗАТА И АНТИОКСИДАНТНИЯ КАПАЦИТЕТ
НА ГРАХОВИ РАСТЕНИЯ ПРИ КАДМИЕВ СТРЕС**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Научен ръководител: Проф. дбн. Лозанка Попова

Рецензенти: 1. Проф. дн Лиляна Масленкова

2. Доц. д-р Юлиана Марковска

Научна специалност

01.06.16. – Физиология на растенията

СОФИЯ, 2013

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря специално на научния си ръководител проф. дбн Лозанка Попова за всичко, на което ме научи през тези години, за ценните съвети и критични забележки, за търпението и огромната помощ при изготвяне на дисертацията.

Благодаря на колегите от секция “Фотосинтеза” за подкрепата и насърчаването при изработването на дисертацията, както и на колегите от другите секции от ИФРГ за оказваната помощ през годините.

Изказвам специални благодарности на доц. д-р Димитрина Недева, доц. д-р Валя Василева, д-р Русина Йорданова, д-р Петър Петров и на специалист Славка Паунова за любезната им съдействие и отзивчивост.

Благодаря на Фонд “Научни изследвания” при МОМН на Република България за осигуреното финансиране на проектите NTS –09-01676/2010 и СС 1505, което направи възможно изпълнението на изследванията.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

A	скорост на фотосинтезата
АКФ	активни кислородни форми
APX	аскорбатпероксидаза
CAT	каталаза
Gs	устична проводимост
МДА	малонилдиалдехид
POD	пероксидаза
PAGE	електрофореза в полиакриламиден гел
SNP	натриев нитропрусид
SOD	супероксид дисмутаза
Tr	транспирация
WUE	ефективност на използване на водата

I. УВОД

Качеството на околната среда е подложено на рискове от различен характер. Между най-важните от тях са последиците от замърсяването с токсични отпадъци, биотичните стресови фактори и резките климатични промени. В допълнение към индустриалното замърсяване/тежки метали, пестициди, отпадъци от преработката на горива/, глобалното затопляне и настъпващата повсеместно суша, се считат като едни от най-силно увреждащите продукцията от растенията. Нарастването на антропогенното въздействие върху природата води до проблеми в селското стопанство. От друга страна, нарастването на населението на планетата повишава нуждите от по-високи растителни добиви.

Тежките метали намират приложение в различни индустриални производства и са огромен източник на замърсяване на природата. Най-малко 20 метала са известни като токсични и повече от половината от тях, включително кадмий, мед, живак, никел, сребро и цинк, се отделят в околната среда в количества, които представляват риск за човешкото здраве.

Замърсяване на почвите с тежки метали е сериозен световен проблем, включително и за България. Нашите почви съдържат значително високо ниво на кадмий и мед. По официални данни около 36000 хектара земи са замърсени в различна степен с тежки метали. Основен проблем за специалистите е да локализируют “горещите зони” с най-висока плътност на населението и развито селско стопанство.

Същевременно трябва да се има предвид, че много от тежките метали се явяват като важни микроелементи в клетъчния метаболизъм и служат като структурни и каталитични компоненти на белтъци и ензими. Но натрупването им във високи концентрации влияе върху физиологичните процеси и води до намаляване на биомасата, листната площ, кореновото развитие, промени в азотния метаболизъм, инхибиция на фотосинтезата, на хлорофилния метаболизъм и на хлоропластната структура.

Кадмият е един от най-агресивните замърсители на въздуха, водите и почвите. Той е високо токсичен за растенията, животните и хората. Той лесно се поглъща чрез кореновата система и чрез ксилема се транспортира до листата.

Високото съдържание на кадмий индуцира генетични и биохимични промени в растителния метаболизъм, които се проявяват като общи, но и специфични стресови отговори.

За да балансират концентрациите на токсичните метали в клетките, всички организми са изградили защитни механизми, между които: биосинтез на нискомолекулни, богати на цистеин белтъци, известни като металотионини, мобилизация на фитохелатините или обезвреждането на тежките метали при натрупването им във вакуолите или в трихомите. Друг тип стратегия на растенията е използването на различни сигнални молекули за преодоляване на стресовите въздействия. Преживяването на растенията в условия на стрес зависи от тяхната способност да различават въздействията, да генерират и пренасят сигнали и да индуцират биохимични промени, които да настройват метаболизма в съответствие с тях. Ето защо, изследванията върху идентифицирането на сигнални молекули, които да медиат толерантност към различните видове стрес имат важно значение за по-доброто разбиране на механизмите на адаптация.

Азотният оксид е между малкото известни сигнални молекули, които са под формата на газ. Неговата висока реактивност и свободна дифузия през мембраните го прави идеален сигнал, който се предава между клетките и в самите клетки и опосредства връзката между стреса на околната среда и физиологичния отговор на растенията. Редица изследвания сочат, че той присъства в растенията и изпълнява разнообразни физиологични функции, като: влияние върху процесите на развитие и растеж, дихателен метаболизъм, зреене и стареене, а също и като медиатор между различни биотични и абитични стресове и отговорите на растенията към тях. Азотният оксид се класифицира като нетрадиционен фитохормон, който участва в регулацията на определени звена от генната експресия. Приложен екзогенно /под форма на различни донори/, той индуцира физиологични промени идентични или много близки с характеристиките, предизвикани от определено стресово въздействие. Следователно, този подход се явява надежно средство за разкриване на някои страни от механизмите на хормоналната регулация на основни физиологични процеси и същевременно дава отговор и на основни механизми на приспособителните реакции на растенията към стреса на околната среда. В този

смисъл, насочването на нашето изследване към изясняване на някои страни на физиологичния отговор на граховите растения към действието на азотния оксид е актуално и теоретично значимо. Перспективите на нашето изследване могат да се разглеждат във фундаментален и приложен аспект. В една по-далечна перспектива, разкриването на някои от посочените закономерности би подпомогнало опознаването на защитните механизми на растенията към определени стресови въздействия и би създало възможност да се влияе за по-пълното им реализиране.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия труд е да се изследва ролята на азотния оксид върху основни физиологични и биохимични показатели в грахови растения, да се установи дали този растежен регулатор е включен в индукцията на защитни отговори в условия на кадмиев стрес и да се тества хипотезата, че защитното действие на NO върху растежа и фотосинтезата е обусловено от действието му върху антиоксидантната защитна система.

За реализиране на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се изследват уврежданията на граховите растения, подложени на Cd стрес.
2. Да се изследват физиологичните и биохимични промени на граховите растения, третирани с SNP като донор на NO.
3. Да се изследва дали NO има защитно действие срещу Cd стрес и в тази връзка:
 - ❖ да се определят Cd-индуцираните нарушения в листата и възможната защитна роля на NO
 - ❖ да се изследват промените в липидното пероксидиране, електролитно изтичане и в нивата на H_2O_2 и пролин,
 - ❖ да се изследва ефекта на NO върху антиоксидантната ензимна защита в условия на Cd стрес,
 - ❖ да се определят промените в съдържанието на Cd в листата и корените на граховите растения, третирани с Cd и SNP.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал и условия на отглеждане

За обект на изследване беше използван грах (*Pisum sativum* L., сорт Ran), който се отличава с по-висока чувствителност към кадмиевия стрес.

Семената се поставяха за покълване върху влажна филтърна хартия на тъмно за 72 часа. Растенията се отглеждаха като водни култури в хранителна среда на Hogland-Arnon (1950) в климатична камера при условия: фотопериод 16/8 часа, интензитет на светлината $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, температура 22/18 °C (дневна/нощна) и влажност на въздуха- между 50 и 60%. Постановката включваше 6 варианта: (I): контрола (хранителен разтвор), (II): 500 μM SNP, (III): 1000 μM SNP, (IV): 25 μM Cd, (V): 500 μM SNP + 25 μM Cd, (VI): 1000 μM SNP + 25 μM Cd. Кадмият и SNP се добавяха към хранителния разтвор. Растенията бяха отглеждани при посочените условия в продължение на 12 дни.

Химикали: Кадмият беше под формата на CdCl_2 . SNP, cPTIO и CdCl_2 са продукти на фирмата Sigma-Aldrich (USA).

Експериментални методи

- ✓ **Биометрични показатели-** измерване на сухо тегло и дължина на корените и на надземната част на граховите растения
- ✓ **Микроскопски наблюдения** върху листната структура и морфология на устичния апарат и на епидермалните клетки
- ✓ **Определяне на съдържанието на пигменти-** по Arnon (1949)
- ✓ **Измерване на листния газообмен-** с портативна фотосинтетична система LCpro + (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK)
- ✓ **Определяне съдържанието на пероксиди-** по Jessup et al. (1994)
- ✓ **Определяне степента на липидно пероксидиране-** по Heath and Packer (1968)
- ✓ **Определяне съдържанието на свободен пролин-** по Bates et al. (1973)
- ✓ **Определяне степента на електролитно изтичане-** по Zhao et al. (2007)
- ✓ **Определяне съдържанието на разтворими белтъци-** по Bradford (1976)
- ✓ **Определяне на активността на супероксиддисмутаза (SOD)-** по Beauchamp and Fridovich (1971)
- ✓ **Определяне на активността на каталаза (CAT) -** по Aebi (1984)

- ✓ **Определяне на активността на гваякол пероксидаза (POD)-** по Polle et al. (1994)
- ✓ **Определяне на активността на аскорбат пероксидаза (APX)-** по Nakano and Asada (1981)
- ✓ **Едномерна електрофореза в полиакриламиден гел при неденатуриращи условия и анализ на изоформите и относителната ензимна активност след субстратна реакция в гела**
- ✓ **Изоформите и активността на SOD** бяха онагледени по метода на Beauchamp and Fridovich (1971)
- ✓ **Каталазната активност** беше определена по Clare et al. (1984)
- ✓ **Изоформите на APX** бяха визуализирани съгласно Mittler and Zilinskas (1991)
- ✓ **Гваякол специфичната пероксидазна активност** беше установена според Fielding and Hall (1978)
- ✓ **Определяне на съдържанието на Cd в корени и листа-** с помощта на атомно абсорбционен спектрометър
- ✓ **Статистическата обработка** на резултатите включва определяне на средната стойност и оценка на стандартното отклонение. Достоверността на разликите е определяна по критерия t на Student при различни нива на значимост: (*) $P \leq 0.05$; (**) $P \leq 0.01$; (***) $P \leq 0.001$

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. Ефект на Cd и NO върху растежа и развитието на граховите растения

Третираните с 25 μM Cd грахови растения се отличават с много забавен растеж и силно инхибирано развитие на надземната и коренови системи (снимки 1 и 2). Корените са удебелени и скъсени и без развити латерални разклонения, листното развитие е силно забавено (листните петури са дребни и с много малка площ), силно е понижено натрупването на сухо вещество (приблизително 2 пъти за прорастъците и 3 пъти за корените), (Таблица 1). Тези симптоми отсъстват при растенията, които са самостоятелно третирани с 500 и 1000 μM SNP. Едновременно присъствие на Cd и SNP преодолява частично негативния ефект на Cd, като действието е по-добре изразено при концентрация на SNP 1000 μM .



