

20. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам // Институт биологии КарНЦ Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007, 156 с.
21. Pen E. Bonanza for Plant Genomics // Science, 1998, v. 282, p. 652-654.
22. Madlung A., Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure // Annals of Botany, 2004, v. 94, p. 481-495.

Оценка фитотоксичности меди и получение стресс-устойчивых двудольных растений

Седов К.А., Литвинова И.И., к.б.н. доц. Гладков Е.А.
Университет машиностроения, ИФР РАН
8 (499) 231-83-34, ilina-15@ya.ru

Аннотация. Оценена фитотоксичность меди для целых растений и каллусных культур льна многолетнего (*Linum perenne* L.) и хризантемы килеватой (*Chrysanthemum carinatum* L.). Определена селективная концентрация меди для этих растений, а также разработаны схемы селекции для получения устойчивых к меди растений-регенерантов.

Ключевые слова: медь, фитотоксичность, клеточная селекция, каллус, регенерация, хризантема, лен.

Высокий уровень загрязненности почв тяжелыми металлами (ТМ) в мегаполисах негативно сказывается на городских растениях, в частности на травянистых, декоративных, красивоцветущих растениях, вызывает повреждение тканей, вытянутость клеток корней. При прямом попадании высоких концентраций данного металла на надземные органы растений, наблюдается скручивание и опадание листьев, молодые листья приобретают темно-зеленую окраску [1]. Наиболее восприимчивы к избытку меди молодые ткани и органы [2]. Повышенные концентрации меди в почве не только существенно снижают декоративные качества декоративных растений, но и могут приводить к гибели растений [3].

Среди способов решения данной проблемы – получение растений [4], устойчивых к солям меди, с помощью биотехнологических методов.

Цель работы – оценка влияния меди в условиях *in vivo* и *in vitro* для льна многолетнего (*Linum perenne* L.) и хризантемы килеватой (*Chrysanthemum carinatum* L.) и получение растений, толерантных к повышенному содержанию меди в окружающей среде.

Материалы и методы

В работе использованы семена льна многолетнего (*Linum perenne* L.), сорт Синий Шелк и хризантемы килеватой (*Chrysanthemum carinatum* L.), сорт Эльдорадо.

В качестве эксплантов использовали семена растений. Для получения устойчивых клонов каллусы культивировали на жидких питательных средах Мурасиге-Скуга (МС) и Гамборга (В5) [5-6], содержащих медь в различных концентрациях. В питательную среду вносили токсикант в концентрациях от 10 до 100 мг/л (в пересчете на чистый металл) и культивировали в течение 14 - 30 суток, в зависимости от вида растения.

Оценку фитотоксичности меди *in vivo* проводили в нестерильных условиях, путем проращивания семян в растворах с медью на чашках Петри. Измеряли длину проростков, через 7 и 14 суток от начала опыта.

Результаты и обсуждения

Оценка фитотоксичности меди в условиях in vivo. Большинство декоративных травянистых растений не устойчивы к действию меди [4], как одному из самых токсичных ТМ. Была определена чувствительность к меди льна многолетнего и хризантемы килеватой.

Для оценки фитотоксичности меди, семена растений проращивали в растворе с токси-

кантом в течение 14 суток, токсическое действие данного металла существенно проявлялось при прорастании семян и было заметно уже через 7 суток. Ингибирование роста растений наблюдалось при концентрации меди 20 мг/л (в пересчете на чистый металл), а при концентрации 50 мг/л прирост составлял менее 40% у хризантемы килеватой, при концентрации 100 мг/л меди у растений не образовывались корни (рисунок 1).

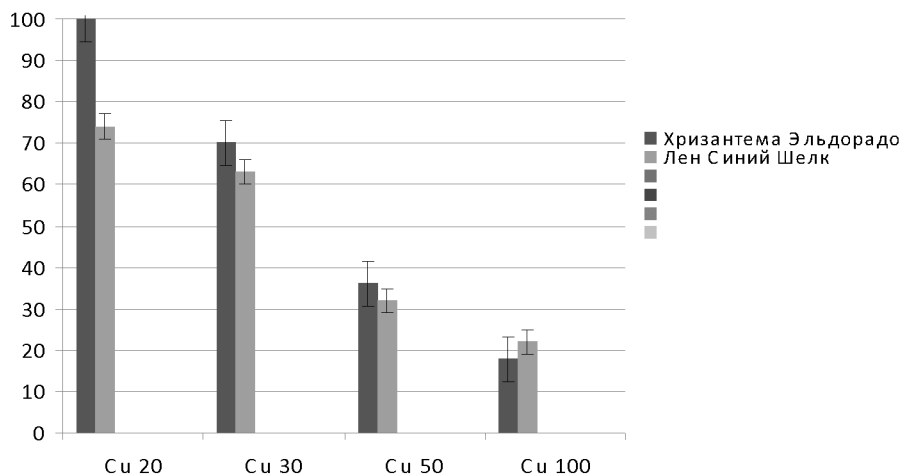


Рисунок 1 – Влияние меди на рост побегов в водном растворе через 14 суток

Данные растения продемонстрировали очень высокую чувствительность к меди, по сравнению с рядом ранее исследуемых травянистых растений (представителями семейств злаковые, крестоцветные, бобовые и др.), наибольшей чувствительностью обладал лен многолетний.

