

УДК 57.042.2

ПОЛУЧЕНИЕ КРАСИВОЦВЕТУЩИХ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ, ТОЛЕРАНТНЫХ К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ МЕДИ В ПОЧВЕННОМ ПОКРОВЕ МЕГАПОЛИСОВ

© И.И. Литвинова, Е.А. Гладков

Оценена фитотоксичность меди для каллусных культур хризантемы килеватой (*Chrysanthemum carinatum* L.), брахикома иберисолистной (*Brachycome iberidifolia* L.), льна многолетнего (*Linum perenne* L.), райграса многолетнего (*Lolium perenne* L.). Разработаны технологии получения данных растений, устойчивых к меди.

Ключевые слова: медь, тяжелые металлы, клеточная селекция, хризантема килеватая, брахикома иберисолистная, лен многолетний.

Эффектные декоративные цветы оживляют городской ландшафт, улучшают микроклимат городской среды, являются важными составляющими клумб, рабаток, миксбордеров.

Среди основных загрязнителей почвенного покрова городов – тяжелые металлы (ТМ). ТМ негативно влияют на городские растения, приводят к потере декоративности растений, вызывая хлороз, засыхание нижних листьев, замедляя рост и развитие корней и побегов [1–3]. По степени фитотоксичности тяжелые металлы распределяются в следующей последовательности: Cu>Ni>Cd>Zn>Pb>Hg. Таким образом, медь является одним из наиболее опасных загрязнителей почвенного покрова [4–5].

Для повышения толерантности декоративных растений к меди можно использовать клеточные технологии. Клеточная селекция используется для получения растений, устойчивых к ТМ, например, получены газонные травы, устойчивые к свинцу и кадмию [6–7].

В работе рассматривались красивоцветущие декоративные растения – хризантема килеватая, брахикома иберисолистная и лен многолетний, а также газонная трава – райграс многолетний. Эти красивоцветущие растения широко используются в городском озе-

лении и декоративном садоводстве за счет продолжительного периода цветения, высокой декоративности и неприхотливости в уходе. Но, к сожалению, данные растения чувствительны к повышенным концентрациям меди в окружающей среде [1].

Цель работы: разработка схем клеточной селекции для получения растений, устойчивых к меди.

Материалы и методы. Основными объектами исследования являлись брахикома иберисолистная (*Brachycome iberidifolia* L.), сорт «Голубая Неженка» и хризантема килеватая (*Chrysanthemum carinatum* L.), сорт «Эльдорадо», лен многолетний (*Linum perenne* L.), сорт «Синий Шелк», райграс многолетний (*Lolium perenne* L.).

Ранее были разработаны технологии введения в культуру клеток и регенерации исследуемых растений [8].

Каллусы культивировали в течение 2-х пассажей на жидких питательных средах Мурасиге-Скуга (МС) и Гамборга (B5) [9–10] с добавлением в различных концентрациях $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Контролем служили каллусы, росшие на стандартной жидкой среде МС без меди.

ЛИТВИНОВА Илина Игоревна, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
e-mail: ilina-15@ya.ru

ГЛАДКОВ Евгений Александрович – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
e-mail: gladkovu@mail.ru

Результаты и обсуждение. *Оценка фитотоксичности меди in vitro.* На первом этапе работы была оценена фитотоксичность меди для каллусных тканей. Каллусы помещали на питательные среды с токсикантом, культивировали в течение 2-х пассажей. Ингибирующее действие меди проявлялось через 14 суток уже при концентрации 10 мг/л для всех исследуемых видов, а на среде с 40 мг/л значительная часть каллусов желтела и становилась менее плотной, в отличие от контроля. При концентрации меди 50 мг/л и 100 мг/л каллус темнел через несколько дней и терял морфогенную активность.

Для второго пассажа отбирались выжившие каллусные ткани. Процент гибели резко возрастал при концентрации 20 мг/л, у всех объектов выживало менее половины каллусов (рис. 1). Каллусные ткани при концентрациях выше 40 мг/л погибали через 14–18 суток (в зависимости от вида растения).

