



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



РОСТ КЛЕВЕРА И БУРАЧКА *IN VITRO* В СРЕДЕ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Ермошин А.А., Орлова М.В., Неугодникова Е.А.,
Григорьева Е.И., Тептина А.Ю., Киселева И.С.

Уральский федеральный университет им. первого
Президента России Б.Н. Ельцина,
г. Екатеринбург, Россия
E-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Проведено изучение показателей роста двух видов рода бурачок – *Alyssum tortuosum* Waldst. & Kit. Ex Willd. и *Alyssum litvinovii* Knjaz., роста и антиоксидантных показателей линий клевера *Trifolium repens* L., выращенных в асептической культуре в среде с высоким содержанием ионов меди и никеля. Целью исследования был отбор растений, перспективных для использования в фиторемедиации. Выбор растений обусловлен тем, что клевер является космополитным видом, а виды бурачка известны как гипераккумуляторы никеля. Растения *T. repens* получены путем клеточной селекции. Растения *A. tortuosum* и *A. litvinovii* получены из семян, собранных в естественных местобитаниях, и размножены микроклонально в асептической культуре. Показано, что селекционные линии *T. repens* обладают меньшей скоростью роста по сравнению с исходным вариантом. Добавление в среду культивирования 200 мкМ сульфата меди не оказывало существенного влияния на рост селекционных форм, тогда как контрольные растения угнетались. Обнаружено, что *A. tortuosum* более устойчив к избытку ионов меди и никеля, чем *A. litvinovii*. Добавление в среду 200 мкМ Ni^{2+} не оказывало негативного эффекта на рост побегов бурачка, в то время как концентрация 100 мкМ Ni^{2+} даже стимулировала его. Были обнаружены генотипы растений, выживающие на 200 мкМ Cu^{2+} в среде, что может быть перспективно для их использования на почвах с полиметаллическим загрязнением.

Ключевые слова: *Alyssum litvinovii*, *Alyssum tortuosum*, *Trifolium repens*, культивирование *in vitro*, медь, никель, параметры роста растений, перекисное окисление липидов, стресс, супероксиддисмутаза

GROWTH OF CLOVER AND ALISSUM *IN VITRO* IN MEDIA WITH HIGH HEAVY METAL CONTENT

Ermoshin A.A., Orlova M.V., Neugodnikova E.A.,
Grigoryeva E.I., Teptina A.Yu., Kiseleva I.S.

Ural Federal University named after the first
President of Russia B. Yeltsin,
Ekaterinburg, Russia
E-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Study deals with the growth and antioxidant reaction of creeping clover plants, growth two species of *Alyssum* grown in an aseptic culture in a media with a high content of copper and nickel ions. The study is aimed at selecting plants promising for use in phytoremediation. Clover plants were obtained by cell selection, alyssum plants – from seeds harvested in natural habitats and propagated microclonally in an aseptic culture. The choice of plants was due to the fact that clover is a cosmopolitan species, and *Alyssum* species are known as nickel hyperaccumulators. It was shown that *T. repens* lines obtained by cell selection have a lower growth rate compared to the original ones. The addition of 200 μM copper ions to the cultivation medium did not significantly affect the growth of selected forms, whereas control plants were inhibited. *Alyssum tortuosum* was shown to be more resistant to excess copper and nickel ions than *Alyssum litvinovii*. The addition of 200 μM Ni^{2+} to the medium did not show effect on the growth of alyssum plants, and 100 μM Ni^{2+} even stimulated growth. Genotypes that survived on 200 μM Cu^{2+} in the medium were found, which may be promising for their use in soils with poly-metallic contamination.

