РАСТЕНИЕВОДСТВО

УДК 631:581.1 doi: 10.30766/2072-9081.2018.65.4.19-29

Комплексная оценка растений ячменя, полученных путем клеточной селекции на устойчивость к кадмию

И.Г. Широких[1,2,3], О.Н. Шуплецова[1,2], Е.В. Товстик[1,2], С.Ю. Огородникова[2,3], Я.И. Назарова[1], Г.И. Березин[2]

[1]*ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», г. Киров, Российская Федерация,*

[2]*ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», г. Киров, Российская Федерация,*

[3]*ФГБУН «Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук», г. Сыктывкар, Республика Коми, Российская Федерация*

Накопление кадмия (Cd) в зерне ячменя (Hordeum vulgare L.) и его последующая передача по пищевым цепям человеку и животным является серьезной экологической проблемой. Создание стресс-толерантных сортов для сокращения потерь урожая и противодействия биоаккумуляции токсичных ионов может способствовать сохранению качества зерна и повышению продуктивности ячменя на загрязненных кадмием почвах. В процессе клеточной селекции в 2017 г. от исходного генотипа ячменя 8730×Омский получили в каллусных культурах сомаклональные варианты (RA) и провели среди них отбор устойчивых к токсичности 15 мг/л ионов кадмия линий (RA_{Cd}). Регенерированные из каллусов растения сравнивали с исходным генотипом по физиолого-биохимическим и продуктивным признакам, биоаккумуляции кадмия в условиях вегетационного опыта. Растения выращивали в обычных условиях и на провокационном фоне по кадмию в 2017-2018 гг. Симптомы окислительного стресса тестировали по динамике накопления малонового диальдегида, активности супероксиддисмутазы, содержанию антоцианов в листьях. При стрессе линии ячменя, отобранные в результате клеточной селекции (на среде с добавлением 15 мг/л Cd^{2+}), отличались от регенерантов, полученных в обычных условиях (без добавления в среду Cd^{2+}), и исходного генотипа с более высокими показателями антиоксидантной активности. На провокационном фоне в листьях устойчивых регенерантных линий отмечены более высокие, чем у исходной формы и регенерантов, не подвергнутых отбору в селективных условиях, показатели содержания в листьях хлорофиллов (на 76 и 64 %) и каротиноидов (на 64 и 60% соответственно), семенной продуктивности (в 4,5 и 1,3 раза соответственно) и биоаккумуляции в корнях кадмия (на 100 и 5% соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования клеточной инженерии в селекционных программах по повышению устойчивости ячменя к токсичности кадмия.

Ключевые слова: *токсичность кадмия, почвенный фон, ячмень, сомаклональная изменчивость, клеточная селекция, растения-регенеранты, окислительный стресс, устойчивость, продуктивность, аккумуляция кадмия*

Серьёзной проблемой современного аграрного производства является загрязнение тяжелыми металлами (ТМ) почв, используемых для производства растениеводческой продукции [1, 2]. Наиболее высокая степень загрязнения характерна для территорий, прилегающих к крупным городам с приоритетом металлургического производства, химической промышленности и машиностроения. Зоны влияния городов простираются на десятки километров, а крупных промышленных агломераций – на сотни километров. Характерная для России последних лет тенденция «стягивания» населения в города и ареалы вокруг них привела к тому, что структура размещения сельхозпредприятий становится всё более локализованной в пригородных зонах больших городов и городских агломераций [3]. Концентрация сельскохозяйственных угодий вокруг городов, как источника эмиссии разнообразных загрязнителей, обусловливает значительный риск в отношении экологической частоты получаемой растениеводческой продукции.

Высокой токсичностью для растений и животных, даже при низкой концентрации, выделяется среди ТМ кадмий (Cd), относимый санитарно-гигиеническими нормами к I классу опасности [4]. Главная опасность Cd, как и других рассеянных в среде токсикантов, заключается не в явном (остром) отравлении, а в его способности мигрировать и концентрироваться в пищевых цепях и в силу этого влиять на здоровье человека [5]. Именно поэтому его отравляющее действие было выявлено лишь недавно. Кроме того, только в последние десятилетия Cd стал находить широкое техническое применение. Его содержание в окружающей среде возросло в связи с развитием горнорудной, металлургической, химической промышленности, а также с производством

ракетной и атомной техники, полимеров. Широко применяются соединения этого металла в электронной и лакокрасочной промышленности. Содержится Cd также в твердых отходах и стоках предприятий, перерабатывающих бывшую в употреблении бумажную массу [6, 7]. В общей сложности, с хозяйственной деятельностью связывают 13 тыс. из 30 тыс. т кадмия, циркулирующего в окружающей среде [6].

При обследовании Россельхознадзором 14257,7 тыс. га пахотных угодий на предмет выявления загрязнения почв солями кадмия, выявлено 27,7 тыс. га с содержанием Cd выше ПДК. Зоны, в которых содержание тяжелых металлов в почвах сельскохозяйственных угодий в десятки и сотни раз превышают ПДК, отмечаются в Кемеровской, Белгородской, Челябинской, Московской, Смоленской, Тульской и Брянской областях [8]. Наряду с технологическими выбросами, в почвы агроценозов Cd поступает в результате широкого использования удобрений на основе фосфатов, содержащих этот элемент в виде естественной примеси в количествах от 2 до 200 мг/кг [1, 2, 6].

Под воздействием кадмия серьезно изменяются рост и морфология корневой системы растений. Увеличивая производство активных форм кислорода (АФК), кадмий вызывает у растений окислительный стресс, который приводит к замедлению темпов роста растений, снижению их биомассы и продуктивности [9, 10]. Не являясь необходимым элементом для метаболизма, кадмий, тем не менее, активно поглощается растением. Локализуется он в основном в корнях, но в отличие от других минеральных элементов (за исключением цинка) может в относительно больших количествах накапливаться в наземной части, включая генеративные органы. Загрязнение кадмием порождает в агрофитоценозах две основные проблемы: снижение продуктивности сельскохозяйственных растений; попадание в организм животных и человека загрязненной растениеводческой продукции [11].

