



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“
Биологически факултет
Катедра „ Физиология на растенията“

Камелия Димитрова Миладинова - Георгиева

**РАСТЕЖ И АКУМУЛАЦИОНЕН ПОТЕНЦИАЛ НА ДВЕ
ЛИНИИ *PAULOWNIA*, ОТГЛЕЖДАНИ НА ЗАМЪРСЕНА С
ТЕЖКИ МЕТАЛИ ПОЧВА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за получаване на научната и образователна степен
„ДОКТОР“

Научна специалност
01.06.16 – Физиология на растенията

Научен консултант:
доц. д-р Юлиана К. Марковска

София 2014 г.

Дисертацията е написана на 137 печатни страници и включва 26 фигури, 21 таблици и 20 снимки. Списъкът на цитираната литература съдържа 411 източника, от които 2 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен съвет на Катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, проведено на 07.11.2013 г.

Изследванията на дисертацията са извършени в лабораториите на БИО ТРИИ ООД, Катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски” и Катедра „Дендрология” на Лесотехнически университет, София. Вегетационните опити са изведени във вегетационната къща на ИФРГ „Акад. М. Попов“.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2014 г. от часа в заседателната зала на Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, бул. „Драган Цанков” №8, на открито заседание на

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“
Биологически факултет
Катедра „ Физиология на растенията“

Камелия Димитрова Миладинова - Георгиева

**РАСТЕЖ И АКУМУЛАЦИОНЕН ПОТЕНЦИАЛ НА ДВЕ
ЛИНИИ *PAULOWNIA*, ОТГЛЕЖДАНИ НА ЗАМЪРСЕНА С
ТЕЖКИ МЕТАЛИ ПОЧВА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за получаване на научната и образователна степен
„ДОКТОР“

Научна специалност
01.06.16 – Физиология на растенията

Научен консултант:
доц. д-р Юлиана К. Марковска

Рецензенти:
проф. д-р Евгени Ананиев
проф. дбн Лиляна Масленкова

София 2014 г

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АКФ – активни форми кислород

МДА – малондиалдехид

МДК – максимално допустими концентрации

АРХ – аскорбат пероксидаза

ВАР – бензиламинопурин

ВФ – биоаккумуляционен фактор

САТ - каталаза

ЕДТА – етилендиаминотетраоцетна киселина

GPO- глутатион пероксидаза

GR – глутатион редуктаза

g_s – устична проводимост

GSH – редуциран глутатион

GSSG – окислен глутатион

IAA – индолилоцетна киселина

IBA – индолилмаслена киселина

LAR – отношение на общата листна маса към общото сухо тегло

MS среда – среда на Murashige и Skoog

PAL – фенилаланин амоняк – лиаза

PAR – фотоактивна радиация

P_N – скорост на фотосинтезата

POX –гваякол пероксидаза

S_{mes} – обем на вътреклетъчното пространство на единица листна площ

TF – транслационен фактор

Tr – интензивност на транспирацията

WUE – ефективност на използване на водата

I. УВОД

Производството на черната и цветната металургия е един от главните източници на замърсяване на почвите и водите с тежки метали – Cu, Cd, Pb, Zn. По данни на Министерството на околната среда и водите от 2008 г., в България има около 36 000 ha почви, които съдържат тежки метали и металоиди в по-високи от максимално допустимите концентрации (МДК) и съгласно приетите в страната стандарти подлежат на ремедиация. Наднормените концентрации на тежки метали в почвите и водите водят до различна степен на увреждане на отглежданите растения, понижаване на добивите от тях и получаване на замърсена продукция.

За ремедиация на замърсени с тежки метали почви се използват два типа технологии – конвенционални и фитотехнологии. Конвенционалните технологии са скъпи, трудно приложими на големи територии и неприемливи от екологична гледна точка, тъй като разрушават почвата и я превръщат в биологично неактивен субстрат. Фитотехнологиите са насочени към използване на естествените възможности на определени растения (и асоциираните с тях микроорганизми) да извличат, трансформират и инактивират тежки метали (и органични замърсители) от почвите. На съвременния етап тези технологии все още са в процес на развитие и се прилагат ограничено, въпреки че са средно с 40% по-евтини от други *in situ* методи и с повече от 90% - в сравнение с технологиите *ex situ*.

Едно от основните технологични направления при фиторемедиацията - фитоекстракцията - се основава на акумулацията на замърсителите в надземните части на растенията, последвано от събирането на биомасата. Металната фитоекстракция се развива в две направления: използване на естествени хиперакумулиращи растения и на формиращи голямо количество биомаса културни растения, чиито акумулиращи способности се подобряват посредством допълнително мобилизиране на съдържащите се в почвата метали чрез използването на сърфактанти (повърхностно активни вещества), ко-разтворители, циклодекстрини, хелатиращи агенти и органични киселини (т. нар. асистирана или индуцирана фитоекстракция). Хиперакумулиращите растения растат и се развиват бавно, а синтезираната от тях биомаса е малка. Затова по-удачно е развиването на второто направление, при което поради продължителността на фитоекстракционния процес с десетки години, метал-акумулиращите културни растения могат да бъдат използвани като суровина за производство на биоенергия.

Когато замърсяването на почвите е в дълбочина и с разнообразни замърсители, за ремедиацията им се използват алтернативни бързо растящи дървесни видове с дълбока коренова система. Някои от тях (топола, ива, акация, ясен, елша) намират приложение за ремедиация на почви, замърсени с неорганични и органични замърсители. *Paulownia* е предпочитана за ремедиация на почви, замърсени с Pb, Zn, Cu и Cd поради високия ѝ потенциал за натрупване на биомаса. Този дървесен вид принадлежи към флората на Китай и се отглежда успешно в смесени плантации с царевица, фасул, джинджифил и др. *Paulownia tomentosa* е интродуцирана в САЩ и Европа като декоративен вид. През последните години различни видове *Paulownia* са изучавани интензивно за изясняване на възможностите им за акумулиране на нитрати и на различни замърсители, включително и на тежки метали. Този дървесен вид формира голямо количество биомаса и може да бъде използван успешно за производство на биоенергия (биоетанол), хартия, мебели и др. От 2001 г. функционира *The World Paulownia Institute* (WPI), който се занимава с

разработването на технологии за получаване на биогорива от дървесината ѝ. Разработени са и методи за микроразмножаването на *Paulownia elongata* и *Paulownia fortunei*. Внедряването на тези методи в практиката позволява получаването на голямо количество посадъчен материал, който може да бъде използван в програмите за залесяване или за подобряване на генетичния ѝ потенциал.

В БИОТРИИ ООД, България са създадени редица хибридни линии, с цел подобряване на техните характеристики (сухоустойчивост, студоустойчивост): *P. elongata x fortunei*, *P. tomentosa x fortunei*, *P. elongata x kawakamii* и др. *P. elongata x fortunei* и *P. tomentosa x fortunei* са предпочитани от фермерите в България поради това, че натрупват голямо количество биомаса и са непретенциозни по отношение на типа почва и условията на отглеждане. *Paulownia tomentosa x fortunei* формира по-голяма корона, но височината на дърветата не е особено голяма. *Paulownia elongata x fortunei* израства на височина, но образува по-малко клони. Няма данни за приложението на тези две линии за фиторемедиация на почви, съдържащи различни замърсители, както в България, така и в световен мащаб.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е въз основа на физиологични, биохимични и агрохимични изследвания да бъде установен фиторемедиационния потенциал и толерантността към действието на тежки метали на две линии *Paulownia* (*Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*), селектирани от БИОТРИИ ООД, България, с оглед на бъдещото им приложение за пречистване на замърсени почви; да се проследи влиянието на някои хелатиращи агенти върху растежа и фотосинтезата на тези линии, както и да се тества хипотезата за защитното им действие срещу стреса, предизвикан от действието на тежки метали.

За реализиране на целта бяха поставени следните задачи:

1. Да се направи агрохимична характеристика на почвени образци и да се определят биодостъпните количества на тежки метали в тях;
2. Да се изследват уврежданията и да се проследят промените в натрупване на свежа и суха биомаса в корените и надземните части на растенията, отгледани при хидропонни и вегетационни условия, в присъствие и отсъствие на различни хелатиращи агенти (ЕДТА, цитрат);
3. Да се определят промените в съдържанието на тежки метали в корените и надземните части на двете линии при различни условия на отглеждане;
4. Да се изследват промените в някои физиологични характеристики на водообмена и фотосинтетичния апарат на двете линии (ефективност на използване на водата, скорост на транспирация и на фотосинтеза, съдържание на пластидни пигменти);
5. Да се определят промените в нивата на липидно пероксидиране и в количеството на H_2O_2 ;

6. Да се изследва ефекта на тежките метали и хелатиращите агенти върху антиоксидантната ензимна защита на растенията.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Растителен материал и условия на отглеждане

1.1. Хидропонни експерименти

Културите от надземни части от *Paulownia tomentosa*, *Paulownia elongata* и техните хибриди с *Paulownia fortunei* са инициирани от стерилно покълнали семена. Разглежданата в работата хранителна среда е базирана на формулата на Murashige and Skoog (1968) с добавка на 2,5 % (w/v) захароза, 0,8 % (w/v) агар и витамини. При разработването на мултипликационния протокол, към MS средата са добавени 1.0 mg l⁻¹ бензиламинопури (BAP) и 0.1 mg l⁻¹ индолил-3-оцетна киселина (IAA). Средата съдържа още 3 % захароза (w/v), 0.8 % агар и витамини. След намножаването на надземните части, от тях се вземат връхчета с височина 1.5 – 2 см и се прехвърлят в среда за инициране на коренообразуване (вкореняване), която съдържа ½ от солите на MS средата, 2 % захароза, 6% агар и витамини. Добавени са 1,0 mg l⁻¹ индолил маслена киселина (IBA) и 0.2 mg l⁻¹ IAA.

Намножените растения от *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei* са отглеждани първоначално на 1/4 хранителен разтвор на Hellriegel с добавка на всички микроелементи от A-Z по Hoagland (pH 5.9), с намалено съдържание на ZnSO₄ до 0.001 mg l⁻¹ за период от 20 дни и по-късно на 1/2 от същия разтвор за период от 28 дни във фототермостатна камера с 16-h фотопериод (PAR 100 μmol m⁻² s⁻¹, измерена на горната листна повърхност, при температури 25/23±1°C и относителна влажност 60/70%). Третирането с тежки метали е извършено на 48^{-я} ден. Добавянето им е извършено в следните концентрации: Cd [0.5; 2.5 и 5.0 mg l⁻¹ Cd, прибавен под формата на Cd(NO₃)₂·4H₂O: MERCK]; Pb [5.0; 10.0 и 20.0 mg l⁻¹ Pb, прибавен под формата на Pb(NO₃)₂: MERCK] и Zn [10.0; 20.0 и 30.0 mg l⁻¹ Zn, прибавен под формата на Zn(NO₃)₂·6H₂O: MERCK]. Растенията, отгледани само в хранителен разтвор на Hellriegel (pH 5.9), без добавяне на тежки метали, са използвани като контролни.

1.2. Експерименти при вегетационни условия

Експерименталната почва е взета на разстояние около 1 km от района на хвостохранилището на Металургичния комбинат „Кремиковци”. Събирането на почвени образци е направено от повърхността и от дълбочина 20 до 40 cm. Тези образци (общо тегло около 50 kg) са обединени, изсушени до постоянно тегло, пресяти през найлоново сито и са смесени с пясък в съотношение 3:1.

В качеството на моделни обекти са използвани едногодишни растения от двете линии *Paulownia* - *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, които са засадени в предварително дренирани 5 kg пластмасови съдове, съдържащи 2.5 kg от тестираната почва. Поливането на почвата е извършено ежедневно до 60% пълна почвена влагемност. Продължителността на експеримента е 3 месеца (от 20 април до 20 юли, 2012), а растенията са отгледани при осветление, нормално за сезона и за условията на

вегетационната къща. През този период температурите на въздуха са варирали от 15° C до 35° C, а относителната влажност – от 40% до 65%.

На 60^а ден от засаждането на растенията са добавени два хелатиращи агента: ЕДТА (ethylenediaminetetraacetic disodium salt dihydrate, purity \geq 99%, Fluka) и цитрат (citrate trisodium dihydrate, purity \geq 99%, Fluka), в концентрации 1, 5 и 10 mM kg⁻¹ суха почва, при рН 8.00 (естественото рН на почвата) в еднократна доза след разтваряне на съответните количества от тях в 150 ml вода. Нетретираниите с хелатиращи агенти растения и от двете линии са използвани в качеството на контролни.

2. Експериментални методи

2.1. Биометрични показатели – измерване на свежо и сухо тегло, дължина на корените и на надземната част, брой листа, обща листна площ чрез софтуерна програма *SigmaScan Pro 5*, отношение на общата листна площ към общото сухо тегло на всяко растение (LAR) - по Hunt (1982)

2.2. Микроскопски наблюдения върху листната структура

2.3. Определяне на съдържанието на пигменти – по Lichtenthaler (1987)

2.4. Измерване на листния газообмен – посредством автоматичен газанализатор LICOR 6400 (*Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA*), с използване на red-blue LED светлинен източник

2.5. Определяне на съдържанието на пероксиди – по Jessup et al. (1994)

2.6. Определяне на степента на липидно пероксидиране – по Heath and Packer (1968)

2.7. Определяне на общото фенолно съдържание – по Pffefer et al. (1998)

2.8. Определяне на общото флавоноидно съдържание – по Zhishen et al. (1999)

2.9. Определяне на общото съдържание на антоциани – по Mancinelli et al. (1975)

2.10. Определяне съдържанието на разтворими белтъци – по Lowry et al. (1951)

2.11. Определяне на нискомолекулни антиоксиданти – аскорбат и дехидроаскорбат - по метода на Foyer et al. (1983) и на окислен и редуциран глутатион – по метода на Griffith (1980)

2.12. Определяне на ензимни активности – аскорбат пероксидазна (ЕС 1.11.1.11) – по метода на Nakano and Asada (1981), глутатион редуктазна (ЕС 1.6.4.2) – по метода на Sherwin and Farrant (1998), каталазна (ЕС 1.11.1.6) – по метода на Aebi (1984), гваякол пероксидазна (ЕС 1.11.1.7) – по метода на Polle et al. (1994), фенилаланин амоняк-лиазна (ЕС 4.3.1.24) – по метода на Yuan et al. (2002).

2.13. Определяне на общото количество на Cd, Cu, Pb, Zn, Fe, Ca, Mg, Na и K в почвени и растителни образци – след киселинна хидролиза с помощта на оптико-емисионен спектрометър с източник на възбуждане - индуктивно свързана плазма (*CCD Simultaneous ICP OES, Varian, Australia*) и на атомно-абсорбционен спектрофотометър (*Perkin-Elmer 5000, UK*) – по Doumett et al. (2008). Изчислението на биоаккумуляционните коефициенти (BC) при хидропонните опити е извършено по метода на Nanda-Kumar et al. (1995). Изчисляването на биоаккумуляционните коефициенти (BC) и трансляционните коефициенти (TF) при вегетационните опити е извършено по метода на Tu and Ma (2002).

2.14. Статистическа обработка на резултатите - чрез използване на метода на Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$) след прилагането на ANOVA анализ (*Statgraphics Plus, V. 2.1*).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV. 1. Хидропонни опити

IV. 1.1. Влияние на Cd, Pb и Zn върху растежа и развитието на растенията

В сравнение с контролните растения, третираните с тежки метали не проявяват визуално никакви симптоми на фитотоксичност (хлороза, некроза, завяхване) при нито един от изследваните варианти, въпреки че свежата, сухата биомаса и общата им листна площ драстично намаляват. Отношението листна площ/ обща суха биомаса (LAR) обаче нараства след третиране с по-високи концентрации на Cd и Pb, но не и на Zn, докато отношението листна площ/брой листа намалява и при двете линии (Таблица 1). При *Paulownia tomentosa* x *fortunei* най-силен негативен ефект оказва Cd, а при *Paulownia elongata* x *fortunei* - Pb и Zn.