Keywords: *Alyssum litvinovii*, *Alyssum tortuosum*, *Trifolium repens*, *in vitro* cultivation, copper, nickel, plant growth parameters, lipid peroxidation, stress, superoxide dismutase

Поступила в редакцию: 12.05.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-253-260](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-253-260)

ВВЕДЕНИЕ

Изменяющиеся условия среды негативно сказываются на живых организмах. Наиболее остро на такие изменения реагируют растения, так как они не могут физически

избегать воздействия, вынуждены адаптироваться на физиологическом, биохимическом и морфологических уровнях.

Проблема загрязнения среды тяжелыми металлами (ТМ) остро стоит во многих регионах мира, в том числе, на Урале [Fazlieva et al., 2012; Borisova et al., 2016; Kumar et al., 2019]. Поэтому поиск или создание растений, устойчивых к высоким дозам ТМ представляет большой интерес. Поиск растений в природе зачастую занимает продолжительное время, поэтому возникает необходимость направленно создавать растения, устойчивые к ТМ. Наиболее эффективным методом получения растений с заданными свойствами является генная инженерия. Однако в нашей стране выращивание трансгенных культур в открытом грунте запрещено, поэтому необходимо использовать другие методы в получении устойчивых линий растений, например, клеточную селекцию.

Клеточная селекция растений *in vitro* является достаточно быстрым и эффективным методом создания растений, устойчивых к высоким дозам ТМ и вызванным ими окислительному стрессу. Растения, полученные таким образом, могут служить материалом для поиска генотипов «исключителей» и/или «гипераккумуляторов» для последующего их использования в технологиях восстановления окружающей среды.

Выявление растений, способных выживать в среде с высоким содержанием ТМ, не накапливая их в надземной части, может быть интересным в связи с технологиями фитостабилизации. Такие виды могут создавать растительный покров на нарушенных территориях, служить средой обитания для животных. Они должны быть неприхотливыми, широко распространенными, сочетающими разные способы размножения. Например, виды клевера. Виды, используемые для фиторемедиации, должны обладать свойствами накопителей и сверхнакопителей ТМ. Некоторые виды бурачка обладают такой способностью к гипераккумуляции никеля в надземной биомассе (особенно в листьях), например, *Alyssum obovatum* [Brook, Radford, 1978; Teptina, Paukov, 2015; Тептина и др., 2016; Tripti et al., 2020], *A. tortuosum* и *A. litvinovii* [Altinözlü et al., 2012; Teptina, Paukov, 2015; Тептина и др., 2016].

Среди ТМ имеется много эссенциальных для растений элементов. Такими, например, являются медь и никель. Они играют важную роль в жизнедеятельности растений, поскольку являются составной частью многих ферментативных систем. В то же время, в избыточных концентрациях эти ТМ могут стать высокотоксичными для растений из-за своей редокс-активности. Известно, что поливалентные ионы провоцируют образование активных форм кислорода, в частности, образование высокоактивных гидроксильных радикалов в реакциях Фентона и Хабера–Вейса, что приводит к окислительному стрессу [Полесская, 2007].

Таким образом, целью работы был отбор генотипов растений клевера и бурачка, введенных в культуру *in vitro*, проявляющих устойчивость к избытку ионов меди и никеля, окислительному стрессу, вызванному ими, и перспективных для использования в экобиотехнологиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Trifolium repens L. (клевер ползучий) – многолетний травянистый космополитный вид из семейства бобовых. Используется как почвопокровное растение и сидерат. Легко размножается вегетативно, неприхотлив к условиям выращивания и имеет широкие пределы толерантности. В работе использованы растения клевера ползучего, ранее полученные нами

методом клеточной селекции и размножаемые в асептической культуре на среде Мурасиге и Скуга (МС) [Ermoshin et al., 2015; Ермошин, Киселева, 2017].

Alyssum tortuosum Waldst. & Kit. Ex Willd. (бурачок извилистый/изогнутый) – полиморфный вид, ареал охватывает Центральную и юго-восточную Европу, Россию (Кавказ, Южный Урал, Восточную и Западную Сибирь), юго-западную Азию, Казахстан, Туркменистан, Западный Китай. Вид заселяет различные виды горных пород и песчаные субстраты [Князев, 2011].

