

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.) НА ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАДМИЯ

© 2016 г. Е. А. Гончарук, Н. В. Загоскина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

Российской академии наук

(Москва, Россия)

Изучали влияние кадмия ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации 15 мг/л) на морфофизиологические характеристики, накопление фенольных соединений, а также локализацию кадмия и фенольного полимера лигнина в каллусных культурах, инициированных из двух контрастных по устойчивости сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) – Славный 82 и Ленок. Установлено, что в присутствии металла в среде рост каллусных культур снижался, в большей степени у сорта Ленок, обладающего более высокой устойчивостью по сравнению с сортом Славный 82. Культуры отличались по содержанию фенольных соединений, которое было выше у сорта Ленок. При действии кадмия их накопление возрастало, что наиболее ярко проявлялось на начальных этапах его поступления (у 15-дневных культур). Представлены данные по локализации металла и фенольного полимера лигнина в каллусных культурах льна-долгунца. Подчеркивается важное значение генетических характеристик исходных сортов льна-долгунца для «ответа» клеток в условиях *in vitro* на действие кадмия.

Ключевые слова: *Linum usitatissimum*, культуры *in vitro*, кадмий, устойчивость, фенольные соединения

Лен обыкновенный (*Linum usitatissimum* L.) относится к семейству льновые – Linaceae класса Dicotyledoneae и представляет собой одну из важнейших культур комплексного использования. Это одно из древнейших культурных растений, возделываемых уже в течение нескольких тысячелетий для получения съедобных семян, волокна, пищевого и технического масла (Сизов, 1955; Труш, 1976; Karg, 2011). Столь широкий спектр получаемых из льна продуктов является следствием его разнонаправленной селекции во время одомашнивания, что привело к появлению двух типов льна – прядильного или долгунцового, используемого для получения волокна, и масличного, объединяющего лен-межеумок, лен-кудряш и лен крупносемянный, выращиваемых для получения семян и масла (Ордина, 1978; Лемеш и др., 2014). Несмотря на давнюю историю, лен до сих пор является предметом многочисленных

исследований, посвященных его филогенезу и таксономии (Зеленцов и др., 2016), селекции (Живетин, Гинзбург, 2002; Павлов и др., 2007), регуляции продуктивности (Белопухов и др., 2010; Брач и др., 2010), устойчивости к стрессовым факторам (Angelova et al., 2004; Belkadhia et al., 2014). Он также используется в биотехнологических целях, в том числе для генно-инженерных исследований (Поляков, 2000; Wang et al., 2004; Milliam et al., 2005). Большой интерес лен вызывает как продуцент волокна – важного продукта для текстильной промышленности (Тихвинский, 1978; Горшкова, 2009; Брач и др., 2010).

Характерной особенностью льна является высокая чувствительность к составу почвенного раствора, который подвержен значительным изменениям как при внесении минеральных удобрений, так и под влиянием экотоксикантов (Ягодин и др., 1989, Clemens, 2006). В значительной степени это обусловлено поступлением в окружающую среду различных поллютантов, к числу которых относятся и тяжелые металлы, концентрация которых в почве и растительных

Адрес для корреспонденции: Гончарук Евгения Александровна, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, 127276, Россия; e-mail: biophenol@gmail.com

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ

биоценозах может значительно увеличиваться вследствие техногенных воздействий (Алексеев, 1987; Титов и др., 2014). К числу наиболее распространенных и токсичных для растений поллютантов относится кадмий, способный накапливаться в тканях даже при низких концентрациях иона в почвенном растворе (Ягодин и др., 1989; Ильин, 2012). Он может накапливаться не только в корнях и листьях, но и в семенах, что наиболее опасно (Antonovics et al., 1971; Clemens, 2006; Копцик, 2014). Ряд исследователей указывают на то, что кадмий в 2-20 раз токсичнее для растений, животных и человека, чем другие металлы (Ягодин и др., 1989; Барсукова, 1997; Титов и др., 2014). Заменяя процессы фотосинтеза и дыхания, нарушая водный режим и минеральное питание, он ингибирует рост и развитие растений, снижает их биологическую продуктивность, что может приводить к нарушению естественных растительных сообществ, а у культурных видов – к значительным потерям урожая (Серегин, Иванов, 2001; Clemens, 2006; Алексеев, 2008). Известно также, что кадмий повреждает светособирающие антенные комплексы фотосистем I и II (Asada, 1994; Казнина и др., 2013), конкурирует с ионом аммония, тем самым негативно влияя на азотный метаболизм (Батова и др., 2013), нарушает поступление кальция в клетки (Покровская, 1995), способствует активации свободно-радикальных процессов (Сазонова и др., 2012), а также влияет на накопление различных антиоксидантов (Iannone et al., 2010; Загоскина и др., 2015).

Поступление кадмия в клетки растений приводит к изменениям в накоплении фенольных соединений – одних из наиболее распространенных в растительных тканях вторичных метаболитов, значительно отличающихся по структуре, химическим свойствам и биологической активности (Запрометов, 1993; Lattanzio et al., 2008; Тараховский и др., 2013). Этим соединениям свойственна чрезвычайная широта функций – от разобщающего действия в электрон-транспортных цепях фотосинтеза и дыхания до участия в защите клеток от стрессовых воздействий. Фенольные соединения являются одними из важных низкомолекулярных компонентов системы защиты клеток от активных форм кислорода (Меньщикова и др., 2006). Их антиоксидантные свойства связаны с наличием в структуре гидроксильных групп, которые легко взаимодействуют со свободными радикалами, тем самым способствуя ингибированию процессов радикально-цепного окисления, развивающихся в условиях стрессовых воздей-

ствий. Известно, что баланс между генерацией и удалением активных форм кислорода позволяет избежать развития окислительного стресса в клетках растений (Колупаев, 2016).

Нельзя забывать и о важной роли фенольного полимера лигнина – одного из основных компонентов клеточных стенок растений, предотвращающего поступление тяжелых металлов, в том числе и кадмия, в растения (Серегин, Иванов, 2001).

Поскольку применение традиционных агрономических методов работы с целым растением является трудоемким и длительным процессом, альтернативой ему является биотехнологический метод – культивирование тканей в условиях *in vitro* (Бутенко, 1999; Лемеш и др., 2014). Его преимуществом по сравнению с интактными растениями является более простой уровень внутритканевой и внутриклеточной организации, а также возможность точного контроля условий выращивания. Использование каллусных и суспензионных культур позволяет изучать метаболические процессы в клетках растений, включая и биосинтез фенольных соединений, а также ответную реакцию клеток на действие различных стрессовых факторов, в том числе и тяжелых металлов (Millam et al., 2005; Verma et al., 2013). Такой подход был использован и для различных видов льна, что позволило выяснить некоторые аспекты устойчивости клеток этого растения к действию стрессоров (Гончарук и др., 2000; Millam et al., 2005; Староверов и др., 2011).