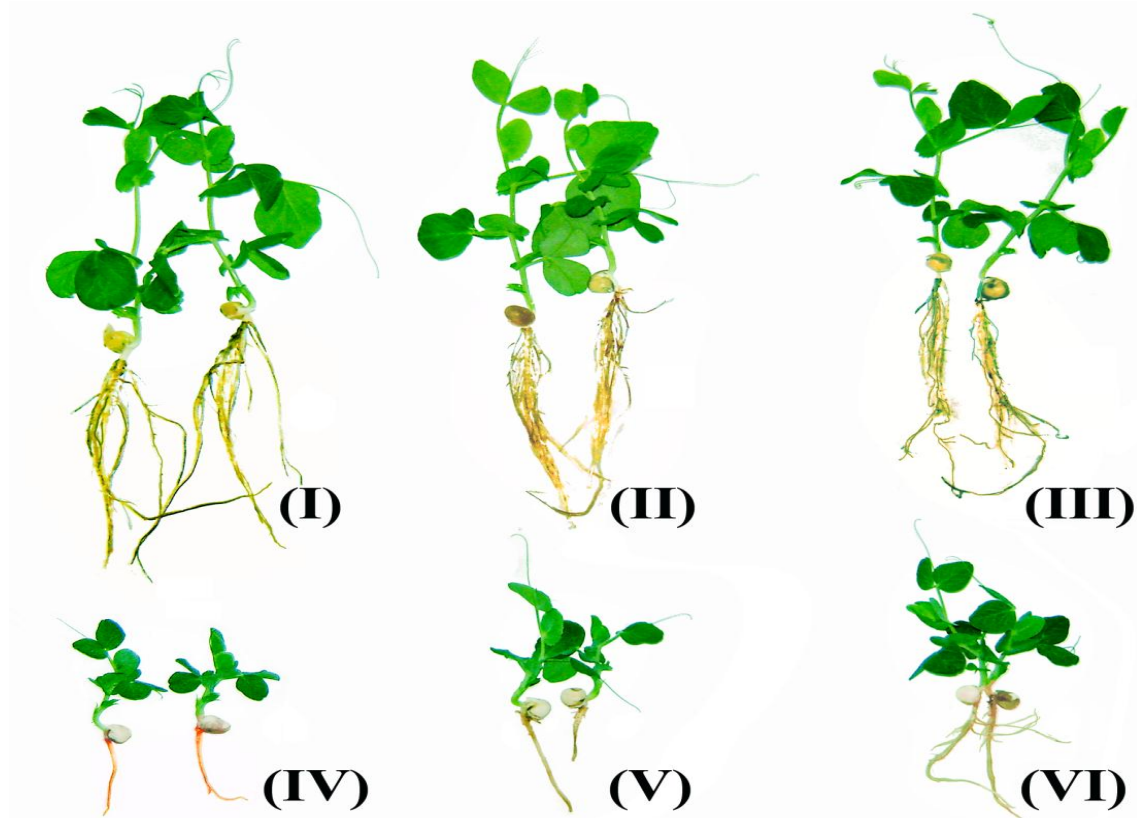
Снимка 1. Влияние на Cd и SNP върху растежа на граховите растения

Варианти: (K): контрола; (2): 500 μM SNP; (3): 1000 μM SNP; (4): 25 μM Cd; (5): 500 μM SNP + 25 μM Cd; (6): 1000 μM SNP + 25 μM Cd

Таблица 1. Влияние на Cd and SNP върху растежа и съдържанието на разтворим белтък и листни пигменти

Варианти	Дължина (cm)		Сухо тегло (g plant^{-1})		Разтворим белтък (mg g^{-1} FW)		Хлорофил (a + b) (mg dm^{-2})	Каротеноиди (mg dm^{-2})
	Прорастък	Корен	Прорастък	Корен	Прорастък	Корен		
Контрола	11.1 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 0.9	0.088 $\pm$ 0.009	0.034 $\pm$ 0.002	2.40 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.06	4.03 $\pm$ 0.14	0.36 $\pm$ 0.04
500 μM SNP	12.1 $\pm$ 0.6	16.9 $\pm$ 0.9	0.086 $\pm$ 0.007	0.040 $\pm$ 0.005	1.35 $\pm$ 0.02	1.31 $\pm$ 0.05	4.03 $\pm$ 0.14	0.34 $\pm$ 0.01
1000 μM SNP	11.0 $\pm$ 0.3	15.2 $\pm$ 1.2	0.094 $\pm$ 0.010	0.046 $\pm$ 0.004	2.95 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.02	4.18 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.04
25 μM Cd	4.3 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.7	0.048 $\pm$ 0.007	0.012 $\pm$ 0.002	5.25 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.02	5.41 $\pm$ 0.18	0.41 $\pm$ 0.03
500 μM SNP + 25 μM Cd	4.1 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.2	0.042 $\pm$ 0.007	0.012 $\pm$ 0.002	4.95 $\pm$ 0.01	1.28 $\pm$ 0.01	5.54 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.01
1000 μM SNP + 25 μM Cd	5.4 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.8	0.056 $\pm$ 0.007	0.022 $\pm$ 0.002	4.95 $\pm$ 0.03	1.35 $\pm$ 0.03	5.59 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.08

Данните са средни стойности от 4 независими експеримента $\pm$ SD



Снимка 2. Наблюдение върху корените и надземните органи

Варианти: (I): контрола; (II): 500 μM SNP; (III): 1000 μM SNP; (IV): 25 μM Cd; (V): 500 μM SNP + 25 μM Cd; (VI): 1000 μM SNP + 25 μM Cd

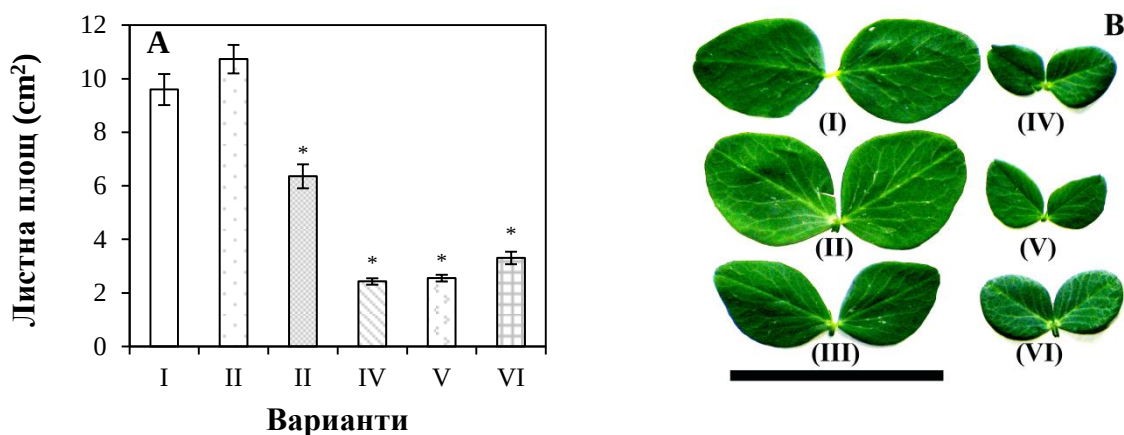
Докато ефектът от кадмиевия стрес е добре документиран в литературата, данните за влиянието на SNP върху растежа и развитието на растенията са оскъдни. Сочи се двупосочно поведение върху растежа (инхибиция или стимулиране), (Leshem and Haramaty, 1996), както и концентрационно изразена зависимост (Anderson and Mansfield, 1979). Подобни зависимости се откриват и по отношение на влиянието на SNP върху съдържанието на пигменти и белтък. Липсват данни относно защитната роля на NO върху процесите на растеж в условия на Cd - индуциран стрес.

IV. 2. Ефект на SNP и Cd върху анатомията на листата и морфологията на устичния апарат

Листна площ

Листният размер се разглежда като един от важните параметри при характеризиране на процесите на растеж и развитие. В нашите експерименти

стойностите на този показател са най-ниски в третираните с 25 μM Cd грахови растения (Fig. 1A и B). Негативният ефект на Cd върху този показател е частично преодолян при вариантите с присъствие на 1000 μM SNP.