В связи с этим задача минимизации негативного влияния кадмия на продуктивность и качество продукции растениеводства приобретает особое значение. Наиболее успешной агрономической практикой является селекция сортов с низким уровнем аккумуляции токсичных ионов. Так, с помощью селекционных методов удалось повысить толерантность к кадмию и уменьшить его накопление в зерне пшеницы [12].

Возможности традиционной селекции по созданию устойчивых к ТМ сортов существенно расширяются благодаря использованию методов клеточной инженерии. Популяции клеток в каллусных культурах отличаются большой генетической, физиологической и цитологической изменчивостью, получившей название сомаклональной. Отбор *in vitro* устойчивых к кадмию линий с помощью селективных систем ранее проводили в культурах дурмана, табака, томата [цит. по 13]. Однако регенерировать из них растения в большинстве случаев не удавалось, вследствие утраты клетками способности к морфогенезу. Исключение составила работа по получению путем клеточной селекции растений-регенерантов пшеницы [14]. Из устойчивых к Cd каллусных линий ячменя получить растения-регенеранты нам удалось впервые. Однако условия культуры *in vitro* обеспечивают реализацию генетического потенциала отдельных клеток, а не целого растения. Поэтому по другим признакам, по которым адекватно определённого ответа *in vitro* не существует, необходимо оценивать именно растения-регенеранты.

Цель исследований – сравнительная оценка на провокационном почвенном фоне по кадмию растений ячменя исходного генотипа и растений-регенерантов, полученных от него *in vitro* в обычных и селективных по кадмию условиях.

Материал и методы. Объектами исследования служили: 1) гибридная комбинация ячменя 8730×Омский (исходный генотип); 2) регенерантная линия RA, индуцированная исходным генотипом в каллусной культуре на обычной среде (без добавления ионов Cd^{2+}); 3) регенерантная линия RA_{Cd}, индуцированная исходным генотипом в каллусной культуре на селективной среде, содержащей 15 мг/л Cd^{2+} [15]. Полученные *in vitro* растения-регенеранты высаживали в вегетационные сосуды с суглинистой дерново-подзолистой почвой. Схема опыта включала два почвенных фона: 1) контрольный – почва с pH_{KCl} 5,3 и природным содержанием 0,07±0,01 мг/кг Cd^{2+}; 2) провокационный – почва с 2,5±0,2 мг/кг Cd^{2+}. Провокационный фон создавали путем внесения в природную почву $Cd(CH_3COOH)_2$ с последующим её регулярным увлажнением (до 80% от ПВ) и перемешиванием в течение месяца для закрепления кадмия в почвенном поглощающем комплексе.

Одновременно с высадкой пробирочных растений-регенерантов в почву высевались

семена исходного генотипа (3 растения на сосуд, 3 сосуда в каждом варианте). Все растения выращивали в климатической камере «Ilka» (Германия) до получения семенного потомства при следующем режиме: температура днем 20-22°С, ночью 16-18°С, фотопериод 16 часов.

Для определения показателей, тестирующих симптомы окислительного стресса, у растений каждого варианта отбирали смешанные пробы листьев (второй подфлаговый лист) по фазам развития: кущение, выход в трубку, колошение. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) анализировали по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом (МДА), образующимся в процессе ПОЛ [16]. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях определяли спектрофотометрически (Specol, Германия) в ацетоновой вытяжке при длинах волн 662 и 644 нм для хлорофилла *a* и *b* соответственно [17]. Определение каротиноидов проводили при 470 нм [18]. Антоцианы экстрагировали из листьев 1% раствором соляной кислоты. Количественное определение антоцианов проводили в соответствии с методикой спектрофотометрически при 510 и 657 нм [19].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, основанным на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление п-нитротетразолиевого синего (NBT). В присутствии рибофлавина и метионина, генерирующих супероксидные анион-радикалы, NBT восстанавливается до синего формазана с максимумом поглощения при 560 нм [20]. Реакционная смесь (3 мл) содержала: 1,3 мкМ рибофлавин, 13 мМ метионин, 63 мкМ NBT в 0,05 М Na-фосфатный буфер с 0,10 мМ EDTA, pH 7,8 и 0,1 мл ферментативного экстракта. Образцы освещали в течение 6 мин. Измерения проводили на спектрофотометре «Spekol 1200». За единицу активности СОД принимали объем ферментативного экстракта, который вызывал 50% ингибирование фотовосстановления NBT. Активность СОД рассчитывали на грамм сырой массы.

По окончании вегетации в каждом варианте проводили анализ структуры продуктивности растений. В смешанных образцах отдельно для корней, соломы, листьев и зерна определяли валовое содержание кадмия на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Спектр-5-4», предварительно экстрагируя воздушно-сухие растительные образцы аммонийно-ацетатным буфером (pH 4,8).

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли методом дисперсионного анализа с использованием встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007). В таблицах и на рисунках приведены средние значения из трех аналитических повторений и их квадратичные отклонения, различия значимы при $P \geq 0,95$.

Результаты и их обсуждение. Кадмий является для растений индуктором оксидативного стресса, в результате которого происходит усиленное образование свободных радикалов и активных форм кислорода, вызывающих перекисное окисление липидов. В клетках растений в ответ на стресс активируется система ферментативной антиоксидантной защиты и происходит суперпродукция низкомолекулярных антиоксидантов.

Поскольку генотипы с различной устойчивостью к кадмию могут испытывать при выращивании на провокационном фоне стресс различной интенсивности и, соответственно, иметь различный уровень антиоксидантной защиты, у растений определяли показатели, тестирующие симптомы окислительного стресса: интенсивность ПОЛ, активность антиоксидантного фермента СОД и накопление антоцианов − пигментов группы флавоноидов, играющих роль низкомолекулярных антиоксидантов.