Следовательно, данные красивоцветущие растения чувствительны к относительно низкому уровню загрязнения почв медью.

Оценка фитотоксичности меди в условиях in vitro. Для проведения клеточной селекции нужно было определить чувствительность каллусных культур льна многолетнего сорт Синий Шелк и хризантемы килеватой сорт Эльдорадо к токсиканту и выбрать селективную концентрацию для получения устойчивых растений.

Для оценки фитотоксичности меди в культуре клеток каллусы помещали на питательную среду с медью. Действие ионов меди было заметно через 14 суток, часть каллусов приобретало желтую или коричневую окраску. Ингибирующее действие меди проявилась для всех растений уже при концентрации 10 мг/л, а на среде с 40 мг/л значительная часть каллусов желтела и становилась менее плотной, в отличие от контроля. На высоких концентрациях меди (50 мг/л и 100 мг/л) каллус темнел через несколько дней и терял морфогенную активность, лишь у незначительной части каллуса наблюдался небольшой прирост биомассы (рисунок 2). Несмотря на большую чувствительность целых растений льна многолетнего (рисунок 1), культивируемые ткани льна были более устойчивы к меди, чем каллусы хризантемы килеватой. Например, при концентрации меди 30 мг/л процент выживших каллусов составлял 59,1%. Концентрация меди 100 мг/л была летальной для каллусов хризантемы килеватой. В следующем пассаже процент гибели каллусов резко возрастал у всех растений (рисунок 3).

Затем выжившие каллусы отбирали и вновь помещали на среду с медью.

Таким образом, при концентрации 20 мг/л меди у хризантемы килеватой и у льна многолетнего, после культивирования в течение 2 пассажей, выживала и сохраняла регенерационную способность только небольшая часть каллусов. При концентрации меди 30 мг/л, процент выживших каллусов и регенерационная способность, после 2 пассажей, был незначительный, концентрация меди 50 мг/л была летальной для обоих растений (рисунок 3). Таким

образом, каллусные ткани льна многолетнего и хризантемы килеватой продемонстрировали очень высокую чувствительность к ионам меди, большую, чем у каллусов *Arabidopsis thaliana* и *Agrostis stolonifera*.

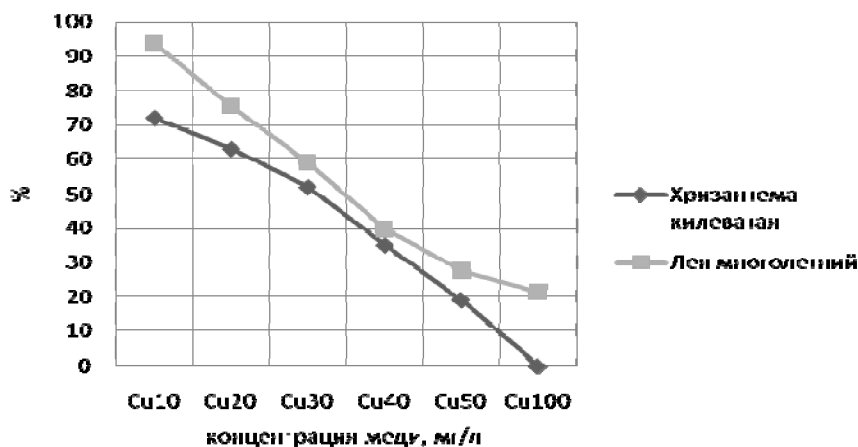


Рисунок 2 – Влияние меди на выживаемость каллусов (процент от контроля)

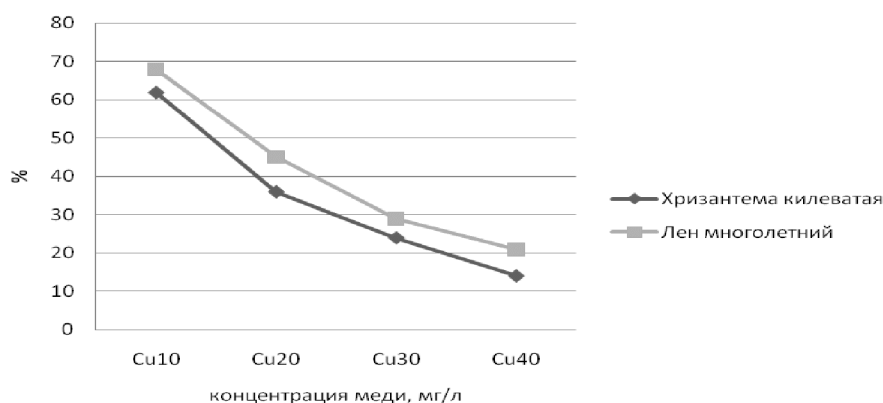


Рисунок 3 – Влияние меди на выживаемость каллусов исследуемых растений, во 2-м пассаже (процент от контроля)

В качестве селективной была выбрана концентрация меди 20 мг/л для льна многолетнего и хризантемы килеватой. Полученные данные позволили нам разработать схемы клеточной селекции для исследуемых растений.

