

DOI: 10.15393/j2.art.2020.5562

УДК 57.085.23, 574.23

*Краткое сообщение*

## **Оценка устойчивости каллусных культур газонных трав к меди, кадмию и использование этих результатов в экологической биотехнологии**

**Гладков Евгений Александрович**

*кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН» (Российская Федерация), [gladkovu@mail.ru](mailto:gladkovu@mail.ru)*

**Гладкова Ольга Викторовна**

*старший преподаватель кафедры биотехнологии, Московский государственный машиностроительный университет (Российская Федерация), [olgav.gladkova@mail.ru](mailto:olgav.gladkova@mail.ru)*

*Получена: 17 декабря 2020 / Принята: 29 декабря 2020 / Опубликовано: 29 декабря 2020*

---

**Аннотация:** Оценка токсичности тяжёлых металлов в культуре клеток имеет важное значение в экологической фитобиотехнологии, т. к. позволяет оценить пределы толерантности клеток к этим токсикантам и использовать полученные данные при разработке схем клеточной селекции для получения растений, устойчивых к тяжёлым металлам. Целью работы являлась оценка фитотоксичности меди и кадмия для каллусных культур и растений газонных трав. Была показана более высокая степень токсичности кадмия по сравнению с медью для каллусов двух видов газонных трав. Значительная гибель каллусов наблюдалась при содержании меди 100—150 мг/л (в зависимости от вида газонных трав), кадмия 10 мг/л. Для растений показаны значительно меньшие различия в степени фитотоксичности кадмия и меди. Следовательно, при разработке биотехнологических подходов нужно учитывать очень высокий уровень токсичности кадмия для каллусов по сравнению с медью и использовать относительно невысокие концентрации этого токсиканта в первом пассаже на стадии культивирования.

**Ключевые слова:** газонные травы, тяжёлые металлы, медь, кадмий, биотехнология, каллус

---

DOI: 10.15393/j2.art.2020.5562

*Brief communication*

## **Evaluation of resistance calli cultures of lawn grass for copper, cadmium and use of these results in ecological biotechnology**

**Evgeny Gladkov**

*Ph. D., Senior Researcher, Federal State Budgetary Institution of Science «K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS» (Russian Federation), [gladkovu@mail.ru](mailto:gladkovu@mail.ru)*

**Olga Gladkova**

*Senior Lecturer, Department of Biotechnology, Moscow State University of Mechanical Engineering (Russian Federation), [olgav.gladkova@mail.ru](mailto:olgav.gladkova@mail.ru)*

*Received: 17 December 2020 / Accepted: 29 December 2020 / Published: 29 December 2020*

---

**Abstract:** Evaluation of the toxicity of heavy metals in cell culture is important in ecological phytobiotechnology. These studies allow us to estimate the limits of cell tolerance to these toxicants and to use the data obtained in the development of cell selection schemes for the production of plants resistant to heavy metals. The aim of the work was to assess the phytotoxicity of copper and cadmium for callus cultures of lawn grasses. A higher degree of toxicity of cadmium in comparison with that of copper for calli of lawn grasses was shown. Significant death of calli was observed at a copper content of 100-150 mg/l, cadmium 10 mg/l. Significantly smaller differences in the degree of phytotoxicity of cadmium and copper were shown for plants. When developing ecological biotechnological schemes for obtaining plants resistant to these toxicants, one must take into account a very high level of cadmium toxicity for cells, as compared with that of copper. It is desirable to use relatively low concentrations of cadmium in the first passage at the cultivation stage.