Целью нашего исследования явилось получение каллусных культур из двух сортов льна-долгунца, отличающихся биологическими и технологическими свойствами, и изучение их реакции на действие кадмия на морфофизиологическом, цитологическом и биохимическом уровнях, включая оценку содержания фенольных соединений, как важных компонентов антиоксидантной системы растительных клеток.

МЕТОДИКА

Объектом исследования были каллусные культуры льна-долгунца сортов Ленок и Славный 82. Сорт Славный 82 был получен во Всероссийском научно-исследовательском институте льна (ВНИИЛ; Торжок, Россия) и включен в Государственный реестр селекционных достижений по Северо-Западному и Восточно-Сибирскому районам в 1986 году. Сорт Ленок более позднего происхождения, полученный в результате совместной работы ВНИИЛ и Костромского научно-исследовательского институ-

Таблица 1. Основные характеристики сортов льна-долгунца*

Сорт	Спелость	Волокнистость	Устойчивость к полеганию	Устойчивость к болезням	Качество волокна и его прядильные свойства
Славный 82	ранне-спелый	низковолокнистый	неустойчив	неустойчив	удовлетворительные
Ленок	средне-спелый	высоковолокнистый	устойчив	высокоустойчив	хорошие

*На основании данных сайта ВНИИЛ (<http://vniil.narod.ru/sellbsel.htm>)

тута льняной промышленности. Он включен в Государственный реестр селекционных достижений по Северо-Западному и Центральному регионам в 1997 году.

Для получения каллусных культур использовали гипокотили стерильных проростков льна. Для этого семена стерилизовали 0,1% раствором сулемы (8 мин), промывали стерильной дистиллированной водой (3 раза) и помещали на агаризованную питательную среду Мурасига-Скуга (МС) без регуляторов роста (Гончарук и др., 2000). Через 10 дней отделенные от стерильных проростков сегменты гипокотилей переносили на свежую питательную среду МС, содержащую сахарозу (20 г/л) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (1 мг/л) для получения и последующего культивирования каллусных тканей. При изучении действия кадмия к основной питательной среде добавляли $Cd(NO_3)_2$ в концентрации 15 мг/л (по элементу). Длительность пассажа составляла 30 дней. Образцы каллусной ткани отбирали в начале, середине и конце пассажа.

Культивирование стерильных проростков и каллусной ткани проводили в факторостатной камере ИФР РАН при температуре 25°C, относительной влажности воздуха 70% и 16-часовом фотопериоде с интенсивностью освещения 3 000 люкс.

Учитывали интенсивность роста каллусов, плотность культуры, формирование морфогенных структур.

Содержания воды в каллусных тканях рассчитывали стандартным методом после их высушивания до постоянного веса в термостате при температуре 70°C (Носов, 2011).

Фенольные соединения извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина-Дениса (при 725 нм) (Запрометов, 1971). Калибровочную кривую строили по рутину.

Для цитохимических исследований использовали срезы свежемороженых каллусных тканей толщиной 30 мкм, полученные с помощью микротомы-криостата (Россия). Локализацию кадмия определяли по реакции с дитизоном (Серегин, Иванов, 1998), а локализацию лигнина – по реакции с флороглюцином (Загоскина и др., 2003).

Эксперименты проводили в 2 биологических и 5 аналитических повторностях. Все результаты обрабатывались статистически. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика сортов льна-долгунца

Для получения каллусных культур были использованы два сорта льна-долгунца, успешно районированные в Нечерноземной полосе России. Как следует из представленных в табл. 1 данных, они отличались по всем основным параметрам, включая устойчивость к полеганию и болезням, а также технологическим свойствам (качеству волокна).

Исходя из этих данных, можно заключить, что сорт Ленок является агрономически более ценной культурой по сравнению с сортом Славный 82. Возможно, эти различия обусловлены тем, что для его получения была проведена селекция с учетом таких важных показателей, как рост растений и качество продукта (Труш, 1977; Павлов и др., 2007; Брач и др., 2010).

Морфофизиологические характеристики каллусных культур

Каллусные культуры двух сортов льна-долгунца, культивируемые на основной питательной среде МС, значительно отличались по морфофизиологическим характеристикам (рис. 1, А, Б).

Каллус сорта Славный 82 имел светло-бежевый или бежевый цвет и рыхлую консистенцию (рис. 1, А). На его поверхности форми-