Alyssum litvinovii Княз. (бурачок Литвинова) – узколокальный эндемик Южного Урала, известен только из одной популяции ('locus classicus') на Южном Урале [Князев, 2011].

Растения *A. tortuosum* и *A. litvinovii* не подвергались предварительной селекции, а генотипы размножали из семян методом микроклонирования в асептической культуре на среде МС с 3% сахарозы.

Растения, выращенные *in vitro*, переносили на культуральные среды с добавлением 200 мкМ сульфата меди (для *T. repens*); 100 и 200 мкМ сульфата меди или никеля (для *A. tortuosum* и *A. litvinovii*). Растения культивировали в климатической камере Binder (Германия) в течение месяца. У растений, выращенных *in vitro*, были определены показатели роста: количество образовавшихся листьев и сформировавшихся розеток – у клевера и высота побегов – у бурачка.

Наиболее активно растущие линии клевера были адаптированы к грунту и выращены в горшечной культуре. Для этих растений было проведено изучение показателей антиоксидантной системы в условиях короткого и жесткого стресса. Стресс вызывали экспонированием листьев в чашках Петри с растворами ТМ.

Листья селекционных форм клевера, а также дикого типа, помещали на 20 ч в чашки Петри с 5 мМ раствором сульфата меди или на дистиллированную воду. После воздействия определяли уровень перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) и активность супероксиддисмутазы (СОД) с использованием спектрофотометрического метода. Уровень ПОЛ определяли по реакции малонового альдегида с тиобарбитуровой кислотой, активность СОД по ингибированию фотоокисления нитросинего тетразолия [Uchiyama, Mihara, 1978; Beauchamp, Fridovich, 1971] с использованием планшетного спектрофотометра Infiniti 200 Pro (Тесан, Австрия).

В эксперименте использовали 3–7 независимых генотипов каждого вида, не менее чем в 3-х биологических повторностях. На рисунках представлены значения среднего арифметического и их стандартная ошибка ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Культивирование растений клевера *in vitro* на среде МС показало, что селекционные линии растут медленнее, чем исходная форма: число сформированных розеток снижалось на 49%, а количество листьев – на 47% (рис. 1, 2). Культивирование *T. repens* на селекционной среде с добавлением 200 мкМ Cu^{2+} приводило к угнетению роста контрольных растений, в то время как селекционные линии росли так же, как и в нормальной среде. У контрольных растений число розеток уменьшилось на 43%, число листьев – на 42%. У селекционных линий в среде МС с избытком ионов меди число заложившихся розеток снизилось всего на 18%, а число листьев – на 39%.

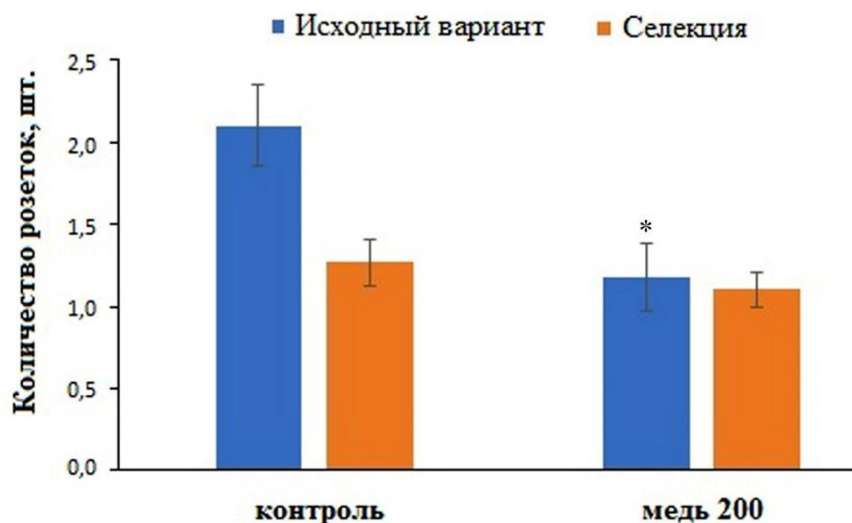


Рис. 1. Количество сформированных розеток у *T. repens*, выращенного *in vitro* на среде с добавлением 200 мкМ Cu^{2+} . * – Отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.



