

УДК 573.6:631.527:633.16

О. Н. Шуплецова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;

И. Г. Широких, доктор биологических наук, заведующая лабораторией

ФГБНУ «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства

Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого»,

(г. Киров, 610007, ул. Ленина, 166 а, тел. (8332) 331026, e-mail: olga.shuplecova@mail.ru)

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЯЧМЕНЯ К ТОКСИЧНОСТИ МЕТАЛЛОВ И ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ ПУТЕМ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Изучена реакция ячменя в каллусных культурах на селективных средах с ионами Cd^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} и ПЭГ в качестве осмотика. При анализе дозовых кривых, имеющих линейный характер для показателя выживаемости, выявлены летальные и сублетальные (LD_{50}) концентрации металлов: марганец (350 и 250 мг/л соответственно), кадмий (30 и 10 мг/л), алюминий (42 и 20 мг/л). Дозовые кривые, отражающие частоту регенерации в селективных условиях, имели конфигурацию, близкую к синусоидальной при наличии нескольких максимумов. Предложены оптимальные селективные схемы для отбора каллусных линий, устойчивых к комплексу стрессов. Для получения линии, с устойчивостью к комплексной ионной токсикации рекомендуется вводить в селективные среды ионы кадмия (20 мг/л) на этапе пролиферации, а ионы марганца (200 мг/л) – на этапе морфогенеза. Ионы алюминия (20-30 мг/л) можно вводить на том и другом этапах развития каллусной ткани, без существенного снижения выживаемости каллуса и частоты регенерации растений. Для отбора каллусов с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу целесообразно вводить осмотик (10% ПЭГ) исключительно на этапе морфогенеза, а на этапе пролиферации возможно воздействие на каллус ионами алюминия (20 мг/л) в сочетании с 20 мг/л ионов кадмия или с 200 мг/л марганца. С использованием разработанных схем отбора получено 50 растений - регенерантов ячменя для использования в качестве исходного материала в практической селекции культуры.

Ключевые слова: ячмень (*Hordeum vulgare* L.), каллусная культура, алюминий, марганец, кадмий, водный дефицит, схемы отбора, растения-регенеранты.

O.N. Shupletsova, Candidate of Biology, senior researcher;

I.G. Shirokikh, Doctor of Biology, head of the laboratory,

FSBRI “Research Institute of Agriculture of North-East Area after N.V. Rudnitsky”

(610007, Kirov, Lenin Str., 166a; tel.: (8332) 331026, e-mail: olga.shuplecova@mail.ru)

INCREASE OF BARLEY TOLERANCE TO TOXICITY OF METALS AND OSMOTIC STRESS USING CELL SELECTION

The reaction of barley in callus cultures has been studied using ions Cd^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} and PEG as osmotic. Analyzing amount of doses for crop survival, lethal and sublethal metal concentrates were found: manganese (350 and 250 mg/l, respectively), cadmium (30 and 10 mg/l), aluminum (42 and 20 mg/l). Optimal schemes have been suggested to select callus lines tolerant to a complex of stresses. To select a line resistant to complex ion toxicity, it has been recommended to use ions of cadmium (20 mg/l) during a proliferation period and ions of manganese (200 mg/l) during a period of morphogenesis. Ions of aluminum (20-30 mg/l) can be used during both stages of callus tissue development, supporting survival of callus and frequency of plant regeneration. To choose callus with total tolerance to ion toxicity and osmotic stress it's advisable to apply osmotic (10% of PEG) only during a period of morphogenesis, during a proliferation period it's possible to use aluminum (20 mg/l) with ions of cadmium (20 mg/l) or ions of manganese (200 mg/l). Using the developed scheme of selection we received 50 plants-regenerators of barley for applying them as starting material in crop selection.