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ

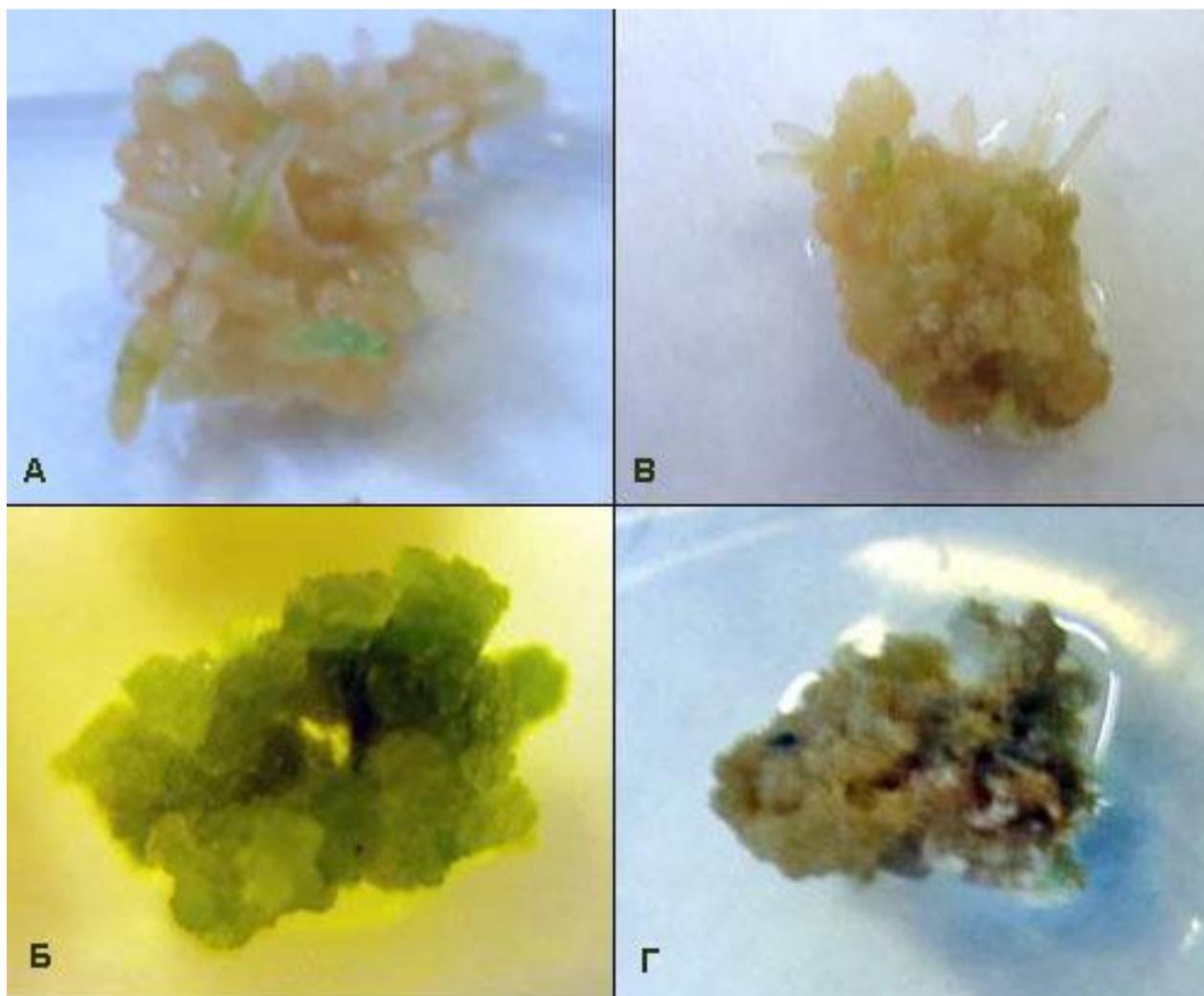


Рис. 1. Внешний вид каллусных культур льна-долгунца сортов Славный 82 (А, В) и Ленок (Б, Г), выращиваемых на основной питательной среде (А, Б) или на среде с $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (В, Г). Возраст культур 30 дней.

ровались ризогенные структуры, для которых характерно незначительное позеленение. Каллус сорта Ленок был зеленым, более плотным и достаточно однородным по структуре (рис. 1, Б). Следовательно, каллус сорта Славный 82 относится к тканям средней плотности с хорошо выраженными меристематическими очагами, тогда как каллус сорта Ленок – к плотным тканям, с зонами редуцирования камбия и сосудов. Все это свидетельствует о том, что различия в физиологических и генетических характеристиках исходных сортов льна-долгунца в определенной степени проявились и в условиях *in vitro*. О том, что клеточные культуры растений в условиях *in vitro* сохраняют многие характеристики интактных тканей сообщалось в литературе (Бутенко, 1999; Pasqua et al., 2003).

В условиях действия кадмия в обоих случаях отмечалось снижение прироста каллусной

массы (в среднем на 15-20%), повышение ее плотности и формирование некротизированных участков коричневого цвета (рис. 1, В, Г). В большей степени эти изменения проявлялись у каллуса сорта Ленок (рис. 1, Г). Следует также подчеркнуть, что на среде с металлом процесс ризогенеза у каллусной культуры сорта Славный 82 усиливался (рис. 1, В). Следовательно, возможно проявление двух ответов в клетках льна-долгунца на действие кадмия – активации морфогенных процессов (сорт Славный 82) или усиления некротизации тканей (сорт Ленок), что, вероятно, обусловлено различными механизмами защиты клеток. Изменения в морфофизиологических характеристиках каллусных тканей в присутствии кадмия отмечались и для других культур (Maroti, Vognar, 1991; Загоскина и др., 2015).

Одной из важных характеристик культур, выращиваемых в условиях *in vitro*, является их

Таблица 2. Оводненность 15 и 30-дневных каллусных культур льна-долгунца сортов Славный 82 и Ленок при их росте на основной питательной среде или на среде с Cd(NO₃)₂

Сорт	Вариант	Оводненность, %	
		15 дней	30 дней
Славный 82	контроль	91,5±2,3	94,3±2,3
	кадмий	91,8±2,3	93,1±2,4
Ленок	контроль	91,7±2,2	92,8±2,2
	кадмий	91,1±1,9	92,8±1,9

оводненность (Носов, 2011). В каллусных культурах, полученных из двух сортов льна-долгунца, этот показатель был достаточно близким (табл. 2).

В обоих случаях по мере роста каллусов как на основной питательной среде, так и на среде с кадмием, в начале выращивания (15 дней) содержание воды у них было практически одинаковым, тогда как к концу (30 дней) – несколько возросло, что в большей степени проявлялось у каллуса сорта Славный 82. О повышении оводненности культур *in vitro* в процессе пассирования сообщалось и в литературе, что свидетельствует о растяжении клеток к концу культивирования (Илькун, 1978). Исходя из этого, можно заключить, что токсическое действие металла, одним из показателей которого является снижение оводненности тканей, проявилось только у каллуса сорта Славный 82, что подтверждает сортоспецифичность ответа клеток на стрессовые воздействия в условиях *in vitro* (Гончарук, 2000).

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что кадмий оказывал токсическое действие на каллусные культуры льна-долгунца, что проявлялось в изменении их морфофизиологических характеристик и уровня тканевой дифференциации. Этот эффект в определенной степени был сортоспецифичным, о чем свидетельствует более выраженная реакция клеток сорта Ленок, характеризующегося более высокой устойчивостью к действию стрессовых факторов по сравнению с сортом Славный 82.

Содержание фенольных соединений в каллусных культурах

Как уже отмечалось, фенольные соединения образуются практически во всех клетках высших растений (Запрометов, 1993; Lattanzio et al., 2008), в том числе и у льна-долгунца (Артюхова, Лапина, 2008). В связи с этим изучали их суммарное накопление как основной показате-

тель биосинтетической способности тканей (Запрометов, 1974; Yu, Dahlgren, 2000).

Каллусные культуры, иницированные из различных сортов льна-долгунца, отличались по содержанию фенольных соединений, которое во многих случаях было выше у сорта Ленок (рис. 2). Эти различия могут быть следствием «контрастности» изучаемых генотипов (см. табл. 1), что может определяться их способностью к образованию этих вторичных метаболитов.

