

УДК 581.19:633.162:546.48

АНАЛИЗ СВЯЗИ ИЗОЭНЗИМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЯРОВОГО ДВУРЯДНОГО ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.) С ЕГО СОРТОВОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ВОЗДЕЙСТВИЮ КАДМИЯ

© 2023 г. А. В. Дикарев^{1,*}, В. Г. Дикарев¹, Н. С. Дикарева¹¹Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии
249032 Обнинск, Калужская обл., Киевское шоссе, 109 км, Россия

*E-mail: ar.djuna@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 15.04.2023 г.

В лабораторном эксперименте выяснили, как связано формирование контрастных реакций сортов ярового двурядного ячменя с изотипным полиморфизмом ряда ферментов, сопряженных с устойчивостью растительного организма к стрессу, на действие кадмия. Были взяты 14 сортов ярового ячменя различного географического происхождения (по 7 чувствительных и устойчивых к Cd^{2+}). Отбор этих сортов был осуществлен в предшествующих исследованиях на основе морфометрических критериев. Семена ячменя этих сортов проращивали в термостате, после чего готовили белковые экстракты проростков, которые потом разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. С фореграммами проводили гистохимические реакции для выявления зон активности следующих ферментов: супероксиддисмутазы, гваяколовой пероксидазы, глутаматдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, каталазы. Подсчитывали частоты встречаемости всех выявленных аллельных вариантов, после чего эти частоты с помощью критерия углового преобразования Фишера сравнивали для групп контрастных по устойчивости к кадмию сортов. В результате удалось выявить ряд изотипов, которые с большей вероятностью встречаются или у устойчивых к Cd^{2+} сортов, или у чувствительных. Таким образом, можно утверждать, что реакция конкретного сорта ячменя на действие кадмия связана с выработкой у него специфических аллельных вариантов. Полученные данные могут быть использованы для прогнозирования устойчивости или чувствительности отдельно взятого сорта ячменя к действию Cd^{2+} .

Ключевые слова: яровой двурядный ячмень, кадмий, устойчивость к стрессу, контрастные по устойчивости сорта, электрофорез, изоферментный анализ.

DOI: 10.31857/S0002188123080057, **EDN:** ZDTKWN

ВВЕДЕНИЕ

Одна из серьезных проблем современного сельского хозяйства — прогрессирующее загрязнение окружающей среды, к которому приводит рост промышленного производства. Это вместе с нарастающими изменениями климата вызывает сокращение площадей, пригодных для аграрного производства. Более того, почвы доступных для хозяйственного использования территорий зачастую оказываются сильно загрязнены токсическими веществами, что создает потенциальную опасность для здоровья человека и домашних животных. Таким образом, в целях решения продовольственной проблемы требуется создание таких сортов основных сельскохозяйственных культур, которые отвечали бы следующим крите-

риям. Во-первых, они были бы нечувствительными к токсическому стрессу, давая возможность получать высокие урожаи, во-вторых, эти сорта не должны накапливать вредные вещества в товарной части растения.

Одной из значимых групп техногенных поллютантов являются тяжелые металлы (ТМ) — химические элементы с металлической кристаллической решеткой, имеющие плотность $>5 \text{ г/см}^3$. В соответствии с данными литературы [1–4], соединения ТМ являются токсичными и способны вызывать серьезные нарушения в функционировании растительного организма. Кадмий — один из достаточно широко распространенных ТМ, опасность его для растений можно считать доказанной [5], хотя до сих пор нет вполне сформиро-

ванного представления о механизмах его воздействия на живые объекты.

Ранее [6] были определены критические дозы кадмия, вызывающие существенное угнетение морфометрических показателей проростков ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Эта работа, в свою очередь, развивала идеи других исследователей [7–11], в работах которых был исследован внутривидовой полиморфизм ячменя по устойчивости к другому ТМ — свинцу и рассмотрены причины формирования контрастных реакций на действие этого поллютанта. Используя предложенный в том исследовании критерий коэффициента депрессии, нами были выделены 14 контрастных по устойчивости к кадмию сортов ячменя и описан их полиморфизм. В работе со свинцом удалось установить, что формирование визуально наблюдаемого полиморфизма в ответе на действие этого ТМ связано с биохимическими и цитогенетическими особенностями изученных сортов. В этой связи представляется логичным провести сходную работу в отношении кадмия, чтобы выявить сходства и различия в ответе на действие 2-х ТМ. Аналогичные исследования выполняли и другие авторы, например в [12], где рассмотрен вопрос формирования радиорезистентности пшеницы.

В рамках реализации поставленных задач существенный интерес представляют методы биохимической и молекулярной генетики. Одним из важных методов из арсенала этих дисциплин является поиск маркеров хозяйственно ценных признаков и биологических свойств живых организмов, и, в частности, — растений. Такие методики — неоценимый источник исходного материала для нужд селекционной работы, направленной на выведение сортов с заданными свойствами. Подобный подход использовали уже достаточно давно [13, 14], но при этом тогда рассматривали главным образом морфометрические признаки (например, опушенность колоса или его цвет). Однако в настоящее время такие маркеры, несмотря на их несомненную простоту и удобство использования, не могут считаться удовлетворительными. Причина этого — полигенный характер наследования этих признаков, и, как следствие, — их нестабильность. Таких недостатков лишены белковые и особенно молекулярно-генетические маркеры (изоферменты, последовательности нуклеотидов и др.) [15].

Существуют определенные трудности на пути эффективной идентификации генетических маркеров. К таковым следует причислить их связь с разнообразными жизненными процессами, происходящими на разных уровнях биологической

организации живой материи, что предопределяет сложность генетического контроля таких признаков. Стоит учесть также и большую подверженность этих признаков фенотипической изменчивости. Все эти обстоятельства затрудняют выполнение в отношении таких маркеров классического генетического анализа и интерпретации полученных результатов. Однако существует выход из подобной ситуации. Как правило, из любого сложного признака можно выделить ряд более простых. При этом часть из таких признаков оказываются мономорфными (встречаются у всех представителей изучаемого вида), в то время как другие — полиморфны, т.е. отмечаются только у конкретных представителей вида (сортов, линий, индивидов) [16]. Зная такие особенности структуры сложных биологических признаков, можно изучить систему их генетического контроля и идентифицировать локусы в геноме, которые ответственны за кодирование этих свойств [12].

