



Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Биологически факултет

Катедра „Физиология на растенията“

Катя Митева Иванова

**ФИЗИОЛОГО – БИОХИМИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА
УСТОЙЧИВОСТТА КЪМ ЗАСОЛЯВАНЕ НА РАЗЛИЧНИ
ЛИНИИ *PAULOWNIA***

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Докторска програма Физиология на растенията

Научни ръководители:

проф. д-р Юлиана К. Марковска

проф. д-р Николина П. Цветкова

Рецензенти:

проф. д-р Евгени Д. Ананиев

проф. дбн Аглика М. Едрева

Изказвам дълбоки и най-искрени благодарности на своите научни ръководители – проф. Ю. Марковска, която бе до мен през всички тези години на разработване на дисертацията, за неизменната ѝ професионална подкрепа и посветеното време и проф. д-р Николина Цветкова – за нейната отзивчивост, конструктивни напътствия и неоценима помощ при провеждане на експерименталната работа.

Благодаря на инж. Теодора Георгиева – изпълнителен директор на Био Трии ООД за помощта при избор на експериментални обекти и безвъзмездно предоставения растителен материал.

Изказвам специални благодарности на гл. ас. д-р Светослав Анев, чието съдействие и споделян научноизследователски опит направиха възможно провеждането на голяма част от експериментите.

Изказвам благодарности на гл. ас. д-р Петър Петров за отзивчивостта и помощта, която направи възможно изпълнението на структурните изследвания.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

- АКФ** – активни кислородни форми
- Asc** – редуцирана форма на аскорбата
- MDA** – малондиалдехид
- APX** – аскорбат пероксидаза
- CAT** – каталаза
- C_a** – концентрация на CO₂ в околния въздух
- C_i** – концентрация на CO₂ в междуклетъчните въздушни пространства на листа
- DHA** – дехидроаскорбат
- E** – интензивност на транспирацията
- GR** – глутатион редуктаза
- g_s** – устична проводимост
- GSH** – редуциран глутатион
- GSSG** – окислен глутатион
- G** – CO₂ компенсационен пункт
- J_{max}** – скорост на фотосинтетичния електронен транспорт
- LAR** – отношение на обща листна маса към общо сухо тегло
- MLA** – отношение на обща листна маса към брой листа
- NAD-MDH** – НАД-зависима малат дехидрогеназа
- NADP-MDH** – НАДФ-зависима малат дехидрогеназа
- PAL** – фенилаланин амоняк-лиаза
- PAR** – фотоактивна радиация
- PEP** – фосфоенол пируват
- PEPC** – фосфоенолпируват карбоксилаза
- P_N** – скорост на фотосинтезата
- POX** – гваякол пероксидаза
- R_d** – скорост на дишането
- S_L** – устично лимитиране на фотосинтезата
- SOD** – супероксид дисмутаза
- V_{c,max}** – максимална скорост на карбоксилазната реакция
- V_{TRU}** – скорост на използване на триозофосфатите
- WUE** – ефективност на използване на водата

I. УВОД

Засоляването е един от най-разпространените процеси на деградация на почвата. Естественото или първично засоляване е широко разпространено в аридните и семиаридни региони на земята и се дължи на натрупването на високи концентрации на соли в почвите или в подпочвените води през продължителни геоложки периоди. До появата на т.н. вторично засоляване на почвите се стига при извършване на неправилни агромелиоративни действия. Близко половината от всички напоявани почви в световен мащаб, са засегнати от засоляване, алкализирание и преовлажняване. По данни на ФАО общата площ на засолените региони на Земята възлиза на 1500×10^6 ha, а около 2% от нея се пада на вторичното засоляване. В България, съгласно последния Национален доклад за състоянието на околната среда обработваемите площи в процес на засоляване възлизат на 35 500 ha, като от тях 252 ha са засолени със сода и хлориди.

Засоляването е главен абиотичен стресов фактор, който засяга растежа и развитието на растенията и намалява селскостопанската продукция. Отглеждането на растенията върху засолената почва предизвиква физиологични и метаболитни смущения в тях, които водят до морфологични промени, забавен растеж и развитие, намалена интензивност на фотосинтезата, дишането и синтетичните процеси, и като цяло понижена жизнеспособност. Първата фаза на солевия стрес се дължи на осмотичния ефект и е подобна на реакцията към засушаване. Втората, по-бавна фаза е резултат от токсичното действие на йоните, дължащо се на натрупването им в по-голямо количество в тъканите, и особено в листата на растенията.

Устойчивостта към солеви стрес се определя от множество биохимични пътища, които спомагат за задържането и/или набавянето на вода, поддържат функциите на хлоропластите и йонната хомеостаза. Тези жизнено необходими пътища включват синтеза на осмотично активни метаболити, специфични протеини, антиоксиданти и ензими, контролиращи движението на йони и водни молекули през цитоплазмената мембрана и тонопласта.

Paulownia е единственият род бързорастящи дървесни растения в сем. *Paulowniaceae*. Дървесните видове от род *Paulownia* принадлежат към флората на Китай, но са интродуцирани в различни страни от Азия, Америка, Австралия и Европа в качеството им на високопродуктивни на биомаса растения. Дълбоката коренова система в комбинация с изключително високата интензивност на растеж обясняват използването им за биоремедиация на замърсени и деградирани почви. През последните години са разработени методи за микроразмножаване на различни видове от род *Paulownia*. Внедряването на тези методи в практиката позволява получаването на голямо количество посадъчен материал, който може да бъде използван за залесяване.

В Био Трии ООД, България са създадени редица хибридни линии *Paulownia*, с цел подобряване на техните характеристики (сухоустойчивост, студоустойчивост): *P. tomentosa* x *fortunei* (TF), *P. elongata* x *fortunei* (EF), *P. elongata* x *fortunei* x *elongata* (T2), *P. elongata* x *elongata* (T4), *P. elongata* x *kawakamii* (ЕК). Изясняването на физиолого-биохимичните механизми на толерантност към високи концентрации на соли в почвата ще позволи изготвянето на препоръки при селекцията на солеустойчиви хибридни линии. Използването на селектираните линии *Paulownia* при рекултивиране на пустеещи земи в райони със засоляване би спомогнало за прилагане на фиторемедиационните методи като една екологосъобразна алтернатива на химичните методи за мелиорации. По този начин пустеещи земи биха могли да бъдат използвани

за производство на дървесина, включително и на биогориво, което би подобрило икономическите и социални условия на дадения регион. Изследванията върху толерантността към солеви стрес на отделни видове и линии *Paulownia* са все още малко и недостатъчни. Няма данни за приложението на селектираните пет линии за фиторемедиация на засолен почви, 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 бъдат проучени механизмите на адаптация и толерантност към солеви стрес на хибридни линии *Paulownia* с цел използването им за мелиорация на засолен почви.

За реализиране на целта бяха поставени следните основни задачи:

1. Да се проучи влиянието на кратковременното засоляване върху пет линии *Paulownia*, отгледани като хидропонни култури, и да се определят най-устойчивите от тях чрез проследяване на промените в морфологията, газовата обмяна и антиоксидантната им защита.

2. Да бъде направен лабораторен анализ на почвени образци с различна степен на засоляване и да се определят биодостъпните количества на алкални и алкалоземни метали в тях преди и след отглеждане на растенията като почвени култури.

3. Да се проучи влиянието на продължителното засоляване върху най-устойчивите линии *Paulownia*, отгледани като почвени култури като се проследят промените в натрупването на алкални и алкалоземни метали в тях, както и в анатомо-морфологичната структура и във функционалната активност и механизмите на адаптация на фотосинтетичния им апарат (скорост на фотосинтеза, дишане, показатели на водния режим, активности на основни фотосинтетични ензими от C_4 метаболизма и някои крайни продукти на фотосинтезата). Да се изследват ключови антиоксидантни ензими и метаболити в качеството им на стрес маркери и да се посочат най-чувствителните, характеризиращи толерантността на растенията към солеви стрес.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Растителен материал и условия на отглеждане

1.1. Хидропонни опити

Експериментите са проведени с *in vivo* експлантите от *Paulownia tomentosa*, *Paulownia elongata* и техните хибриди с *Paulownia fortunei* и *Paulownia kawakamii*, съответно: *P. tomentosa x fortunei* (TF), *P. elongata x fortunei* (EF), *P. elongata x fortunei x elongata* (T2), *P. elongata x elongata* (T4), *P. elongata x kawakamii* (ЕК). Те са предоставени от Био Трии ООД, като размножаването им е направено съгласно разработен протокол за *in vitro* микроразмножаване, описан от Миладинова (2014). Растенията са отглеждани при фототермостатни условия като хидропонни култури с цел скрининг на най-устойчивите към засоляване линии. За всяка една от тях са приложени четири варианта на третиране с NaCl, в съответния брой повторения. Първоначалният брой на експлантите от всяка линия е около 100.

Експериментите при хидропонни условия включват 4 варианта, включително контролите, като всяко третиране е с 5 повторения. *In vitro* отгледаните растения *Paulownia* са пренесени в полиетиленови съдове с обем 1.2 l, съдържащи 4 x разреден хранителен разтвор на Hellriegel (1898) с включени всички микроелементи от A-Z по Hoagland (pH 5.9). Полиетиленовите съдове се поставят във фототермостатна камера с 16-h фотопериод, PAR 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, измерена на горната листна повърхност, 25/23 \pm 1 °C температури, относителна влажност на въздуха 60/70%. Всеки съд съдържа по две растения и представлява едно повторение. След 21 дни на култивиране, растенията са прехвърлени на 2 x разреден разтвор на *Hellriegel* (pH 5.9), съдържащ същите микроелементи.

Третирането на растенията с NaCl е извършено на 48^{-ия} ден от отглеждането им. Вариантите включват: контрола (без добавяне на NaCl) и варианти 1, 2 и 3, съответстващи на концентрации 50, 100 и 200 mM NaCl. Разтворите се аерират всеки ден, а средата се заменя с нова със същия състав на всеки 3 дни с цел предотвратяване изчерпването на хранителните вещества.

1.2. Почвени опити

Експериментите при оранжерийни условия са проведени с два типа почви, събрани от различни места на един и същ регион – землището на с. Белозем, област Пловдив, България. Събирането на почвени образци е направено от повърхността и от дълбочина от 30 до 60 cm. Тяхното общо тегло е приблизително 60 kg. В следствие образците са обединени, изсушени до постоянно тегло и пресяти. Първият тип почва (1) се характеризира като незасолена, ливадно-блатна, а вторият (2) като засолена, средно алкална. Растителността при първия тип е естествена: пасище – *Camphorosma monspeliacum*, като 40-50% са голи петна без растителност. Няма антропогенни въздействия. При втория тип почва естествена растителност няма, а културната е царевични насаждения. Подложена е на антропогенни въздействия – оран и напояване (Реферативна база данни за почвите в България, 2009).

В качеството на моделни обекти са използвани растения от две линии *Paulownia* - *Paulownia tomentosa x fortunei* (TF) и *Paulownia elongata x elongata* (T4), характеризирани след скрининга на петте линии като най-устойчиви към засоляване. Растенията са предоставени от фирма Био Трии ООД на двугодишна възраст, а отглеждането им е извършено при оранжерийни условия в съдове (с d = 10 cm)

запълнени с торф и перлит в съотношение 2:1 (v:v). В началото на експеримента растенията са пренесени и засадени (по 1 растение на съд) в предварително дренирани пластмасови съдове, съдържащи по 2.5 kg от тестираната почва. Всеки вариант е представен с 10 повторения. Продължителността на експеримента е два вегетационни сезона (от април 2013 до септември 2014 г.). Растенията са отглеждани в условия на вегетационна къща и оранжерия. Условията на средата са обичайните за сезона: осветление от 10 000 до 25 000 лукса, температура на въздуха от 15° С до 35° С и относителната влажност – от 40% до 65%. Поливането на почвата се извършва ежедневно с чешмяна вода.

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 (*SigmaScan Pro 5*), отношение на общата листна площ към общото сухо тегло на всяко растение (LAR) - по Hunt (1982), отношение на общата листна площ към броя на листата на всяко растение (MLA) - по Di Vaccio et al. (2010).

2.2. Микроскопски наблюдения върху листната структура.

2.3. Определяне на съдържанието на пигменти (Lichtenthaler, 1987).

2.4. Изследване характеристиките на газообмена и CO₂ - зависимостите на фотосинтезата – посредством автоматичен газанализатор LICOR 6400 (*Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA*), с използване на red-blue LED светлинен източник. Изчислението на параметрите на газообмена е извършено по метода на von Caemmerer and Farquhar (1981). Анализът на A:C_i кривите е направен чрез използването на модела на Farquhar et al. (1980). Устичното лимитиране на фотосинтезата е изчислено по формулата на Farquhar and Sharkey (1982).

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

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

2.7. Определяне на количеството на пролина (Bates et al., 1973).

2.8. Определяне на количеството на α - малат (Gutmann and Wahlefeld, 1974).

2.9. Определяне на общото фенолно съдържание (Pffefer et al., 1998).

2.10. Определяне на общото флавоноидно съдържание (Zhishen et al., 1999).

2.11. Определяне на количеството на разтворимите захари (Dubois et al., 1956).

2.12. Определяне съдържанието на разтворими белтъци (Lowry et al., 1951).

2.13. Определяне на количеството на нискомолекулни антиоксиданти – аскорбат и дехидроаскорбат (Foyer et al., 1983) и на окислен и редуциран глутатион (Griffith, 1980).

2.14. Определяне на ензимни активности – супероксид дисмутазна (EC 1.15.1.1) (Marklund and Marklund, 1974), **аскорбат пероксидазна (EC 1.11.1.11)** (Nakano and Asada, 1981), **глутатион редуктазна (EC 1.6.4.2)** (Sherwin and Farrant, 1998), **каталазна (EC 1.11.1.6)** (Aebi, 1984), **гваякол пероксидазна (EC 1.11.1.7)** (Polle et al., 1994), **фенилаланин амоняк-лиаза (EC 4.3.1.24)** (Yuan et al., 2002), **фосфоенолпируват карбоксилазна (EC 4.1.1.31)** (Romanova, 1980), **НАД - малат дехидрогеназна (EC 1.1.1.37)** и **НАДФ – малат дехидрогеназна (EC 1.1.1.82)** (Scheibe and Stitt, 1988).

2.15. Определяне на общото количество на Ca, Mg, Na, K и Fe в почвени и растителни образци – след киселинна хидролиза с помощта на атомно-абсорбционен спектрофотометър (*Perkin-Elmer 5000, UK*) – по Doumett et al. (2008).

2.16. Статистическа обработка на резултатите

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Хидропонни опити

1.1. Влияние на NaCl върху растежа и развитието на растенията

В сравнение с контролните растения, третираните с различни концентрации на NaCl не проявяват визуално никакви симптоми на фитотоксичност (хлороза, некроза, завяхване) при нито един от изследваните варианти, въпреки че общата свежа, суха биомаса и общата листна площ драстично намаляват. Отношението между обща листна площ и обща суха биомаса (LAR) представлява капацитета на растенията за формиране на фотосинтезираща повърхност. С увеличаване на засоляването LAR се увеличава в реда TF > T2 > EK, но намалява при EF > T4. MLA представлява отношението между обща листна площ и общ брой листа. MLA се променя драстично под действие на неблагоприятни фактори, тъй като листата намаляват размерите си, но техния брой може да се увеличи. С увеличаване на засоляването MLA намалява в различна степен при всички линии — най-много при 200 mM NaCl за TF (Таблица 1).