Изучение динамики накопления фенольных соединений в каллусных культурах льна показало, что в начале пассажа оба сорта характеризовались невысоким их содержанием, которое у сорта Ленок было на 40% выше, чем у сорта Славный 82 (0,53 и 0,38 мг/г сырой массы, соответственно). Следовательно, для каллусной культуры, иницированной из высокопродуктивной и устойчивой к различным воздействиям льна-долгунца сорта Ленок, характерна более высокая способность к накоплению фенольных соединений – важных компонентов антиоксидантной системы растений, по сравнению с каллусной культурой сорта Славный 82. Это еще раз подтверждает представление о том, что в условиях *in vitro* сохраняются особенности тканей интактных растений в отношении образования вторичных соединений (Бутенко, 1999).

Дальнейший рост культур в контрольных условиях сопровождался снижением содержания фенольных соединений к середине пассажа (15 день): у сортов Славный 82 и Ленок соответственно на 20 и 40% относительно начала культивирования. К концу пассажа (30 день) он вновь увеличивался почти до уровня начала культивирования (сорт Ленок) или даже превышал его (сорт Славный 82). При этом в каллусах 30-дневного возраста содержание фенольных соединений было на 70 и 50% выше (сортов Славный 82 и Ленок, соответственно),

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ

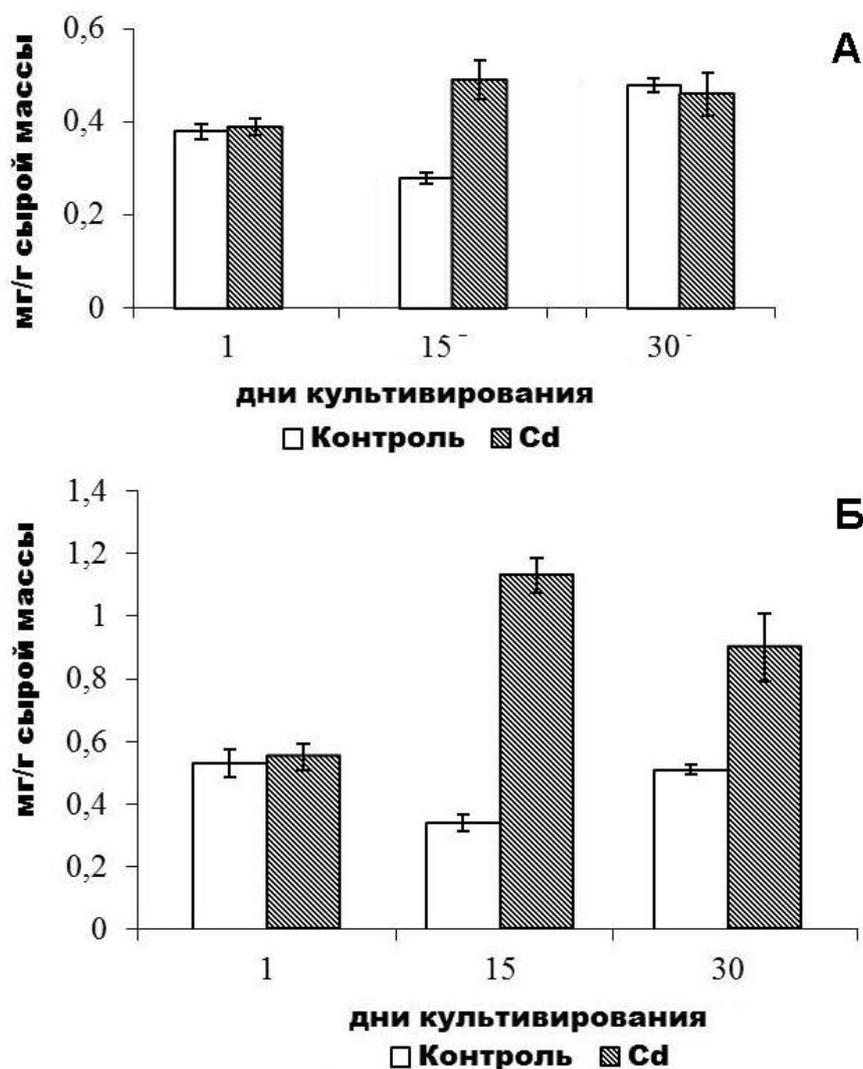


Рис. 2. Суммарное содержание фенольных соединений в каллусных культурах сорта Славный 82 (А) и Ленок (Б), выращиваемых на основной питательной среде (контроль) или на среде с $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (Cd).

по сравнению с 15-дневной культурой. Об изменениях в накоплении этих вторичных метаболитов по мере роста сообщалось как для тканей интактных растений, так и иницированных из них культур *in vitro* (Запрометов, 1993; Matkowsky, 2008). При этом высокий уровень фенольных соединений может быть либо в молодых активно растущих клетках и тканях, либо на завершающих этапах их онтогенеза (Запрометов, 1993), что, возможно, обусловлено отличиями в их функциональной роли.

Поскольку одной из функций фенольных соединений является защита клеток от стрессовых воздействий, следующей задачей было определение суммарного содержания фенольных соединений в каллусных культурах льна-долгунца, растущих на средах с кадмием. В этих условиях у обеих культур отмечались из-

менения в накоплении фенольных соединений (рис. 2). Так, у 15-дневного каллуса сорта Славный 82 оно почти на 70% превышало таковое контрольного варианта и в дальнейшем сохранялось без изменений. К концу пассажа (30 дней) оно было таким же, как и в контроле. Следовательно, реакция клеток этого каллуса на действие тяжелого металла проявлялась лишь на ранних стадиях роста. Что касается каллуса сорта Ленок, то в этом случае содержание фенольных соединений в опытном варианте (действие кадмия) в течение всего пассажа было выше, чем в контроле. В большей степени эти различия проявлялись в 15-дневной культуре (более чем на 300%). К концу пассажа накопление фенольных соединений незначительно снижалось, однако и в этом случае оно превышало таковое контроля почти на 80%. Все это свидетельствует о том, что каллусная