Одной из разновидностей таких белковых маркеров, позволяющей увязать особенности конкретного организма с его генетической структурой, являются изозимы — изомеры различных ферментных систем. Наличие существенного количества конформаций ферментов, имеющих различия в химической активности, предопределяет формирование разнообразия в пределах биологического вида [17]. Каждый из таких изоферментов распределен среди популяции неравномерно, что ведет к различиям в способности индивида приспосабливаться к меняющимся или экстремальным условиям среды. Причина этого состоит в том, что, как правило, соотношение изоформ ферментов существенно отражается на биологических функциях клетки [18]. Используя эти обстоятельства, можно, выявив те или иные изоферменты, связанные, допустим, с наличием повышенной сопротивляемости к токсическому стрессу, дифференцировать группы индивидов по этому признаку.

Примером такой работы можно считать исследование влияния алюминия на активность супероксиддисмутазы (*SOD*), выявленной у 2-х сортов райграсса многолетнего (*Lolium perenne* L.) [19]. Авторами был доказан рост активности 2-х изозимов — LpFe-*SOD* и LpCu/Zn-*SOD* в тканях корней проростков, что сопровождалось повышением экспрессии связанных генов. Что примечательно, у каждого из этих сортов эффективность указанных процессов разнилась, что можно увязать с различиями в металлоустойчивости. Любопытно, что результаты, полученные в отношении *SOD* для одного токсиканта, могут не подтверждаться для другого. Например, в листьях

Arabidopsis thaliana при действии меди активность всех изоформ *SOD* стабильно увеличивалась, но если медь заменяли на кадмий, то аналогичный эффект отмечали лишь для Fe-*SOD* и Mn-*SOD*, а у Cu-*SOD* наблюдали противоположный эффект. Другим интересным свидетельством следует считать исследование [20], посвященное кормовым бобам (*Vicia faba* L.). Авторам удалось установить, что несколько выявленных изомеров *SOD* демонстрировали различную способность к нейтрализации активных форм кислорода (АФК), повышенный выход которых наблюдали при внесении в субстрат свинца.

Эти сведения явились предпосылками для настоящей работы, посвященной исследованию формирования реакций сортов ярового ячменя, контрастных по ответу на действие кадмия. Нами был проведен изоферментный анализ белковых экстрактов, полученных из проростков контрастных по устойчивости сортов ячменя, выявленных ранее [6]. В процессе работы был использован ряд ферментов, связанных с различными процессами метаболизма в организме растений, и, в частности, с его стрессоустойчивостью: супероксиддисмутаза (*SOD*), гваяколовой пероксидазы (*PER*), глутаматдегидрогеназы (*GDH*), алкогольдегидрогеназы (*ADH*), малатдегидрогеназы (*MDH*), глутатионредуктазы (*GSR*), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*G6PD*), каталазы (*CAT*). В исследовании выявляли биохимические признаки, связанные с устойчивостью или чувствительностью изученных сортов. Цель работы — поиск специфических изозимных вариантов ряда ферментных систем, которые с большей вероятностью встречаются у устойчивых или чувствительных по устойчивости к кадмию сортов ярового ячменя из мировой коллекции ВИР. В случае если таковые аллели удастся выявить, то можно говорить о наличии связи между формированием ответа конкретных сортов ячменя на токсическое действие кадмия и их биохимическими особенностями.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения изоферментного полиморфизма и выявления специфических аллельных вариантов, сопряженных с устойчивостью/чувствительностью к действию кадмия, использовали метод изоэнзимного анализа с применением электрофореза белков в полиакриламидном геле.

Для приготовления экстрактов брали семена ячменя, замачивали их в дистиллированной воде на ночь при охлаждении (5°C). На другой день семена раскладывали в рулоны фильтровальной бу-

маги и помещали в сосуды с дистиллированной водой. Сосуды выдерживали в течение 1 сут в термостате при 20°C [21]. Подобную процедуру проводили для того, чтобы выбраковать невсхожие семена. Семена, у которых появлялись проростки ~1 мм длиной, отбирали для получения экстрактов.

Дополнительно аналогичное исследование было проведено не только с использованием дистиллированной воды, но и при наличии Cd^{2+} в среде. В этом случае семена ячменя выдерживали в термостате при 20°C в течение 5-ти сут в чашках Петри с раствором Cd^{2+} 0.35 мг/мл (тестирующая доза, выявленная в предыдущем исследовании [6]). Остальные процедуры в этом случае были идентичны таковым для интактных семян.

У семян извлекали зародыши с проростком и растирали в ступке до получения гомогенной массы с добавлением равных количеств (по 50 мкл) 50%-ного раствора сахарозы и экстракционной смеси. Состав экстракционной смеси: 1%-ный раствор меркаптоэтанола + 1%-ный раствор Тритона X-100 = 1 : 1 [22–24]. Гель для анализа получали следующим образом. Готовили растворы: раствор А — 1 н. HCl 48 мл + трис-оксиметиламинметан 36.6 г + тетраметилэтилендиамин 0.23 мл + H_2O до 100 мл (pH = 8.9), раствор В — акриламид 30 г + N,N'-метилен-бисакриламид 0.8 г + H_2O до 100 мл, раствор С — аммоний надсернокислый 0.14 г + H_2O до 100 мл. Растворы смешивали в соотношении: 1 А : 2 В : 1 H_2O : 4 С. Полученную смесь заливали в стеклянные блоки со вставленными спейсерами и гребенкой (для формирования карманов) и выдерживали при 37°C до полной полимеризации.

Экстракты помещали в карманы гелевых блоков (1%-ный полиакриламидный гель) и разгоняли с использованием щелочного TRIS—HCl буфера (pH 8.3) (трис-оксиметиламинметан 6.0 г + глицин 28.8 г + H_2O до 1 л (перед использованием буфер разбавляли в 10 раз)) с использованием индикатора бромфенолового синего (0.1%) при ~350 V, 30 mA. Для разгонки использовали аппарат для вертикального электрофореза фирмы “Owl” модели P9DS (США). Процесс вели при комнатной температуре до достижения линией лидирующего красителя положения на 2 см выше нижнего края геля. После окончания процесса проводили гистохимические реакции для определения ферментов: супероксиддисмутаза (*SOD*, К.Ф. 1.15.1.1), пероксидазы (*PER*, К.Ф. 1.11.1.7), глутаматдегидрогеназы (*GDH*, К.Ф. 1.4.1.2), алкогольдегидрогеназы (*ADH*, К.Ф. 1.1.1.1), малатдегидрогеназы (*MDH*, К.Ф. 1.1.1.37), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*G6PD*, К.Ф. 1.1.1.49), глю-

татионредуктазы (*GSR*, К.Ф. 1.6.4.2) и каталазы (*CAT*, К.Ф. 1.11.1.6).