Оценка степени окислительных повреждений по содержанию в листьях МДА показала, что при выращивании в обычных условиях (контроль) ПОЛ сравниваемых генотипов ячменя имеет общую тенденцию к увеличению в онтогенезе растений от 12-19 до 75-111 ммоль/г МДА, особенно значительному у исходного генотипа (рис. 1А). При выращивании ячменя на провокационном фоне реакция на обусловленный кадмием стресс у сравниваемых растений различалась. Так, содержание МДА в листьях исходной формы возросло на ранних стадиях развития (кущение, выход в трубку) и снизилось в фазу колошения. Уровень МДА при стрессе у регенеранта RA, напротив, в фазу кущения был ниже, чем в благоприятных почвенных условиях, а затем возрастал, причем более значительно, чем у исходного генотипа (рис. 1Б). Динамика МДА в листьях регенеранта RA_{Cd}, полученного путем клеточной селекции на устойчивость к кадмию, не имела на провокационном фоне существенных отличий от контроля, что свидетельствует о его толерантности к стрессу (рис. 1В).

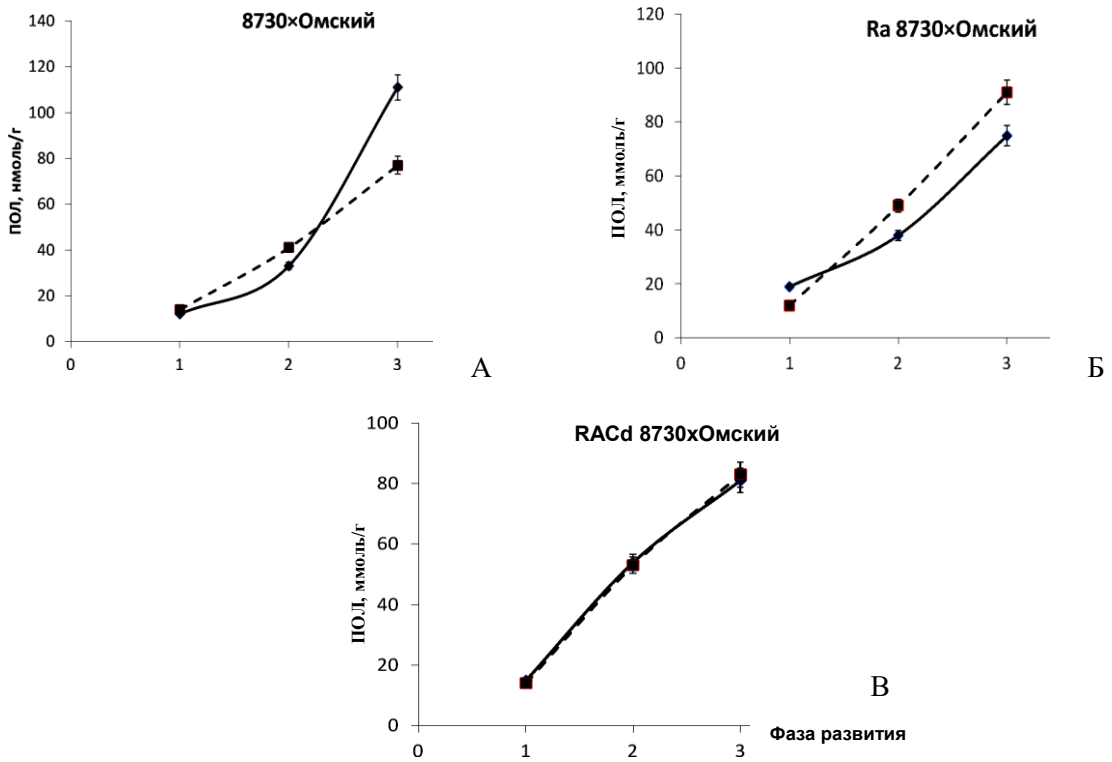

Рис. 1. **Накопление малонового диальдегида в листьях ячменя различных генотипов в зависимости от условий выращивания растений: –◆– – контроль (без кадмия); –■- · – провокационный фон по кадмию. Фазы развития растений: 1 – кущение, 2 – выход в трубку, 3 – колошение**

Фермент СОД относится к числу ключевых компонентов системы защиты клеток от окислительной деструкции. При выращивании ячменя в отсутствии стресса динамика активности СОД практически не зависела от генотипа, за исключением резкого увеличения активности фермента в листьях регенеранта RA в фазу колошения (рис. 2Б).

На провокационном фоне активность СОД в листьях растений этого генотипа изменялась незначительно (от 20,41±1,30 до 17,81±1,90 ед/г), тогда как у исходного генотипа активность фермента под воздействием кадмия возросла в фазу колошения от 13,36±0,49 до 23,28±0,22 ед/г, т.е в 1,7 раза (рис. 2А). Наиболее высокой активностью СОД в присутствии кадмия на протяжении всего периода наблюдений отличался регенерант $RA_{Cd.}$ В его листьях ферментативная активность увеличилась, по сравнению с активностью на благоприятном фоне, в фазы «кущение», «выход в трубку» и «колошение» соответственно в 3,8; 3,0 и 1,9 раза (рис. 2В). Индуцируемое кадмием повышение активности СОД можно считать одним из механизмов устойчивости этой сомаклональной линии, полученной в результате клеточной селекции на устойчивость к токсичному металлу. Ранее сообщалось, что эффективное функционирование ферментов антиоксидантной системы у отдельных сортов пшеницы способствует ослаблению воздействия Cd на растения, защищает фотосинтетический аппарат и способствует формированию более высокого потенциала урожайности [21].

По-видимому, каллусная линия, выжившая в селективной системе с кадмием за счет антиоксидантной активности, дала начало стресс-толерантному растению-регенеранту.