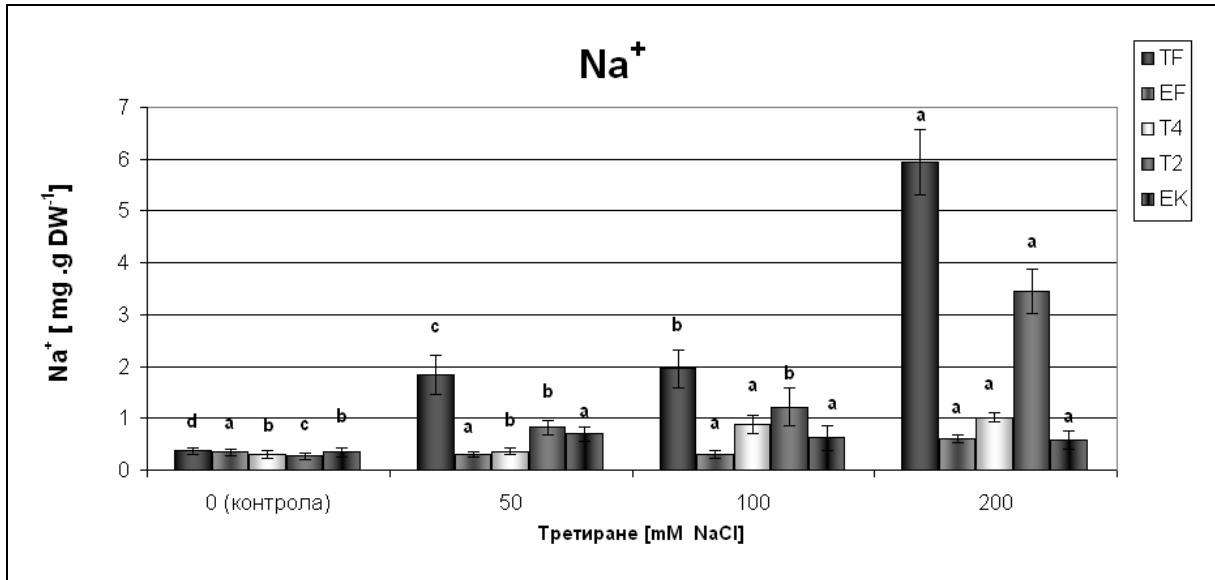
Таблица 1. Промени в съотношенията обща листна площ/обща суха биомаса (LAR) и обща листна площ/общ брой листа (MLA) при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с M±SE (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и съответните варианти на засоляване) съгласно Fisher's LSD test (P<0.1).

линия	Третиране [mM NaCl]	обща листна площ [cm ²]	LAR [cm ² g ⁻¹]	MLA
TF	K	429±16b	472.5±10.5a	35.8±6.4b
	50	126±5a	611.6±11.0ab	15.8±0.7a
	100	109±22a	471.8±21.8a	12.1±1.4a
	200	87±4a	595.8±34.4b	7.9±1.8a
EF	K	502±39b	407.1±54.4a	50.2±1.6b
	50	300±40a	283.8±10.4a	33.3±4.1a
	100	360±23a	344.2±15.3a	45.1±1.0ab
	200	321±67a	363.1±64.7a	40.1±3.9ab
T4	K	411.7±11.8a	799.6±21.7a	34.3±5.2a
	50	294.8±28.4b	448.0±48.0d	24.6±1.0b
	100	379.1±46.1c	515.1±15.9c	37.9±2.2c
	200	188.6±19.8d	582.1±28.5d	20.9±2.8d
T2	K	400.0±61.4a	386.8±32.0c	33.3±3.2a
	50	415.9±80.8a	503.5±18.8b	34.6±1.9b
	100	329.6±12.1b	542.1±46.4a	27.5±1.8b
	200	253.4±61.5c	553.3±36.2a	31.7±1.4c
EK	K	338.0±68.8a	548.7±24.0c	42.2±1.4a
	50	327.2±32.3a	479.1±38.7d	29.7±9.2b
	100	249.9±27.9b	550.4±91.8a	27.8±4.4c
	200	198.6±10.7c	582.4±34.7b	22.1±1.4d

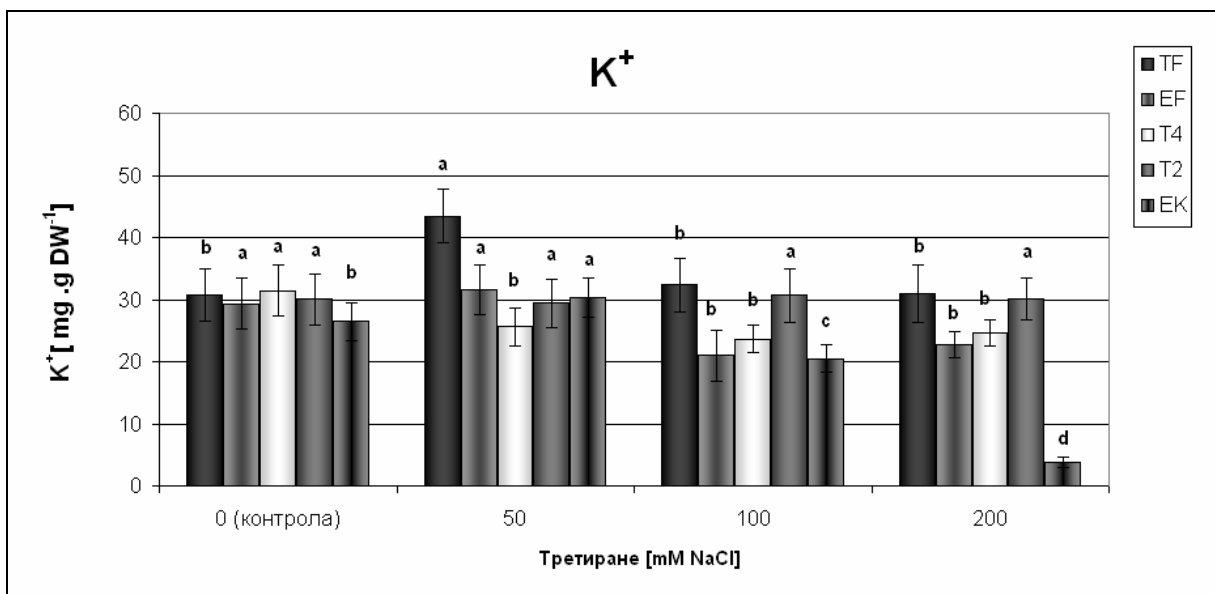
1.2. Натрупване на Na⁺, K⁺ и K⁺/Na⁺ в напълно развити листа от различни линии

С увеличаване на концентрацията на NaCl в хранителния разтвор нараства количеството на Na⁺ в листата на изследваните линии. Най-голямо количество Na⁺ се акумулират в листата на линията TF при най-високата концентрация на NaCl – 200 mM, а най-малко – при линията EK (Фигура 1). Количеството на акумулирания K⁺ нараства най-много в листата на TF след третиране с 50 mM NaCl в сравнение с контролния вариант, след което намалява. Най-силно намалява количеството на акумулираните K⁺

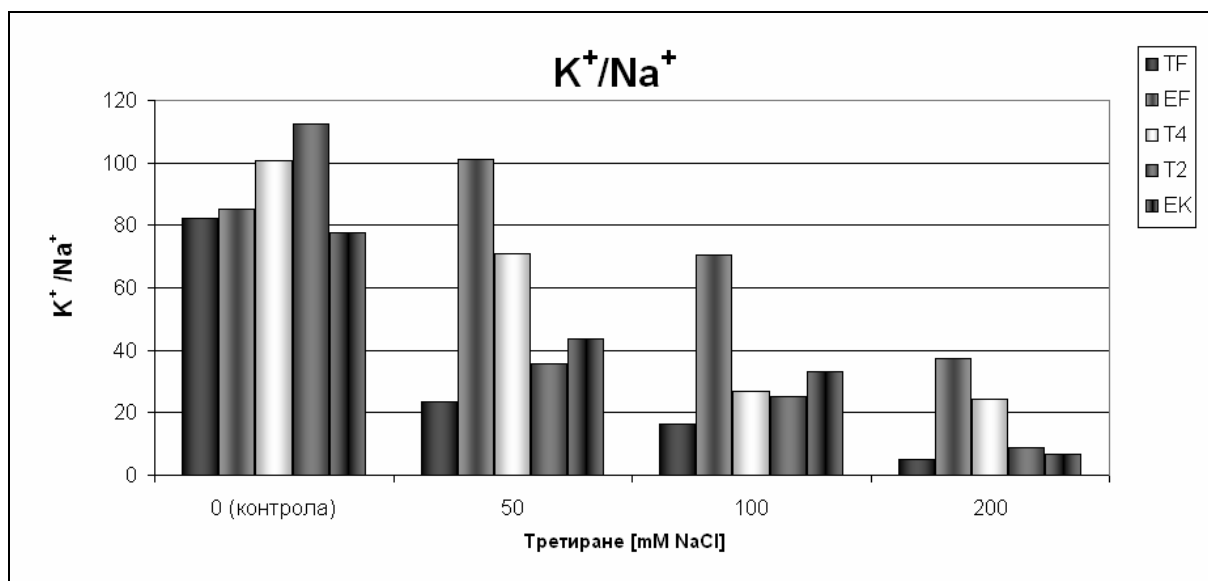
в листата на ЕК при най-високата концентрация на NaCl – 200 mM (Фигура 2). С увеличаване на концентрацията на NaCl в хранителния разтвор съотношението K^+/Na^+ намалява като най-голямо е понижението при линиите TF и ЕК (Фигура 3).



Фиг. 1. Количество на акумулирани Na^+ в листата при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и съответните варианти на засоляване) съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Фиг. 2. Количество на акумулирани K^+ в листата при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ (n=5). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и съответните варианти на засоляване) съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Фиг. 3. Съотношение K^+/Na^+ в листата при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl.

Според Maathuis and Amtmann (1999) капацитетът на растенията да толерират засоляване се определя от статуса на K^+ в листата (съотношението K^+/Na^+). Редица изследователи считат, че високото съотношение K^+/Na^+ представлява важен селекционен критерий за толерантност към засоляване. Нашите резултати показват, че с повишаване на засоляването се наблюдава рязко намаляване на съотношението K^+/Na^+ , причината за което е не намаляването на поглъщането на K^+ , а увеличеното поглъщане на Na^+ .

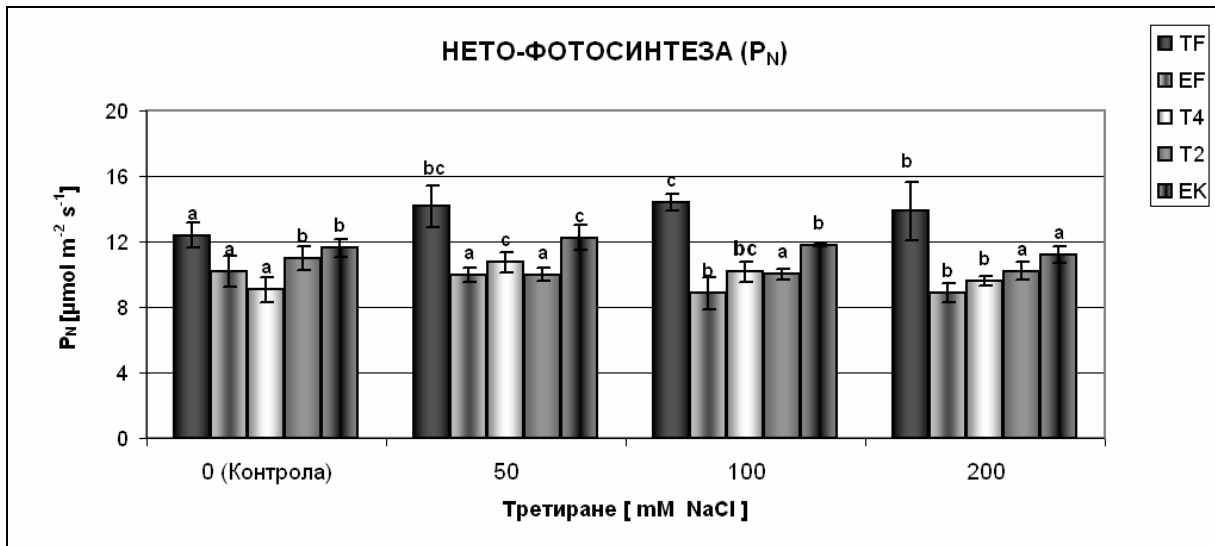
При засоляване растенията реагират с намаляване на общата листна площ, което се дължи както на намаляване на броя на листата, така и на тяхната площ. При нашите изследвания е отчетена най-малка обща листна площ, но най-високи стойности на LAR и най-ниски стойности на MLA при линията TF след третиране с 200 mM NaCl (Таблица 1). При същия вариант количеството на Na^+ в листата е най-високо (Фигура 1), а съотношението K^+/Na^+ е ниско (Фигура 3).

1.3. Влияние на NaCl върху листния газообмен

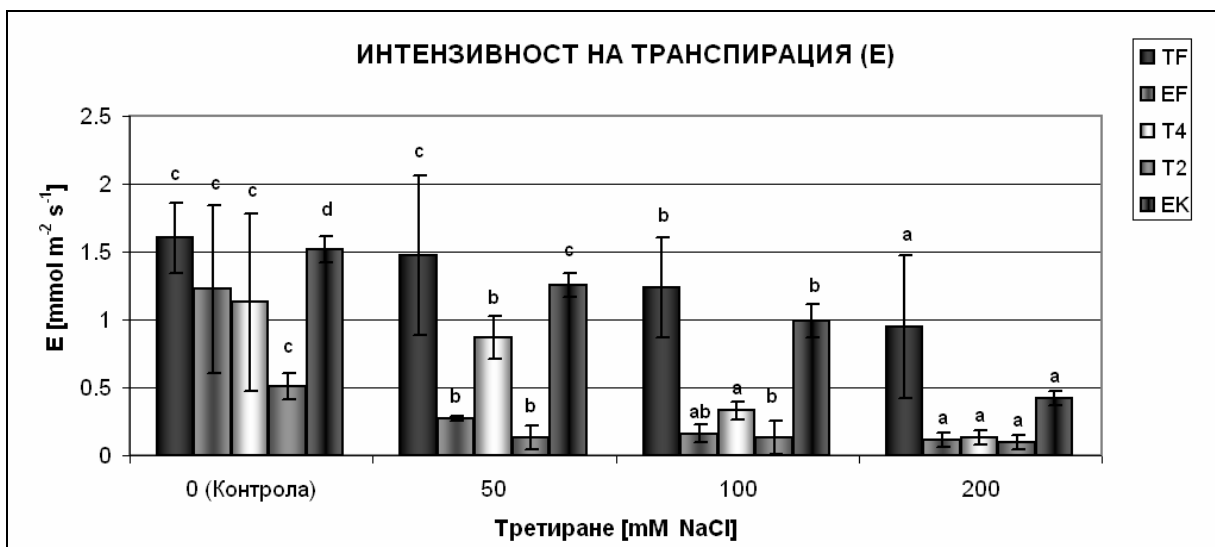
Независимо, че в листата на линията TF са установени значителни количества Na^+ в сравнение с останалите линии, ходът на промените в скоростта на тяхната нето-фотосинтеза (P_N) бележи ясно изразена тенденция на повишаване (Фигура 4), а интензивността на транспирация (E) и устичната проводимост (g_s) постепенно намаляват след третиране с нарастващи концентрации на NaCl (Фигури 5 и 6). Установените разлики в скоростта на нето-фотосинтезата при контролните и третираните варианти на линиите EF, T2, T4 и EK са относително слаби, но значими. При T4 стойностите на P_N също са слабо повишени (Фигура 4), докато E и g_s плавно намаляват (Фигури 5 и 6). Линиите EF, T2 и T4 се отличават с най-голямо увеличение в ефективността на използване на водата (WUE), докато за EK, и най-вече за TF, установената тенденция на повишаване е незначителна (Фигура 7).