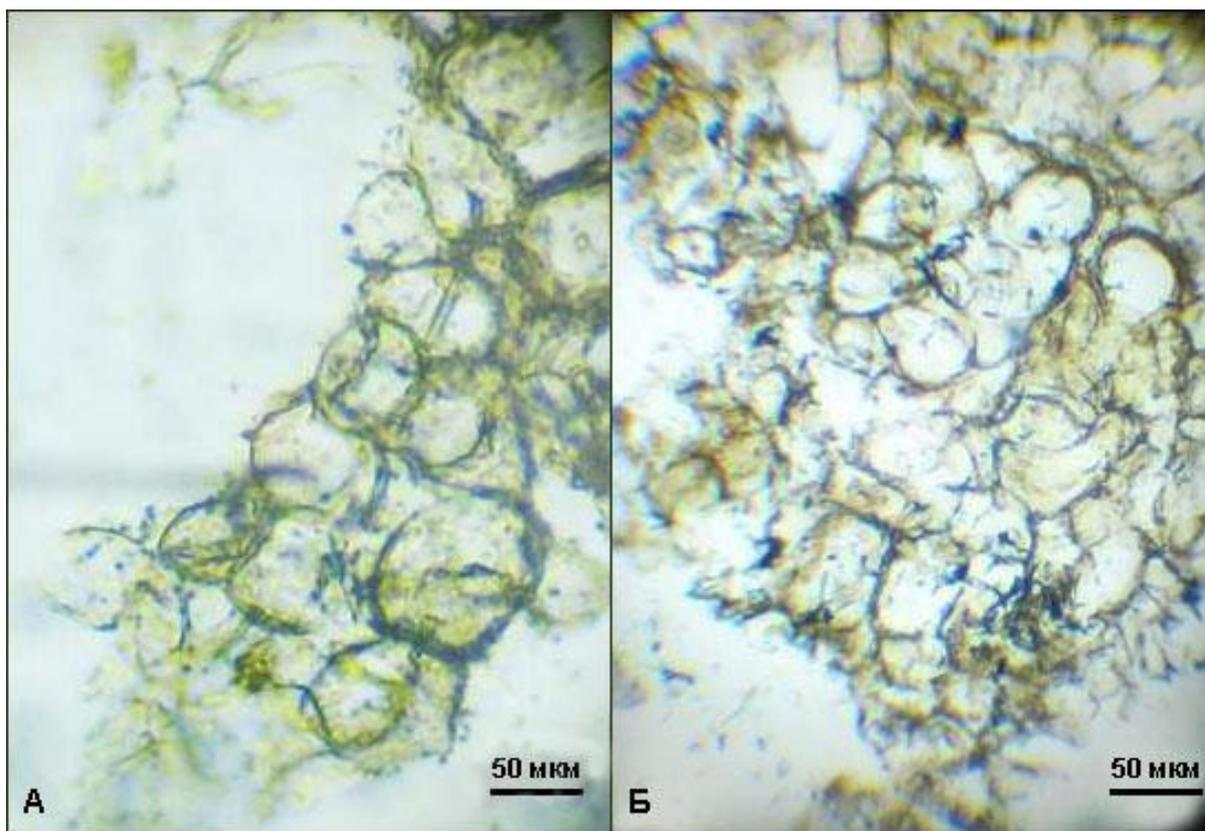


Рис. 3. Структура клеток каллусных тканей льна-долгунца сортов Ленок (А) и Славный 82 (Б), выращиваемых на основной питательной среде.

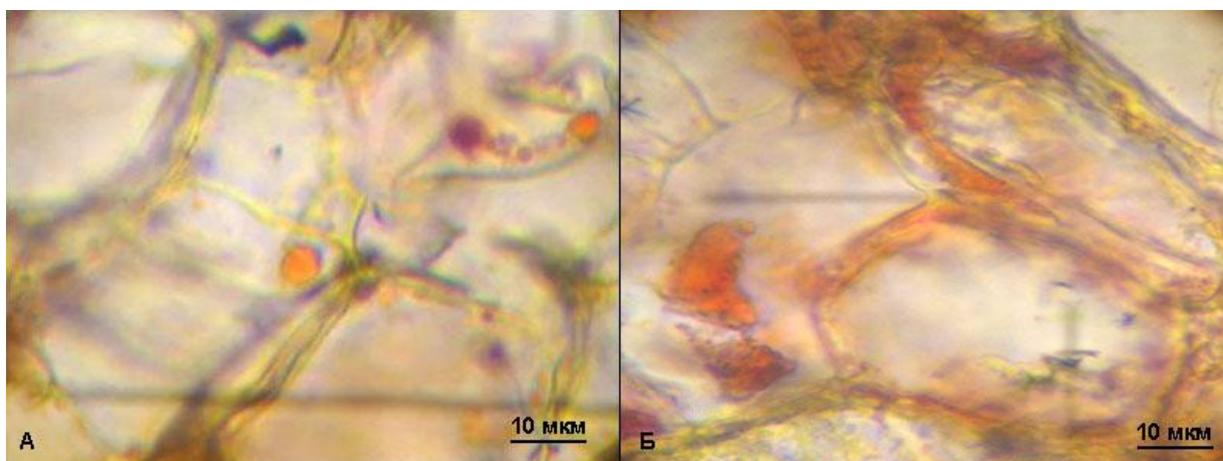


Рис. 4. Локализация кадмия в вакуоле (А) и клеточной стенке (Б) клеток каллусной культуры льна-долгунца сорта Ленок, выращиваемой на среде с $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

ткань, инициированная из растений льна-долгунца сорта Ленок, в большей степени «реагировала» на действие кадмия, чем культура из сорта Славный 82. Возможно, что столь выраженная активация биосинтеза фенольных соединений в каллусной культуре сорта Ленок при действии кадмия и привела к значительным изменениям его морфологических характеристик, в том числе к образованию некротических участков (см. рис. 1). О том, что высокий уро-

вень фенольных соединений в культурах *in vitro* приводит к их некротизации и даже гибели отмечалось в литературе (Деменко, 2005; Загоскина и др., 2007).

Известно, что растения льна синтезируют фенольные соединения, уровень накопления которых зависит от стадии онтогенеза (Белова, Лапина, 2005). Отмечалось также, что при действии повышенных доз тяжелых металлов, в