Индикатором окислительного стресса у растений может служить накопление в тканях таких низкомолекулярных антиоксидантов, как антоцианы. В листьях исходного генотипа, при выращивании на провокационном фоне, максимум в накоплении антоцианов отмечался в более ранние сроки (в фазу «выход в трубку»), чем у растений в благоприятных условиях (в фазу «колошение») (рис. 3А). Динамика антоцианов в листьях растений-регенерантов отличалась от таковой в листьях исходного генотипа, как в контроле, так и на провокационном фоне. У регенеранта RA (на протяжении всего периода наблюдений) и у регенеранта RA_{Cd} (только в фазу «колошение») количество антоцианов, в отличие от исходного генотипа, под воздействием кадмия увеличивалось (рис. 3Б, В)

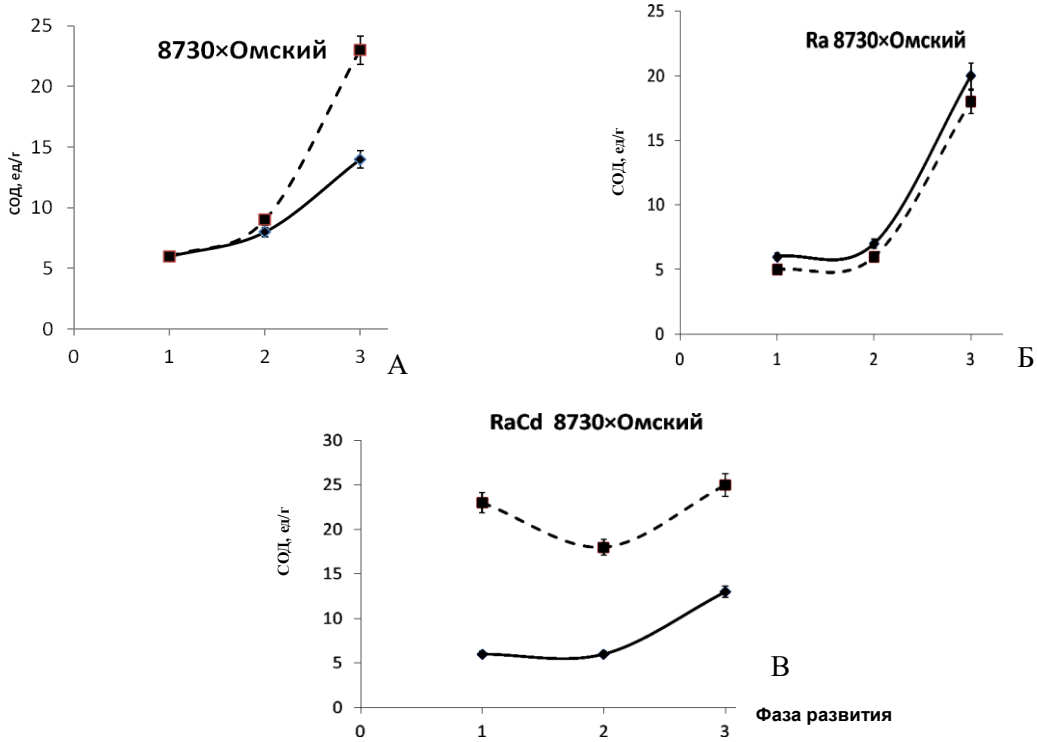

Рис. 2. **Активность супероксиддисмутазы в листьях ячменя различных генотипов в зависимости от условий выращивания растений: —◆— – контроль (без кадмия); –■- · – провокационный фон по кадмию. Фазы развития растений: 1- кущение, 2- выход в трубку, 3- колошение**

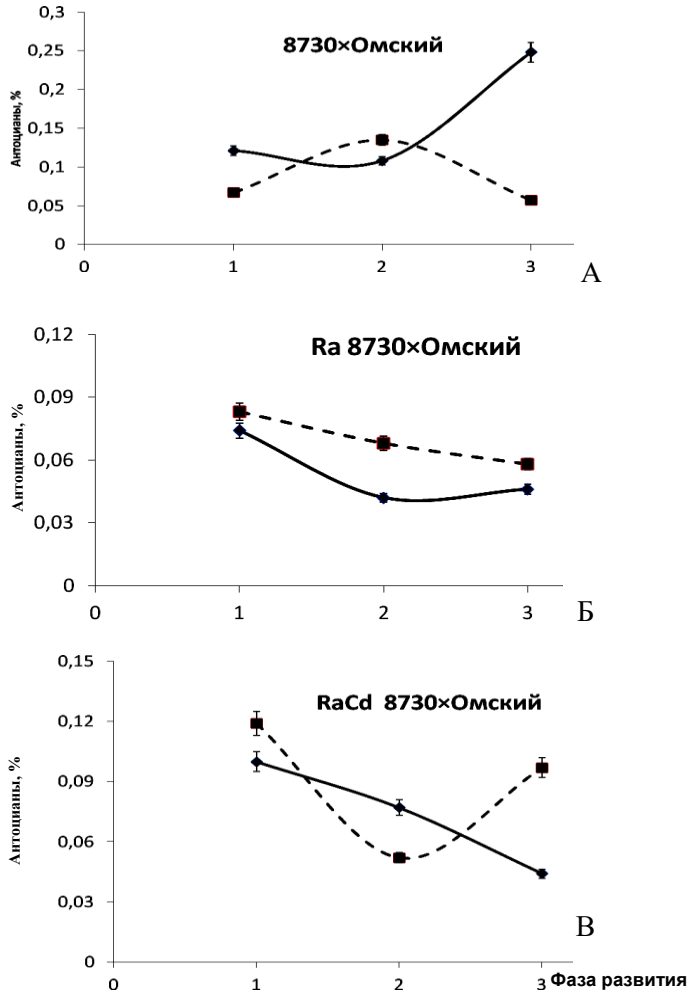

Рис. 3. **Содержание антоцианов в листьях ячменя различных генотипов в зависимости от условий выращивания растений: —◆— - контроль (без кадмия); –■- · - провокационный фон по кадмию. Фазы развития растений: 1- кущение, 2- выход в трубку, 3- колошение**

Таким образом, симптомы окислительного стресса, тестируемые по интенсивности ПОЛ, активности СОД и накоплению в листьях антоцианов, у исходного генотипа на провокационном фоне были выражены сильнее, чем у растений-регенерантов, полученных в каллусных культурах в обычных и селективных условиях.