Установена е стриктна корелация между растежа и фотосинтетичната активност на растенията под действие на солеви стрес (Коуго and Huchzermeyer, 2004; Geissler et al., 2009). Продукцията на биомаса зависи главно от възможността за съхраняване на високи стойности на нето-фотосинтезата при минимални загуби на вода. Според редица

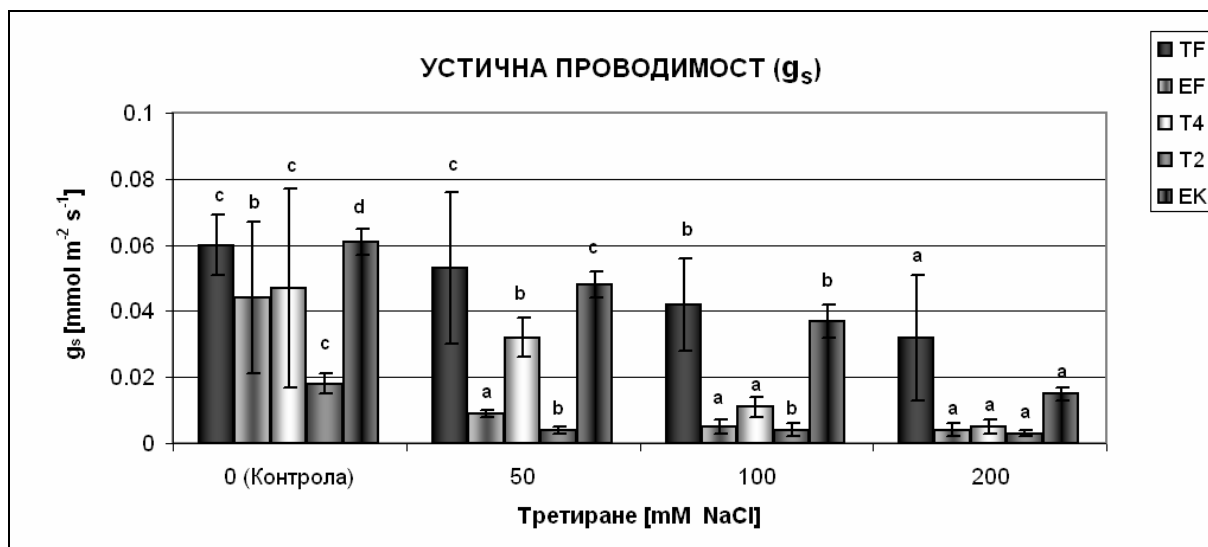
изследователи балансът между акумулираната в тъканите на растенията и транспирираната вода или неблагоприятното съотношение K^+/Na^+ са причина за намаленото удължаване на листата и подтиснатия растеж на растенията (Neves-Piestum and Bernstein, 2001; Cramer, 2003). При нашите изследвания се установява най-силно намаляване на съотношението K^+/Na^+ в листата на линията TF, както и на съотношението MLA при най-високата степен на засоляване. Тази линия се отличава и със слаби изменения в WUE (Фигура 7). При линията T4 се наблюдава значително повишаване на параметъра WUE, но средни по големина стойности на съотношенията MLA и K^+/Na^+ (Фигура 3, Таблица 1).



Фиг. 4. Промени в скоростта на нето-фотосинтезата (P_N) при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=20$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и съответните варианти на засоляване) съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Фиг. 5. Промени в интензивността на транспирацията (E) при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=20$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и съответните варианти на засоляване) съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

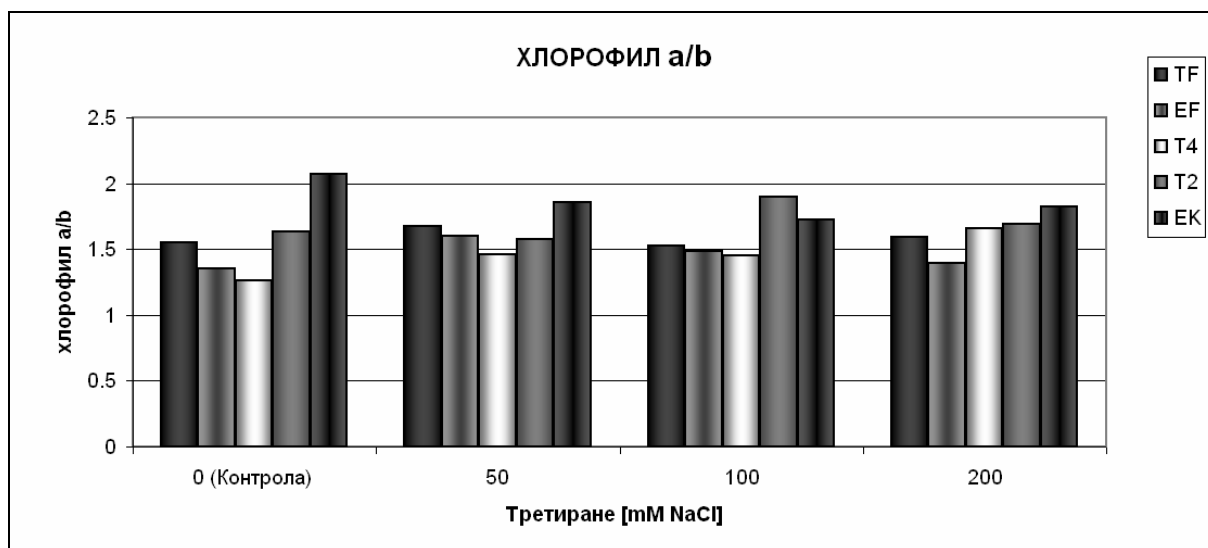


Фиг. 6. Промени в устичната проводимост (g_s) при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=20$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики (при сравняване на контролните и съответните варианти на засоляване) съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



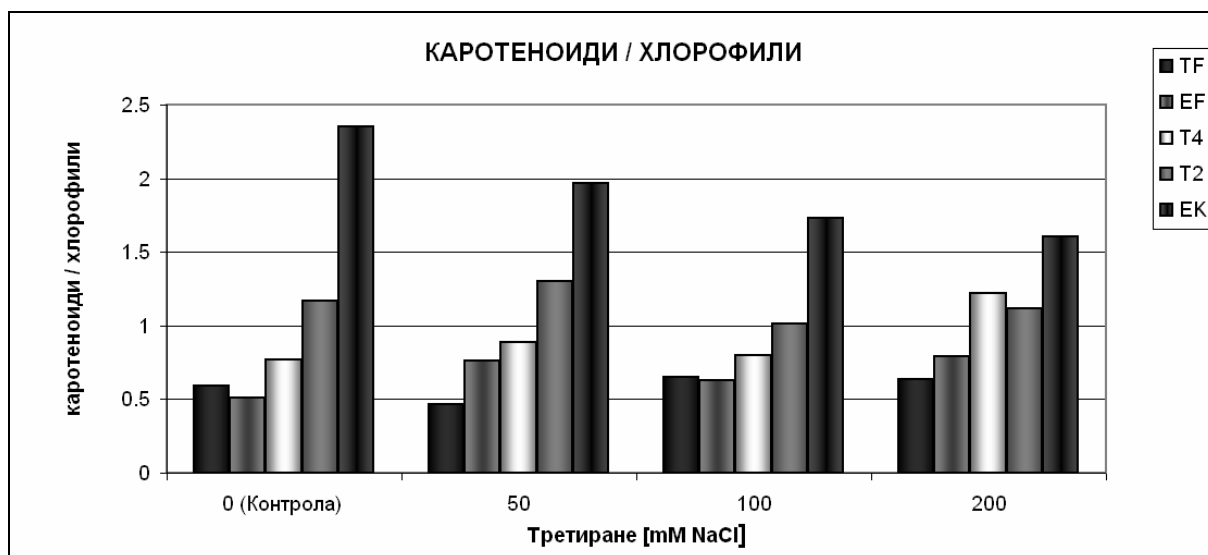
Фиг. 7. Промени в ефективността на използване на водата (WUE) при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl.

Представените промени в съотношението хлорофил a/ хлорофил b при петте линии *Paulownia*, измерени в условия на засоляване показват, че то варира относително слабо в листата на TF и EF и в по-голяма степен при останалите три линии (Фигура 8). Наблюдаваната тенденция на промени е подобна на тази, установена при отчитане на нето-фотосинтезата на същите линии (Фигура 4).



Фиг. 8. Промени в съотношението хлорофил a/ хлорофил b при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl.

На Фигура 9 са представени промените в съотношението каротеноиди/ хлорофил в листата на петте линии *Paulownia*. Това съотношение нараства слабо при TF и T2, при линиите EF и T4 се увеличава по-значително, а при линията EK намалява с увеличаване на степента на засоляване. Резултатите показват, че пътищата на адаптация на фотосинтетичния апарат към действието на повишени концентрации на NaCl при петте линии вероятно са различни.



Фиг. 9. Промени в съотношението каротеноиди/ хлорофил (car/chl) при различни хибридни линии *Paulownia*, измерени на 58^{-ия} ден от отглеждането им при хидропонни условия и на 10^{-ия} ден от третирането с NaCl.

Тъй като по време на растежа и развитието на растенията формата и функцията на органите търпи съществени изменения, то възможностите на растенията да реагират на солеви стрес се определят от експресията на гените по време на тяхното развитие. Изясняването на механизмите на толерантност става още по-комплицирано когато отговорът на растенията варира в зависимост от фазата на развитие и цикъла на растеж.

Затова, за да се разработи практическа стратегия за селектиране на толерантни линии (генотипове) според Ashraf (2004) е необходима детайлна информация доколко наблюдаваните физиологични и биохимични промени в параметрите са резултат от увреждащия ефект на засоляването или са компоненти на адаптационни механизми.

Нашите изследвания на антиоксидантната защита на петте линии показват, че активностите на каталазата (CAT), гваякол пероксидазата (POX) и глутатион редуктазата (GR), но не и на аскорбат пероксидазата (APX) нарастват постепенно след третиране с нарастващи концентрации на NaCl при линията TF, докато при линията T4 – CAT-, POX- и APX-активностите намаляват, а GR-активността слабо нараства. Същевременно при TF е установено повишаване на нивото на малондиалдехида (MDA) и на глутатиона (GSH), но не и това на хидроксипероксидите (H_2O_2) и на аскорбата (Asc). При линията T4 почти не се наблюдават изменения в нивото на MDA, но това на H_2O_2 , Asc и особено на GSH нараства постепенно със засоляването. По-големите промени в активностите на CAT, POX, APX и на GR в сравнение с количествените промени на нискомолекулните антиоксиданти при TF линията показват, че в неутрализацията на излишните количества H_2O_2 участват по-скоро ензимни, отколкото неензимни процеси, докато при линията T4 е обратното. При останалите линии установените промени на ензимните и неензимни компоненти от антиоксидантната защита на растенията са по-нееднозначни. Други високоефективни антиоксиданти като например фенолите, и по-специално флавоноидите и фенилпропаноидите могат да бъдат окислени посредством пероксидази и обезвреждат H_2O_2 в системата феноли/аскорбат/пероксидази. Има доказателства за индукция на метаболизма на фенолите при растенията под действие на различни стресови влияния (Michalak, 2006), а при нашите изследвания е установено значително нарастване на общото количество на фенолите и на флавоноидите при TF, но по-слабо при T4.

IV.2. Почвени опити

IV.2.1. Агрохимични характеристики на тестираните почви

В таблица 2 са представени агрохимични характеристики на избраните от нас почвени образци за провеждане на почвените опити.

Таблица 2. Агрохимични характеристики на незасолена и засолена почва, събрани от района на с. Белозем, обл. Пловдив, България.

Почвен тип	НЕЗАСОЛЕНА(1)	ЗАСОЛЕНА(2)
Предназначение	пасище	обработваема
T [meq 100 g ⁻¹ почва]*	14.68	14.98
pH (почвения разтвор)	8.00	8.92
Ел. проводимост [mS cm ⁻¹]	6.3	14.0
C _{org} (%)	0.98	1.92
Общ N [%]	0.050	1.329
Общ P [mg kg ⁻¹]	390.26	584.25
Обменен Са [meq. 100 g ⁻¹ почва (g . 100g ⁻¹ почва)]	11.0 (0.440)	7.4 (0.296)
Обменен Mg [meq. 100 g ⁻¹ почва (g . 100g ⁻¹ почва)]	2.63 (0.063)	3.62 (0.088)
Обменен К [meq. 100 g ⁻¹ почва (g . 100g ⁻¹ почва)]	0.80 (0.031)	0.96 (0.037)
Обменен Na [meq. 100 g ⁻¹ почва (g . 100g ⁻¹ почва)]	0.49 (0.011)	2.60 (0.060)
SAR **	0.187	1.108
Степен на солонцеватост [%] ***	3.33	17.35

*T – капацитет на катионнообменната адсорбция [meq .100 g⁻¹ почва];

**SAR (Sodium adsorption ratio) – адсорбционно отношение на Na към съдържащите се в почвата Ca и Mg – (Na / √(Ca+Mg)/2), където обменните катиони са представени в meq .100 g⁻¹ почва;

***Степен на солонцеватост (%) – (обм. Na/T .100), където Na е представен в meq .100 g⁻¹ почва.

От направения анализ на почвите става ясно, че незасолената (1) почва е ~ 2 пъти по-бедна на C, 26 пъти по-бедна на N и 1.5 пъти по-бедна на P. Капацитетът на катионнообменна адсорбция (T) не се отличава съществено, но количеството на обменния Na в засолената (2) почва е ~ 5 пъти повече, Sodium Adsorption Ratio (SAR) - ~6 пъти по-голямо, а степента на солонцеватост – 5.2 пъти по-висока. Високата електрическа проводимост (14.0 mS cm⁻¹) и относително високото pH на почвения разтвор (8.92) дават основание тази почва да бъде характеризирана като средно алкална (солонцевата) (Приложение №16 към чл. 13, т.2.от Наредба №3, обн. в ДВ, бр. 71, 12.08.2008 г.).

Почвените опити са изведени с растения от линиите TF и T4, тъй като първата се характеризира с най-високи стойности на нето-фотосинтезата (P_N), но ниски стойности на ефективността на използване на водата (WUE), акумулира най-голямо количество Na⁺ и притежава ефективна антиоксидантна защита в условия на хидропоник, а втората линия има по-ниски, но положителни стойности на P_N и относително слаба антиоксидантна защита, слабо акумулира Na⁺, но WUE при нея е висока.

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

Анализът на достъпните количества алкални и алкалоземни метали в екстрахируемата (биодостъпната) фракция от двете почви преди засаждането на растенията показва, че количеството на Ca²⁺ и особено на Na⁺ преобладава при засолената почва. По-големи количества K⁺ и Mg²⁺, но не и Fe³⁺ са установени също във фракцията от засолената почва, а pH и на двете фракции е алкално, като на засолената почва е по-високо в сравнение с незасолената (Таблица 3).

Таблица 3. Биодостъпни количества на алкални, алкалоземни метали и Fe³⁺ [mg l⁻¹] във фракциите от незасолена и засолена почва преди засаждането и след прибирането на растенията на втората година (2014)

Тип почва	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Fe ³⁺	K ⁺ /Na ⁺	pH
Преди засаждане на растенията							
Незасолена (1)	29.0±2.5a	10.0±1.3a	26.5±2.9a	34.0±2.9 a	8.3±0.9 a	1.28	8.00
Засолена (2)	40.0±3.5b	187.0±12.3 b	382.2±24.9b	50.0±4.9 b	0.2±0.05 b	0.13	8.92
След прибиране на линията TF							
Незасолена (1)	45.0±3.7a	0.7±0.02 a	178.2±2.6 a	174.0±20.9 a	495.0±39.6 a	0.98	5.66
Засолена (2)	40.0±3.0b	28.6±2.5 b	53.2±4.8 b	42.0±3.7 b	40.2±4.2 b	0.79	6.66
След прибиране на линията T4							
Незасолена (1)	22.0±2.1a	3.2±1.1 a	338.8±23.9	110.0±19.9 a	220.3±91.3 a	0.32	5.82
Засолена (2)	27.0±1.5b	41.8±2.9 b	78.1±6.7b	29.0±3.6 b	27.0±5.5 b	0.37	6.85

Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P< 0.05).

След прибирането на растенията от TF и от T4, прави впечатление увеличеното количество на Mg²⁺, Fe³⁺ и особено на Na⁺ и K⁺ във фракцията от незасолената почва. Съотношението K⁺/Na⁺ в тази фракция намалява почти трикратно след прибиране на T4 (0.32) в сравнение с TF (0.98). pH на двете фракции също се променя – от алкално в слабо кисело. Нашите резултати показват, че отглеждането на растенията от двете линии *Paulownia* върху незасолена почва за период от 2 години води до обогатяване на биодостъпната фракция с допълнително количество Na⁺, K⁺ и Fe³⁺, т.е. при тези условия и двете линии избягват стреса, отделяйки излишните количества на дадените йони в ризосферната зона на корените.