Исследуемые каллусные культуры оказались очень чувствительны к действию ионов меди, однако они демонстрировали различную реакцию в зависимости от длительности культивирования на высокое содержание токсиканта в среде. Например, в первом пассаже наибольшей устойчивостью к меди об-

ладали каллусы льна многолетнего, а во втором они оказались более чувствительны, чем каллусные ткани райграса. Во втором пассаже процент гибели каллусов резко возрастал у всех растений. Наибольшей чувствительностью обладала брахикома иберисолистная: при втором субкультивировании гибель клеток уже при концентрации 10 мг/л составляла около 50% (см. рис. 1).

Получение клонов и растений, устойчивых к меди. На основе проведенных исследований в качестве селективной была выбрана концентрация меди 20 мг/л для хризантемы килеватой, брахикома иберисолистная и льна многолетнего, для райграса многолетнего – 30 мг/л. Из-за очень высокой чувствительности каллусных культур к ионам меди токсикант использовали только на стадии культивирования, регенерация и укоренение проводились без соли.

Для получения растений льна многолетнего, устойчивого к меди, была разработана следующая схема клеточной селекции: культивирование каллуса на среде МС с 20 мг/л меди в течение 2-х пассажей по 26 суток каждый, затем культивирование и регенерация каллусов на питательной среде В5 с 1 мг/л

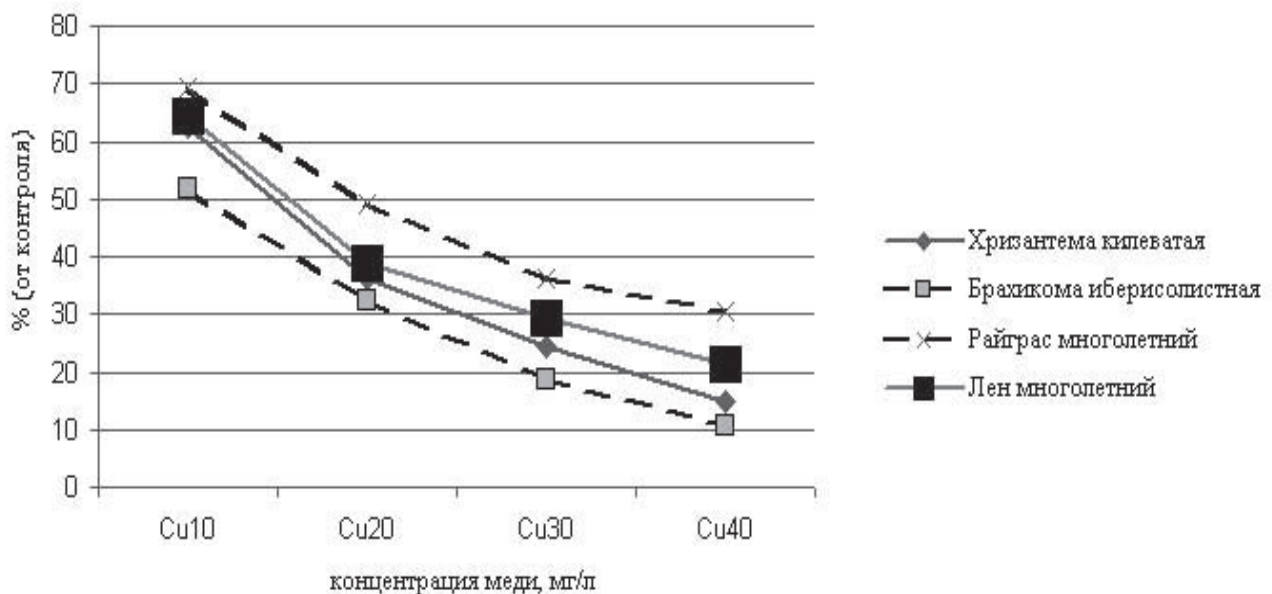


Рис. 1. Влияние меди на выживаемость каллусных тканей исследуемых растений во 2-м пассаже (% от контроля)

6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК) в течение 3-х пассажей и укоренение на среде МС с половинным содержанием всех компонентов ($1/2$ МС) с 0,1 мг/л НУК без токсиканта.

