

УДК 546.47/49:581.1:581.4:633.16

DOI 10.30679/2587-9847-2020-29-132-139

СОРТОИЗУЧЕНИЕ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ ЧЕТЫРЕХ СОРТОВ ЯРОВОГО ДВУРЯДНОГО ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.), КОНТРАСТНЫХ ПО ОТВЕТУ НА ДЕЙСТВИЕ КАДМИЯ В УСЛОВИЯХ ВЕГЕТАЦИОННОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**Дикарев А.В.,** канд. б. наук, **Гераськин С.А.,** д-р. б. наук,*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (Россия, г. Обнинск)**E-mail: ar.djuna@yandex.ru*

Реферат. Выполнен вегетационный опыт на дерново-подзолистой почве с внесенным туда Cd^{2+} в дозах 25 и 50 мг/кг. Для работы взяты 4 сорта ярового ячменя, контрастные по устойчивости к кадмию (Ca 220702, Malva – чувствительные; Местный, Симфония – устойчивые). Оценивались: внешний вид растений, морфометрические параметры (высота растений, биомасса, площадь листьев), физиолого-биохимические критерии (содержание в надземной биомассе пролина и МДА), структура урожая (масса зерна и соломы, масса 1000 зерен). Показано, что существуют значимые различия между группами устойчивых и чувствительных сортов в плане их ответа на действие кадмия. По значениям морфометрических параметров и продуктивности в условиях вызванного кадмием стресса устойчивые сорта значительно превосходят чувствительные. Данные эффекты наглядно проявляются при дозе 50 мг/кг Cd^{2+} , в то время как доза 25 мг/кг недостаточна для уверенной дифференциации сортов на чувствительные и устойчивые. Лишь в случае с физиолого-биохимическими параметрами существенных различий между контрастными сортами выявить не удалось.

Ключевые слова: кадмий, ячмень, контрастные по устойчивости сорта, морфометрические и биохимические параметры, продуктивность.

Summary. A vegetative experiment on the sand-loamy podzol soil was completed with the Cd^{2+} 25 and 50 mg/kg included. Four spring barley variants, which have contrasting reactions to cadmium influence, were taken for this work (Ca 220702, Malva – sensitive; Mestnyi, Simphonia – tolerant). It were assessed such parameters as: morphological (on outward appearance of plants, its height, biomass, leaves square), biochemical (proline and MDA content at tissues), productivity (straw and harvest mass, 1000 grains mass). It was shown, that a significant differences existed between tolerant to cadmium influence barley variants and sensitive ones. So, cadmium tolerant variants have higher values of the morphometrical parameters and productivity as compared with sensitive ones. Hence, a connection between MDA and proline content and sensitivity or tolerance to cadmium influence wasn't found. Such effects were relevant for Cd^{2+} 50 mg/kg, but the dose of 25 mg/kg wasn't enough for differentiation of cadmium contrasting variants.

Key words: cadmium, spring barley, cadmium contrasting variants, morphometric and biochemical parameters, productivity.

Введение. Кадмий – один из значимых загрязнителей природных и аграрных экосистем. Поэтому необходимо углубленное изучение механизмов его воздействия на растения и устойчивости к нему [1]. Важно выполнить поиск и мобилизацию генетических ресурсов культурных растений с целью выведения таких сортов их, которые бы обладали повышенной устойчивостью к токсическому стрессу. Полагают, что одной из главных причин, за счет которых Тяжелые металлы (ТМ) способны вызывать токсический стресс, является повышенная выработка активных форм кислорода (АФК). Чтобы

противостоять этому, живые существа выработали механизмы, позволяющие успешно развиваться в условиях негативного воздействия среды. К таковым относят, например, систему антиоксидантной защиты, включающую как ферменты, так и низкомолекулярные соединения (пролин). Различные концентрации ТМ способны как подавлять, так и стимулировать выработку этих веществ, и, анализируя их содержание, можно судить об уровнях стресса еще прежде, чем тот проявится визуально [2]. Важны и тест-системы, основанные на анализе морфологических признаков (высота растения, площадь листьев, биомасса и др.) и продуктивности (структура урожая). Ячмень – одна из главных зерновых культур, возделываемых с глубокой древности по всему миру, при этом она хорошо изучена на всех уровнях биологической организации. Это делает ячмень подходящим объектом для работы в плане изучения стрессоустойчивости.