Окрашивание ферментов выполняли по прописям, представленным в [25]. Ниже приведено подробное описание схем визуализации для исследованных ферментов. Для идентификации зон активности *SOD* готовили раствор 10 мг рибофлавина, 100 мг этилен диамин тетрауксусной кислоты (EDTA), 43 мг гексагидрата хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) и 7 мг 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромида (МТТ) в 100 мл TRIS-HCl буфера (pH 8.0). Гель заливали данным раствором и помещали под интенсивное облучение видимым светом. Постепенно гель окрашивался в интенсивный фиолетовый цвет, зоны активности проявлялись на нем бесцветными полосами.

Для *PER*: 1.25 г пирогаллола растворяли в 100 мл воды, гель заливали раствором на 30 мин, после этого раствор удаляли, а гель заливали 50 мл 5%-ного пероксида водорода (H_2O_2). Кювету с этим составом и гелем осторожно встряхивали до появления на буро-оранжевом фоне нестойких красно-бурых полос с интенсивностью, достаточной для проведения дальнейшего анализа.

Для *ADH*: в 50 мл TRIS-HCl буфера (pH 8.5) готовили раствор 40 мг β -никотинамида аденина динуклеотида (NAD), 10 мг МТТ, 1 мг феназина метасульфата (PMS) с добавлением 2 мл этанола. Залив раствором гель, инкубировали его при 37°C в темноте до появления синих полос на бесцветном фоне.

Для *MDH*: в 100 мл TRIS-HCl буфера (pH 8.0) готовили раствор 250 мг L-малеиновой кислоты (натриевая соль), 30 мг NAD, 25 мг хлористого нитросинего тетразолия (NBT), 2 мг PMS. Залив раствором гель, инкубировали его при 37°C в темноте до появления синих полос на бесцветном фоне.

Для *G6PD*: в 45 мл TRIS-HCl буфера (pH 8.0) готовили раствор 20 мг глюкозо-6-фосфата (динатриевая соль), 10 мг никотинамида динуклеотида фосфата динатриевой соли (NADP), 10 мг МТТ, 1 мг PMS, 40 мг $MgCl_2$. Залив раствором гель, инкубировали его при 37°C в темноте до появления синих полос на бесцветном фоне.

Для *GSR*: в 50 мл TRIS-HCl буфера (pH 8.0) готовили раствор 40 мг окисленного глутатиона, 10 мг NADPH, 0.2 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола, 10 мг МТТ. Залив раствором гель, инкубировали его при 37°C в темноте до появления пурпурных полос на синем фоне. Для того чтобы сделать полосы более заметными, гель промывали в 0.1 М растворе HCl.

Для *CAT*: предварительно при приготовлении геля в исходную смесь вносили 250 мг растворимого крахмала по Жульковскому. После разгона белковых фракций готовили 3 раствора: первый — 30 мг $Na_2S_2O_3$ в 50 мл воды, второй — 50 мл 3%-ного H_2O_2 , третий — 100 мг KI в 100 мл воды с добавлением 0.5 мл ледяной уксусной кислоты. Первый и второй раствор одновременно выливали на гель, смешивая их. Так гель выдерживали ~3 ч. После раствор сливали, заливая гель третьим раствором. Гель окрашивался в бурый цвет, а зоны активности фермента оставались бесцветными.

Для *GDH*: готовили раствор 5 мг NAD, 4 мг PMS, 4 мг NBT, 1 г L-глутамата в 30 мл фосфатного буфера (pH 7.0), разбавленного до 100 мл водой. Раствором заливали гель, выдерживали его в темноте при 37°C до появления сине-фиолетовых полос на бесцветном фоне в зонах активности фермента.

Фореграммы фотографировали, после чего подсчитывали частоты каждой из обнаруженных зон активности фермента. Каждую из них помечали порядковым номером в соответствии с электрофоретической подвижностью (отношение длины пробега полосы от старта до линии лидирующего красителя к общему расстоянию от старта до фронта). Частоты тех изоэлемов, которые встречались не во всех случаях (факультативных) сравнивали для групп устойчивых и чувствительных сортов с помощью критерия углового преобразования Фишера [26] с целью выявить такие, которые бы могли служить маркерами устойчивости или чувствительности к кадмию, обнаруживаясь с большей вероятностью в том или ином варианте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из 50-ти сортов ячменя разного географического происхождения из мировой коллекции ВИР (Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург) на основе анализа морфометрических показателей были отобраны 14 контрастных по устойчивости к действию кадмия (по 7 устойчивых и чувствительных) (табл. 1). Процедура исследования их морфологических реакций на влияние ТМ подробно описана в опубликованной ранее работе [8].

По результатам изоферментного анализа белковых экстрактов у рассматриваемых ферментов отмечено следующее количество зон активности: у *SOD* — 5, *PER* — 1–2, *GDH* — 2–4, *ADH* — 3–4, *MDH* — 5, *G6PD* — 3–8, *GSR* — 8, *CAT* — 6. Схема их размещения на гелях представлена на рис. 1. При

Таблица 1. Контрастные по устойчивости к действию кадмия сорта ярового двурядного ячменя разного географического происхождения

Название и происхождение	Разновидность	№ по каталогу ВИР
Устойчивые		
Местный (Удмуртия)	nutans	К-9219
Оренбургский 4 (Оренбургская обл.)	nutans	К-25959
Линия 15 (Московская обл.)	nutans	К-26284
Икар (Кировская обл.)	nutans	К-26824
Гетьман (Ставропольский край)	nutans	К-30965
Русский (Ставропольский край)	nutans	К-30969
Симфония (Харьковская обл.)	medicum	К-30996
Чувствительные		
Blenheim (Великобритания)	nutans	К-29780
Ca 220702 (Дания)	nutans	К-29921
Malva (Латвия)	nutans	К-30925
Saloon (Чехия)	nutans	К-30930
Pongo (Швеция)	nutans	К-30946
Jelen (Сербия)	nutans	К-30955
Ansis (Латвия)	nutans	К-30963

этом изозимы *SODI*, III, IV+V (встречались вместе), *PERI*, *GDHII*, *ADHII*, III, IV, *GSRI*, II, III–V (встречались совместно), *VI*, *MDHII*, IV, V, *G6PDI*, II–III (тоже совместно) отмечали всегда (они были облигатными), в то время как *SODI*,

PERII, *GDHII*, III, IV, *ADHI*, *GSRII*, VIII, *MDHI*, II, *G6PDIV*–VIII (встречались совместно) наблюдали от случая к случаю (т.е. они были факультативными).

