

PHẢN ỨNG SIÊU NHẠY CẢM Ở RỄ CÂY ĐẬU TƯƠNG NAM ĐÀN ĐỐI VỚI CHÌ

Mai Văn Chung*, Nguyễn Đức Diện, Nguyễn Đình San

Trường Đại học Vinh

Email: chung.uni@gmail.com*

Ngày gửi bài: 05.09.2014

Ngày chấp nhận: 10.10.2014

TÓM TẮT

Bài báo giới thiệu kết quả nghiên cứu về phản ứng siêu nhạy cảm (Hypersensitive response-HR) ở rễ cây đậu tương Nam Đàn (*Glycine max* (L.) Merr. cv. ND) - giống địa phương gắn liền với sản phẩm có thương hiệu “tương Nam Đàn” của tỉnh Nghệ An - dưới ảnh hưởng của ion kim loại nặng chì (Pb^{2+}) ở các nồng độ 0,1mM, 0,5mM và 1,0mM. HR đã biểu hiện ở rễ đậu tương Nam Đàn sau 6 giờ tác động của Pb^{2+} với quá trình sinh tổng hợp sớm và mạnh mẽ dạng oxy hoạt hóa hydrogen peroxide (H_2O_2), sự gia tăng phân giải lipid màng tế bào trong quá trình peroxide hóa lipid, đồng thời duy trì tỷ lệ thương tổn cao của các tế bào, trong khi gốc tự do superoxide $O_2^{\cdot-}$ tăng nhẹ. HR trong các nghiệm thức xử lý kim loại nặng luôn cao hơn đối chứng. Tương quan tỷ lệ giữa mức độ biểu hiện của HR và nồng độ Pb^{2+} không thực sự rõ ràng, tuy nhiên, 0,5mM và 1,0mM Pb^{2+} là các nồng độ cùng cho hiệu quả cảm ứng kích thích HR cao. Các enzyme superoxide dismutase-SOD và catalase-CAT duy trì độ hoạt động cao trong khoảng thời gian 6-48 giờ góp phần kiểm soát hàm lượng H_2O_2 và $O_2^{\cdot-}$ nội sinh trong HR.

Từ khóa: CAT, chì- Pb^{2+} , đậu tương, enzym, hydrogen peroxide, peroxide hóa lipid, phản ứng siêu nhạy-HR, SOD, superoxide.

Hypersensitive Response in “Nam Dan” Soybean Roots to Lead

ABSTRACT

The present paper reported hypersensitive response (HR) in roots of soybean cultivar “Nam Dan” exposed to Pb^{2+} ion with concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0mM after 6 hours treatment. An increase in content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)-products of lipid peroxidation, and the high percentage of membrane injury caused serious cellular damage in root cells. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was strongly induced and soon reached high level, however, the burst of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) was not recorded. The enhancement of HR was not correlated with the treated concentrations of Pb^{2+} . The activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) rapidly increased and maintained high level in 6-48 hours after Pb^{2+} treatment, making contribution to control the burst of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ in HR in soybean roots.

Keywords: CAT, Hypersensitive response, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, lead- Pb^{2+} , soybean, SOD, superoxide anion radical.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phản ứng siêu nhạy cảm (HR) là một trong những cơ chế bảo vệ của thực vật nhằm hạn chế, giảm thiểu sự lây nhiễm, lan truyền các mầm bệnh xâm nhập từ môi trường sống. HR diễn ra gắn liền với những thiệt hại lớn, thường là chết, đối với các tế bào và mô xung quanh điểm nhiễm bệnh, tạo nên hàng rào cách ly với các vùng

khác trên cơ thể thực vật. Sau khi cảm ứng tác động của mầm bệnh, HR được khởi động dẫn đến sự thay đổi các dòng ion vào - ra tế bào, tiếp đó, kích thích bùng nổ oxy hóa đặc trưng bởi sự sinh tổng hợp mạnh mẽ các dạng oxy hoạt hóa (reactive oxygen species - ROS) như hydrogen peroxide (H_2O_2), các gốc tự do superoxide ($O_2^{\cdot-}$) và hydroxyl ($HO^{\cdot}$), tăng cường phân hủy lipid màng tế bào trong quá trình peroxide hóa lipid,

làm thay đổi căn bản tính thấm của màng tế bào, tiếp đó là gây chết tế bào (Pontier et al., 1998). HR là đặc trưng cho khả năng chống lại các mầm bệnh nhưng ít gặp trong phản ứng của thực vật đối với sâu, rệp (Hoglund et al., 2005) hay kim loại nặng (Rueda et al., 2011).