Рис. 2. Селекционные линии *T. repens*: А – контрольные растения на среде МС; Б – селекционные растения на среде МС; В – контрольные растения на среде МС с добавлением 200 мкМ Cu^{2+} ; Г – селекционные растения на среде МС с добавлением 200 мкМ Cu^{2+} .

В эксперименте с острым стрессом показано, что при выдерживании листьев клевера на 5 мМ растворе сульфата меди уровень перекисного окисления липидов у контрольных растений (исходный генотип, не подвергшийся селекции) выше в 2 раза по сравнению с вариантом на воде. У селекционных линий результаты отличаются. Например, у линии 02-1 количество ТБК-реагирующих продуктов при выдерживании на 5 мМ растворе сульфата меди выше в 3 раза по сравнению с водой. У линий 02-9, 02-10 и 02-12 выше на 60%, 91% и в 2 раза соответственно, чем в варианте водой (рис. 3). Это говорит о том, что у селекционных линий, адаптированных к действию ионов меди, в условиях экспонирования в растворе ТМ обнаруживается разный уровень окислительного стресса в сравнении с контрольными растениями, не прошедшими отбор в культуре клеток. Линия 02-1 испытывает больший окислительный стресс, 02-12 – сопоставимый и две селекционные линии, 02-9 и 02-10, испытывают меньший стресс, в сравнении с контролем.

Активность СОД у контрольной линии при выдерживании на 5 мМ растворе сульфата меди выше, чем в варианте с водой на 12%. У линий – 02-1, 02-9 – активность фермента в условиях действия ионов меди выше, чем в варианте с водой в 2,5 и 3,5 раза, соответственно, а у линий 02-10 и 02-12 – на 39% и 36%, соответственно (рис. 4). Все растения испытывают стресс, но уровень активности СОД у селекционных линий в присутствии ионов меди, значительно выше, чем у исходного генотипа. Очевидно, что у растений, не прошедших отбор в культуре клеток, система гашения супероксид-анион-радикала работает менее эффективно, чем у селекционных линий.

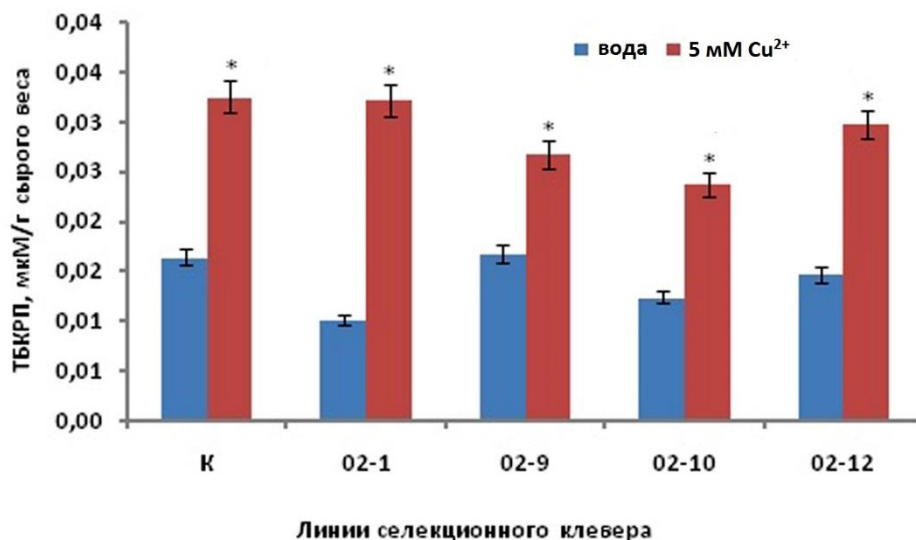


Рис. 3. Уровень перекисного окисления липидов мембран у линий селекционного и контрольного клевера. * – Отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

