ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

DOI 10.21178/2079–6080.2022.3.25
УДК 630*161.443.6:57.085

Ответные реакции березы на воздействие кадмия в условиях *in vitro*

© Т.М. Табацкая[1], Н.И. Внукова[1], О.С. Машкина[1,2]

Birch responses to *in vitro* cadmium exposure

T.M. Tabatskaya, N.I. Vnukova, O.S. Mashkina (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology; Voronezh State University)

In vitro stress modeling is a promising biotechnological approach to plants study and selection for resistance to negative environmental factors (drought, soil salinization, pollution from heavy metals, etc.). In this paper we studied the effects of different concentrations (10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M and 2×10^{-4}M) of cadmium as an agent of toxic and osmotic stress on *in vitro* growth and preservation rate of four species: silver birch, Karelian birch, dalecarlica birch and downy birch. We determined the proline level and evaluated the response of different clones to cadmium exposure at cellular level. The study demonstrated that heavy metal at concentrations ranging from 10^{-6}M to 2×10^{-4}M had a negative effect on growth and preservation of the plants studied, though the reaction of a specific clone (in this article we analyzed 11 clones) depended on its genotypic (species-related) characteristics. Clones of downy birch showed the best cadmium tolerance. We found the sub-lethal concentrations of cadmium (10^{-4} M) and the duration of its exposure (30 days), that allowed us to differentiate the studied clones by their response to the stress factor into «stable» and «sensitive» ones. The addition of cadmium to the nutrient medium induced the free-proline accumulation in birch leaves. The level of proline depended on concentration of the stressor and on genotypic characteristics of the clone. So-called «stable» clones showed higher abilities to form proline, the most active in this regard being two clones of downy birch and dalecarlica birch. The birch adaptive-defence mechanism as a response to cadmium exposure had been manifested in a significant increase (6.5–14 times) in the proportion of cells with residual nucleoli in metaphase and anaphase of mitosis. This fact can serve as a proxy indicator of changes in gene expression (in particular, rRNA genes) and of a boost in metabolic activity of meristem cells. The results obtained confirm that the studied indicators can be used as morpho-physiological and cytological markers in selection of *in vitro* birch plants for stress resistance.

Key words: birch, cadmium, *in vitro*, growth, preservation, proline, residual nucleoli

Ответные реакции березы на воздействие кадмия в условиях *in vitro*

Т.М. Табацкая, Н.И. Внукова, О.С. Машкина

Моделирование стресса в культуре *in vitro* – перспективный биотехнологический подход для изучения и отбора растений на устойчивость к негативным факторам среды (засухе, засолению почв, загрязнению тяжелыми металлами и др.). Исследовано действие кадмия (как агента токсического и осмотического стрессов) в разных концентрациях (10^{-6}М, 10^{-5}М, 10^{-4}М и 2×10^{-4}М) на рост и сохранность растений четырех видов березы (повислой, карельской, далекарлийской и пушистой) в культуре *in vitro*. Также определялся уровень пролина, оценивалась ответная реакция разных клонов на клеточном уровне. Тяжелый металл (в диапазоне концентраций от 10^{-6}М до 2×10^{-4}М) оказывал негативное влияние на сохранность и рост растений березы, однако, реакция клонов зависела от их генотипических (видовых) особенностей. Наибольшую толерантность к кадмию проявили клоны березы пушистой. Определена сублетальная концентрация кадмия (10^{-4}М) и экспозиция его воздействия (30 суток), позволившие дифференцировать изученные клоны на «устойчивые» и «чувствительные» к воздействию стрессора. Присутствие кадмия в питательной среде индуцировало накопление свободного пролина в листьях растений березы, уровень которого зависел от концентрации стрессора и генотипических особенностей клонов. Более высокую пролинообразующую способность проявили «устойчивые» клоны – березы пушистой и березы далекарлийской. Защитно-приспособительная реакция березы на воздействие кадмия проявилась и в существенном (6,5–14-кратном) увеличении доли клеток с остаточными ядрышками в метафазе и анафазе митоза, что может служить косвенным показателем изменения характера экспрессии генов (в частности, генов рРНК), повышения метаболической активности клеток меристемы. Полученные результаты подтверждают возможность использования изученных показателей в качестве морфофизиологических и цитологических маркеров в исследованиях по селекции на стрессоустойчивость березы в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: береза, кадмий, *in vitro*, рост, сохранность, пролин, остаточные ядрышки

Табацкая Татьяна Михайловна – старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: tatyana.tabacky@gmail.com

Внукова Наталья Ивановна – научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: natalya.vnuckova@yandex.ru

Машкина Ольга Сергеевна – заведующая лабораторией биотехнологии ВНИИЛГИСбиотех, доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, канд. биол. наук

E-mail: mashkinaos@mail.ru

[1]ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии» (ВНИИЛГИСбиотех)

304087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105

E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

[2]ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

304018, Воронеж, Университетская пл., 1

Телефон: +7(473)220–88–76

Введение

Растения (в том числе лесные древесные) подвержены воздействию множества абиотических стрессов (засуха, засоление почв, загрязнение тяжелыми металлами и др.), оказывающих негативное влияние на их рост и развитие. К наиболее распространенным стресс-факторам относятся засуха и засоление [15, 27]. Так, например, аномально сильная засуха 2010 г. в европейской части России привела к частичному (и даже к массовому в отдельных районах) усыханию деревьев березы повислой [5]. В связи с усилением негативных природных явлений и техногенных воздействий селекция на устойчивость к различным факторам стресса в последние годы приобрела особую актуальность.

Для изучения стресс-реакций, получения и отбора устойчивых генотипов в настоящее время используются методы биотехнологии. К числу перспективных направлений относится клеточная и тканевая селекция *in vitro*. В значительной степени это объясняется тем, что изолированные ткани растений в условиях *in vitro* проявляют повышенную чувствительность к стрессовым воздействиям. Кроме того, подобные опыты отличаются строго контролируемыми условиями культивирования, воспроизводимостью экспериментов в короткие сроки, возможностью быстрого клонального размножения единичных отобранных экземпляров.