Таблица 1. Промени в листната площ, отношение листна площ към обща суха биомаса (LAR) и отношение листна площ към брой листа при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, измерени на 58^а ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^а ден от третирането с тежки метали. Стойностите са представени с \pm SE (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0,1).

Species	Treatment	Leaf area [cm ²]	LAR [cm ² g ⁻¹]	Leaf area/leaf number
<i>Paulownia tomentosa</i> x <i>fortunei</i>	Control	429±16b	497±25a	34.35±6.38b
	0.5 mg l ⁻¹ Cd	218±24a	474±57a	19.79±3.18a
	2.5 mg l ⁻¹ Cd	195±40a	473±42a	18.09±0.84a
	5.0 mg l ⁻¹ Cd	207±38a	510±35a	18.43±0.76a
	5.0 mg l ⁻¹ Pb	241±39a	523±27a	18.55±4.85a
	10.0 mg l ⁻¹ Pb	257±39a	531±29a	24.99±3.12a
	20.0 mg l ⁻¹ Pb	241±33a	504±33a	26.15±7.51a
	10.0 mg l ⁻¹ Zn	198±27a	472±22a	21.45±7.01a
	20.0 mg l ⁻¹ Zn	277±38a	487±32a	20.70±7.92a
	30.0 mg l ⁻¹ Zn	268±27a	498±35a	21.86±3.46a
<i>Paulownia elongata</i> x <i>fortunei</i>	Control	502±26d	415±54ab	50.20±1.57d
	0.5 mg l ⁻¹ Cd	462±26cd	484±27abc	45.34±2.04cd
	2.5 mg l ⁻¹ Cd	376±36bcd	437±53abc	47.06±1.71bcd
	5.0 mg l ⁻¹ Cd	271±48abc	560±73c	32.76±0.79abc
	5.0 mg l ⁻¹ Pb	357±42abcd	480±88abc	34.02±0.63abcd
	10.0 mg l ⁻¹ Pb	303±19abcd	433±35abc	33.69±1.49abcd
	20.0 mg l ⁻¹ Pb	143±17a	530±72bc	17.53±0.33a
	10.0 mg l ⁻¹ Zn	534±21bcd	415±32a	59.43±1.01bcd
	20.0 mg l ⁻¹ Zn	225±29ab	451±62abc	22.03±0.88ab
	30.0 mg l ⁻¹ Zn	171±25abcd	419±29abc	14.53±1.32abcd

IV. 1.2. Натрупване на Cd, Pb и Zn в различни органи на растенията

Концентрациите на тежки метали при нашите опити варират в диапазона от 4 до 40 μM за Cd, 40 до 160 μM за Pb и от 700 до 2100 μM за Zn и са подбрани според наличните литературни данни за третиране на тревисти видове растения при хидропонни условия и приблизителното съдържание на тежки метали в почвите в близост до Металургичния комбинат Кремиковци, София.

Съдържанието на тежки метали в растенията нараства с увеличаване на концентрацията им в хранителния разтвор, а отчетените стойности в корените са значително по-високи в сравнение с тези за стъблата, листните дръжки и листата. В органите на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* се установяват значително по-високи стойности на акумулираните метали в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei*, с изключение на корените при третирането с 0.5 и 5.0 mg l^{-1} Cd. Не винаги най-високата концентрация на метал в разтвора съответства на най-висок биоаккумуляционен коефициент (BC) (Таблицы 2 и 3).

Таблица 2. Съдържание на тежки метали и биоаккумуляционни коефициенти (BC) в органите на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* след третиране с различни концентрации на Cd, Pb и Zn, прибавени към хранителния разтвор на Hellriegel. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно LSD test ($P > 0,05$).

Концентрация на метала [mg l^{-1}]	Съдържание на метала [mg kg DW^{-1}]				BC
	Листа	Листни дръжки	Стъбла	Корени	
Cd					
0	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	-
0.5	1.8 \pm 0.2ab	1.1 \pm 0.1ab	2.9 \pm 0.2a	26.3 \pm 2.4a	58.4
2.5	3.9 \pm 0.4ab	10.1 \pm 1.4ab	14.0 \pm 0.4a	541.7 \pm 56.8b	222.3
5.0	11.9 \pm 1.3abc	9.5 \pm 0.9ab	21.4 \pm 1.3a	458.2 \pm 32.7b	95.9
Pb					
0	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	-
5.0	5.6 \pm 0.6abc	7.6 \pm 0.8ab	13.2 \pm 0.4a	1580.8 \pm 231.5c	318.8
10.0	19.6 \pm 2.8bc	11.6 \pm 1.9ab	31.2 \pm 2.7a	2608.0 \pm 341.7d	263.9
20.0	24.0 \pm 2.5c	14.4 \pm 3.8b	38.4 \pm 3.5a	7941.2 \pm 563.8e	398.9
Zn					
0	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	0.0 \pm 0.0a	-
10.0	177.6 \pm 12.8d	141.6 \pm 10.5c	319.2 \pm 12.8b	488.0 \pm 34.2b	80.7
20.0	274.8 \pm 23.5f	201.2 \pm 15.9d	476.0 \pm 24.5c	843.2 \pm 67.3b	65.9
30.0	240.0 \pm 23.4e	221.6 \pm 12.8e	461.6 \pm 65.9c	1566.8 \pm 123.5c	67.6

Таблица 3. Съдържание на тежки метали и биоакумулационни коефициенти (BC) в органите на *Paulownia elongata* x *fortunei* след третиране с различни концентрации на Cd, Pb и Zn, прибавени към хранителния разтвор на Hellriegel. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно LSD test (P>0,05).

Концентрация на метала [mg l ⁻¹]	Съдържание на метала [mg kg DW ⁻¹]				BC
	Листа	Листни дръжки	Стъбла	Корени	
Cd					
0	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	-
0.5	0.3±0.02a	0.5±0.03a	0.8±0.02a	55.0±3.4a	113.3
2.5	0.9±0.04a	3.1±0.04a	4.0±0.24ab	146.5±26.8b	60.2
5.0	2.6±0.03a	12.0±0.91a	14.6±1.30b	551.8±52.7e	111.6
Pb					
0	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	-
5.0	1.2±0.61a	2.4±0.03a	3.6±1.40ab	540.0±23.1e	108.7
10.0	2.4±0.08a	9.6±0.09a	12.0±0.70ab	1592.0±34.2g	160.4
20.0	6.4±0.05a	4.8±0.04a	11.2±0.05ab	4220.8±56.3h	211.6
Zn					
0	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	-
10.0	92.1±2.8b	112.4±10.5b	204.5±12.8c	234.5±31.2c	43.9
20.0	173.4±21.5c	155.6±15.9c	329.0±14.5d	457.8±47.3d	39.3
30.0	177.4±23.4c	243.6±12.8d	421.0±15.9e	622.8±56.5f	34.8

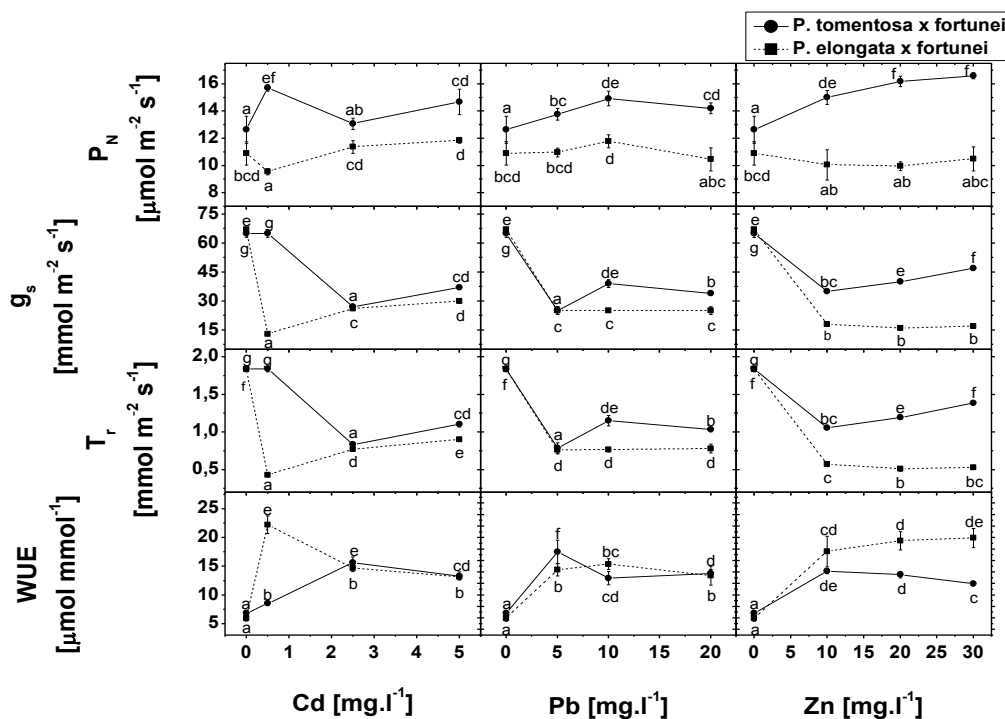
В няколко изследвания са получени различни резултати за акумулацията и биоакумулационните коефициенти на металите в едно и също растение. Нашите резултати са подобни на получените от Tanhan et al. (2007) за *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson, характеризирана като Pb хиперакумулатор. При отглеждане на растенията в условия на хидропоник при подобни на нашите концентрации за Cd, Pb и Zn, приложени за време 15 дни, количеството на акумулираното в корените Pb достига 60 655.7 mg kg⁻¹ суха биомаса. Биоакумулационните коефициенти намаляват в реда Pb > Cd > Zn, докато получените от нас намаляват в реда Pb > Zn > Cd. Нашите резултати за BC са с порядък пониски в сравнение с получените за *Chromolaena odorata* (L.).

IV.1.3. Влияние на Cd, Pb и Zn върху листния газообмен

Независимо, че в листата на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* е установено значително по-високо съдържание на тежки метали в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei* (Таблицы 2 и 3), ходът на промените в скоростта на тяхната нето-фотосинтеза (P_n) бележи ясно изразена тенденция на повишаване. Този параметър се променя по различен начин при двете линии под действие на Cd, Pb и Zn (Фиг. 1). За *Paulownia tomentosa* x *fortunei* са установени най-високи стойности на P_N при най-ниската концентрация на Cd - 0.5 mg l⁻¹,

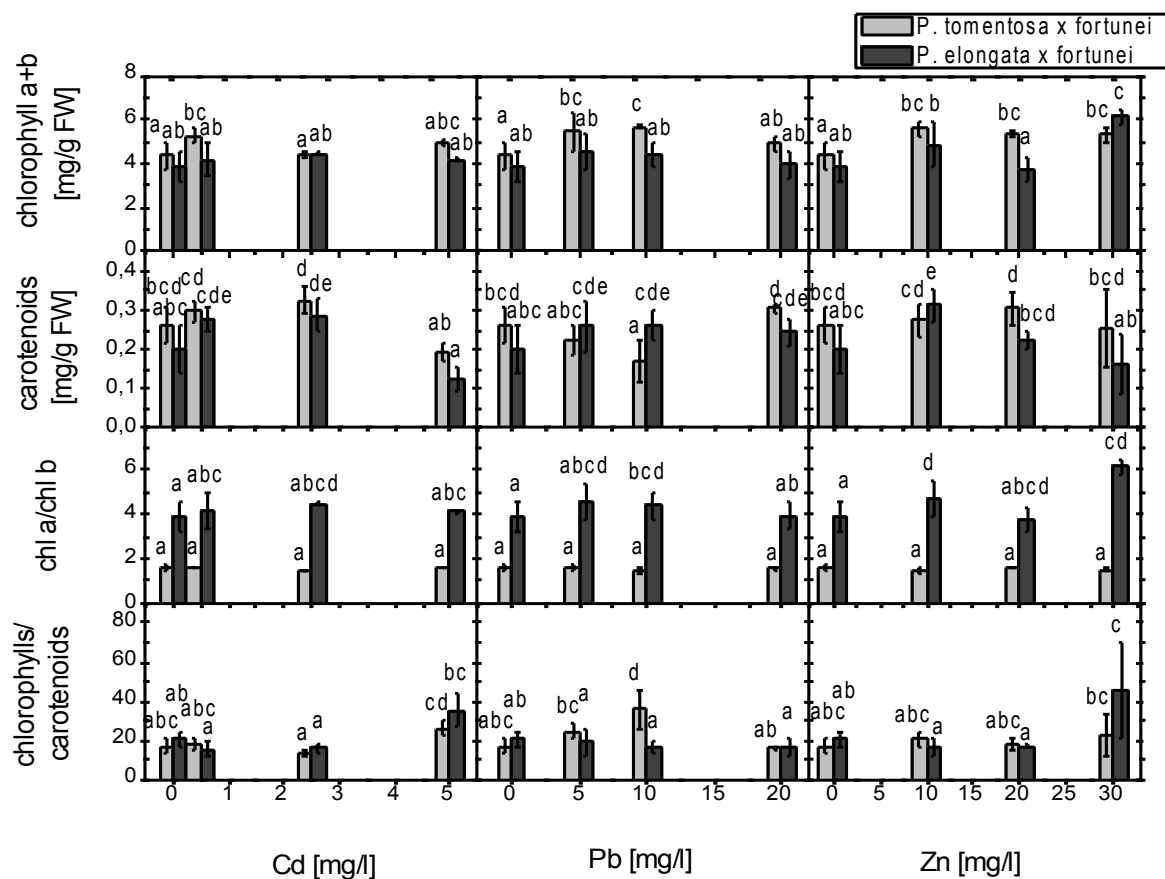
средната концентрация на Pb - 10 mg l⁻¹ и най-високата концентрация на Zn - 30 mg l⁻¹ (около 2100 μM Zn) в сравнение с контролата. Най-ниската концентрация на Cd в разтвора не води до промени в устичната проводимост (g_s) и интензивността на транспирация (T_r) в сравнение с контролата, докато при най-ниските концентрации на Pb и Zn се наблюдава рязко намаляване на тези параметри. След третиране с по-високи концентрации на тежките метали се установява ход на промени на g_s и T_r, подобен на P_N, но стойностите и на двата параметъра остават по-ниски от контролата. При *Paulownia elongata x fortunei* най-ниски стойности на P_N, g_s и T_r са установени при най-ниската концентрация на Cd в разтвора. С увеличаване на концентрацията на този метал, ходът на промените на P_N, както и на g_s и T_r, бележи тенденция на повишаване. Третирането с 10 mg l⁻¹ Pb слабо повишава стойностите на P_N, но g_s и T_r не се изменят в сравнение с предишния вариант на третиране. С увеличаване на концентрацията на Zn в разтвора стойностите на трите изследвани параметъра намаляват приблизително по един и същ начин в сравнение с контролата. Най-ниски величини на P_N и за двете линии са установени при най-високите стойности на биоаккумуляционните коефициенти, отчетени за трите метала (Таблицы 2 и 3). Получените резултати за промените в P_N корелират положително с установените изменения в отношението листна площ/обща суха биомаса (LAR) при *Paulownia tomentosa x fortunei*. При *Paulownia elongata x fortunei* не се наблюдава подобна зависимост (Таблица 1).