Таким образом, цель этого эксперимента – оценить воспроизводимость результатов лабораторного эксперимента с проростками сортов ячменя различного географического происхождения по исследованию устойчивости их к кадмию на всем жизненном цикле растений по морфометрическим, физиолого-биохимическим показателям и продуктивности.

Объекты и методы исследований. Вегетационный опыт заложили на дерново-подзолистой супесчаной почве. Взяли сорта ярового ячменя: устойчивые к Cd – Симфония и Местный; чувствительные – Са 220702 и Malva. Методика и процедура выбора этих сортов были описаны в работах [3]. Растения выращивали в пластиковых сосудах емкостью 5 кг по общепринятой методике [4]. Агрохимические характеристики использованной почвы приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Агрохимические характеристики использованной в эксперименте почвы

Показатель	Дерново-подзолистая супесчаная
pH _{KCl}	5,27±0,01
Гумус, %	1,31±0,02
N _г , мг-экв/100 г почвы	1,82±0,03
Сумма обменных оснований, мг-экв/100 г почвы	6,05±0,18
Обменный K ₂ O мг/кг почвы по Масловой	77,6±3,3
Подвижный P ₂ O ₅ мг/кг почвы по Кирсанову	65,0±0,6

В почву внесли 25 мг/кг и 50 мг/кг Cd(NO₃)₂. Для 50 мг/кг опыт проводили в 4 повторностях для каждого сорта, а 25 мг/кг – 3 повторности, плюс еще 4 повторности для контроля, всего 44 сосуда. Почву тщательно перемешивали, внося NH₄NO₃ и K₂HPO₄ из расчета N₂₀₀P₂₅K₃₃ [4; 5]. Учитывали и корректировали количество азота, поступающее с раствором соли ТМ. Контролем служил вариант с NPK без внесения кадмия. Перед посевом почву инкубировали 14 суток при температуре 20-23°C и влажности 60% ПВ. Растения выращивали до товарной спелости в условиях постоянной влажности почвы (60% ПВ). Поливали растения дистиллированной водой. Отбор проб для анализов проводили через 30 суток после всходов. Биохимические показатели (содержание свободного пролина [6] и малонового диальдегида (МДА) [7] определяли в пробах листьев. До урожая оставляли по 10 растений на сосуд. В течение всего вегетационного периода вели фенологические наблюдения. При уборке урожая через 90 суток после всходов определяли структуру урожая: высоту растений, общее число стеблей и число продуктивных стеблей, вес колосьев, массу соломы; общее число колосьев и число

колосьев с зерном, массу зерна, число зерен. Статистическую обработка проводилась с использованием программных пакетов MS Excel 2003 и Statistica 10.0.

Обсуждение результатов. Внешний вид растений ярового ячменя через 50 суток после всходов показан на рисунке 1. Для наглядности фотографии даны для варианта 50 мг/кг кадмия, поскольку именно в этом случае различия между контрастными по устойчивости сортами наиболее очевидны. В случае с 25 мг/кг Cd^{2+} визуальное различия между контрастными сортами не обнаруживаются, хотя и отмечено, что у чувствительных сортов образование колосьев происходит на 1-2 недели позже. Иная картина наблюдалась при внесении в почву 50 мг/кг Cd^{2+} . В целом, при такой дозе ТМ и на этом этапе органогенеза уже заметны различия во внешнем виде и, особенно, по высоте растений при действии кадмия и в контрольном варианте (рис. 1). Изменилась и биомасса растений. Так же следует отметить, что устойчивые сорта демонстрируют меньшее угнетение по сравнению с чувствительными. Следовательно, доза в 50 мг/кг является достаточной для обнаружения эффектов воздействия ТМ и дифференциации сортов на устойчивые и чувствительные, что подтверждает данные ранее проведенных нами исследований [3].



А.



Б.