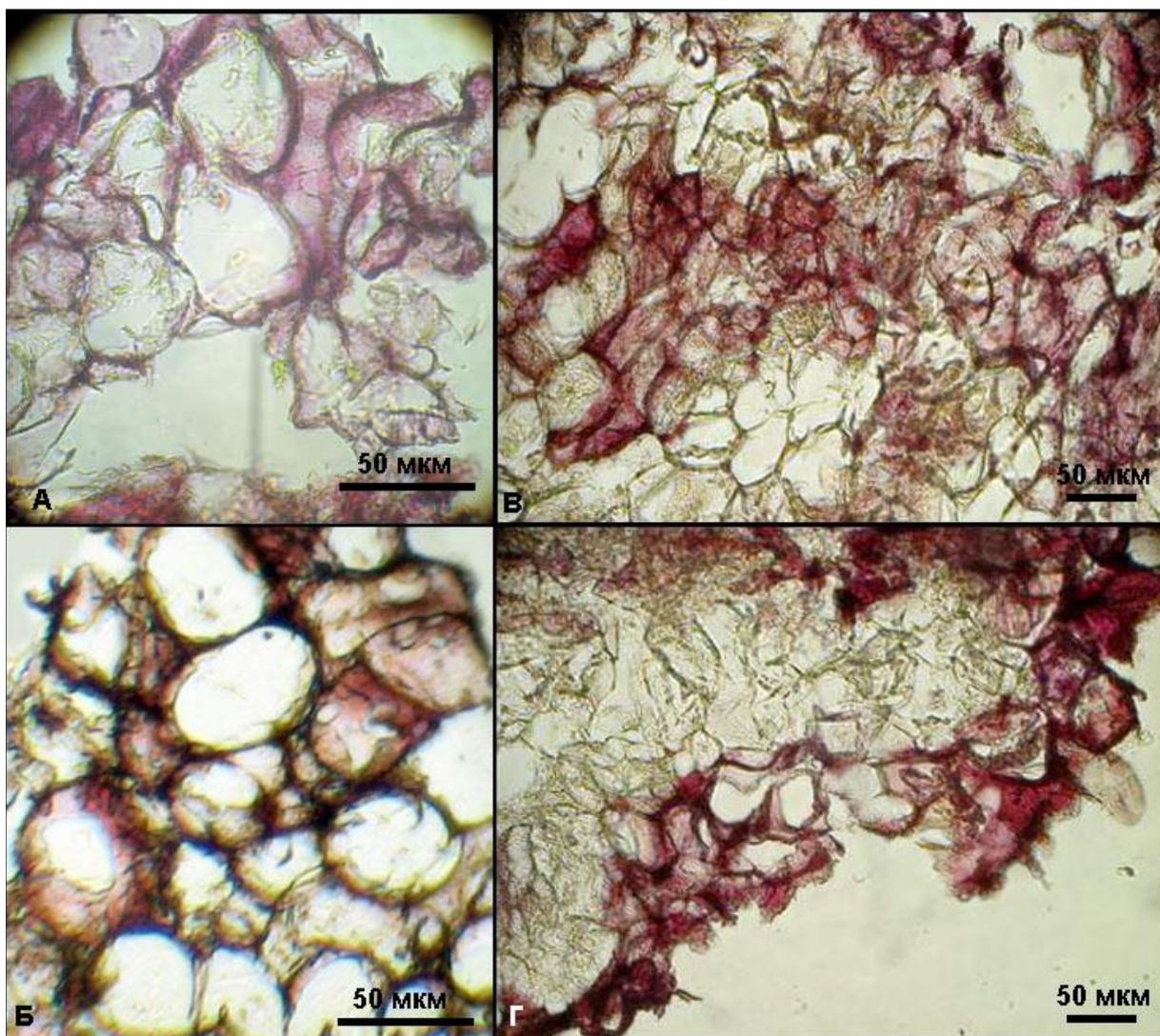


Рис. 5. Локализация лигнина в клетках каллусной культуры льна-долгунца сорта Ленок (А, В) и Славный 82 (Б, Г).

А, Б - основная среда, В, Г – среда с $Cd(NO_3)_2$.

частности кадмия, образование в них фенолпропаноидов, флавоноидов и лигнина усиливалось (Гончарук, 2000). Такая же тенденция наблюдалась и нами в условиях *in vitro*. Все это свидетельствует о том, что присутствие кадмия в среде и его поступление в клетки растений активирует биосинтез фенольных соединений, что согласуется с отмеченным в литературе фактом повышения в этих условиях активности одного из ключевых ферментов биосинтеза фенольных соединений L-фенилаланиаминаксилазы (Michalak, 2006).

Локализация кадмия и лигнина

Наряду с изучением морфологических и биохимических особенностей каллусной культуры льна-долгунца и их изменений при действии кадмия, нами были проведены также гистохимические исследования каллусных клеток. Культуры обоих сортов льна представлены

клетками паренхимного типа (рис. 3). Иногда среди них встречались единичные трахеидальные элементы. Следует отметить, что у сорта Ленок паренхимные клетки были крупнее, чем у сорта Славный 82.

Известно, что кадмий проникает в клетки растений и локализуется в различных ее компартментах, но преимущественно в вакуолях, а также в клеточных стенках (Серегин, Иванов, 2001). В связи с этим было проведено изучение распределения кадмия в каллусных клетках льна гистохимическим методом, основанным на способности дитизона образовывать окрашенные комплексы с этим металлом (рис. 4). Было установлено, что у изучаемых сортов льна кадмий локализовался в микровакуолях и в ряде случаев в клеточных стенках каллусных культур. При этом у сорта Ленок его накопле-

ние в клеточных органеллах было более выражено, чем у сорта Славный 82.

Все это свидетельствует о традиционном распределении кадмия в клетках льна-долгунца и более эффективном его поступлении в каллусную культуру сорта Ленок, для которого характерна более высокая устойчивость к стрессовым воздействиям, по сравнению с сортом Славный 82.

Нами была изучена также локализация лигнина в каллусах льна, как важного «барьерного» компонента при проникновении в клетки металлов (Серегин, Иванов, 2001). Проведение реакции с флороглюцином, позволяющей выявить наличие этого фенольного полимера и одного из основных компонентов вторичных клеточных стенок растений, показало его присутствие в клеточных стенках и межклеточном пространстве каллусов (рис. 5). В контрольных вариантах у обоих сортов льна лигнин локализовался преимущественно в клеточных стенках и реже – в межклеточном пространстве. Воздействие кадмия приводило к усилению процесса лигнификации, что выражалось в увеличении числа клеток, прореагировавших с флороглюцином, увеличении площади окрашивания реактивом и его интенсивности (темно-малиновое окрашивание в опыте (рис. 5, В, Г) против светло-розового в контроле (рис. 5 А, Б). Следует также отметить, что процесс лигнификации в опытных вариантах охватывал не только клеточные стенки (что было характерно для контроля), но и межклеточное пространство, затрагивая иногда и содержимое клеток.

Таким образом, при действии кадмия в каллусных культурах изучаемых сортов льна-долгунца отмечалось усиление лигнификации клеток, а о защитной функции лигнина при действии разнообразных стрессовых факторов неоднократно сообщалось в литературе (Dixon, Paiva, 1995; Запрометов, 1996). Кроме того, лигнин является одним из важнейших компонентов вторичных клеточных стенок растений и его накопление может косвенно свидетельствовать о морфологических изменениях в каллусных культурах. Возможно, это изменение в структуре клеток является одной из приспособительных реакций к данному воздействию.

