

УДК 57.042.2

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТОЛЕРАНТНЫХ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ ГАЗОННЫХ ТРАВ

©2013 Е.А. Гладков<sup>1,2</sup>, Ю.И. Долгих<sup>1</sup>, О.В. Гладкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

<sup>2</sup>Московский государственный машиностроительный университет, г. Москва

Поступила 17.06.2013

В данной статье описаны технологии получения растений, устойчивых к меди, цинку, свинцу.

**Ключевые слова:** городская экосистема, клеточная селекция, каллус, тяжелые металлы.

Городские растения оздоравливают окружающую среду, снижая концентрацию загрязняющих веществ, смягчая летнюю жару и сухость, ионизируют воздух, уменьшают шум и поглощают пыль. Однако городские условия крайне неблагоприятны для произрастания растений.

Среди основных загрязнителей почвенного покрова городов – соли тяжелых металлов. Крайне высокое содержание солей тяжелых металлов фиксируется даже в почвах некоторых скверов и парков. Основные загрязнители почвенного покрова Москвы – среди тяжелых металлов – соли цинка, свинца и меди. Например, на 7,5% территории города Москвы содержание меди доходит до 2 ОДК, на 1,4% территории оно составляет 2-4 ОДК и на 0,6% площади – выше 4 значений ОДК (выше 528 мг/кг) [1]. ОДК меди в почве, близкие к нейтральным, нейтральные (суглинистые и глинистые), составляет 132 мг/кг. В Российской Федерации самые высокие концентрации меди фиксируются в Ревде (средняя 1177 мг/кг, максимальная до 7206 мг/кг), Екатеринбурге (максимальная до 3684 мг/кг) [2].

Высокой чувствительностью к тяжелым металлам обладают газонные травы. Характерное действие загрязняющих веществ на городские газоны – образование не покрытых растительностью участков придорожных газонов вдоль проезжей части. Из-за постоянного действия техногенных факторов у городских растений существенно снижаются декоративные качества, многие растения погибают.

Среди способов решения данной проблемы – восстановление растительного покрова с использованием более толерантных видов растений, которое может помочь увеличить видовое разнообразие городских экосистем. Однако большинство дикорастущих местных видов не обладают высокими декоративными свойствами, особенно сорные травы – «заменители» газонных трав. Поэтому необходимость использования в городском озеленении технологий, которые позволили бы сохранить видовое разнообразие травянистого покрова городов,

в условиях среднего уровня загрязнения, в последние годы ощущается все с большей остротой. Клеточная селекция редко использовалась для решения экологических проблем городов [3-7]. Требования к городским растениям отличаются от сельскохозяйственных. В первую очередь это сохранение жизнеспособности и декоративных качеств при загрязнении окружающей среды.

Работ по получению растений, устойчивых к тяжелым металлам, очень мало, и в основном получены растения, толерантные к кадмию [8-9]. В ряде работ получены клеточные культуры, толерантные к тяжелым металлам [10], отсутствуют работы по получению однодольных растений, устойчивых к меди.

Цель работы – создание технологий получения растений газонной травы полевицы побегоносной, толерантной к меди, цинку и свинцу.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом нашего исследования была газонная трава – полевица побегоносная (*Agrostis stolonifera* L.).

Первичный каллус получали из семян на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 30 г/л сахарозы, 500 мг/л гидролизата казеина и 7 г/л агар-агара, концентрация 2, 4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) составляла 3 мг/л. Для образования первичного каллуса семена предварительно стерилизовали коммерческим отбеливателем «Белизна». Затем семена раскладывали в чашки Петри на поверхность агаризованной среды (по 30 семян/чашку) и культивировали при температуре 26<sup>0</sup>С и влажности 70% на свету интенсивностью 2000 лк при длине светового дня 16 час. Через 30 дней культивирования получали первичный каллус.

Первичный каллус массой 15-20 мг высаживали на селективную среду МС, содержащую соли тяжелых металлов – меди, цинка, свинца, в зависимости от опыта. После культивирования в течение 1 мес отбирали светлые экспланты, увеличившиеся в размере. Культивирование отобранных каллусов во 2 пассаже проводили при тех же условиях, что и в первом пассаже. Затем проводили регенерацию растений и укоренение на среде МС с токсикантом. При добавлении тяжелых металлов в твердую пи-

Гладков Евгений Александрович, к.б.н., доц., научный сотрудник, e-mail: gladkovu@mail.ru; Долгих Юлия Ивановна, д.б.н., заведующая лабораторией; Гладкова Ольга Викторовна, младший научный сотрудник.

