

## STRESS “ÔXY HÓA” VÀ PHẢN ỨNG BẢO VỆ CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG DT84 ĐỐI VỚI CHÌ

Mai Văn Chung\*, Trần Ngọc Toàn

*Khoa Sinh học, Trường đại học Vinh*

*Email\* : chung.uni@gmail.com/chungmv@vinhuni@edu.vn*

Ngày gửi bài: 14.01.2015

Ngày chấp nhận: 22.07.2015

### TÓM TẮT

Ion  $Pb^{2+}$  đã gây stress “ôxy hóa” ở rễ cây đậu tương DT84 (*Glycine max* (L.) Merr. ‘DT84’) với sự cảm ứng tổng hợp mạnh mẽ các dạng ôxy hoạt hóa nội sinh như hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), gốc tự do superoxide ( $O_2^-$ ) sau khi  $Pb^{2+}$  tác động 6 - 12 giờ. Cường độ giải phóng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  là khác nhau dưới ảnh hưởng của các nồng độ  $Pb^{2+}$  khác nhau: 0,1mM ; 0,5mM và 1,0mM. Sự tăng lên về hàm lượng các dẫn xuất của axit thiobarbituric (Thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) - sản phẩm của quá trình peroxide hóa lipid màng, cùng với tỷ lệ tổn thương tế bào lớn (13,89-25,03%) là hậu quả của stress “ôxy hóa”. Các enzym chống ôxy hóa superoxide dismutase (SOD) và catalase (CAT) có hoạt độ cao đã làm giảm lượng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  sau 24 giờ chịu tác động của  $Pb^{2+}$ , góp phần kiểm soát stress “ôxy hóa” ở rễ đậu tương DT84.

Từ khóa: CAT, cây đậu tương, chì, hydrogen peroxide, stress “ôxy hóa”, superoxide, SOD.

### Lead-Induced Oxidative Stress and Defense Response of Soybean ‘DT84’

#### ABSTRACT

Oxidative stress in root of soybean [(*Glycine max* (L.) Merr.] cv. DT84’ was induced by exposure to  $Pb^{2+}$  ion. The reactive oxygen species (ROS) products such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) were rapidly produced 6-12 hours after treatment with  $Pb^{2+}$ . The enhancement of the ROS was closely dependent upon concentrations of  $Pb^{2+}$ . An increase in content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) - product of membrane lipid peroxidation, and the high percentage of injury (13.89-25.03%) indicated that the cellular damage was resulted from oxidative stress. The induction of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in roots of soybean cv. DT84 as the defense response of soybean via these antioxidative enzymes reduced the concentration  $H_2O_2$  and  $O_2^-$  24 hours following  $Pb^{2+}$  treatment, therefore, contributing to control oxidative stress in soybean roots.

Keywords: CAT, hydrogen peroxide, lead, oxidative stress, soybean, superoxide, SOD.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Là kim loại nặng phổ biến trong đất, chì (Pb) không bị phân hủy mà có xu hướng tích lũy, xâm nhập và gây độc cho thực vật. Một trong những tác động điển hình của Pb đối với cây trồng là gây stress “ôxy hóa” với sự hình thành mạnh mẽ các dạng ôxy hoạt hóa (reactive oxygen species - ROS) nội sinh như hydrogen peroxide -  $H_2O_2$ , các gốc tự do superoxide -  $O_2^-$

và hydroxyl -  $HO^\cdot$  (Wojtaszek, 1997; Bhattacharjee, 2005; Malecka et al., 2009). Sinh tổng hợp ROS thường gắn liền với các cơ chế cảm ứng kích thích những phản ứng của thực vật như: nhận diện yếu tố tác động, tăng cường độ bền của vách tế bào, khởi động các con đường tín hiệu, kích hoạt biểu hiện của gen và protein có chức năng bảo vệ,... (Mittler et al., 2004; Maffei et al., 2007; Radville et al., 2011). Tuy nhiên, ROS cũng gây độc đối với tế bào sống.

