

УДК 547.2

**Экологическая биотехнология получения растений брахикома
иберисолистной, устойчивых к высоким концентрациям меди**

Евсюков С.В., студент

*Россия, 107023, г. Москва, Университет машиностроения,
кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология»*

Литвинова И.И., н.с.

Лаборатория генетики культивируемых клеток, ИФР РАН

Научный руководитель: Гладков Е.А., к.б.н., доцент

Россия, 127276, г. Москва, Лаборатория генетики культивируемых клеток ИФР РАН

Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана

Университет машиностроения,

кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология»

Консультанты: Долгих Ю.И.

зав. лабораторией генетики культивируемых клеток, ИФР РАН, д.б.н., проф.,

Гладкова О.В.

СГУ ТВ, Университет машиностроения (МГУИЭ)

кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология»

gladkovu@mail.ru

Брахикома иберисолистная (*Brachycome iberidifolia*) (класс двудольные, семейство астровые) – однолетнее, сильно разветвленное растение высотой 20-25 см, с перисто-рассеченными на узкие доли листьями, расположенными в очередном порядке. Кустики несут многочисленные мелкие соцветия — корзинки 3-3,5 см в диаметре.

Брахикома не требовательна к условиям произрастания, свето- и теплолюбивая, поэтому предпочитает открытые и солнечные места. Брахикома характеризуется обильным цветением с середины июня в течении 75-90 дней. Семена созревают в сентябре и сохраняют всхожесть 2-3 года.

Благодаря высоким декоративным качествам брахикома иберисолистная может использоваться для озеленения городов, например в составе мавританских газонов, клумб, рабаток, бордюров, каменистых горок. Однако, брахикома иберисолистная чувствительна к действию тяжелых металлов.

<http://sntbul.bmstu.ru/doc/741393.html>

В крупных городах, в том числе и в Москве одним из приоритетных загрязнителей почвенного покрова среди тяжелых металлов является медь, обладающая очень высокой фитотоксичностью [1-3], которая ограничивает использование декоративных растений [2,4]. Учитывая неблагоприятное воздействие урбанизированной среды на человека, как и с экологической, так и с философской точек зрения [2,5,6], расширение ассортимента эффектных декоративных растений способных расти в городе является важной экологической задачей. Одним из путей решения данной проблемы является получение устойчивых растений к неблагоприятным условиям среды, с помощью клеточной селекции, то есть отбор *in vitro* клеток с заданными свойствами. Преимущество данного метода заключается в возможности работать с популяциями клеток в малом объеме, отбирать устойчивые клетки [7] и регенерировать из них растения [8-10]. Однако, для того чтобы использовать клеточную селекцию необходимо ввести растения в культуру клеток, для ряда растений это достаточно трудоемкий процесс [11-12].

Целью нашей работы было введение в культуру клеток, регенерация брахикома иберисолистная и разработка технологии получения устойчивых к меди растений.

Материалы и методы

Для получения каллусов, семена помещали на агаризованные питательные среды по Мурасиге и Скугу (МС) и Гамборгу (В5) [13-14] с различным содержанием регуляторов роста. В среду вносили ауксины: 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и кинетин – в различных концентрациях и комбинациях. Предварительно семена стерилизовали однократной обработкой спиртом с последующей стерилизацией раствором содержащим гипохлорит натрия, в течение 20 минут. Затем их три раза промывали стерильной дистиллированной водой. Для оценки фитотоксичности меди, полученные каллусы пересаживали на жидкую питательную среду МС, содержащую медь в концентрациях от 10 до 100 мг/л (в пересчете на чистый металл) в течение 30 суток. Контролем служили каллусы, росшие в таких же условиях на среде без добавления меди. Затем каллусы пересаживали на среду для регенерации МС с добавлением 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК. Частоту каллусообразования рассчитывали в процентах, как отношение числа образовавшихся каллусов к общему числу эксплантов, помещенных на питательную среду. Частоту морфогенеза определяли как долю каллусов, регенерировавших побеги, от общего числа каллусов.

Результаты.

Введение в культуру клеток представителей семейства сложноцветных является трудоемким процессом. Работ по брахикоме иберисолистной нет. Для получения каллусов были использованы сочетания различных регуляторов роста, для брахикомы иберисолистной наиболее подходящим оказалось комбинация ауксина 2,4-Д и цитокинина кинетина. Оптимальной средой для каллусообразования брахикомы иберисолистной была среда В5 с 6 мг/л 2,4-Д и 2 мг/л кинетина, процент образования каллуса составил 56,1% (Рис. 1.) Каллус образовывался светло-желтого цвета, средней плотности, в течение 10-14 дней. При этом добавление в среду 2 мг/л кинетина, в сочетании с различными концентрациями 2,4-Д, усиливало процесс каллусообразования.