При выращивании в благоприятных почвенных условиях растения-регенеранты отличались от выращенных из семян растений значительно более низким уровнем фотосинтетических пигментов. Сравнение исследуемых генотипов на провокационном фоне выявило у прошедших отбор на устойчивость к кадмию регенерантов RA_{Cd}, напротив, более высокое суммарное содержание хлорофиллов *а* и *б* (6,33 мг/г) и каротиноидов (1,2 мг/г), чем у исходного генотипа (3,6 мг/г и 0,73 мг/г соответственно) и регенерантов RA (3,86 мг/г и 0,75 мг/г соответственно), не подвергнутых отбору на этапе каллусной ткани (табл. 1), то есть при выращивании на почве с внесением кадмия у регенерантов RA_{Cd} содержание фотосинтетических пигментов существенно не снизилось по сравнению с ростом в благоприятных условиях. Это свидетельствует о приобретении генотипом в результате клеточной селекции в каллусной культуре адаптивных преимуществ по сравнению с использованием сомаклональной изменчивости без проведения отборов *in vitro*.

Таблица 1

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях ячменя сравниваемых генотипов в фазу колошения, мг/г

Генотипы	*Хлорофиллы*		*Каротиноиды*	*Соотношение хлорофиллы/каротиноиды*	*Сумма (а + б)*	*Отношение а/б*
	а	*б*				
8730×Омский (исходный генотип)	8,28±1,13 2,41±0,01	4,20±0,93 1,19±0,13	2,36±0,29 0,73±0,05	5,28 4,94	12,48 3,60	1,99 2,04
RA	4,27±0,10 2,74±0,35	1,84±0,02 1,13±0,18	1,17±0,04 0,75±0,08	5,24 5,14	6,11 3,86	2,32 2,43
RA_{Cd}	3,88±0,39 4,17±0,01	1,78±0,13 2,15±0,22	1,07±0,13 1,20±0,02	5,32 5,27	5,67 6,33	2,18 1,95

Примечания: в числителе – контроль (без кадмия), в знаменателе – провокационный фон по кадмию.

Наряду с различиями в биохимических показателях у растений ячменя, в зависимости от генотипа, выявлены различия в продуктивных признаках. На благоприятном почвенном фоне регенеранты RA достоверно превосходили исходную форму по кустистости, количеству зерен в главном колосе, количеству зерен и массе зерна с растения (табл. 2).

Регенеранты RA_{Cd}, напротив, характеризовались меньшей (на 16%) высотой и меньшими (на 18%) значениями количества зерен в главном колосе и массы зерна с растения, несмотря на повышенную кустистость по сравнению с исходной формой.

На провокационном по кадмию фоне у растений исходного генотипа достоверно снизились все структурные компоненты продуктивности, тогда как растения регенерантной линии RA характеризовались, в сравнении с контролем, снижением по одним признакам − числу зёрен и массе зерна с растения и повышением по другим – высоте растений, общей и продуктивной кустистости. У регенерантов RA_{Cd}, подвергнутых воздействию кадмием на стадии каллуса, оказалась выше, чем в контроле не только продуктивная кустистость, но и семенная продуктивность. Масса зерна с растений, выращенных в присутствии кадмия, была вдвое больше, чем в контроле и превосходила исходный генотип в 4,5 раза, а регенерантную линию RA – на 26%. Т.е. обе регенерантные линии в условиях стресса демонстрировали устойчивость, выразившуюся в увеличении структурных показателей продуктивности растений. При этом у регенерантов RA увеличение касалось только вегетативных органов, а у регенерантов RA_{Cd} – вегетативных и репродуктивных органов одновременно.

Особый интерес, в связи с увеличением в настоящее время доли загрязненной ТМ расти-

Таблица 2
Структура продуктивности растений ячменя сравниваемых генотипов в условиях вегетационного опыта в зависимости от почвенного фона

Генотип	*Высота растения, см*	*Кустистость, шт.*	*Продуктивная кустистость, шт.*	*Длина главного колоса, см*	*Кол-во колосков в главном колосе, шт.*	*Кол-во зерен в главном колосе, шт.*	*Масса зерна, г*		*Кол-во зерен с растения, шт.*
							с главного колоса	*с растения*	
Контроль									
8730 × Омский (исходный генотип)	62±2,8	3,0±0,7	2,0±0,6	9,2±1,0	22±3,8	17±1,5	1,82±0,07	2,8±0,4	49±6,8
RA	56±7,1	4,3±1,4*	3,3±0,9	8,9±2,1	26±4,6	23±2,2*	1,88±0,05	5,8±1,1*	86±19,3*
RA_{Cd}	52±2,2*	5,7±2,3*	2,7±0,9	8,8±2,9	16±5,5	14±2,6	0,48±0,02*	2,3±0,8	41,7±16,2
Провокационный фон по кадмию									
8730 × Омский (исходный генотип)	51±4,3	1,0±0,0	1,0±0,0	8,1±1,6	20±2,9	10±3,4	1,1±0,04	1,1±0,04	14,3±3,7
RA	67±3,5*	6,7±1,6*	4,3±1,5*	9,5±2,2	26±3,0*	24±3,9*	1,05±0,26	3,9±0,08*	54±12,5*
RA_{Cd}	51±4,2	5,3±1,9*	4,3±1,4*	10,2±2,7	26±2,1*	20±2,5*	1,01±0,24	4,9±1,06*	69±15,9*

*достоверно отличается от исходной формы при P>0,95.