Hàm lượng ROS cao thường làm rối loạn tính thấm của màng, đồng thời gây nên những biến đổi khó phục hồi đối với các thành phần quan trọng như lipid, protein, axit nucleic..., thậm chí gây chết tế bào (Ahmad et al., 2008).

Để hạn chế những thiệt hại do stress “ôxy hóa”, thực vật có những cơ chế kiểm soát, điều chỉnh hàm lượng ROS phù hợp, trong đó có sự tham gia của các enzym chống ôxy hóa như superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT, peroxidase - POX và ascorbate peroxidase - APX (Maffei et al., 2007; Ahmad et al., 2008). Các enzyme này vừa duy trì sinh tổng hợp ROS để tăng cường khả năng chống chịu trước tác động từ môi trường ngoài, đồng thời kiểm soát, giảm thiểu độc tính của ROS đối với các yếu tố cấu trúc và quá trình sống diễn ra bên trong tế bào (Zhu-Salzman et al., 2004). Phản ứng bảo vệ của thực vật đối với stress “ôxy hóa” do kim loại nặng gây nên đã được ghi nhận ở đậu Hà Lan khi chịu tác động của Cd (Rodriguez-Serrano et al., 2009) hay ở cà chua dưới ảnh hưởng của Cu (Rueda et al., 2011). Đối với Pb, một số thực nghiệm trên đậu Hà Lan (Malecka et al., 2001), đậu xanh (Hassan and Mansoor, 2014) hay lúa mì (Dey et al., 2007) đều đã ghi nhận, các loài thực vật khác nhau có những cơ chế bảo vệ không giống nhau sau khi kim loại nặng này gây bùng nổ sinh tổng hợp ROS.

DT84 (*Glycine max* (L.) Merr. ‘DT84’) là giống đậu tương đang được trồng phổ biến hiện nay ở nhiều địa phương vì cho năng suất cao, chịu nóng, chống đổ tốt, có tính kháng cao đối với một số bệnh hại. Tuy nhiên, cơ sở dữ liệu khoa học về khả năng chống chịu, sức đề kháng của giống đậu tương DT84 trước điều kiện sống bất lợi đang còn ít thông tin. Do đó, việc đánh giá, bổ sung những dẫn liệu mới về cơ chế bảo vệ của cây trồng này là thực sự cần thiết.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên giống đậu tương DT84 (*Glycine max* (L.) Merr. ‘DT84’). Hạt giống được cung cấp bởi Công ty cổ phần giống cây trồng Nghệ An.

Kim loại nặng chì (Pb) dùng để tác động đến cây đậu tương ở dạng ion  $Pb^{2+}$  của muối chì nitrat -  $Pb(NO_3)_2$ .

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Hạt giống được khử trùng kép bởi etanol 70° và  $HgCl_2$  0,01%, rồi ủ trong các đĩa petri có đủ độ ẩm, đặt trong tối ở nhiệt độ thích hợp. Sau 48 giờ, những hạt nảy mầm tốt được lựa chọn trồng trong dung dịch dinh dưỡng Hoagland.

Sau 10 ngày, bổ sung riêng rẽ vào môi trường nuôi cây muối chì  $Pb(NO_3)_2$  ở các nồng độ ion  $Pb^{2+}$ : 0,1mM; 0,5mM và 1,0mM. Công thức đối chứng không bổ sung  $Pb^{2+}$ . Tất cả các công thức được bố trí trong điều kiện nhiệt độ 23-25°C, độ ẩm 70%, cường độ chiếu sáng 110 - 120  $\mu\text{mol photon.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , thời gian chiếu sáng 14 giờ liên tục/ngày.