Trong một số ít công bố về cơ chế bảo vệ của thực vật đối với kim loại nặng, vai trò của HR được ghi nhận ở đậu Hà Lan (*Pisum sativum* L.) dưới tác động của cadmium - Cd (Rodriguez-Serrano et al., 2009) hay ở cà chua (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) H. Karst.) chịu ảnh hưởng của đồng - Cu (Rueda et al., 2011). Hoặc một số cây bị gây độc bởi chì - Pb, một kim loại nặng điển hình trong đất, không bị phân hủy mà có xu hướng tích lũy, xâm nhập vào cây trồng. Một số nghiên cứu khác trên đậu Hà Lan (*P. sativum*), đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) hay lúa mì (*Triticum aestivum* L.) đã ghi nhận, các thực vật khác nhau có những phản ứng bảo vệ khác nhau sau khi kim loại nặng này gây bùng nổ oxy hóa (Malecka et al., 2001; Dey et al., 2007; Hassan and Mansoor, 2014).

Đậu tương Nam Đàn (*Glycine max* (L.) Merr. cv. ND) là giống địa phương gắn liền với thương hiệu “tương Nam Đàn” của tỉnh Nghệ An, được phục tráng thành công năm 2009 và bắt đầu đưa vào giai đoạn sản xuất ở quy mô lớn. Cơ sở dữ liệu khoa học về khả năng chống chịu, sức đề kháng của giống đậu tương Nam Đàn trước điều kiện sống bất lợi đang là mảng trống. Do đó, việc nghiên cứu cơ chế bảo vệ của cây trồng này là thực sự cần thiết. Bài báo giới thiệu kết quả nghiên cứu mới nhất về HR ở *G. max* (L.) Merr. cv. ND khi chịu tác động của chì (Pb) nhằm cung cấp những dẫn liệu khoa học đầu tiên về vấn đề cấp thiết này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm được tiến hành trên giống đậu tương Nam Đàn (*Glycine max* (L.) Merr. cv. ND).

Kim loại chì (Pb) dùng để tác động đến cây đậu tương ở dạng ion Pb^{2+} trong dung dịch muối $Pb(NO_3)_2$.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Hạt đậu tương giống được khử trùng kép bởi etanol 70° và $HgCl_2$ 0,1%. Sau khi ngâm 6 giờ, hạt no nước được ủ trong các đĩa petri có đủ độ ẩm, đặt trong tối ở nhiệt độ thích hợp cho quá trình nảy mầm. Sau 48 giờ ủ, những hạt nảy mầm tốt được lựa chọn trồng trong dung dịch dinh dưỡng Hoagland.

Sau 10 ngày, bổ sung riêng rẽ vào môi trường nuôi cấy muối của chì là $Pb(NO_3)_2$ theo các nồng độ ion Pb^{2+} : 0,1 milimol (mM); 0,5mM và 1,0mM. Đối chứng là công thức không có Pb^{2+} . Các công thức được bố trí ở phòng thí nghiệm với nhiệt độ 23-25°C, độ ẩm 70-75%, cường độ chiếu sáng 150 $\mu\text{mol photon.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 14 giờ liên tục/ngày.

Rễ cây đậu tương trong các thí nghiệm được thu cẩn thận vào các thời điểm 0, 6, 12, 24, và 48 giờ sau khi xử lý Pb^{2+} , cố định ngay trong nitơ lỏng, bảo quản ở -80°C để phân tích sự peroxide hóa lipid. Các chỉ tiêu về mức độ tổn thương tế bào và hàm lượng H_2O_2 , O_2^- được phân tích trên nguyên liệu tươi theo các mốc thời gian nghiên cứu tương ứng.

Nghiên cứu được thực hiện trong năm 2014 tại phòng thí nghiệm Sinh lý Sinh hóa thực vật, Trường Đại học Vinh.