На основе анализа фореграмм, полученных путем разгона экстрактов 14-ти контрастных по устойчивости сортов, была произведена оценка частот факультативных зон активности изученных ферментов (*SODI*, *GDHII*, III и IV; *ADHI*, *MDHI*, II) с помощью ϕ -критерия углового преобразования Фишера. Из анализа были исключены *PERII*, *G6PDIV*–VIII, *GDHIV*, *GSRII*, VIII ввиду того, что не удалось выявить связи этих изозимов с устойчивостью или чувствительностью сортов, и *CAT*, которая обладала достаточно слабой активностью, и поэтому не удалось собрать достаточной статистики присутствия этого фермента. Результаты оценки частот встречаемости изоформ изученных ферментов представлены в табл. 2. В данном случае рассмотрены результаты исследования интактных семян.

У всех рассмотренных изозимов рассчитанные величины ϕ -критерия Фишера больше критической величины $\phi_{кр}^{0.01}$ (2.31), за исключением *GDHII*, где он является значимым при $\phi_{кр}^{0.05}$ (1.64). Таким образом, выделенные в настоящем исследовании редко встречающиеся изоформы исследованных ферментов можно рассматривать в качестве биохимических маркеров чувствительности или устойчивости к действию кадмия. Изоферменты *SODI*, *GDHII*, *MDHI* с большей вероятностью встречались у чувствительных сортов, в то время как *GDHII*, *ADHI*, *MDHII* – у устойчивых. Из представленных в табл. 2 данных следует, что обнаруженный при исследовании 50-ти сортов ярового ячменя полиморфизм по устойчивости к действию кадмия [6] сопряжен с биохимическим полиморфизмом.

Таблица 2. Встречаемость изоформ исследованных ферментов у 14 контрастных по устойчивости к кадмию сортов ярового ячменя

Изофермент	Частота встречаемости		Величина критерия Фишера
	устойчивые, %	чувствительные, %	
<i>SODI</i>	28.571	71.429	4.799
<i>GDHII</i>	14.285	71.429	6.593
<i>GDHIII</i>	14.286	3.571	2.275
<i>ADHI</i>	57.148	28.571	3.228
<i>MDHI</i>	12.5	37.5	3.148
<i>MDHII</i>	78.571	57.143	2.386

Одной из причин угнетения процессов роста и развития растительных организмов, вызываемого ТМ, такими как кадмий, является окислительный стресс [27–31]. Суть этого явления состоит в повышенной продукции активных форм кислорода (АФК), которые, имея высокую реакционную способность, вызывают повреждение структурных элементов клетки [32–34]. В наших работах [6–8] было показано, что воздействие свинца и кадмия на проростки ячменя ведет к существенному угнетению ростовых процессов и возникновению морфологических аномалий корней. Было бы логично увязать подобные явления с окислительным стрессом. Например, свободные радикалы типа $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ – обычные субпродукты процесса окислительного фосфорилирования и других процессов, легко обнаруживаемые в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах [35].

Разумеется, в организме существуют механизмы и системы, призванные контролировать данный процесс, учитывая его потенциальную опасность [36]. Но в ряде случаев данная сбалансированная система способна давать серьезные сбои, не справляясь с избыточной продукцией АФК [37]. Полагают, что эти соединения легко вступают в химические реакции с ДНК, белками и липидами, нарушая их структуру и функциональность [38]. Но в то же время образование АФК запускает механизмы, направленные на их ликвидацию, такие как увеличение биосинтеза антиоксидантных ферментов *SOD*, *CAT*, *PER* и др. Подобные тезисы подтверждены и данными настоящего исследования, где был обнаружен рост активности *CAT* в ответ на введение в среду кадмия.

Одним из важнейших энзимов, входящих в число высокомолекулярных антиоксидантов, является супероксиддисмутаза [39]. Химизм катализируемого ею процесса заключается в обезвреживании супероксид-радикала $O_2^{\cdot-}$ путем перевода его в пероксид водорода (который потом может быть превращен в воду и кислород посредством другого важного фермента – каталазы) и молекулярный кислород. Примечательно, что окислительный статус клетки разнится в ее компартментах, поэтому повышенная продукция АФК вызывает активацию не одного, а нескольких генов, ответственных за синтез нескольких изоформ *SOD*, работающих в специфических компартментах клетки [40]. Впервые это теоретическое предположение, актуальное как для растительных, так и для животных клеток, было экспериментально подтверждено на кукурузе [41, 42]. В нашем исследовании были получены аналогичные данные,

показывающие, что изоформа *SOD1* имеет связь с чувствительностью к действию ТМ. Вероятно, данный изоэнзим имеет большую активность в детоксикации свободных радикалов, что и предопределило его ассоциируемость с более уязвимыми к действию техногенного стресса сортами ячменя. Хотя, надо заметить, что это наблюдение не является абсолютным, и в предшествующей работе со свинцом этот изоэнзим *SOD* не удалось увязать с устойчивостью к стрессу [9].

Существуют работы, постулирующие связь высокого уровня генетического полиморфизма с устойчивостью к стрессу [43]. В частности, одним из примеров такого полиморфизма становится как раз возникновение редких изоформ *SOD* и других антиоксидантных ферментов. Частота и разнообразие подобных изоэнзимов напрямую связана с уровнем полиморфизма. Наша работа вполне согласуется с такими утверждениями, демонстрируя наличие у контрастных по устойчивости сортов ячменя довольно высоких уровней биохимического полиморфизма.