Моделирование стрессов, имитирующих естественные, например, засоление, дефицит воды, проводится в основном на травянистых растениях [7, 8, 18]. Исследования, выполненные по селекции *in vitro* на лесных древесных растениях немногочисленны [3, 20, 24]. Так, было показано, что степень солеустойчивости растений тополя и ивы (определенная по интенсивности роста и ризогенезу микрочеренков в условиях засоления NaCl *in vitro*) значительно различалась у разных генотипов [24].

Береза является одной из лесообразующих и хозяйственно ценных пород России, а также важной породой для защитного лесоразведения в южных регионах страны. При создании искусственных насаждений необходимо иметь не только продуктивные, но и устойчивые к засухе и засолению формы. В пользу выбора березы в качестве объекта наших исследований послужило и наличие большого генетического разнообразия (виды, гибриды, полиплоиды), представленного в коллекции *in vitro* клонов ценных генотипов лиственных древесных растений ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех».

Среди многочисленных загрязнителей окружающей среды наиболее токсичными считаются тяжелые металлы, поражающий эффект которых заметно усиливается при повышении температуры среды, колебаниях объемов осадков. Токсичность кадмия, одного из наиболее агрессивных металлов, выражается в нарушении окислительно-восстановительных процессов в клетках растений, угнетении активности ферментных систем, подавлении основных физиологических процессов (фотосинтеза, водного обмена, дыхания, минерального питания, роста и развития), нарушении цитоплазматических и ядерных структур клетки [6,15].

Кадмий обладает не только токсическим, но и осмотическим действием. Под его влиянием изменяется водный (в том числе, осмотический) потенциал, что рассматривается в качестве одного из наиболее важных элементов адаптивной стратегии растений [23]. На примере сельскохозяйственных растений показана возможность использования ионов кадмия в клеточной селекции *in vitro* в качестве осмотического стрессора (способного влиять на транспорт воды в клетке) для отбора устойчивых к водному дефициту вариантов [13]. Согласно литературным данным, скорость и интенсивность ответных реакций на воздействие данного стрессора различна в зависимости от вида растения [6, 15, 20]. Относительно древесных растений данные реакции еще недостаточно изучены.

Имеются сведения об изменении морфофизиологических показателей *Betula pendula* и *B. pendula* Roth var. *carelica* (рост и укоренение

побегов, содержание пигментов и жирнокислотного состава) в зависимости от концентрации кадмия в питательной среде [3, 9].

Цель выполненной нами работы состояла в выявлении особенностей ответных реакций березы на воздействие кадмия в условиях *in vitro* для разработки системы отбора стрессоустойчивых регенерантов. В задачи исследования входило изучение влияния разных концентраций азотнокислого кадмия в составе питательной среды на сохранность и рост микрорастений четырех видов березы, их цитологические показатели и уровень пролина (который рассматривают как один из биохимических показателей стрессоустойчивости растений).

Объекты и методы исследования

Материалом для исследований служили микрорастения коллекционных клонов березы повислой (*Betula pendula* L.), карельской (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti), далекарлийской (*B. pendula* f. *'dalecarlica'* (L.f.) Schneid) и пушистой (*B. pubescens* Ehrh.). Микрорастения из коллекции in vitro размножали черенкованием на безгормональной питательной среде [10, 14]. Использовали среду Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макросолей (½ MS) [26]. Береза карельская с узорчатой текстурой древесины и береза далекарлийская с рассеченными листьями считаются разновидностями березы повислой. Тем не менее, приводятся факты, свидетельствующие о необходимости выделения березы карельской в самостоятельный биологический вид [4].

Экспланты – микрочеренки растений с одной пазушной почкой длиной 1–1,5 см. Для получения сопоставимых данных высадку эксплантов исследуемых клонов проводили одновременно для всех 4 опытных вариантов и контроля. Микрочеренки помещали по 5 шт. в стеклянные конические колбы объемом 100 мл, закрытые колпачками из алюминиевой фольги. Провокационный фон (селективные условия) в опытных вариантах создавали добавлением в питательную среду ½ MS кадмия в виде азотнокислой соли $Cd(NO_3)_2$ в ряде мольных концентраций – 10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M, 2×10^{-4}M [3]. В контроле (неселективные условия) использовали аналогичную среду без добавления кадмия.

Для каждого варианта (опытного и контрольного) испытано два цикла культивирования: 50 суток (20 суток на селективной среде с кадмием, 30 – на среде без кадмия) и 60 суток (30 суток в селективных условиях, 30 – неселективных условиях). Режим культивирования: температура 25 ± 2,0 °C, фотопериод 16 ч, освещенность 2,0 клк.

Устойчивость культур к заданному стрессу оценивали по сохранности и росту микрорастений через 20 и 30 суток от начала культивирования, изменению их морфологических признаков, способности к накоплению пролина как на селективных средах, так и в период восстановления (в неселективных условиях). Оценку морфометрических показателей проводили не менее чем на 20 растениях каждого исследуемого клона в отдельном опытном варианте.

Цитологический анализ проводили с использованием корневой меристемы микрорастений березы. Молодые корешки размером 1–1,5 см фиксировали в уксусном алкоголе (3:1). Давленые препараты, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по методике [16] в нашей модификации. Определяли частоту нарушений митоза и частоту встречаемости остаточных ядрышек в митозе. Для каждого образца (микрорастения) просматривали по 5 препаратов, учитывали не менее 500–600 клеток на стадиях мета-, ана- и телофазы митоза. Просмотр препаратов проводили на световом микроскопе AXIO Lab. A1 (CarlZeiss Microscopy GmbH, Германия) с использованием объектива 40×. Микрофотосъемку осуществляли с помощью цифровой камеры AxioCam ICc 1. Частоту нарушений митоза вычисляли как процентное отношение числа клеток с нарушениями на всех стадиях митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток.