Keywords: *barley (Hordeum vulgare L.), callus crop, aluminum, cadmium, manganese, water deficit, schemes of selection, plant-regenerators.*

Введение. Ячмень относится к стратегически важным сельскохозяйственным культурам и широко используется в животноводстве, перерабатывающей и пищевой промышленности. Лимитирующим фактором урожайности ячменя на доминирующих дерново-подзолистых и подзолистых почвах Нечерноземья является почвенная кислотность, негативное влияние которой усиливается наличием в них подвижных ионов алюминия Al^{3+} [1]. Ионную токсичность кислых почв связывают также с подвижностью ионов марганца Mn^{2+} [2]. В последнее время, вследствие усиления техногенного влияния, в почвах сельскохозяйственного назначения повышается содержание тяжелых металлов, в частности, содержание ионов кадмия Cd^{2+} значительно превышает безопасные пределы [3].

Повышенная подвижность тяжелых металлов в кислых почвах приводит к обширным патологическим изменениям во многих тканях растительного организма. Несмотря на различие физиологических механизмов, все тяжелые металлы нарушают окислительно-восстановительные процессы в клетках растений. При этом снижается усвояемость основных питательных веществ растениями, что, в свою очередь, вызывает угнетение развития корневой системы, снижение интенсивности дыхания, торможение фотосинтеза, хлороз (некроз) листьев и возможную гибель растения [2].

Неблагоприятные для растений последствия почвенной ионной токсичности усугубляются в условиях неравномерного в течение вегетационного периода выпадения осадков на фоне повышения среднемесячных температур. Усиление стрессового давления окружающей среды расширяет спектр стрессовых поражений растений [4]. В числе мер,

обеспечивающих устойчивость зерновых культур к неблагоприятным абиотическим, в том числе техногенным воздействиям, немалая роль принадлежит селекции. Некоторые сорта поглощают тяжелые металлы, фиксируют их в корневой системе, обеспечивая получение экологически чистого зерна, практически без снижения урожайности [1].

Реализация механизмов устойчивости к ионной токсикации и обезвоживанию на клеточном и молекулярном уровне [5, 6] позволяет использовать для повышения адаптивности растений методы клеточной инженерии, которые существенно увеличивают возможности традиционной селекции, ускоряют, облегчают и удешевляют процесс отбора ценных селекционных форм. Эффективность и целесообразность этого направления подтверждается результатами проводимых во всем мире работ с использованием клеточной селекции для создания сортов, устойчивых к тем или иным стрессовым воздействиям [7-10].

В наших предыдущих исследованиях были проведены успешные отборы каллусных линий ячменя и овса, устойчивых к кислотности, токсичности алюминия и осмотическому стрессу, а также к комплексному воздействию этих факторов. Выделены перспективные регенерантные линии ячменя с урожайностью, существенно превышающей стандарт [11, 12].

К настоящему времени известны отдельные работы по получению *in vitro* растений, устойчивых к ионам меди [13], свинца и кадмия [14]. Сведения о проведении *in vitro* отборов на комплексную устойчивость к избытку ионов Al^{3+} , Cd^{2+} и Mn^{2+} в доступной нам литературе отсутствуют. В то же время известно, что токсический для растения эффект при наличии в селективной среде двух и более тяжелых металлов может как усиливаться (аддитивный синергизм), так и ослабляться (антагонизм) [15].

Целью исследований являлась разработка селективных условий для отбора каллусных линий ячменя с комплексной устойчивостью к ионной токсичности (Cd^{2+} , Mn^{2+} и/или Al^{3+}) и осмотическому стрессу, с последующим получением растений-регенерантов.

Материалы и методы. В качестве исходных генотипов для введения в культуру ткани использовали генотипы ячменя (*Hordeum vulgare* L.), предоставленные лабораторией селекции и первичного семеноводства. Индукцию каллусогенеза и регенерацию растений проводили как описано ранее [11]. Каллусную культуру получали на среде Мурасиге и Скуга (МС) без введения селективных агентов. На этапах пролиферации и морфогенеза для создания селективных условий исследуемые металлы вносили в питательные среды в виде сульфатных солей: $3CdSO_4 \times 8H_2O$ (0 – 35 мг/л Cd^{2+}); $MnSO_4 \times 5H_2O$ (0 – 400 мг/л Mn^{2+}); $Al_2(SO_4)_3 \times 18H_2O$ (20 – 30 мг/л Al^{3+}). Кислотность среды устанавливали на уровне pH 4,5. Для моделирования водного дефицита в питательную среду в качестве осмотика вносили 10 % полиэтиленгликоля (ПЭГ). Сравнивали различные схемы отбора, включающие в себя последовательное и/или одновременное воздействие селективных агентов на этапах пролиферации и морфогенеза каллусных культур (см. таблицу).