Получение клонов и растений, устойчивых к меди. Для отбора резистентных линий была использована прямая схема селекции.

Схема клеточной селекции для льна многолетнего включает в себя получение эксплантов из семян на среде для каллусообразования В5 с 6 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты; культивирование первичного каллуса на среде МС с 20 мг/л меди в течение 2 пассажей; затем, культивирование и регенерация каллусов на питательной среде В5 с 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК), в течение 3 пассажей, и укоренение на среде $\frac{1}{2}$ МС с 0,1 мг/л НУК без токсиканта.

Учитывая очень высокую токсичность меди для хризантемы килеватой, а также для сохранения регенерационной способности клеток, был выбран короткий период культивирования каллусов на питательной среде с токсикантом (3 пассажа по 14-18 суток). Схема селекции включала в себя получение эксплантов из семян на среде для каллусообразования МС с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты; культивирование первичного каллуса на среде МС с 20 мг/л меди в течение 3 пассажей; и затем культивирование каллусов, в течение 4 пассажей, на средах для регенерации $\frac{1}{2}$ МС с 0,5 мг/л БАП и укоренение $\frac{1}{2}$ МС с 0,1 мг/л НУК без токсиканта.

Использование прямой схемы клеточной селекции и добавление токсиканта в питательную среду только на этапе культивирования каллусов, позволило получить нам растения-регенеранты. Было получено 30 регенерантов льна, толерантных к меди, в условиях *in vitro* и 21 растение хризантемы килеватой.

Таким образом, нами было показано, что исследуемые объекты очень чувствительны к меди как на уровне целых растений, так и в культуре клеток. Разработаны схемы клеточной селекции для получения декоративных двудольных растений, устойчивых к меди.

Литература

1. Ладонина Н.Н., Ладонин Д.В. Загрязнение почв юго-восточного административного округа г. Москвы медью и цинком; Экология, 2000, № 1: 61-65.
2. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам; Институт биологии КарНЦ Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007: 156.
3. Гладков Е.А. Оценка фитотоксичности комплексного воздействия тяжелых металлов и определение ориентировочно допустимых концентраций для цинка и меди. Сельскохозяйственная биология, № 6, 33-36, 2010.
4. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Оценка комплексной фитотоксичности тяжелых металлов и получение растений, обладающих комплексной устойчивостью, Биотехнология, № 1, 81-86, 2007.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*, 1962, V. 15: 473-476.
6. Gambourg O.L., Elevegh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of weat and parleys // *Can.J.Biochem*, 1968, 46: 417-421.

Введение в культуру клеток и получение растений брахикома иберисолистной и хризантемы килеватой

Литвинова И.И., к.б.н. доц. Гладков Е.А.
Университет машиностроения
8 (499) 231-83-34, ilina-15@ya.ru

Аннотация. Введены в культуру клеток брахикома иберисолистная, хризантема килеватая. Подобраны оптимальные среды для каллусообразования, регенерации и укоренения растений-регенерантов.

Ключевые слова: каллус, регенерация, хризантема, брахикома.

Хризантема килеватая и брахикома иберисолистная широко используются в озеленении города, на клумбах, в миксбордерах, в срезке, обладают удивительной многоликостью красок и продолжительным цветением.

Хризантема килеватая (*Chrysanthemum carinatum L.*) – однолетнее, обильноцветущее, с конца июня по сентябрь, растение, семейство Сложноцветных (Астровые). Соцветия – корзинки, чаще простые, реже полумахровые или махровые, душистые, довольно крупные, 5-7 см в диаметре, различной окраски. Плод – треугольная или сплюснутая семянка с крыловидными выростами. Семена сохраняют всхожесть 2-3 года. Хризантему килеватую часто выращивают на срезку, поскольку ее привлекательные соцветия могут довольно долго стоять в вазе с водой не увядая. Кроме этого она может быть с успехом использована для украшения клумб и рабаток как в одиночных посадках, так и небольшими компактными группами[1].

Брахикома иберисолистная (*Brachycome iberidifolia L.*) – однолетнее сильноветвистое растение, семейство Сложноцветных, высотой 15-25 см с изящными листьями, расположенными в очередном порядке. Кустики несут многочисленные мелкие соцветия – корзинки 3–3,5 см в диаметре. Применяется для оформления клумб, бордюров, альпийский горок, как