Определение количества свободного пролина в тканях (листьях) микрорастений проводили

на 20-е сутки эксперимента по методике [17, 19] в нашей модификации. Пробы для анализа отбирали с 8 до 9 часов утра (время максимально активного синтеза пролина) [12]. Навеску из листьев (10 мг) заливали в пробирке 3 мл кипящей дистиллированной воды и на 30 мин помещали на водяную баню (100 °С). Экстракт листьев (1 мл) помещали в сухую пробирку. Туда же добавляли 1 мл ациднингидринового реактива (1,25 г нингидрина, 30 мл ледяной уксусной кислоты, 20 мл 6М раствора H_3PO_4), приготовленного при нагревании, и 1 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь реагентов в закрытой пробирке инкубировали в течение 1 часа на кипящей водяной бане. Реакцию останавливали, погружая пробирки в холодную воду со льдом (2 °С), а затем нагревали до комнатной температуры (для корректной работы спектрофотометра). Оптическую плотность продуктов реакции экстракта листьев с кислым нингидриновым реактивом измеряли при длине волны 520 нм на спектрофотометре UNICO 2800. Калибровочную кривую строили по кристаллическому L-пролину (99 %, Panreac). Содержание пролина в образцах рассчитывали в мкмоль (мкМ) на 1 г свежей массы.

Каждый эксперимент проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ Stadia и Microsoft Excel, а сравнение выборок – с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Универсальным интегральным показателем поражающего воздействия на растения неблагоприятных факторов среды, в том числе тяжелых металлов, является изменение ростовых характеристик [1, 25, 28]. Нами показано (табл. 1), что низкие концентрации кадмия (10^{-5}М и 10^{-6}М) не оказывали заметного негативного влияния на рост березы в первой фазе (20 суток культивирования) развития побега (раскрытие почки и формирование нового побега). При более продолжительном (30-суточном) культивировании на селективной среде с кадмием в количестве 10^{-5}М для трех из четырех видов березы отмечено незначительное снижение роста побегов в высоту.

Таблица 1

Рост в высоту микрорастений березы в зависимости от концентрации и продолжительности воздействия кадмия на питательной среде ½MS

Вид березы	Экспозиция (сутки)	Высота микрорастений (см) при разных концентрациях кадмия				
		10–6М	10–5М	10–4М	2×10–4 М	Контроль
Б. пушистая	20	2,9 ± 0,10	2,4 ± 0,10	1,2 ± 0,103	0,6 ± 0,103	2,2 ± 0,10
	30	4,9 ± 0,05	3,9 ± 0,202	2,1 ± 0,103	1,1 ± 0,103	5,0 ± 0,10
Б. карельская	20	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,10	0,5 ± 0,021	0,0	0,7 ± 0,10
	30	2,8 ± 0,05	2,1 ± 0,102	1,1 ± 0,103	0,4 ± 0,103	2,9 ± 0,20
Б. повислая	20	1,8 ± 0,20	2,0 ± 0,02	0,5 ± 0,203	0,0	1,8 ± 0,10
	30	3,4 ± 0,10	3,3 ± 0,10	1,6 ± 0,043	0,0	3,4 ± 0,10
Б. далекарлийская	20	2,3 ± 0,10	2,2 ± 0,20	1,2 ± 0,103	0,75 ± 0,103	2,5 ± 0,10
	30	3,7 ± 0,102	3,6 ± 0,103	1,8 ± 0,043	1,0 ± 0,083	4,4 ± 0,10
Среднее	20	1,8 ± 0,10	1,8 ± 0,10	0,8 ± 0,103	0,3 ± 0,063	1,8 ± 0,10
	30	3,6 ± 0,10	3,2 ± 0,102	1,6 ± 0,103	0,6 ± 0,103	3,9 ± 0,10

Примечания. 1) Различия с контролем статистически значимы при: 1 – $P < 0,05$; 2 – $P < 0,01$; 3 – $P < 0,001$.

2) Для каждого вида березы представлено среднее значение из 3–4 клонов.

При дальнейшем увеличении дозы кадмия до 10^{-4}М проявилась его выраженная токсичность для всего экспериментального материала. Отмечено торможение роста побегов более чем в два раза по сравнению с контролем: при продолжительности воздействия стрессора в течение 20 суток средние значения высот составили 0,8 см (против 1,8 см в контроле), а при воздействии в течение 30 суток – 1,6 см (против 3,9 см в контроле).

Данные, полученные при двукратном увеличении дозы стрессора (2×10^{-4}М) выявили максимальную (в среднем в 6 раз) степень снижения роста побегов. При полном (100 %) отсутствии возобновления побегообразования клонов березы повислой остальные культуры по кратности снижения роста после 30-суточного воздействия кадмия можно расположить в следующем порядке: карельская береза – в 7,2 раза; береза пушистая – в 4,5 раза и береза далекарлийская – в 4 раза. То есть, на общем фоне многократного снижения роста побегов степень его проявления заметно варьировала – от 0,4 см (Б. карельская) до 1,1 см (Б. пушистая) при 30-суточном культивировании в опытном варианте – 2×10^{-4}М. Таким образом, реакция растений на действие кадмия зависела от генотипических (видовых) особенностей экспериментальных образцов. Наиболее толерантными к кадмию в условиях проведенного эксперимента были береза пушистая и береза далекарлийская, у которых отмечено наименьшее ингибирование роста побегов.

Полученные данные согласуются с литературными в том, что жизнеспособность растений в стрессовых условиях сопровождается торможением ростовых процессов, являясь защитно-приспособительной реакцией [9, 20, 22, 29]. Она объясняется тем, что тяжелые металлы, в том числе и кадмий, оказывают прямое действие на деление и растяжение клеток и косвенное – на эффективность минерального питания [8, 21].