Есть основания полагать, что возникновение редких аллелей антиоксидантных ферментов связано с особенностями формирования сортов, у которых они обнаруживаются. Возможно, условия среды, в которых были выведены эти сорта, предполагали достаточно высокую стрессовую нагрузку, что и предопределило эволюционное закрепление таких аллельных вариантов, как необходимых для приспособления к неблагоприятным по какому-то фактору условиям. При этом стоит отметить, что соотношение факторов среды могло варьировать, что и объясняет неоднозначную реакцию изоферментов на различные ТМ. Подобную ситуацию можно наблюдать, например, в случае повышенной засоленности почв или в условиях произрастания вблизи с месторождениями полиметаллических руд, где содержание каждого элемента (в %) в составе минералов способно заметно различаться.

Известно, что антиоксидантные системы организма не являются специфичными, а способны аналогичным образом реагировать на разные неблагоприятные факторы среды [44–46]. Это обстоятельство предопределяет сложность ответа на стресс и различия в таковом по отношению, например, к действию 2-х металлов. О различиях в ответе культурных растений на действие токсических элементов, содержащихся в почве (на примере As), сообщают в [47]. В соответствии с представлениями о движущем отборе в подобной ситуации изоэнзимные варианты, имеющие повышенную способность к обезвреживанию АФК, имеют все шансы сохраниться в ряду поколений. Не стоит

упускать из внимания и те особенности, которые могут быть предопределены хозяйственно ценными признаками сорта, сформированными в ходе искусственного отбора. Например, высокое содержание липидов в семенах создает повышенный риск свободнорадикального окисления этих метаболитов, что в конечном итоге ведет к необходимости ликвидации этих нежелательных соединений.

Одним из путей решения данной проблемы становится возникновение новых, более эффективных изоформ антиоксидантных ферментов. Потенциальная возможность сохранения таких аллельных вариантов в генетическом коде растения была показана в работе [48], посвященной особенностям транскрипции гена, отвечающего за изоформу *Mn-SOD*. При наличии в среде обитания растения ионов ртути экспрессия отвечающего за этот изоформ гена заметно повышалась, при этом росла и активность соответствующего изофермента. Аналогичные данные, свидетельствующие о преимуществах высокополиморфных образцов в стрессовых условиях, получены и для других ТМ, например, кобальта [43]. Эти сведения показали неоднозначность и сложность механизмов стрессоустойчивости живых систем, способность антиоксидантных ферментов реагировать на различные факторы среды. Например, отмечено сходство в ответе растений на действие не только химических, но и физических факторов, таких как ионизирующее излучение [49].

При всей важности *SOD* для жизнедеятельности клеток сам по себе этот фермент не может полностью защитить растение от окислительного стресса. Причина этого кроется в том, что продукт его работы — H_2O_2 тоже представляет опасность, потому для обеспечения нормального функционирования организма необходимо поддерживать его концентрацию на низком уровне [50]. Кроме того, пероксиды способны образовываться вследствие воздействия на организм ядовитых веществ (в том числе ТМ) и патогенов. Некоторые исследователи [50] для пероксида водорода отмечали закономерности, сходные с рассмотренными выше: у чувствительных к стрессовым воздействиям сортов сельскохозяйственных культур выявлены более высокие уровни содержания этого вещества, чем у устойчивых. Однако не стоит считать, что H_2O_2 играет чисто негативную роль в функционировании живых систем. Напротив, известно [51], что молекулы пероксида водорода могут выполнять сигнальную функцию, запуская механизмы ответа на негативное воздействие извне. К таковым можно отнести восстановление поврежденной клеточной стенки

[52], связывание вредных ионов и окисление патогенов (например, вирусные частицы и бактерии могут “сжигаться” пероксидом водорода) [53], продукцию специальных белков, ответственных за подавление патогенов и фитоалексинов [54, 55].

Все эти сведения проясняют причины сделанного нами наблюдения, что *CAT*, имея в случае с интактными проростками настолько низкую активность, что ее зачастую не удавалось обнаружить, при наличии в среде Cd^{2+} уверенно выявлялась практически всегда. Это объясняется повышенным образованием пероксидов под воздействием токсиканта. В нашем предшествующем исследовании [9] отмечена связь редкой изоформы *PER* с устойчивостью к Pb^{2+} , что тоже позволяет полагать, что этот изоформ более эффективен в ликвидации пероксидов. Впрочем, в случае с кадмием сходных закономерностей подтвердить не удалось, но это свидетельствует не об их принципиальном отсутствии в данном случае, а скорее — о сложном характере ответа на стресс. Адаптация к негативным факторам среды — комплексный процесс, в который вовлекаются различные не только высокомолекулярные, но и низкомолекулярные антиоксиданты.

Не стоит недооценивать и значение ферментов, прямо не вовлеченных в ответ на стрессовые воздействия. Будучи ответственными за различные важные метаболические процессы, они тоже тем или иным образом реагируют на изменения во внутренней и окружающей среде. Например, *GDH* играет значимую роль в азотном обмене, являясь катализатором процесса восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до глутамата и обратного ему процесса окислительного дезаминирования [56] при участии в качестве кофермента восстановленной и окисленной форм *NAD*. Важность этого процесса для жизнедеятельности растений заключается в том, что таким образом происходит включение минерального азота в обмен веществ. Если прямая реакция используется для построения всех азотистых соединений, то обратная, напротив, служит для разрушения старых органических соединений и высвобождения азота.

Подобно рассмотренным выше ферментам, *GDH* также присуща множественность изоформ, в работах [57, 58] указано, что данный фермент имеет 2 изоформы, отличающиеся по молекулярной массе. Вероятно, речь идет как раз о тех изоформах, которые были выявлены в настоящей и предшествующей наших работах. Каждая из этих изоформ отвечает преимущественно за один из про-

тивоположно направленных процессов обмена азота, и их соотношение определяет баланс этих реакций. Изменения окружающей среды способны сместить это равновесие в любую сторону. Способствуя накоплению в тканях широкого диапазона азотсодержащих веществ, *GDH* может быть опосредованно вовлечена в ответ на стрессовые воздействия среды. Об этом свидетельствуют работы [59–61], где содержание биологически активных веществ и развитие биомассы увязывали с устойчивостью к действию токсикантов и сообщали, что, добившись роста этих показателей (путем генетической модификации), можно усилить и стрессоустойчивость.