тательную среду, среда не застывала, поэтому в чашки Петри помещалась фильтровальная бумага на вате, которая была смочена жидкой питательной средой.

Стандартное отклонение рассчитывали с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была проведена оценка фитотоксичности тяжелых металлов для каллусных культур.

Масса каллуса полевицы на питательной среде без токсиканта (контроль) увеличивалась за месяц в 5 раз. Добавление соли меди в питательную среду ингибировало прирост массы каллуса полевицы (табл. 1), при концентрации 300 мг/л и выше каллус газонных трав приобретал голубую окраску, вероятно, вследствие интенсивного накопления меди в клетках, выживаемость каллусных тканей была крайне низкой.

**Таблица 1.** Влияние меди на выживаемость и рост каллусов полевицы (% от контроля)

Концентрация меди, мг/л	% живых каллусов	% прироста каллусов
100	78±7,4	62±5,8
150	58±4,5	37±1,5
200	40±4,3	20±2,3
300	10±1,4	4±0,3
450	0	0

Для каллусных культур концентрация цинка 300 мг/л являлась сублетальной, концентрация 600 мг/л была летальной и значительная часть клеток погибала в течение двух недель (табл. 2).

**Таблица 2.** Влияние цинка на рост каллуса полевицы (% от контроля)

Концентрация цинка, мг/л	% живых каллусов	% прироста каллусов
300	48±4,8	50±3,2
350	33±3,6	30±3,0
450	21±2,2	19±1,8
600	5±0,5	0

Каллусы продемонстрировали относительную толерантность к свинцу. Добавление 650 мг/л свинца вызывало снижение роста тканей в 2 раза. Концентрация свинца 1600 мг/л являлась летальной. Интенсивность роста отдельных каллусов различалась в полтора-два раза. Часть каллусов погибала на среде со свинцом, а некоторые сохраняли рост на уровне контроля.

Таким образом, пределы толерантности ростовых показателей целых растений и каллусных культур к высоким концентрациям токсикантов могут не совпадать. Различия в устойчивости растений и клеточных популяций *in vitro* связаны с из-

бирательностью поглощения тяжелых металлов и спецификой механизмов устойчивости на клеточном и организменном уровне.

Затем была проведена оценка влияния тяжелых металлов на морфогенную способность каллусной ткани. Регенерационная способность каллусных тканей была низкой при культивировании на средах со 100 мг/л меди, у большого количества эксплантов наблюдалось потемнение ткани. Каллус становился рыхлым и не был способен к регенерации. При концентрации 200 мг/л меди большая часть клеток теряла способность к регенерации растений и каллусные ткани практически не регенерировали (табл. 3).

**Таблица 3.** Влияние меди на способность к морфогенезу каллуса газонных трав (% от контроля)

Концентрация меди, мг/л	% образования морфогенного каллуса
100	33±1,5
150	24±2,6
200	6±0,8
300	2,5±0,3
450	0

Цинк в меньшей степени, чем медь, влиял на регенерационную способность каллусных клеток (табл. 4). Даже при высоких концентрациях ионов цинка – 450 мг/л небольшая часть каллусов (10,8%) была способна к регенерации.

**Таблица 4.** Влияние цинка на способность к морфогенезу каллуса газонных трав (% от контроля)

Концентрация цинка, мг/л	% образования морфогенного каллуса
150	58±4,1
300	33±3,6
450	11±0,6

Свинец оказывал наименьшее влияние по сравнению с остальными исследуемыми металлами, на регенерационную способность каллусной ткани.

Таким образом, каллусные клетки продемонстрировали устойчивость к свинцу и высокую чувствительность к меди.

Учитывая высокий уровень токсичности тяжелых металлов, длительное культивирование каллусов является нецелесообразным, предпочтительней использовать непродолжительное культивирование.

Для получения не только клеток, но и растений, устойчивых к тяжелым металлам, необходим принципиально иной подход, который заключался в использовании прямой схемы селекции, включающей в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде МС с токсикантом, регенерацию на среде МС с токсикантом и укоренение растений на среде МС с токсикантом.

Селективный фактор присутствовал в среде на всех этапах отбора, включая укоренение регенерантов, для того чтобы повысить вероятность получения устойчивых растений.