Негативное влияние кадмия сказалось и на сохранности образцов (рис. 1 и 2). Снижение количества выживших растений для всего экспериментального материала отмечено начиная с концентрации кадмия 10^{-5}М. Однако степень проявления данной реакции березы зависела от ее видовых особенностей. Наименьшим снижением сохранности культур (на 10,7 %) характеризовались клоны березы пушистой, наибольшим (на 42,7 %) – клоны карельской березы.

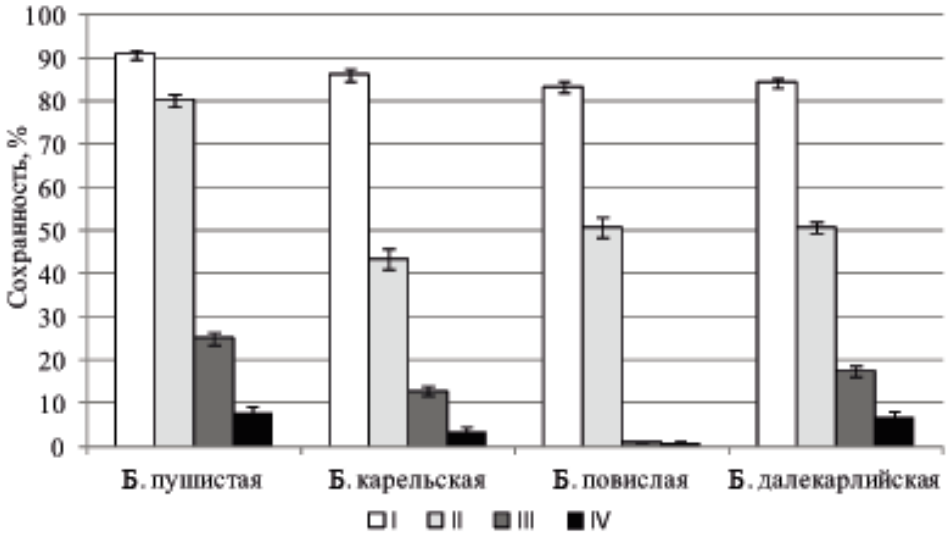
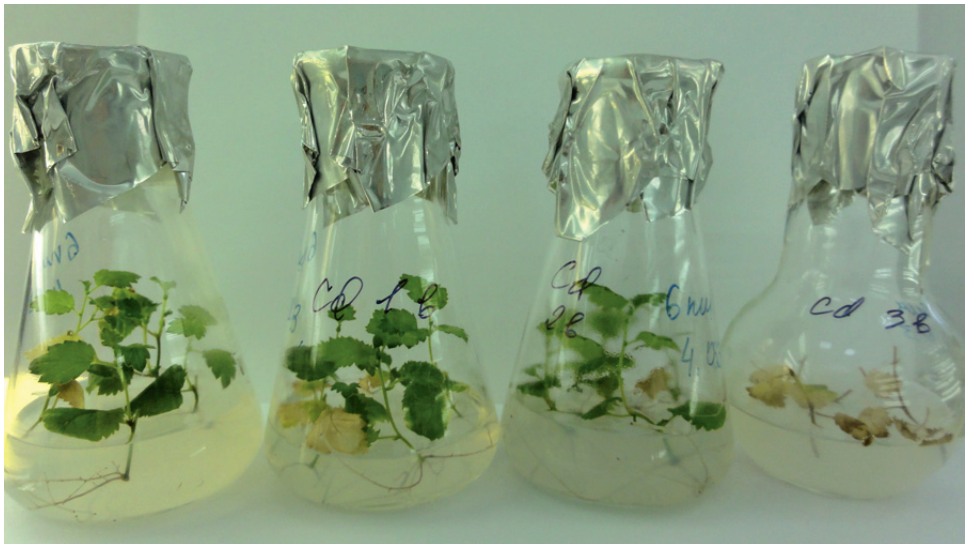


Рис. 1. Сохранность культур березы при воздействии кадмия разной концентрации (II–IV варианты) в течение 30 суток *in vitro* по сравнению с контролем (I): II –10^{-5} М, III – 10^{4} М, IV – 2×10^{-4}М. Для каждого вида березы представлено среднее значение из 3–4 клонов

Увеличение концентрации стрессора в питательной среде до 10–4М сопровождалось значительным снижением сохранности микрорастений для всех клонов березы. Максимальное количество выживших культур (клоны Б. пушистой) не превышало 25 % против 90,9 % в контроле. При двукратном увеличении концентрации металла в среде (2×10^{-4}М) сохранность культур сократилась многократно: для березы пушистой в 11 раз, березы далекарлийской – в 12 раз, березы карельской – в 25 раз по сравнению с контролем, при полной гибели культур березы повислой.

Таким образом, в условиях заданного стресса межвидовые различия наиболее ярко проявились по признаку «сохранность культур». Максимальное количество выживших культур в каждом из 4 вариантов концентрации кадмия демонстрируют клоны березы пушистой – от 7,9 до 80,2 % против 90,9 % в контроле. В аналогичных условиях сохранность клонов березы карельской составила от 3,3 до 43,3 % против 86,0 % в контроле, а березы повислой – от 0 до 43,3 % против 84,2 % в контроле.



0 10^{-5}М 10^{-4}М 10^{-3}М

Рис. 2. Сохранность микрочеренков одного из клонов березы пушистой при возрастании концентрации Cd^{2+} в питательной среде ½MS

Считают, что сохранность культур при воздействии кадмия определяется способностью металла накапливаться в клетках растений до токсических концентраций, а также нарушением процессов его детоксикации [18, 21]. Так, в работе Л.В. Ветчинниковой с соавт. [3] показано, что с увеличением концентрации кадмия от 10^{-6}М до 10^{-3}М в питательной среде *in vitro* происходило его накопление в побегах березы повислой и карельской, а при токсической концентрации 10^{4}М наблюдался некроз пораженных клеток, что в целом подтверждают и наши экспериментальные данные, которые также демонстрируют их наибольшую чувствительность к кадмию (из 4-х испытанных видов березы).