2.2.2. Phương pháp phân tích

Tổn thương của tế bào được đánh giá bằng phương pháp điện hóa của Sullivan, 1971.

Mức độ peroxide hóa lipid màng tế bào được xác định thông qua hàm lượng axit thiobarbituric và các dẫn chất hoạt hóa (TBARS) - sản phẩm quá trình biến đổi lipid - theo phương pháp của Heath and Packer (1968).

Hàm lượng hydrogen peroxide (H_2O_2) nội sinh trong rễ đậu tương được xác định bằng phương pháp so màu ở bước sóng 508nm trên máy quang phổ UV-Vis theo phương pháp của Becana et al. (1986).

Gốc tự do superoxide ($O_2^{\cdot-}$) sinh ra được xác định theo phương pháp của Doke (1983).

Hoạt độ của các enzyme chống ôxy hóa superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) được xác định bằng phương pháp so màu quang phổ theo các phương pháp của Beauchamp and Fridovich (1971); Dhindsa et al. (1981).

Hàm lượng protein trong các phân tích hoạt độ enzyme được xác định theo phương pháp của Bradford (1976) với chất chuẩn là bovine serum albumin (Sigma-Aldrich).

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần. Số liệu được xử lý bằng toán thống kê. Sự sai khác giữa giá trị trung bình của các nghiệm thức được đánh giá theo phân tích ANOVA ở mức ý nghĩa $P < 0,05$. Thể hiện trên các hình 1, 2 và 3 là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn mỗi nghiệm thức của các thông số và mức độ sai khác có ý nghĩa thống kê (nếu có, biểu thị bởi dấu *).

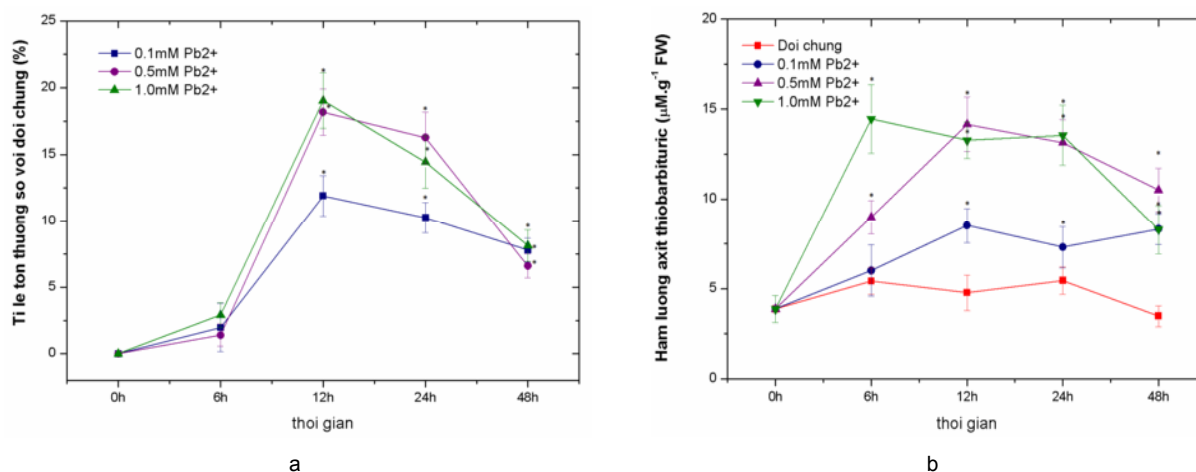
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của Pb^{2+} đối với tế bào rễ đậu tương

Kết quả phân tích điện hóa ghi nhận, trong 6 giờ đầu, chỉ một tỷ lệ nhỏ (1,39-2,91%) tế bào rễ bị tổn thương bởi tác động của Pb^{2+} . Sau 6 giờ, tỷ lệ này bắt đầu tăng lên đạt 11,91% (công

thức 0,1mM Pb^{2+}) - 19,03% (công thức 1,0mM Pb^{2+}) ở thời điểm 12 giờ, rồi giảm xuống nhưng duy trì ở mức cao hơn 7,0% (Hình 1a). Giá trị về mức độ tổn thương của các tế bào chịu ảnh hưởng của Pb^{2+} sau 12, 24 và 48 giờ luôn cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng. Như vậy, tác động của Pb^{2+} đã làm đổi các dòng ion, qua đó làm thay đổi tính thấm của màng các tế bào rễ đậu tương. Tuy nhiên, tương quan tỷ lệ thuận giữa mức độ thiệt hại của tế bào rễ với nồng độ Pb^{2+} chưa được ghi nhận.