Для получения растений, устойчивых к меди была использована схема селекции, включающая в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде МС с 150 мг/л меди, регенерацию на среде МС с 150 мг/л меди и укоренение растений на среде МС с 150 мг/л меди. Продолжительность селекции составляла 4 мес, т.к. при длительном культивировании возрастает частота нежелательных мутаций. Всего в селективных условиях было получено 180 регенерантов полевницы в условиях *in vitro*. Часть регенерантов не укоренялись в почве, вероятно, это было связано с относительно жесткими условиями культивирования – использовании меди на каждом этапе. Около 10% регенерантов в почве имели морфологические отличия от исходных растений – низкорослость, меньшая кустистость, более жесткие листья. Остальные регенеранты не отличались от исходных растений. В первый год шесть регенерантов зацвели и дали семена. Ряд растений не дали семян, это могло быть следствием как мутаций, так и немутационных изменений регуляции развития, связанных с культивированием на питательных средах с медью в условиях *in vitro*.

Для проверки устойчивости к высоким концентрациям меди, тридцать полученных после клеточной селекции регенерантов полевницы, а также ис-

ходные растения были высажены в почву со 150 мг/кг Cu. Чувствительность растений различалась – 80% растений, полученных из устойчивых к меди клеток, росли лучше, чем исходные растения, при этом рост большинства растений не отличался от растений, растущих на почве без меди. Четыре из тридцати исследуемых растений имели прирост на уровне исходных, у двух прирост был незначительно меньше. У исходных растений наблюдались хлорозы и немного более темная окраска листьев, что характерно для медного токсикоза, в результате которого происходит глубокое нарушение клеточного метаболизма.

Потомки четырех (№ 33, № 56, № 58, № 26) из пяти исследуемых регенерантов полевницы продемонстрировали повышенную толерантность к меди. Признак устойчивости у потомков регенерантов проявлялся в различной степени, это связано с тем, что механизмы устойчивости и степень проявления устойчивости разных клонов могут различаться. Например, потомки регенеранта № 26 продемонстрировали повышенную устойчивость к меди в двух поколениях (рис.), потомки регенеранта № 14 существенно большей толерантностью к меди не обладали. В 3 поколения потомки регенеранта № 26 также продемонстрировали повышенную толерантность. Следовательно, потомки данного клона могут нормально существовать и выполнять свои экологические функции в условиях повышенной концентрации меди в окружающей среде.

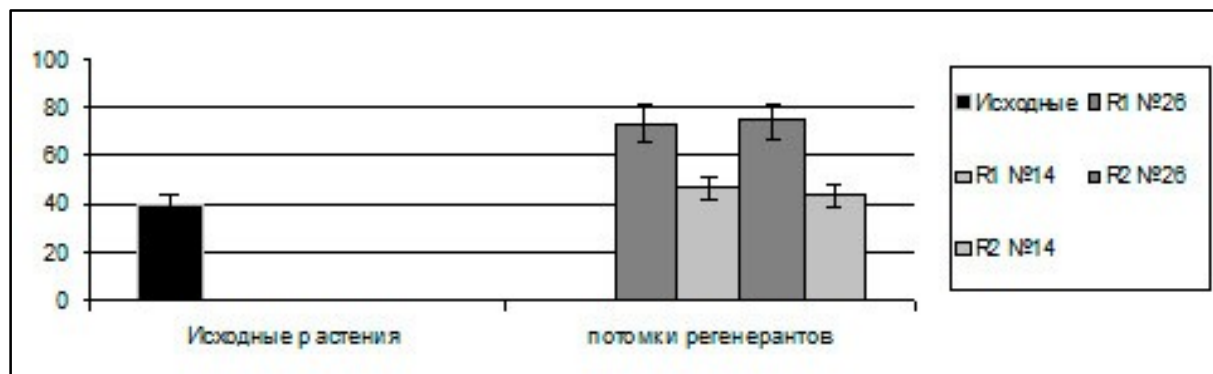


Рис. Влияние меди (100 мг/л) на рост потомков регенерантов

Таким образом, у растений полевницы показано наследование отселектированного признака в следующих поколениях. Учитывая высокий уровень загрязнения медью городских почв, внедрение этой технологии в селекционный процесс позволит существенно уменьшить неблагоприятное воздействие данного токсиканта на важную составляющую городских газонов – полевницу побегоносную.

Для получения растений, толерантных к свинцу, была использована схема селекции, включающаяся в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде МС с 650 мг/л (950 мг/л на всех этапах для создания более жестких условий) свинца, регенерацию и укоренение

растений на среде МС с токсикантом. Было получено 56 растений в условиях *in vitro* (42 – после селекции на среде МС с 650 мг/л свинца, 14 – после селекции на среде МС с 950 мг/л свинца), однако укореняемость в почве растений полученных после более жестких условий была невысокая.