Rễ đậu tương trong các công thức thí nghiệm được thu cẩn thận (để tránh tổn thương cơ học) vào các thời điểm 0, 6, 12, 24, 48, 72 và 96 giờ sau khi xử lý bởi  $Pb^{2+}$ , bảo quản ở nhiệt độ -20°C để xác định hàm lượng TBARS trong quá trình peroxide hóa lipid và hoạt độ các enzyme SOD, CAT. Các chỉ tiêu về hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), gốc tự do superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) và tỷ lệ tổn thương của tế bào được phân tích trên nguyên liệu tươi theo các mốc thời gian tương ứng.

Nghiên cứu được thực hiện trong năm 2014 với các phân tích được tiến hành tại phòng thí nghiệm Sinh lý - Sinh hóa thực vật, Trường đại học Vinh.

#### 2.2.2. Phương pháp phân tích

Hàm lượng  $H_2O_2$  được phân tích bằng phương pháp so màu quang phổ (Becana et al., 1986).

Hàm lượng gốc tự do  $O_2^{\cdot-}$  được xác định thông qua đánh giá khả năng phân giải nitro blue tetrazolium ngoại bào (Doke, 1983)

Tỷ lệ tổn thương của tế bào được tính toán theo kết quả của phương pháp điện hóa đo mức độ rối loạn, thất thoát các chất điện li trên màng sinh chất (Sullivan, 1971).

Mức độ peroxide hóa lipid màng tế bào được đánh giá thông qua phân tích hàm lượng các dẫn chất hoạt hóa của axit thiobarbituric (Thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) (Heath and Packer, 1968)

Hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa SOD, CAT được xác định bằng phương pháp so màu (Beauchamp and Fridovich, 1971; Dhindsa et al., 1981). Đơn vị hoạt độ của các enzyme được sử dụng là nanokatal/milligram protein (nkat.mg<sup>-1</sup> protein).

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

Hóa chất dùng trong phân tích là các hóa chất tinh khiết xuất xứ Sigma-Aldrich (Mỹ).

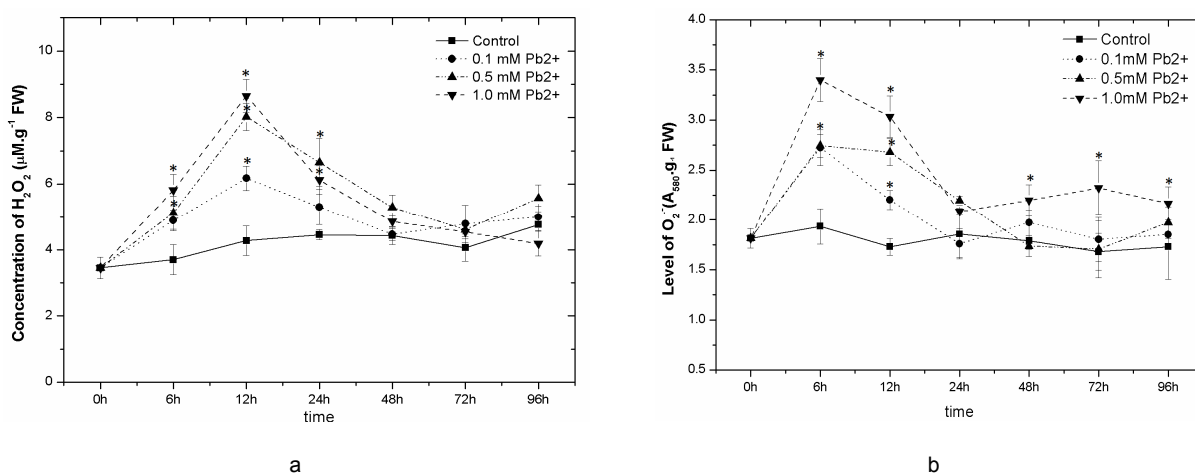
Thí nghiệm được lặp lại 5 lần. Số liệu được xử lý bằng toán thống kê. Sự sai khác giữa giá trị trung bình của các thông số được đánh giá theo phân tích ANOVA ở mức P < 0,05.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Biểu hiện của các dạng oxy hoạt hóa trong rễ đậu tương DT84

Sự hiện diện của Pb<sup>2+</sup> trong môi trường dinh dưỡng như một yếu tố bất lợi đã gây nên stress “ôxy hóa” đối với các tế bào rễ đậu tương DT84, biểu hiện qua sự thay đổi hàm lượng các dạng oxy hoạt hóa nội sinh như H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và gốc tự do O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Hình 1).