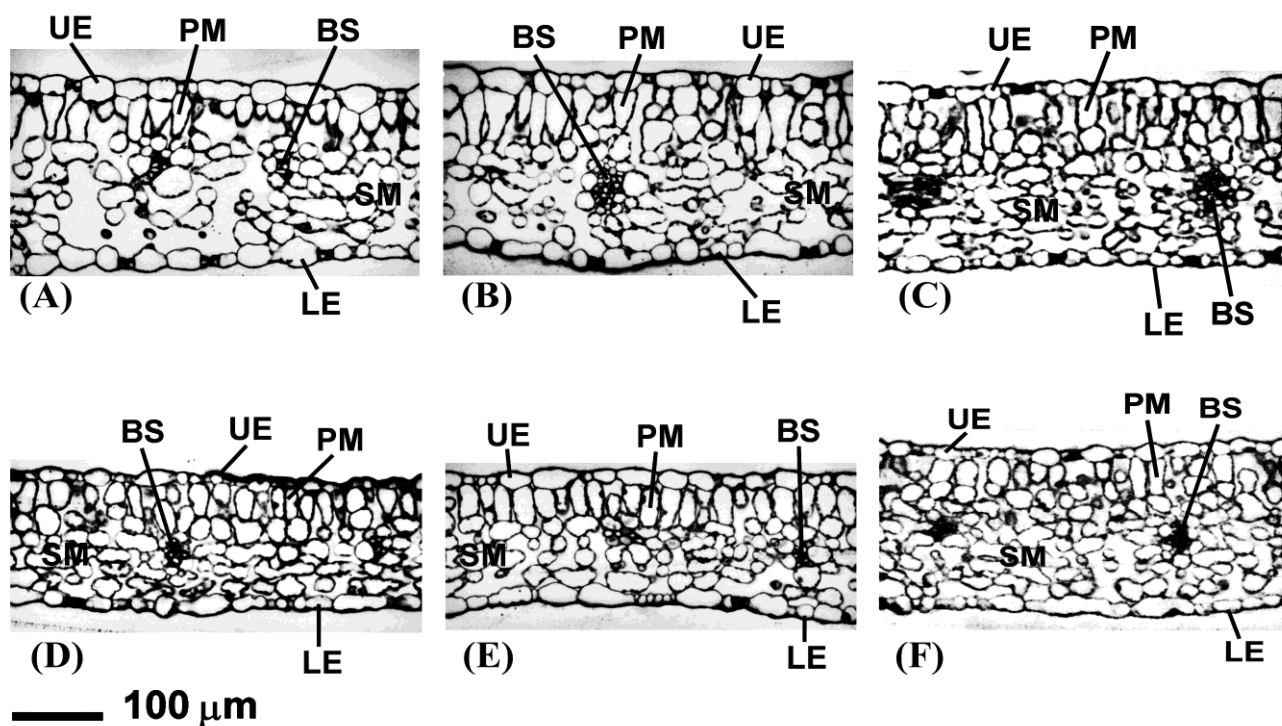


Фигура 1. Листна площ (A) and изглед (B) на листа от грах, третиран с Cd в присъствие или в отсъствие на SNP

Варианти: (I): контрола; (II): 500 μM SNP; (III): 1000 μM SNP; (IV): 25 μM Cd; (V): 500 μM SNP + 25 μM Cd; (VI): 1000 μM SNP + 25 μM Cd. Бара по скалата = 5 cm. Резултатите са осреднени стойности $\pm$ SD ($n = 4$). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.05$) според t -test

Структурни наблюдения

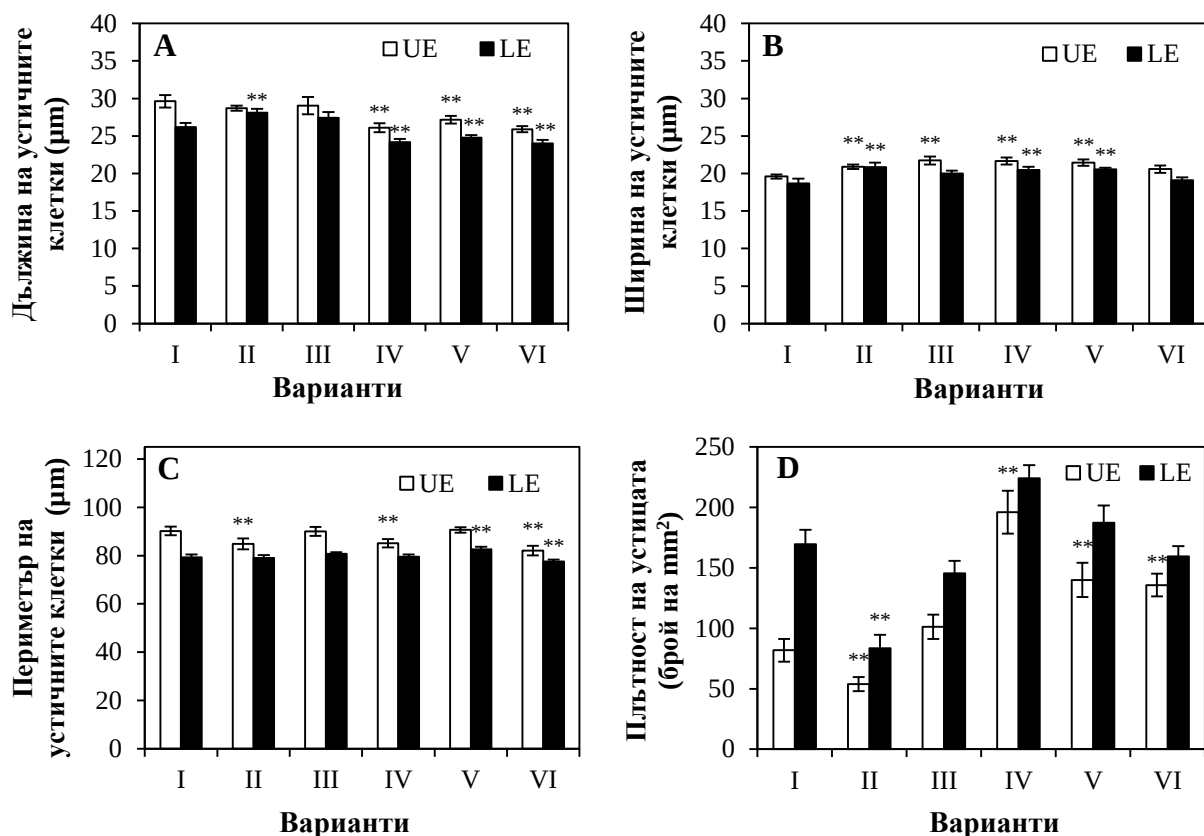
Граховите листа притежават дорзивентрална и амфистоматична структура с добре развит горен и долен епидермис, компактно подредени цилиндрични клетки и мезофил. Непосредствено над долния епидермис е разположен гъбчестия мезофил, състоящ се от 5-6 слоя рехаво подрени клетки, които обграждат големи междуклетъчни пространства (Фиг. 2A). Значими структурни различия се наблюдават в листата на третираните с Cd грахови растения. Средната дебелина на петурата намалява, също и дебелината на мезофилния слой, междуклетъчните пространства са приблизително двукратно редуцирани (Фиг. 2D) Третираните с 500 и 1000 μM SNP растения имат сходна на контролите листна структура (Фиг. 2B и C). Един съществен резултат в тези изследвания е наблюдаваното пълно възстановяване на листната структура от присъствието на 1000 μM SNP (Фиг. 2F).



Фигура 2. Напречни срези на листа от грах, третирани с Cd със или без SNP. Вариантите (A-F) са както на фигура 1. (BS): проводящи снопчета; (UE): горен епидермис; (PM): палисиден мезофил; (SM): гъбчест мезофил; (LE): долен епидермис. Бар = 100 μm

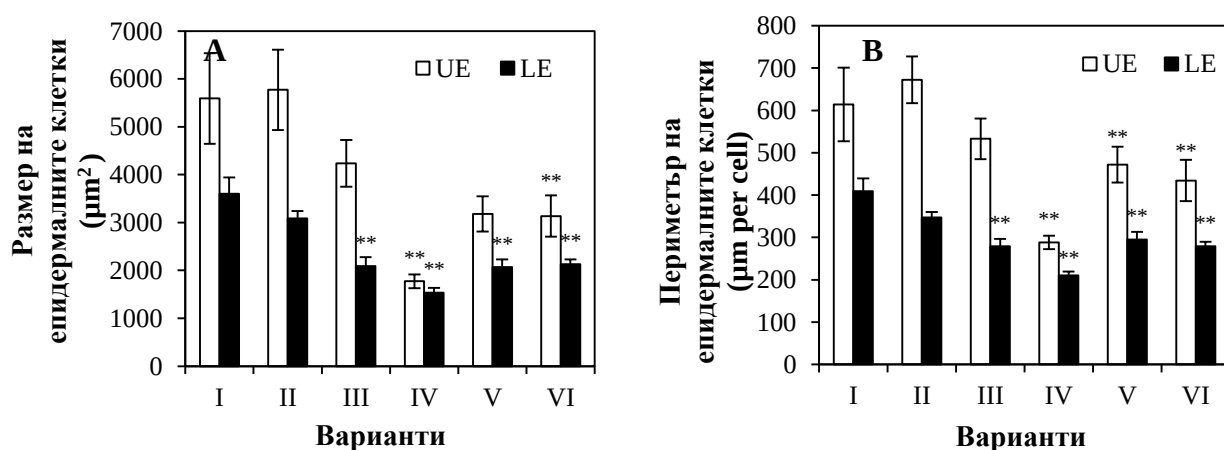
Кадмият оказва влияние и върху морфологията на устичния апарат. Морфометричният анализ сочи, че стойностите за дължина, ширина и периметър на устичните клетки са сравнително по-ниски спрямо контролата, но най-значимо (приблизително двукратно повишение) се наблюдава върху броя на устицата за единица площ (Фиг. 3). Сходни, но по-слабо изразени, тези характеристики се запазват и при вариантите с комбинирано присъствие на Cd и SNP.