Контролем служили каллусные линии, культивируемые на средах с реакцией, близкой к нейтральной (pH 6,0), без добавления селективных агентов. О приемлемости для клеточной селекции той или иной селективной схемы судили по средним значениям выживаемости каллуса и частоте регенерации растений.

Схемы отбора устойчивых каллусных линий

№	Среда для пролиферации	Среда для морфогенеза
Блок А. Селективные среды с Cd^{2+} и Al^{3+} (мг/л)		
1	30 Al^{3+}	20 Cd^{2+}
2	20 Cd^{2+}	30 Al^{3+}
3	30 Al^{3+} + 20 Cd^{2+}	без отбора
4	20 Al^{3+} + 15 Cd^{2+}	30 Al^{3+} + 20 Cd^{2+}
Блок Б. Селективные среды с Mn^{2+} и Al^{3+} (мг/л)		
1	30 Al^{3+}	200 Mn^{2+}
2	200 Mn^{2+}	30 Al^{3+}
3	20 Al^{3+} + 200 Mn^{2+}	без отбора
4	20 Al^{3+} + 200 Mn^{2+}	30 Al^{3+} + 200 Mn^{2+}
Блок В. Селективные среды с ПЭГ и Cd^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} (мг/л)		
1	20 Al^{3+} + 20 Cd^{2+}	ПЭГ
2	ПЭГ	20 Al^{3+} + 20 Cd^{2+}
3	20 Al^{3+} + 200 Mn^{2+}	ПЭГ
4	ПЭГ	20 Al^{3+} + 200 Mn^{2+}

Результаты. Изучение реакции каллусной ткани ячменя на ионы марганца, кадмия и алюминия в градиенте концентраций позволило выявить для каждого металла летальные дозы, вызывающие полную гибель каллусных клеток, и дозы, соответствующие 50% выживаемости каллуса (LD_{50}).

Анализ дозовых кривых показал, что каллус ячменя, в среднем для трех генотипов (Новичок, Купец, Белгородский 100, в порядке снижения кислотоустойчивости), наиболее устойчив к ионам марганца и высоко чувствителен к ионам кадмия (рис. 1). Летальные дозы и LD_{50} для марганца (350 и 250 мг/л соответственно) и кадмия (30 и 10 мг/л соответственно) отличались более чем на порядок, тогда как для алюминия критические концентрации занимали промежуточное положение и были близки к кадмию, составив соответственно 42 и 20 мг/л.

Прямой зависимости между концентрацией ионов металла в селективной среде и частотой регенерации растений в каллусных культурах, подвергнутых селективному воздействию, не выявлено. По сравнению с контролем частота регенерации изменялась волнообразно, в результате чего дозовые кривые для показателя частоты регенерации во всех случаях имели конфигурацию, близкую к синусоидальной (рис. 1). В индивидуальном для каждого из исследуемых металлов диапазоне концентраций регенерационная способность каллусных культур превышала контрольное значение. Наличие нескольких максимумов на

кривой, отражающей регенерационную способность, по-видимому, обусловлено различными механизмами токсического действия металлов в градиенте концентраций, а также функционированием различных генетических систем, определяющих морфогенетическую реакцию ячменя в стрессовых условиях.

Руководствуясь полученными данными по выживаемости и морфогенетической активности каллуса ячменя в присутствии ионов металлов, для отбора устойчивых каллусных линий в дальнейшем использовали рабочие концентрации, равные для кадмия 10 и 20, для марганца – 200, для алюминия - 20 и 30 мг/л.