Ние установяваме по-висока ефективност на използване на водата (WUE) и при двете линии *Paulownia* във вариантите с малки и средни концентрации на тежки метали, с изключение на третирането с 0.5 mg l⁻¹ Cd на *Paulownia elongata x fortunei* (Фиг. 1). Този факт може да се разглежда като опит за подобряване на техния воден режим. Най-големи са разликите между отчетените стойности на WUE за двете линии при 0.5 mg l⁻¹ Cd и при увеличаване на концентрацията на Zn в разтвора (Фиг. 1).



Фигура 1. Промени в нето-фотосинтезата (P_N - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), устичната проводимост (g_s - $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), транспирацията (T_r - $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) и ефективността на използване на водата (WUE - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) при *Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*, отглеждани като хидропонна култура при различни концентрации на тежки метали. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ ($n=5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P>0,05$).

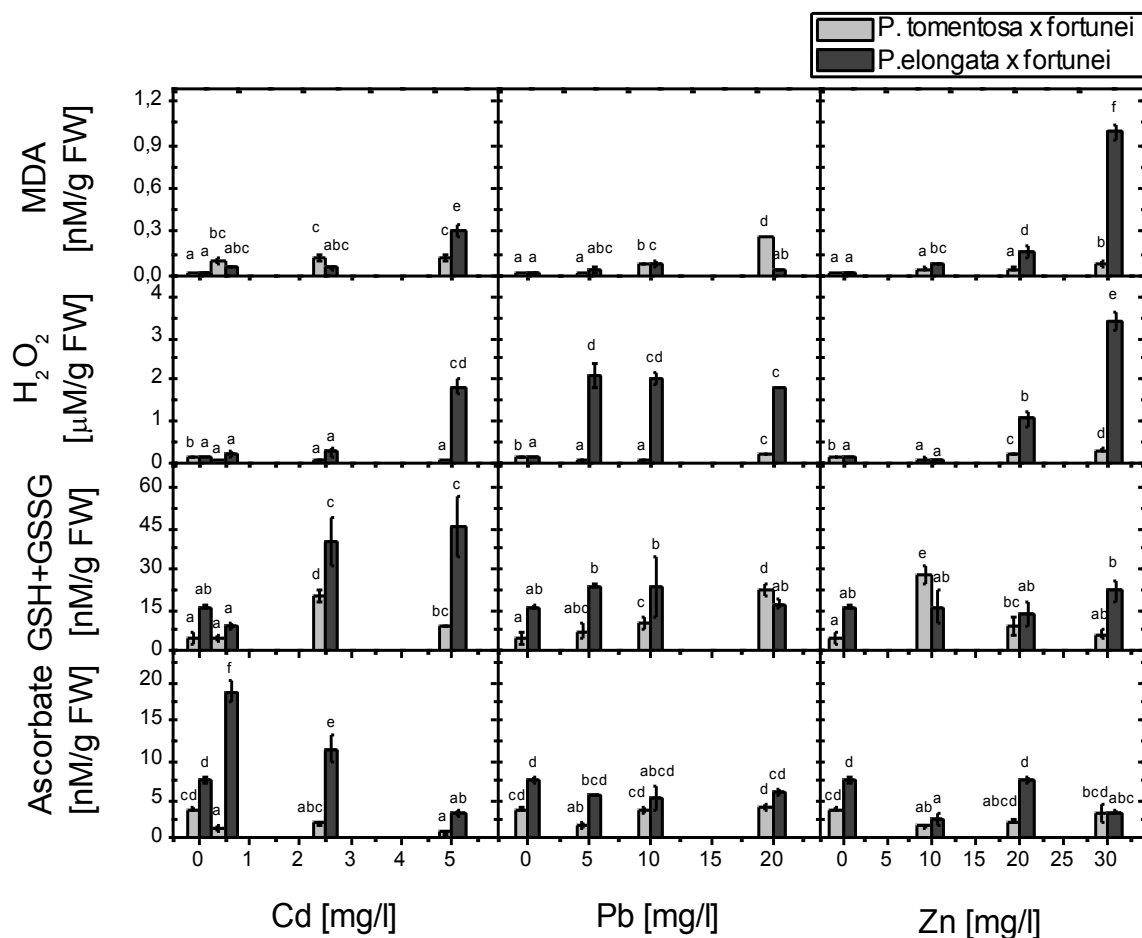
Третирането с Cd и Pb и на двете линии води до слабо повишаване в количеството на хлорофил a+b. Най-високи стойности са достигнати след третиране с Zn. Отношението на хлорофил a/хлорофил b е приблизително двукратно по-ниско при контролния вариант на *Paulownia tomentosa x fortunei* в сравнение с този на *Paulownia elongata x fortunei*. След третиране с тежки метали това отношение остава близко до контролата при *Paulownia tomentosa x fortunei* и по-високо от нея при *Paulownia elongata x fortunei*. Количеството на каротеноидите намалява в най-голяма степен при най-високите концентрации на Cd и Zn в разтвора, но не и на Pb и при двете линии. Отношението хлорофил/ каротеноиди се променя по-нееднозначно и в по-голяма степен (Фиг. 2).



Фигура 2. Промени в съдържанието на хлорофилни и каротеноидни пигменти при *Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*, отглеждани като хидропонна култура при различни концентрации на тежки метали. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ ($n=5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P>0,05$).

IV. 1.4. Влияние на Cd, Pb и Zn върху антиоксидантната защита на растенията

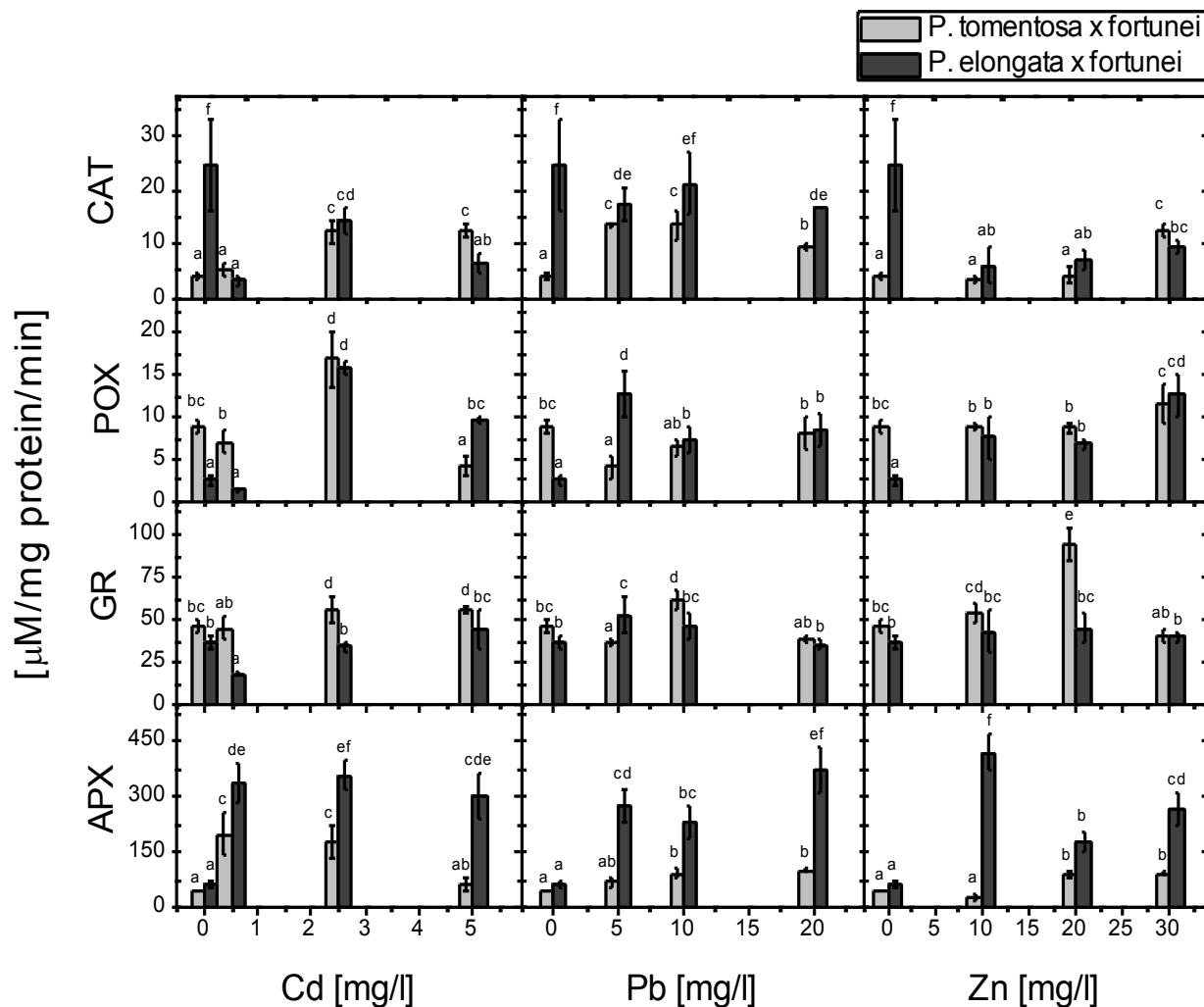
Измерените стойности на МДА и водороден пероксид в качеството на маркери за нивото на оксидативен стрес показват, че с увеличаване на концентрацията на тежките метали те се увеличават (Фиг. 3). Най-високите концентрации на Pb в хранителния разтвор предизвикват увеличаване на стойностите на МДА и в по-малка степен на водородния пероксид при *Paulownia tomentosa* x *fortunei*, докато при *Paulownia elongata* x *fortunei* подобна тенденция се наблюдава в присъствие на Cd и Zn (Фиг. 3).



Фигура 3. Промени в съдържанието на МДА, H₂O₂, редуциран и окислен глутатион и аскорбат при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, отглеждани като хидропонна култура при различни концентрации на тежки метали. Стойностите са представени с ±SE (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P>0,05).

Активностите на каталазата, гваякол пероксидазата, аскорбат пероксидазата и глутатион редуктазата нарастват по различен начин в листата на двете линии. Активността на глутатион редуктазата и аскорбат пероксидазата нараства в най-голяма степен. Тези ензими участват в аскорбат-глутатионовия цикъл и осигуряват ефективна защита на изследваните линии *Paulownia* срещу въздействието на Cd, Pb и Zn (Фиг. 4). Общото количество глутатион (GSH + GSSG) нараства по различен начин с увеличаване на нивото на оксидативен стрес, индуциран от тежките метали (Фиг. 3). Установените стойности са по-високи от контролните, особено след третиране на *Paulownia elongata* x *fortunei* с

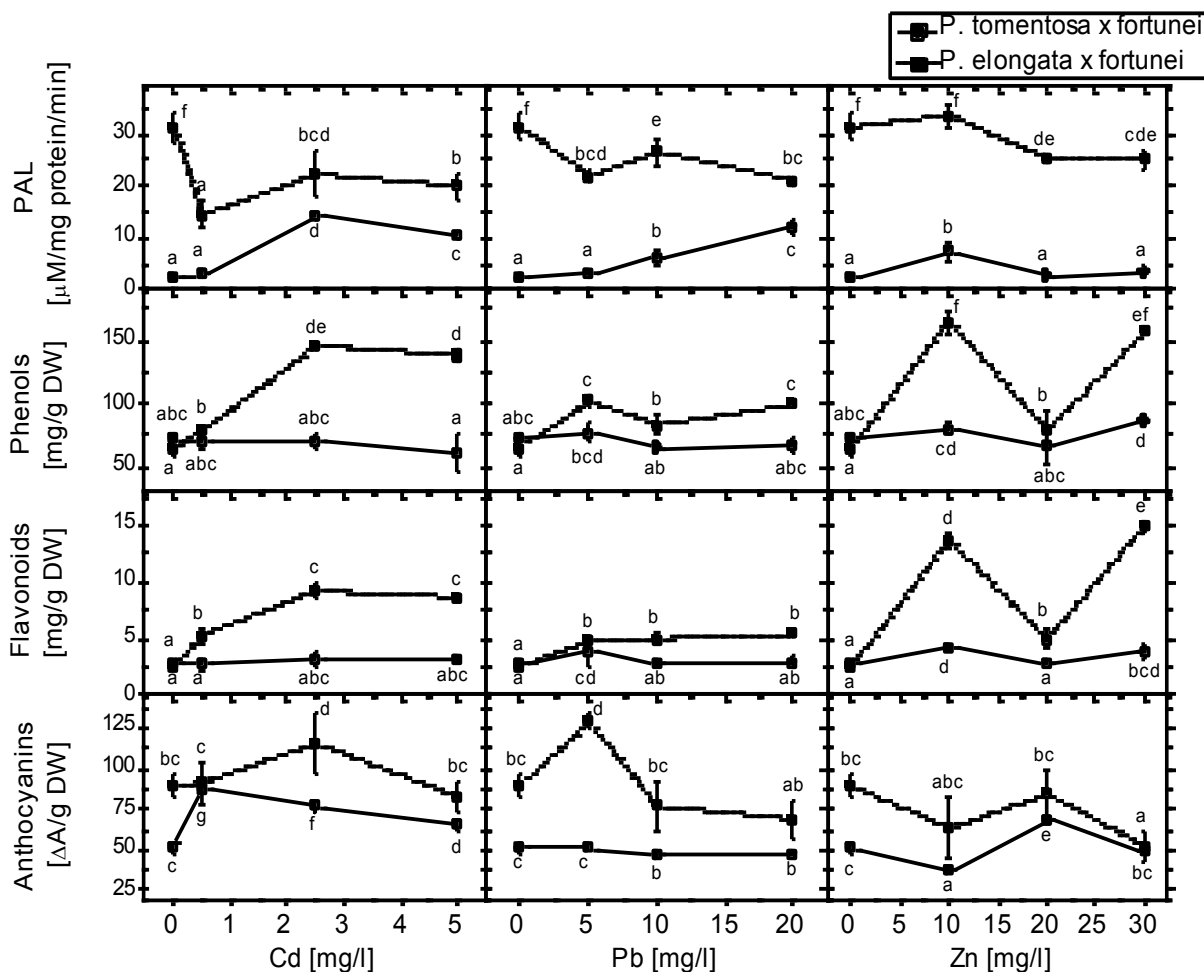
нарастващи концентрации на Cd и Pb. Количеството на аскорбата нараства драстично в листата на *Paulownia elongata* x *fortunei* след третиране с ниски и средни концентрации на Cd, докато при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* измерените стойности са по-ниски от контролните (Фиг. 3).



Фигура 4. Промени в активността на каталазата (CAT- $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$), гваякол пероксидазата (POX- $\mu\text{M guaiacol mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$), глутатион редуктазата (GR – $\mu\text{M NADPH mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$) и аскорбат пероксидазата (APX – $\mu\text{M ascorbate mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$) при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, отглеждани като хидропонна култура при различни концентрации на тежки метали. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ ($n=5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P>0,05$).

Установено е, че общото фенолно и флавоноидно съдържание се променя по един и същ начин след третиране с Cd, Pb и Zn. По-значими са промените в съдържанието на феноли и флавоноиди в листата на *Paulownia elongata* x *fortunei* (Фиг. 5). Освен, че обезвреждат свободните радикали, флавоноидите могат да изпълняват и функцията на хелатори за металите (Brown et al., 1998). Съдържанието на антоциани нараства най-много

след третиране с Cd и при двете линии *Paulownia*. Активността на PAL, установена в листата на *Paulownia elongata* x *fortunei* от контролния вариант е по-висока в сравнение с *Paulownia tomentosa* x *fortunei*. Увеличаване на активността на този ензим е установено само при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* след третиране с Cd и Pb и с най-ниската концентрация на Zn (Фиг. 5).