Tác động của Pb<sup>2+</sup> đã tăng cường quá trình sinh tổng hợp H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, trong khi ở môi trường nuôi cây không bổ sung chì, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nội sinh có sự biến đổi không đáng kể (Hình 1a). Hàm lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong rễ đậu tương xử lý bởi ở các nồng độ Pb<sup>2+</sup> khác nhau đều tăng nhanh và đạt cao đỉnh sau 12 giờ. Trong khoảng thời gian này, lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giải phóng tỷ lệ thuận với cường độ tác động của nồng độ Pb<sup>2+</sup>: trị số cao nhất của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8,65 μM.g<sup>-1</sup> khối lượng tươi - FW) đạt được ở công thức nồng độ 1,0 mM Pb<sup>2+</sup>, cao hơn trước khi xử lý Pb<sup>2+</sup> (3,45 μM.g<sup>-1</sup> FW) 2,51 lần và cao hơn đối chứng ở cùng thời điểm 12 giờ (4,27 μM.g<sup>-1</sup> FW) 2,03 lần. Sau khi đạt cao đỉnh ở thời điểm 12 giờ, hàm lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở rễ đậu tương xử lý Pb<sup>2+</sup> giảm xuống. Phân tích ANOVA ghi nhận sự sai khác có ý nghĩa thống kê về hàm lượng của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sản sinh ở các công thức thí nghiệm và đối chứng trong 24 giờ đầu của thí nghiệm; còn sau 48 giờ, không còn sự khác nhau của thông số này giữa các công thức thí nghiệm.



**Hình 1. Biến đổi hàm lượng hydrogen peroxide (a) và gốc tự do superoxide (b) trong rễ đậu tương DT84**

Ghi chú: Thể hiện trên hình là giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và dấu (\*) biểu thị sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng ở mức P < 0,05

Tương tự  $H_2O_2$ , gốc tự do  $O_2^-$  cũng tăng nhanh ngay sau khi xử lý  $Pb^{2+}$ , tuy nhiên, đạt đỉnh sớm hơn (chỉ sau 6 giờ tác động của  $Pb^{2+}$ ) và duy trì hàm lượng cao đến 12 giờ rồi giảm nhanh. Trong khoảng thời gian này, lượng  $O_2^-$  sinh ra tỷ lệ thuận với cường độ tác động của  $Pb^{2+}$  và sai khác có ý nghĩa giữa các công thức nồng độ  $Pb^{2+}$  khác nhau. Từ 24 - 96 giờ, hàm lượng  $O_2^-$  ít thay đổi và không có sự khác biệt rõ ràng giữa các công thức thí nghiệm, ngoại trừ ở công thức nồng độ  $Pb^{2+}$  1,0mM (Hình 1b).