тельной продукции, представляет вопрос о наличии связи между устойчивостью организмов и накоплением в них ТМ. Предполагается, что устойчивость к металлам и способность к биоаккумуляции находятся у растений под независимым генетическим контролем. Определение содержания кадмия в различных органах (корни, соломина, листья и зерно) растений, выращенных в провокационных условиях, показало, что все сравниваемые генотипы ячменя аккумулируют токсичный элемент, в основном, в корневых тканях (табл. 3). Если у растений на контрольном фоне доля связанного корнями кадмия изменялась от 58,1 (регенерант RA) до 68,7 (регенерант RA_{Cd}) и 75,6% (исходный генотип), то на провокационном фоне она увеличивалась, в зависимости от генотипа, до 74,4 (регенерант RA), 78,2 (исходный генотип) и 82,7% (регенерант RA_{Cd}) от его общего содержания в фитомассе. Таким образом, кадмий накапливался в надземной части растений в небольших количествах, составляя в пересчете на 1 кг десятые доли грамма в соломине и листьях, сотые доли грамма − в зерне, как у исходного генотипа, так и у индуцированных им регенерантных линий.

Полученные результаты хорошо согласуются с представлением, что распределение кадмия в растениях определяется наличием функциональных барьеров на границах корень-стебель, стебель-лист, стебель-репродуктивные органы [22].

Количество металла в зерне ячменя, выращенного на провокационном фоне, увеличивалось по сравнению с контролем, но в зависимости от генотипа в разной степени: у исходной формы – в 2,5 раза, у регенерантов – в 3,6 (линия RA) и 3,3 (линия RA_{Cd}) раза. Тем не менее, существенных различий между генотипами по содержанию кадмия в зерне не обнаружено, тогда как по суммарному выносу кадмия исходная форма и регенерантные линии различались значительно, причем вынос токсичного металла растениями-регенеран-тами составил более 9 мг, а исходным генотипом – только 5 мг на 1 кг сухой фитомассы. Содержание кадмия в корнях растений 8730×Омский на провокационном фоне возросло по сравнению с обычными условиями в 5 раз, а у регенерантных линий в 11,4 (линия RA) и 11, 9 (линия RA_{Cd}) раза.

Таблица 3

Накопление кадмия (мг/кг сухой массы) в растениях ячменя сравниваемых генотипов в зависимости от почвенных условий

Генотип	*Фон*	
	контроль	*провокационный по кадмию*
Корни		
8730×Омский (исходный генотип)	0,847±0,136	3,929±0,629
RA	0,625±0,100	7,156±1,145
RA_{Cd}	0,634±0,101	7,537±1,206
Соломина		
8730×Омский (исходный генотип)	0,157±0,025	0,650±0,104
RA	0,225±0,036	1,563±0,250
RA_{Cd}	0,151±0,024	0,990±0,158
Листья		
8730×Омский (исходный генотип)	0,100±0,016	0,400±0,064
RA	0,213±0,034	0,850±0,136
RA_{Cd}	0,125±0,020	0,543±0,089
Зерно		
8730×Омский (исходный генотип)	0,015±0,002	0,038±0,006
RA	0,013±0,020	0,047±0,008
RA_{Cd}	0,013±0,020	0,043±0,007

Выводы. Полученные данные говорят о том, что устойчивость к кадмию, индуцированная у ячменя проведением через культуру изолированной ткани, сопровождалась усилением в то же время способности регенерантных линий аккумулировать токсичный металл, особенно в корнях. Причиной повышения устойчивости исходной формы является, очевидно, сомаклональная изменчивость, возникающая в культуре *in vitro*, как результат событий генетической (мутации, кроссинговер, перемещение транспозонов) и эпигенетической (амплификация генов и метилирование) природы. В дезорганизованных каллусных клетках эти события происходят с большей интенсивностью, чем в интактном растении. Регенерированные из каллусов линии могут отличаться от исходной формы по ряду признаков. Для направленного выявления среди них форм, обладающих устойчивостью к кадмию, необходимо ещё на стадии каллуса проводить отбор линий с соответствующими адаптивными изменениями. В нашем случае такие изменения заключались в повышенной активности СОД, что обеспечило сомаклону RA_{Cd} способность противостоять окислительной деструкции фотосинтетических пигментов и сохранить в условиях стресса более высокую семенную продуктивность, чем исходный генотип и сомаклон RA, который на стадии каллуса не был подвергнут клеточной селекции.

Список литературы

1. Khan M.A., Khan S., Khan A., Alam M. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments // Science of the Total Environment. 2017. Vol. 601. P. 1591-1605.

2. Rizwan M., Ali S., Abbas T., Zia-ur-Rehman M., Hannan F., Keller C., Ok Y.S. Cadmium minimization in wheat: a critical review // Ecotoxicology and environmental safety. 2016. Vol.130. P. 43-53.

3. Доклад о состоянии и использовании земель сельскохозяйственного назначения за 2011 год [Электронный ресурс]: http://www.mcx.ru/ documents/ docu-ment/show/17135.133.htm (дата обращения: 24.01.2018).

4. Методические рекомендации по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве. М.: Минздрав СССР, 1982. 57 с.

5. Alloway B.J., Jackson, A.P. The Transfer of Cadmium from Agricultural Soils to the Human Food Chain // Biogeochemistry of Trace Metals. 2017. P. 121-170. CRC Press.

6. Szolnoki Z.S., Farsang A., Puskás I. Cumulative impacts of human activities on urban garden soils: origin and accumulation of metals // Environmental Pollution. 2013. Vol. 177. P. 106-115.

7. Ok Y.S., Chang S.X., Gao B., Chung, H.J. SMART biochar technology–a shifting paradigm towards advanced materials and healthcare research // Environmental Technology & Innovation. 2015. Vol. 4. P. 206-209.

8. Проблемы деградации и восстановления продуктивности земель сельскохозяйственного назначения в России / Под ред. А.В. Гордеева, Г.А. Романенко. М.: Росинформагротех, 2008. 67 с.