Рисунок 1 – Внешний вид растений ячменя на 50 день эксперимента: А. (устойчивые сорта, слева направо: сорт Симфония, Cd^{2+} 50 мг/кг; сорт Симфония, контроль; сорт Местный, Cd^{2+} 50 мг/кг; сорт Местный, контроль); Б. (чувствительные сорта, аналогично: сорт Са 220702, Cd^{2+} 50 мг/кг; сорт Са 220702, контроль; сорт Malva, Cd^{2+} 50 мг/кг; сорт Malva, контроль)

При концентрации Cd^{2+} 25 мг/кг не удастся выявить значимых различий между контрастными сортами по высоте растений, площади листьев и биомассе (рис. 2А). Только один из устойчивых сортов (Симфония) по биомассе превосходил оба чувствительные сорта. Отклонения прочих параметров между сортами находятся в пределах ошибки. Вероятно, это говорит о том, что рассматриваемой дозы ТМ еще не достаточно, чтобы вызвать заметный стресс, и потому различия между контрастными по устойчивости сортами отчетливо не проявляются. При концентрации Cd^{2+} 50 мг/кг внутривидовые особенности в плане ответа растений ячменя на токсический стресс становятся очевидными (Рис. 2Б). Практически по всем трем исследованным показателям устойчивые сорта превосходят чувствительные. Наиболее заметными такие различия становятся при анализе площади листьев: величина данного критерия для устойчивых сортов почти в два раза превышает таковую для чувствительных. Сходную картину демонстрирует и высота растений, хотя здесь отличия в ответе на действие кадмия проявляются не столь ярко. Менее всего дифференциация между группами контрастных

сортов обнаруживается по биомассе, в этом случае один из чувствительных сортов (Са 220702) проявил себя почти так же, как устойчивые.

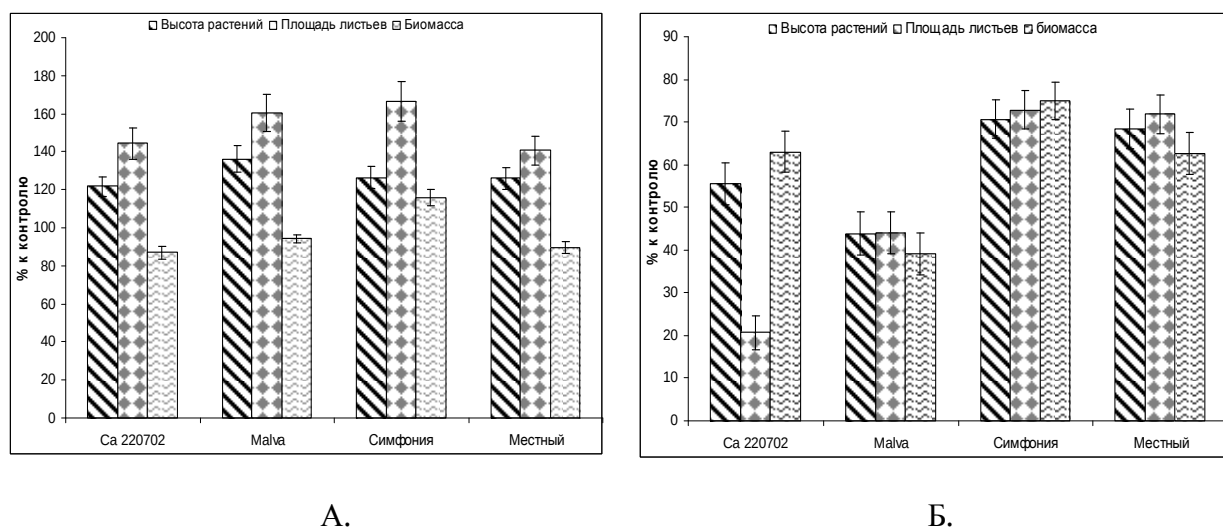


Рисунок 2 – Влияние кадмия на высоту, площадь листьев и биомассу растений ячменя контрастных по устойчивости сортов (А – Cd^{2+} 25 мг/кг, Б - Cd^{2+} 50 мг/кг)

Таким образом, по чувствительности к действию кадмия описываемые показатели можно выстроить в следующий ряд. Сильнее всего на токсический стресс реагирует площадь листьев, и именно при ее анализе заметна наибольшая разница между устойчивыми и чувствительными сортами. В меньшей степени изменяется высота растений, хотя и по этому критерию устойчивые сорта статистически значимо опережают чувствительные. Биомасса изменяется не столь сильно, и в некоторых случаях она у чувствительных сортов может сохраняться на уровне, близком к таковому у устойчивых.

