

## КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ К ПОВЫШЕННЫМ ДОЗАМ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.С. ЛУКАТКИН, И.Д. МИХАЙЛОВА, О.А. ВЕДЯШКИНА

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет  
им. Н.П. Огарёва», Саранск (aslukatkin@yandex.ru)

## CELL SELECTION OF PLANTS TO HIGH DOSES OF HEAVY METALS IN *IN VITRO* CULTURE

A.S. LUKATKIN, I.D. MIKHAILOVA, O.A. VEDYASHKINA

N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk (aslukatkin@yandex.ru)

**Резюме.** Представлены данные по изучению влияния различных доз тяжёлых металлов (ТМ) в среде культивирования на каллусообразование, рост и окислительные процессы в каллусных культурах огурца и редиса. По токсическому действию ТМ на образование и рост каллусов можно расположить их в следующем порядке:  $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+}$  (огурец),  $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+}$  (редис). Длительное выращивание каллусных культур на средах с добавлением различных доз ТМ дифференцированно влияло на индикаторы окислительного стресса, что может свидетельствовать об адаптации клеточных популяций к ТМ.

**Ключевые слова:** огурец, редис, тяжёлые металлы, каллус, адаптация.

**Abstract.** The data about effects of different doses of heavy metals (HM) in cultural medium on callogenesis, growth and oxidative processes in callus cultures of cucumber and radish are shown. Toxic effect of HM on callus formation and growth has following order:  $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+}$  (cucumber),  $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+}$  (radish). Prolonged growth of calluses on the media with different HM concentrations is differentiated affected an oxidative stress indices, that may indicate adaption of the cell populations to HM.

**Key words:** cucumber, radish, heavy metals, callus, adaptation.

Важным направлением современной биологии растений является изучение ответных реакций культивируемых *in vitro* клеток и тканей растений на абиотические факторы внешней среды, что необходимо для создания новых устойчивых форм растений. Каллусная культура является удобным объектом для изучения повреждающего действия неблагоприятных факторов. Её использование имеет ряд преимуществ: каллус является довольно однородным материалом, в котором исключены надклеточные системы регуляции; в культуре *in vitro* достаточно легко изучать некоторые параметры физиологии клетки; в культуре *in vitro* можно осуществлять клеточную селекцию на резистентность и/или толерантность к неблагоприятным факторам среды, и т.п. При этом необходимо отметить, что создание стрессовых селективных условий *in vitro*, идентичных таковым в природе, крайне затруднительно.

В последнее время параметры существования растений усложняются в связи с глобальными процессами на Земле, как естественными, так и антропогенными. В связи с этим возрастает потребность в точной оценке адаптивного потенциала культурных растений, которая невозможна без изучения их устойчивости и повреждения при стрессовых воздействиях окружающей среды. Одним из токсикантов, действующих на культурные растения, являются тяжёлые металлы (ТМ), и их действие постоянно усиливается с возрастанием антропогенной нагрузки на экосистемы. Большинство овощных растений выращивается в непосредственной близости от городов, что может приводить к поступлению в растения высоких количеств ТМ. Поэтому очень важны как оценка устойчивости к ТМ разных генотипов, так и возможность повышения устойчивости растений к ТМ посредством клеточной селекции [Lukatkin et al., 2013, 2014].

Работы по клеточной селекции на устойчивость растений к тяжёлым металлам (ТМ) начаты недавно, но уже имеются положительные результаты. Во всех экспериментах использовали метод прямой селекции, при котором в качестве селективного агента применяли токсические концентрации солей тяжёлых металлов. Поскольку невозможно детально повторить условия, типичные для того или иного участка, в работах обычно использовали дозы ТМ, которые определяются преобладающими характеристиками почв на определенной территории (иначе говоря, использовали модельные концентрации ТМ, которые соотносимы с представленными в естественных почвах). Таким образом, были получены растения газонной травы полевицы побегоносной, устойчивые к кадмию, меди и цинку [Гладков, 2006а, 2006б]. Использование прямой схемы селекции и непродолжительного периода культивирования позволило получить растения-регенеранты хризантемы килеватой и льна декоративного, толерантные к действию ионов меди; сахарного тростника, обладающие устойчивостью к кадмию [Fornazier et al., 2002]. Путём прямой селекции *in vitro* отобраны клеточные линии петунии, устойчивые к ртути, сорго – к алюминию, моркови – к алюминию и марганцу одновременно; суспензионные культуры дурмана – к кадмию.