В настоящем исследовании отмечали наличие главным образом 2-х изоформ *GDH*, хотя в редких случаях это число увеличивалось до 4-х (в работе со свинцом было только 2 изоформы). При этом если в случае свинца аллель *GDHII* ассоциировалась с устойчивостью к ТМ, то в случае с кадмием наблюдали обратную картину, хотя аллель *GDHIII* все же значимо чаще встречается у устойчивых сортов. Можно предположить, что этот наиболее легкий изофермент главным образом катализирует реакцию аминирования, что определяет большую активность анаболизма у имеющих его сортов, а как следствие — их устойчивость к стрессу. Более тяжелый и гораздо чаще встречающийся аллель *GDHII*, видимо, не столь избирателен. Потому в разных случаях способен встречаться и у устойчивых, и у чувствительных сортов.

Индивидуальные особенности сортов, вероятно, способны отразиться и на том, как именно поведет себя изозим в данном случае. Все это еще раз подтверждает, что ответ организма на стресс является комплексным процессом, способным заметно видоизменяться при модификации внешнего воздействия. Надо полагать, что такая ситуация имеет важный смысл с точки зрения эволюции, делая организм более пластичным, позволяя ему быстрее и эффективнее приспосабливаться к разным условиям среды. Это предположение подтверждается данными работы [62], свидетельствующими о том, что более легкая изоформа *GDH* (из 2-х) чаще встречается у тех линий сосны, которые чувствительны к воздушному загрязнению. Применительно к ячменю наличие у него такой пластичности на уровне ферментных систем дало данной культуре возможность занять свое место в сельском хозяйстве — одной из основных сельскохозяйственных культур, возделываемых по всему миру в самых разнообразных условиях.

По некоторым данным [63], определенные изоформы *GDH*, отвечающие за дезаминирование, способны активироваться не только NH_4^+ , но и катионами типа Me^+ , Me^{2+} (например, двухзарядными ионами Pb^{2+} , Cd^{2+}), при этом интенсивность реакции может быть даже больше, чем в случае иона аммония.

Таким образом, постоянное наличие ионов металлов в питательном субстрате способно предопределить соотношение соответствующих изоформ *GDH* у культур, возделываемых длительное время в таких условиях. В конечном счете эти обстоятельства могут привести к тому, что сформировавшиеся в итоге сорта могут показывать повышенную устойчивость или чувствительность к избытку металлов. Примечательно, что указанные реакции должны обнаруживаться даже у интактных растений. Подобная информация способна пролить свет на вопрос о причинах связи наличия легких изоформ *GDH* с устойчивостью к техногенному стрессу.

Сходную ситуацию наблюдают и с другими метаболическими ферментами. Например, филогенетические исследования выявили 2 или 3 аллеля *ADH* (а в некоторых случаях больше 3-х) у двудольных и однодольных растений [64]. При этом на примере кукурузы обнаружено, что у тех или иных сортов и линий растения уровень активности гена, кодирующего аллель *ADH*, неодинаков. Помимо того, экспрессия генов, кодирующих изоформы *ADHI* и *ADHII*, различается в зависимости от тканей растения. Выявлено, что усиление экспрессии *ADH* наблюдается в ответ на средовой стресс, такой как гипоксия, дегидратация, низкие температуры. Рост экспрессии этого фермента также связан с накоплением абсцизовой кислоты, что связано с адаптацией к стрессу [64].

В нашем исследовании у устойчивых к действию кадмия сортов ячменя отмечали наличие редких аллелей *ADH*. На основании приведенных выше сведений можно предполагать, что эти изоформы способствуют более эффективному сопротивлению стрессу.

Доказано существование несколько изоформ и у *MDH* [65]. При этом фермент в эукариотических клетках главным образом представлен 2-мя изозимами. Первый из них находится в матриксе митохондрий, где *MDH* является ключевым ферментом в цикле трикарбоновых кислот, катализируя реакцию окисления малата. Помимо этого, фермент принимает участие в превращении глицина в серин и переносе CO_2 для его дальнейшей фиксации в хлоропластах. Другая изоформа встречается в цитоплазме, катализируя реакцию

обратимого превращения малата и аспартат [65, 66]. В ходе этого процесса происходит перенос малата через митохондриальную мембрану для дальнейшего превращения в оксалоацетат, который вовлекается в иные клеточные процессы.

Помимо этого, *MDH* обнаруживается в митохондриях клеток (глиоксисомы и пероксисомы), хлоропластах [65]. Почти все эти формы *MDH* в качестве кофактора используют NAD, кроме той, что находится в хлоропласте — у нее кофактором является NADP. В хлоропластах фермент участвует в C₃- и C₄-путях фотосинтеза, а именно в превращении малата в оксалоацетат, таким образом контролируя поступление и выведение этих метаболитов из органелл.

Во всех клеточных компартментах выявляется целый ряд изоформ этого фермента [65, 66]. Известно [67], что наличие во внутренней среде растения ТМ оказывает угнетающее воздействие на активность ферментов циклов Кальвина и Кребса, в том числе и на *MDH*. В нашем исследовании мы выявили 2 изозима этого фермента, один из которых с большей вероятностью встречается у устойчивых, а другой — у чувствительных сортов ячменя. Такие результаты связаны с многообразием функций *MDH*. Вероятно, одни изоформы *MDH* имеются у устойчивых сортов, обеспечивая им лучшее сопротивление к негативному воздействию среды. В то время как другие, напротив, довольно чувствительны к токсическому стрессу, и их ингибирование ионами ТМ сразу же ведет к разбалансировке физиологических процессов и угнетению растения.

ВЫВОДЫ

На основании полученных в ходе настоящего исследования результатов можно заключить, что полиморфизм устойчивости ярового двурядного ячменя к действию кадмия связан с особенностями ферментной системы растительного организма. Были идентифицированы редкие аллели супероксиддисмутазы, глутаматдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, с большей вероятностью встречающиеся у устойчивых или чувствительных к кадмию сортов. Этот полиморфизм обнаруживается на интактных проростках, а внесение в среду поллютанта не выявляет значимых отличий от контрольного варианта, хотя этот вопрос, вероятно, требует отдельного и более подробного исследования. На это также указывает тот факт, что *CAT*, почти не активную у интактных проростков, уверенно идентифицировали при наличии в среде кадмия, хотя

и не удалось выявить различий в частотах встречаемости ее изоформ между группами контрастных сортов.