Часть выживших микрорастений характеризовались измененным морфотипом с различными отклонениями: недоразвитием листовых пластин, отклонением от нормы длины междоузлий, верхушечным некрозом, хлорозом. Причем выраженная токсичность кадмия по данному признаку отмечена при увеличении концентрации до 2×10^{-4}М. В остальных опытных вариантах количество культур с морфологическими отклонениями ограничивалось единичными образцами.

Наблюдаемые нами морфологические реакции березы могут быть связаны с изменением фи-

зиологического состояния растений в условиях стресса, в частности, нарушением процессов фотосинтеза. Как отмечает ряд исследователей [3, 7, 9], хлороз листьев является визуальным проявлением снижения интенсивности синтеза хлорофилла, связанного с нарушения структуры внешней мембраны хлоропластов и мембран тилакоидов. Недоразвитие листовых пластин может быть результатом нарушения процесса минерального питания [15], негативного влияния металла на процессы деления и растяжения клеток [9, 21].

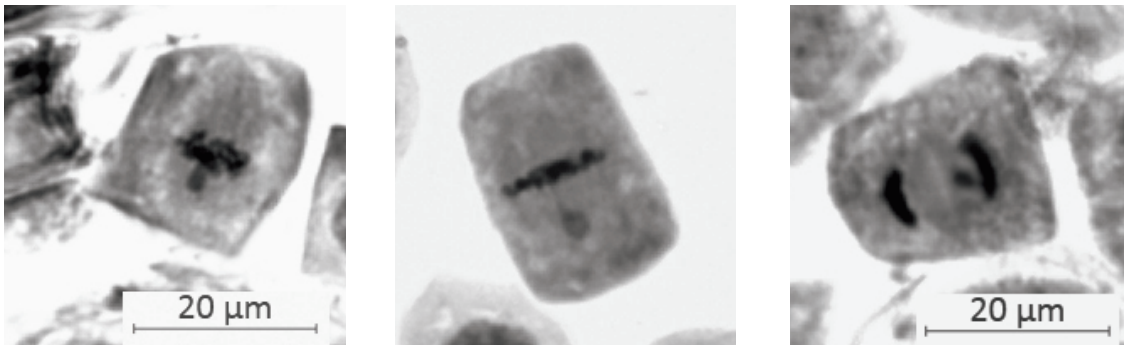
Реакция клонов березы на воздействие кадмия проявилась и на клеточном уровне. На примере клонов березы пушистой (3пш, 6пш) и березы далекарлийской (R2) показано, что при содержании кадмия в концентрации 2×10–4М в питательной среде происходило существенное увеличение частоты нарушений митоза – в 2,5–4,7 раза по сравнению с контролем (табл. 2). Кроме того, наблюдалось значительное возрастание доли клеток с остаточными ядрышками в метафазе и анафазе митоза (в 6,5–14 раз) (рис. 3), что может служить косвенным показателем изменения характера экспрессии генов (в частности, генов рРНК), повышения метаболической активности клеток меристемы. Известно, что в норме ядрышки исчезают в конце профазы митоза, когда приостанавливается синтез рРНК. Появление остаточных ядрышек в метафазе и анафазе митоза при высокой конденсации хромосом рассматривают как проявление эпигенетической изменчивости [2].

Таблица 2

Влияние кадмия на цитогенетические показатели клонов березы пушистой и березы далекарлийской в культуре *in vitro*

Вид, клон	Вариант	Число изученных клеток		
		Всего, шт.	В том числе с нарушениями в митозе, %	Доля клеток с остаточными ядрышками, %
Береза пушистая, 3пш	Контроль	209	1,3 ± 0,20	0,8 ± 0,20
	Опыт 2×10^{-4} М	330	3,2 ± 0,50[2]	6,2 ± 0,10[3]
Береза пушистая, 6пш	Контроль	403	1,1 ± 0,10	0,4 ± 0,10
	Опыт 2×10^{-4} М	226	3,3 ± 0,30[3]	5,8 ± 0,60[3]
Береза далекарлийская, R2	Контроль	215	1,6 ± 0,30	0,8 ± 0,20
	Опыт 10^{-4} М	332	1,5 ± 0,20	2,7 ± 0,10[3]
	Опыт 2×10^{-4} М	400	7,5 ± 1,10[3]	5,2 ± 0,60[3]

Примечание. Различия с контролем статистически значимы при: 2 – $P < 0,01$; 3 – $P < 0,001$.



1 2 3

Рис. 3. Клетки с остаточными ядрышками в метафазе (1, 2) и анафазе (3) митоза в корневой меристеме микропобегов березы пушистой в условиях засоления $Cd(NO_3)_2$ *in vitro*

По данным роста и сохранности культур *in vitro* в опытных вариантах исследуемые клоны были условно дифференцированы на «устойчивые» к воздействию кадмия (клоны 6пш и 3пш березы пушистой; клон R2 березы далекарлийской) и «чувствительные» (клон 2пш березы пушистой, клон R1 березы далекарлийской, клон Ю березы карельской).

Накопление в растительной ткани низкомолекулярных соединений (в частности, аминокислоты пролина, выполняющей роль осморегулятора и протектора) в ответ на засуху, засоление, действие солей тяжелых металлов и др. рассматривают как один из биохимических показателей стрессоустойчивости [7, 11, 12].

Нами проведены исследования по выявлению возможной связи между уровнем устойчивости растений к воздействию кадмия и способностью к интенсивному синтезу пролина в группе «устойчивых» и «чувствительных» клонов. В ходе эксперимента установлено, что клоны березы уже в контроле (при отсутствии стрессора) различались по содержанию пролина. «Устойчивые» клоны имели относительно низкие значения (от 4,7 до 5,8 мкМ/г с. в., при среднем показателе 5,3), а «чувствительные» – более высокие (5,4 – 8,4 мкМ/г с. в., при среднем показателе 6,8) (табл. 3).