Резултатите, отчетени за корените на двете линии, отгледани на незасолена и засолена почва показват, че не са установени съществени различия в количеството на Mg²⁺ и Ca²⁺, а количеството на Na⁺ и K⁺ преобладава в корените и на двете линии, отгледани на незасолена почва. Не са установени съществени различия в количеството на тези елементи в корените на двете линии, отгледани на засолена почва, поради което съотношението K⁺/Na⁺ е близко по стойност. В корените на T4 това отношение е обаче 1.2 пъти по-високо (13.93) в сравнение с корените на TF (12.00) (Таблица 4).

Таблица 4. Промени в количествата на алкални, алкалоземни метали и Fe³⁺ [mg g⁻¹ DW] в корените след прибирането на растенията на втората година (2014).

Тип почва	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Fe ³⁺	K ⁺ /Na ⁺
След прибиране на линията TF						
Незасолена (1)	1.79±0.7a	0.66±0.05a	2.75±0.8a	17.37±2.1a	0.96±0.06a	6.32
Засолена (2)	1.39±0.2a	0.65±0.03a	0.72±0.06b	8.58±0.7b	1.86±0.20b	12.00
След прибиране на линията T4						
Незасолена (1)	2.92±0.4a	0.85±0.07a	3.37±0.5a	14.85±1.9a	2.79±0.3a	4.41
Засолена (2)	2.23±0.5a	1.08±0.09a	0.74±0.6b	10.27±1.1b	2.14±0.2b	13.93

Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P< 0.05).

Резултатите, отчетени за листата на двете линии през първата година показват, че количеството на Na⁺ и K⁺ е по-високо в листата на растенията, отгледани на засолена почва в сравнение с незасолената. Съотношението K⁺/Na⁺ намалява при линията TF, отгледана на засолена почва, но при линията T4 се повишава (Таблица 5).

Таблица 5. Промени в количествата на алкални, алкалоземни метали и Fe³⁺ в [mg g⁻¹ DW] в напълно развити листа от две линии *Paulownia* – TF и T4, измерени през първата година (2013).

Тип почва	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Fe ³⁺	K ⁺ /Na ⁺
След прибиране на линията TF						
Незасолена (1)	1.98±0.8a	2.90±0.3a	0.14±0.02a	10.40±1.2a	0.14±0.02a	74.29
Засолена (2)	1.74±0.6a	2.35±0.4a	0.19±0.02b	11.80±1.4a	0.06±0.01b	62.11
След прибиране на линията T4						
Незасолена (1)	1.95±0.3a	2.29±0.2a	0.14±0.01a	7.52±0.6a	0.10±0.01a	53.71
Засолена (2)	2.88±0.4b	2.15±0.5b	0.19±0.03b	10.70±0.9b	0.41±0.02b	56.32

Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P< 0.05).

В края на втората година количеството на Ca²⁺ е приблизително 3 пъти по-високо в листата на TF в сравнение с T4, а това на Na⁺ преобладава в листата на T4, отгледана както на незасолена, така и на засолена почва. Съотношението K⁺/Na⁺ е от цял порядък по-високо в листата на TF в сравнение с T4 – то е почти двойно за листата на TF, отгледана на незасолена и засолена почва. Количеството на Fe³⁺ преобладава в листата на TF в по-голяма степен в сравнение с T4 (Таблица 6).

Таблица 6. Промени в количествата на алкални, алкалоземни метали и Fe³⁺ в [mg g⁻¹ DW] в напълно развити листа от две линии *Paulownia* – TF и T4, измерени през втората година (2014).

Тип почва	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Fe ³⁺	K ⁺ / Na ⁺
След прибиране на линията TF						
Незасолена (1)	2.94±0.4a	6.06±0.5a	0.071±0.005a	9.13±0.8a	0.133±0.02 a	128.59
Засолена (2)	1.87±0.2b	6.51±0.6a	0.072±0.006a	9.90±0.9a	0.158±0.02b	137.50
След прибиране на линията T4						
Незасолена (1)	1.48±0.2a	6.51±0.6a	0.116±0.02a	7.81±0.6a	0.085±0.007a	67.24
Засолена (2)	2.11±0.2b	2.08±0.2b	0.156±0.06b	8.92±0.8b	0.093±0.008b	57.22

Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P < 0.05).

Изключването на соли е механизъм, който се проявява на клетъчно ниво, но и на ниво цяло растение и е свързано до голяма степен с регулирането на K⁺/Na⁺ селективност (Jeschke and Hartung, 2000). При нашите опити се наблюдава акропетален градиент в разпределението на алкалните метали между биодостъпната фракция, корените и листата – най-ниски са количествата на Na⁺ в листата, особено на линията TF отгледана на незасолена и засолена почва през втората година. Същевременно е установено значително по-голямо количество на Ca²⁺ в биодостъпната фракция от засолената почва преди засаждането на растенията (Таблица 3). В листата на TF, отгледана на незасолена и засолена почва, както и в листата на T4, отгледана на незасолена почва, количеството на Ca²⁺, отчетено през втората година е от един порядък по-високо в сравнение с корените. Следователно, единствено при Ca²⁺ се наблюдава нарушение в градиента на разпределение на йоните (Таблицы 3, 4 и 6). Установените концентрации на K⁺ в напълно развитите листа на линиите на втората година от изследванията са високи, а тези на Na⁺ - ниски (Таблица 6). Според изказаната хипотеза от Mengel and Kirkby (2001), съхраняването на K⁺ хомеостаза е от съществено значение за експанзията на листата. Сравнявайки обаче динамиката на промени в количеството на Na⁺ и K⁺, както и на съотношението K⁺/ Na⁺ в хода на вегетацията с резултатите от измерваната листна площ на същите листа се оказва, че не се наблюдава корелация.

IV.2.3. Влияние на засоляването върху растежа и развитието на растенията

Установено е, че с напредване на вегетацията и при двете линии се проявява пожълтяване и опадване първоначално на по-възрастните, а по-късно и на по-младите листа. Опадването на възрастните листа е по-ярко изразено при растенията от TF, отгледана на засолена почва в сравнение с незасолената и може да се разглежда като проява на фитотоксичност и възможност да се предпазят младите листа от действието на високи концентрации на соли. Този механизъм на действие е свързан също с избягване на стреса.

Резултатите показват, че дължината на стъблата и броя на листата намалява както през първата, така и през втората от отглеждането на линията TF върху засолена почва в сравнение с незасолената. При линията T4 наблюдаваната тенденция е обратна и за двете години. Свежата биомаса се увеличава както през първата, така и през втората година и при двете линии, докато сухата биомаса намалява. Изключение прави линията T4 през втората година, но отчетеното увеличение е статистически незначимо. Съотношението на суха биомаса на корени към надземни части (DW_{root/shoot}) обаче се

повишава при отглеждане на растенията от двете линии на засолен почва. В по-голяма степен се увеличава това отношение при линията TF. Общата листна площ (LA) намалява както през първата, така и през втората година при линията TF, отгледана на засолен почва. При линията T4 се наблюдава увеличение на тази площ през втората година, като отчетената разлика е статистически значима. Двата най-важни параметъра, характеризиращи капацитета на растенията за формиране на фотосинтезираща повърхност - LAR и MLA през втората година нарастват значително при TF, докато при T4 намаляват слабо при отглеждане на растенията върху засолен почва в сравнение с незасолената (отчетените разлики за MLA са статистически значими) (Таблица 7).

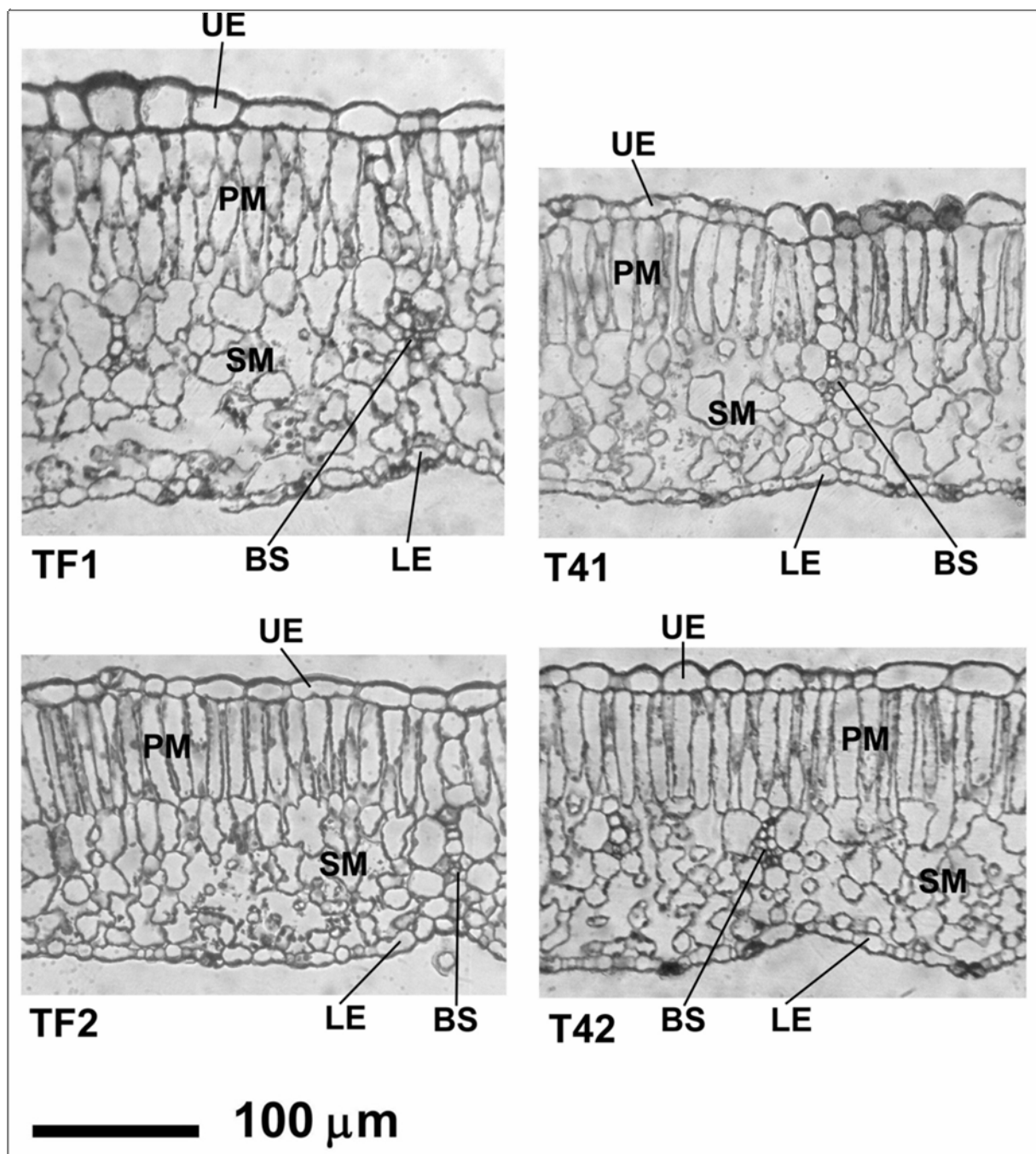
Таблица 7. Промени в дължината на стъблата, броя на листата, общата свежа (FW) и суха (DW) биомаса, съотношението между тях (FW/DW), отношението между сухата биомаса на корени и надземни части ($DW_{\text{root/shoot}}$), общата листна площ (LA), LAR и MLA при отглеждане на две линии *Paulownia* – TF и T4 в продължение на две години на незасолен (1) и засолен (2) почва при оранжерийни условия.

линия	дължина на стъбла [cm]	брой листа	обща свежа биомаса [g]	обща суха биомаса [g]	корени/ надзем- на част	обща листна площ [cm ²]	LAR [cm ² .g ⁻¹]	MLA
първа година								
TF(1)	21.5±2.09a	9±0.83a	15154±2.724b	14197±2.217a		1281.12±271.95a		128.11±24.72a
T4(1)	22.6±2.70a	9±1.01a	20061±2.572b	11103±4.012a		817.32±226.15a		90.81±2.26a
TF(2)	19.4±1.98a	8±0.92a	20410±8.646a	5.714±2.124b		800.67±241.87b		90.98±2.02b
T4(2)	23.0±2.27a	10±1.0a	33710±3.443a	8.270±4.486a		575.33±275.67b		65.38±3.32b
втора година								
TF(1)	33.0±2.5b	26±1.9b	48642±4.67b	26552±2.622a	0.471	823.56±78.42a	31.02±2.69b	31.67±1.92b
T4(1)	32.0±2.7b	22±1.5b	27156±1.86b	15029±1.544a	0.541	655.93±52.48b	43.64±3.18a	29.82±1.78a
TF(2)	26.0±1.8a	18±1.1a	62713±5.15a	17561±1.618b	1.010	731.68±68.26b	41.66±3.87a	40.64±3.46a
T4(2)	48.0±3.6a	26±1.7a	40177±3.75a	16898±1.543a	0.752	720.12±66.64a	42.62±3.27a	27.70±1.86b

Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.1$).

IV.2.3.1. Структурни наблюдения

Листата на *Paulownia* притежават дорзивентрална и амфистоматична структура с добре развит горен, долен епидермис и компактно подредени 4–5 слоя палисаден мезофил. Над долния епидермис е разположен гъбчестия мезофил, който се състои от 4–5 слоя рехаво разположени клетки, които обграждат големи междуклетъчни пространства (Фигура 10).



Фиг.10. Напречни прерези на листа от *Paulownia tomentosa* x *fortunei* (TF) и *Paulownia elongata* x *elongata* (T4), отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Обозначения: BS – проводящи сночета; UE – горен епидермис; PM – палисаден мезофил; SM – гъбчест мезофил; LE – долен епидермис. Бар = 100 μm .

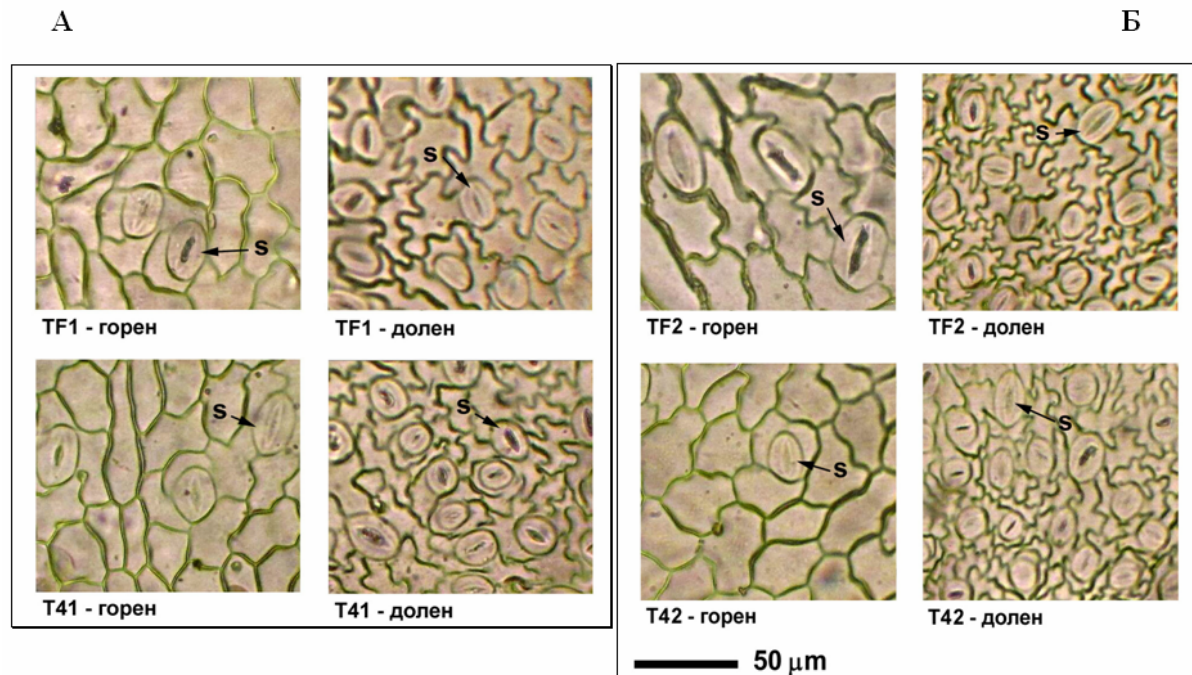
В сравнение с T4, растенията от TF притежават по-голяма дебелина на листната петура, на горния и долния епидермис, на палисадния и особено на гъбчестия мезофил, както и на междуклетъчното пространство в гъбчестия мезофил, установени при отглеждането им на незасолена почва. Всички тези параметри намаляват при отглеждане на растения от TF на засолена почва, като отчетените разлики са значими. Същите параметри намаляват и при линията T4, с изключение на дебелината на гъбчестия мезофил, която се увеличава, но установените разлики са незначими. При линията TF намалява и междуклетъчното пространство в гъбчестия мезофил с около 48%, докато при линията T4 намаляването е само с около 2% (Таблица 8).