Спектр факультативных изозимов не совпадал с полученным ранее для свинца, что свидетельствовало о сложности и неоднозначности ответа растительного организма на техногенный стресс на биохимическом уровне. Изохим *SOD1* оказался ассоциированным с чувствительностью к действию кадмия (в случае свинца не удалось выявить статистически значимых связей с устойчивостью), аллель *GDH1* также чаще встречался у чувствительных сортов (обратная ситуация по сравнению со свинцом), в то время как *GDH3* был связан с устойчивостью к кадмию (при исследовании полиморфизма по устойчивости к свинцу не обнаруживался). Также с большей вероятностью у устойчивых сортов встречались изоформы *ADH1* и *MDH1*, а *MDH1* — у чувствительных. Выявленные изомеры указанных ферментов можно рассматривать как биохимические маркеры устойчивости или чувствительности избранных сортов к действию кадмия.

Учитывая различия в данных устойчивости к 2-м тяжелым металлам, полученные результаты не могут рассматриваться как абсолютные. В целом, общие закономерности ответа на токсическое действие ТМ воспроизводятся для всех металлов, но существуют и заметные различия. Вероятно, требуется проведение аналогичных исследований с другими тяжелыми металлами, а возможно, и иными сельскохозяйственными культурами. Полученные данные имеют важное фундаментальное значение для понимания причин и механизмов формирования стрессоустойчивости живых систем.

Потенциально накопленные сведения могут быть полезны и в прикладном плане для нужд сельскохозяйственного производства на загрязненных ТМ территориях, однако в силу указанных выше причин давать конкретные практические рекомендации было бы преждевременно. Следует продолжать лабораторные исследования в целях выявления таких изозимов, которые подтвердили бы свой статус как маркеров устойчивости или чувствительности для целого диапазона тяжелых металлов, и только после этого можно было бы переходить к проведению вегетационных и полевых экспериментов. Подобный подход позволяет подготовить исходный материал для нужд селекционной работы, имеющей целью выведение устойчивых к воздействию техногенных стрессоров сортов основных сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к действию тяжелых металлов // Физиол. и биохим. культ. раст. 1994. Т. 26. № 2. С. 107–117.
2. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Усп. совр. биол. 1995. Т. 115. № 3. С. 261–276.
3. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. 2001. V. 212. P. 475–486.
4. Sawidis T., Breuste J., Mitrovic M., Pavlovic P., Tsigaridas K. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities // Environ. Pollut. 2011. P. 3560–3570.
5. Кулаева О.А., Цыганов В.Е. Молекулярно-генетические основы устойчивости высших растений к кадмию и его аккумуляции // Экол. генетика. 2010. Т. 8. С. 3–15.
6. Гераськин С.А., Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Анализ внутривидового полиморфизма ячменя по устойчивости к действию кадмия // Агрохимия. 2021. № 8. С. 57–64.
7. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Влияние нитрата свинца на морфологические и цитогенетические показатели растений ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Агрохимия. 2014. № 7. С. 45–52.
8. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Гераськин С.А. Внутривидовой полиморфизм ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) по устойчивости к действию свинца // Сел.-хоз. биол. 2014. № 5. С. 78–87.
9. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Гераськин С.А. Исследование изозимного полиморфизма у сортов ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), контрастных по устойчивости к свинцу // Сел.-хоз. биол. 2016. Т. 51. № 1. С. 89–99.
10. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Сравнительный анализ частоты цитогенетических эффектов в апикальной меристеме корешков проростков сортов ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), контрастных по устойчивости к свинцу // Тр. по прикл. бот., генет. и селекции. 2016. Т. 177. № 1. С. 50–68.
11. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Гераськин С.А. Факторный анализ полиморфизма сортов ячменя по изоэнзимам, маркирующим устойчивость к свинцу // Агрохимия. 2017. № 6. С. 73–80.
12. Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А. Генетические основы радиорезистентности и эволюция. М.: Атомиздат, 1993. С. 250.
13. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983. С. 320.
14. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. С. 272.
15. Чесноков Ю.В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений // Сел.-хоз. биол. 2005. № 1. С. 20–40.
16. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. С. 431.
17. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экол. генетика. 2010. Т. 8. № 1. С. 12–24.
18. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
19. Cartes P., McManus M., Wulf-Zotelle C. Differential superoxide dismutase expression in ryegrass cultivars in response to short term aluminum stress // Plant Soil. 2012. V. 350. P. 353–363.
20. Wang Y., Greger M. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation and distribution in willow // J. Environ. Qual. 2004. V. 33. P. 1779–1785.
21. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. М.: Стандартиформ, 2010. С. 25.
22. Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. С. 247.
23. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1976. С. 256.
24. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. С. 288.
25. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. N.Y.: CRC Press, 1994. P. 268.
26. Зыкова Н.Ю., Лапкина О.С., Хлоповских Ю.Г. Методы математической обработки данных. Воронеж: Издат.-полиграф. центр ВоронежГУ, 2008. С. 84.
27. Boening D.W. Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review // Chemosphere. 2000. V. 40. P. 1335–1351.
28. Wang Y., Greger M. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation and distribution in willow // J. Environ. Qual. 2004. V. 33. P. 1779–1785.
29. Zhou Z.S., Huang S.Q., Guo K., Mehta S.K., Zhang P.C., Yang Z.M. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. // J. Inorg. Biochem. 2007. V. 101. P. 1–9.
30. Drazkiewicz M., Scorezinska-Polit E., Krupa Z. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress // Chemosphere. 2007. V. 67. P. 188–193.
31. Malecka A., Jarmuszkiewicz W., Tomaszewska B. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells // Acta Biochim. Polonica. 2001. V. 48. № 3. P. 687–690.
32. Cho U.H., Park J.O. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings // Plant Sci. 2000. V. 156. P. 1–9.
33. Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Spanevello R.M. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings // Chemosphere. 2006. V. 65. P. 999–1006.