Таблица 3

Содержание пролина в листьях микрорастений разных клонов березы в зависимости от концентрации кадмия в питательной среде ½MS

Вид, клон	Содержание пролина				
	Контроль	Опыт			
		$C_{Cd} = 10^{-5}$ М		$C_{Cd} = 10^{-4}$ М	
	Абс. величина, мкМ/г с. в.	Абс. величина, мкМ/г с. в.	Отн. контроля, %	Абс. величина, мкМ/г с. в.	Отн. контроля, %
	«Устойчивые»*				
Береза пушистая, 6пш	5,5 ± 0,30	8,0 ± 0,42[1]	146,5	17,4 ± 0,42[3]	318,1
Береза пушистая, 3пш	4,7 ± 0,31	17,5 ± 0,84[2]	372,6	37,1 ± 0,65[3]	787,3
Береза далекарлийская, R2	5,8 ± 0,40	17,7 ± 0,31[3]	303,9	43,8±0,763	749,6
Среднее	5,3 ± 0,24	14,4 ± 0,52[3]	274,3	32,7 ± 0,723	618,3
	«Чувствительные»*				
Береза пушистая, 2пш	5,4 ± 0,18	6,8 ± 0,43	125,6	8,9 ± 0,23[2]	165,8
Береза пушистая, R1	6,8 ± 0,69	5,9 ± 0,18[1]	88,1	7,0 ± 0,51	104,9
Береза карельская, Ю	8,4 ± 0,33	9,1 ± 0,66	109,4	9,4 ± 0,64[1]	112,9
Среднее	6,8 ± 0,42	7,3 ± 0,39	107,7	8,5 ± 0,58[1]	127,9

Примечания. 1) * – устойчивость к воздействию кадмия (по данным предшествующих экспериментов).
2) Различия между контролем и опытом достоверны при: 1 – $P < 0,05$; 2 – $P < 0,01$; 3 – $P < 0,001$.

Для большинства клонов березы в опытных вариантах количество пролина в листьях существенно превышало контрольные значения. Причем с повышением концентрации кадмия (от 10^{-5}М до 10^{-4}М) наблюдалось увеличение его содержания. В большей степени способностью к синтезу этой аминокислоты отличались «устойчивые» клоны, показатели которых в обоих опытных вариантах в 2,5–4,8 раза превыша-

ли «чувствительные» и составляли относительно контроля в среднем 274,3 и 618,3 %, 107,7 и 127,9 % соответственно. Таким образом, присутствие кадмия в условиях *in vitro* активировало накопление пролина в листьях микрорастений березы, уровень которого зависел от концентрации стрессора в питательной среде и генотипических особенностей изученных клонов. При этом увеличение количества пролина наиболее выражено для клона березы пушистой (3пш) и березы далекарлийской (R2).

Заключение

Из полученных данных следует, что моделирование стресса в культуре *in vitro* с использованием селективных питательных сред, содержащих ионы кадмия (как агента токсического и осмотического стрессов) в концентрации 10^{-4}М, при продолжительности воздействия в течение 30 суток позволяет дифференцировать клоны разных видов березы на «устойчивые» и «чувствительные». Показано, что ответная реакция клонов на воздействие кадмия зависела от их генотипических (в том числе, видовых) особенностей. Для дифференциации клонов березы возможно использование комплекса информативных и доступных для учета показателей: наименьшее снижение роста побегов в высоту по сравнению с контролем; сохранение жизнеспособности культур и их регенерационного потенциала; повышение содержания свободного пролина в листьях экспериментальных образцов; существенное увеличение доли клеток с остаточными ядрышками в метафазе и анафазе митоза.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУ «ВНИИЛГИСбиотех» (№ АААА-А20–120012890092–6), установленного Федеральным агентством лесного хозяйства.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аминева, Е.Ю. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях / Е.Ю. Аминева, Т.М. Табацкая, О.С. Машкина, В.Н. Попов // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2017. – № 1. – С. 14–22.
2. Буторина, А.К. Ритмы суточной митотической активности у золотистой фасоли *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek / А.К. Буторина, Д.Н. Тиен // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 8. – С. 729–733.
3. Ветчинникова, Л.В. Влияние кадмия на морфо- и органогенез березы *in vitro* / Л.В. Ветчинникова, Т.Ю. Кузнецова, А.Ф. Титов // Труды Карельского научного центра РАН. – 2014. – № 5. – С. 174–181.
4. Ветчинникова, Л.В. Карельская береза: разновидность или самостоятельный вид? / Л.В. Ветчинникова, А.Ф. Титов // ИВУЗ. Лесной журнал. – 2020. – № 1. – С. 26–48.
5. Газизуллин, А.Х. Состояние березняков возвышенного Заволжья Республики Татарстан после засухи 2010 года / А.Х. Газизуллин, И.К. Сингатуллин // Вестник КазГАУ. – 2014. – № 2 (32). – С. 99–103.
6. Гончарук, Е.А. Тяжелые металлы: поступление, токсичность и защитные механизмы растений (на примере ионов кадмия) / Е.А. Гончарук, Н.В. Загоскина // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2017. – Вып. 1 (40). – С. 35–49.
7. Данилова, Е.Д. Влияние хлоридного засоления на ростовые и физиологические процессы растений Solanum tuberosum L. среднеспелых сортов / Е.Д. Данилова, Ю.В. Медведева, М.В. Ефимова // Вестник Томского государственного университета. – Биология. – 2018. – № 44. – С. 158–171.
8. Егорова, Н.А. Оптимизация приемов клеточной селекции лаванды на устойчивость к низкотемпературному стрессу / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // Материалы V межд. научно-практич. конф. «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки». – Симферополь : Ариал, 2020. – С. 175–177.