Кадмият оказва негативно влияние и върху параметрите на епидермалните клетки. Наблюдава се силно понижение на площта и периметъра на клетките на горния и долен епидермис. Едновременно третиране с Cd и SNP възстановява в голяма степен стойностите на тези показатели, без обаче да се достигнат контролните нива (Фиг. 4A-B)



Фигура 3. Размер на устичните клетки и плътност на устицата на грахови растения, третиран с Cd в присъствие или в отсъствие на SNP

Варианти: (I - VI) както на фигура 1. UE: горен; LE: долен епидермис. Данните са средни $\pm$ SD ($n = 10$). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според *t*-test



Фигура 4. Размер (A) и периметър (B) на епидермалните клетки от горния и долен епидермис на грахови растения, третиран с Cd в присъствие или в отсъствие на 500 и 1000 μM SNP

Варианти: (I - VI): както на фигура 1. Данните са средни $\pm$ SD ($n = 5-10$). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според *t*-test

В обобщение, резултатите показват, че третирането с Cd индуцира намаляване на листната площ и свиване на епидермалния, палисиден и гъбчест паренхим. Тези данни потвърждават други известни резултати (Barcelo *et al.*, 1988; Fiskesjö, 1988; Liu *et al.*, 1992) и дават основание да се допусне, че наблюдаваната загуба на един мезофилен слой се дължи на инхибиторния ефект на Cd върху клетъчното делене по време на най-началното листното развитие. Известно е, че нарастването на листната площ корелира с нарастването на размера на епидермалните клетки, което е основание да обясним и наблюдавания от нас ефект на Cd върху тези показатели. Обаче инхибиторният ефект на Cd върху размера на епидермалните клетки е по-слабо изразен отколкото върху листната площ, и това ни позволява да предположим, че по-малката листна площ се дължи не само на клетъчното уголемяване, но и на клетъчното делене.

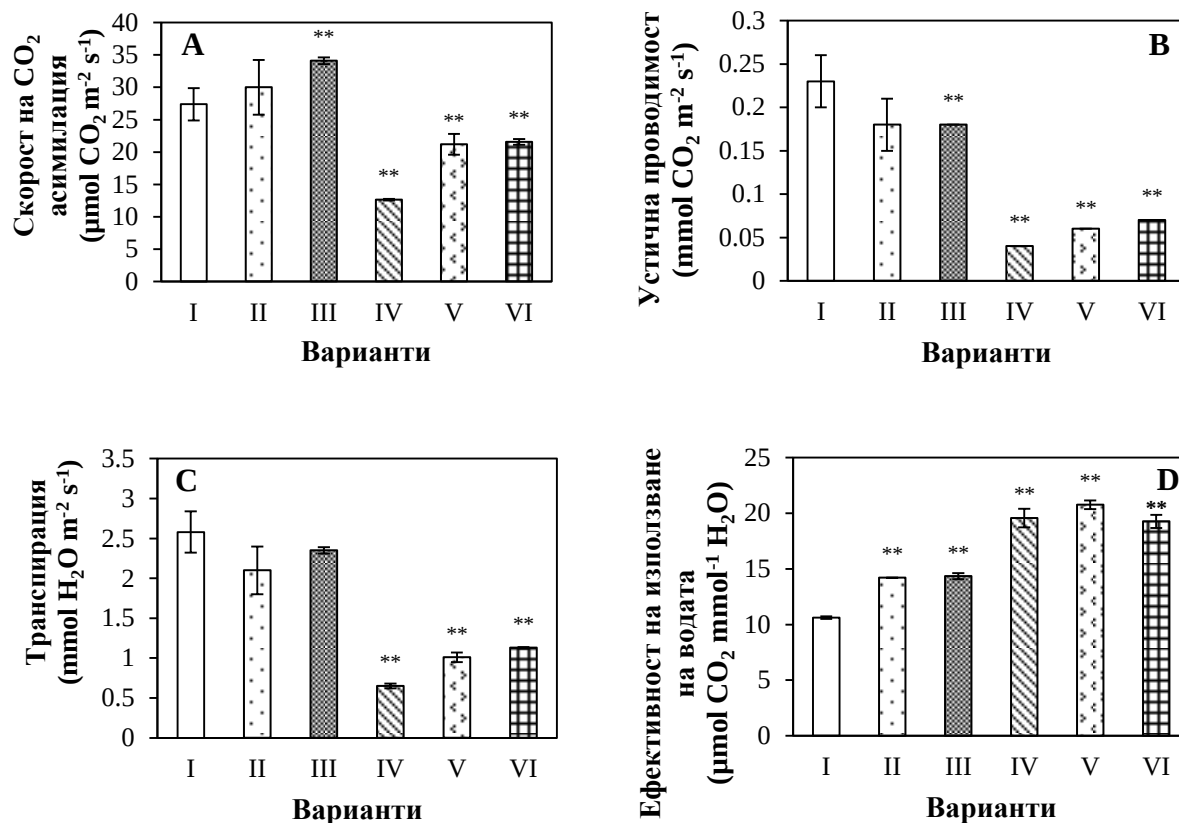
Известно е, че промените в гъстотата на устичните клетки е един от адаптивните отговори на растенията към многообразни стресови въздействия. Съгласно de Melo (2007), повишеният брой на устицата, заедно с намаленият им размер, е адаптивен механизъм за поддържане на притока на CO₂ за фотосинтезата, без да се допускат излишни загуби на вода. Друг важен фактор, който подобрява функцията на листата е добре развитата система на мезофилни пространства в мезофилната тъкан, което води до оптимален листен обмен. Констатираното възстановяване на мезофилната структура от присъствието на 1000 µM SNP е индикация за реорганизация на междуклетъчните мезофилни пространства, като по този начин се подобрява пропускливостта за асимилация на CO₂.

В обобщение на по-горе изложените резултати, може да се твърди че NO има защитен ефект върху листната структура и морфологията на устичния апарат и на епидермиса. Едновременно третиране с SNP и Cd преодолява Cd- индуцираните нарушения в листното развитие, което води до по-добро функциониране на листата, а чрез това- и до повишаване на толерантността на организмово ниво.

IV.3. Влияние на Cd и NO върху листния газообмен

Фотосинтезата е процес, който се уврежда много чувствително от Cd стрес. Нашите данни сочат приблизително двукратно понижение на скоростта на асимилация на CO₂. Слаб, но положителен ефект се констатира при самостоятелно

въздействие с 500 и 1000 μM SNP. Екзогенното прилагане на SNP към третираните с Cd растения възстановява във висока степен скоростта на фотосинтезата. Сходни резултати се констатираат и по отношение на транспирацията и устичната проводимост за CO_2 (Фиг. 5).



Фигура 5. Промени в параметрите на листния газообмен в грахови растения, третирани с Cd и SNP

(A): скорост на CO_2 асимилация; (B): устична проводимост; (C): транспирация; (D): ефективност на използване на водата (WUE). Варианти: (I- VI)- както на фигура 1. Данните са средни $\pm$ SD ($n = 6$). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според t -test

Литературните данни по отношение на ролята на NO върху процесите фотосинтеза и транспирация са оскъдни и противоречиви- от стимулиране до инхибиция. Разнообразието в резултатите се дължи до голяма степен от експерименталните системи, възраст на растенията и използваните форми и концентрации на донора на NO.

Наблюдаваният защитен ефект на NO върху параметрите на листния газообмен (и по-значимо за изследването- върху процеса фотосинтеза) отдаваме на възстановената листна структура и функция на устичния апарат. Не без значение са едни бъдещи по-подробни изследвания относно ролята на азотния оксид върху първичните фотосинтетични реакции и на биохимичния фотосинтетичен метаболизъм. Друго съществено допускане е, че NO участва в засилване на антиоксидантните защитни системи в растенията, с което спомага за намаляване на увреждащото действие на Cd.

IV.4. Окислителен стрес и антиоксидантна защита. Роля на NO

IV.4.1. Неензимни характеристики на окислителния стрес

Една от най-интригуващите характеристики на NO в растенията е неговата двойствена роля- силен оксидант и ефективен антиоксидант. Това проявление зависи от прилаганите концентрации, възрастта на растенията и от промените в околната среда.

Окислителният стрес е най-типичен резултат от действието на редица абиотични и биотични стресови фактори и най-общото му проявление се изразява в свръх продукция на АКФ, които атакуват клетъчните структури и в по-късен етап увреждат основни физиологични функции на растенията.

Нашите данни показват, че продължителното третиране на граховите растения с Cd предизвиква окислителен стрес, за който се съди по промените в съдържанието на водородния пероксид, степента на липидно пероксидиране, електролитно изтичане и по съдържанието на един по-неспецифичен индикатор- иминокиселината пролин.

Третирането на граховите растения с Cd повишава нивото на всички посочени показатели, с изключение на електролитното изтичане –Таблица 2.

Подобни данни се съобщават от редица изследователи за различни растителни представители, като: прорастъци от краставица (Gonçalves *et al.*, 2007), корени от пшеница (Singh *et al.*, 2008), включително и за корени и листа от грах (Sandalio *et al.*, 2001; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006; Popova *et al.*, 2009).

Самостоятелното третиране с SNP не оказва съществено влияние върху съдържанието на МДА и пролин, но понижава степента на електролитното изтичане спрямо нетретираната контрола. Комбинираното действие на SNP и Cd няма еднопосочен характер- не се наблюдава преодоляване на ефекта на Cd върху нивото на H_2O_2 и МДА, но скоростите на изтичане на електролити и на акумулиране на пролин са понижени спрямо ефекта от Cd. Наблюдаваните промени в тези показатели не следват стриктна концентрационна зависимост и вероятно са свързани в вътрешния хомеостазис на клетките при комбинацията на двата фактора.