Ion Pb^{2+} đã thúc đẩy sự biến đổi lipid của màng tế bào rễ đậu tương trong quá trình peroxide hóa lipid với sản phẩm là các hoạt chất của axit thiotubarbituric (TBARS-Thiobarbituric acid reactive substances). Kết quả phân tích hàm lượng TBARS cho thấy, quá trình peroxide hóa lipid trong các tế bào rễ đậu tương có xu hướng tăng lên ngay sau khi có sự tác động của Pb^{2+} (Hình 1b). Quá trình này diễn ra sớm nhất ở công thức xử lý 1,0mM Pb^{2+} : lượng TBARS nhiều nhất sinh ra đạt được sau 6 giờ là $14,46 \mu M.g^{-1}$ FW, cao gấp 3,74 lần so với ban đầu ($3,87 \mu M.g^{-1}$ FW) và gấp 2,67 lần so với đối chứng ở cùng thời điểm ($5,42 \mu M.g^{-1}$ FW). Quá trình peroxide hóa lipid duy trì cường độ cao đến 24 giờ sau đó giảm xuống. Quá trình biến đổi này cũng được tăng cường ở công thức nồng



Hình 1. Tỷ lệ tổn thương (a) và sự peroxide hóa lipid (b) ở các tế bào rễ đậu tương Nam Đan

Ghi chú: (*) biểu thị sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng ở mức $P < 0,05$

độ 0,5mM Pb^{2+} nhưng chậm hơn và thời gian ngắn hơn so với nồng độ 1,0mM. Trong khi đó, hàm lượng TBARS trong rễ đậu tương xử lý bởi 0,1mM Pb^{2+} tăng nhẹ trong suốt quá trình nghiên cứu. Nhìn chung, hàm lượng TBARS sinh ra có tương quan tỷ lệ thuận với nồng độ Pb^{2+} và có sự sai khác ý nghĩa về chỉ số này giữa các nghiệm thức xử lý bởi Pb^{2+} so với đối chứng.

Kết quả trên tương tự công bố của Hassan and Mansoor (2014) nghiên cứu trên đậu xanh-*V. radiata*, hay Dey et al. (2007) đánh giá HR ở lúa mì-*T. aestivum*, khi các tác giả này cùng ghi nhận sự gia tăng hàm lượng TBARS dưới tác động của Pb hay Cd.

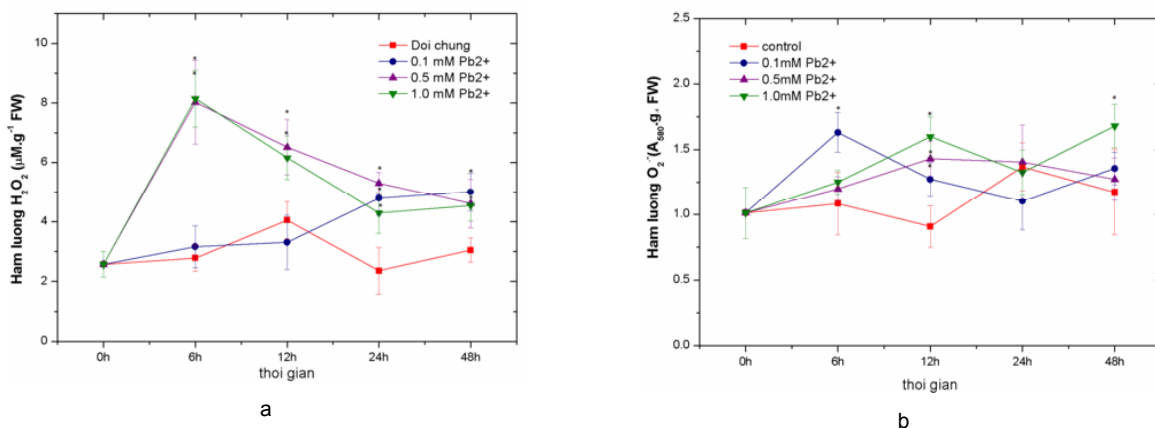
Sự tổn thương tế bào và quá trình peroxide hóa lipid ở rễ đậu tương Nam Đàn dưới ảnh hưởng ion kim loại nặng chì Pb^{2+} biểu hiện rõ đặc điểm cơ bản đầu tiên của HR là thay đổi tính thấm (thay đổi các dòng ion) của màng tế bào. Đặc điểm thứ hai của HR là sự chết của các tế bào rễ chưa được phản ánh trực tiếp qua hai chỉ số trên; nhưng điều này có thể xảy ra nếu thời gian tác động của Pb^{2+} tiếp tục kéo dài.