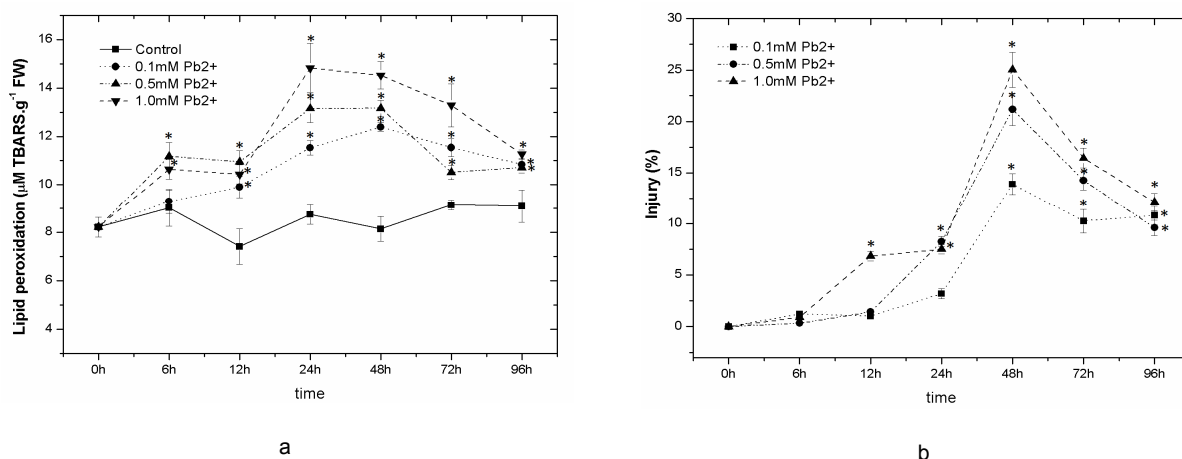
Cảm ứng sinh tổng hợp ROS thường liên quan với sự khởi động các phản ứng bảo vệ trong cơ thể thực vật để đáp trả những tác động bất lợi từ các yếu tố môi trường (Mittler et al., 2004; Maffei et al., 2007; Radville et al., 2011). Trong nghiên cứu mới đây trên giống đậu tương “Nam Đàn” trước tác động của  $Pb^{2+}$  (Mai Văn Chung và cs., 2014), chúng tôi cũng đã ghi nhận, quá trình giải phóng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  ở rễ tăng cường khả năng bảo vệ cho cây; trong đó,  $H_2O_2$  đóng vai trò là phân tử tín hiệu khởi động các cơ chế tự bảo vệ, còn  $O_2^-$  là một thành tố quan trọng trong cơ chế đó (Mai et al., 2013). Do vậy, đối với giống đậu tương DT84, sự gia tăng mạnh mẽ hàm lượng của  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  sau khi

chì tác động 6 - 12 giờ có thể cũng liên quan đến cơ chế bảo vệ của cây trồng này.

### 3.2. Ảnh hưởng của $Pb^{2+}$ đối với các tế bào rễ đậu tương DT84

Stress “ôxy hóa”, với sự bùng nổ về hàm lượng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  trong 6 - 12 giờ sau khi có sự tác động của  $Pb^{2+}$ , đã gây nên những thiệt hại nhất định cho rễ đậu tương DT84. Sự phân tán các chất điện ly bị rối loạn dẫn đến thay đổi tính thấm của màng; đồng thời giảm lượng lipid do bị phân giải thành axit thiobarbituric và các dẫn chất hoạt hóa (TBARS) trong quá trình peroxide hóa, đã gây tổn thương cho các tế bào rễ (Hình 2).

Quá trình peroxide hóa lipid trong các tế bào rễ đậu đã tăng lên ngay sau khi có sự tác động của  $Pb^{2+}$  và đạt cao nhất trong khoảng 24 - 48 giờ. Lượng TBARS hình thành nhiều nhất trong công thức 1,0mM  $Pb^{2+}$  đạt được sau 24 giờ là  $14,83 \mu M.g^{-1}$  FW, cao gấp 1,8 lần so với thời điểm ban đầu ( $8,23 \mu M.g^{-1}$  FW) và gấp 1,69 lần so với đối chứng ( $8,75 \mu M.g^{-1}$  FW). Sau 48 giờ, quá trình peroxide hóa lipid có xu hướng giảm xuống. Mặc dù tương quan tỷ lệ thuận giữa lượng TBARS sinh ra với nồng độ  $Pb^{2+}$  tác động biểu hiện không rõ ràng, song chỉ số này luôn sai khác có ý nghĩa so với đối chứng (Hình 2a).