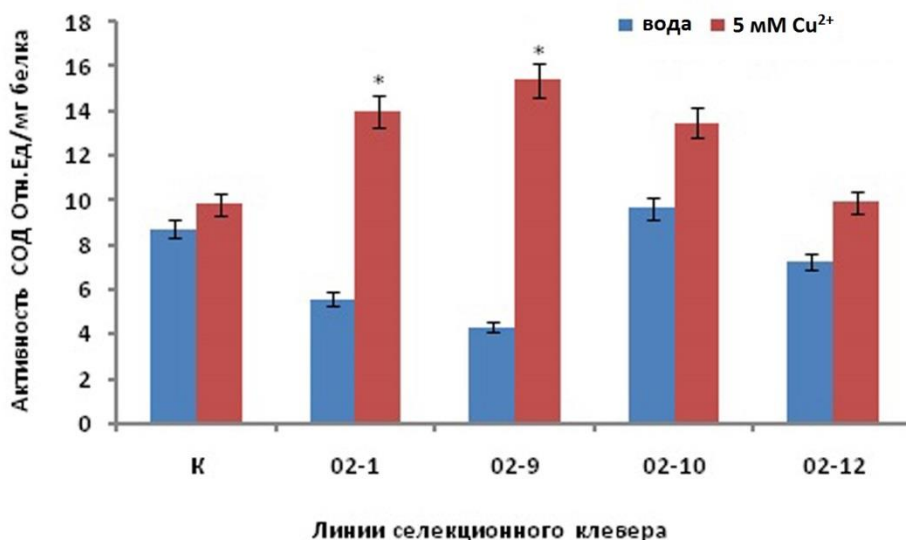


Рис. 4. Активность СОД у линий селекционного клевера при выдерживании на 5 мМ растворе сульфата меди. * – Отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

Выращивание *in vitro* видов рода *Alyssum* показало, что *A. litvinovii* обладает замедленным ростом на всех использованных средах культивирования, в сравнении с *A. tortuosum*. На среде с добавлением 100 мкМ Ni²⁺ растения формировали более длинные

побеги (на 17%) в сравнении с контролем, что говорит о стимулировании роста ионами никеля у данных видов (рис. 5).

При выращивании растений *in vitro* на среде с добавлением ионов меди было обнаружено, что растения рода *Alyssum* не устойчивы к выбранным концентрациям этого металла. При этом *A. litvinovii* оказался более чувствителен к избытку ионов меди, чем *A. tortuosum* (рис. 6). Тем не менее, у обоих видов были выявлены генотипы, способные выживать на среде с 200 мкМ Cu^{2+} , хотя и не способные активно расти в присутствии таких доз токсиканта. При внесении в среду культивирования 100 мкМ Cu^{2+} выжили пять из шести генотипов *A. tortuosum* и два из трех генотипов *A. litvinovii*. В присутствии 200 мкМ Cu^{2+} выжили три и один генотип, соответственно.



Рис. 5. Культуральные линии *A. tortuosum*: А – на среде МС; Б – на среде МС со 100 мкМ Ni^{2+} ; В – на среде МС со 100 мкМ Cu^{2+} .

В присутствии ионов никеля в культуральной среде выживали все изученные генотипы обоих видов бурачка.