Из полученных данных можно сделать вывод, что различия между устойчивыми и чувствительными сортами уверенно выявляются на организменном уровне, когда доза поллютанта в среде достигает некоторого критического предела. В то же время, пока концентрация кадмия недостаточно велика, существенных различий между устойчивыми и чувствительными сортами может не проявиться. В этих условиях организм еще успешно справляется со стрессовой нагрузкой, а общие биологические механизмы защиты, нацеленные на предотвращение проникновения во внутреннюю среду нежелательных веществ, оказываются достаточно эффективными. При этом особенности ответа растений ячменя на токсическое действие кадмия, описанные ранее для проростков, сохраняются и у взрослых растений.

Действие повреждающих агентов вызывает включение у живых организмов механизмов защиты. Так, тяжелые металлы вызывают нарушение функционирования ферментативных систем, индуцируют образование перекисных и свободнорадикальных соединений. Реакции структурных и ферментативных систем клеток с этими соединениями вызывают обширные повреждения и нарушения ферментативных циклов метаболизма, объединяемых под общим термином оксидативный стресс. Одним из классов соединений, которые организм направляет на нейтрализацию вредных

воздействий, служит ряд аминокислот – γ -аминомасляная кислота, пролин, цистеин [8; 9], среди которых особый интерес вызывает пролин [10].

При концентрации ТМ 25 мг/кг почвы у всех четырех сортов содержание МДА существенно возрастает по сравнению с контрольным уровнем (в 1,5 – 2,5 раза) (Рис. 3А). В целом содержание данного метаболита несколько ниже у устойчивых к кадмию сортов, что особенно заметно для сорта Симфония (для сорта Местный этот эффект не столь явен). При второй дозе кадмия, 50 мг/кг, у всех сортов содержание МДА снижается (Рис. 3А). При этом существенных различий между группами устойчивых и чувствительных сортов выявить не удалось. Оценка содержания пролина дала иные результаты. При 25 мг/кг Cd^{2+} концентрация пролина возрастает до 2 раз (однако, у двух из исследованных сортов данный показатель при этой дозе еще не обнаружил отклонений от контрольного уровня) (Рис. 3Б). А при 50 мг/кг такой рост составляет от 2 до 7 раз, что очевидно связано с увеличением стрессовой нагрузки (Рис. 3Б). При этом различий между группами устойчивых и чувствительных сортов выявить не удалось, более того, отмечалась несколько парадоксальная картина. У одного из чувствительных сортов (Са 220702) отмечено самое низкое содержание пролина из всех 4 сортов, в то время как у другого (Malva) оно оказалось самым высоким. Исследование продуктивности при Cd^{2+} 25 мг/кг не выявило существенных различий между группами контрастных по устойчивости сортов ячменя.

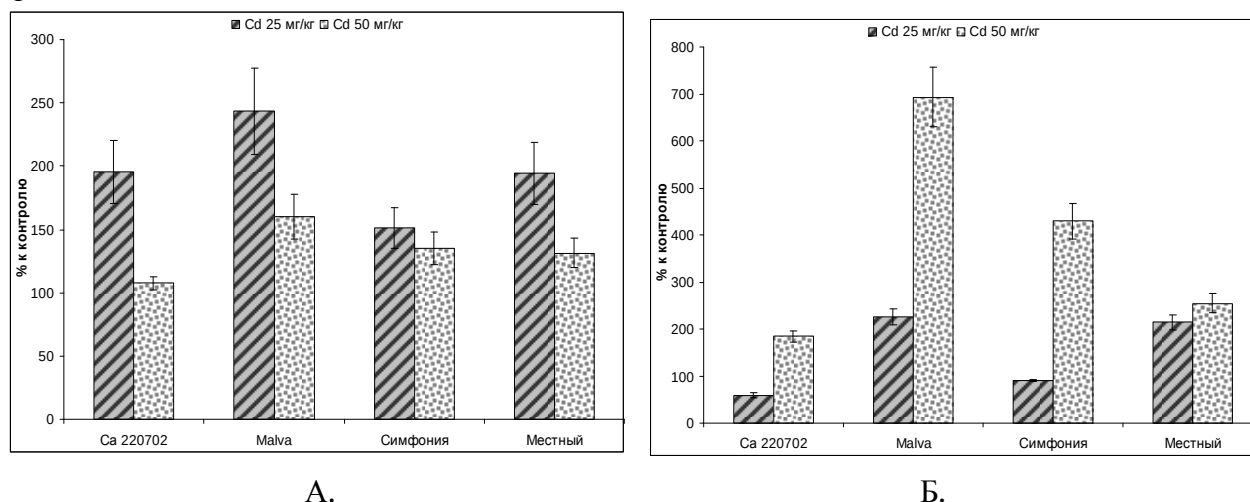


Рисунок 3 –Содержание МДА (А) и пролина (Б) в надземной биомассе четырех сортов ярового ячменя