Фигура 5. Промени в активността на фенилаланин — амоняк лиазата (PAL – μM cinamic acid $\text{mg prot.}^{-1} \text{min}^{-1}$) и съдържанието на феноли, флавоноиди и антоциани при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, отглеждани като хидропонна култура при различни концентрации на тежки метали. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ ($n=5$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P>0,05$).

Резултатите от проведените хидропонни опити показват, че *Paulownia tomentosa* x *fortunei* притежава по-висок биоакмулационен потенциал в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei*. Натрупването на най-големи количества тежки метали в корените на растенията и от двете линии дава основание да се счита, че те могат да бъдат използвани успешно за фитостабилизация на намиращите се в почвата токсични метални йони.

IV. 2. Вегетационни опити

IV.2.1. Агрохимични характеристики на тестираната почва

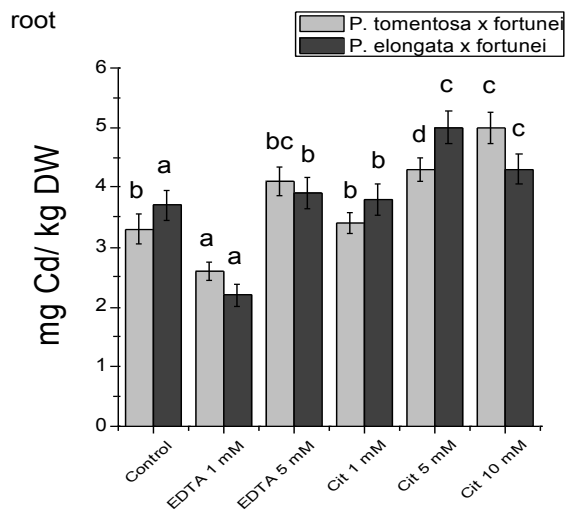
Основните агрохимични характеристики на почвата са: $\text{pH}(\text{H}_2\text{O}) = 8.00$; 9.0 mg kg^{-1} почва мобилен азот ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NH}_4^+$), 26.0 mg kg^{-1} почва мобилен фосфор (P_2O_5). Количеството на изследваните метали (mg kg^{-1} суха почва) е следното: Cd – 4.8; Cu – 69.5; Pb – 115.5; Zn – 199.5; Fe – 48730; Ca – 2015; Mg – 3645; Na – 325; K – 5020. Според Наредба №3 Обн. ДВ, бр. 71, 12 Август 2008г., максимално допустимите концентрации за почвите при $\text{pH}(\text{H}_2\text{O}) = 8.00$ са: Cd < 3.0, Cu < 300, Pb < 120 и Zn < 400 $\text{mg kg}^{-1}\text{DW}$. Това означава, че почвата е замърсена над допустимите концентрации с Cd. Количеството на Cd надвишава нормата 1.6 пъти.

IV.2.2. Определяне на достъпните количества тежки метали в почвата преди засаждането и след прибирането на растенията

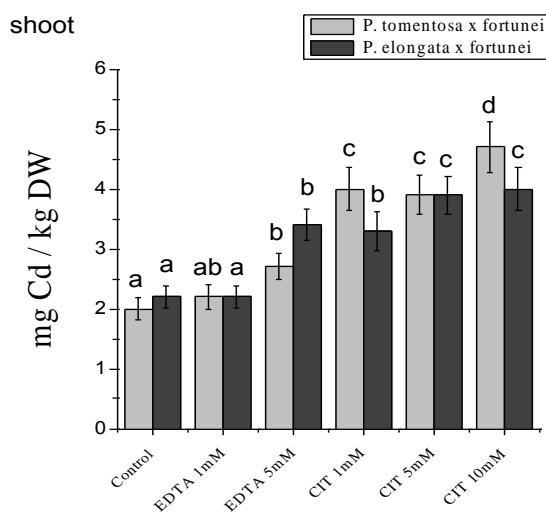
За разтворимостта на съдържащите се в почвата метали се съди по процентното им съдържание в екстрахируемата (биодостъпна) фракция след третиране с различни концентрации на хелатиращи агенти преди засаждането на растенията. Първоначално, преди засаждането им, в най-голяма степен се извличат от почвата Pb (55.5%) и Cd (43.7%), следвани от Cu (5.06%), Zn (2.41%) и Fe (1.13%). Третирането с различни концентрации на ЕДТА увеличава разтворимостта на съдържащите се в почвата тежки метали в значително по-голяма степен в сравнение с цитрата. Изключение прави единствено Cd, при който е постигнато процентно по-голямо извличане след третиране с цитрат.

В края на експеримента, когато се събират растенията за анализ, установените остатъчни количества от тежки метали в почвата значително намаляват. В най-голям процент се извличат Fe, Cu, Cd, а сравнително по-малко Pb и Zn. Не се наблюдава особена закономерност в извличането на тежките метали с увеличаване на концентрациите на хелатиращите агенти и при двете линии.

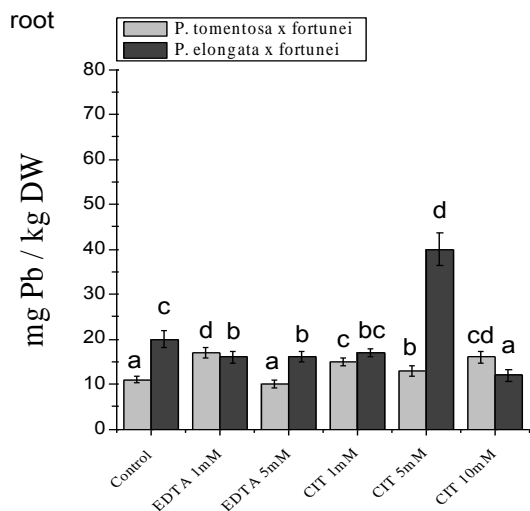
Разпределението на тежките метали в корените и надземните части на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei* на 90-я ден от отглеждането на растенията във вегетационни условия и на 30-я ден от третирането им с хелатиращи агенти – ЕДТА и цитрат, е представено на Фигури 6-15. Количествата на металите, погълнати от корените на двете линии от контролния вариант са почти еднакви, с изключение на Fe при *Paulownia elongata* x *fortunei*, което е приблизително двукратно по-ниско в сравнение с това при *Paulownia tomentosa* x *fortunei*.



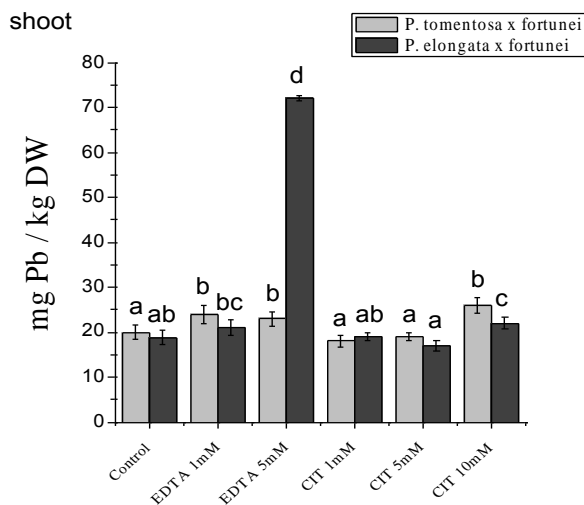
Фигура 6. Количество Cd, погълнато от корените на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P>0,05).



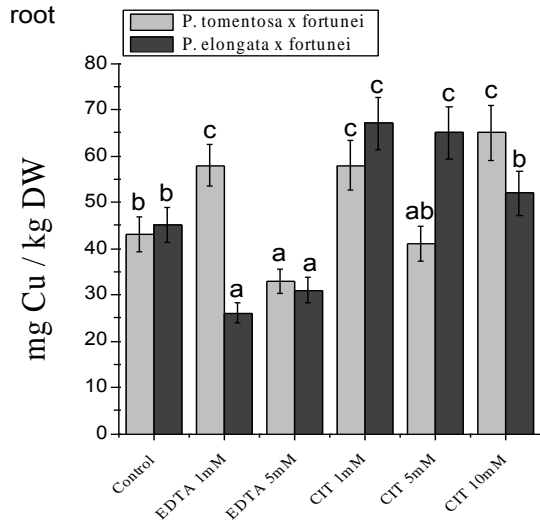
Фигура 7. Количество Cd, погълнато от надземните части на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test P>0,05.



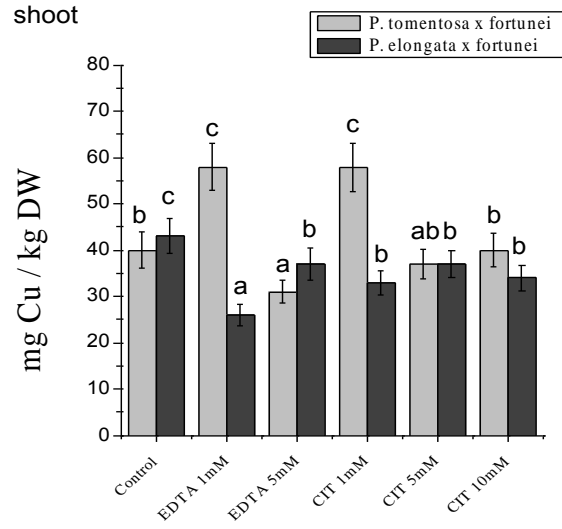
Фигура 8. Количество Pb, погълнато от корените на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P>0,05).



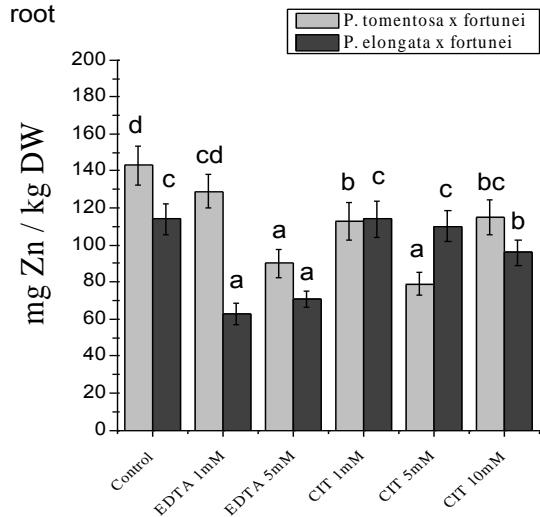
Фигура 9. Количество Pb, погълнато от надземните части на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test P>0,05.



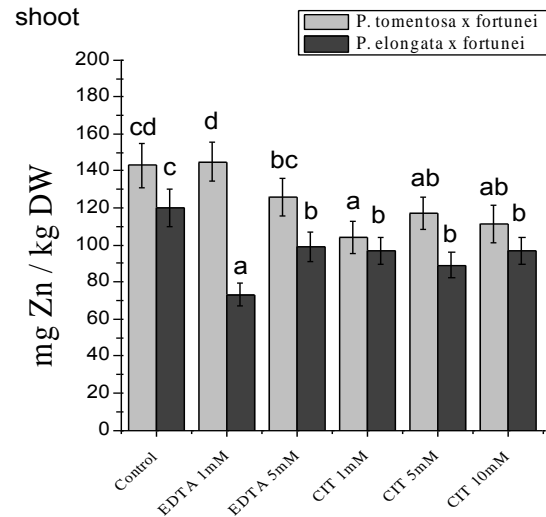
Фигура 10. Количество Cu, погълнато от корените на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P>0,05).



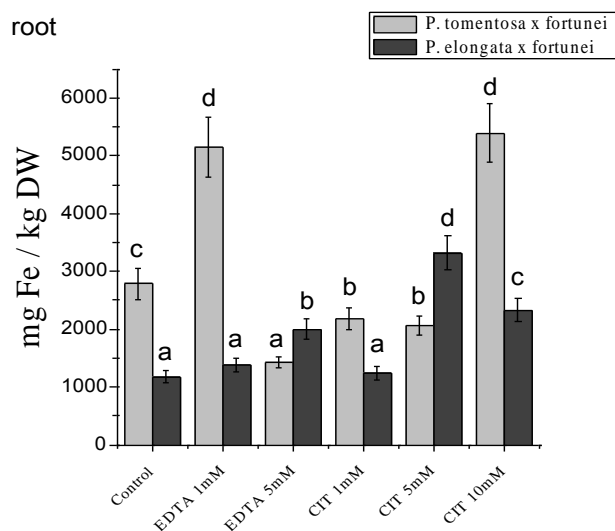
Фигура 11. Количество Cu, погълнато от надземните части на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test P>0,05.



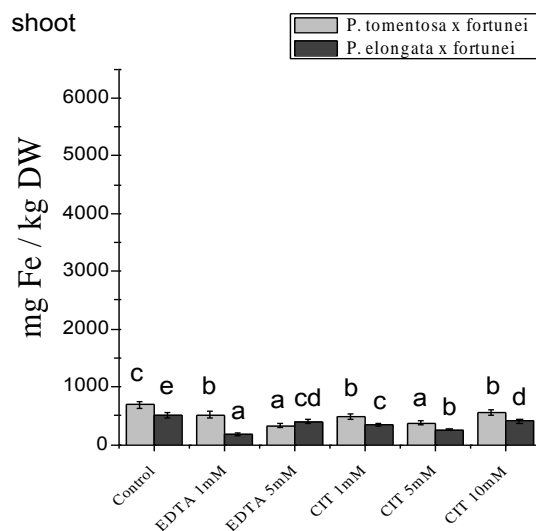
Фигура 12. Количество Zn, погълнато от корените на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P>0,05).



Фигура 13. Количество Zn, погълнато от надземните части на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test P>0,05.



Фигура 14. Количество Fe, погълнато от корените на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P>0,05).



Фигура 15. Количество Fe, погълнато от надземните части на *P. tomentosa x fortunei* и *P. elongata x fortunei*, на 30^{-ия} ден от третирането с EDTA и цитрат. Стойностите са представени с \pm SE (n=4). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test P>0,05.

Третирането с 1 mM EDTA води до значително увеличаване на акумулацията на Pb, Cu и Fe в корените на *Paulownia tomentosa x fortunei* (Фиг. 6, 8, 10, 12, 14). Резултатите, отчетени за надземните части показват по-високи стойности само за Pb в контролния вариант на *Paulownia tomentosa x fortunei* и за Pb и Zn в контролния вариант на *Paulownia elongata x fortunei*. Количеството на всички тежки метали се увеличава в надземните части на *Paulownia tomentosa x fortunei* след третиране с 1 mM EDTA, както и на Cd и Pb след третиране с 10 mM цитрат. За *Paulownia elongata x fortunei* са по-подходящи концентрациите от 5 mM EDTA и 10 mM цитрат за повишаване акумулирането на Cd и Pb (Фиг. 7, 9, 11, 13, 15).

Възможностите на едно растение да бъде използвано за целите на фиторемедиацията се определят от т. нар. биоаккумуляционен фактор (BF) и транслокационен фактор (TF). Според Anderson (2007) растенията се делят на отделящи, акумулатори и хиперакумулатори на тежки метали съгласно биоаккумуляционния си фактор, който може да бъде < 1, > 1 и > 10. Получените стойности на BF > 1 за контролните варианти показват, че и двете линии могат да бъдат акумулатори на Cu, Zn и Cd. При *Paulownia tomentosa x fortunei* е отчетен BF за Cd приблизително с 58% по-нисък в сравнение с *Paulownia elongata x fortunei*. Най-ефективна е концентрацията от 5 mM EDTA, която води до увеличаване на количеството на акумулирания Cd и Pb при двете линии. TF > 1 е отчетен за Pb и Zn в контролния вариант на *Paulownia tomentosa x fortunei* и само за Zn в контролния вариант на *Paulownia elongata x fortunei*. Третирането с 5 mM EDTA води до по-голямо увеличение на фактора за Pb и Cd и незначително увеличение за Cu и Zn при

Paulownia tomentosa x *fortunei*. Третирането с различни концентрации на цитрат увеличава стойностите на TF най - вече за Cd (Таблица 4).