Таблица 8. Промени в дебелината на листната петура, полисадния и гъбчестия мезофил, размерите на вътреклетъчното пространство, горния и долния епидермис на листа от *Paulownia tomentosa* x *fortunei* (TF) и *Paulownia elongata* x *elongata* (T4), отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва.

Линии	Дебелина на лист. петура (μm)	Горен епидермис ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	Долен епидермис ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	Палисаден мезофил ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	Гъбчест мезофил ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	Междукл. простр. в г. мезофил ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
TF(1)	238.7 \pm 15a	20.6 \pm 2.30a	11.20 \pm 0.7a	84.15 \pm 3.20a	122.7 \pm 7.27a	42.85 \pm 4.55a
T4(1)	175.5 \pm 4.2a	17.65 \pm 1.8ab	9.05 \pm 0.24a	66.40 \pm 1.90a	82.75 \pm 2.51a	28.90 \pm 2.54a
TF(2)	168.0 \pm 3.2b	13.25 \pm 0.71b	9.17 \pm 0.33b	61.10 \pm 1.49b	86.10 \pm 2.14b	22.50 \pm 1.49b
T4(2)	174.3 \pm 8.5a	13.9 \pm 1.13a	8.67 \pm 0.29a	65.25 \pm 1.74a	87.05 \pm 3.51a	28.30 \pm 3.46a

Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

На Фигура 11А,Б са представени снимки на горен и долен епидермис от напълно развити листа на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* (TF) и *Paulownia elongata* x *elongata* (T4), отгледани на незасолена и засолена почва. Резултатите от отчитането на гъстотата на устицата показват, че техния брой е по-голям на долния в сравнение с горния епидермис и при двете линии. При отглеждане на растенията върху засолена почва броят на устицата нараства с около 12% за долния епидермис на листата на TF, и с около 86% за горния. За линията T4 увеличението е също с около 11% за долния епидермис, но при горния броя на устицата намалява с около 36% (Таблица 9).



Фиг.11 А, Б. Снимки на горен и долен епидермис от напълно развити листа на *Paulownia tomentosa* x *fortunei* (TF) и *Paulownia elongata* x *elongata* (T4), отгледани на незасолена (А) и засолена (Б) почва.

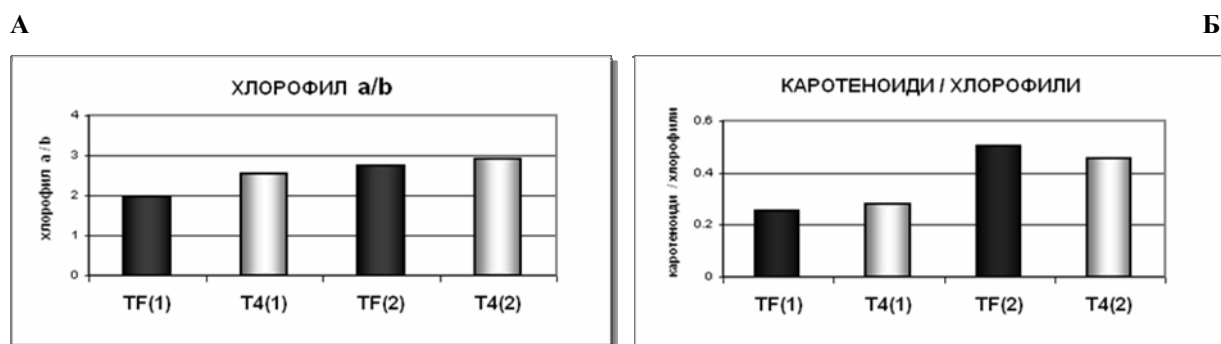
Таблица 9. Промени в броя на устицата, отчетени върху горния и долния епидермис на напълно развити листа от *Paulownia tomentosa* x *fortunei* (TF) и *Paulownia elongata* x *elongata* (T4), отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва.

Линии	Брой на устицата (no. mm ²) ± se
TF(1) - горен епидермис	59±9.8a
TF(1) - долен епидермис	770±42a
T4(1) - горен епидермис	104.5±11.3b
T4(1) - долен епидермис	985±53b
TF(2) - горен епидермис	110±16.3b
TF(2) - долен епидермис	861±52a
T4(2) – горен епидермис	67.1±8.5a
T4(2)– долен епидермис	1096±85b

Установено е, че различията в гъстотата на устицата директно влияят върху продукцията на биомаса. Нашите резултати показват, че линията T4, отгледана на незасолена почва се отличава с по-голям брой устица както на адаксиалната, така и на абаксиалната повърхност на листата в сравнение с линията TF. Засоляването предизвиква различни промени – при TF се увеличава значимо броя им на адаксиалната повърхност на листата, докато при T4 намалява техния брой на същата повърхност (Таблица 9). По-малкият брой устица предполага ограничаване на транспирационния поток, поради което T4 се отличава с по-голяма обща суха биомаса и листна площ в сравнение с TF, а LAR и MLA намаляват слабо при отглеждане на растенията върху засолена почва (Таблица 7).

IV.2.3.2. Влияние на почвеното засоляване върху фотосинтезата

Установено е, че съотношението хлорофил a/ b се променя в по-голяма степен в листата на линията TF, отгледана на засолена почва в сравнение с линията T4 (Фигура 12А).



Фиг. 12 А, Б. Промени в съотношението хлорофил a/ хлорофил b (А) и в съотношението каротеноиди/ хлорофили (Б) в листата на две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва.

Съотношението каротеноиди/хлорофили е приблизително еднакво за листата на двете линии, отгледани на незасолена почва. То се повишава в значително по-голяма степен в листата на TF, отгледана на засолена почва в сравнение с линията T4 (Фигура 12Б). Наблюдаваните промени са типични за растения, подложени на действието на солеви стрес.

В Таблица 10 са представени промените в скоростта на дишането (R_d), нето-фотосинтезата (P_n), интензивността на транспирацията (E), устичната проводимост (g_s) и ефективността на използване на водата (WUE) при двете линии *Paulownia*, отгледани на незасолена и засолена почва. Резултатите показват, че засоляването води до повишаване на скоростта на дишане при TF с 26%, докато при T4 този параметър намалява с 33%. Нето-фотосинтезата намалява при TF с 24%, но промените при T4 са незначителни (около 2%). Интензивността на транспирация се увеличава слабо - при TF с около 5%, а при T4 с около 9%. Устичната проводимост е редуцирана обаче с около 83% при TF и с около 56% при T4. Ефективността на използване на водата намалява и при двете линии, но това намаление е по-голямо при TF (с ~28%) и по-слабо при T4 (с ~10%).

Таблица 10. Промени в скоростта на дишането – R_d [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], нето-фотосинтезата – P_N [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], транспирацията – E [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], устичната проводимост – g_s [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$] и ефективността на използване на водата – WUE [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$] в напълно развити листа от две линии *Paulownia* (*P. tomentosa x fortunei* – TF и *P. elongata x elongata* - T4), отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва.

Линии	R_d	P_n	E	g_s	WUE
TF(1)	1.32±0.23a	10.50±2.09a	2.12±0.23a	20.80±3.45a	4.95
T4(1)	1.91±0.35a	10.20±1.67a	2.09±0.35a	39.00±3.67a	4.88
TF(2)	1.67±0.37a	7.98 ±0.55b	2.23±0.38a	3.48 ±0.26b	3.58
T4(2)	1.28±0.21b	10.00±2.69a	2.28±0.26a	17.20±2.32b	4.38

Резултатите са представени като средни стойности $M \pm SD$, където $n=20-40$. Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$).

При нашите изследвания е установена слаба промяна на P_N при линията T4, но значително намаляване на g_s . Параметрите P_N , g_s и WUE са редуцирани в по-голяма степен при линията TF, а R_d се увеличава в сравнение с линията T4 при засолената почва. При отглеждане на TF при хидропонни условия се наблюдава обаче тенденция на повишаване на P_N и намаляване на WUE , докато интензивността на транспирация и устичната проводимост намаляват плавно с увеличаване на степента на засоляване. При линията T4 също се наблюдава слаба тенденция на повишаване на P_N , но WUE нараства значително в сравнение с TF.

Резултатите от измерване на CO_2 - кривите на нето-фотосинтетичната скорост показват намаляване на наклона на кривите и на платото при растенията от линията TF, отгледана на засолена почва, докато при T4 се установява обратния ефект. Като резултат изчислените стойности на максималната скорост на карбоксилазната реакция ($V_{c,\text{max}}$) и скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт (J_{max}) са редуцирани при линията TF с 11% и 20%. При линията T4 е установено повишаване на същите параметри с 20% и 14%. Скоростта на използване на триозофосфатите (V_{TPU}) намалява при TF с 5%, докато при T4 се увеличава с 15%. CO_2 компенсационният пункт (Γ) е значително по-висок при линията TF, отгледана на засолена почва, докато при T4 намалява слабо, но значимо. Устичното лимитиране на фотосинтезата (S_L) се увеличава както при TF, така и при T4 (Таблица 11).

Таблица 11. Промени в максималната скорост на карбоксилазната реакция – $V_{c,\text{max}}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт – J_{max} [$\mu\text{mol electron m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], скоростта на използване на триозофосфатите – V_{TPU} [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], CO_2 компенсационният пункт – Γ [$\mu\text{mol mol}^{-1}$] и устичното лимитиране на фотосинтезата – S_L [%], получени при анализа на CO_2 -кривите на нето-

фотосинтетичната скорост при две линии на *Paulownia* – TF и T4, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва.

Линии	$V_{c,max}$	J_{max}	V_{TPU}	Γ	S_L
TF1	49.35±3.23a	50.88±4.09a	7.99±0.73a	58.25±4.45a	19.23±1.14a
T41	45.90±4.35a	49.19±5.67a	7.59±0.65a	69.23±5.67a	18.18±1.99a
TF2	43.69±3.37b	40.59 ±3.55b	7.61±0.78a	72.72±6.76b	27.78±1.65b
T42	55.26±5.21b	56.14±2.69b	8.77±0.96b	60.00±5.62b	22.94±1.89b

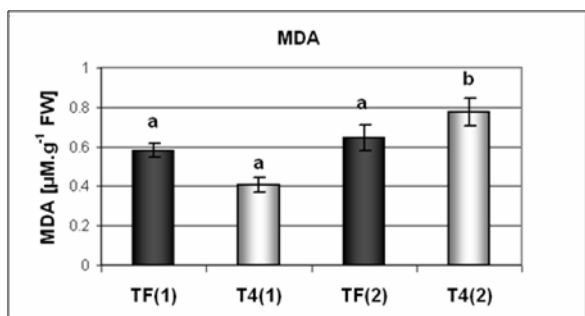
Резултатите са представени като средни стойности $M \pm SE$, където $n=3-5$. Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$).

Анализът на CO_2 - кривите на нето-фотосинтетичната скорост показва, че в листата на линията TF, отгледана на засолена почва, се наблюдава намаляване на карбоксилазната ефективност на Рубиско, намаляване на скоростта на електронния поток посредством електронно-транспортната система за регенериране на рибулозо-1,5-бисфосфата и ограничаване на количеството на наличния неорганичен фосфор (P_i), необходим за протичане на цикъла на Калвин-Бенсон. CO_2 компенсационният пункт (Γ) се увеличава с 25% при линията TF, докато при T4 намалява с 13%, а установените разлики са статистически значими и при двете линии. Резултатите показват, че намаляването на скоростта на нето-фотосинтезата се дължи както на затварянето на устицата (устично лимитиране на фотосинтезата), така и на действието на биохимични фактори (неустично лимитиране на фотосинтезата). Установеното при хидропонните опити повишаване на стойностите на WUE на изследваните линии с увеличаване на концентрациите на NaCl следва да се разглежда като проява на неравномерното затваряне на устицата (patchy stomatal closure) (Naidoo et al., 2002). Това неравномерно затваряне на устицата по време на измерванията води до прекомерно повишаване на стойностите на нето-фотосинтезата, откъдето се повишават и тези на WUE. Обикновено устичното лимитиране на газовата обмяна нараства, след което следва намаляване на скоростта на дишане и на транспирация и повишаване на стойностите на WUE. При засоляване устичните фактори, които лимитират фотосинтезата доминират над неустичните. Отговорът на растенията от *Paulownia* към действието на солеви стрес включва морфологични, биохимични и устични промени, водещи до редукция на C и от там до редукция на растежа на растенията. Тези промени са значително по-силно изразени при линията TF.

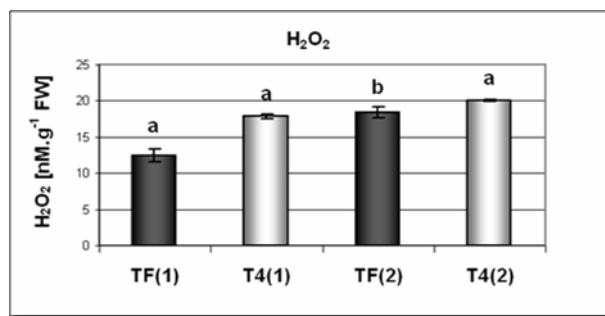
IV.2.3.3. Влияние на почвеното засоляване върху антиоксидантната защита на растенията

На Фигура 13А и Фигура 13Б са представени резултатите от измерване на нивото на MDA и H_2O_2 в листата на TF и T4, отгледани на незасолена и засолена почва. Нивото на MDA се увеличава в по-малка степен в листата на TF в сравнение с T4, докато увеличението в количеството на H_2O_2 е по-голямо при TF и по-малко при T4. Както е известно, повишената акумулация на липидни пероксиди е индикатор за образуване на активни кислородни форми (АКФ). При нашите хидропонни опити със същите линии е установено постепенно повишаване на нивата на MDA, но незначително повишаване на H_2O_2 при TF и по-слабо повишаване на MDA в сравнение с H_2O_2 при T4 с увеличаване на степента на засоляване (от 50 mM до 200 mM NaCl).