Исследование биохимических параметров не позволило связать устойчивость или чувствительность сортов с содержанием пролина и МДА. Из этого можно сделать вывод, что реакция на воздействие кадмия определяется иными физиологическими процессами и требует дополнительного изучения.

Особый интерес представляют результаты, полученные в конце цикла вегетации растений ячменя. На их основе можно сделать вывод о том, сохраняется ли устойчивость или чувствительность каждого сорта на протяжении всей жизни растений, и как эти особенности сказываются на хозяйственно ценных качествах.

При дозе 25 мг/кг Cd^{2+} масса зерна и масса соломы для всех четырех сортов практически одинакова (Рис. 4А), а различия по этим показателям находятся в пределах

ошибки. Однако, значения столь важного в хозяйственном отношении признака, как масса 1000 зерен, у сорта Симфония значительно превосходили таковые для всех остальных сортов. Более того, лишь у этого сорта этот показатель сохранился на уровне контроля, в то время как у всех остальных – упал примерно до 70%. При 50 мг/кг Cd^{2+} наблюдается четкая закономерность к подавлению развития чувствительных сортов (Рис. 4Б). Устойчивые тоже демонстрируют угнетение, но не столь значительное. Так, с чувствительных сортов урожая получить не удалось совсем (или он был исчезающе мал), в то время как у устойчивых сортов масса зерна составляла около 20% от контрольных значений. Стоит заметить, что сорт Симфония и здесь продемонстрировал свои выдающиеся качества, поскольку у него масса 1000 зерен составила свыше 90% от контрольной. По массе соломы наблюдалась тенденция к тому, что чувствительные сорта образуют куда меньшую биомассу, чем устойчивые. Правда, у сорта Са 220702 этот показатель находился почти на том же уровне, что и у устойчивого Местный. Но у сорта Malva масса соломы составила около 10% от контрольного значения (для сравнения, у сорта Симфония она была примерно 50%). Отмечено, что устойчивые сорта накапливали значимо меньшие количества ТМ, чем чувствительные (1,2-2,5 раза меньше для соломы). Доза 25 мг/кг не позволила уверенно дифференцировать группы сортов.

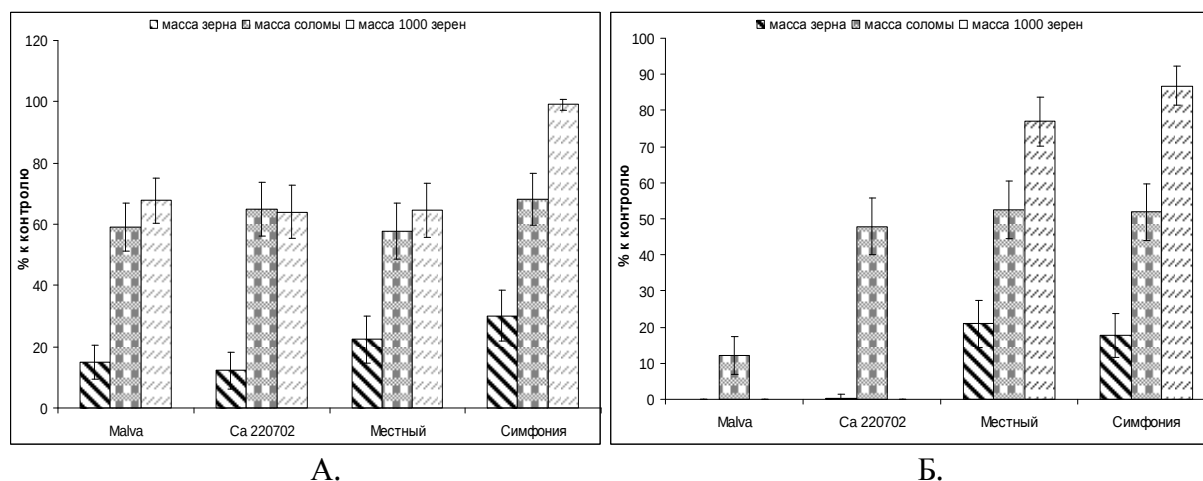


Рисунок 4 –Влияние кадмия на основные показатели продуктивности четырех сортов ярового ячменя (А – Cd^{2+} 25 мг/кг, Б – 50 мг/кг)