**Hình 2. Sự peroxide hóa lipid (a) và tỷ lệ tổn thương (b) ở các tế bào rễ đậu tương DT84 dưới tác động của  $Pb^{2+}$**

Ghi chú: Thể hiện trên hình là giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và dấu (\*) biểu thị sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng ở mức  $P < 0,05$

Kết quả này phù hợp với những công bố trước đây về ảnh hưởng của các kim loại nặng Cd, Zn, Cu, Hg, Fe, As... đối với các loại cây trồng khác nhau với đặc điểm đặc trưng: khi tác động đến các tế bào thực vật, kim loại nặng thúc đẩy sự phân giải lipid màng trong quá trình peroxide hóa (dẫn theo Skorzynska-Polit, 2006). Tuy nhiên, mức độ peroxide hóa là khác nhau tùy thuộc vào bản chất của kim loại nặng, loại tế bào, mô và giống cây trồng khác nhau.

Cùng với peroxide hóa lipid, tác động của  $Pb^{2+}$  cũng đã gây thất thoát các chất điện ly, làm thay đổi tính thấm của màng, dẫn đến tế bào bị tổn thương. Trong 6 giờ đầu, chỉ một tỷ lệ nhỏ tế bào rễ đậu tương DT84 (0,93 - 1,21%) bị ảnh hưởng. Sau đó, tỷ lệ này tăng lên, đạt đỉnh ở thời điểm 48 giờ, cao nhất là 25,03% ở công thức 1,0mM  $Pb^{2+}$ ; đến 96 giờ thì chỉ số này giảm xuống còn 9,59 - 12,14% (Hình 2b). Mức độ thiệt hại của tế bào chịu ảnh hưởng của  $Pb^{2+}$  sau 12 giờ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

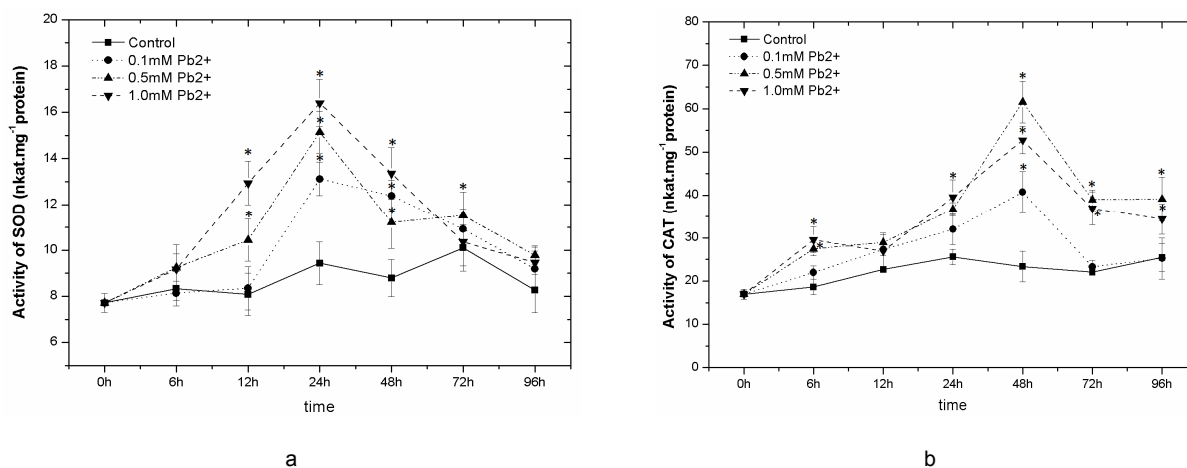
Quá trình peroxide hóa lipid và rối loạn tính thấm của màng tế bào rễ đậu tương DT84 là hậu quả của stress “ôxy hóa”. Sự bùng nổ hàm lượng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  trong 6 - 12 giờ đầu đã gây nên những thiệt hại đó (Hình 1a,b). Khi lượng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  giải phóng ra ít và ổn định,

cùng với khả năng tự phục hồi của các tế bào, mức độ thiệt hại ở rễ đậu tương DT84 đã giảm rõ rệt.