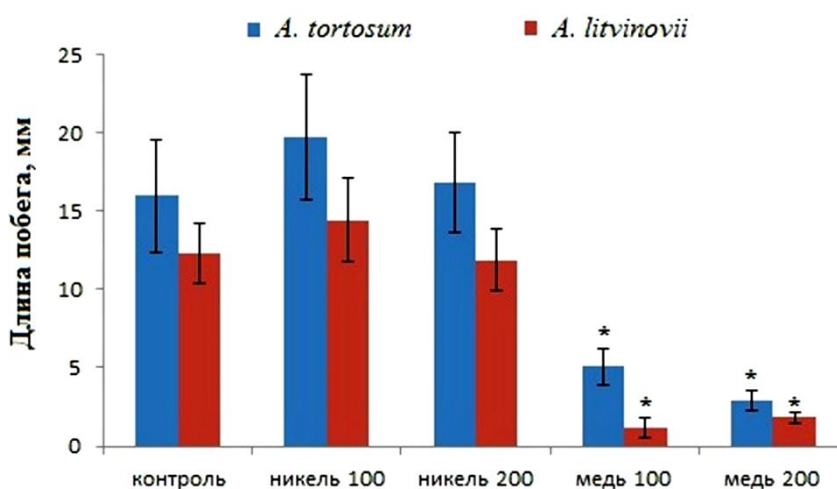


Рис. 6. Длина побегов у двух видов рода *Alyssum*, культивируемых *in vitro* на среде МС с добавлением ионов меди и никеля. * – Отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клевер ползучий, будучи космополитным видом, широко распространен в разных типах экосистем как вид, проявляющий свойства рудеральных растений. Однако он часто встречается на техногенно трансформированных территориях с высоким уровнем поллютантов, в том числе ТМ. Так, на Среднем Урале этот вид встречается в зонах, прилегающих к добывающим и перерабатывающим меднорудное сырье предприятиям [Kumar et al., 2019]. Это позволило нам предположить, что среди растений этого вида могут встречаться генотипы, устойчивые к меди.

В результате ступенчатой клеточной селекции получены линии клевера ползучего, проявившие устойчивости к действию высоких доз ионов меди – они выживали на среде с добавлением 200 мкМ Cu^{2+} в среду культивирования и практически не замедляли рост, тогда как у растений, не прошедших клеточную селекцию, рост подавлялся значительно. Растения из систем *in vitro* успешно были адаптированы к выращиванию в горшечных культурах. При экспонировании листьев таких растений в 5 мМ растворе ионов меди было выявлено, что прошедшие через клеточную селекцию линии клевера обладали большей активностью СОД в условиях стресса и, соответственно, в меньшей степени подвергались окислительному стрессу. Как следствие, уровень перекисного окисления мембранных фосфолипидов у двух линий был ниже, чем у растений, не подвергавшихся селекции.

Виды рода *Allyssum* широко распространены на серпентинитах, и многие из них относятся к «гипераккумуляторам» никеля. Они должны обладать высокой устойчивостью к избытку этого металла, поскольку его содержание в таких породах очень высоко [Тептина, Paukov, 2015; Тептина и др., 2016; Tripti et al., 2020]. Известно, что растения рода *Allyssum* могут накапливать высокие дозы никеля в надземных органах, чаще всего в листьях [Brooks, Radford, 1978; Тептина, Paukov, 2015; Тептина и др., 2016; Tripti et al., 2020]. В наших опытах при выращивании *A. tortuosum* и *A. litvinovii in vitro*, эти виды проявляли высокую устойчивость к избытку ионов никеля. Добавление в среду культивирования 200 мкМ NiSO_4 не оказывало на них существенного влияния: они сохраняли окраску, активно росли, не отличаясь размерами от контрольных растений, выращенных на среде МС без добавления этого металла. Таким образом, растения бурачка проявляли устойчивость к избытку никеля в среде, но не были устойчивы к высоким дозам ионов меди.