На основе рассмотренных данных можно сказать, что доза кадмия 50 мг/кг является критической для ячменя при выращивании на дерново-подзолистой почве и позволяет уверенно разделить контрастные по устойчивости к этому тяжелому металлу сорта. При этом все сорта сохраняют свои свойства как устойчивых, так и чувствительных к кадмию на протяжении всего жизненного цикла растений, и это отражается на их продуктивности. Из рассмотренных сортов наиболее примечательными оказались сорт Симфония, продемонстрировавший высокую устойчивость к токсическому действию кадмия, и сорт Malva, который, напротив, крайне остро реагировал на загрязнение почвы этим тяжелым металлом.

В дополнение ко всем рассмотренным ранее показателям было интересно проанализировать еще и накопление кадмия в биомассе зрелых растений – в соломе и зерне. Этот параметр имеет существенное значение для сельскохозяйственного производства, поскольку в рамках решения проблемы техногенного загрязнения агроферы необходимо не только выявить устойчивые к ТМ сорта ячменя и понять механизмы этого феномена, но и оценить безопасность таких сортов для человека и домашних животных.

В контроле содержание кадмия в зерне и соломе контрастных сортов не различалось. Одним из возможных механизмов, повышающих устойчивость растений к загрязнению почвы тяжелыми металлами, является снижение их поступления в растение. Действительно, концентрации кадмия в соломе устойчивых сортов при загрязнении 50 мг/кг почвы существенно меньше (различия значимы по критерию Манна-Уитни при $p \leq 0,05$), чем у чувствительных (рис. 5Б). Сопоставить загрязнение кадмием зерна в этом варианте опыта не представляется возможным, т.к. у чувствительных сортов зерно не сформировалось. Тем не менее, следует отметить, что накопление кадмия в зерне у двух устойчивых сортов в 99 раз (9,91 мг/кг для сорта Симфония) и 108 раз (10,8 мг/кг для сорта Местный) превышало установленную гигиеническими требованиями безопасности продовольственного сырья и продуктов (СанПиН 2.3.2.1078-01) норму (0,1 мг/кг) [11].