В задачи следующего этапа исследований входило выявление кратности (количества селективных воздействий) и последовательности введения в селективные среды ионов металлов и осмотика по отдельности и в комбинациях, а также определение оптимального для селективного воздействия этапа развития каллусной ткани. Рассматривали различные схемы отбора, скомпонованные в три блока, в зависимости от состава селективных агентов: А - среды с добавлением ионов Cd^{2+} и Al^{3+} ; Б - среды с добавлением ионов Mn^{2+} и Al^{3+} и В - среды с добавлением ПЭГ и ионов металлов (см. таблицу). Сравнивали реакцию пяти генотипов ячменя *in vitro* при введении селективного агента на различных стадиях развития каллусной ткани – пролиферации и морфогенеза, а также при прямом и обратном воздействии селективными агентами и, в отдельных случаях- при постепенном увеличении дозы токсиканта.

В контроле для исследованного набора генотипов (Родник Прикамья; 436-06×Родник Прикамья; 436-06×Купец; 530-98×Дуэт; Дуэт×Биос) выживаемость каллусных линий составила в среднем 94,8%, а частота регенерации растений – 30,6%. При использовании для отбора устойчивых линий ячменя схем из блока А важное значение имела очередность внесения в питательные среды ионов Cd^{2+} и Al^{3+} . При воздействии ионов Al^{3+} на этапе пролиферации, а ионов Cd^{2+} на этапе морфогенеза показатели каллусной ткани снижались по сравнению с контролем в большей степени, чем при обратной последовательности селективных воздействий (рис. 2, А).

Особенно существенно снижало регенерационную способность воздействие на каллусную ткань 30 мг/л Al^{3+} в сочетании с 20 мг/л Cd^{2+} на этапе пролиферации. В результате использования менее высоких доз металлов (20 мг/л Al^{3+} + 15 мг/л Cd^{2+}) и постепенном их повышении при пассаже каллуса на морфогенную среду (30 мг/л Al^{3+} + 20 мг/л Cd^{2+}) удалось повысить показатели выживаемости (48,3%) и регенерационной способности (9,9%) до приемлемого уровня. Таким образом, для отбора каллусных линий ячменя, устойчивых одновременно к алюминию и кадмию, можно использовать схемы с последовательным введением токсичных ионов: 20 мг/л Cd^{2+} на этапе пролиферации и 30 мг/л Al^{3+} на этапе морфогенеза. Допустимо также в среду для пролиферации каллуса одновременно вводить 20

мг/л Al^{3+} и 15 мг/л Cd^{2+} , а в качестве морфогенной использовать среду с добавлением 30 мг/л Al^{3+} и 20 мг/л Cd^{2+} .