3.2. Biểu hiện của các dạng oxy hoạt hóa trong rễ đậu tương

Sự hiện diện của Pb^{2+} trong môi trường dinh dưỡng như một yếu tố bất lợi đã gây nên sự biến đổi hàm lượng các dạng oxy hoạt hóa nội sinh như hydrogen peroxide (H_2O_2) và gốc tự do superoxide ($O_2^{\cdot-}$) ở các tế bào rễ đậu tương Nam Đàn (Hình 2).

Khi có sự tác động của Pb^{2+} , quá trình sinh tổng hợp H_2O_2 đã được tăng cường. Hàm lượng H_2O_2 trong rễ đậu ở hai công thức nồng độ 0,5mM và 1,0mM Pb^{2+} đều tăng nhanh và sớm đạt cao đỉnh sau 6 giờ (Hình 2a). Trong thời gian này, lượng H_2O_2 được tổng hợp cao nhất của H_2O_2 đạt được ở các công thức nồng độ 1,0mM và 0,5mM Pb^{2+} ; ví dụ, ở công thức 1,0mM Pb^{2+} , trị số của H_2O_2 là $8,15\mu M.g^{-1}$ khối lượng tươi-FW cao hơn trước khi xử lý Pb^{2+} ($2,57\mu M.g^{-1}FW$) 3,17 lần, và cao hơn đối chứng ở cùng thời điểm 6 giờ ($2,79\mu M.g^{-1}FW$) 2,92 lần. Sau khi đạt cao đỉnh, lượng H_2O_2 ở rễ trong hai công thức nồng độ Pb^{2+} này cùng giảm. Xử lý bởi nồng độ 0,1mM Pb^{2+} cảm ứng H_2O_2 tăng nhẹ trong suốt quá trình nghiên cứu. Trong khi đó, chỉ số này ở công thức đối chứng dao động không đáng kể.

Khác với H_2O_2 , gốc tự do superoxide ($O_2^{\cdot-}$) trong các nghiệm thức tăng không đáng kể sau khi xử lý Pb^{2+} 6-12 giờ, sau đó dao động trong khoảng $1,17-1,59 A_{580}.g^{-1}FW$ (Hình 2b). Dưới tác động của Pb^{2+} , gốc tự do này được tổng hợp nhiều hơn so với đối chứng trong phần lớn thời gian nghiên cứu, nhưng không thể hiện rõ tương quan tỷ lệ giữa lượng $O_2^{\cdot-}$ sinh ra với nồng độ Pb^{2+} . Việc hàm lượng $O_2^{\cdot-}$ ít thay đổi có liên quan trực tiếp đến hoạt động của SOD-enzyme đóng vai trò chuyển hóa $O_2^{\cdot-}$ thành H_2O_2 và O_2 . Enzyme này có hoạt độ cao trong khoảng thời gian 6-48 giờ (Hình 3a) đã góp phần ổn định sự biểu hiện của $O_2^{\cdot-}$.



Hình 2. Hàm lượng hydrogen peroxide (a) và superoxide (b) trong rễ đậu tương Nam Đàn

Ghi chú: (*) biểu thị sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng ở mức $P < 0,05$

Như vậy, sự oxy hóa ở rễ cây đậu tương dưới tác động của Pb^{2+} không bùng nổ như trong HR của thực vật đối với các nguồn bệnh, bởi chỉ có sự gia tăng mạnh mẽ hàm lượng H_2O_2 nội sinh, trong khi O_2^- chỉ tăng nhẹ.