Таблица 2. Влияние на Cd и NO върху съдържанието на водороден пероксид, МДА, пролин и изтичане на електролити

Варианти	Съдържание на пероксиди ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	Съдържание на МДА ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	Електролитно изтичане (%)	Съдържание на пролин ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)
Контрола	0.758 ± 0.001	0.012 ± 0.002	41.3	88.0 ± 1.9
500 μM SNP	1.204 ± 0.009	0.016 ± 0.002	27.5	84.3 ± 2.7
1000 μM SNP	1.314 ± 0.007	0.017 ± 0.001	25.1	100.3 ± 2.7
25 μM Cd	1.314 ± 0.001	0.046 ± 0.001	37.3	512.3 ± 10.7
500 μM SNP + 25 μM Cd	1.264 ± 0.008	0.059 ± 0.002	33.2	416.3 ± 10.7
1000 μM SNP + 25 μM Cd	1.531 ± 0.018	0.048 ± 0.001	24.8	504.0 ± 16.0

Данните са средни стойности от 4 независими експеримента $\pm$ SD

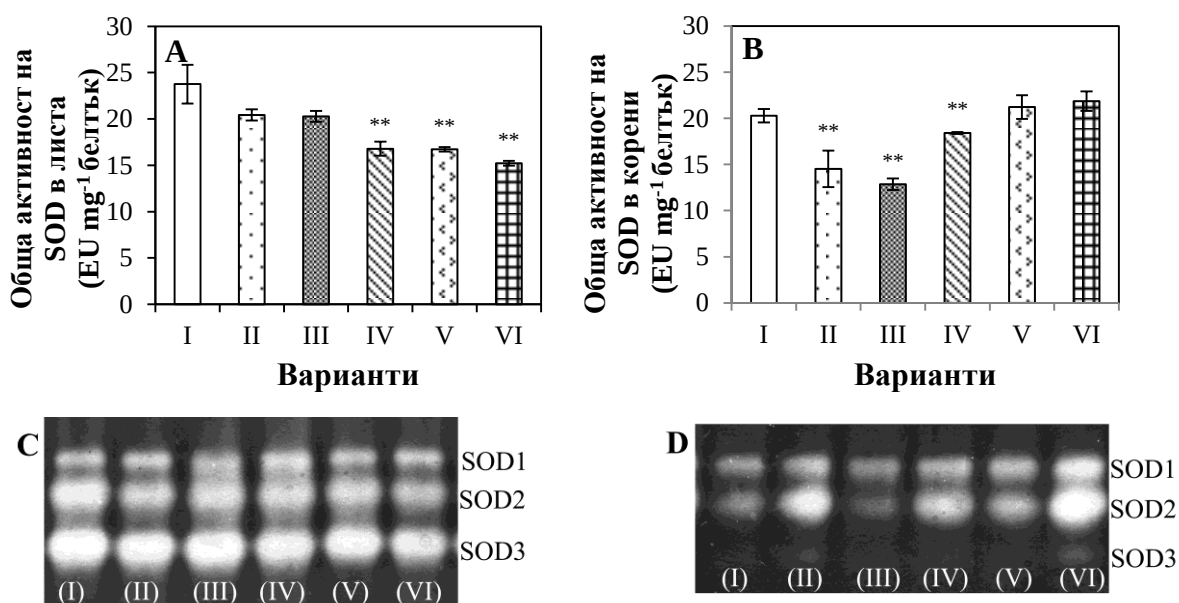
IV.4.2. Антиоксидантни ензими

За предпазване от високото натрупване на АКФ растителните организми притежават широк спектър от защитни механизми, който включва антиоксидантни ензими и неензимни антиоксиданти. Към последните се отнасят токофероли, флавоноиди, алкалоиди и каротеноиди. Ензимната защитна система включва ензимите SOD, CAT, POD и ензими от аскорбат-глутатионовия цикъл и глутатион-пероксидазния цикъл (Apel and Hirt, 2004).

SOD е сред първите ензими в защита срещу повишената продукция на АКФ, дисмутирайки супероксидния радикал до H_2O_2 .

Анализирайки изоформите на SOD посредством неденатурираща PAGE бяха идентифицирани в листата три основни изоформи с SOD активност. В корените също бяха визуализирани три изоформи, но само две от тях бяха определили активността на ензима (Фиг. 6C-D). Не се наблюдават различия в активността на изоензимите на SOD в листата при всички варианти. За корените е характерно едно по-значимо нарастване на активността на двете основни изоформи при варианта 25 μM Cd + 1000 μM SNP (Фиг. 6D).

Измерванията върху общата относителна активност на SOD в листата показват по-ниски стойности при всички варианти спрямо нетретираните растения. Защитен ефект от SNP върху активността на SOD се наблюдава само в корените (Фиг. 6B).



Фигура 6. Обща активност и изоензимен профил на SOD в листа и и корени на грахови растения, третиран с Cd и SNP

(A): обща активност на SOD в листа; (B): обща активност на SOD в корени ; (C): нативна PAGE на SOD от листа; (D): нативна PAGE на SOD от корени. Варианти: (I-VI): както на фигура 1. Средни стойности $\pm$ SD (n=4). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според *t*-test

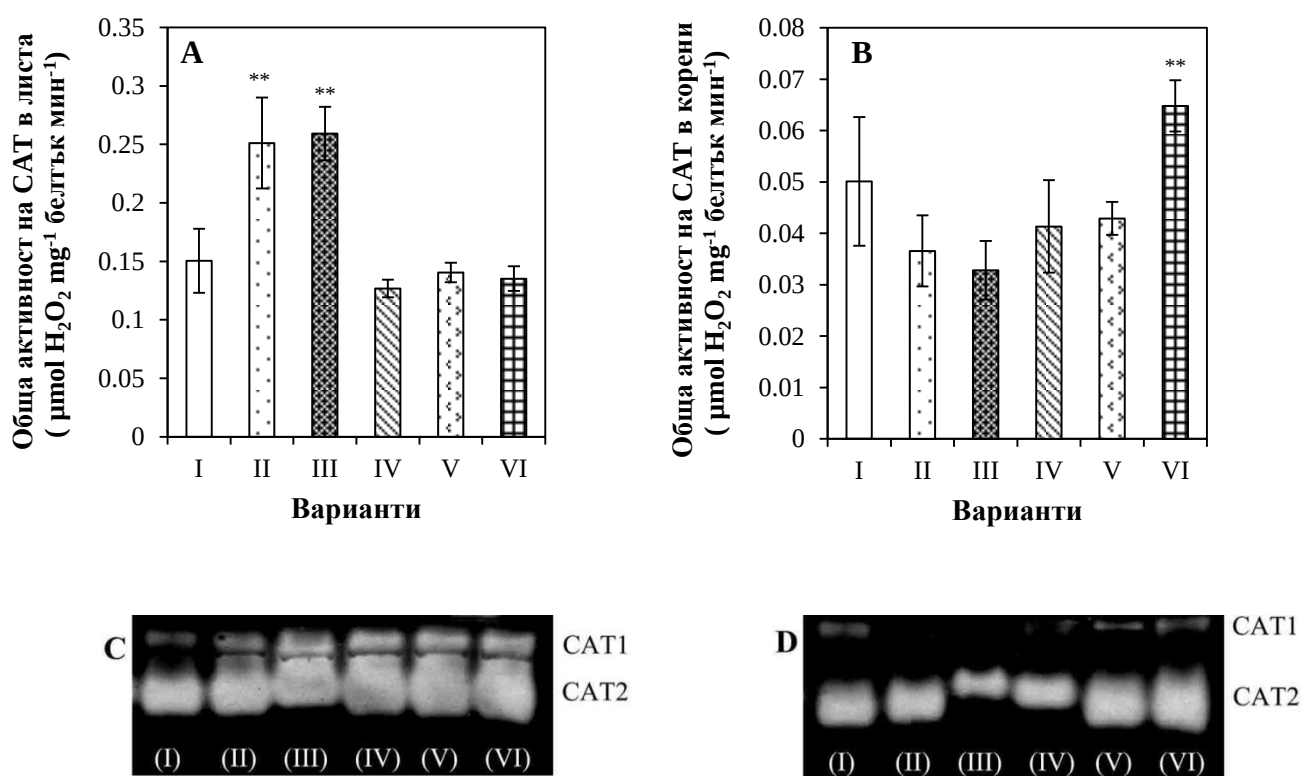
Данните в литературата относно влиянието на Cd върху активността на SOD са твърде противоречиви- от инхибиране в пшеница (Milone *et al.*, 2003), грах (Sandalio *et al.*, 2001), фасул (Cardinaels *et al.*, 1984)- до стимулиране в слънчоглед

(Laspina *et al.*, 2005), царевица (Krantev *et al.*, 2008) или в корени на репички (Vitória *et al.*, 2001).

За защитен ефект на NO₂ срещу Cd стрес се съобщава от Коруга *et al.*, (2006) в клетъчни култури от соя и от Коруга and Gwózdź (2003) в корени от лупина.

В растенията за обезвреждането на H₂O₂ работят ензимите каталаза, аскорбат пероксидаза и различните форми на пероксидазите.

При нашите опити електрофоретичните профили на САТ показват две отчетливи изоформи с САТ активност в листата и една в корените. Както при вариантите с Cd, така и при SNP + Cd, се наблюдава по-висока активност на изоформата на САТ2, докато в корените отчетливо е по-висока активността на тази изоформа при вариантите с SNP + Cd (Фиг. 7C-D).