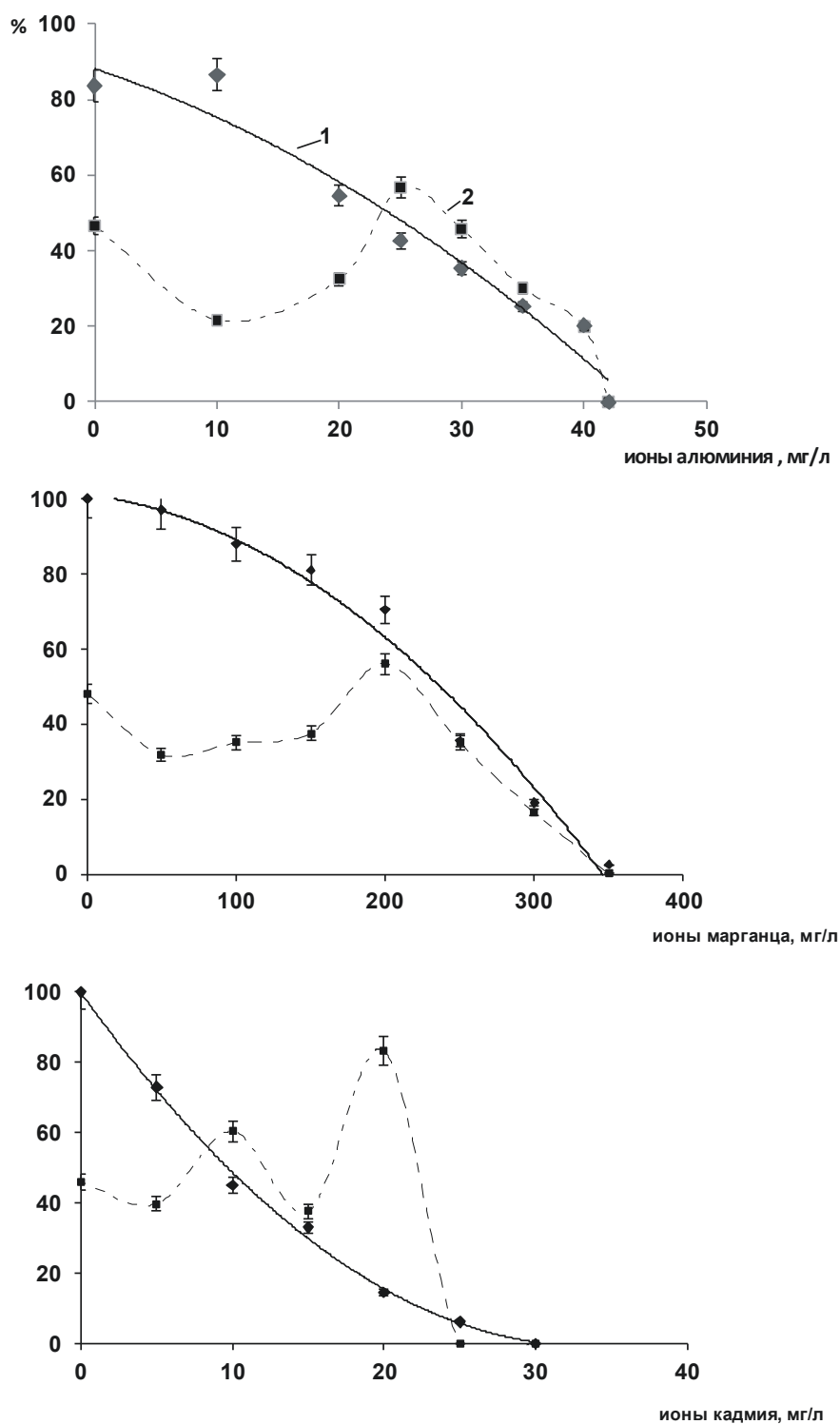


Рис. 1. Выживаемость (1) и частота регенерации (2) в каллусной культуре ячменя на средах с добавлением ионов алюминия, марганца и кадмия в различных концентрациях (средние значения для трёх генотипов и их доверительные интервалы).

Отбор каллусных линий, одновременно устойчивых к марганцу и алюминию, в соответствии со схемами блока Б, так же выявил особое значение последовательности внесения токсичных ионов. Выживаемость каллусной ткани была выше при внесении алюминия на этапе пролиферации, а марганца – на этапе морфогенеза (59,7%), чем при обратном порядке их введения в селективные среды (49,5%). Частота регенерации различалась в том и другом случае несущественно, составив 24 и 21% (рис.2, Б). Одновременное воздействие ионов Mn^{2+} и Al^{3+} как однократно, так и двукратно, не вызвало существенных изменений в жизнеспособности каллусных культур, но обусловило снижение их регенерационной способности в 3-5 раз по сравнению с отдельным последовательным воздействием. Таким образом, селективные схемы для отбора устойчивых к марганцу и алюминию форм ячменя предполагают только последовательное введение в селективные среды 200 мг/л Mn^{2+} и 30 мг/л Al^{3+} в прямом и обратном порядке.