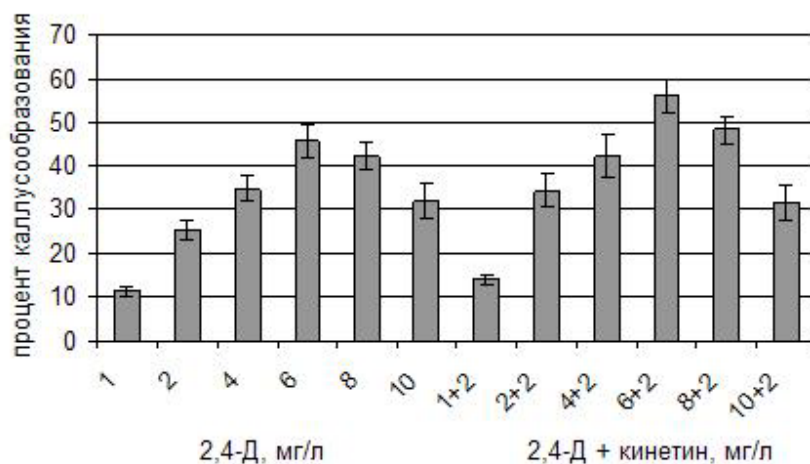


Рис. 1. Влияние 2,4-Д и кинетина на интенсивность каллусообразования брахикомы иберисолистной на среде Гамборга

Для регенерации брахикомы иберисолистной была использована питательная среда МС с половинным содержанием всех минеральных компонентов и добавлением 0,1 мг/л НУК и 2 мг/л БАП, процент образования регенерантов составлял - 62,3%.

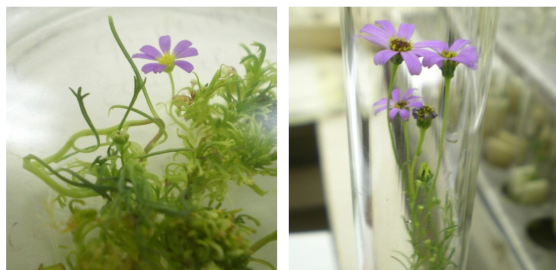


Рис. 2. Культивирование брахикомы иберисолистной на среде для регенерации

Для определения селективной концентрации и проведения клеточной селекции необходимо было оценить фитотоксичность меди для культуры клеток брахикомы иберисолистной. Для этого полученные каллусы помещались на питательную среду содержащую медь. Действие ионов меди проявлялось через 14 суток, часть каллусов приобретало желтую и коричневую окраску. Ингибирующее воздействие меди наблюдалось даже при относительно невысокой концентрации - 10 мг/л, а на среде, при концентрации 30 и 40 мг/л меди значительная часть каллусов желтела и становилась менее плотной, чем контрольные образцы. На максимальных концентрациях меди (50 и 100 мг/л) каллус темнел и терял морфогенную способность уже через несколько дней, лишь у незначительной части клеток наблюдался небольшой прирост биомассы.



Рис. 3. Каллусы брахикомы иберисолистной через 21 сутки после культивирования на питательной среде, содержащей медь

Далее выжившие каллусы помещали повторно на среду с медью, с целью определения селективных концентраций. Уровень токсичности меди во втором пассаже значительно усилился. На 7-14 сутки появлялись очаги некроза и значительная часть каллусов погибала. Высокий уровень ингибирования наблюдался уже при концентрации 20 мг/л меди (Табл.). Только некоторые каллусы сохраняли эмбриогенную способность и имели прирост биомассы. Увеличение концентрации меди до 40 мг/л вызывало гибель у 90 % клеток, на 7-10

сутки от начала культивирования.

Концентрация меди, мг/л	10	20	30	40	50	100
1 пассаж	86,1±7,9	54,7±6,0	49,3±5,2	38,4±4,4	26,4±2,5	7,5±0,3
2 пассаж	51,3±4,6	32,7±3,8	18,0±1,7	10,4±0,7	–	–

На основании полученных результатов можно сделать выводы, что каллусные культуры очень чувствительны к присутствию в питательной среде ионов меди. Высокие концентрации меди приводят к гибели каллусов, а случае использовании на стадии регенерации к потере морфогенной способности. В качестве селективной концентрации выбрана концентрация меди – 20 мг/л. Для отбора резистентных линий была использована прямая схема селекции, включающая пассивирование каллусов на питательной среде МС с концентрацией меди 20 мг/л в течение 2 пассажей по 21-26 суток, регенерация в течение 3 пассажей на среде МС и добавлением 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК, укоренение на среде МС с 0,1 мг/л НУК без токсиканта (рис.4). Были получены растения, устойчивые к меди.