### 3.3. Các enzyme chống ôxy hóa ở rễ đậu tương DT84

Với chức năng kiểm soát hàm lượng ROS, hoạt động của SOD, CAT (cùng với một số enzyme chống ôxy hóa khác) giúp cơ thể thực vật có thể duy trì sinh tổng hợp ROS để tăng cường khả năng bảo vệ trước tác động từ môi trường ngoài, đồng thời giảm thiểu độc tính của ROS đối với các yếu tố cấu trúc và quá trình sống diễn ra trong tế bào. Thể hiện vai trò này ở đậu tương DT84, SOD và CAT trong rễ bị stress ‘ôxy hóa’ do ảnh hưởng của  $Pb^{2+}$  đã luôn có hoạt độ cao, biến đổi mạnh và tương quan mật thiết với hàm lượng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  nội sinh; trong khi ở công thức đối chứng, các enzyme này có độ hoạt động thấp và ít thay đổi (Hình 3).

Đối với SOD, enzyme chuyển hóa  $O_2^-$  thành  $H_2O_2$  và  $O_2$ , sự tăng nhanh độ hoạt động sau 6 giờ và đạt giá trị cao nhất 16,39 nkat.mg<sup>-1</sup> protein vào thời điểm 24 giờ, cao hơn trước khi xử lý  $Pb^{2+}$  (7,71 nano katal.mg<sup>-1</sup> protein) 2,12 lần và cao hơn đối chứng ở cùng thời điểm (9,43 nano katal.mg<sup>-1</sup> protein) 1,74 lần. Hoạt độ SOD



**Hình 3. Biến đổi hoạt độ enzyme superoxide dismutase - SOD (a) và catalase - CAT (b) trong rễ đậu tương DT84**

Ghi chú: Thể hiện trên hình là giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và dấu (\*) biểu thị sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng ở mức  $P < 0,05$

trong các công thức xử lý bởi  $Pb^{2+}$  luôn cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng; mối tương quan tỷ lệ giữa nồng độ kim loại nặng này với độ hoạt động của SOD biểu thị rõ nét trong khung thời gian 6 - 24 giờ. Sự tăng nhanh và duy trì hoạt độ cao của SOD sau 6 giờ (Hình 3a) đã góp phần làm giảm đáng kể lượng của  $O_2^-$  nội sinh (Hình 1b). Khi gốc tự do này được duy trì ở mức thấp sau 24 giờ, hoạt độ của SOD cũng giảm nhanh.

So với SOD, hoạt độ CAT tăng và đạt cao đỉnh chậm hơn, sau tác động của  $Pb^{2+}$  48 giờ. Trong suốt thời gian 0 - 96 giờ, độ hoạt động của CAT trong các công thức xử lý kim loại nặng luôn cao hơn so với đối chứng; tuy nhiên, không ghi nhận được mối tương quan tỷ lệ giữa nồng độ  $Pb^{2+}$  tác động với hoạt độ enzym này. Với chức năng phân giải  $H_2O_2$  thành  $H_2O$  và  $O_2$ , sự gia tăng hoạt độ của CAT đã làm giảm lượng  $H_2O_2$ . 24 giờ, khi hoạt độ CAT bắt đầu tăng nhanh (Hình 3b), cũng chính là thời điểm  $H_2O_2$  giảm mạnh (Hình 1a).

Biểu hiện của các enzym SOD và CAT trong rễ đậu tương DT84 chịu ảnh hưởng của  $Pb^{2+}$  tương tự với kết quả nghiên cứu mới đây trên giống đậu tương “Nam Đàn” (Mai Văn Chung và cs., 2014). Tuy nhiên, độ hoạt động và thời điểm đạt cao đỉnh của các enzym ở các giống đậu tương này là không giống nhau.