Таким образом, каллусные культуры, инициированные из двух сортов льна-долгунца (Славный 82 и Ленок) с различной устойчивостью к действию биотических факторов, отличаются по морфофизиологическим характеристикам и способности к образованию фенольных соединений – важнейших компонентов ан-

тиоксидантной системы высших растений. При этом в клетках сорта Ленок, для которого характерна большая устойчивость к стрессовым воздействиям, отмечен более высокий уровень этих вторичных метаболитов, а также и более выраженная реакция на действие такого стрессового фактора, как кадмий, чем у клеток менее устойчивого сорта – Славный 82. Все это свидетельствует о важном значении генетических характеристик исходных сортов льна-долгунца, а также возможности использования полученных из них культур *in vitro* как возможных модельных систем для выяснения механизмов их защиты и адаптации к стрессовым воздействиям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01742).

Выражаем глубокую признательность доктору биологических наук, профессору А.В. Полякову за любезно предоставленные семена льна и А.К. Алявиной за помощь в проведении гистохимических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеев Ю.В. Тяжелые металлы в почвах и растениях. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 142 с.
- Барсукова В.С. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам. – Новосибирск, 1997. – 63 с.
- Батова Ю.В., Казнина Н.М., Титов А.Ф. Влияние кадмия на некоторые физиологические процессы у растений тимopheевки луговой (*Phleum pratense* L.) // Тр. Карельск. научн. центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 52-58.
- Белова О.В., Латина Г.П. Фенольные соединения тканей льна в раннем развитии // Тр. II Всерос. научн. конф. молодых ученых и студентов «Современное состояние и приоритеты развития фундаментальных наук в регионах». – Краснодар: Просвещение-Юг, 2005. – Т. 1. – С. 101-102.
- Белопухов С.Л., Сафонов А.Ф., Дмитриевская И.И. Влияние биостимуляторов на морфологические показатели и урожайность льна-долгунца // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 3. – С. 28-29.
- Брач Н.Б., Шаров И.Я., Павлов А.В., Пороховинова Е.А. Разнообразие признаков льна, связанных с формированием волокна, и влияние условий выращивания на их проявление // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – С. 25-35.
- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 152 с.
- Гончарук Е.А., Калашникова Е.А., Шевелуха В.С. Воздействие кадмия на морфофизиологические реакции различных генотипов льна-долгунца в

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ

- условиях *in vitro* и *in vivo* // Изв. Тимиряз. с.-х. академии. – 2000. – Т. 2. – С. 108-118.
- Гончарук Е.А. Влияние кадмия на морфогенез, анатомию стебля и процесс регенерации льна-долгунца из клеточных и тканевых культур *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2000. – 23 с.
- Горшкова Т.А. Биогенез растительных волокон. – М.: Наука, 2009. – 264 с.
- Деменко В.И. Проблемы и возможности микрклонального размножения садовых культур // Изв. Тимиряз. с.-х. академии. – 2005. – № 2. – С. 48-58.
- Живетин В.В., Гинзбург Л.Н. Лен и его комплексное использование. – М.: Информ-Знание, 2002. – 400 с.
- Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Алявина А.К., Гончарук Е.А. Влияние ультрафиолетовой (УФ-Б) радиации на образование и локализацию фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 302-308.
- Загоскина Н.В., Зайцева С.М., Александрова М.С. Изменения в образовании фенольных соединений при введении клеток тиса ягодного и тиса канадского в культуру *in vitro* // Биотехнология. – 2007. – №1. – С. 29-34.
- Загоскина Н.В., Зубова М.Ю., Нечаева Т.Л., Живухина Е.А. Действие ионов кадмия на культуру *in vitro* чайного растения (*Camellia sinensis* L.) // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 3 (36). – С. 29-37.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 185-197.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения. – М.: Наука, 1993. – 271 с.
- Зеленцов С.В., Зеленцов В.С., Мошненко Е.В., Рябенко Л.Г. Современные представления о филогенезе и таксономии рода *Linum* L. и льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.) // Масличные культуры. Научно-техн. бюл. Всерос. НИИ масличных культур. – 2016. – Вып. 1 (165). – С. 106-121.
- Ильин В.Б. Тяжелые металлы и неметаллы в системе почва-растение. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН, 2012. – 218 с.
- Илькун Г.М. Загрязнители атмосферы и растения. – Киев: Наук. думка, 1978. – 246 с.
- Казнина Н.М., Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф. Влияние возраста листа на устойчивость фотосинтетического аппарата растений к кадмию // Тр. Карельск. научн. центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 112-117.
- Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений // Успехи соврем. биологии. – 2016. – Т. 136, № 2. – С. 181-198.
- Котчик Г.Н. Проблемы и перспективы фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами // Почвоведение. – 2014. – № 9. – С. 1113-1130.
- Лемеш В.А., Богданова М.В., Кубрак С.В., Никитинская Т.В., Титок В.В., Хотылева Л.В. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма подвидов льна культурного для идентификации генотипов с редкими ДНК-локусами // Генетические основы селекции растений. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. – Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 206-242.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 553 с.
- Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: Бином, 2011. – С. 386-402.
- Ордина Н.А. Структура лубоволокнистых растений и ее изменение в процессе переработки. – М.: Легкая индустрия, 1978. – 127 с.
- Павлов А.В., Кутузова С.Н., Брач Н.Б., Пороховинова Е.А., Шаров И.Я. Анализ коллекции льна-долгунца ВИР для решения проблемы селекции на повышение качества волокна // Докл. РАСХН. – 2007. – № 3. – С. 16-19.
- Покровская С.Ф. Регулирование поведения свинца и кадмия в системе почва-растение. – М.: Наука, 1995. – 51 с.
- Поляков А.В. Биотехнология в селекции льна. – Тверь: Формат, 2000. – 180 с.
- Прасад М.Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 768-780.
- Сазанова К.А., Башмаков Д.И., Лукаткин А.С. Генерация супероксидного анион-радикала в листьях растений при хроническом действии тяжелых металлов // Тр. Карельск. научн. центра РАН. Сер. Экспериментальная биология. – 2012. – № 2. – С. 119-124.
- Серегин И.В., Иванов В.Б. Передвижение ионов кадмия и свинца по тканям корня // Физиология растений. – 1998. – Т. 45. – С. 899-905.
- Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. – 2001. – Т. 48. – С. 606-630.
- Сизов И.А. Лен. – М.: Сельхозгиз, 1955. – 256 с.
- Староверов В.В., Степанова А.Ю., Терешонок Д.В., Литвинова И.И. Клеточная селекция в культуре *in vitro* льна многолетнего (*Linum perenne* L.) на