В ходе отбора генотипов ячменя с комплексной устойчивостью к токсичности металлов и осмотическому стрессу по схемам, представленным в блоке В, более высокий уровень выживаемости в среднем для исследованных генотипов наблюдали при введении ионов металлов на этапе пролиферации, а ПЭГ – на этапе морфогенеза (50,4-53,2%), чем при обратной очередности введения селективных агентов (40,0-41,4%). У каллуса, подвергнутого действию осмотика в период пролиферации, регенерационная способность отсутствовала, если в последующем морфогенез протекал в присутствии ионов Cd^{2+} . Если на стадии морфогенеза селективные условия создавались введением в среду ионов Al^{3+} и Mn^{2+} , частота регенерации была неприемлемо низкой (6,7%). Воздействие осмотиком на этапе морфогенеза сопровождалось увеличением частоты регенерации растений в каллусной культуре ячменя в 3 и более раз (рис. 2, В).

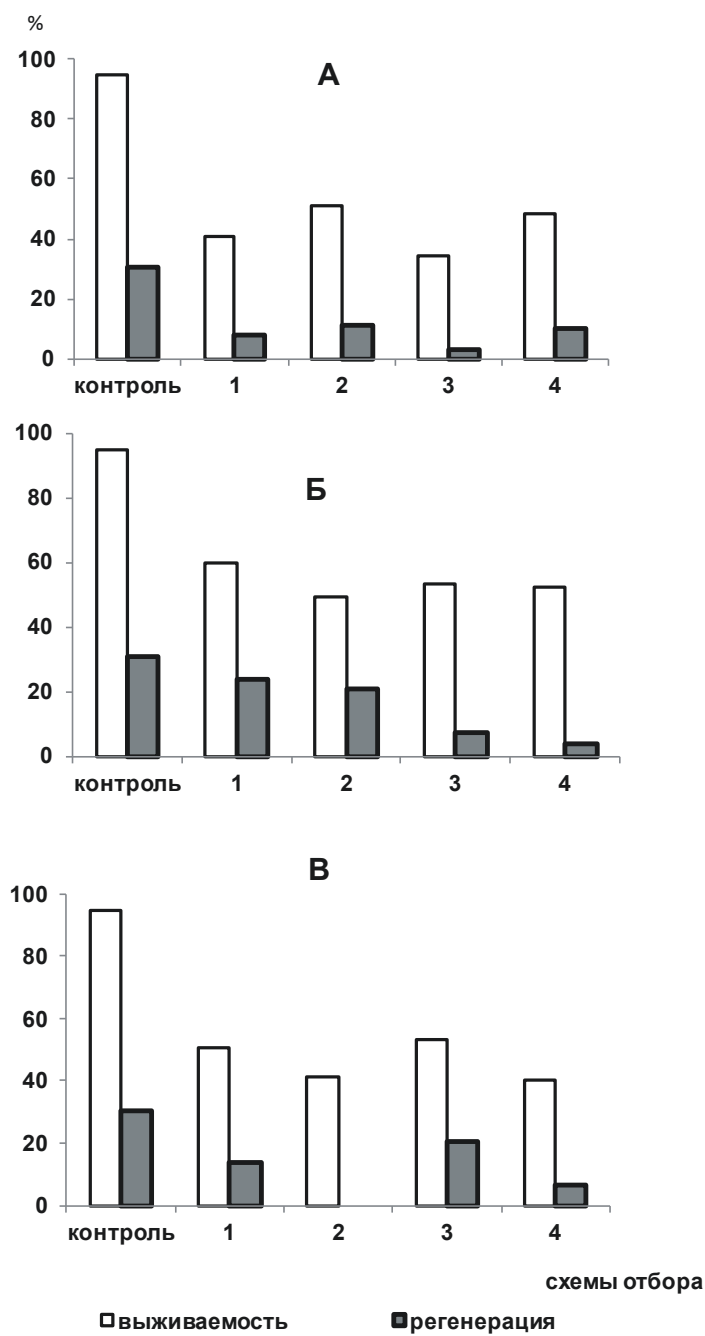


Рис. 2. Выживаемость и частота регенерации в каллусных культурах ячменя (среднее для пяти генотипов) в селективных условиях с Cd^{2+} и Al^{3+} (А), Mn^{2+} и Al^{3+} (Б), Cd^{2+} , Al^{3+} и ПЭГ; Mn^{2+} , Al^{3+} и ПЭГ (В). (Схемы приведены в таблице.)