Целью работы было сравнение эффектов различных концентраций ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  М/л) ионов ТМ ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) в среде культивирования на каллусообразование, рост и окислительные процессы в каллусных культурах огурца (*Cucumis sativus* L., сорт 'Единство') и редиса (*Raphanus sativus* L., сорт 'Красный великан').

Из поверхностно стерилизованных семян получали стерильные растения, затем из них вычленили экспланты, на которых после посадки на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) формировалась каллусная ткань. 5-недельные каллусы, полученные на разных эксплантах, пересаживали на среды МС с добавлением различных концентраций (от  $10^{-5}$

до  $10^{-3}$  М/л)  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Изучали влияние ТМ на рост, каллусогенез и скорость генерации супероксидного анион-радикала [Лукаткин, 2002] в каллусах огурца и редиса при длительном субкультивировании.

Показано, что ТМ в низких концентрациях (возможно, выступая в качестве необходимых эссенциальных элементов) зачастую стимулировали каллусогенез и рост каллусов, тогда как в высоких сильно угнетали эти процессы. При этом выявлены различия у огурца и редиса для разных ТМ. Так, ионы меди угнетающе действовали на каллусогенез в культуре *in vitro* огурца. При высокой концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (1 мМ) нарастания каллуса не происходило; при более низких концентрациях ионов меди в среде наблюдалось незначительное увеличение каллусовой культуры; во всех вариантах опыта цвет ткани менялся со светло-жёлтого на тёмно-жёлтый. Для каллусов редиса показано, что на среде, содержащей 1 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ , они характеризовались очень слабым каллусогенезом и не росли в пересадочной культуре; концентрация 0,1 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  не оказала выраженного токсического эффекта на образование и рост каллусов; на среде с добавлением 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  экспланты редиса обрастали каллусом быстрее и сильнее относительно контроля, а пересадочные каллусы имели наибольший размер и более интенсивную окраску.

У эксплантов огурца на среде с низким содержанием ионов  $\text{Ni}^{2+}$  наблюдали интенсивный каллусогенез (чего не происходило на средах с более высокой концентрацией никеля). Рост каллусовой культуры огурца, пересаженной на среду МС, содержащую ионы никеля, практически не наблюдался, за исключением среды с низким содержанием  $\text{Ni}^{2+}$ . В опыте с редисом при добавлении в среду МС ионов  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрации 1 мМ наблюдали замедленное образование каллусовой ткани мелкозернистой структуры. Каллусы редиса, выращенные на среде с добавлением 1 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ , имели больший размер по сравнению с каллусами, выращенными на среде с внесением 1 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ , но меньший по сравнению с контролем. Каллусы, выращенные на среде с добавлением 10 мкМ  $\text{Ni}^{2+}$ , существенно не отличались от таковых на среде с добавлением ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .

Ионы свинца не оказали негативного влияния на каллусогенез и рост каллусовой ткани огурца, а в средней и низкой концентрациях даже стимулировали рост каллусовой ткани. Концентрация 1 мМ  $\text{Pb}^{2+}$  приводила к угнетению роста каллусов огурца и изменению цвета каллусовой культуры со светло-жёлтого до насыщенного жёлтого. У редиса не отмечено существенного подавления каллусогенеза на средах с добавлением ионов  $\text{Pb}^{2+}$ , как и роста каллусов. При этом рост каллусов редиса на среде с добавлением 10 мкМ  $\text{Pb}^{2+}$  незначительно отличался от контроля. Угнетение роста отмечено только при самой высокой дозе металла в среде 1 мМ, но, в то же время каллусы редиса имели больший размер по сравнению с каллусами, выращенными на средах с добавлением ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ . Возможно, стимулирующее действие  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  связано с влиянием не ионов  $\text{Pb}^{2+}$ , а нитрат-анионом.