- устойчивость к окислительному стрессу // Плодоводство и ягодоводство России. – 2011. – Т. 26. – С. 230-236.
- Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. – Пушино, 2013. – 308 с.
- Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. – Петрозаводск, 2014. – 194 с.
- Тихвинский С.Ф. Улучшение качества прядильного льна. – Л.: Колос, 1978. – 112 с.
- Труш М.М. Лен-долгунец. – М.: Колос, 1976. – 352 с.
- Ягодин Б.А., Виноградова С.Б., Говорина В.В. Кадмий в системе почва-удобрения-растения-животные организмы и человек // Агрехимия. – 1989. – № 5. – С. 118-130.
- Angelova V., Ivanova R., Delibaltova V., Ivanov K. Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp) // Ind. Crop Prod. – 2004. – V. 19. – P. 197-205.
- Antonovis J., Bradshaw A.D., Turner R.G. Heavy metal tolerance in plants // Advances in Ecological Research. – 1971. – V. 7. – P. 1-85.
- Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues // Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants / Eds. C.H. Foyer, P. Mullineaux. – Boca Raton: CRC Press, 1994. – P. 77-104.
- Belkadhia A., De Harob A., Soengasc P., Obregonb S., Carteac M. E., Chaibia W., Djebalia W. Salicylic acid increases tolerance to oxidative stress induced by hydrogen peroxide accumulation in leaves of cadmium-exposed flax (*Linum usitatissimum* L.) // J. Plant Interact. – 2014. – V. 9. – P. 647-654.
- Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochemie. – 2006. – V. 88. – P. 1707-1719.
- Iannone M.F., Rosales E.P., Groppa M.D., Benavides M.P. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium // Protoplasma. – 2010. – V. 245. – P. 15-27.
- Karg S. New research on the cultural history of the useful plant *Linum usitatissimum* L. (flax), a resource for food and textiles for 8,000 years // Veget. Hist. Archaeobot. – 2011. – V. 20. – P. 507-508.
- Lattanzio V., Kroon P.A., Quideau S., Treutter D. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions // Recent Advances in Polyphenols Research. – Oxford: Wiley-Blackwell, 2008. – V. 1. – P. 1-35.
- Maroti M., Bognar J. Effect of toxic metals inhibiting the growth of plant callus tissues // Acta Agron. Hung. – 1991. – V. 40. – P. 39-47.
- Matkowski A. Plant cell *in vitro* culture for production of antioxidants – A review // Biotechnol. Adv. – 2008. – V. 26. – P. 548-560.
- Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // Polish J. Environ. Stud. – 2006. – V.15. – P. 523-530.
- Millam S., Obert B., Pretova A. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2005. – V. 82. – P. 93-103.
- Pasqua G., Avato P., Monacelli B., Santamaria A.R., Argentieri M.P. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. *Topas* // Plant Sci. – 2003. – V. 165. – P. 977-982.
- Verma P., Mathur A. K., Masood N., Luqman S., Shanker K. Tryptophan over-producing cell suspensions of *Catharanthus roseus* (L) G. Don and their up-scaling in stirred tank bioreactor: detection of a phenolic compound with antioxidant potential // Protoplasma. – 2013. – V. 50. – P. 371-380.
- Wang Y.F., Kang Q.H., Liu Y., Li X.C., Liu S.J., Xu Y. Study on flax genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // J. Natural Fibers. – 2004. – V. 1 (1). – P. 1-10.
- Yu Z., Dahlgren R.A. Evaluation of methods for measuring polyphenolics in conifer foliage // J. Chem. Ecol. – 2000. – V. 26. – P. 2119-2140.

Поступила в редакцию
03.10.2016 г.

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ

**EFFECTS OF CADMIUM IONS ON THE CELLS
OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.) WITH DIFFERENT RESISTANCE**

E. A. Goncharuk, N. V. Zagoskina

*K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology
of Russian Academy of Sciences
(Moscow, Russia)
e-mail: biophenol@gmail.com*

The effect of cadmium ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$), the concentration of 15 mg/l) on the morphological and physiological characteristics, the accumulation of phenolic compounds, as well as localization of cadmium and phenolic polymer lignin in callus cultures initiated from two varieties (Slavnii 82, Lenok) of fiber flax (*Linum usitatissimum* L.) with different levels of sustainability was studied. It was established that in presence of metal in the medium the growth of callus cultures was reduced to a greater extent in the variety Lenok having a higher resistance than variety Slavnii 82. Cultures differed in the content of phenolic compounds, which was higher in the variety Lenok. Cadmium leads to accumulation of phenolic compounds that was shown to a greater extent in the initial stages of growth of cultures (15 days). Information about metal and phenolic polymer lignin localization in the fiber flax callus cultures represented. The genetic characteristics of the original varieties of flax are essential to *in vitro* cultures' «answer» on the effect of pollutant (cadmium).

Key words: *Linum usitatissimum, in vitro culture, cadmium, resistance, phenolic compounds*

**РЕАКЦІЯ КЛІТИН КОНТРАСТНИХ ЗА СТІЙКІСТЮ СОРТІВ ЛЬОНУ-
ДОВГУНЦЯ (*LINUM USITATISSIMUM* L.) НА ДІЮ ІОНІВ КАДМІЮ**

Є. О. Гончарук, Н. В. Загоскіна

*Федеральна державна бюджетна установа науки
Інститут фізіології рослин ім. К.А. Тімірязєва
Російської академії наук
(Москва, Росія)*

Вивчали вплив кадмію ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в концентрації 15 мг/л) на морфологічні характеристики, накопичення фенольних сполук, а також локалізацію кадмію і фенольного полімеру лігніну в калусних культурах, ініційованих з двох контрастних за стійкістю сортів льону-довгунця (*Linum usitatissimum* L.) – Славний 82 і Льонок. Встановлено, що в присутності металу в середовищі ріст калусних культур знижувався, більшою мірою у сорту Льонок, що має вищу стійкість порівняно з сортом Славний 82. Культури відрізнялися за змістом фенольних сполук, який був вищим у сорту Льонок. За дії кадмію їх накопичення зростало, що найбільш яскраво виявлялося на початкових етапах його надходження (у 15-денних культур). Представлені дані з локалізації металу і фенольного полімеру лігніну в калусних культурах льону-довгунця. Підкреслюється важливе значення генетичних характеристик вихідних сортів льону-довгунця для «відповіді» клітин в умовах *in vitro* на дію кадмію.

Ключові слова: *Linum usitatissimum, культури in vitro, кадмій, стійкість, фенольні сполуки*