А



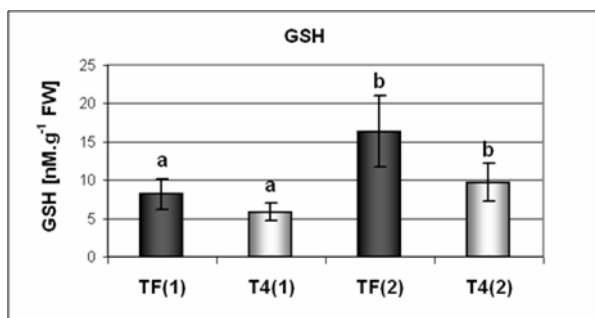
Б



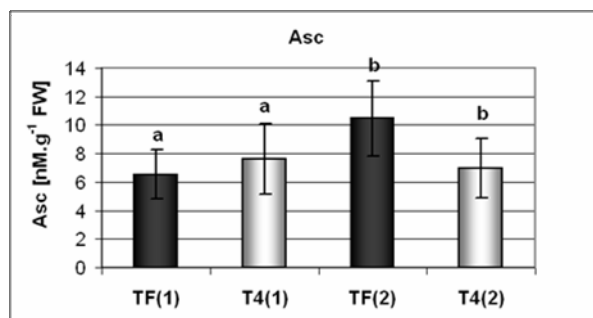
Фигура 13 А, Б. Промени в количеството на MDA и H₂O₂ при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с M±SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

Количеството на нискомолекулните антиоксиданти – глутатион (GSH) и аскорбат (Asc) се увеличава драстично след отглеждане на растенията на засолена почва – Фигура 14 А и Б. Количествата на окисления глутатион (GSSG) и на дехидроаскорбата (DHA) също се променят – Фигура 15А и Б. Количеството на окисления глутатион (GSSG) е по-високо в сравнение с това на редуцирания глутатион (GSH), както в листата на растенията, отгледани на засолена почва, така и в листата на растенията, отгледани на незасолена почва (само втората разлика е статистически значима). Съотношението между количеството на GSH/GSSG обаче нараства с 86.2% за листата на TF и с 116.2% за листата на T4, отгледани на засолена почва. Увеличението на съотношението на количеството аскорбат към количеството дехидроаскорбат (Asc/DHA) е с 71.9% за листата на TF и с 143.6% за листата на T4 (Таблица 12).

А

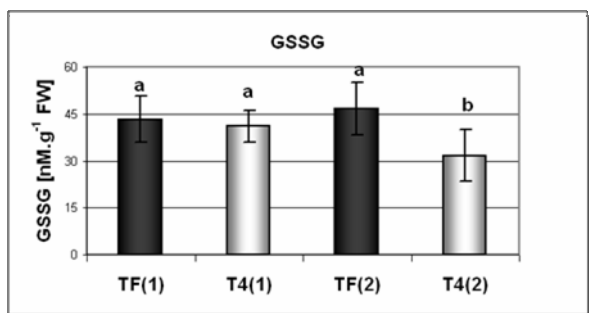


Б

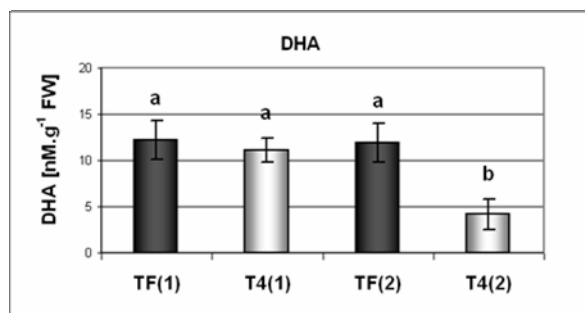


Фигура 14 А, Б. Промени в количеството на GSH и Asc при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с M±SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

А



Б



Фигура 15 А, Б. Промени в количеството на GSSG и DHA при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с M±SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

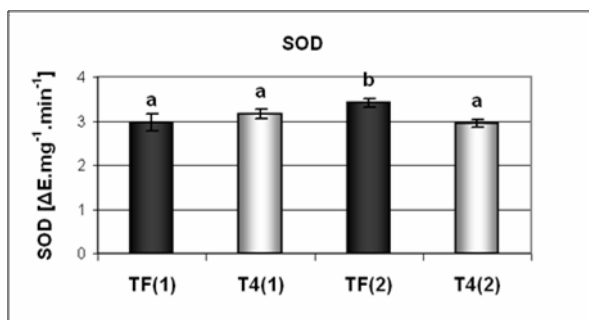
Таблица 12. Промени в съотношенията GSH/GSSG и Asc/DHA при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва.

Линии	GSH/GSSG	Asc/DHA
TF(1)	0.188±0.021a	0.534±0.059a
T4(1)	0.142±0.012a	0.685±0.071a
TF(2)	0.350±0.027b	0.918±0.099b
T4(2)	0.307±0.028b	1.669±0.097b

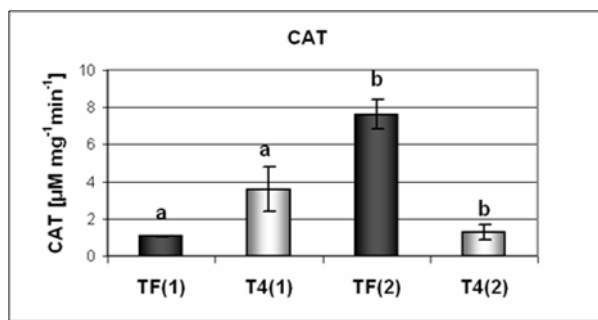
Стойностите са представени с M±SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

Промените в активността на антиоксидантните ензими – супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и гваякол пероксидаза (POX) определят чувствителността на растенията към липидна пероксидация. В нашите опити SOD се увеличава при отглеждане на TF на засолена почва (Фигура 16А), активностите на CAT и POX нарастват в листата на TF, докато CAT намалява, а POX се увеличава при T4 (Фигура 16Б и Фигура 17А). Промените в активностите на супероксид дисмутазата (SOD), каталазата (CAT) и гваякол пероксидазата (POX) са от един и същи порядък, докато активностите на глутатион редуктазата (GR) и аскорбат пероксидазата (APX) се променят в значително по-голяма степен – Фигура 17Б и Фигура 18. Увеличението на тези активности е по-голямо в листата на линията TF.

А

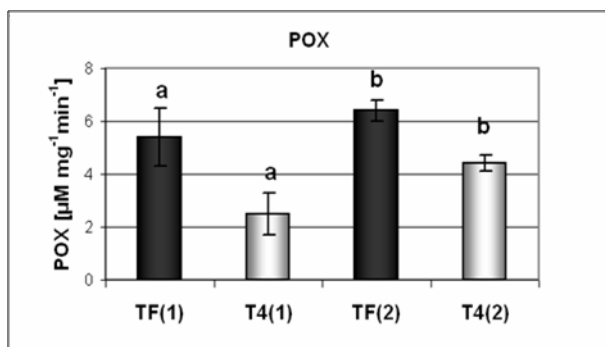


Б

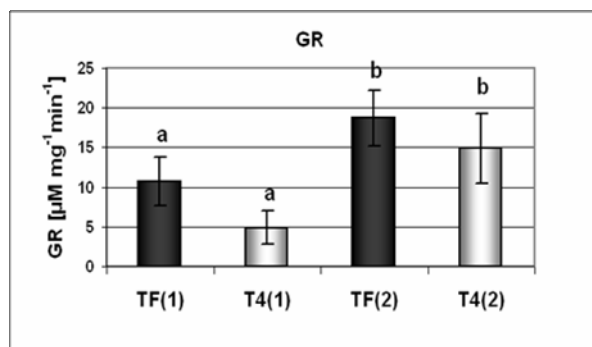


Фигура 16 А, Б. Промени в активността на SOD и CAT при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с M±SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

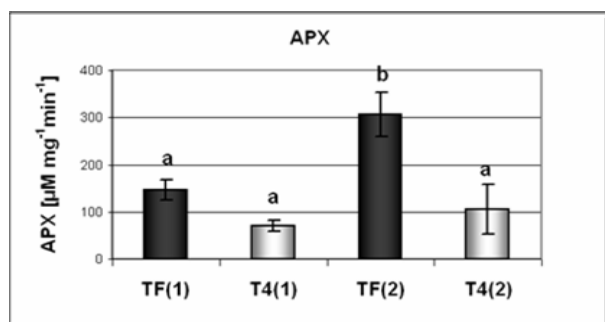
А



Б



Фигура 17 А, Б. Промени в активността на POX и GR при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=4-6$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



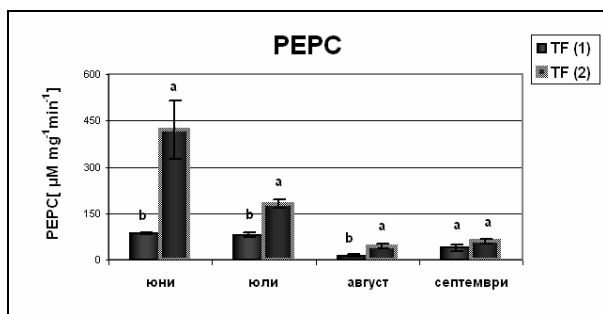
Фигура 18. Промени в активността на APX при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=4-6$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

IV.2.3.4. Влияние на почвеното засоляване върху активността на основни фотосинтетични ензими от C_4 метаболизма

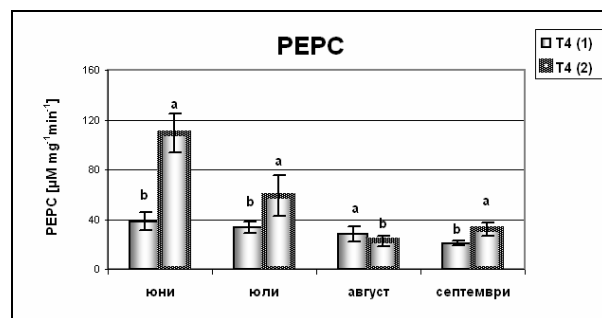
Ролята на C_4 метаболизма при C_3 растенията се разглежда от гледна точка на функционирането на фосфоенолпируват (PEP) системата при реорганизацията на основния метаболизъм в стресови условия. Различни хипотетични схеми са разработени във връзка с действието на CO_2 -концентрация механизъм при C_3 растения, подложени на воден, солеви и температурен стрес. Освен на PEPС, се проучва и ролята на NAD-малат дехидрогеназа (NAD-MDH) и на NADP-малат дехидрогеназа (NADP-MDH) при адаптацията на C_3 растенията при стресови условия. Някои изследователи считат, че PEPС и MDH могат да се използват в качеството на маркери за толерантност към солеви стрес при C_4 растенията, тъй като активността на PEPС се повишава при толерантните генотипове и се намалява при нетолерантните.

Проследяването на хода на промените на PEPС, NADP-MDH и NAD-MDH през втората година показва, че активностите им се повишават в началото на вегетационния период, след което постепенно намаляват към края му (Фигури 19 А, Б; 20 А, Б; 21 А, Б). Изключение в това отношение прави зависимостта на NAD-MDH при линията TF, отгледана на засолена почва в края на вегетационния период (Фигура 21А). Отчетените активности на ензимите за растенията, отгледани на засолена почва са по-високи, особено при TF. Промените в количеството на малата следват същия ход, но стойностите за месеците юли и август, отчетени за линията T4, отгледана на незасолена почва са по-високи в сравнение със засолената (Фигури 22 А, Б).

А

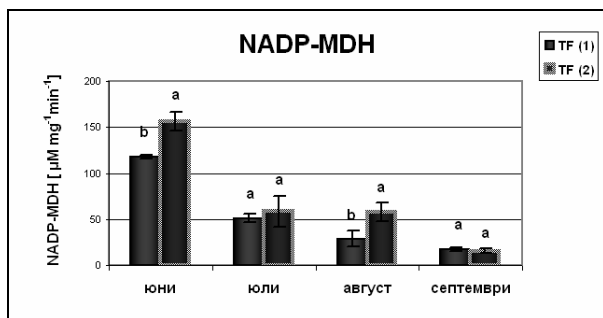


Б

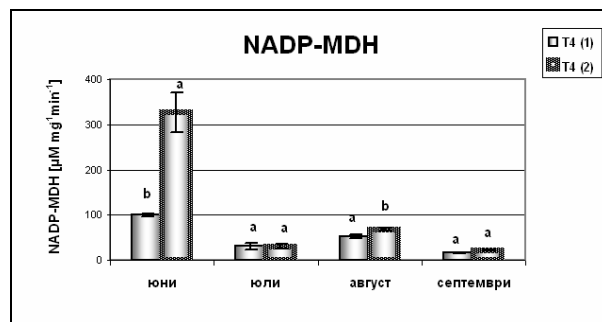


Фигура 19 А, Б. Промени в активността на PEPC в листата на растения от линиите TF (А) и T4(Б) отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва, регистрирани в хода на вегетацията през втората година. Стойностите са представени с M \pm SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

А

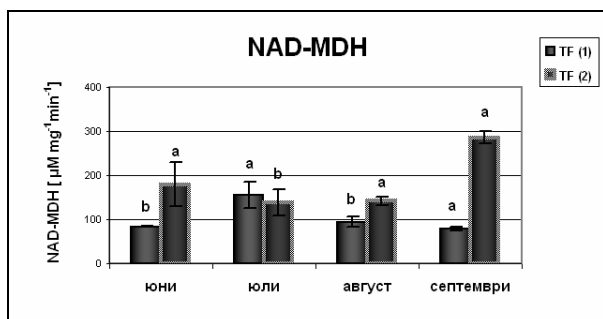


Б

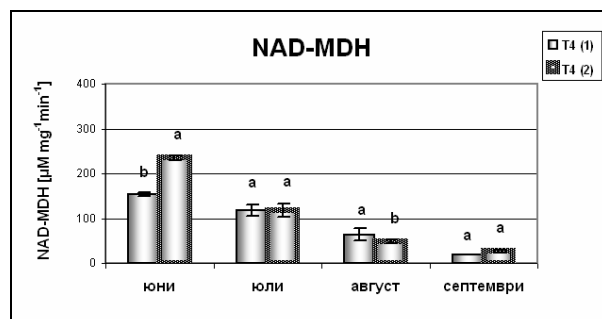


Фигура 20 А, Б. Промени в активността на NADP-MDH в листата на растения от линиите TF (А) и T4(Б) отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва, регистрирани в хода на вегетацията през втората година. Стойностите са представени с M \pm SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

А

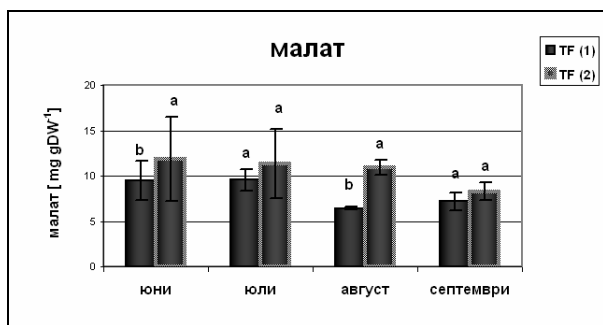


Б

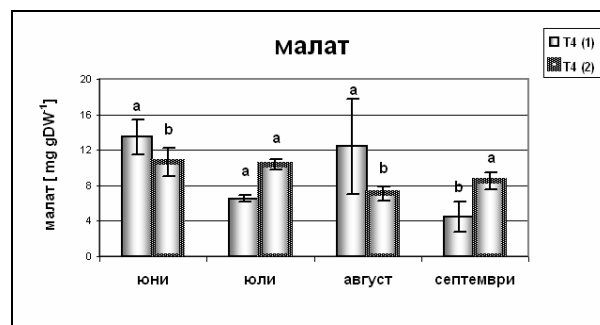


Фигура 21 А, Б. Промени в активността на NAD-MDH в листата на растения от линиите TF (А) и T4(Б), отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва, регистрирани в хода на вегетацията през втората година. Стойностите са представени с M \pm SE (n=4-6). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test (P<0.05).

А



Б



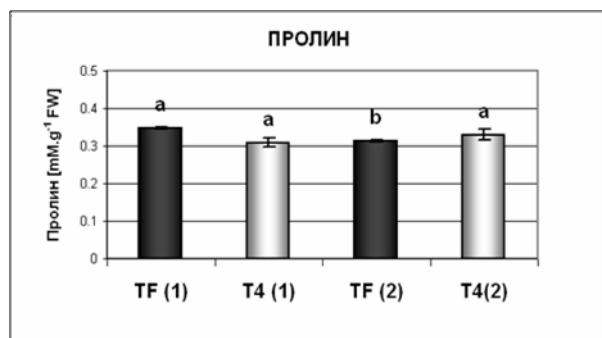
Фигура 22 А, Б. Промени в количеството на малата в листата на растения от линиите TF (А) и Т4(Б), отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва, регистрирани в хода на вегетацията през втората година. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=4-6$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

Ние установяваме, че PEPС и NAD-MDH вероятно изпълняват основна роля в рециклирането на CO_2 , отделен при дишането и синтезата на малата при TF. Тъй като активността на PEPС се променя по-слабо при линията Т4 в сравнение с TF, пултът на разтворимите захари вероятно е по-стабилен в сравнение с този на въглехидратите при Т4. За разлика от TF, при Т4 се установява увеличаване на максималната скорост на карбоксилазната реакция ($V_{c,max}$), скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт (J_{max}) и скоростта на използване на триозофосфатите (V_{TPU}) при засоляване (Таблица 12). Вероятно при линията Т4 се запазва по-висока активност на Rubisco в сравнение с PEPС при засоляване, поради което CO_2 компенсационният пункт (Γ) почти не се променя (Таблица 11), а NADP-MDH играе по-съществена роля в сравнение с NAD-MDH при установяването на CO_2 концентриращ механизъм.