Theo những nghiên cứu trước đây, sự tổng hợp H_2O_2 và O_2^- có liên quan mật thiết với khả năng cảm ứng các phản ứng bảo vệ trong cơ thể thực vật đối với các yếu tố bất lợi từ môi trường (Mittler et al., 2004; Maffei et al., 2007), trong đó, H_2O_2 đóng vai trò là phân tử tín hiệu khởi động các cơ chế đáp trả thích hợp (Mai et al., 2013). Do đó, sự gia tăng sớm, mạnh mẽ và duy trì hàm lượng cao của H_2O_2 ở các tế bào rễ đậu tương có thể liên quan trực tiếp đến cơ chế bảo vệ của HR đối với ion kim loại nặng Pb^{2+} .

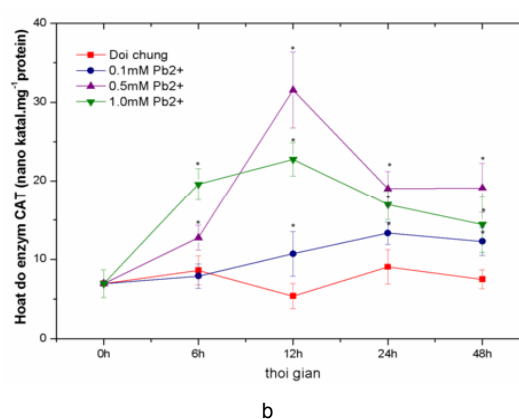
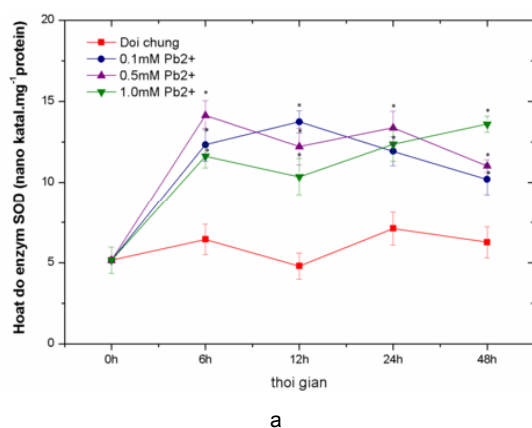
3.3. Các enzyme chống oxy hóa ở rễ đậu tương

Tham gia điều chỉnh HR ở thực vật có các enzyme chống oxy hóa SOD, CAT với vai trò kiểm soát biểu hiện của ROS như O_2^- , H_2O_2 . Hoạt độ của SOD và CAT trong rễ đậu tương Nam Đàn chịu ảnh hưởng của Pb^{2+} luôn có hoạt độ cao hơn, biến đổi mạnh hơn, trong khi các enzyme này ở công thức đối chứng có độ hoạt động thấp và ít thay đổi (Hình 3a, 3b). SOD, enzyme đóng vai trò chuyển hóa O_2^- , trong tất cả các công thức xử lý bởi Pb^{2+} đều tăng nhanh độ hoạt động ngay sau 6 giờ tác động và duy trì

ở mức cao trong suốt thời gian nghiên cứu (Hình 3a). Hoạt độ SOD cao nhất ghi nhận được ở công thức nồng độ 0,5mM Pb^{2+} , đạt 14,13 nano katal.mg⁻¹ protein, cao hơn trước khi xử lý Pb^{2+} (5,15 nano katal.mg⁻¹ protein) 2,74 lần và cao hơn đối chứng ở cùng thời điểm (6,44 nano katal.mg⁻¹ protein) 2,19 lần. Hoạt độ SOD trong các công thức thí nghiệm luôn cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng, tuy nhiên, không ghi nhận được mối tương quan tỷ lệ giữa nồng độ kim loại nặng tác động với độ hoạt động của SOD. Sự tăng nhanh và duy trì hoạt độ cao của SOD sau 6 giờ đã góp phần duy trì ổn định biểu hiện của O_2^- (Hình 2b).