34. Chen J., Shiyab S., Han F.X. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata* // *Ecotoxicology*. 2009. V. 18. P. 110–121.
35. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 373–399.
36. del Ri'o L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes, production, scavenging, and role in cell signaling // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 330–335.
37. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Университет, 2007. 140 с.
38. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // *Trends Plant Sci.* 2004. V. 9. P. 490–498.
39. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide-dismutase // *Biochemie*. 1975. V. 57. P. 657–660.
40. Inze D., Montagu M. Oxidative stress in plants // *Current Opinion in Biotechnology*. 1995. V. 6. P. 153–158.
41. Scandalios J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases // *Plant Physiol.* 1993. V. 101. P. 7–12.
42. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1331–1341.
43. Rancelis V., Cesniene T., Kleizaite V. Influence of cobalt uptake by *Vicia faba* seeds on chlorophyll morphosis induction, SOD polymorphism and DNA methylation // *Environ. Toxicol.* 2010. V. 10. P. 5–15.
44. Tanaka Y. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts // *Plant Sci.* 1999. V. 148. P. 131–138.
45. Taylor N.L., Day A.C. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 394. P. 1–10.
46. Vacca R.A. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. № 3. P. 1100–1112.
47. Mallick S., Sinam G., Sinha S. Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of *Zea mays* L.: differential detoxification mechanism and effect on nutrient status // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011. V. 74. P. 1316–1324.
48. Elbaz A., Wei Y., Meng Q. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamidomonas reinhardtii* // *Ecotoxicology*. 2010. V. 10. P. 8–18.
49. Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* 2000. V. 57. P. 779–795.
50. Lanubile A., Bernardi J., Marocco A. Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides* // *Environ. Exp. Bot.* 2012. V. 78. P. 39–46.
51. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1997. V. 48. P. 251–275.
52. Bolwell G.P., Butt V.S., Davies D.R., Zimmerlin A. The origin of the oxidative burst in plants // *Free Radic. Res.* 1995. V. 23. P. 517–523.
53. Lane B.G. Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants // *FASEB J.* 1994. V. 8. P. 294–301.
54. Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses // *Plant Cell.* 1996. V. 8. P. 1773–1791.
55. Greenberg J.T., Guo A., Klessig D.F., Ausubel F.M. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions // *Cell.* 1994. V. 77. P. 551–563.
56. Grabowska A., Nowicki M., Kwinta J. Glutamate dehydrogenase of the germinating triticale seeds: gene expression, activity distribution and kinetic characteristics // *Acta Physiol. Plant.* 2011. V. 33. P. 1981–1990.
57. Loulakis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities // *Physiol. Plant.* 1996. V. 96. P. 29–35.
58. Purnell M.P., Scopelites D.S., Roubelakis-Angelakis K.A. Modulation of higher-plant NAD(H) dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta-subunit level // *Planta*. 2005. V. 222. P. 167–180.
59. Ameziane R., Bernhardt K., Lightfoot D.A. Expression of the bacterial *gdhA* gene encoding a glutamate dehydrogenase in tobacco and corn increased tolerance to the phosphinothricin herbicide // *Nitrogen in a sustainable ecosystem: From the cell to the plant* / Eds. M.A. Martins-Loucao, S.H. Lips. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 2000. P. 339–343.
60. Mungur R., Glass A.D.M., Goodenow D.B. Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene // *J. Biomed. Biotechnol.* 2005. № 2. P. 198–214.
61. Mungur R., Glass A.D., Wood A.J., Lightfoot D.A. Increased water deficit tolerance in *Nicotiana tabacum* expressing the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 54. P. 260–272.
62. Geburek T., Scholz F., Knabe W. Genetic studies by isozyme gene loci on tolerance and sensitivity in air polluted *Pinus sylvestris* field trial // *Silvae Genetica*. 1987. V. 36. № 2. P. 49–53.
63. Wootton J.C. Re-assessment of ammonium-ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases // *Biochem. J.* 1983. V. 209. P. 527–531.
64. Thompson C.E., Fernandes C.L., de Souza O.N., de Freitas L.B., Salzano F.M. Evaluation of the impact of functional diversification on Poaceae, Brassicaceae, Fabaceae, and Pinaceae alcohol dehydrogenase enzymes // *J. Mol. Model.* 2010. V. 16. P. 919–928.
65. Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1100. P. 217–234.
66. Dasika S.K., Vinnakota K.C., Beard D.A. Determination of the catalytic mechanism for mitochondrial malate dehydrogenase // *Biophys. J.* 2015. V. 108. № 1. P. 408–419.
67. Sharma P., Dubey R.S. Lead toxicity in plants // *Braz. J. Plant. Physiol.* 2005. V. 17. P. 35–52.

Analysis of the Spring Barley (*Hordeum vulgare* L.) Isoenzyme Polymorphism Connection with Its Tolerance to the Cadmium Influence

A. V. Dikarev^{a,#}, V. G. Dikarev^a, and N. S. Dikareva^a

^a*Russian Institute of Radiology and Agroecology*

Kiev highway 109 km, Kaluga region, Obninsk 249032, Russia

[#]*E-mail: ar.djuna@yandex.ru*

In was the laboratory experiment carried on with the spring barley variants, which shown a contrasting reactions to the cadmium influence. The topic of this work was a searching of the connection of the barley variants response to the toxic stress with the isoenzyme polymorphism of some ferments, which are determined a plants tolerance to the environmental stress. It was taken 14 spring barley variants with the different geographic origin (7 – tolerant to Cd²⁺ and 7 – sensitive) for this task. Such variants were selected on the base of the morphometric criteria in our previous work. The seeds of these variants were germinated and then a protein extracts were prepared from the seedlings. The extracts were separated by electrophoresis in the polyacrilamide gel. The gel blocks after this process were stained for discovering of the enzyme activity zones. The list of the ferments used was follows: superoxidedismutase, peroxidase, glutamatedehydrogenase, alcoholdehydrogenase, malatedehydrogenase, glutationedehydrogenase, glucose-6-phosphatedehydrogenase, catalase. The frequencies of all enzyme activity zones were counted, and thus such frequencies were compared for the groups of the Cd²⁺ tolerant and sensitive barley variants. Consequently, it was discovered the specific alleles, which are found in the tolerant or sensitive variants with the much probability. Therefore, some conclusion can be stated: the reaction of the selected barley variant to the Cd²⁺ influence is connected with some specific isozyme variants. The data, collected in this work, can be used for forecasting of the tolerance of the selected barley variants to the Cd²⁺.

Key words: spring barley, cadmium, environmental stress tolerance, tolerant and sensitive barley variants, electrophoresis, isoenzyme analysis.