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

- 1) в результате клеточной селекции получены растения *T. repens*, устойчивые к высокой концентрации ионов меди в среде. В нормальных условиях они отставали в росте от исходной линии, однако в стрессовых их рост не подавлялся, тогда как у исходных форм был существенно снижен;
- 2) устойчивость селекционных линий клевера подтверждена, при изучении маркеров окислительного стресса – растения обладали более высокой активностью СОД и сниженным уровнем ПОЛ в условия стресса, по сравнению с генотипами, не подверженными селекции;
- 3) ионы никеля в концентрации 100 и 200 мкМ не оказывали токсического действия на растения рода *Allyssum*, что подтверждает их устойчивость к этому металлу;
- 4) ионы меди в концентрации 100 и 200 мкМ оказались высокотоксичными для растений бурачка. Присутствие в среде культивирования 100 мкМ Cu^{2+} достоверно снижало рост и вызывало гибель некоторых генотипов. Концентрация 200 мкМ Cu^{2+} блокировала рост и вызывала гибель больше половины генотипов.

- 5) *Alyssum litvinovii* более чувствителен к избытку ионов меди и никеля, чем *Alyssum tortuosum*. Возможно, этот факт является причиной его ограниченного распространения.

Авторы выражают благодарность к.б.н., доц. Малева М.Г. за редактирование, замечания и помощь в подготовке финального текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ермошин А.А., Киселева И.С. Клеточная селекция клевера ползучего на устойчивость к ионам меди // Матер. Всеросс. конф. Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты. Судак, 2017. С. 164.
2. Князев М.С. Заметки о некоторых видах крестоцветных (Brassicaceae) на Урале и сопредельных территориях // Новости систематики высших растений. 2011. Т. 42. С. 136–146.
3. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Книжный дом Университет, 2007. – 140 с.
4. Тептина А.Ю., Пауков А.Г., Морозова М.В. Аккумуляция Ni представителями семейства Brassicaceae на почвах ультраосновных пород Южного и Среднего Урала. Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2016. № 4. С. 110–117.
5. Altinözlü H., Karagoz A., Polat T., Unver I. Nickel hyperaccumulation by natural plants in Turkish serpentine soils // Turkish Journal of Botany. 2012. V. 36. P. 269–280. <https://doi.org/10.3906/bot-1101-10>
6. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Analytic. Biochem. 1971. V. 44. P. 276–286.
7. Borisova G., Chukina N., Maleva M., et al. Thiols as biomarkers of heavy metal tolerance in the aquatic macrophytes of Middle Urals, Russia // International Journal of Phytoremediation. 2016. V. 18. № 10. P. 1037–1045.
8. Brooks R.R., Radford C.C. Nickel accumulation by European species of the genus *Alyssum* // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 1978. V. 200. P. 217–224.
9. Ermoshin A., Shatunova S., Kiseleva I. White clover cell culture tolerance to copper ions // Journal of Biotechnology, 2015. V. 208. P. S115. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.362>
10. Fazlieva E.R., Kiseleva I.S., Zhuikova T.V. Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper // Russ. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. P. 333–338. <https://doi.org/10.1134/S1021443712030065>
11. Kumar A., Tripti, Maleva M., et al. Toxic metal(loid)s contamination and potential human health risk assessment in the vicinity of century-old copper smelter, Karabash, Russia // Environmental Geochemistry and Health. 2019. [Publishes on-line]. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00414-3>
12. Tepina A., Paukov A. Nickel accumulation by species of *Alyssum* and *Noccaea* (Brassicaceae) from ultramafic soils in the Urals, Russia // Australian Journal of Botany. 2015. V. 63 (2). P. 78–84. <https://doi.org/10.1071/BT14265>
13. Tripti, Kumar A., Maleva M., et al. Nickel and copper accumulation strategies in *Odontarrhena obovata* growing on copper smelter-influenced and non-influenced serpentine soils: a comparative field study // Environmental Geochemistry and Health. 2020. [Publishes on-line]. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00575-6>
14. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Analytic. Biochem. V. 86. P. 287–297.