Таблица 4. Ефективност на отстраняване на металите от почвата и преразпределение от корените към надземните части на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*.

Тежки метали	Третиране											
	К	1E	2E	1Ц	2Ц	3Ц	К	1E	2E	1Ц	2Ц	3Ц
	<i>Paulownia tomentosa</i> x <i>fortunei</i>						<i>Paulownia elongata</i> x <i>fortunei</i>					
Биоаккумуляционен фактор (BF)												
Pb	0.96	1.12	1.23	1.27	1.25	1.29	0.93	1.05	3.38	1.22	2.19	1.17
Cu	2.52	3.14	2.09	3.86	2.84	2.87	2.09	1.36	2.38	2.89	3.64	2.87
Zn	3.84	3.17	2.86	2.95	2.15	2.17	3.37	1.44	2.41	2.7	2.37	3.09
Cd	1.57	2.28	4.12	4.77	6.56	5.54	2.68	2.75	6.08	4.73	7.12	5.93
Транслационен фактор (TF)												
Pb	1.82	1.41	2.3	1.2	1.46	1.63	0.95	1.31	4.5	1.12	0.42	1.03
Cu	0.93	1	0.94	1	0.9	0.61	0.96	1	1.19	0.49	0.57	0.65
Zn	1.01	1.12	1.4	0.92	1.48	0.96	1.05	1.15	1.39	0.85	0.81	1.01
Cd	0.61	0.84	0.66	1.18	0.91	0.94	0.59	1	0.87	0.87	0.78	0.93

Забележка: Обозначенията 1E, 2E, 1Ц, 2Ц и 3Ц означават 1 mM, 5 mM ЕДТА и 1 mM, 5 mM и 10 mM цитрат.

IV.2.3. Влияние на ЕДТА и цитрат върху растежа и развитието на растенията

Нашите резултати от прилагането на индуцирана (асистирана) фитоекстракция показваха, че третираните с хелатиращи агенти – ЕДТА и цитрат - растения от двете линии проявяват симптоми на фитотоксичност в зависимост от приложената концентрация. Третирането на двумесечните растения и от двете линии с 10 mM ЕДТА води до появата на хлороза и некроза на листата още на 3-я ден от добавянето. Ефектът от третирането на растенията и от двете линии с 1 и 5 mM ЕДТА, както и с 1, 5 и 10 mM цитрат не води до съществени промени във външния вид на листата. Ние установихме намаляване на стойностите на общата свежа и суха биомаса на растенията. Съотношението между тези два параметъра при третиране с 1 mM ЕДТА и с нарастващи концентрации на цитрат на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* остава по-високо в сравнение с контролата. При *Paulownia elongata* x *fortunei* са отчетени по-високи стойности на съотношението в сравнение с контролата само при третиране с 1 mM и 10 mM цитрат.

При *Paulownia tomentosa* x *fortunei* общата листна площ нараства след третиране с 1 mM ЕДТА и с 5 и 10 mM цитрат. Най-високо съотношение листна площ/обща суха биомаса (LAR) и отношение листна площ/брой листа се наблюдава при третиране с 1 mM ЕДТА и с 10 mM цитрат. Общата листна площ, съотношението листна площ/обща суха биомаса (LAR) и отношението листна площ/брой листа намалява постепенно с увеличаване на концентрацията на комплексообразувателя при *Paulownia elongata* x *fortunei* (Таблица 5).

Таблица 5. Промени в листната площ, отношение листна площ към обща суха биомаса (LAR) и отношение листна площ към брой листа при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, измерени на 90^a ден от отглеждането им при вегетационни условия и на 30^a ден от третирането с хелатиращи агенти. Стойностите са представени с \pm SE (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0,1).

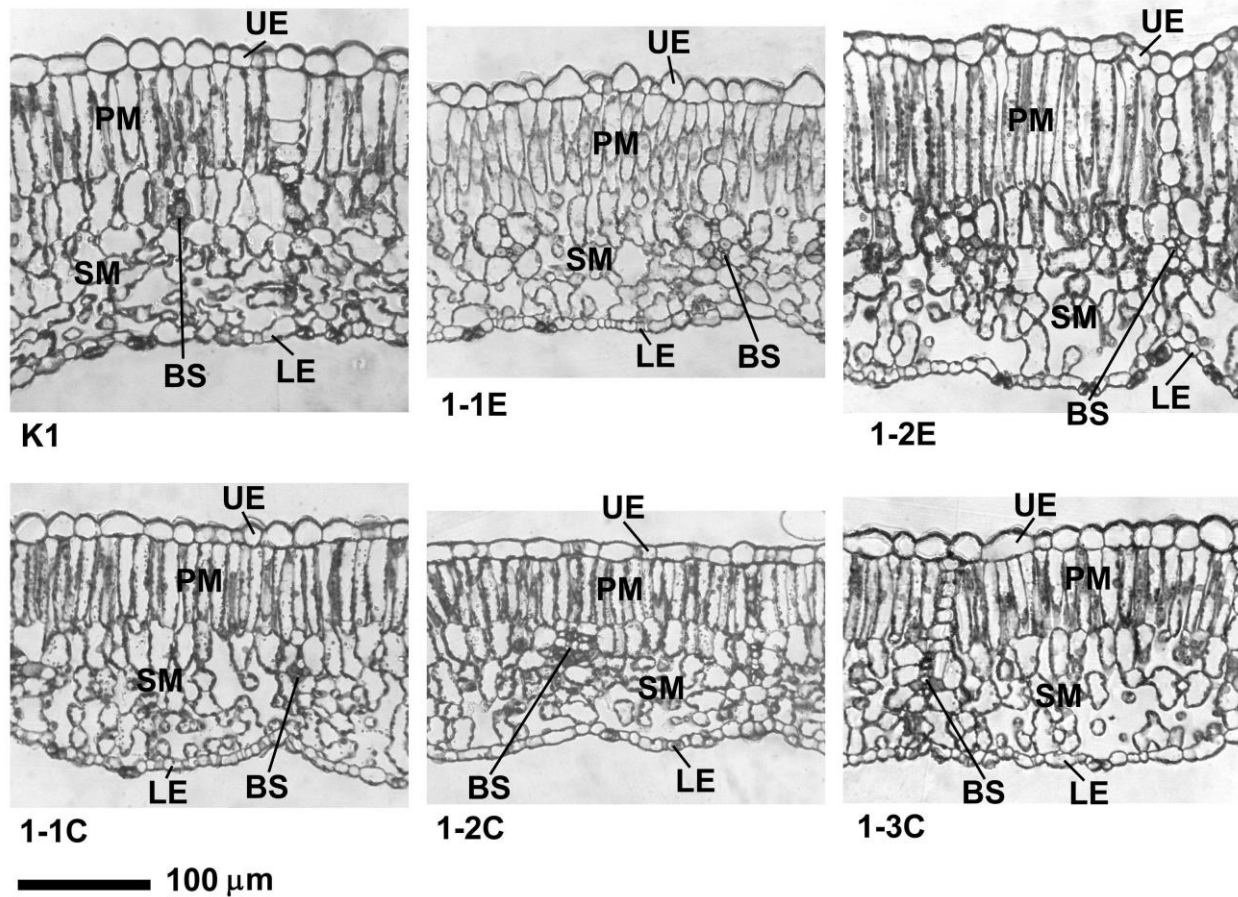
Species	Treatment	Leaf area [cm ²]	LAR [cm ² g ⁻¹]	Leaf area/leaf number
<i>Paulownia tomentosa</i> x <i>fortunei</i>	Control	395 \pm 21a	57,5 \pm 2,1a	41,60 \pm 2.13c
	1 mM EDTA	495 \pm 23b	117,2 \pm 8,3d	50,51 \pm 1.59d
	5 mM EDTA	360 \pm 79a	70,3 \pm 2,5b	37,99 \pm 3.76b
	1 mM Citrat	395 \pm 21a	76,4 \pm 4,4bc	35,30 \pm 2.30a
	5 mM Citrat	582 \pm 19c	82,2 \pm 3,0c	51,53 \pm 9.93b
	10 mM Citrat	463 \pm 21b	125,3 \pm 4,4d	54,47 \pm 1.12d
<i>Paulownia elongata</i> x <i>fortunei</i>	Control	785 \pm 20e	90,5 \pm 2,7e	65,46 \pm 7.23e
	1 mM EDTA	383 \pm 18c	54,1 \pm 2,6c	45,61 \pm 1.24d
	5 mM EDTA	131 \pm 11a	38,2 \pm 1,0b	19,33 \pm 3.14a
	1 mM Citrat	502 \pm 24d	69,8 \pm 3,9d	47,01 \pm 2.33d
	5 mM Citrat	123 \pm 23a	25,9 \pm 2,6a	26,17 \pm 1.11b
	10 mM Citrat	322 \pm 43b	65,9 \pm 1,1d	33,91 \pm 6.16c

IV.2.4. Структурни наблюдения

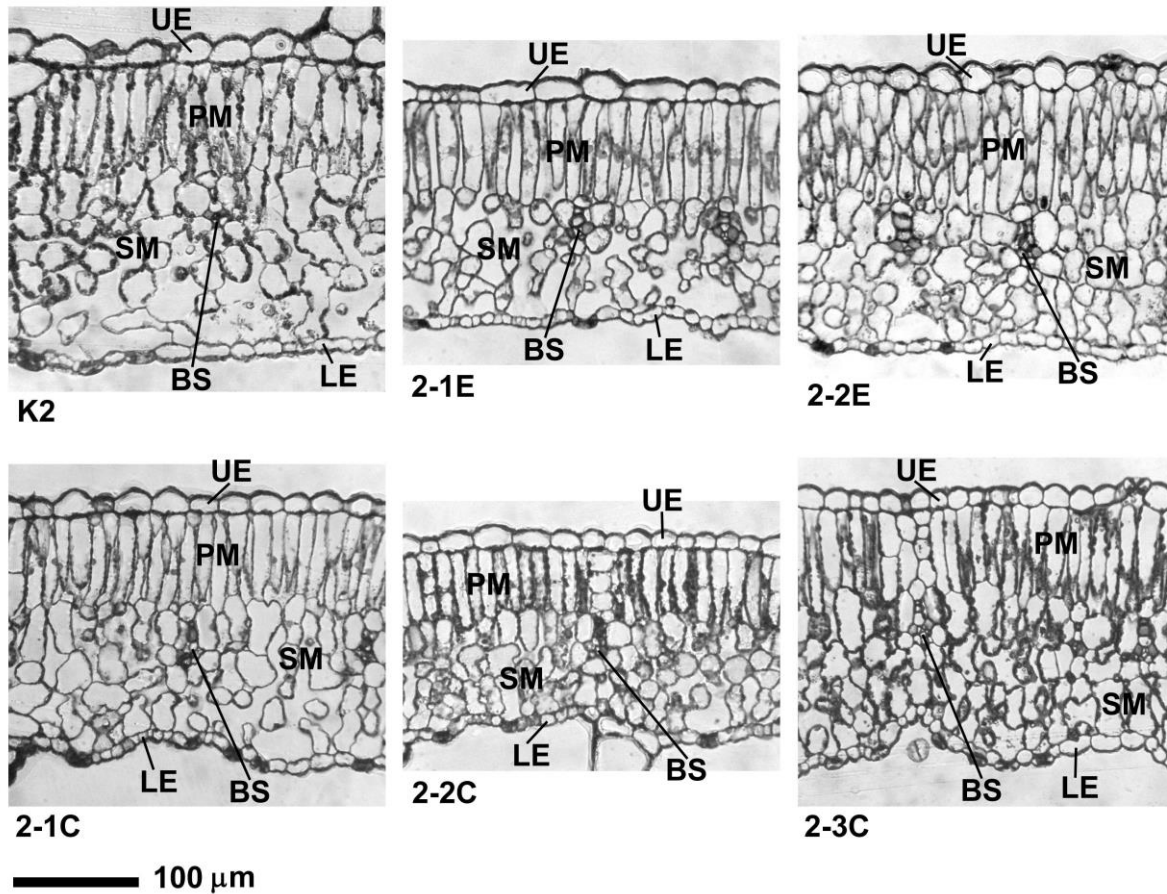
Листата на *Paulownia* притежават дорзивентрална и амфистоматична структура с добре развит горен, долен епидермис и компактно подредени 4-5 слоя палисиден мезофил. Над долния епидермис е разположен гъбчестия мезофил, който се състои от 4-5 слоя рехаво разположени клетки, които обграждат големи междуклетъчни пространства (Фиг. 16 и Фиг. 17).

Paulownia elongata x *fortunei* се отличава с по-голяма средна дебелина на листната петура в сравнение с *Paulownia tomentosa* x *fortunei*. Средната дебелина на листната петура, както и дебелината на мезофилния слой намаляват най-силно след третиране с 1 mM EDTA и с 5 mM цитрат и при двете линии (Таблица 6). Дебелината на листната петура зависи до голяма степен от вида на растението (Gratani et al., 2003), но се променя при третиране и под действие на факторите на околната среда (Di Vaccio et al., 2009) или в зависимост от фазата на развитие (Marchi et al., 2008). Това може да се дължи на увеличаване на дебелината на палисадния и гъбчестия мезофил и се интерпретира като възможност за повишаване на асимилиращата площ на листата в отговор на стрес (Lin et al., 2001). При тези условия са отчетени и по-високи стойности на S_{mes} в пряка корелационна зависимост от фотосинтетичния капацитет на растението (Marchi et al., 2008). Параметърът S_{mes} , който

характеризира междуклетъчното пространство, отнесено към единица листна площ, нараства при *Paulownia tomentosa* x *fortunei*, с изключение на вариантите с 1 и 5 mM цитрат. Най-високи стойности на този параметър са отчетени при 5 mM ЕДТА (60% увеличение). Установено е, че при листата на *Paulownia elongata* x *fortunei* S_{mes} намалява във всички варианти на третиране и достига минимални стойности при 5 mM цитрат (Таблица 6).



Фигура 16: Напречни прерези на листа от *Paulownia tomentosa* x *fortunei*, изготвени на 90^а ден от отглеждането ѝ при вегетационни условия и на 30^а ден от третирането с хелатиращи агенти. Легенда: K1 – контролен вариант; 1-1E – 1 mM ЕДТА; 1-2E – 5 mM ЕДТА; 1-1C – 1 mM цитрат; 1-2C – 5 mM цитрат; 1-3C – 10 mM цитрат. Обозначения: BS – проводящи снопчета; UE – горен епидермис; PM – палисаден мезофил; SM – гъбчест мезофил; LE – долен епидермис. Бар= 100 μM



Фигура 17: Напречни презеци на листа от *Paulownia elongata* x *fortunei*, изготвени на 90^а ден от отглеждането ѝ при вегетационни условия и на 30^а ден от третирането с хелатиращи агенти. Легенда: K2 – контролен вариант; 2-1E – 1 mM ЕДТА; 2-2E – 5 mM ЕДТА; 2-1C – 1 mM цитрат; 2-2C – 5 mM цитрат; 2-3C – 10 mM цитрат. Обозначения: BS – проводящи снопчета; UE – горен епидермис; PM – палисаден мезофил; SM – гъбчест мезофил; LE – долен епидермис. Бар= 100 μm

Таблица 6: Промени в дебелината на мезофила, съотношението палисаден/гъбчест мезофил и вътреклетъчното листово пространство, отнесено към единица площ (S_{mes}) при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, на 90^а ден от отглеждането им при вегетационни условия и на 30^а ден от третирането с хелатиращи агенти. К – контролен вариант; 1E – 1 mM ЕДТА; 2E – 5 mM ЕДТА; 1C – 1 mM цитрат; 2C – 5 mM цитрат; 3C – 10 mM цитрат.