Ионы цинка оказали весьма негативное действие на каллусогенез и рост каллусов огурца, вызывая отмирание клеток при высокой концентрации ионов, а в остальных концентрациях наблюдался лишь очень незначительный рост культуры клеток. Однако на каллусы редиса ионы  $\text{Zn}^{2+}$  оказали меньшее ингибирующее воздействие по сравнению с другими использованными ТМ. Каллусогенез редиса на средах с добавлением ионов  $\text{Zn}^{2+}$  проходил немного медленнее по сравнению с контролем, но заметного замедления роста каллусов отмечено не было (при всех использованных концентрациях).

По действию ТМ на каллусогенез и рост каллусов огурца их можно расположить в следующем порядке, начиная с самого токсичного:  $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ . В то же время для редиса этот ряд выглядит несколько иначе:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ .

На каллусных культурах огурца и редиса гипоксигенного происхождения определяли эффекты длительного выращивания в присутствии ТМ в среде на генерацию одной из потенциально опасных активированных форм кислорода – супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^-$ ). В каллусах огурца выявлена чёткая прямая зависимость между концен-

трацией ионов цинка в среде и скоростью генерации  $O_2^-$ . Это свидетельствует о неблагоприятном воздействии на каллусную культуру ионов цинка, вызывающих усиление генерации  $O_2^-$  (указывающего на возникновение окислительного стресса в клетках) [Лукаткин, 2002]. В то же время другие изученные ионы ТМ не оказали активирующего действия на генерацию супероксида в каллусной культуре огурца. Можно предположить, что ионы  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  не индуцировали окислительный стресс в каллусной культуре огурца.

Таким образом, длительное выращивание каллусов огурца на средах с избытком ТМ в большинстве вариантов не индуцировало повышения генерации  $O_2^-$  (за исключением ионов  $Zn^{2+}$ ). Возможно, что развивающаяся в условиях хронического действия ТМ культура клеток адаптируется к ТМ, либо за счёт селекционных процессов, либо путём биохимической адаптации.

Аналогичные определения, проведенные на каллусных культурах редиса, дали совершенно иные результаты. Наибольшее увеличение скорости генерации  $O_2^-$  относительно контроля обнаружено в каллусных линиях редиса, выращенных на средах с добавлением ионов  $Pb^{2+}$ , максимально (в 1,5 раза) – при самой малой дозе свинца в среде. На средах с добавлением ионов  $Ni^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  генерация  $O_2^-$  была самой высокой при минимальной концентрации ионов (10 мкМ). Парадоксально, что увеличение концентраций ТМ в среде не индуцировало усиления генерации супероксида в каллусах редиса.

Таким образом, несмотря на явно выраженные токсические эффекты ТМ на каллусогенез и рост каллусных культур огурца и редиса, отсутствие окислительного стресса (по генерации супероксидного анион-радикала) в большинстве каллусов, длительно выращиваемых на различных концентрациях ТМ, указывает на высокую вероятность акклимации клеточной популяции к действию ТМ. Это подтверждает потенциальную возможность направленного повышения металлоустойчивости овощных культур посредством клеточной селекции каллусных культур.

### ЛИТЕРАТУРА

- Гладков Е.А.** 2006а. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжёлым металлам. 1. Сравнительная оценка токсичности тяжёлых металлов для каллусных клеток и целых растений. *Биотехнология*. 3: 79–82.
- Гладков Е.А.** 2006б. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжёлым металлам. 2. Получение растений, толерантных к ионам кадмия и свинца. *Биотехнология*. 4: 87–92.
- Лукаткин А.С.** 2002. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений. *Физиология растений*. 49(5): 697–702.
- Fornazier R.K., Ferreira R.R., Pereira G.J., Molina S.M., Smith J., Lea P.J.** 2002. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect of antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 71(2): 125–131.
- Lukatkin A.S., Michailova I.D., Teixeira da Silva J.A.** 2013. Prooxidative and antioxidative properties of cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus *in vitro* and young *in vivo* plantlets in response to copper ions. *Folia Horticulturae*. 25(2): 141–151.
- Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K.** 2014. Effect of copper on pro- and atioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) *in vitro* and *in vivo*. *J. of Trace Elements in Medicine and Biology*. 28: 80–86.