So với SOD, hoạt độ CAT tăng chậm hơn và đạt đỉnh cao muộn hơn, sau tác động của Pb^{2+} 12 giờ. Với chức năng phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 , sự gia tăng hoạt độ của CAT góp phần làm giảm lượng H_2O_2 . Khi hoạt độ CAT tăng nhanh (Hình 3b), cũng chính là thời điểm H_2O_2 bắt đầu giảm xuống (Hình 2a).

Trong quá trình điều chỉnh biểu hiện của HR đối với Pb^{2+} , độ hoạt động của các enzyme SOD, CAT là khác nhau ở các loài thực vật khác nhau. Ở cây đậu xanh (*V. radiata*) có sự tham gia mạnh mẽ của CAT (Hassan and Mansoor, 2014). Trái lại, ở lúa mì (*Triticum aestivum* L.), biểu hiện của SOD tăng lên còn hoạt độ của CAT giảm nhiều (Dey et al., 2007). Giống với kết quả của chúng tôi là nghiên cứu của



Hình 3. Hoạt độ các enzyme superoxide dismutase-SOD (a) và catalase-CAT (b) trong rễ đậu tương Nam Đàn

Ghi chú: (*) biểu thị sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng ở mức $P < 0,05$

Malecka et al. (2001) trên đậu Hà Lan (*P. sativum*) khi các tác giả này ghi nhận: SOD và CAT ở rễ đậu cùng tăng nhanh hoạt độ sau 6 giờ chịu ảnh hưởng của Pb^{2+} .

4. KẾT LUẬN

Dưới tác động của ion Pb^{2+} ở các nồng độ 0,5mM và 1,0mM, phản ứng siêu nhạy cảm đã biểu hiện ở rễ cây đậu tương Nam Đàn sau khi Pb^{2+} tác động 6 giờ với sự sinh tổng hợp mạnh mẽ dạng oxy hoạt hóa hydrogen peroxide H_2O_2 , tăng cường quá trình peroxide hóa lipid màng tế bào và gây mức độ thương tổn cao cho các tế bào.

Các enzyme chống oxy hóa SOD và CAT ở rễ đậu tương với hoạt độ cao trong khoảng thời gian 6-48 giờ có vai trò kiểm soát hàm lượng H_2O_2 và O_2^- nội sinh trong phản ứng siêu nhạy cảm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beauchamp C. and Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- Becana M., Aparicio-Tejo P., Irigoyen J.J. and Sanchez-Diaz M. (1986). Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.*, 82: 1169-1171.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Dey S.K., Dey J., Patra S. and Pothal D. (2007). Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(1): 53-60.
- Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P. and Thorpe T.A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, 32: 93-101.
- Doke N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 23: 345-355.
- Hassan M. and Mansoor S. (2014). Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments. *Turk. J. Agric. For.*, 38: 55-61.
- Heath R.L. and Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189-198.
- Hoglund S., Larsson S. and Wingsle G. (2005). Both hypersensitive and non-hypersensitive responses are associated with resistance in *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *J. Exp. Bot.*, 56: 3215-3222.
- Maffei M.E., Mithöfer A., and Boland W. (2007). Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68: 2946-2959.
- Mai V.C., Bednarski W., Borowiak-Sobkowiak B., Wilkaniec B., Samardakiewicz S. and Morkunas I. (2013). Oxidative stress in pea seedlings leaves in response to *Acyrtosiphon pisum* infestation. *Phytochemistry*, 93: 49-62.
- Malecka A., Jarmuszkiewicz W. and Tomaszewska B. (2001). Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim. Pol.*, 48(3): 687-98.
- Mittler R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Pontier D., Balague C. and Roby D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *CR Acad. Sci. III*, 321: 721-734.
- Rodriguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pazmino D.M., Testillano P.S., Risueno M.C., del Rio L.A. and Sandalio L.M. (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol.*, 150: 229- 243.
- Rueda A., Roman Y., Lobo M., and Pelaez C. (2011). Analysis of tomato seedling cell death in response to copper and paraquat induction. *Trop. Plant Pathol.*, 36: 169-177.
- Sullivan Y.C. (1971). Techniques of measuring plant drought stress. In: Larson K.L. and Eastin J.D. (Eds.), *Drought injury and resistance in crops*. Crop Science Society of America, Madison, WI, p 1-8.