9. Кузнецова, Т.Ю. Влияние кадмия на морфо-физиологические показатели березы *in vitro* / Т.Ю. Кузнецова, В.Ф. Титов, Л.В. Ветчинникова // Лесной журнал. – 2008. – № 3. – С. 40–45.

10. Машкина, О.С. Технология долгосрочного хранения в культуре *in vitro* ценных генотипов березы и выращивание на ее основе посадочного материала / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, Н.И. Внукова // Биотехнология. – 2019. – Т. 35, № 3. – С. 57–67.

11. Морозова, М.Е. Влияние солей тяжелых металлов на синтез пролина *Lemna minor* L. / М.Е. Морозова, Т.В. Сторчак // Вестник Нижневартовского государственного университета. – Экология и природопользование. – 2017. – № 4. – С. 119–124.

12. Сергеева, Л.Е. Содержание свободного пролина как показатель жизнедеятельности клеточной культуры *Nicotiana tabacum* L. при стрессе / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова, Е.Н. Тищенко // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 87–94.

13. Сергеева, Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для отбора форм пшеницы и кукурузы, устойчивых к осмотическим стрессам / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2018. – Т. 22. – С. 318–322.

14. Табацкая, Т.М. Опыт долговременного хранения коллекции ценных генотипов березы с использованием безгормональных питательных сред / Т.М. Табацкая, О.С. Машкина // Лесоведение. – 2020. – № 2. – С. 147–161.

15. Титов, А.Ф. Тяжелые металлы и растения / А.Ф. Титов, Н.М. Казнина, В.В. Таланова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.

16. Топильская, Л.А. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленых препаратах / Л.А. Топильская, С.А. Лучникова, Н.П. Чувашина // Бюллетень ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1975. – Вып. 22. – С. 58–61.

17. Шихалеева, Г.Н. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах / Г.Н. Шихалеева, А.К. Будняк, И.И. Шихалеев, О.Л. Иващенко // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. - 2014. – Вып. 21. - № 1112. - С. 168–172.

18. Шуплецова, О.Н. Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе / О.Н. Шуплецова, И.Н. Щенникова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, № 5. – С. 623–628.

19. Bates, L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies / L.S. Bates, R.P. Waldeen, I.D. Teare // Plant Soil. – 1973. – V. 39, № 1. – P. 205–207.

20. Fernández, R. Cadmium accumulation and its effect on the *in vitro* growth of woody fleabane and mycorrhized white birch / R. Fernández, A. Bertrand, A. Casares, R. García, R.S. Tamés // Environmental Pollution. – 2008. – V. 152, № 3. – P. 522–529.

21. Hall, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance / J.L. Hall // J. Experimental Botany. – 2002. – V. 53, № 366. – P. 1–11.

22. Jan, N. Developing stress-tolerant plants through *in vitro* tissue culture: family *Brassicaceae* / N. Jan, H.A. Qazi, S. Ramzan, R. John // Biotechnologies of Crop Improvement. – 2018. – V. 1. – P. 327–372.

23. Kholodova, V. Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress / V. Kholodova, K. Volkov, A. Abdeyeva, V. Kuznetsov // Environ. Exp. Bot. – 2011. – V. 71. – P. 382–389.

24. Khudolieieva, L. In vitro evaluation of salt tolerance of poplars and willows / L. Khudolieieva, N. Kutsokon // ScienceRise: Biological Science. – 2018. – № 2 (11). – P. 35–38.

25. Lux, A. Root responses to cadmium in the rhizospere: a review / A. Lux, M. Martinka, M. Vaculik, P.J. White // J. Exp. Bot. – 2011. – V. 62, № 1. – P. 21–37.

26. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco tissue* cultures / T. Murashige, F. Skoog // Phisiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497.

27. Nowicka, B. Improving Photosynthesis, Plant Productivity and Abiotic Stress Tolerance – Current Trends and Future Perspectives / B. Nowicka, J. Ciura, R. Szymańska, J. Kruk // J. Plant Physiol. – 2018. – Vol. 231. – P. 415–433.

28. Philips, G.C. Plant tissue culture media and practices: an overview / G.C. Philips, M. Garda // In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2019. – V. 55, № 3. – P. 242–257.

29. Rai, M.K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress / M.K. Rai, R.K. Kalia, R. Singh, M.P. Gangola, A.K. Dhawan // Environmental and Experimental Botany. – 2011. – V. 71, № 1. – P. 89–98.

REFERENCES

1. Amineva E.Yu., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Popov V.N. Otsenka zasukhoustoichivosti otdel'nykh genotipov *Pinus sylvestris* L. na osnove metoda kul'tury tkani in vitro v modeliruemykh stressovykh usloviyakh. *Trudy Sankt Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaistva*, 2017, no. 1, pp. 14–22. (In Russian)

2. Butorina A.K., Tien D.N. Ritmy sutochnoi mitoticheskoi aktivnosti u zolotistoi fasoli *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek, *Tsitologiya*, 2008, vol. 50, no. 8, pp. 729–733. (In Russian)

3. Vetchinnikova L.V., Kuznetsova T.Yu., Titov A.F. Vliyanie kadmiya na morfo- i organogenez berezy *in vitro*. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN*, 2014, no. 5, pp. 174—181. (In Russian)

4. Vetchinnikova L.V., Titov A.F. Karel'skaya bereza: raznovidnost' ili samostoyatel'nyi vid? *IVUZ. Lesnoi zhurnal*, 2020, no. 1, pp. 26—48. (In Russian)

5. Gazizullin A.Kh., Singatullin I.K. Sostoyanie bereznyakov vozvyshennogo Zavolzh'ya Respubliki Tatarstan posle zasukhi 2010 goda. *Vestnik KazGAU*, 2014, no. 2 (32), pp. 99–103. (In Russian)