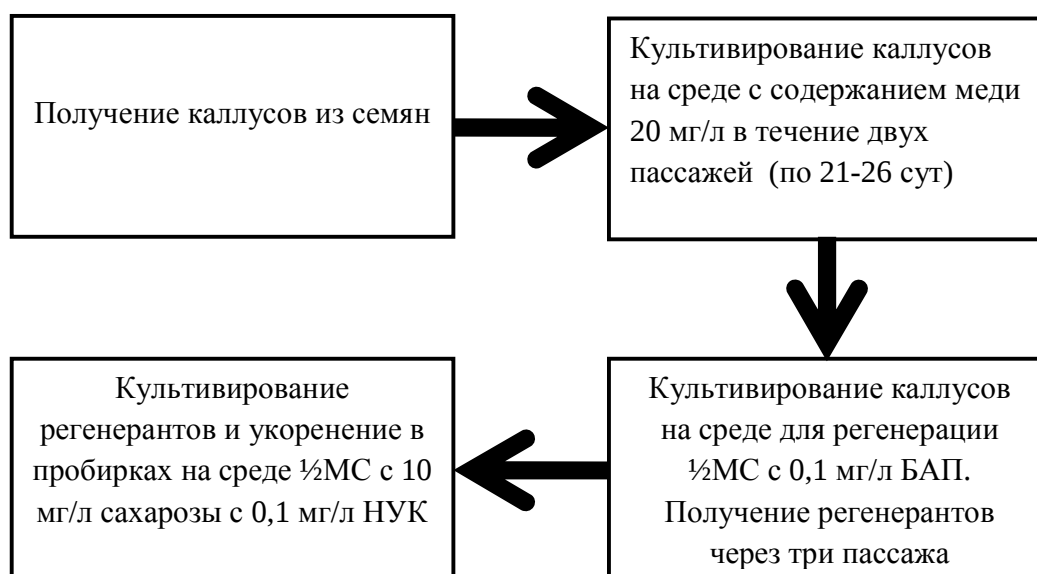


Рис. 4. Схема клеточной селекции брахикомы иберисолистной, устойчивой к меди

Таким образом, была разработана технология введения в культуру клеток и регенерации растений брахикомы иберисолистной. Определена реакция растений и

культивируемых тканей на ионы меди и подобрана селективная концентрация токсиканта. Разработана технология клеточной селекции каллусных культур и растений, толерантных к ионам меди. Получены растения брахикомы иберисолистной, устойчивые к повышенному содержанию данного токсиканта в окружающей среде.

Список литературы

1. Растения в экстремальных условиях минерального питания / под ред. М.Я. Школьника, Н.В. Алексеевой-Поповой. Л.: Наука, 1983. 177 с.
2. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Фитотехнологии для охраны окружающей среды: учеб. пособие. М.: МГУ инженерной экологии, 2012. 202 с.
3. Gladkov E. A., Gladkova O. N., Glushetskaya L. S. Estimation of Heavy Metal Resistance in the Second Generation of Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*) 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. 776–779.
4. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Бирюков В.В., Гладкова О.В. Клеточная селекция газонных трав, толерантных к ионам меди // *Биотехнология*. 2006. № 5. С. 63-66.
5. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Оценка комплексного воздействия экологических факторов на городские растения // *Сборник научных трудов МГУИЭ. Механика. Теплофизика. Экология*. 2006. Вып.3. С. 96-100.
6. Кондратьева С.Б. Осмысление личностью специфики своего «Я» как основы самопознания и самореализации // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Философия*. 2008. Т. 6. № 3. С. 67-70.
7. Jackson P.J., Roth E.J., McClure P.R., Naranjo C.M. Selection, isolation and characterization of cadmium-resistant *Datura innoxia* suspension culture // *Plant Phys*. 1984. Vol.75. P.914-918.
8. Гладков Е.А., Гладкова О.Н., Глушецкая Л.С. Биотехнологический способ получения устойчивых растений к солям свинца и кадмия // *Сборник научных трудов МГУИЭ. Механика. Теплофизика. Экология*. 2006. Вып.3. С.101-106.
9. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Получение многолетних трав, устойчивых к хлоридному засолению, с помощью клеточной селекции // *Сельскохозяйственная биология*. 2014. № 4. С. 106-111.
10. Gori P., Schiff S. Response of in vitro Cultures of *Nicotiana- Tabacum* L to copper stress

- and selection of plants from Cu – tolerant callus // Plant cell tissue and organ culture . 1998. Vol. 53. P. 161-169.
11. Литвинова И. И., Гладков Е. А., Гладкова О.Н. Способ введения в культуру льна многолетнего: пат. 2506741 Российская Федерация. 2014. Бюл. № 5. 6 с.
 12. 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.
 13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473-476.
 14. Gambourg O.L., Elevegh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of weat and parleys // Can.J.Biochem. 1968. № 46. P. 417-42.