9. Gallego S.M., Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales E.P., Benavides M.P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms // Environmental and Experimental Botany. 2012. Vol. 83. P. 33-46.

10. Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozef-czak M., Keunen E., Gielen H., Nawrot T. Cadmium stress: an oxidative challenge // Biometals. 2010. Vol. 23(5). P. 927-940.

11. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 439 с.

12. Naeem A., Saifullah Rehman M.Z.U., Akhtar T., Ok Y.S., Rengel Z. Genetic variation in cadmium accumulation and tolerance among wheat cultivars at the seedling stage // Communications in Soil Science and Plant Analysis. 2016. Vol. 47(5). P. 554-562.

13. Гладков Е.А. Получение растений, толерантных к ионам кадмия и свинца // Биотехнология. 2006. №4. С. 87-93.

14. Мохаммед С.Е., Каранова С.Л., Долгих Ю.И. Получение толерантных к ионам кадмия клеточных линий и растений пшеницы методом клеточной селекции // Мат. Всерос. конф. «Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений и грибов». Орел, 2010. С. 155-159.

15. Шуплецова О.Н., Широких И.Г. Повышение устойчивости ячменя к токсичности металлов и осмотическому стрессу путем клеточной селекции // Зерновое хозяйство России. 2015. №1 (37). С. 57-62.

16. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.

17. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев// Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154-171.

18. Маслова Т.Г., Попова И.А., Попова О.Ф. Критическая оценка спектрофотометрического метода количественного определения каротиноидов // Физиология растений. 1986. Т.39. Вып. 6. С. 615-619.

19. Муравьева Д.А., Бубенчикова В.Н., Беликов В.В. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего // Фармация. 1987. Т. 36. С. 28-29.

20. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P. 276-287.

21. Khan N.A., Singh S., Nazar R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress // Journal of Agronomy and Crop Science. 2007. Vol. 193(6). P. 435-444.

22. Ильин И.Б. Тяжелые металлы в системе почва – растение. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 151 с.

Сведения об авторах:

Широких Ирина Геннадьевна[1,2,3], доктор биол. наук, зав. лабораторией, ведущий научный сотрудник, профессор, e-mail: irgenal@mail.ru,

Шуплецова Ольга Наумовна[1,2], кандидат биол. наук, старший научный сотрудник, доцент,

Товстик Евгения Владимировна[1,2], кандидат биол. наук, научный сотрудник, доцент,

Огородникова Светлана Юрьевна[2,3], кандидат биол. наук, старший научный сотрудник, доцент,

Назарова Янина Иордановна[1], младший научный сотрудник, аспирант,

Березин Григорий Иванович[2], кандидат биол. наук, доцент

[1]ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», ул. Ленина, д. 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail:priemnaya@fanc-sv.ru,

[2]ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», ул. Московская, д.36, г. Киров, Российская Федерация, 610000,

[3]ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ГСП 2, ул. Коммунистическая, д. 28, г. Сыктывкар, Республика Коми, Российская Федерация, 167982, e-mail:directorat@ib.komisc.ru

Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka, 2018. Vol. 65, no. 4, pp. 19-29.

doi: 10.30766/2072-9081.2018.65.4.19-29

Comprehensive assessment of barley plants regenerated from resistant to cadmium callus lines

I.G. Shirokikh[1,2,3], O.N. Shupletsova [1,2], E.V. Tovstik[1,2], S.Yu. Ogorodnikova[2,3], Ya.I. Nazarova[1], G.I. Berezin[2]

[1] *Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V.Rudnitsky, Kirov, Russian Federation,*

[2]*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Vyatka State University», Kirov, Russian Federation,*

[3]*Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Brauch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation*

Accumulation of cadmium (Cd) in barley grain (*Hordeum vulgare* L.) and its subsequent transmission through food chains to humans and animals is a serious environmental problem. The creation of stress-tolerant varieties to reduce crop losses and bioaccumulation of toxic ions can contribute to the preservation of grain quality and increase the productivity of barley on cadmium-contaminated soils. In the process of cell selection in 2017 from the original genotype of barley 8730 × Omsk in callus cultures somaclonal variants (RA) and conducted among them the selection of toxicity-resistant 15 mg/l cadmium ion lines (RA_{Cd}) were obtained. Plants regenerated from callus were compared with the original genotype by physiological, biochemical and productive features, cadmium bioaccumulation in the conditions of vegetation experience. Plants were grown in normal conditions and against a provocative background of cadmium in 2017-2018. Symptoms of oxidative stress in plants were evaluated by the content of Malon dialdehyde in the leaves, the activity of superoxide dismutase, the accumulation of anthocyanins. Under stress, barley lines selected as a result of cell selection (in the medium with 15 mg/l Cd^{2+}), differed from regenerants obtained under normal conditions(without Cd^{2+}), and the initial genotype with higher antioxidant activity, chlorophyll (64 and 76%) and carotenoid (60 and 64%, respectively) content in leaves, seed productivity (1.3 and 4.5 times correspondently) and cadmium bioaccumulation in roots (5 and 100%, respectively). The obtained results indicate the feasibility of using cell engineering in breeding programs to improve the resistance of barley to cadmium toxicity.

Key words: *cadmium toxicity, soil background, barley, somaclonal variability, cell selection, plant regenerated, oxidative stress, stability, productivity, accumulation of cadmium*

References

1. Khan M.A., Khan S., Khan A., Alam M. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. Science of the Total Environment. 2017. Vol. 601. pp. 1591-1605.

2. Rizwan M., Ali S., Abbas T., Zia-ur-Rehman M., Hannan F., Keller C., Ok Y.S. Cadmium minimization in wheat: a critical review. Ecotoxicology and environmental safety. 2016. Vol. 130. pp. 43-53.

3. *Doklad o sostoyanii i ispol'zovanii zemel' sel'skokhozyaystvennogo naznacheniya za 2011 god*. [Report on the state and use of agricultural land for 2011]: Available at: http://www.mcx.ru/documents/ document /show/17135.133.htm (accessed: 24.01.2018).

