

УДК 547.2

**Клеточная технология получения газонной травы полевицы побегоносной,
толерантной к высоким концентрациям меди**

*Евсюков С.В., студент
Россия, 107023, г. Москва, Университет машиностроения,
кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология»,
ИФР РАН, лаборатория генетики культивируемых клеток*

*Груздев В.Г., студент
Университет машиностроения,
кафедра «Экологическая и промышленная биотехнология»,
ИФР РАН, лаборатория генетики культивируемых клеток*

*Научный руководитель: Гладков Е.А., к.б.н., доцент
Россия, 105005, г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана,
Университет машиностроения,
лаборатория генетики культивируемых клеток ИФР РАН*

*Консультанты: Долгих Ю.И.,
зав. лабораторией генетики культивируемых клеток, ИФР РАН, д.б.н., проф.,
Гладкова О.Н.,
ст. преп. кафедры «Экологическая и промышленная биотехнология»
Глушецкая Л.С.,
доцент кафедры «Экологическая и промышленная биотехнология»
gladkovu@mail.ru*

Городские растения оздоравливают окружающую среду, снижая концентрацию загрязняющих веществ, смягчая летнюю жару и сухость, ионизируют воздух, уменьшают шум и поглощают пыль [1-4]. Однако, городские условия неблагоприятны не только для человека, согласно характеристикам городских экосистем и философским мировоззрениям [3,5], но и для произрастания растений [1-4,6]. Газонные травы очень чувствительны к неблагоприятным условиям окружающей среды, из-за постоянного действия неблагоприятных экологических факторов у городских растений существенно снижаются декоративные качества, многие растения погибают. Основные загрязнители почвенного покрова Москвы - среди тяжелых металлов - соли цинка, свинца и меди, при этом медь обладает наибольшей фитотоксичностью. Для создания городских партерных, декоративных

и спортивных газонов используются высокодекоративные виды, среди них полевица побегоносная (*Agrostis stolonifera* L.). Она имеет преимущество перед многими другими газонными злаками — вегетативно размножается за короткий срок и создание газона только из нее. Газон из полевицы побегоносной не нужно стричь часто, она выносит затенение и относительно газоустойчива, однако она чувствительна к высокому уровню меди в окружающей среде.

Один из способов решения этой проблемы является создание устойчивых к неблагоприятным экологическим факторам растений. Среди новых технологий большую перспективу имеют биотехнологии, которые используются в различных направлениях и для различных объектов [7-9]. Технологии клеточной селекции хорошо зарекомендовали себя при получении растений, толерантных к различным экологическим стрессовым факторам, разработаны технологии для газонных трав [10-14], но они редко использовались в городском озеленении.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

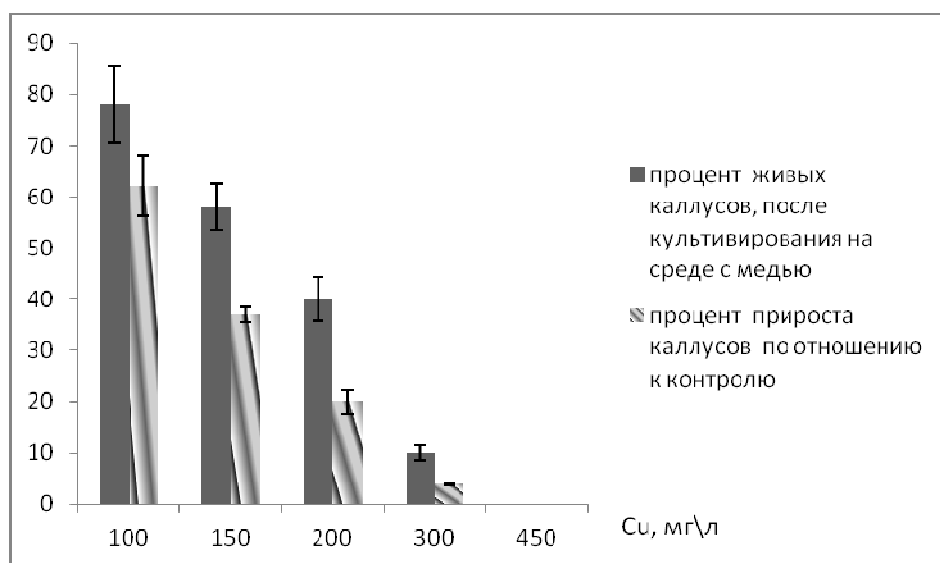
Объектом нашего исследования была газонная трава - полевица побегоносная (*Agrostis stolonifera* L.). Первичный каллус получали из семян на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 30 г/л сахарозы, 500 мг/л гидролизата казеина и 7 г/л агар - агара, концентрация 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (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 для полевицы на чашку) и культивировали при температуре 26 °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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. После культивирования в течение 1 месяца 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 питательную 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 ОБСУЖДЕНИЕ

Важнейшее условие для реализации клеточных технологий – введение в культуру клеток растений. Для получения каллуса использовали модифицированную на каждом этапе среду МС с разным содержанием 2,4-Д. Морфогенный каллус формировался с высокой частотой на при концентрации 2,4-Д 3 и 5 мг/л. Для дальнейшей работы была выбрана среда МС, содержащая 3 мг/л 2,4-Д для образования каллуса, 1мг/л - для пассирования.