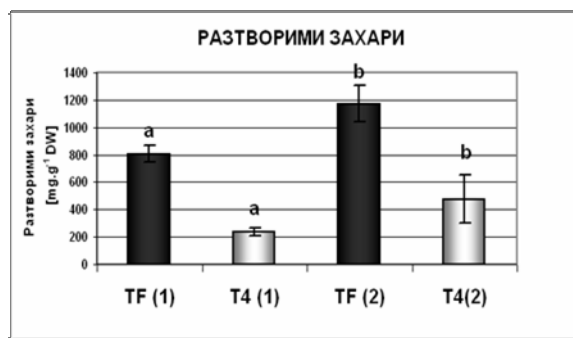
IV.2.3.5. Влияние на почвеното засоляване върху натрупването на вторични метаболити и осмопротектанти

Известно е, че стресовите въздействия инхибират транспорта на фотоасимилати от мезофилните клетки, при което нараства концентрацията на първични продукти от цикъла на Калвин-Бенсон в тях. Според хипотезата на Kougo and Huchzermeyer (2005) по-голямата част от “съвместимите субстанции” се синтезират от първичните продукти на метаболизма на захарите. Ние установихме, че количеството на пролина не се променя съществено при отглеждане на двете линии *Paulownia*, както на незасолена, така и на засолена почва (Фигура 23А), докато количеството на разтворимите захари силно нараства (Фигура 23Б). Това нарастване е по-голямо за листата на Т4 в сравнение с TF. Подобна закономерност е установена при много други растения, но наличните изследвания не дават възможност да бъдат посочени точните механизми, чрез които се подобрява тяхната толерантност към засоляване. Ако сравним с данните от измерване на скоростта на дишане на двете линии, ще видим, че при линията TF този параметър е увеличен с 26%, докато при Т4 R_d намалява с 33% (Таблица 8). Разтворимите захари се използват най-често като субстрати на дишането. Увеличаването на количеството им в листата на Т4 при намалена скорост на дишане показва, че вероятно те не се използват в качеството на субстрати в такава степен, както в листата на линията TF. От друга страна тези резултати са косвено потвърждение на изказаното предположение за по-стабилен пул на разтворимите захари в сравнение с този на въглехидратите при установяване на CO_2 концентриращ механизъм при линията Т4 в условия на засоляване.

А



Б



Фигура 23 А, Б. Промени в количеството на пролина (А) и разтворимите захари (Б) при две линии *Paulownia*, отгледани на незасолена (1) и засолена (2) почва. Стойностите са представени с $M \pm SE$ ($n=4-6$). Стойностите с еднакви букви нямат статистически значими разлики съгласно Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детайлното изясняване на действието на неспецифичните и специфични приспособителни механизми при кратковременно и продължително влияние на солевия стрес може да се извърши успешно след съпоставянето на получените резултати от отглеждането на растенията при хидропонни и оранжерийни условия. Известно е, че отговорът на растенията при кратковременно въздействие на засоляването се изразява в осмотично приспособяване, а едва след по-продължителен период (седмици, месеци) се проявява видово специфичното въздействие на отделни соли (Munns, 2002). При нашите изследвания ние приемаме, че капацитетът за съхраняване на висока биологична продуктивност на селектираните хибридни линии *Paulownia* при отглеждането им на засолени почви е от основно значение за подбора на най-устойчивите от тях за целите на фиторемедиацията. Намалването на количеството на солите посредством фиторемедиация би позволило по-ефективна мелиорация на засолените почви и би дало възможност силно засолени територии да бъдат използвани за производство на дървесина, включително и на биогориво.

За разлика от направените класификации на халофитите за толерантност към засоляване на базата на 50% инхибиране на растежа им при точно определени концентрации на NaCl (Ashraf and O'Leary, 1996) ние считаме, че съотношенията LAR и MLA са по-информативни за характеризиране на растежа при скрининга на петте линии *Paulownia* в условия на засоляване, тъй като тези параметри показват капацитета на растенията за формиране на фотосинтезираща повърхност.

Линията TF се отличава с най-високи стойности за LAR, но с най-ниски стойности за MLA, въпреки нарастания брой листа (Таблица 1). Количеството на акумулирания Na^+ в листата ѝ при 200 mM NaCl е най-високо (Фигура 1), а съотношението K^+/Na^+ най-ниско в сравнение с останалите четири линии (Фигура 3). При TF линията се установява ясно изразена тенденция на повишаване на нето-фотосинтезата (P_N) и най-ниски стойности на ефективността на използване на водата (WUE), докато при линията T4 вторият показател е относително висок (Фигура 4 и Фигура 7). При втората линия са установени средни по стойност изменения на съотношенията LAR, MLA и K^+/Na^+ (Таблица 1 и Фигура 3). Линиите TF и T4

съхраняват относително висока P_N , но имат противоположни по стойност WUE и съотношения K^+/Na^+ в условия на хидропоник, което ги прави подходящ обект за изясняване на особеностите в механизмите за регулиране на фотосинтезата при продължително въздействие на засоляването. При същите линии са установени също слаби вариационни изменения в съотношенията хлорофил а/ хлорофил б и каротеноиди/ хлорофили (Фигура 8 и Фигура 9), подобно на промените в P_N (Фигура 4). За разлика от T4, линията TF се отличава със значително по-ефективна антиоксидантна защита за сметка на участието на предимно ензимни антиоксиданти – каталаза (CAT), гваякол пероксидаза (POX) и глутатион редуктаза (GR).

Ние можем да обобщим получените резултати от почвените опити в три направления: акумулационен потенциал на изследваните линии, морфологични и физиолого-биохимични механизми на адаптация на растенията, подбор на най-подходящи маркери с цел подобряване на селекцията на устойчиви към засоляване линии.

Установено е алкално рН, значителни количества Ca^{2+} и особено Na^+ в биодостъпната фракция от засолена почва в сравнение с незасолена преди засаждане на растенията. K^+ и Mg^{2+} преобладават в същата фракция, поради което съотношението K^+/Na^+ е приблизително 10-кратно по-ниско в сравнение с това на незасолена почва (Таблица 3). След отглеждането на растенията от двете линии *Paulownia* върху незасолена почва за период от 2 години е установено значително намаляване на рН от алкално до слабо кисело и обогатяване на биодостъпната фракция от нея с допълнителни количества Na^+ и K^+ . Съотношението K^+/Na^+ в същата фракция намалява приблизително 3 пъти след прибиране на T4 в сравнение с TF (Таблица 3). Следователно при тези условия на отглеждане и двете линии избягват стреса, като отделят излишните количества на Na^+ и K^+ в ризосферната зона на корените. Пониската коренова пропускливост на растенията за определен тип йони се сочи като основна причина за механизма на изключването им от клетките и тъканите (Collander, 1941).

Установено е, че количеството на Na^+ и K^+ преобладава в корените и на двете линии, отгледани на незасолена почва в сравнение със засолена. Следователно действа фитоекстракционен и фитостабилизационен механизъм. Няма съществени различия в количеството на същите елементи в корените на двете линии, отгледани на засолена почва, поради което съотношението K^+/Na^+ е близко по стойност (Таблица 4).

През първата година от отглеждането на растенията върху незасолена и засолена почва е установено, че количеството на Na^+ и K^+ е по-високо в листата на растенията, отгледани на засолена почва в сравнение с незасолена. Съотношението K^+/Na^+ намалява при линията TF, отгледана на засолена почва в сравнение с незасолена (съответно 74.29 и 62.11), но при линията T4 се повишава (53.7 и 156.32) (Таблица 5). В края на втория вегетационен период Na^+ преобладава в листата на линията T4, отгледана както на незасолена, така и на засолена почва, а съотношението K^+/Na^+ е приблизително двойно за листата на TF (128.59 и 137.50, съответно) в сравнение с това за T4 (67.24 и 57.22). Растенията, които натрупват Na^+ в корените или ги изолират в стъблата се характеризират като „Na изключватели” (Collander, 1941), а солевото изключване се установява при умерено толерантните към солеви стрес видове, заедно с поддържането на високо K^+/Na^+ съотношение (Gorham et al., 1990). При това солевият толеранс при видове, които изключват соли се постига посредством обмен на Na^+ и Ca^{2+} , а не посредством промени в осмотичния потенциал, тъй като адсорбцията на Ca^{2+} в мембраните на кореновите клетки води до намаляване на проникването на едновалентни катиони (Munns et al., 1983). При нашите опити се наблюдава

акропетален градиент в разпределението на алкалните метали между биодостъпната фракция, корените и листата – най-ниски са количествата на тези метали в листата. Единствено при Ca^{2+} се наблюдава нарушение в градиента на разпределение на йоните (виж Таблица 3, 4 и Таблица 6). Според Mengel and Kirkby, (2001) причината за появата на вътреклетъчен йонен дисбаланс може да бъде както действието на катионите - K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , така и действието на анионите - NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . Установените концентрации на K^+ в напълно развитите листа на линиите при нашите опити са високи, а тези на Na^+ - ниски (Таблица 6). Съгласно изказаната от Mengel and Kirkby (2001) хипотеза съхраняването на K^+ хомеостаза е от съществено значение за експанзията на листата. При нашите опити не се наблюдава корелация между измерената листна площ и динамиката на промени в количеството на Na^+ и K^+ , както и на съотношението K^+/Na^+ в хода на вегетацията. Освен съхраняването на K^+ хомеостаза вероятно и други фактори (като например концентрацията на PO_4^{3-} в цитоплазмата) са от съществено значение (Koogo and Stelzer, 1988).

Ние установихме значително повишаване на съотношенията на суха биомаса на корени към надземни части ($\text{DW}_{\text{root/shoot}}$), LAR и MLA при линията TF, отгледана на засолен почва, независимо от намалената обща суха биомаса и броя на листата през втората година. При тази линия опадването на по-старите листа е ясно изразено, което може да се разглежда като приспособителен механизъм за отстраняване на излишните количества Na^+ , акумулирани в тях. При линията T4 намаляването на съотношенията LAR и MLA е слабо поради това, че общата суха биомаса и броя на листата се увеличава в края на втория вегетационен период (Таблица 7). Тази линия се отличава и с формиране на по-мощна коренова система в сравнение с линията TF, особено в условия на засоляване.

Растенията от TF се отличават с по-голяма дебелина на листната петура, горен, долен епидермис, палисаден и особено гъбчест мезофил, както и междуклетъчно пространство в гъбчестия мезофил в сравнение с тези от T4, отгледани на незасолена почва. Тези параметри намаляват при отглеждане на растения от двете линии на засолен почва, с изключение на дебелината на гъбчестия мезофил при T4, която се увеличава, но установените разлики са незначими. При линията TF намалява значително и междуклетъчното пространство в гъбчестия мезофил, докато при линията T4 намаляването е незначително (Фигура 10, Таблица 8).

Резултатите от отчитането на гъстотата на устицата показват, че техният брой е по-голям на долния в сравнение с горния епидермис и при двете линии. При отглеждане на растенията от TF върху засолен почва, броят на устицата нараства по-значително върху горния епидермис. За линията T4 увеличението на броя върху долния епидермис е слабо, но при горния този брой намалява (Фигура 11А, Б; Таблица 9). Доказано е, че различията в гъстотата на устицата директно влияят върху продукцията на биомаса. Нашите резултати показват, че линията T4, отгледана на незасолена почва се отличава с по-голям брой устица както на адаксиалната, така и на абаксиалната повърхност на листата в сравнение с линията TF. Засоляването предизвиква различни промени – при TF се увеличава значимо броя им на адаксиалната повърхност на листата, докато при T4 намалява техният брой на същата повърхност (Таблица 9). Затова T4 се отличава с по-голяма обща суха биомаса и листна площ в сравнение с TF, а LAR и MLA намаляват слабо при отглеждане на растенията върху засолен почва (Таблица 7).

В сравнение с хидропонните опити, количеството на пластидните пигменти се променя много по-съществено в листата на растенията, отгледани на засолен почва. Съотношенията хлорофил а/ б и каротеноиди/ хлорофили нарастват в по-голяма степен

в листата на линията TF, отгледана на засолен почва в сравнение с линията T4 (Фигура 12 А, Б). Според някои изследователи увеличаването на хлорофилното съдържание може да се използва като биохимичен маркер за степен на толерантност, но според други количеството на пигментите не винаги е свързано с толерантността. Установено е намаляване на параметрите P_N , g_s и WUE в по-голяма степен при линията TF в сравнение с T4, а скоростта на дишането (R_d) се увеличава в сравнение с линията T4 при засолената почва (Таблица 10). Получените резултати за скоростта на P_N , E и WUE корелират добре с настъпилите незначими изменения в дебелината на листната петура, палисадния, гъбчестия мезофил и междуклетъчното пространство в гъбчестия мезофил в листата на линията T4 в сравнение с линията TF, отгледани на засолен почва (Фиг. 10, Таблицы 8 и 10). При анализа на CO_2 - кривите на нето-фотосинтетичната скорост е установено намаляване на стойностите на максималната скорост на карбоксилазната реакция ($V_{c,max}$), скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт (J_{max}) и скоростта на използване на триозофосфатите (V_{TPU}) при TF, докато при T4 тези параметри се увеличават в резултат на засоляването. CO_2 компенсационният пункт (Γ) е значително по-висок при линията TF, отгледана на засолен почва, докато при T4 намалява. Устичното лимитиране на фотосинтезата (S_L) се увеличава и при двете линии (Таблица 11). Това показва, че в листата на линията TF, отгледана на засолен почва, се наблюдава намаляване на карбоксилазната ефективност на Рубиско, намаляване на скоростта на електронния поток посредством електронно-транспортната система за регенериране на рибулозо-1,5-бисфосфата и ограничаване на количеството на наличния неорганичен фосфор (P_i), необходим за протичане на цикъла на Калвин-Бенсон, а намаляването на скоростта на нето-фотосинтезата се дължи както на затварянето на устицата (устично лимитиране на фотосинтезата), така и на действието на биохимични фактори (неустично лимитиране на фотосинтезата). Установените морфологични, биохимични и устични промени при действие на солеви стрес, водещи до редукция на C и от там до редукция на растежа на растенията от линията TF са значително по-големи в сравнение с линията T4. При засоляване устичните фактори, които лимитират фотосинтезата доминират над неустичните, а намалената устична проводимост се разглежда като регулаторен механизъм, посредством който се ограничава акумулирането на големи количества соли при растения с ограничен капацитет за тяхната компартментализация (Robinson et al., 1997). При TF намаляването на общото сухо тегло, броя на листата и тяхното сухо тегло е по-значително през втората година (Таблица 7), въпреки по-слабата акумулация на Na^+ и повишеното количество на жизнено важните Ca^{2+} и K^+ в тях. Съотношението K^+/Na^+ се повишава почти двойно в листата на същата линия (Таблица 6). Според Erdal and Çakırlar (2014) по-високите стойности на това съотношение определят по-толерантния към засоляване генотип. Най-често високата устойчивост към действието на неблагоприятни фактори представлява обаче съчетание от действието на механизми за избягване на стреса и на толерантност към стрес. В сравнение с T4 линията TF реагира по-бързо на промените в околната среда чрез отделяне на излишното количество Na^+ в коренообитаемата зона, опадване на по-старите листа, които съдържат по-големи количества Na^+ и съхраняване на K^+ хомеостаза до края на вегетационния период (Таблица 3). При тази линия се включват протекторни механизми, които осигуряват по-добра антиоксидантна защита по време на стрес. Установени са високи стойности на антиоксидантните ензими: супероксид дисмутаза (SOD) – Фигура 16А, каталаза (CAT) – Фигура 16Б, гваякол пероксидаза (POX) – Фигура 17А, глутатион редуктаза (GR) – Фигура 17Б, аскорбат пероксидаза (APX) – Фигура 18, както и в количеството на нискомолекулните антиоксиданти – глутатион (GSH) – Фигура 14А, аскорбат (Asc) – Фигура 14Б, феноли и флавоноиди. При изучаване на антиоксидантната защита на растенията от TF при

почвени условия се оказва, че в неутрализацията на излишните количества H_2O_2 участват както ензимни, така и неензимни процеси, за разлика от хидропонните опити, където преобладават ензимните процеси.