Варианти	Дебелина на мезофила ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	Палис./гъбчест мезофил ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)	Вътрекл. листово простр. (S_{mes})	Дебелина на мезофила ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	Палис./Гъбчест мезофил ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)	Вътрекл. листово простр. (S_{mes})
	P. tomentosa			P. elongata		
К	150±21	0.79±0.09	20.53±2.81	162±35	0.79±0.08	28.92±2.32
1E	115±13	1.00±0.12	23.71±1.11	117±14	1.21±0.09	22.39±1.42
2E	164±32	0.96±0.08	32.82±2.91	158±22	0.94±0.05	21.76±1.56
1C	113±10	0.98±0.09	19.04±1.71	135±12	0.84±0.07	26.70±1.37
2C	97± 9	0.78±0.06	14.37±1.62	114±17	0.80±0.05	8.56±0.98
3C	109±11	0.94±0.08	20.31±1.87	155±29	0.68±0.04	16.46±1.87

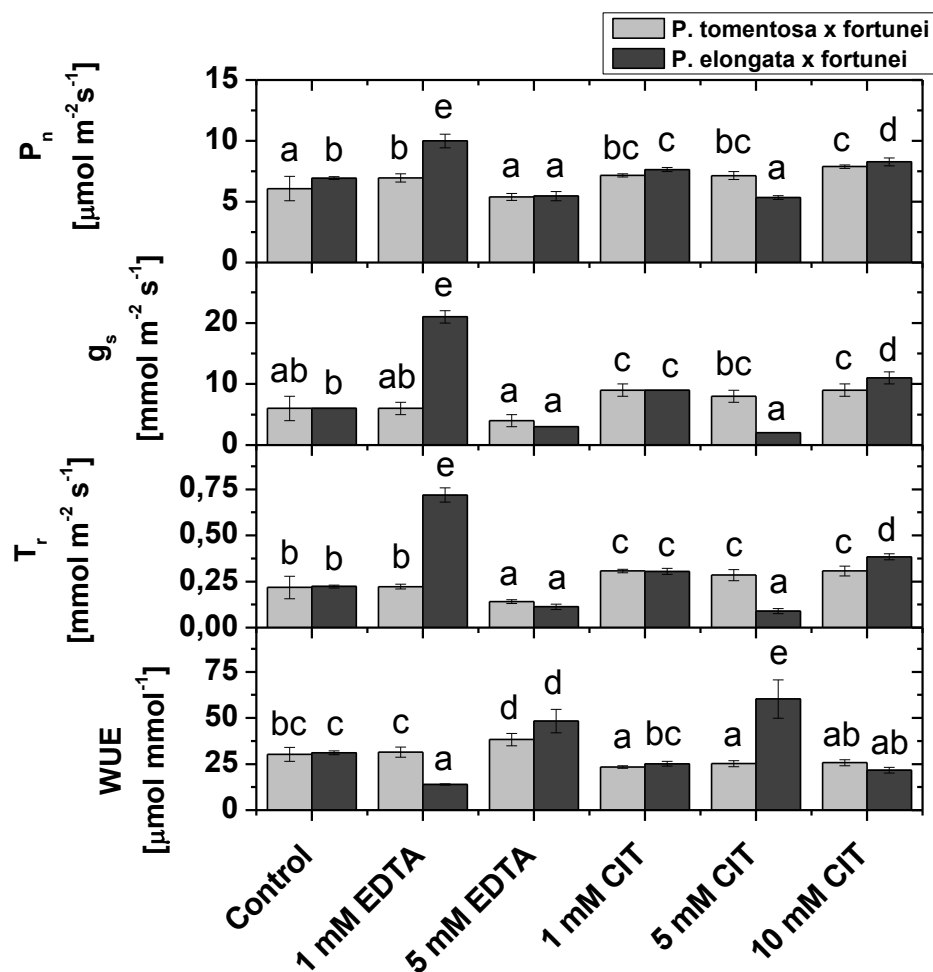
IV.2.5. Влияние на ЕДТА и цитрат върху фотосинтезата

При третиране с 1 mM ЕДТА на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* са установени най-високи стойности на общата листна площ, LAR, отношение листна площ/брой листа (Таблица 5), хл. a+b и съотношение хлорофили/ каротеноиди (Таблица 7). Най-високи стойности на LAR, хл. a+b, съотношение хлорофили/ каротеноиди, но не и на обща листна площ са отчетени и след третиране с 10 mM цитрат на същата линия. Не е установена зависимост между тези параметри при *Paulownia elongata* x *fortunei* при нито един вариант на третиране (Таблицы 5 и 7).

Изследванията за въздействието на хелатиращите агенти върху фотосинтетичния апарат на растенията са малко. Ние установихме, че няма съществени различия в скоростта на нето-фотосинтезата, устичната проводимост, интензивността на транспирацията и ефективността на използване на водата (WUE) в контролните варианти на двете линии (Фиг. 18). След третиране с 1 mM ЕДТА се наблюдава рязко увеличаване на стойностите на първите три параметъра и намаляване на WUE при *Paulownia elongata* x *fortunei*. При *Paulownia tomentosa* x *fortunei* третирането с 1 mM ЕДТА води до минимално, но статистически значимо увеличение на P_n . И при двете линии е установено, обаче, постепенно нарастване на стойностите на WUE с увеличаване на концентрацията на ЕДТА. При *Paulownia tomentosa* x *fortunei* не са установени съществени различия в четирите параметъра след третиране с нарастващи концентрации на цитрат в сравнение с контролния вариант, докато при *Paulownia elongata* x *fortunei* третирането с 5 mM цитрат намалява скоростта на нето-фотосинтезата, устичната проводимост и интензивността на транспирация, но увеличава в най-голяма степен WUE.

Таблица 7. Промени в количеството на пластидните пигменти при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, третирани с различни концентрации на хелатиращи агенти при вегетационни условия. Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0,05$).

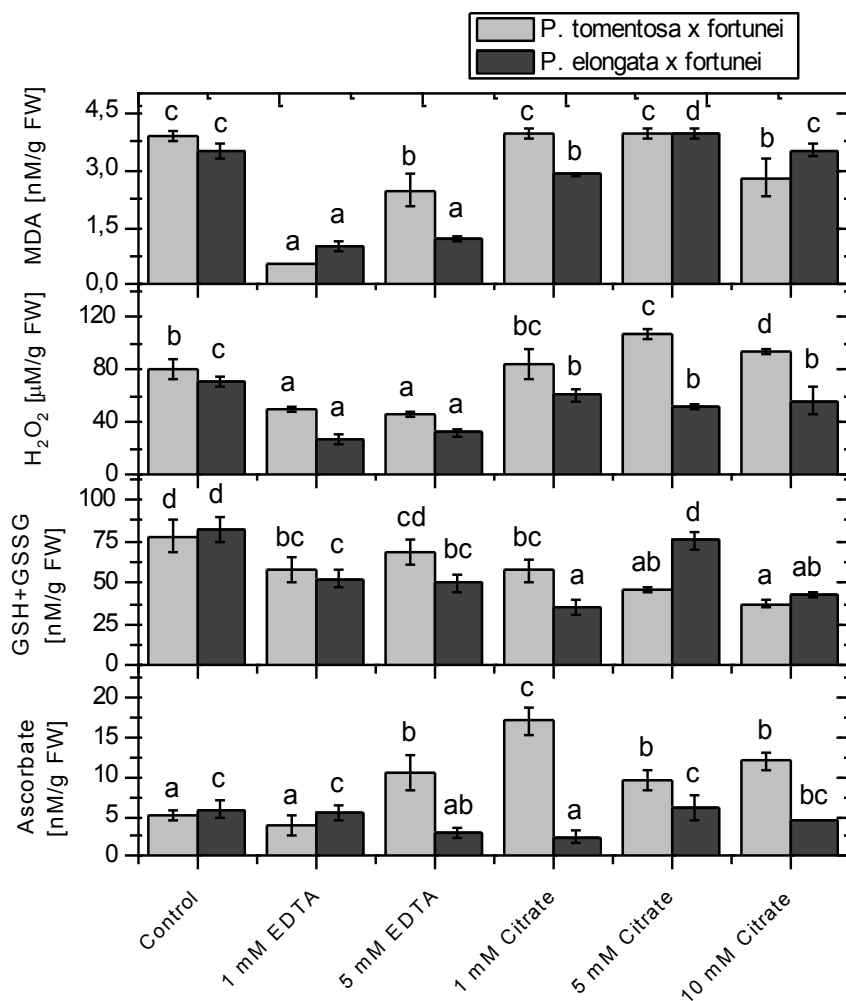
Treatment	Chl a+b [mg g ⁻¹ FW]	Chl a/b	Carotenoids [mg g ⁻¹ FW]	Chl a+b/carot.
<i>P. tomentosa</i> x <i>fortunei</i>				
Контрола	1,03±0,11a	1,560	0,13±0,03a	7,013
1 mM ЕДТА	2,31±0,07c	1,522	0,33±0,08d	7,030
5 mM ЕДТА	1,63±0,36b	1,728	0,28±0,03cd	5,910
1 mM Цитрат	0,91±0,05a	1,660	0,16±0,04ab	5,740
5 mM Цитрат	1,18±0,06a	1,671	0,24±0,01c	4,920
10 mM Цитрат	1,51±0,09b	1,185	0,21±0,02bc	7,060
<i>P. elongata</i> x <i>fortunei</i>				
Контрола	1,18±0,03a	1,186	0,47±0,03d	2,520
1 mM ЕДТА	1,92±0,29b	1,369	0,24±0,01c	8,120
5 mM ЕДТА	1,84±0,14b	1,422	0,15±0,03b	12,180
1 mM Цитрат	1,15±0,08a	1,451	0,16±0,06b	7,020
5 mM Цитрат	0,93±0,17a	1,361	0,13±0,06b	7,030
10 mM Цитрат	1,20±0,12a	0,859	0,03±0,01a	37,530



Фигура 18. Промени в нето-фотосинтезата (P_N – $\mu\text{M CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), устичната проводимост (g_s – $\text{mM H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), транспирацията (T_r – $\text{mM H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) и ефективността на използване на водата (WUE– $\mu\text{M CO}_2 \text{ mM}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) при *Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*, измерени на 90^а ден от отглеждането им при вегетационни условия и на 30^а ден от третирането с хелатиращи агенти. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики при използването на Fisher's LSD test ($P < 0,05$).

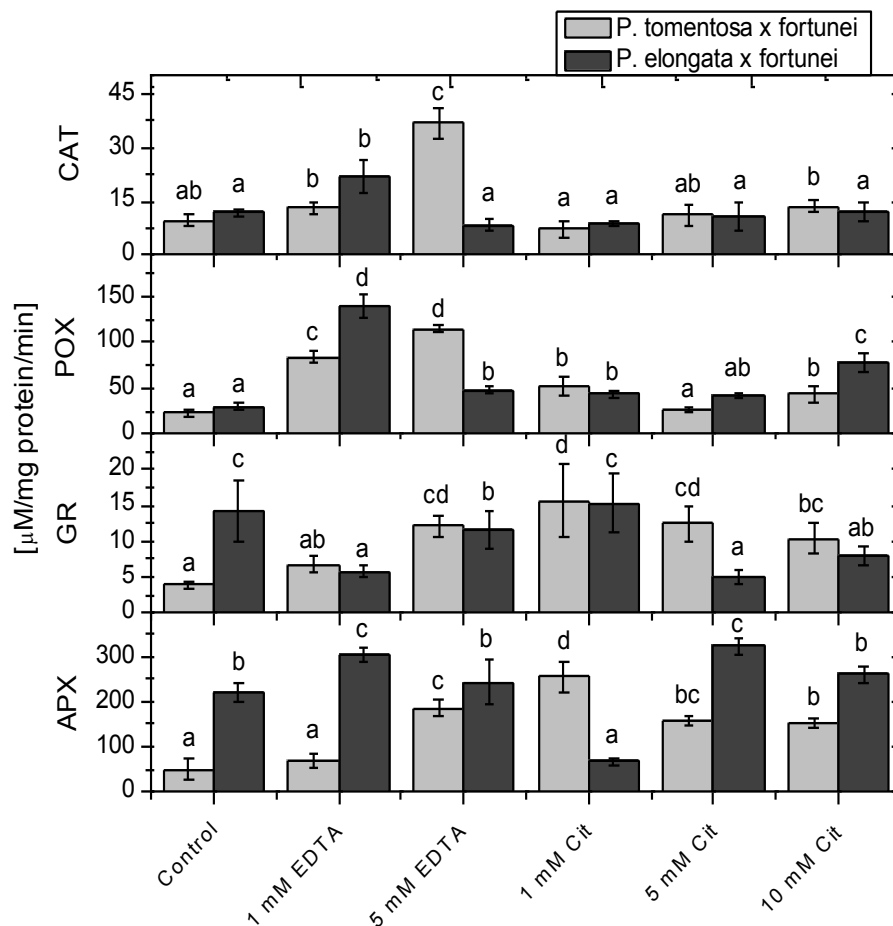
IV.2.6. Влияние на ЕДТА и цитрат върху антиоксидантната защита на растенията

Стойностите на МДА и H_2O_2 рязко намаляват след третиране на двете линии с нарастващи концентрации на ЕДТА. Третирането с цитрат не води до значими изменения на тези параметри (Фиг. 19). Количеството на глутатиона намалява в различна степен във всички варианти спрямо контролата и при двете линии. За аскорбата тенденцията е различна при двете линии – при *Paulownia tomentosa x fortunei* количеството му се повишава във всички варианти с изключение на 1 mM ЕДТА, докато при *Paulownia elongata x fortunei* се наблюдава, макар и незначително намаляване на този параметър.



Фигура 19: Промени в съдържанието на MDA, H₂O₂, GSH+GSSG и аскорбат при *Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*, измерени на 90^я ден от отглеждането им при вегетационни условия и на 30^я ден от третирането с хелатиращи агенти. Стойностите са представени с ±SE (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0,05).

Активностите на катализата, гваякол пероксидазата, глутатион редуктазата и аскорбат пероксидазата постепенно нарастват след третиране с нарастващи концентрации на ЕДТА на *Paulownia tomentosa x fortunei*. При *Paulownia elongata x fortunei* са отчетени най-високи стойности на активността на катализата, гваякол пероксидазата и аскорбат пероксидазата след третиране с 1 mM ЕДТА. За аскорбат пероксидазата максимум се наблюдава и при 5 mM цитрат. Глутатион редуктазната активност и при двете линии е най-висока при 1 mM цитрат (Фигура 20).