В результате проведенной оптимизации условий культивирования была разработана эффективная система *in vitro*, характеризующаяся высокой частотой образования каллуса и регенерации растений.

Следующий этап работы - оценка фитотоксичности меди 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 (см. рис.), при концентрации 300 мг/л (в пересчете на чистый металл) и выше каллус газонных трав приобретал голубую окраску, вероятно, вследствие интенсивного накопления меди в клетках жизнеспособность каллусных тканей была крайне низкой.



Морфогенная способность каллусных тканей была низкой при культивировании на средах при 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.

На основании исследования действия меди, концентрация 150 мг/л была выбрана в качестве селективной. Для получения растений, устойчивых к меди, была использована схема селекции, включающая в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/л меди, регенерацию на среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/л меди и укоренение растений на среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/л меди.

Всего в селективных условиях было получено 180 регенерантов полевицы в условиях *in vitro*. 78 регенерантов полевицы из 180 укоренились в почвенных условиях, 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. Для проверки устойчивости к высоким концентрациям меди, тридцать полученных после клеточной селекции регенерантов полевицы, а также исходные растения были высажены в почву содержащую 150 мг/кг Cu. Большинство исследуемых 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. Показано сохранение устойчивости к меди в трех поколениях. Потомки четырех исследуемых регенерантов полевицы продемонстрировали повышенную толерантность к меди. Потомки регенеранта №56 продемонстрировали повышенную устойчивость к меди в трех 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 - полевицу побегоносную.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следовательно, с помощью клеточной селекции можно повысить предел толерантности к меди 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.

Список литературы

1. Растения в экстремальных условиях минерального питания / под ред. М.Я. Школьника, Н.В. Алексеевой-Поповой. Л.: Наука, 1983. 177 с.
2. Пронина Н.Б. Экологические стрессы. М.: Издательство МСХА, 2000. 310 с.
3. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Фитотехнологии для охраны окружающей среды: учеб. пособие. М.: МГУ инженерной экологии, 2012. 202 с.
4. Глушецкая Л.С., Гладков Е.А. Генеральный план и основные строительные решения промышленных производств: учеб. пособие. М.: МГУИЭ, 2011. 56 с.
5. 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.
6. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Использование растений, полученных с помощью биотехнологических методов, для фиторемедиации почв мегаполисов // Сборник научных трудов МГУИЭ. Механика, биология, информатика. 2009. С 38-41.
7. Осипова Е.А., Цыбулько Н.С., Шамина З.Б. Вариабельность клеточных клонов *Thalictrum minus* in vitro // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 656-661.
8. Каранова С.Л. Использование методов клеточной селекции и экспериментального мутагенеза для получения штаммов культивируемых клеток *Dioscorea deltoidea* Wall с повышенным биосинтезом стероидов // Биотехнология. 2006. № 2. С. 16-19.
9. Цоглин Л.Н., Семененко В.Е., Маслова И.П. Способ культивирования микроводорослей: пат. 1806184 Российская Федерация. 1993. Бюл. № 12. 2 с.
10. Глушецкая Л.С., Гладков Е.А., Гладкова О.Н. Получение растений, обладающих толерантностью к цинку с помощью клеточной селекции // Сборник научных трудов МГУИЭ. Механика, биология, информатика. 2009. С 41-44.
11. 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.
12. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Способ получения толерантных к ионам кадмия однодольных растений in vitro: пат. 23106696 Российская Федерация. 2007. Бюл. № 27. 6 с.
13. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Бирюков В.В., Гладкова О.В., Шевякова Н.И., Гладкова

- О.Н., Глушечкая Л.С. Способ получения толерантных к засолению газонных трав *in vitro*: пат. 2260936 Российская Федерация. 2005. Бюл. № 27. 6 с.
14. Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Бирюков В.В., Гладкова О.В. Способ получения толерантных к ионам меди однодольных растений *in vitro*: пат. 2260937 Российская Федерация. 2005. Бюл. № 27. 5 с.