6 .Goncharuk E.A., Zagoskina N.V. Tyazhelye metally: postuplenie, toksichnost' i zashchitnye mekhanizmy rastenii (na primere ionov kadmiya). *Visnik Kharkivs'kogo natsional'nogo agrarnogo universitetu. Seriya biologia*, 2017, vyp. 1 (40), pp. 35—49. (In Russian)

7. Danilova E.D., Medvedeva Yu.V., Efimova M.V. Vliyanie khloridnogo zasoleniya na rostovye i fiziologicheskie protsessy rastenii *Solanum tuberosum* L. srednespelykh sortov. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta*, *Biologiya*, 2018, no. 44, pp. 158—171. (In Russian)

8. Egorova N.A., Stavtseva I.V. Optimizatsiya priemov kletochnoi selektsii lavandy na ustoichivost' k nizkotemperaturnomu stress. *Proceedings of the 5th International Scientific and Practical Conference "Sovremennoe sostoyanie, problemy i perspektivy razvitiya agrarnoi nauki", Simferopol'*, 2020, pp. 175—177. (In Russian)

9. Kuznetsova T.Yu., Titov V.F., Vetchinnikova L.V. Vliyanie kadmiya na morfo-fiziologicheskie pokazateli berezy *in vitro*. *Lesnoi zhurnal*, 2008, no. 3, pp. 40—45. (In Russian)

10. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Vnukova N.I. Tekhnologiya dolgosrochnogo khraneniya v kul'ture *in vitro* tsennykh genotipov berezy i vyrashchivanie na ee osnove posadochnogo materiala. *Biotekhnologiya*, 2019, vol. 35, no. 3, pp. 57—67. (In Russian)

11. Morozova M.E., Storchak T.V. Vliyanie solei tyazhelykh metallov na sintez prolina *Lemna minor* L. *Vestnik Nizhnevartovskogo gosudarstvennogo universiteta. – Ekologiya i prirodopol'zovanie*, 2017, no. 4, pp. 119—124. (In Russian)

12. Sergeeva L.E., Bronnikova L.I., Tishchenko E.N. Soderzhanie svobodnogo prolina kak pokazatel' zhiznedeyatel'nosti kletochnoi kul'tury *Nicotiana tabacum* L. pri stresse. *Biotekhnologiya*, 2011, vol. 4, no. 4, pp. 87–94. (In Russian)

13. Sergeeva L.E., Bronnikova L.I. Kletochnaya selektsiya s ionami tyazhelykh metallov dlya otbora form pshenitsy i kukuruzy, ustoichivykh k osmoticheskim stressam. *Faktori eksperimental'noï evolyutsiï organizmiv*, 2018, vol. 22, pp. 318—322. (In Russian)
14. Tabatskaya T.M., Mashkina O.S. Opyt dolgovremennogo khraneniya kollektsii tsennykh genotipov berezy s ispol'zovaniem bezgormonal'nykh pitatel'nykh sred. *Lesovedenie*, 2020, no. 2, pp. 147—161. (In Russian)
15. Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. Tyazhelye metally i rasteniya. Petrozavodsk, 2014, 194 p. (In Russian)
16. Topil'skaya L.A., Luchnikova S.A., Chuvashina N.P. Izuchenie somaticheskikh i meioticheskikh khromosom smorodiny na atsetogematoksilinovykh davlenykh preparatakh. *Byul. TsGL im. I.V. Michurina*, 1975, vyp. 22, pp. 58–61. (In Russian)
17. Shikhaleeva G.N., Budnyak A.K., Shikhaleev I.I., Ivashchenko O.L. Modifitsirovannaya metodika opredeleniya prolina v rastitel'nykh ob"ektakh. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N. Karazina*, 2014, vyp. 21, no. 1112, pp. 168—172. (In Russian)
18. Shupletsova O.N., Shchennikova I.N. Rezul'taty ispol'zovaniya kletochnykh tekhnologii v sozdanii novykh sortov yachmenya, ustoichivykh k toksichnosti alyuminiya i zasukhe. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 2016, vol. 20, no. 5, pp. 623–628. (In Russian)
19. Bates L.S., Waldeen R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 1973, vol. 39, no. 1, pp. 205–207.
20. Fernández R., Bertrand A., Casares A., García R., Tamés R.S. Cadmium accumulation and its effect on the *in vitro* growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution*, 2008, vol. 152, no. 3, pp. 522—529.
21. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Experimental Botany*, 2002, vol. 53, no. 366, pp. 1—11.
22. Jan N., Qazi H.A., Ramzan S., John R. Developing stress-tolerant plants through *in vitro* tissue culture: family *Brassicaceae*. *Biotechnologies of Crop Improvement*, 2018, vol. 1, pp. 327—372.
23. Kholodova V., Volkov K., Abdeyeva A., Kuznetsov V. Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress. *Environ. Exp. Bot*., 2011, vol. 71, pp. 382–389.
24. Khudolieieva L., Kutsokon N. *In vitro* evaluation of salt tolerance of poplars and willows, *ScienceRise: Biological Science*, 2018, no. 2 (11), pp. 35—38.
25. Lux A., Martinka M., Vaculik M., White P.J. Root responses to cadmium in the rhizospere: a review. *J. Exp. Bot*., 2011, vol. 62, no. 1, pp. 21—37.
26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco tissue* cultures. *Phisiol. Plant*, 1962, vol. 15, no. 13, pp. 473—497.
27. Nowicka B., Ciura J., Szymańska R., Kruk J. Improving Photosynthesis, Plant Productivity and Abiotic Stress Tolerance – Current Trends and Future Perspectives. *J. Plant Physiol*., 2018, vol. 231, pp. 415—433.
28. Philips G.C., Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2019, vol. 55, no. 3, pp. 242–257.
29. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, vol. 71, no. 1, pp. 89—98.

Статья поступила в редакцию 6.07.2022