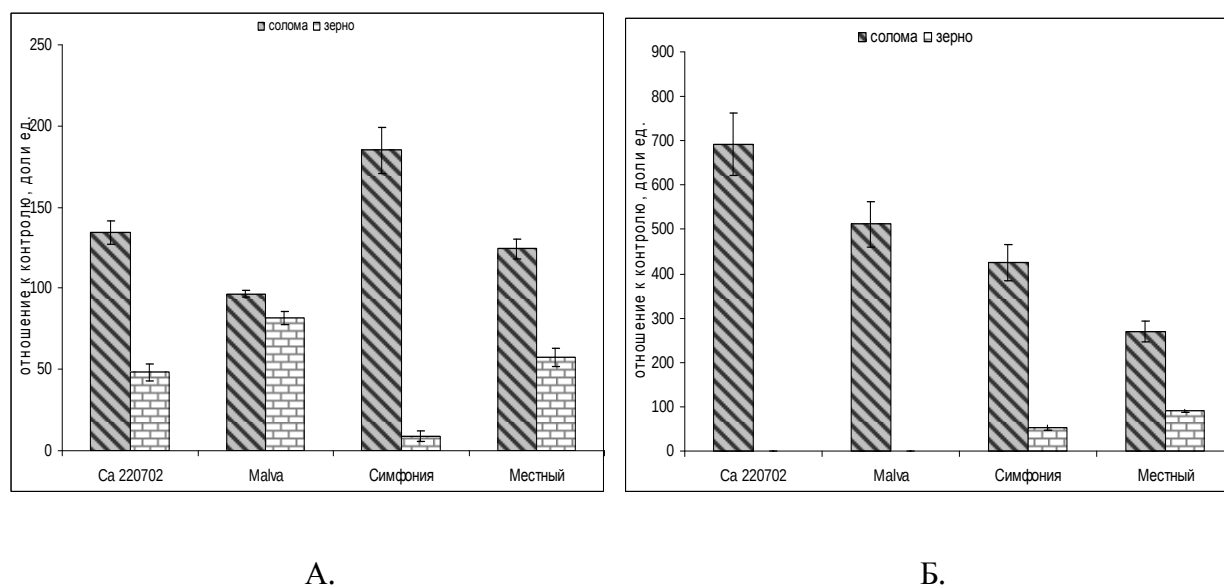


Рисунок 5 – Содержание кадмия в соломе и зерне четырех контрастных по устойчивости сортов ячменя (А – внесено в почву 25 мг/кг кадмия, Б – 50 мг/кг)

Иные закономерности наблюдаются в варианте с два раза меньшей концентрацией кадмия в почве (25 мг/кг). В этом случае, дифференциации как между группами контрастных сортов, так и между отдельными сортами, выявить не удалось. Тем не менее, следует отметить, что в этой ситуации устойчивые сорта в среднем накапливают большие (различия значимы по критерию Манна-Уитни при $p \leq 0,05$) концентрации кадмия в соломе, а чувствительные – в зерне (рис. 5А). Таким образом, внутривидовой полиморфизм по устойчивости к кадмию наиболее ярко проявляется при дозах близких к летальным.

Выводы. В результате исследований показано, что реакции на действие кадмия, выявленные на проростках контрастных к данному ТМ сортов ячменя, воспроизводятся на всем жизненном цикле растений. По значениям морфометрических параметров и продуктивности в условиях вызванного кадмием стресса устойчивые сорта значительно превосходят чувствительные. Данные эффекты уверенно выявляются при дозе 50 мг/кг Cd^{2+} , в то время как доза 25 мг/кг не позволяет выявить значимых различий между контрастными сортами. Так же стоит отметить, что по физиолого-биохимическим параметрам дифференциации сортов по устойчивости выявить не удалось. При дозе 50

мг/кг Cd^{2+} наблюдается дифференциация сортов по накоплению ТМ в соломе. Устойчивые сорта накапливают меньшие количества кадмия, чем чувствительные к нему. Впрочем, накопление кадмия в зерне все же превышает допустимые уровни. В варианте с внесением 25 мг/кг Cd^{2+} значимых различий в накоплении кадмия между группами контрастных по устойчивости сортов выявить не удалось.

Полученные данные могут быть полезны для оценки последствий техногенного загрязнения аграрных экосистем и исследования механизмов устойчивости живых объектов к повреждающим факторам среды. Так же результаты могут быть востребованы для задач селекции сортов основных культур, обладающих высокой устойчивостью к тяжелым металлам и дающим безопасную для человека и животных продукцию. Имеет смысл еще использовать собранные данные в разработке методологии оценки состояния и экологического нормирования загрязнения почв тяжелыми металлами.

Литература

1. Seregin I.V., Shpigun L.K., Ivaniov V.B. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots // Russ. J. Plant Physiol. 2004. V. 51. P. 525–533.
2. Correa A.X. da R., Rorig L.R., Verdinelli M.A. Cadmium phytotoxicity: quantities sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers // Science of the total environment. 2006. V. 357. P. 120–127.
3. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Гераськин С.А. Внутривидовой полиморфизм ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) по устойчивости к действию свинца // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 5. С. 78–87.
4. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968. 260 с.
5. Агрохимические методы исследования почв. М.: Наука, 1975. 656 с.
6. Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. V. 39. № 1. P. 205–207.
7. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1968. V. 125. №1. P. 189–198.
8. Hare P.D., Cress W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants // Plant growth regulation. 1997. V. 21. P. 79–102.
9. Gupta D.K., Nicoloso F.T., Schetinger M.R.C., Rossato L.V., Pereira L.B., Castro, G.Y., Srivastava S., Tripathi R.D. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress // J. Hazard. Mater. 2009. V. 172. P. 479–484.
10. Wei X., Dunhai L., Guihua L. Antioxidative responses of *Elodea nutallii* (Planch.) H.S. John to short-term iron exposure // Plant physiology and biochemistry. 2010. V. 48. P. 873–878.
11. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) тяжелых металлов и мышьяка в почвах (Дополнение № 1 к перечню ПДК и ОДК № 6229-91): Гигиенические нормативы. М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 2010. 8 с.