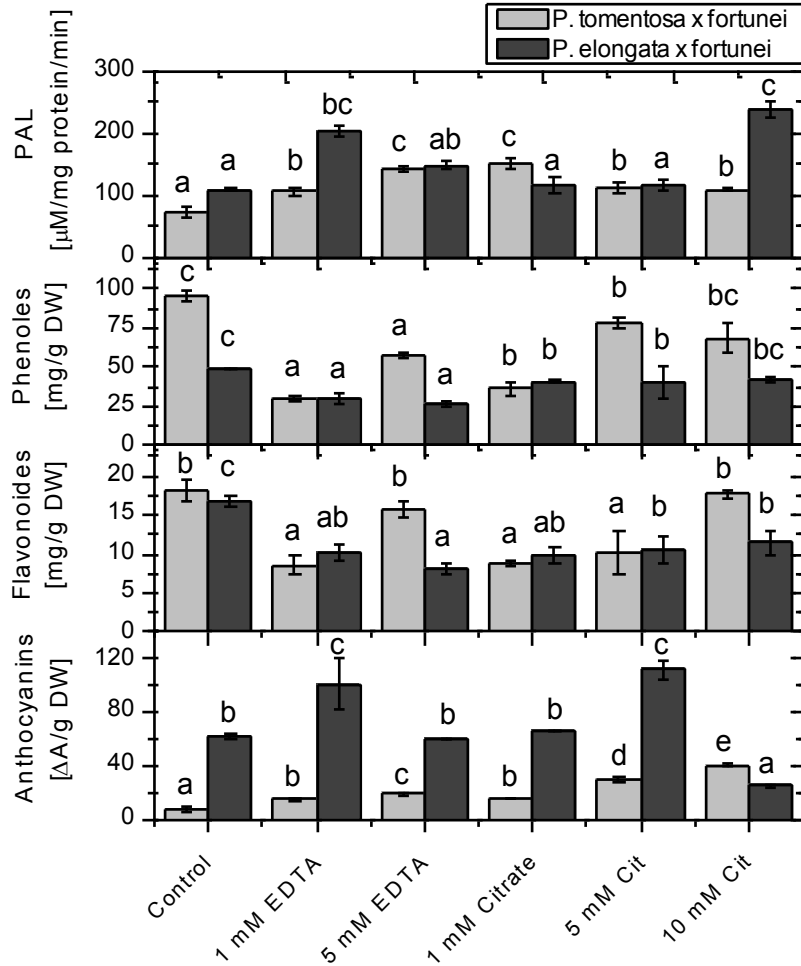
Фигура 20: Промени в активността на каталазата (CAT- $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$), гваякол пероксидазата (POX- $\mu\text{M guaiacol mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$), глутатион редуктазата (GR – $\mu\text{M NADPH mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$) и аскорбат пероксидазата (APX – $\mu\text{M ascorbate mg prot.}^{-1}\text{min}^{-1}$) при *Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*, измерени на 90^а ден от отглеждането им при вегетационни условия и на 30^а ден от третирането с хелатиращи агенти. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0,05).

В таблица 8 са представени съотношенията на редуциран глутатион/ окислен глутатион, и аскорбат/ дехидроаскорбат в листата на растенията от контролния вариант и след третиране с нарастващи концентрации на хелатиращи агенти. Най-високи стойности на съотношението редуциран глутатион/окислен глутатион са установени в контролния вариант и на двете линии. Третирането с двата хелатиращи агента води до силно намаляване на това съотношение, с изключение на варианта с 10 mM цитрат при *Paulownia tomentosa x fortunei*. Повишаване на съотношението се наблюдава и при *Paulownia elongata x fortunei*, но стойностите му не достигат до тези на контролния вариант. Съотношението аскорбат/ дехидроаскорбат се променя по различен начин при двете линии – третирането с 5 mM цитрат увеличава стойността му в най-голяма степен при *Paulownia elongata x fortunei*, докато при *Paulownia tomentosa x fortunei* – третирането с 5 mM ЕДТА.

Таблица 8. Промени в съотношението GSH/GSSG и ascorbate/dehydroascorbate *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, третирани с различни концентрации на хелатиращи агенти при вегетационни условия. Стойностите са представени с \pm SE (n=5).

Treatment	GSH/GSSG	Ascorbate/Dehydroascorbate
<i>P. tomentosa</i> x <i>fortunei</i>		
Контрола	1,126	1,010
1 mM ЕДТА	0,183	0,840
5 mM ЕДТА	0,755	1,077
1 mM Цитрат	0,664	0,575
5 mM Цитрат	0,812	0,175
10 mM Цитрат	2,246	0,208
<i>P. elongata</i> x <i>fortunei</i>		
Контрола	9,230	0,992
1 mM ЕДТА	0,256	0,231
5 mM ЕДТА	0,870	0,940
1 mM Цитрат	1,715	1,324
5 mM Цитрат	1,883	1,568
10 mM Цитрат	2,330	1,308

Общото фенолно съдържание, отчетено в листата на двете линии *Paulownia*, третирани с нарастващи концентрации на хелатиращи агенти намалява в сравнение с контролните варианти (Фигура 21). Тенденцията на промени в общото съдържание на флавоноидите е същата, както при фенолите. Съдържанието на антоциани нараства след третиране с нарастващи концентрации на хелатиращи агенти при *Paulownia elongata* x *fortunei*, докато при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* са отчетени стойности по-високи от контролните след третиране с 1 mM ЕДТА и с 10 mM цитрат. Активността на фенилаланин – амоняк лиазата нараства след третиране с ЕДТА и цитрат и при двете линии, но по различен начин. При *Paulownia tomentosa* x *fortunei* е отчетена най-висока активност след третиране с 5 mM ЕДТА и 1 mM цитрат, докато при *Paulownia elongata* x *fortunei* – след третиране с 1 mM ЕДТА и 10 mM цитрат.



Фигура 21. Промени в активността на фенилаланин — амоняк лиазата (PAL – μM sinamic acid $\text{mg prot.}^{-1} \text{min}^{-1}$) и съдържанието на феноли, флавоноиди и антоциани при *Paulownia tomentosa x fortunei* и *Paulownia elongata x fortunei*, измерени на 90^а ден от отглеждането им при вегетационни условия и на 30^а ден от третирането с хелатиращи агенти. Стойностите са представени с $\pm\text{SE}$ (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0,05).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото изследване е опит да се изяснят особеностите в растежа, развитието и биоаккумуляционния потенциал на две линии *Paulownia*, селектирани от БИОТРИИ, България, с оглед бъдещото им приложение за пречистване на почви, замърсени с тежки метали. Като надежден критерий за устойчивост при техния подбор се приема капацитетът им за съхраняване на висока биологична продуктивност. Изясняването на физиолого-биохимичните механизми на толерантност към високи концентрации на тежки метали

позволява изготвянето на препоръки при селекцията на отделни линии *Paulownia*, устойчиви към тяхното действие.

Намаляването на количеството на тежките метали посредством фиторемедиация дава възможност за значително по-евтина мелиорация на замърсените почви от една страна, а от друга - създава условия за увеличаване на площите на обработваема земя, годна за отглеждане на различни селскостопански култури.

Ние можем да обобщим получените резултати в три направления: увреждащо действие на Cd, Pb и Zn, влияние на хелатиращите агенти – ЕДТА и цитрат върху определени физиологични и биохимични процеси в растенията и роля на хелатиращите агенти в преодоляване на стреса, предизвикан от действието на тежките метали.

Установена е най-голяма акумулация на Cd, Pb и Zn в корените и на двете линии *Paulownia*, като *Paulownia tomentosa* x *fortunei* се отличава с приблизително двукратно по-високо съдържание на Pb и Zn в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei* (Таблицы 2 и 3). Акумулацията на Pb, Cd и Zn в растенията, отгледани при хидропонни условия намалява в реда: Pb > Zn > Cd, а биоаккумуляционните коефициенти се променят в реда: Pb > Cd > Zn. Резултатите от измерването на морфологичните показатели показват, че отношението листна площ/обща суха биомаса (LAR) се увеличава в по-голяма степен при *Paulownia tomentosa* x *fortunei*. Най-високите концентрации на Zn действат позитивно върху LAR (Таблица 1).

Независимо от установеното по-високо съдържание на Cd, Pb и Zn в листата на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* в сравнение с това в листата на *Paulownia elongata* x *fortunei*, скоростта на нето-фотосинтезата (P_n) ѝ бележи тенденция на повишаване (Фиг. 1), а съотношението хлорофил a/ хлорофил b остава близко до контролното (Фиг. 2). Измерените стойности на устична проводимост (G_s) и интензивност на транспирация (T_r) са по-високи в сравнение с тези на *Paulownia elongata* x *fortunei*, отчетени при същото съдържание на тежки метали в разтвора. За разлика от *Paulownia elongata* x *fortunei*, *Paulownia tomentosa* x *fortunei* реагира бързо на действието на най-ниските концентрации на Cd, Pb и Zn чрез повишаване на стойностите в скоростта на нето-фотосинтезата. Устичната проводимост и интензивността на транспирацията остават близки до контролната след третиране с ниски концентрации на Cd, което води до постепенно повишаване на ефективността на използване на водата (WUE). Ние установихме по-високи стойности на WUE и при двете линии след третиране с малки и средни концентрации на тежки метали при хидропонни условия, което може да се разглежда като опит за подобряване на водния режим на растенията на ранните етапи от стресовото въздействие. Това води до балансиране на водните резерви на цялото растение и намаляване на фитотоксичността на тежките метали. Hermle et al. (2007) установяват подобна закономерност - повишаване на скоростта на фотосинтезата на *Salix viminalis* и липса на редукция в растежа при увеличаване на стресовото влияние на тежките метали.

Cd, Pb и Zn са редокс-неактивни метали, но индуцират окислителен стрес в растящите части на растенията посредством генерирането на активни кислородни форми (АКФ). Тяхната продукция зависи от интензивността на стреса, повторемостта на стресовото въздействие, вида на растението и неговата възраст (Verma and Dubey, 2003). Ние установихме повишени стойности на МДА и на H_2O_2 в качеството на маркери за нивото на оксидативен стрес. *Paulownia elongata* x *fortunei* се отличава с по-високо ниво на МДА и на H_2O_2 в сравнение с *Paulownia tomentosa* x *fortunei*, особено при най-високо съдържание на тежки метали в хранителния разтвор (Фиг. 3). При *Paulownia tomentosa* x *fortunei* обаче са установени по-високи стойности на каталазна, гваякол пероксидазна,

глутатион редуктазна, аскорбат пероксидазна активности (Фиг. 4), както и количество на глутатиона (Фиг. 3). С повишаване на концентрациите на тежките метали в хранителния разтвор се повишава значително общото фенолно и флавоноидно съдържание, както и това на антоцианите при *Paulownia elongata* x *fortunei* (Фиг. 5). В антиоксидантната защита на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* участват предимно ензимни компоненти, докато при *Paulownia elongata* x *fortunei* – неензимни. Остава спорен въпросът доколко високата активност на антиоксидантните ензими и повишеното количество на нискомолекулните антиоксиданти е свързано с по-висока толерантност към действието на тежките метали или обратно. Безспорен остава фактът, че повишаването на активността на антиоксидантните ензими се разглежда като вторичен защитен механизъм срещу оксидативен стрес, тъй като първичният отговор е свързан със синтеза на фитохелатини и вакуоларната компартментализация (Grill et al., 1989). *Paulownia tomentosa* x *fortunei* притежава по-ефективна антиоксидантна защита в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei*. Това дава възможност за съхраняване на висока скорост на нето-фотосинтезата дори при най-високи стойности на съдържание на тежки метали в хранителния разтвор. Отношението LAR, което е показател за формиране на ефективна фотосинтезираща площ, се запазва на високо ниво независимо от по-високия биоаккумуляционен потенциал на *Paulownia tomentosa* x *fortunei*.

Съхраняването и имобилизирането на по-големи количества от тежки метали в корените е типичен отговор на някои растения, посредством който се предпазват надземните части от токсичното им действие (Verkleij and Schat, 1990). Ние установихме следния ред на нарастване на металната концентрация в корените на контролните растения от двете линии, отгледани на замърсена с тежки метали почва: Cd < Pb < Cu < Zn < Fe. Това подреждане отговаря на характерните особености на елементите, а именно, че Zn, Cu и Fe са жизнено важни микроелементи, докато Cd и Pb са токсични за повечето растения (Lasat, 2000), поради което се усвояват в по-малки количества (независимо, че процентното им съдържание в биодостъпната фракция на почвата е най-високо в сравнение с останалите три метала).

Възможностите за използване на изследваните линии за фиторемедиация на замърсени почви се определят от стойностите на биоаккумуляционните фактори (BF) и транслокационните им фактори (TF). BF > 1, установени за Cu, Zn и Cd при контролните варианти, показват, че и двете линии могат да бъдат акумулатори на тези метали. TF > 1 е отчетен за Pb и Zn в контролния вариант на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и само за Zn - в контролния вариант на *Paulownia elongata* x *fortunei*. Третирането с нарастващи концентрации на ЕДТА и цитрат води до различно повишаване на този фактор при двете линии. При *Paulownia elongata* x *fortunei* третирането с 5 mM ЕДТА повишава TF > 1 за Pb, Cu и Zn, а при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* – за Pb и Zn (Таблица 4). Отчетените по-високи TF > 1, включително и след третиране с хелатиращи агенти, показват че и двете линии могат да бъдат използвани за фиторемедиация на замърсени почви. Фактът, че Fe, Zn и Cd се съдържат в по-големи количества в корените на контролния вариант и на двете линии показва, че действа по-скоро фитостабилизационен механизъм. Резултатите от вегетационните опити са подобни на тези, получени от хидропонните – Cd, Pb и Zn се акумулират най-вече в корените и на двете линии.

Ефективността на поглъщане Fe, Pb, Cu, Zn и Cd от растенията в сравнение с наличните им количества в биодостъпната фракция е много ниска. Тези резултати потвърждават установената закономерност при извеждане на хидропонните опити – биоаккумуляционните коефициенти, установени за Cd, Pb и Zn и при двете линии не

нарастват в зависимост от съдържанието на тежките метали в разтвора от една страна, а от друга – техните стойности са с порядък по-ниски в сравнение с отчетените за някои тревисти хиперакумулатори на тежки метали. Наличието на значително по-големи количества на тежки метали в биодостъпната фракция от почвата след третиране с хелатиращи агенти и най-вече с ЕДТА - в сравнение с контролния вариант - показва, че поглъщането на тежките метали и тяхното транспортиране към надземните органи не зависи особено от концентрацията на металите в почвения разтвор. Нашите резултати съвпадат с изказаното предположение от Doumett et al. (2008), че не съществува концентрационен градиент в разпределението между почвата и растителните тъкани от една страна, а от друга, най-вероятно двете линии проявяват селективност по отношение на поглъщането на отделните метали в зависимост от структурата и големината на формираните комплекси с хелатиращите агенти. Тъй като цитратът няма синтетичен произход, вероятно неговото метаболизиране от растенията е значително по-бързо в сравнение с ЕДТА.

Нашите резултати от прилагането на индуцирана (асистирана) фитоекстракция показаха, че третираните с хелатиращи агенти – ЕДТА и цитрат - растения от двете линии проявяват симптоми на фитотоксичност в зависимост от приложената концентрация. Третирането на двумесечните растения и от двете линии с 10 mM ЕДТА води до появата на хлороза и некроза на листата. Ефектът от третирането на растенията и от двете линии с 1 и 5 mM ЕДТА се проявява значително по-слабо, а третирането с 1, 5 и 10 mM цитрат не води до съществени промени във външния вид на листата на растенията и от двете линии. Подобни резултати са получени от Sun et al. (2009) след третиране със същите концентрации на ЕДТА при фиторемедиацията на Cd-хиперакумулатор *Solanum nigrum* L. Изследователите установяват, че високите концентрации на ЕДТА намаляват образуването на биомаса и общото количество на извлечения от почвата Cd. Според Doumett et al. (2008), обаче, 10 mM ЕДТА няма негативен ефект върху растежа на *Paulownia tomentosa* и този вид е устойчив спрямо действието на хелатора.