4. *Metodicheskie rekomendatsii po gigienicheskomu obosnovaniyu PDK khimicheskikh veshchestv v pochve*. [Methodical recommendations for the hygienic justification of the MPC of chemical substances in soil]. Moscow: *Minzdrav SSSR*, 1982. 57 p.

5. Alloway B.J., Jackson, A.P. The Transfer of Cadmium from Agricultural Soils to the Human Food Chain. Biogeochemistry of Trace Metals. 2017. pp. 121-170. CRC Press.

6. Szolnoki Z.S., Farsang A., Puskás I. Cumulative impacts of human activities on urban garden soils: origin and accumulation of metals. Environmental Pollution. 2013. Vol. 177. pp. 106-115.

7. Ok Y.S., Chang S.X., Gao B., Chung, H.J. SMART biochar technologya shifting paradigm towards advanced materials and healthcare research. Environmental Technology & Innovation. 2015. Vol. 4. pp. 206-209.

8. *Problemy degradatsii i vosstanovleniya produktivnosti zemel' sel'skokhozyaystvennogo naznacheniya v Rossii*. [Problems of degradation and restoration of agricultural land productivity in Russia]. *Pod red. A.V. Gordeeva, G.A. Romanenko*. Moscow: *Rosinformagrotekh*, 2008. 67 p.

9. Gallego S.M., Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales E.P., Benavides M.P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. Environmental and Experimental Botany. 2012. Vol. 83. pp. 33-46.

10. Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Nawrot T. Cadmium stress: an oxidative challenge. Biometals. 2010. Vol. 23(5). pp. 927-940.

11. Kabata-Pendias A., Pendias Kh. *Mikroelementy v pochvakh i rasteniyakh*. [Trace elements in soils and plants]. Moscow: *Mir*, 1989. 439 p.

12. Naeem A., Saifullah Rehman M.Z.U., Akhtar T., Ok Y.S., Rengel Z. Genetic variation in cadmium accumulation and tolerance among wheat cultivars at the seedling stage. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 2016. Vol. 47(5). pp. 554-562.

13. Gladkov E.A. *Poluchenie rasteniy, tolerantnykh k ionam kadmiya i svintsa*. [Production of plants tolerant to cadmium and lead ions]. *Biotekhnologiya*. 2006. no. 4. pp. 87-93.

14. Mokhammed S.E., Karanova S.L., Dolgikh Yu.I. *Poluchenie tolerantnykh k ionam kadmiya kletochnykh liniy i rasteniy pshenitsy metodom kletochnoy selektsii*. [Obtaining cadmium tolerant cell lines and wheat plants that are tolerant to cadmium ions by cell selection]. *Mat. Vseros. konf. «Sovremennye aspekty strukturno-funktsional'noy biologii rasteniy i gribov»*. [Mat. of All-Russian Conf. "Modern aspects of the structural and functional biology of plants and fungi"]. Orel, 2010. pp. 155-159.

15. Shupletsova O.N., Shirokikh I.G. *Povyshenie ustoychivosti yachmenya k toksichnosti metallov i osmoticheskomu stressu putem kletochnoy selektsii*. [Increase of barley resistance to toxicity of metals and osmotic stress by cell selection]. *Zernovoe khozyaystvo Rossii*. 2015. no.1 (37).pp. 57-62.

16. Lukatkin A.S. *Kholodovoe povrezhdenie teplolyubivykh rasteniy i okislitel'nyy stress*. [Cold damage to heat-loving plants and oxidative stress]. Saransk: *Izd-vo Mordov. un-ta*, 2002. 208 p.

17. Shlyk A.A. *Opredelenie khlorofillov i karotinoidov v ekstraktakh zelenykh list'ev*. [Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts]. *Biokhimicheskie metody v fiziologii rasteniy*. Moscow: Nauka, 1971. pp. 154-171.

18. Maslova T.G., Popova I.A., Popova O.F. *Kriticheskaya otsenka spektrofotometricheskogo metoda kolichestvennogo opredeleniya karotinoidov*. [Critical evaluation of the spectrophotometric method for quantitative determination of carotenoids]. *Fiziologiya rasteniy*. 1986. Vol.39. Iss. 6. pp. 615-619.

19. Murav'eva D.A., Bubenchikova V.N., Belikov V.V. *Spektrofotometricheskoe opredelenie summy antotsianov v tsvetkakh vasil'ka sinego*. [Spectrophotometric determination of the amount of anthocyanins in the flowers of cornflower blue]. *Farmatsiya*. 1987. Vol. 36. pp. 28-29.

20. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. pp. 276-287.

21. Khan N.A., Singh S., Nazar R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. Journal of Agronomy and Crop Science. 2007. Vol. 193(6). pp. 435-444.

22. Il'in I.B. *Tyazhelye metally v sisteme pochva – rastenie*. [Heavy metals in soil-plant system]. Novosibirsk: *Nauka. Sib. otd-nie*, 1991. 151 p.

Information about the authors:
I.G. Shirokikh[1,2,3], DSc in Biology, head of the laboratory, leading researcher, professor,
O.N. Shupletsova[1, 2], PhD in Biology, senior researcher, associate professor,
E.V. Tovstik[1,2], PhD in Biology, researcher, associate professor,
S.Yu. Ogorodnikova[2,3], PhD in Biology, senior researcher, associate professor,
Ya.I. Nazarova[1], junior researcher, postgraduate student,
G.I. Berezin[2], PhD in Biology, associate professor

[1]Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V.Rudnitsky, Lenina str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, e-mail:priemnaya@fanc-sv.ru,
[2]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Vyatka State University», Moskovskaya street, 36, Kirov, Russian Federation, 610000,
[3]Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Brauch of the Russian Academy of Sciences, Kommunisticheskaya street, 28, GSP 2, Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation, 167982,
e-mail:directorat@ib.komisc.ru