Фигура 7. Обща активност и изоензимен профил на САТ в листа и корени на грахови растения, третирани с Cd и SNP

(A): обща активност на САТ в листа; (B): обща активност на САТ в корени; (C): нативна PAGE на САТ от листа; (D): нативна PAGE на САТ от корени. Варианти: (I-VI): както на фигура 1. Средни стойности $\pm$ SD (n=4). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според *t*-test

Общата относителна активност на CAT е три пъти по-висока в листата спрямо корените. Активността и в двата органа намалява при вариантите, които са третирани само с Cd. Самостоятелното третиране с SNP повишава приблизително с 70% ензимната активност в листата, но показва негативен ефект в корените. При комбинираното третиране (+ Cd + SNP) по-значим е защитният ефект на SNP върху кореновата CAT (Фиг. 7B).

Koryta and Gwozdz (2003), Laspina *et al.* (2005), Krantev *et al.* (2008) съобщават за инхибиращ ефект на Cd върху активността на CAT. За защитна роля на NO срещу хербициден стрес намираме в изследванията на Beligni and Lamattina (2002) и на Laspina *et al.* (2005).

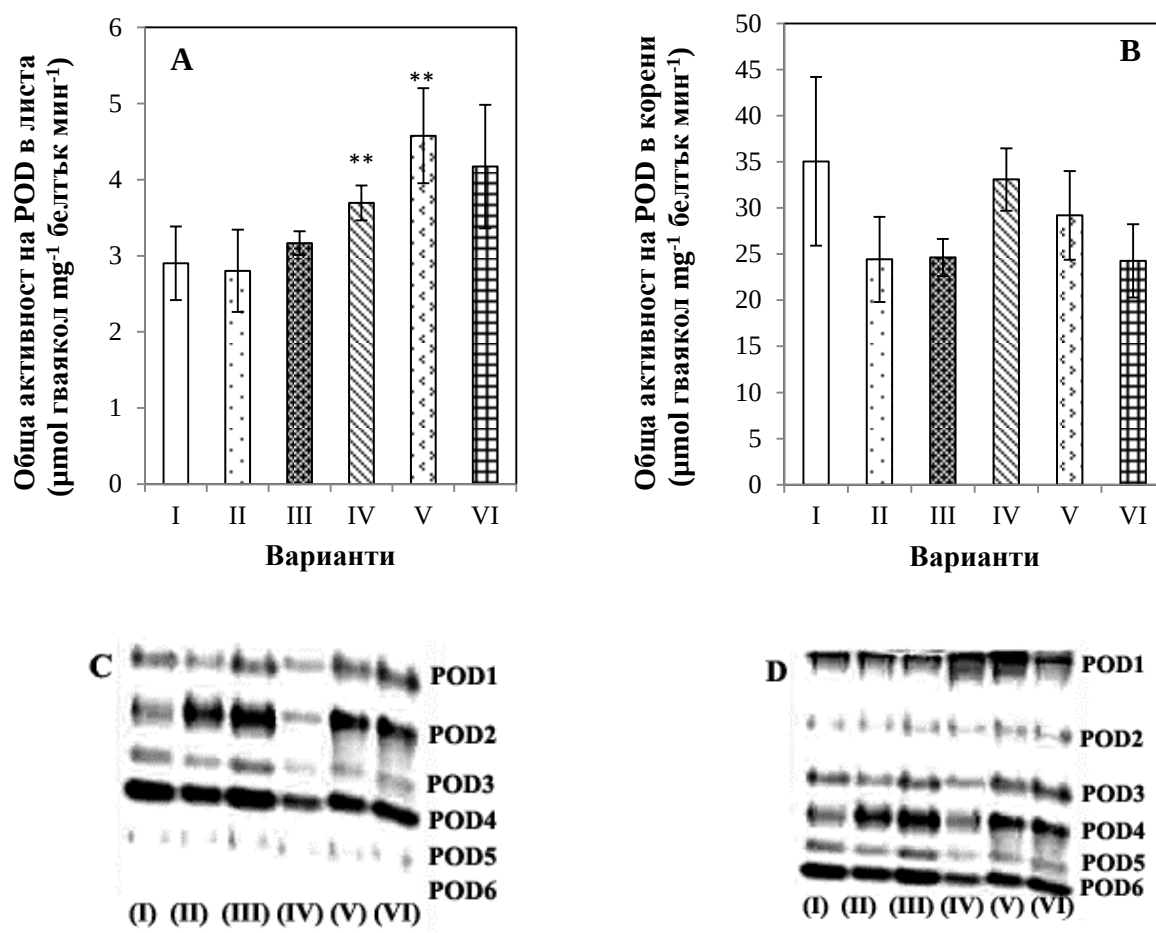
POD, подобно на APX, обезврежда H_2O_2 to H_2O , но използва голям набор от донори на електрони, като аскорбат, глутатион и много вторични метаболити. Тази особеност характеризира наблюдавания голям брой на изоензими на POD и частично обяснява разнообразието в отговорите на растенията към Cd стрес (Eshdat *et al.*, 1997).

След нативна PAGE ние определихме в листата 6 изоформи с POD активност, две от които (POD5 и POD6) са слабо изявени. Третирането с Cd силно понижава /до изчезване/ на слабо подвижната изоформа POD2, докато при 500 и 1000 μM SNP активността на този изоензим е по-висока по отношение на останалите варианти. Едновременно третиране с Cd и SNP показва сходен ефект върху индивидуалните изоформи по отношение на нетретираната контрола и самостоятелното действие на SNP (Фиг. 8C).

В корените също са констатирани 6 изоформи с активност на POD. Третирането с Cd понижава активността на всяка една от тях по отношение на контролата. В присъствие на SNP (+SNP +Cd) се наблюдава преодоляване на инхибиращото действие на Cd. Друг наблюдаван резултат е, че самостоятелното третиране с SNP повишава акумулирането на POD4 и POD6 както спрямо контролата, така и при варианта с Cd (Фиг. 8D).

По отношение на общата относителна активност на POD е характерно няколкократно по-високата активност в корените спрямо листата. Известно защитно

действие на SNP спрямо Cd се наблюдава в листата, но липсва при корените (Фиг. 8A-B).



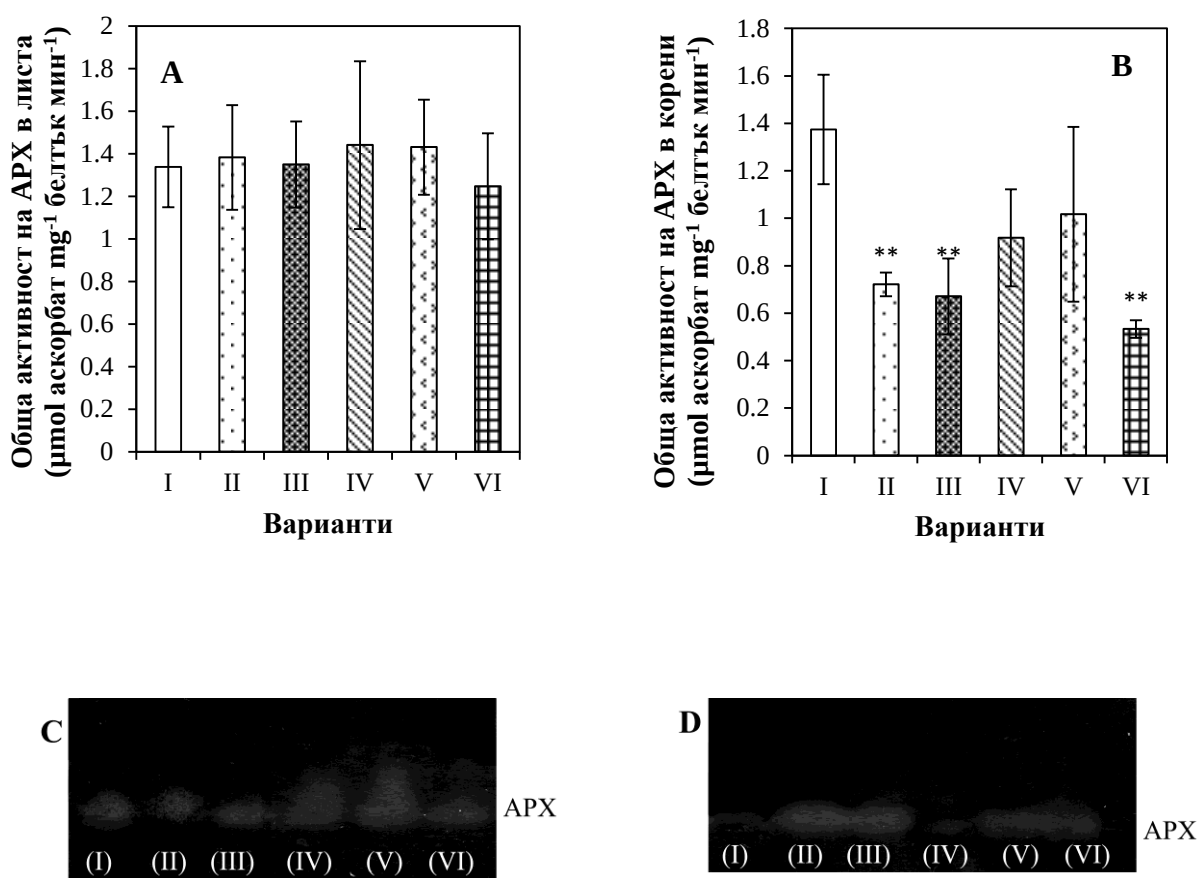
Фигура 8. Обща активност и изоензимен профил на POD в листа и корени на грахови растения, третирани с Cd и SNP

(A): обща активност на POD в листа; (B): обща активност на POD в корени; (C): нативна PAGE на POD от листа; (D): нативна PAGE на POD от корени. Варианти: (I-VI): както на фигура 1. Средни стойности $\pm$ SD ($n=4$). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според t -test

За ефективна защита срещу високите нива на АКФ растенията притежават аскорбат-глутатионовия цикъл. Аскорбат пероксидазите са основно локализирани в хлоропластите и цитозола на растителните клетки.