В нашите опити установихме най-големи количества на Fe, Zn и Cd в корените и на двете линии от контролния вариант (Фиг. 14, 12, 6, Таблица 4). Същевременно количеството на Cu, Pb и Cd се увеличава в надземните части на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* след третиране с 1 mM ЕДТА (Фиг.11, 9, 7), а на Pb, Cu и Cd след третиране с 10 mM цитрат (Фиг. 9, 11, 7, Таблица 4). При същите концентрации на хелатиращи агенти са установени и най-високи стойности на съотношенията листна площ/обща суха биомаса (LAR), листна площ/брой листа, хлорофили/каротеноиди (Таблицы 5, 7), както и по-високо съдържание на хлорофил a+b и слабо повишаване в сравнение с контролния вариант на скоростта на нето-фотосинтезата (Таблица 7, Фиг. 18). Повишената нето-фотосинтеза корелира положително с установените при тези концентрации на хелатиращи агенти по-високи стойности на отношението палисаден/гъбчест мезофил и S_{mes} в листата на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* (Таблица 6). Нашите изследвания са в съгласие с изказаните от Terashima et al. (2001) и Marchi et al. (2008) предположения за положителна корелационна зависимост между S_{mes} и фотосинтетичния капацитет на растението и могат да се интерпретират като възможност за повишаване на асимилиращата площ на листата в отговор на стрес (Lin et al., 2001). Третирането с ЕДТА води до рязко намаляване на стойностите на МДА и H_2O_2 , докато третирането с цитрат не води до значими изменения на тези параметри (Фиг. 19). Антиоксидантната защита е осъществена за сметка на повишената активност на каталазата, гваякол пероксидазата, глутатион редуктазата и аскорбат пероксидазата, както и на повишеното количество на аскорбата след третиране с

ЕДТА. Най-висока глутатион редуктазна и аскорбат пероксидазна активност, както и повишено количество на аскорбата са установени след третиране с 1 mM цитрат (Фиг. 19, 20). Най-високи стойности на съотношението редуциран глутатион/окислен глутатион, на общото количество феноли и флавоноиди са установени в контролните варианти и на двете линии (Таблица 8, Фиг. 21).

За *Paulownia elongata* x *fortunei* е най-подходяща концентрацията от 5 mM ЕДТА за повишаване на акумулирането на Pb, Cu, Cd в надземните части (Фиг. 9, 11, 7, Таблица 4) и от 10 mM цитрат за повишаване на акумулирането на Cu, Zn и Cd (Фиг. 11, 13, 7, Таблица 4). При тази линия беше установено обаче постепенно намаляване на общата листна площ, съотношението листна площ/обща суха биомаса (LAR) и отношението листна площ/ брой листа с увеличаване на концентрацията на комплексообразувателя (Таблица 5). Третирането с 5 mM ЕДТА и с 5 mM цитрат води до рязко намаляване на устичната проводимост и интензитета на транспирацията (Фиг. 18). При тези концентрации на хелатиращите агенти бяха установени най-високи стойности на ефективност на използване на водата (WUE), а установените разлики в стойностите на нето-фотосинтезата са значими. Единствено след третиране с 5 mM цитрат беше отчетена висока аскорбат пероксидазна активност (Фиг. 20) и повишено количество на съдържащите се в листата антоциани (Фиг. 21).

Установяването на адаптивните възможности към високи концентрации на тежки метали на селектирани линии *Paulownia* при отглеждането им в условия на хидропонни и вегетационни опити е добър подход за определяне на акумулационния им потенциал с оглед на бъдещото им практическо приложение. Установяването на система от физиологични и биохимични маркери за характеризиране на механизмите на устойчивост на изпитваните линии е от съществено значение за използването им в качеството на биомонитори в региони с тежкометално замърсяване. По аналогия с използването на *Populus trichocarpa* като моделна система за изучаване на физиологичните и молекулярни механизми на толерантност (защита) към действието на високи концентрации тежки метали в световен мащаб (Tuskan et al., 2006), устойчиви към тежкометален стрес линии *Paulownia* биха могли да бъдат използвани със същото предназначение.

Сравнявайки отговорите на двете изследвани от нас линии *Paulownia*, става ясно, че *Paulownia tomentosa* x *fortunei* има по-висок биоаккумуляционен потенциал и е значително по-устойчива към действието на тежки метали в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei*. В листата и надземните части на *Paulownia tomentosa* x *fortunei*, отгледана при хидропонни и вегетационни условия се натрупва значително по-голямо количество тежки метали в сравнение *Paulownia elongata* x *fortunei*, а отношението обща листна площ/обща суха биомаса (LAR) нараства. Прилагането на асистирана фиторемедиация показва, че при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* най-подходящи за извличането на по-голямо количество тежки метали от почвата са 1 mM ЕДТА и 10 mM цитрат. Увеличаването на съотношенията листна площ/обща суха биомаса (LAR), листна площ/брой листа, хлорофили/каротеноиди, палисаден/гъбчест мезофил, количеството на хлорофил a+b, скоростта на нето-фотосинтезата (P_n), S_{mes} , активността на каталазата, гваякол пероксидазата, глутатион редуктазата, аскорбат пероксидазата и количеството на аскорбата при тези условия на третиране може да бъде използвано в качеството на надежден критерий за характеризиране на механизмите на толерантност при тази линия.

VI. ИЗВОДИ

1. Установено е, че *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei* натрупват значително по-голямо количество тежки метали в корените в сравнение с надземните части. Това показва, че и при двете линии действа фитостабилизационен механизъм, при който погълнатите тежки метали се имобилизират предимно в корените.
2. При отглеждане върху замърсена с тежки метали почва е установен биоаккумуляционен фактор > 1 за Cu, Zn и Cd. Това показва, че и двете линии могат да бъдат използвани за фиторемедиация на почви, замърсени с тези тежки метали. При *Paulownia elongata* x *fortunei* е установен биоаккумуляционен фактор за Cd приблизително с 50% по-висок в сравнение с този при *Paulownia tomentosa* x *fortunei*.
3. Прилагането на асистирана фиторемедиация води до по-голямо извличане на тежките метали, които се акумулират предимно в корените на изследваните линии.
4. Установено е, че ЕДТА е по-ефективен хелатиращ агент в извличането на тежки метали в сравнение с цитрата. Увеличаването на транслокационния фактор при *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei* след третиране с различни концентрации на хелатиращи агенти показва, че освен фитостабилизационен механизъм действа и фитоекстракционен механизъм на разпределение на тежките метали.
5. Третирането с 10 mM ЕДТА води до проявата на хлороза и некроза по листата и на двете линии и загиване на целите растения. При третиране с нарастващи концентрациина цитрат не се наблюдават визуални симптоми на фитотоксичност.
6. Доказано е, че за *Paulownia tomentosa* x *fortunei* е най-удачно третирането с 1 mM ЕДТА и 10 mM цитрат, тъй като при тези концентрации са отчетени най-високи стойности на листна площ/обща суха биомаса (LAR), листна площ/брой листа, хлорофили/каротеноиди, палисаден/гъбчест мезофил, количество на хлорофил a+b, скорост на нето-фотосинтезата (P_n), S_{mes} , активност на каталазата, гваякол пероксидазата, глутатион редуктазата, аскорбат пероксидазата и количество на аскорбата.
7. Доказано е, че най-подходящите концентрации на хелатиращи агенти за *Paulownia elongata* x *fortunei* са 5 mM ЕДТА и 5 mM цитрат, при които са установени най-високи стойности на ефективността на използване на водата. Третирането с 5 mM цитрат води до увеличаване на активността на аскорбат пероксидазата и количеството на антоцианите в листата.
8. *Paulownia tomentosa* x *fortunei* е значително по-устойчива към действието на тежки метали в сравнение с *Paulownia elongata* x *fortunei*, поради което следва да бъде предпочетена за фиторемедиация на замърсени с тежки метали почви.

VII. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Установено е, че ЕДТА е по-ефективен хелатиращ агент в сравнение с цитрата в извличането на тежки метали от почвата.
2. Установено е наличието на фитостабилизационен и фитоекстракционен механизъм на разпределение на тежките метали в различните части на растения от две линии *Paulownia* - *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, отгледани на замърсена с тежки метали почва.
3. Установени са концентрациите от ЕДТА и цитрат, които имат защитен ефект върху развитието на листата на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, като преодоляват уврежданията върху морфологичната им структура в условия на тежкометален стрес.
4. Показано е, че третирането на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei* с 1 mM ЕДТА и 10 mM цитрат възстановява в голяма степен скоростта на нето-фотосинтезата, на транспирацията и подобрява устичната проводимост.
5. Приложена е система от подходящи физиологични и биохимични маркери за характеризирани на механизмите на устойчивост на две линии *Paulownia* - *Paulownia tomentosa* x *fortunei* и *Paulownia elongata* x *fortunei*, селектирани от Био Трии ООД с оглед бъдещото им приложение за ремедиация на почви, завърсени с тежки метали.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Miladinova, K., T. Georgieva, K. Ivanova, M. Geneva, K. Danova, Y. Markovska. 2012. Cadmium and lead effects on *ex vitro* growth and antioxidative response of two *Paulownia* clones. In: Proceedings of the International conference Ecology-Interdisciplinary science and practice”, Sofia, 25-26 October 2012. Part II. Pp 520-525.**
2. **Miladinova, K., T. Georgieva, K. Ivanova, M. Geneva, K. Danova, Y. Markovska. 2012. Ex vitro growth and antioxidative responses of two *Paulownia* clones to Zn excess. In: Proceedings of the International conference Ecology-Interdisciplinary science and practice”, Sofia, 25-26 October 2012. Part II. Pp 526-530.**
3. **Tzvetkova, N., K. Miladinova, K. Ivanova, T. Georgieva, M. Geneva, Y. Markovska. 2013. EDTA mediated phytoextraction of Fe, Zn, Cu, Pb and Cd by two *Paulownia* hybrid plants, In: Proceedings & Abstracts of the 2nd International Symposium on Karda ğlari (Moint Ida) and Endremit “Human –Environmen Interactions and Ecology of Mountain Ecosystems” (Eds. R. Efe, I. Atalay, M. Öztürk), Meta Basim, Izmir, Pp 100-110, ISBN: 978-605-62253-6-9.**
4. **Tzvetkova, N., K. Miladinova, K. Ivanova, T. Georgieva, M. Geneva, Y. Markovska. 2013. Possibility for using of two *Paulownia* lines as a tool for remediation of heavy metal contaminated soil, Journal of Environmental Biology (in press) IF-0.614**

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Miladinova, K., Y. Markovska, N. Tzvetkova, K. Ivanova, M. Geneva, T. Georgieva. 2013. Photosynthesis and growth response of two *Paulownia* lines to heavy metals Cd, Pb and Zn. In: International Sci. Conf.”Forest Research Institute at the Bulgarian Academy of Sciences 85th Anniversary” 1-2 October 2013, Sofia, Book of abstracts, Pp 46 – устен доклад.**

IX. ИСПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- Aebi H.**, 1984. Catalase *in vitro*, In: Methods in Enzymol., 105 (Colowick S.D., Caplan N.O., eds.), Academic Press, New York, pp 120-126.
- Anderson L.L.**, 2007. Assessment of *Thelypteris palustris*, *Asparagus sprengeri* and *Lolium perenne* for their potential use in the phytoremediation of arsenic contaminated soils. PhD Dissertation, Louisiana State University, Louisiana, USA.
- Azzarello E., Pandolfi C., Giordano C., Rossi M., Mugnai S., Mañcuso S.**, 2012. Ultrastructural and physiological modifications induced by high zinc levels in *Paulownia tomentosa*. *Env. Exp. Bot.*, 81, 11-17.
- Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A.**, 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, 330, 1173-1178.
- Di Baccio D., Tognetti R., Minnocci A., Sebastiani L.**, 2009. Responses of *Populus x euramericana* clone I-214 to zinc excess: carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. *Env. Exp. Bot.*, 67, 153-163.
- Doumett S., Lamperi L., Checchini L., Azzarello E., Mugnai S., Mancuso S.**, 2008. Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa* in a pilot-scale assisted phytoremediation study: influence of different complexing agents. *Chemosphere*, 72, 1481-1490.
- Foyer C.H., Rowell J., Walker D.**, 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf, protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*, 157, 239-244.
- Gratani L., Meneghini M., Pesoli P., Crescente M.F.**, 2003. Structural and functional plasticity of *Quercus ilex* seedlings of different provenances in Italy. *Trees*, 17, 515-521.
- Griffith O.W.**, 1980. Determination of glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106, 207-212.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H.**, 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86, No 18, 6838-6842.
- Heath R.L., Packer L.**, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 189-190.
- Hermle S., Vollenweider P., Günthardt-Goers M.S., Mcquattie C., Matyssek R.**, 2007. Leaf responsiveness *Populus tremula* and *Salix viminalis* to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater, *Tree Physiol.*, 27, 1517-1531.
- Hunt R.**, 1982. Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, London.
- Jessup W., Dean R.T., Gebicki J.M.**, 1994. Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Method Enzymol.*, 233, 289-303.
- Lasat M. M.**, 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms, *J. Environ. Qual.*, 31, 109-120.
- Lichtenthaler N.K.**, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol.*, 148, 350-383.
- Lin J., Jach M.E., Ceulemans R.**, 2001. Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO₂. *New Phytol.*, 150, 665-674.
- Lowry O.H., Rosenbough N.J., Farr A.L., Randall R.J.**, 1951. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mancinelli A.L., Yang H. C.-P., Lindquist P., Anderson O.R., Rabino I.**, 1975. Photocontrol of anthocyanin synthesis. III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiol.*, 55, 265-275.

Marchi S., Tognetti R., Minnocci A., Borghi M. Sebastiani L., 2008. Variation of mesophyll anatomy and photosynthetic capacity during leaf development in a deciduous mesophyte fruit tree (*Prunus persica*) and an evergreen sclerophyllous Mediterranean shrub (*Olea europaea*). *Trees*, 22, 559-571.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.

Nakano Y., Asada K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.

Nanda - Kumar P. B. A., Dushenkov V., Motto H., Raskin I., 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1232-1238.

Pfeffer H., Dannel F., Römheld V., 1998. Are there connection between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? *Physiol. Plant.*, 104, 479-485.

Polle A., Otter T., Seifert F., 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.*, 106, 53-60.

Sherwin H.W., Farrant J.M., 1998. Protection mechanisms against excess light in resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regul.*, 24, 203-210.

Sun Y.-B., Zhou Q.-X., An J., Liu W.-T., Liu R., 2009. Chelator-enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil irrigated by industrial wastewater with the hyperaccumulator plant (*Sedum alfredii* Hance). *Geoderma*, 150, 106-112.

Tanhan P., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Chaiyarat R., 2007. Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere*, 68, 323-329.

Terashima I., Miyazawa S.I., Hanba Y.T., 2001. Why are sun leaves rthicker than shade leaves? Consideration based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf. *J. Plant Res.*, 114, 93-105.

Tu C., Ma L.Q., 2002. Effects of arsenic concentration and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. *J. Environ. Qual.*, 31, 641-647.

Tuskan G.A., Di Fazio S., Jansson S., et al., 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr.&Gray). *Science*, 313, 1596-1604.

Verkleij J.A.C., Schat H., 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects (Shaw, A.J., ed.), CRC Press, Boca Raton, pp 179-193.

Verma S., Dubey R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.*, 164, 645-655.

Yuan Y. J., Li C., Hu Z.D., Wu J.C., Zeng A.P., 2002. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairii* for taxol production. *Process Biochem.*, 38, 193-198.

Zhishen J, Mengcheng T., Jianming W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64, 555-559.