#### 4. KẾT LUẬN

Ion  $Pb^{2+}$  đã gây stress “ôxy hóa” ở rễ cây đậu tương DT84 với sự tổng hợp sớm và mạnh mẽ các dạng ôxy hoạt hóa. Hàm lượng cao nhất của gốc tự do superoxide -  $O_2^-$  đạt được sau 6 giờ, còn đối với hydrogen peroxide -  $H_2O_2$  là 12 giờ.

Stress “ôxy hóa” đã thúc đẩy mạnh mẽ quá trình peroxide hóa lipid màng trong khoảng thời gian 24 - 48 giờ cùng với tỷ lệ tế bào thương tổn cao tới 25,03% sau 48 giờ, gây những thiệt hại cho các tế bào rễ đậu tương DT84.

Các enzym chống ôxy hóa SOD và CAT có độ hoạt động mạnh đã làm giảm lượng  $H_2O_2$  và  $O_2^-$  sau 24 giờ chịu tác động của  $Pb^{2+}$ , góp phần hạn chế tác động tiêu cực do stress “ôxy hóa” gây nên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad P., Sarwat M. and Sharma S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J. Plant Biol.*, 51: 167-173.
- Beauchamp C. and Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- Becana M., Aparicio-Tejo P., Irigoyen J.J. and Sanchez-Diaz M. (1986). Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.*, 82: 1169-1171.
- Bhattacharjee S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.*, 89: 1113-1121.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Mai Văn Chung, Nguyễn Đức Diệm, Nguyễn Đình San (2014). Phản ứng siêu nhạy cảm ở rễ cây đậu tương Nam Đàn đối với chì. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(7): 1023-1028.
- Dey S.K., Dey J., Patra S. and Pothal D. (2007). Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(1): 53-60.
- Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P. and Thorpe T.A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, 32:93-101.
- Doke N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.*, 23: 345-357.
- Hassan M. and Mansoor S. (2014). Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments. *Turk. J. Agric. For.*, 38: 55-61.
- Heath R.L. and Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125: 189-198.
- Maffei M.E., Mithöfer A. and Boland W. (2007). Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68: 2946-2959.

- Mai V.C., Bednarski W., Borowiak-Sobkowiak B., Wilkaniec B., Samardakiewicz S. and Morkunas I. (2013). Oxidative stress in pea seedlings leaves in response to *Acyrtosiphon pisum* infestation. *Phytochemistry*, 93: 49-62.
- Malecka A., Jarmuszkiewicz W. and Tomaszewska B. (2001). Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim. Pol.*, 48(3): 687-98.
- Malecka A., Piechalak A. and Tomaszewska B. (2009). Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. *Acta Physiol. Plant.*, 31: 1053–1063.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9: 490-498.
- Radville L., Chaves A. and Preisser E.L. (2011). Variation in plant defense against invasive herbivores: evidence for a hypersensitive response in Eastern Hemlocks (*Tsuga canadensis*). *J. Chem. Ecol.*, 37: 592-597.
- Rodriguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pazmino D.M., Testillano P.S., Risueno M.C., del Rio L.A. and Sandalio L.M. (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol.*, 150: 229- 243.
- Rueda A., Roman Y., Lobo M. and Pelaez C. (2011). Analysis of tomato seedling cell death in response to copper and paraquat induction. *Trop. Plant Pathol.*, 36: 169-177.
- Skorzynska-Pilot E. (2006). Lipid peroxidation in plant cells: its physiological role and change under effect of heavy metal stress. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 76: 49-54
- Sullivan Y.C. (1971). Techniques of measuring plant drought stress. In: Larson K.L. and Eastin J.D., (Eds.), *Drought injury and resistance in crops*. Crop Science Society of America, Madison, WI, p. 1-8.
- Wojtaszek P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence response. *Acta Physiol. Plant.*, 19: 581-589.
- Zhu-Salzman K., Salmon R.A., Ahn J.-E., and Koiwa H. (2004). Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol.*, 134: 420-431.