След електрофоретично разделяне ние открихме по една изоформа с APX активност в листата и корените. С известна уговорка /поради недоброто оцветяване/ може да се каже, че SNP, приложен самостоятелно или в комбинация с Cd повишава

ензимната активност и в двата органа (Фиг. 9C-D). Не се констатира промени в общата относителна активност на APX в листата, докато в корените активността на ензима е по-ниска при третиране с Cd или при вариантите с SNP (Фиг. 9A-B).



Фигура 9. Обща активност и изоензимен профил на APX в листа и корени на грахови растения, третирани с Cd и SNP

(A): обща активност на APX в листа; (B): обща активност на APX в корени; (C): нативна PAGE на APX от листа; (D): нативна PAGE на APX от корени. Варианти: (I-VI): както на фигура 1. Средни стойности $\pm$ SD ($n=4$). Със (*) – значимост на разликите спрямо контролата ($P \leq 0.01$) според t -test

В литературата данните за ефекта на Cd върху активността на APX са твърде противоречиви- от инхибиция при краставици (Zhang *et al.*, 2002) и в клетъчни култури от кафе (Gomes-Junior *et al.*, 2006)- до стимулиране при ориз (Hsu and Kao, 2004) и сънчоглед (Dixit and Parvizi, 2001). За защитен ефект на NO върху

активността на APX в условия на кадмиев стрес се съобщава от Laspina *et al.* (Laspina *et al.*, 2005).

Обикновено се очаква при възникване на стрес от различен характер активностите на антиоксидантните ензими да нарастват и това е индикация за ефективно обезвреждане на свръхпродукцията на АКФ. Понижението в активностите на ензимите е указание за силен окислителен стрес, който може би засяга ензимния биосинтез и комплектовката на ензимните субединици (Singh *et al.*, 2006).

Нашите резултати сочат, че съществува непълно обезвреждане на $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 , които са в състояние да генерират повече свободни хидроксилни радикали и/или други деструктивни форми, като липидни пероксиди. Независимо, че от високото съдържание на АКФ се активират редица деструктивни процеси, те също възбуждат различни сигнални пътища и поддържането на подходящо ниво на тези реактивни форми би представлявало един отговор за преживяване.

IV.5. Ефект на NO върху натрупването на Cd в корени и листа от грах

Съдържанието на Cd в контролните растения (-Cd and -SNP) е много ниско. Тези резултати са в потвърждение на предишни наши данни (Popova *et al.*, 2009) за същия растителен обект. Третирането с SNP променя незначително съдържанието на Cd в листата, но то е по-високо в корените. Много повишено акумулиране се наблюдава в Cd-третираните растения- над 100 пъти нарастване в листата и над 200 пъти в корените. Тези резултати не са изненадващи, поради обстоятелството, че корените влизат първи в съприкосновение с почвените замърсители. Комбинираното присъствие на Cd и SNP (+Cd +SNP) рязко повишава съдържанието на Cd в корените. И в листата то е много по-високо спрямо нетретираните растения, но приблизително два до три пъти по-ниско от това при варианта с Cd (Таблица 3).

Третирането с Cd води до неговото значително натрупване в растителните тъкани. По-голямата част от Cd се задържа в корените и по-малко в надземните органи. Такива данни се съобщават от редица автори (Sandalio *et al.*, 2001; Dixit and Parvizi, 2001; Krantev *et al.*, 2008).

Най-често за обезвреждането на Cd участват различни хелатори, като фитохелатини, металотионини и органични киселини. Бързо натрупване на

фитохелатини в корените е установено от редица автори, включително и от наши изследвания (Szalai *et al.*, 2013).

Таблица 3. Съдържание на Cd в грахови растения, третирани с Cd и SNP

Варианти	Листа (mg Kg ⁻¹ DW)	Корени (mg Kg ⁻¹ DW)
Контрол	0.843	1.263
500 µM SNP	0.451	20.581
1000 µM SNP	1.189	6.522
25 µM Cd	100.262	259.776
500 µM SNP + 25 µM Cd	51.639	2101.587
1000 µM SNP + 25 µM Cd	36.000	2178.808

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото изследване е опит да се изяснят някои страни от механизмите на действие на азотния оксид върху определени физиологични процеси и да се тества хипотезата за защитната му роля спрямо Cd- индуциран стрес

Следвайки получените резултати, ние може да ги обобщим в три направления: увреждащото действие на Cd, влияние на азотния оксид върху определени физиологични процеси и роля на NO в преодоляване на кадмиевия стрес.

Ние показахме, че третирането на граховите растения с 25 µM Cd понижава растежа на корените и листата и натрупването на биомаса в тях. Корените на третираните растения показват визуални изменения, като: скъсяване, удебеляване, промяна на цвета и липса на латерални разклонения. При листата се наблюдава забавяне на развитието на петурите, което понижава размера им, листната площ и дебелината на листа са също по-малки, а междуклетъчни пространства в мезофила са силно редуцирани. Епидермалните клетки са с по-малки размери, но с по-висок брой на устица за единица площ. Промените в тези параметри се съпровождат от занижени скорости на асимилация на CO₂ и на транспирация. Стойностите на устичната проводимост са по-ниски спрямо контролата, който факт ние считаме като една от причините за понижения листен газообмен. Третирането с Cd повишава

нивата на H_2O_2 , МДА и пролин, което е указание за наличие на окислителен стрес. Анализирани от нас антиокислителни ензими CAT, SOD и APX, с изключение на POD, показват понижена активност в листата и корените на третираните растения, което е индикация за ограничена защита срещу окислителния стрес. Вероятна причина би могла да бъде инхибиране на определени ензими, към каталитичните групи на които се свързва кадмия (Mittler, 2002).

Известно е, че POD участва в биосинтеза на лигнина и в омрежването на клетъчните стени, което би могло да създава физическа бариера срещу поглъщането на Cd.

Независимо, че при възникване на стрес от различен характер, растенията мобилизират защитните си механизми, те не винаги са достатъчни да намалят или да ограничат силата на стреса. Това определя ролята на сигналните молекули, които се явяват посредници между растенията и стреса на околната среда. Изучаването на тяхното действие е важна стъпка към разбирането на толерантността и на адаптацията на растенията към околната среда.

Азотният оксид е такава сигнална молекула, която участва във индуцирането на защитни реакции в клетките спрямо разнообразни стресови въздействия /за справка-литературния обзор от дисертацията/.

В обобщение на получените резултати, ние показахме че 500 и 1000 μM SNP са подходящо подбрани концентрации за проведените физиологични изследвания, тъй като при продължително третиране на граха с тях (до 15 дни) те не предизвикват видими увреждания, като повяхване, забавяне на растежните процеси или инхибиция върху фотосинтезата и транспирацията. Третираните растения имат сходна на контролните листна структура по отношение на всички изследвани параметри. Самостоятелното третиране с SNP показва нееднопосочно действие върху параметрите свързани със стреса- от повишаване на съдържанието на пероксиди, до намаляване на степента на електролитното изтичане и до незначителни изменения в съдържанието на МДА и пролин. Активностите на антиоксидантните ензими се повлияват различно в корените и листата. Активностите на SOD, POD и APX в листата показват сходни стойности спрямо

нетретираните контроли, докато активността на CAT е силно повишена. В корените всички изследвани ензими имат по-ниска активност спрямо контролата.

Получените резултати потвърждават, че приложените от нас концентрации на SNP от 500 and 1000 μM не предизвикват стрес и увреждания на граховите растения. Данните също сочат за известна специфичност в действието на SNP в корените и листата.

Фокусът на това изследване беше да се докаже предположението, че NO проявява защитно действие спрямо кадмиевия стрес. Нашите основания в подкрепа на това твърдение са следните: 1) при третирането на граховите растения с SNP в присъствие на Cd се преодолява до значителна степен инхибиращия ефект на Cd върху параметрите на растеж на корените и листата. Резултатите са по-добре изразени при концентрация на SNP 1000 μM . 2) Получените от нас резултати показват, че азотният оксид има стабилизиращ ефект върху листната структура и морфология на устичния апарат и до голяма степен преодолява негативния ефект на Cd върху тези показатели. Третирането на граховите растения с донора на NO (SNP) смекчава индуцираните от Cd разстройства в листното развитие и структура и също защитава от увреждания устичните клетки, и като резултат подобрява функциите на листата. Резултатите потвърждават, че екзогенният донор на NO ефективно способства за по-доброто листно оструктуриране, като по този начин подобрява толерантността на граха към Cd стрес. 3) Екзогенното прилагане на SNP към третираните с Cd растения възстановява в голяма степен скоростта на асимилация на CO_2 , на транспирацията и подобрява устичната проводимост. 4) SNP проявява двойствен ефект върху съдържанието на стрес-индуцираните маркери- от липса на преодоляване на повишените нива на пероксиди и МДА- до понижение в степента на електролитното изтичане и в съдържанието на пролин. 5) Положителен ефект на SNP върху антиоксидантните ензими се констатира за листната CAT и POD и върху кореновата SOD и CAT. Тези данни са в подкрепа на изказаното от други автори поведение на азотния оксид- като антиоксидант и прооксидант. 6) Другото наше предположение за защитното действие на NO се отнася до възможното му взаимодействие с Cd^{2+} . Като сигнална молекула NO има за действие широк обхват от клетъчни мишени. Дали кадмиевите йони са една от тези мишени е все още

ненапълно известно. Поради обстоятелството, че NO е високо активен и същевременно нестабилен свободен радикал, допускането че той би могъл да образува стабилен комплекс с Cd^{2+} е твърде вероятно.