Заключение. При отборе линий, устойчивых к комплексной ионной токсикации, рекомендуется вводить в селективные среды ионы кадмия (20 мг/л) на этапе пролиферации, а ионы марганца (200 мг/л) – на этапе морфогенеза. Ионы алюминия (20-30 мг/л) можно вводить на том и другом этапах развития каллусной ткани без существенного снижения выживаемости каллуса и частоты регенерации растений. Для отбора каллусов с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и осмотическому стрессу целесообразно вводить осмотик (10% ПЭГ) исключительно на этапе морфогенеза, а на этапе пролиферации возможно воздействие на каллус ионами алюминия (20 мг/л) в сочетании с 20 мг/л ионов кадмия или с 200 мг/л марганца.

Всего в ходе проделанной работы на селективных средах с ионами Cd^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} и ПЭГ в различных сочетаниях получено более 50 растений - регенерантов ячменя. По результатам физиологической оценки их семенного потомства выделившиеся соматоклональные формы будут переданы в практическую селекцию для создания сортов с комплексной устойчивостью к ионной токсикации и водному дефициту.

Литература

1. *Родина, Н.А.* Селекция ячменя на Северо-Востоке Нечерноземья / Н.А. Родина. - Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2006. - 488 с.
2. *Алексеев, Ю.В.* Тяжелые металлы в агроландшафте / Ю.В. Алексеев.- СПб., 2008.- 216с.
3. *Шихова, Л.Н.* Тяжелые металлы в почвах и растениях Северо-Востока европейской части России / Л.Н. Шихова, Т.Л. Егошина.- Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2004.-264с.
4. *Сергеева, Л.Е.* Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости /Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова // Биология клеток растений in vitro и биотехнология: Тез. докл. X междунар. конф. - Казань: КИББ КазНЦ, 2013.- С. 82-83.
5. *Hall, J.L.* Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance /J.L. Hall // Journal of Experimental Botany. - 2002. - V.53.- №366.- P.1-11.
6. *Kuznytskov, V.I.* Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polipeptides / V.I. Kuznytskov., N.I. Shevyakova // Physiologia Plantarum. - 2001. - V.100.- N 2.- P. 320-326.
7. *Зобова, Н.В.* Использование биотехнологических методов в повышении соле- и кислотоустойчивости ярового ячменя / Н.В. Зобова, Е.Н. Кошышева // СО РАСХН. КНИИСХ.- Новосибирск, 2007.- 124 с.

8. Roy, B. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation / B. Roy, A. B. Mandal // *Euphytica*. – 2005. – V. 145.- P. 221–227.
9. Mahmood, I. In vitro selection of tissue culture induced somaclonal variants of wheat for drought tolerance / I. Mahmood, A. Razzaq, M. Ashraf, I. A. Hafiz, S. Kaleem, A. Qayyum, M. Ahmad // *Journal of Agricultural Research*.- 2012.- V. 50. – Is. 2 - P. 177-188.
10. Litardo, A. Resistance to brown rust disease (*Puccinia melanocephala* Syd.) evaluation of sugar cane (*Saccharum* spp. híbrido) somaclons obtained in Ecuador / A. C. Litardo, L.M. Ramos, Korneva S. B., J. Pilco, G. Chávez, C. Cabrera, F.A. Pincay *Fitosanidad* // . 2011.- V. 15.- №. 4.- P. 245-250.
11. Широких, И.Г. Получение *in vitro* форм ячменя, устойчивых к токсическому действию алюминия в кислых почвах /И.Г. Широких, О.Н. Шуплецова, И.Н. Щенникова // *Биотехнология*. - 2009. - №3. - С.40-48.
12. Щенникова, И.Н. Регенеранты ячменя –исходный материал для селекции сортов в условиях меняющегося климата /И.Н. Щенникова, О.Н. Шуплецова, А.В. Кунилова // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*.- 2013.- №3.- С.9-11.
13. Гладков, Е.А. Получение растений, устойчивых к тяжелым металлам. 3. Клеточная селекция газонных трав, толерантных к ионам меди /Е.А. Гладков, Ю.И. Долгих, В.В. Бирюков, О.В. Гладкова // *Биотехнология*. - 2006. - №5.-С.63-66.
14. Гладков, Е.А. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжелым металлам. 2.Получение растений, толерантных к ионам кадмия и свинца /Е.А. Гладков // *Биотехнология*.- 2006.- №4.-С.87-93.
15. Куценко, С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко.- С-Пб, 2002.- 119 с.