Для брахикома иберисолистной – пассивирование каллусов на питательной среде МС с концентрацией меди 20 мг/л в течение 2-х пассажей по 20 суток, регенерация в течение 3–4-х пассажей на среде $1/2$ МС и добавлением 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК, укоренение на среде $1/2$ 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 селективной среде (3 пассажа по 18 суток). Схема селекции включала в себя: культивирование первичного каллуса на среде МС с 20 мг/л меди в течение 3-х пассажей; культивирование каллусов в течение 4-х пассажей на средах для регенерации – $1/2$ МС с 0,5 мг/л БАП; укоренение – $1/2$ МС с 0,1 мг/л НУК без токсиканта.

Для райграса многолетнего была выбрана селективная концентрация 30 мг/л, так как выживаемость клеток во втором пассаже составляла 36,2% (см. рис. 1). Поэтому схема селекции для данного растения состояла из культивирования на питательной среде МС с медью в течение 2-х пассажей продолжительностью по 30 суток. А затем регенерация и укоренение на той же среде без токсиканта.

Получены устойчивые каллусные культуры и растения в условиях *in vitro*. Была проведена проверка растений-регенерантов на резистентность полученных линий к концентрациям меди 20 и 30 мг/л. Проверка проводилась путем субкультивирования регенерантов на средах для регенерации с добавлением ионов меди.

Было показано, что растения, полученные после селекции на концентрации меди 20 мг/л, обладали повышенной устойчивостью. Через 30 суток выживаемость побегов у всех линий составляла 100%. В контрольных условиях у льна многолетнего выживаемость составила 27,9%, брахикома иберисолистной – 43,0%, хри-

зантемы килеватой – 24,6%, также у всех исходных растений наблюдался хлороз листьев. На концентрации 30 мг/л выживаемость устойчивых регенерантов составила 100% у всех видов растений, кроме хризантемы килеватой (74,7%).

Таким образом, разработаны схемы клеточной селекции для получения декоративных растений хризантемы килеватой, брахикома иберисолистной, льна многолетнего и райграса многолетнего, устойчивых к меди.

Использование прямой схемы клеточной селекции и добавление токсиканта в питательную среду только на этапе культивирования каллусов позволило получить устойчивые каллусные культуры и растения-регенеранты. Часть растений-регенерантов высажена в почву.

ЛИТЕРАТУРА

1. Духовский П., Юкнис Р. и др. Реакция растения на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессоров // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 2. С. 165.
2. Hoffman A., Persons P.A. Extreme Environment Chance and Evolution: Cambridge Univ. Pre. 197, 259.
3. Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. 1994. Т. 26, № 2. С. 107–117.
4. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Бирюков В.В., Гладкова О.В. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжелым металлам. Клеточная селекция газонных трав, толерантных к ионам меди // Биотехнология. 2006. № 5. С. 63–66.
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. Vol. 47, № 8. P. 776.
6. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Способ получения толерантных к ионам кадмия однодольных растений *in vitro*: патент на изобретение № 23106696. Опубл. 27.09.2007. Бюл. 27.
7. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Способ получения толерантных к ионам свинца однодольных ра-

стений *in vitro*: патент на изобретение № 2305400. Оpubл. 10.09.2007. Бюл. 25.

8. Литвинова И.И., Гладков Е.А., Введение в культуру клеток у растений, используемых в качестве кормовых, лекарственных и декоративных, для получения стрессоустойчивых форм // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 4. С. 94–99.

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. V. 15. P. 473–476.

10. Gambourg O.L., Elevegh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of weat and parleys // *Can J. Biochem.* 1968. V. 46. P. 417–421.



BREEDING ORNAMENTAL PLANTS TOLERANT TO HIGH COPPER CONTENTS IN THE SOILS OF MEGAPOLISES

© I.I. Litvinova, E.A. Gladkov

Copper toxicity was evaluated in plant calluses of *Chrysanthemum carinatum* L., *Brachycome iberidifolia* L., *Linum perenne* L. and *Lolium perenne* L. Technologies were developed to breed plants tolerant to copper.

Key words: copper, heavy metals, cell selection, *Lolium perenne*, *Linum perenne*, *Brachycome iberidifolia*, *Chrysanthemum carinatum*.