Для проверки устойчивости к высоким концентрациям свинца регенеранты, после селекции на среде МС с 650 мг/л свинца, и исходные растения были высажены в почву с концентрацией свинца выше порога токсичности – 2500 мг/кг. Прирост обычных растений в контроле составлял 10 см, у растений регенерантов 10,5 см. Большинство регенерантов обладали повышенной устойчивостью к

свинцу (прирост 40% растений составлял 10,5-10,8 см, прирост остальных, кроме одного – от 9,4 до 11,4 см). Только один из регенерантов, был неустойчив к свинцу. Прирост исходных растений в почве, содержащей свинец, в среднем составлял 4,4 см, у некоторых наблюдались обильные пожелтения.

Для отбора толерантных к цинку растений была использована такая же схема селекции, как и в случае с медью. В качестве селективной была выбрана концентрация цинка 300 мг/л.

Всего в селективных условиях было получено более 30 регенерантов полевицы, большинство из которых не отличались от обычных растений. Большинство исследуемых растений–регенерантов, полученных из устойчивых к ионам цинка клеточных линий, обладало повышенной толерантностью к цинку. Следовательно, с помощью клеточной селекции можно повысить предел толерантности к тяжелым металлам и частично решить важнейшую экологическую проблему городского озеленения – потерю декоративности, при относительно невысоком уровне загрязнения, а в некоторых случаях деградацию городских газонов при повышенном уровне тяжелых металлов в почвенном покрове. Использование в качестве селективных - не очень высоких концентраций тяжелых металлов оказалось более эффективной, т.к. позволило сохранить регенерационную способность клеток и получить устойчивые растения. Однако, проведение жесткой селекции более эффективно с точки зрения стабильности признака, поэтому был найден оптимальный вариант – непродолжительное культивирование и использование токсикантов на каждом этапе культивирования. Данная схема селекции для получения растений, устойчивых к тяжелым металлам нашла применение при получении растений устойчивых к меди, цинку и свинцу. Показано сохранение устойчивости к меди в 3 поколениях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный доклад о состоянии окружающей среды в городе Москве в 2007 году // Департамент природопользования и охраны окружающей среды города Москвы. 2008.
2. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2010 году // Министерство природных ресурсов и экологии РФ, 2011.
3. *Гладков Е.А., Гладкова О.В.* Оценка комплексной фитотоксичности тяжелых металлов и получение растений, обладающих комплексной устойчивостью // Биотехнология. 2007. № 1. С. 81-85.
4. *Гладков Е.А.* Оценка фитотоксичности комплексного воздействия тяжелых металлов и определение ориентировочно допустимых концентраций для цинка и меди // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 6. С. 94-99.
5. *Gladkov E.A., Gladkova O.N., Glushetskaya L.S.* Estimation of Heavy Metal Resistance in the Second Generation of Creeping Bentgrass (*Agrostis solonifera*) Obtained by Cell Selection for Resistance to These Contaminants and the Ability of This Plant to Accumulate Heavy Metals // Applied Biochemistry and Microbiology. 2011. V. 47. N. 8. P. 776-779.
6. *Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В.* Фитотехнологии для охраны окружающей среды: Учебное пособие. М.: МГУИЭ, 2012. 202 с.
7. *Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Бирюков В.В., Гладкова О.В., Шевякова Н.И., Гладкова О.Н., Глушецкая Л.С.* Способ получения толерантных к засолению газонных трав *in vitro* // Патент № 2260936. 2005.
8. *Мохаммед С.Е., Каранова С.Л., Долгих Ю.И.* Получение толерантных к ионам кадмия клеточных линий и растений пшеницы методом клеточной селекции // Мат. Всерос. конф. «Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений и грибов». Орел, 2010. С. 155-159.
9. *Гладков Е.А., Гладкова О.В.* Способ получения толерантных к ионам кадмия однодольных растений *in vitro* // Патент № 23106696. 2007. Бюл. 27.
10. *Domozlicka E., Opatrny Z.* The effect of cadmium on tobacco cell culture and the selection of potentially Cd-resistant cell lines // Biol. Plant. 1989. V. 31 (1). P. 19-27.

## USING OF CELL SELECTION FOR LAWN GRASS TOLERANCE TO HEAVY METALS

©2013 E.A. Gladkov<sup>1,2</sup>, Yu.I. Dolgih<sup>1</sup>, O.V. Gladkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Physiology named K.A. Timirjazev of RAS, Moscow

<sup>2</sup>Moscow State Engineering University, Moscow

This article describes the technology of obtaining of plants resistant to copper, zinc and lead.

**Key words:** urban ecosystem, cell selection, callus, heavy metals.

*Eugeniy Gladkov*, Candidate of Biology, associate professor, researcher, e-mail: gladkovu@mail.ru; *Julia Dolgih*, Doctor of Biology, head of laboratory; *Olga Gladkova*, junior researcher