Literature

1. Rodina, N.A. Barley selection in North-East of Nechernozemie/ N.A. Rodina. – Kirov: Regional RIA of North-East, 2006. – 488 p.
2. Alekseev, Yu.V. Heavy metals in agro landscape/ Yu.V. Alekseev. – St-P., 2008. – 216 p.
3. Shikhova, L.N. Heavy metals in soils and plants of North-East of European part of Russia/ L.N. Shikhova, T.L. Egoshina. - Kirov: Regional RIA of North-East, 2004. – 264 p.
4. Sergeeva, L.E. Cellular selection with ions of heavy metals: new aspects of complex stability/ L.E. Sergeeva, L.I. Bronnikova// *Biology of plant cells in vitro and bio technology: Abstracts of reports for the X-th International Conference*. – Kazan: KIB KSC, 2013. – P.82-83.

5. *Hall, J.L.* Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance /J.L. Hall // Journal of Experimental Botany. - 2002. - V.53.- N.366.- P.1-11.
6. *Kuznytsov, V.V.* Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polipeptides / V.V. Kuznytsov., N.I. Shevyakova // Physiologia Plantarum. - 2001. - V.100.- N 2.- P. 320-326.
7. *Zobova, N.V.* Use of biotechnological methods to increase of salt and acid tolerance of spring barley/ N.V. Zobova, E.N. Koshysheva// RAAS RIA. – Novosibirsk. – 2007. – 124 p.
8. *Roy, B.* Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation / B. Roy, A. B. Mandal // Euphytica. – 2005. – V. 145.- P. 221–227.
9. *Mahmood, I.* In vitro selection of tissue culture induced somaclonal variants of wheat for drought tolerance / I. Mahmood, A. Razzaq, M. Ashraf, I. A. Hafiz, S. Kaleem, A. Qayyum, M. Ahmad // Journal of Agricultural Research.- 2012.- V. 50. – Is. 2 - P. 177-188.
10. [*Litardo, A.C.*](#) Resistance to brown rust disease (*Puccinia melanocephala* Syd.) evaluation of sugar cane (*Saccharum* spp. híbrido) somaclons obtained in Ecuador / A. C. Litardo, L.M. [Ramos](#), [Korneva](#) S. B., J. [Pilco](#), G. [Chávez](#), C. [Cabrera](#), F.A. [Pincay](#) // [Fitosanidad](#). 2011.- V. 15.- №. 4.- P. 245-250.
11. *Shirokikh, I.G.* In vitro selection of barley al-toxicity tolerant in acid soils/ I.G. Shirokikh, O.N. Shupletsova, I.N. Tschennikova// Biotechnology. - 2009. - №3. - P.40-48.
12. *Tschennikova, I.N.* Regenerators of barley as original material for selection of varieties under climate changes/ I.N. Tschennikova, O.N. Shupletsova, A.V. Kunilova // Agrarian Science of Euro-North-East.- 2013.- №3.- P.9-11.
13. *Gladkov, E.A.* Selection of plants tolerant to heavy metals. 3. Cell selection of lawn grasses tolerant to copper ions/ E.A. Gladkov, Yu.I. Dolgikh, V.V. Biryukov, O.V. Gladkova// Biotechnology. - 2006. - №5.- P.63-66.
14. *Gladkov, E.A.* Biotechnological methods of selection of plants tolerant to heavy metals. 2. Selection of plants tolerant to ions of cadmium and lead/ E.A. Gladkov // Biotechnology.- 2006.- №4.- P.87-93.
15. *Kutsenko, S.A.* basis of toxicology/ S.A. Kutsenko. – St.P., 2002. – 119 p.