Във връзка с проучванията за участието на C_4 метаболизма при C_3 растенията са установени промени в активностите на фосфоенолпируват карбоксилазата (PEPC), NAD-малат дехидрогеназата (NAD-MDH) и на NADP-малат дехидрогеназата (NADP-MDH) при адаптацията на растенията от двете линии към засоляване. Ние установихме, че активностите и на трите ензима са значително по-високи в началото на вегетационния период при растенията, отгледани на засолена почва (Фигури 19 А и Б, 20 А и Б, 21 А и Б), а PEPC и NAD-MDH изпълняват основна роля в рециклирането на CO_2 , отделен при дишането и синтезата на малата при TF (Фигура 21 А и Б). Освен като осмолит, малатът може да бъде използван и като източник на CO_2 и редуциращи еквиваленти (Crecelius et al., 2003), а NAD(P)-зависимите дехидрогенази, които рециклират кофактора NAD(P)H, могат да бъдат ключови ензими в антиоксидантната защита на растенията в условия на засоляване, тъй като аскорбат-глутатионовия цикъл се нуждае от NAD(P)H (Valderrama et al., 2006). Тъй като активността на PEPC се променя по-слабо при T4 в сравнение TF, ние считаме, че при първата линия се запазва по-висока активност на Rubisco в сравнение с PEPC при отглеждане на засолена почва, поради което CO_2 компенсационният пункт (Γ) намалява слабо (Таблица 11). От друга страна PEPC може да се конкурира с ензимите, катализиращи първоначалните етапи от шикиматния път за PEP, който играе ролята на прекурсор в него. По такъв начин промените в активността на PEPC могат да влияят не само върху първичния метаболизъм, но и да определят количеството на образувалите се вторични продукти.

Установено е силно нарастване на количеството на разтворимите захари и при двете линии под действие на солеви стрес (Фигура 23Б). Разтворимите захари се използват най-често като субстрати на дишането, но увеличаването на количеството им в листата на T4 при намалени стойности на R_d показва, че вероятно те не се използват в качеството на дихателни субстрати в такава степен, както в листата на линията TF, където R_d се увеличава (Таблица 10). От друга страна по-слабата активност на PEPC, установена в листата на T4 в сравнение с TF косвено показва, че разходът на разтворими захари за синтезата на PEP посредством гликолиза вероятно също е намален.

Изучаването на адаптивните възможности на селектирани линии *Paulownia* при продължително действие на засоляването е добър подход за определяне на техния акумулационен потенциал с оглед на бъдещото им практическо приложение. Установяването на система от морфологични, физиологични и биохимични маркери за характеризирание на механизмите на устойчивост на изследваните линии е от съществено значение за използването им в качеството на биомонитори в силно засолените региони.

Сравнявайки отговорите на двете изследвани линии *Paulownia* става ясно, че TF линията е по-чувствителна към засоляване в сравнение с T4 линията.

VI. ИЗВОДИ

1. Кратковременното влияние на солевия стрес повишава в най-голяма степен количеството на акумулирания Na^+ в листата, отношението обща листна площ/ обща суха биомаса (LAR), скоростта на нето-фотосинтезата (P_N) и антиоксидантната защита, но понижава отношенията K^+/Na^+ , обща листна площ/ брой листа (MLA), устичната проводимост (g_s) и ефективността на използване на водата (WUE) при линията TF. При линията T4 са установени средни по стойност изменения на K^+/Na^+ , LAR, MLA, слаба антиоксидантна защита и относително високи P_N и WUE в условия на хидропоник.

2. Установено е, че продължителното влияние на солевия стрес предизвиква значително по-голямо натрупване на Na^+ и K^+ в корените в сравнение с надземните части на линиите TF и T4. Следователно действа фитоекстракционен и фитостабилизационен механизъм. С изключение на Ca^{2+} , в разпределението на металите между биодостъпната фракция от почвите, корените и листата се установява акропетален градиент.

3. При отглеждане на растенията на засолена почва линията T4 се отличава със слаби изменения в структурата на листата и намаляване на броя на устицата на адаксиалната им повърхност, както и на растежните показатели - LAR и MLA, в сравнение с линията TF. Установените изменения в пигментния състав и скорост на нето-фотосинтезата (P_N) са незначими, но устичната проводимост (g_s), скоростта на дишането (R_d) и ефективността на използване на водата (WUE), характеризиращи нейната газова обмяна, намаляват значително.

4. Скоростта на фотосинтезата на двете линии – TF и T4 при висока степен на засоленост зависи от действието на морфологични, биохимични и устични фактори. Линията TF реагира с по-значително намаляване на P_N и g_s , както и на максималната скорост на карбоксилазната реакция ($V_{c,max}$), скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт (J_{max}) и скоростта на използване на триозофосфатите (V_{TRU}), но с по-голямо увеличение на CO_2 -компенсационния пункт (Γ) и на устичното лимитиране на фотосинтезата (S_L) в сравнение с T4. Установяването на CO_2 -концентрационен механизъм и при двете линии се отличава с по-високи стойности на активностите на фосфоенолпируват карбоксилаза (PEPC), NAD-малат дехидрогеназа (NAD-MDH) и NADP-малатдехидрогеназа (NADP-MDH) в началото на вегетационния период в сравнение с края.

5. Линията TF притежава по-добра антиоксидантна защита в сравнение с T4, както при отглеждането на растенията в условия на хидропоник, така и при оранжерийни условия. За разлика от хидропонните опити, където преобладават ензимните процеси, при почвените участват както ензимни, така и неензимни процеси на обезвреждане на H_2O_2 .

6. Устойчивостта на изследваните линии TF и T4 се определя от съчетаването на механизми за избягване на стреса – екскреция на излишните количества Na^+ в коренообитаемата зона, опадване на по-старите листа, които съдържат по-големи количества Na^+ и съхраняване на K^+ хомеостаза до края на вегетационния период, с

механизми на толерантност към стрес – антиоксидантна защита, по-силно изразени при линията TF.

7. T4 линията е значително по-устойчива към засоляване в сравнение с TF линията, поради което следва да бъде предпочетена за фиторемедиация на засолени почви.

VII. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е установено наличието на фитостабилизационен и фитоекстракционен механизъм на разпределение на алкалните метали в различните части на растения от две линии *Paulownia* – TF и T4, отгледани на незасолена и засолена почва. Доказано е, че при отглеждането на тези линии на незасолена почва растенията екскретират голяма част от Na^+ и K^+ в ризосферната зона на корените като намаляват рН на биодостъпната фракция.

2. За първи път е установена връзка между намаляването на дебелината на листната петура, както и на промените в броя на устицата на адаксиалната и абаксиална повърхност на листата с регистрираните изменения в интензивността на газовата обмяна и водния режим (скорост на дишане и нето-фотосинтеза, интензивност на транспирация, устична проводимост и ефективност на използване на водата) на растенията от линиите TF и T4 в следствие на повишената степен на засоляване на почвата. В качеството на стрес маркери могат да се използват ензимите - супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), гваякол пероксидаза (POX), глутатион редуктаза (GR), аскорбат пероксидаза (APX), както и нискомолекулните антиоксиданти - рециран глутатион (GSH), окислен глутатион (GSSG), аскорбат (Asc), дехидроаскорбат (DHA).

3. Оценен е акумулационният потенциал и толерантността на изследваните хибридни линии към засоляване. Доказано е, че устойчивостта на двете линии към засоляване се дължи на съчетаването на механизми за избягване на стреса и толерантност към стрес, по-силно изявени при линията TF.

4. Приложена е система от подходящи физиологични и биохимични маркери за характеризирание на механизмите на устойчивост на две линии *Paulownia* – TF и T4, селектирани от Био Трии ООД с оглед на бъдещото им приложение за ремедиация на засолени почви.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Ivanova, K.**, K. Miladinova, T. Georgieva, Y. Markovska . 2013. Influence of salt stress on some physiological parameters of two *Paulownia* lines, In: Seminar of Ecology-2013, 25-26 April 2013, Sofia, Proceedings, 55-61
2. Miladinova, K., T. Georgieva, **K. Ivanova**, M. Geneva, Y. Markovska. 2013. The salinity effect on morphology and pigments content in three *Paulownia* clones grown *ex vitro*, Bulg. J. Agr. Sci., 19(2), 52-56. IF-0.136
3. **Ivanova, K.**, K. Miladinova, T. Georgieva, Y. Markovska. 2014. A possible role of some antioxidative enzymes in tolerance of *Paulownia* to NaCl, Bulg. J. Agr. Sci., 20 (Suppl. 1), 37-40. IF-0.136
4. **Ivanova, K.**, N. Tzvetkova, T. Georgieva, Y. Markovska. 2014. Photosynthesis and growth responses of five *Paulownia* lines to salt stress, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 67(8), 1101-1106. IF-0.211
5. **Ivanova, K.**, V. Dimitrova, T. Georgieva, Y. Markovska. 2015. Effect of soil salinity on growth, gas exchange and antioxidant defense of two *Paulownia* lines, Genetics and Plant Physiol., vol. 4 (3-4), 163-173.
6. **Ivanova, K.**, T. Georgieva, Y. Markovska. 2015. A possible role of C4 photosynthetic enzymes in tolerance of two *Paulownia* hybrid lines to salinity, Годишник на СУ „Св. Кл. Охридски” (in press)

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

7. Miladinova, K., **K. Ivanova**, T. Georgieva, M. Geneva, Y. Markovska. 2012. Influence of salt stress on *ex vitro* growth and antioxidative response of two *Paulownia* clones, Proceedings of the 4th Balkan conference “Science-Education-Art”, Blagoevgrad, 29-30 September 2012. В: Годишник „Наука-Образование-Изкуство”, Съюз на учените – Благоевград, том 6, част I, 356-364.
8. **Ivanova, K.**, S. Anev, N. Tzvetkova, T. Georgieva, Y. Markovska. 2015. Influence of salt stress on stomatal, biochemical and morphological factors limiting photosynthetic gas exchange in *Paulownia elongata* x *fortunei*, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 68(2), 217-224. IF-0.211

IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- Миладинова – Георгиева, К.** 2014. Растеж и акумулационен потенциал на две линии *Paulownia*, отглеждани на замърсена с тежки метали почва, Автореферат, СУ „Св. Кл. Охридски”, София, 1-36 стр.
- Реферативна база данни за почвите в България. Селскостопанска Академия, Институт по почвознание „Н. Пушкарров”, София, 2009.
- 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.
- Ashraf, M.** 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants, *Flora*, 199, 361-376.
- Ashraf, M., O'Leary, J. W.** 1996. Responses of some newly developed salt-tolerant genotypes of spring wheat to salt stress. 1. Yield components and ion distribution, *J. Agron. Crop Sci.*, 176, 91– 101.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D.** 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Cramer, G.R.** 2003. Differential effects of salinity on leaf elongation kinetics of three grass species, *Plant Soil*, 253, 233-244.
- Collander, R.** 1941. Selective absorption of cations by higher plants, *Plant Physiol.*, 16, 691– 721.
- Crecelius, F., Streb, P., Feierabend, J.** 2003. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves, *J. Exp. Bot.*, 54: 1075-1083.
- 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.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- 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.
- Erdal, S.Ç., Çakırlar, H.** 2014. Impact of salt stress on photosystem II efficiency and antioxidant enzyme activities of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars, *Turk. J. Biol.*, 38, 549-560.
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D.** 1982. Stomatal conductance and photosynthesis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33, 317-345.
- Farquhar, G., Von Caemmerer, S., Berry, J.** 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species, *Planta*, 149, 78-90.
- 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.
- Geissler, N., Hussin, S., Koyro, H.-W.** 2009. Elevated atmospheric CO₂ concentration ameliorates effects of NaCl salinity on photosynthesis and leaf structure of *Aster tripolium* L., *J. Exp. Bot.*, 60, 137-151.
- Gorham, J., Wyn Jones, R.G., Bristol, A.** 1990. Partial characterization of the trait for enhanced K⁺ - Na⁺ discrimination in the D genome of wheat, *Planta*, 180, 590-597.
- Griffith O.W.**, 1980. Determination of glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106, 207-212.
- Gutmann, J., Wahlefeld, A.W.** 1974. L-(-)-malate. Determination with malate dehydrogenase and NAD, IN: Methods of enzymatic analysis (Ed. Bermeier, H.W.), pp 1585-1589, Verlag Chemie, Weinheim.
- Heath R.L., Packer L.**, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 189–190.
- Hunt R.**, 1982. Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, London.
- Jeschke, W.D., Hartung, W.** 2000. Root-shoot interactions in mineral nutrition, *Plant Soil*, 226, 57–69.
- Jessup W., Dean R.T., Gebicki J.M.**, 1994. Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Method Enzymol.*, 233, 289-303.
- Koyro, H.-W., Stelzer, R.** 1988. Ion concentrations in the cytoplasm and vacuoles of rhizodermal cell from NaCl treated Sorghum, *Spartina* and *Puccinellia* plants, *J. Plant Physiol.*, 133, 441-446.

- Koyro, H.-W., Huchzermeyer, B.** 2004. Ecophysiological needs of the potential biomass crop *Spartina townsendii* Grov., Tropical Ecology, 45, 123-139.
- Koyro, H.-W., Huchzermeyer, B.** 2005. Recent developments in stress tolerance breeding in maize. In: (Ed. M. Pessaraki) Handbook of Plant and Crop Stress, 3rd edition, pp 1051-1093, CRC Press, Taylor&Fransis Group.
- Lichtentaler N.K.**, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymol., 148, 350-383.
- 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.
- Marklund, S., Marklund, G.** 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, Eur. J. Biochem., 47, 469-474.
- Maathuis, F., Amtmann, A.** 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios, Ann. Bot., 84, 123-133.
- Mengel, K., Kirkby, E.A.** 2001. Principles of plant nutrition, Kluwer Academic Publisher, , Dordrecht, The Netherlands.
- Michalak, A.** 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, Pol. J. Environm. Study, 15, 523-530.
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress, Plant Cell Environ., 25, 239– 250.
- Munns, R., Greenway, H., Kirst, G.O.** 1983. Halotolerant eukaryotes. In: Encyclopedia of Plant Physiology (New Series, Vol. 12C), (Eds. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond C.B., Ziegler, H.H.), pp 59–135, Springer-Verlag, Berlin.
- Naidoo, G., Tuffers, A.V., Willert, D.J.** 2002. Changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence characteristics of two mangoves and a mangrove associate in response to salinity in the natural environment, Trees, 16, 140-146.
- Nakano Y., Asada K.**, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol., 22, 867-880.
- Neves-Piestun, B.G., Bernstein, N.** 2001. Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity, Plant Physiol., 125, 419-428.
- 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.
- Robinson, M.F., Very, A., Sanders, D., Mansfield, T.A.** 1997. How can stomata contribute to salt tolerance? Ann. Bot., 80, 387-393.
- Romanova, A.K.** 1980. Biochemical methods of the study of autotrophy in microogganisms, Nauka, Moscow, pp 160.
- Scheibe, R., Stitt, M.** 1988. Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, QA reduction and O₂ evolution in spinach leaves, Plant Physiol. Biochem., 26, 473-481.
- 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.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A. et al.** 2006. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants, Plant Cell Environ., 29,1449-1459.
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D.** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, Planta, 153, 376-387.
- 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. *mairei* 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.