VI. ИЗВОДИ

1. Третирането на грахови растения с 25 μM Cd инхибира растежа на надземната и коренова системи, натрупването на сухо вещество и забавя нарастването и развитието на листата. Скоростите на фтосинтезата и траспирацията са силно понижени вследствие на нарушената функция на устичния апарат и силно намалената устична проводимост.
2. Кадмият предизвиква структурни нарушения в листната анатомия на граховите растения. Дебелината на петурата и междуклетъчните пространства в мезофила намаляват, епидермалните клетки са по-дребни и с малък периметър, увеличава се броят на устичните клетки на единица площ, но те са с намалени размери
3. Кадмият предизвиква окислителни увреждания, за които се съди по промените в някои неензимни и ензимни характеристики. Установено е двукратно повишение в нивото на пероксидите, над четири и повече пъти нарастване на съдържанието на МДА и пролин. Активностите на ензимите супероксидисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза в листата и корените са инхибирани, което показва, че антиоксидантната система не е в състояние за защити граховите растения от кадмиевия стрес
4. Третирането на грахови растения 12 дни с 500 и 1000 μM нитропрусид /SNP/, донор на NO, не предизвиква увреждания на листата и корените и в натрупването на сухо вещество в тях. Листната структура и морфология на епидермалните и устични клетки са близки до контролите. Параметрите на листния газообмен /асимиляция на CO_2 , транспирация и устична проводимост/ са близки до контролните, което е указание, че използваните концентрации на SNP не предизвикват стрес в граховите растения
5. SNP проявява нееднопосочно действие върху параметрите на окислителния стрес- от повишаване на нивото на пероксидите- до намаляване на скоростта на електролитното изтичане и до незначителни промени в съдържанието на МДА

и пролин. Промени в активностите на антиоксидантните ензими супероксидисмутаза, каталаза и гваякол-пероксидаза не се установяват в листата, докато активността на CAT е силно повишена. В корените активностите на изследваните ензими са по-ниски спрямо нетретираните растения, което е указание за двойственото поведение на NO в двата растителни органа.

6. Третирането на граховите растения с SNP в присъствието на Cd проявява защитно действие върху растежа, фотосинтезата, транспирацията и устичната проводимост. Защитният ефект е по-добре изразен при 1000 μM SNP.
7. Екзогенното прилагане на SNP едновременно с Cd има благоприятен ефект върху листната структура и морфологията на епидермалните клетки и на устичния апарат. Резултатите показват, че азотният оксид ефективно защитава листата от структурни увреждания и подобрява толерантността на граховите растения към Cd стрес.
8. Азотният оксид има двупосочно действие върху параметрите на окислителния стрес- не се наблюдава понижение в нивата на пероксидите и на МДА, но се установява възстановяване на мембранната пропускливост и понижение на нивото на пролин. Положителен ефект на SNP върху антиоксидантните ензими се констатира за листната каталаза и пероксидаза и върху кореновата супероксидисмутаза и каталаза. Това показва, че защитното действие на азотния оксид не е единствено върху антиоксидантната система, а се включват допълнителни ефективни механизми за повишаване на устойчивостта на граховите растения към кадмиевия стрес.
9. Третирането на грахови растения с Cd (25 μM) води до значително повишаване на ендогенното му съдържание в корените и в листата. Третирането с SNP в присъствие на Cd предизвиква рязко повишаване на съдържанието на Cd в корените. Предполага се, че това е част от стратегията на граховите растения за преодоляване на вредното въздействие на Cd.

VII. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Установено е, че третирането на граховите растения с SNP в присъствие на Cd преодолява в значителна степен инхибиращия ефект на кадмия върху растежа на корените и листата и натрупването на биомаса в тях.
2. Азотният оксид има защитен ефект върху развитието на листата и преодолява уврежданията върху листната им структура в условия на кадмиев стрес.
3. Показано е, че азотният оксид има защитно действие спрямо Cd-индуцираните нарушения върху морфологията на устичните и епидермални клетки и подобрява функциите на листата.
4. Екзогенното прилагане на SNP към третираните с Cd растения възстановява в голяма степен скоростта на асимилация на CO₂, на транспирацията и подобрява устичната проводимост.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМЕТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Popova, L. & **Tuan, T.** (2010). Nitric oxide in plants: Properties, biosynthesis and physiological functions. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science* 34(3): 173-183. (Impact factor (2011): 0.029) (обзор)
2. **Tran, T. A.**, Paunova, S., Nedeva, D. & Popova, L. (2011). Nitric oxide alleviates cadmium toxicity on photosynthesis in pea plants. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 64(8): 1137-1142. (Impact factor (2011): 0.210)
3. **Tran, T. A.** & Popova, L. P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany* 37: 1-13. (Impact factor (2011): 1.991) (обзор)
4. **Tran, T. A.**, Vassileva, V., Petrov, P. & Popova, L. (2013). Cadmium-induced structural disturbances in pea leaves are alleviated by nitric oxide. *Turkish Journal of Botany* (in press). (Impact factor (2011): 1.991).

IX. ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

- L. Popova, **Tuan T.** (2011). Nitric oxide in plants: properties, biosynthesis and physiological functions. *Iranian J. Sci. & Technology, Transaction A*, 34 (3): 173-183.

Цитирана в:

1. Mirza Hasanuzzaman, Sarvajeet Singh Gill, Masayuki Fujita (2013). *Physiological Role of Nitric Oxide in Plants Grown Under Adverse Environmental Conditions*. In: *Plant Acclimation to Environmental Stress*. N.Tuteja and Gill S.S. (Eds), Springer, pp. 270-321.
- **Tran T.A.**, Popova L. 2013. Functions and toxicity of cadmium in plants. Recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany* 37: 1-13.

Цитирана в:

1. Gülден Yılmaz & Feruzan Dane (2013). Phytotoxic effects of herbicide Attribut and surfactant BioPower on the root, stem and leaf anatomy of *Triticum aestivum* cv. Pehlivan. *Turkish Journal of Botany*. (in press)
2. Demet Cansaran-Duman, Ersin Altunkaynak, Emine Sümer Aras. Heavy metal accumulation and genotoxicity indicator capacity of the lichen species, *Ramalina pollinaria* collected from around the iron steel factory in Karabük, Turkey. *Turkish Journal of Botany*. (in press).

X. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- Anderson, L. S. & Mansfield, T. A. (1979). The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution* (1970) 20(2): 113-121.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373-399.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1-15.
- Barcelo, J., Vazquez, M. D. & Poschenrieder, C. (1988). Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytologist* 108(1): 37-49.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39(1): 205-207.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44(1): 276-287.
- Beligni, M. V. & Lamattina, L. (2002). Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment* 25(6): 737-748.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Cardinaels, C., Put, C., Van Asche, F. & Clijsters, H. (1984). The superoxide dismutase as a biochemical indicator, discriminating between zinc and cadmium toxicity. *Biol Plant* 40: 131-135.
- de Melo, H. C. (2007). Anatomical and physiological alterations in *Setaria anceps* Stapf ex Massey and *Paspalum paniculatum* L. under water deficit conditions. *Hoehnea* 34(2): 145-153 (in Portuguese with abstract in English).
- Dixit, V. D. & Parvizi, N. (2001). Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science* 65(1-2): 1-16.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z. & Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* 100(2): 234-240.
- Fiskesjö, G. (1988). The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 197(2): 243-260.
- Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Grato, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J. & Azevedo, R. A. (2006). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65(8): 1330-1337.
- Gonçalves, J. F., Becker, A. G., Cargnelutti, D., Tabaldi, L. A., Pereira, L. B., Battisti, V., Spanevello, R. M., Morsch, V. M., Nicoloso, F. T. & Schetinger, M. R. C. (2007). Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 223-232.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts : I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1): 189-198.
- Hsu, Y. & Kao, C. (2004). Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 42(3): 227-238.
- Jessup, W., Dean, R. T. & Gebicki, J. M. (1994). [29] Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. In *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 233, 289-303 (Ed P. Lester). Academic Press.
- Kopyra, M. & Gwózdź, E. A. (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41(11-12): 1011-1017.
- Kopyra, M., Stachoń-Wilk, M. & Gwózdź, E. (2006). Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum* 28(6): 525-536.

- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. & Popova, L. (2008). Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 165(9): 920-931.
- Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. & Benavides, M. P. (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science* 169(2): 323-330.
- Leshem, Y. Y. & Haramaty, E. (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage. *Journal of Plant Physiology* 148: 258-263.
- Liu, D. H., Jiang, W. S. & Li, M. X. (1992). Effects of Cd^{2+} on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Acta Scientiae Circumstantiae* 12(3): 439-447.
- Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H. & Navari-Izzo, F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 50(3): 265-276.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Popova, L. P., Maslenkova, L. T., Yordanova, R. Y., Ivanova, A. P., Krantev, A. P., Szalai, G. & Janda, T. (2009). Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(3): 224-231.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A. N. A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A. & Sandalio, L. M. (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell & Environment* 29(8): 1532-1544.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C. & del Río, L. A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52(364): 2115-2126.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kaur, G., Arora, K. & Kohli, R. K. (2008). Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany* 63(1-3): 158-167.
- Singh, S., Eapen, S. & D'Souza, S. F. (2006). Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62(2): 233-246.
- Szalai, G., Krantev, A., Yordanova, R., Popova, L. P. & Janda, T. (2013). Influence of salicylic acid on phytochelatin synthesis in maize during Cd stress. *Turkish J Bot* in press.
- Vitória, A. P., Lea, P. J. & Azevedo, R. A. (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57(5): 701-710.
- Zhang, F., Shi, W., Jin, Z. & Shen, Z. (2002). Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity. *Journal of Plant Nutrition* 26(9): 1779-1788.
- Zhao, M., Zhao, X., Wu, Y. & Zhang, L. (2007). Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. *Journal of Plant Physiology* 164(6): 737-745.