**Keywords:** lawn grasses, heavy metals, copper, cadmium, biotechnology, callus

---

## 1. Введение

В 1980-х гг. проводились исследования по влиянию тяжёлых металлов на культивируемые клетки растений на различных объектах — гаглопаппусе, табаке, рисе, дурмане и других объектах [1—3]. Особенно высокую токсичность для клеток продемонстрировал кадмий [1]. Исследования не утратили свою актуальность в настоящее время, оценена степень угнетения роста каллуса при добавлении в среду хлорида никеля, в процессе исследований разработан метод оценки толерантности яблони к этому токсиканту на клеточном уровне [4], ионы меди оказывали более сильное влияние на проростки редиса, чем на каллусную культуру [5]. В культуре *in vitro* каллусы клевера обладали большей устойчивостью к действию тяжёлых металлов, чем проростки растений *in vivo* [6]. Исследовано действие кадмия на суспензионные культуры *Coffea arabica* [7], оценена устойчивость к цинку клеточной культуры *Arabidopsis halleri* [8].

Оценка токсичности тяжёлых металлов в культуре клеток имеет важное значение в экологической фитобиотехнологии, т. к. позволяет оценить пределы толерантности клеток к этим токсикантам и использовать полученные данные при разработке схем клеточной селекции для получения растений, устойчивых к тяжёлым металлам (при оценке токсичности тяжёлых металлов для каллусов).

Целью работы являлась оценка фитотоксичности меди и кадмия для каллусных культур и растений газонных трав.

## 2. Материалы и методы

Главный объект исследования — газонная трава полевика побегоносная или побегообразующая (*Agrostis stolonifera* L.). Это многолетний низовой короткокорневищный злак, который имеет укореняющиеся надземные побеги. Одно растение полевицы побегоносной, разрастаясь, может занять несколько квадратных метров. Уже через 2 месяца может появиться сплошной, нежный, эффектный, зелёный ковёр.

Газон из полевицы побегоносной не нужно стричь часто, он выносит затенение и относительно газоустойчив. *Agrostis stolonifera* можно использовать для создания городских газонов. Данное растение имеет ряд преимуществ — вегетативно размножается за короткий срок, отсутствие необходимости частой стрижки, теневыносливость, возможность создания газона разного назначения только из полевицы побегоносной.

Второй объект исследования — овсяница красная (*Festuca rubra* L.). Этот низовой многолетний злак широко применяется во всех типах газонов. Овсяница долговечна, держится в травостое до 10 лет и более.

Первичный каллус получали из семян *Agrostis stolonifera* на модифицированной агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 3 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), содержание сахарозы составляло 30 г/л, гидролизата казеина — 500 мг/л, агар агара — 7 г/л. Для роста каллуса использовали среду МС с добавлением 1 мг/л 2,4-Д.

Первичный каллус овсяницы красной получали на той же среде, как и для полевицы побегообразующей.

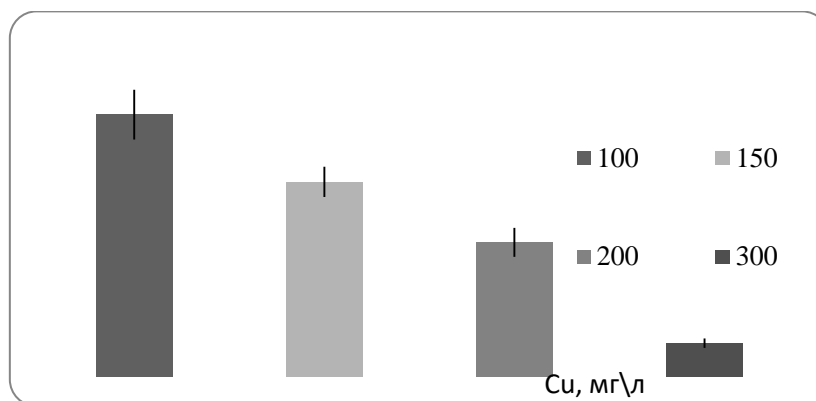
Для оценки фитотоксичности тяжёлых металлов в питательную среду добавляли соли тяжёлых металлов  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  [9],  $\text{Cd Cl}_2$  [10] (все концентрации в растворах соединений, во всех случаях указаны концентрации металла).

Определение чувствительности каллусных культур к меди и кадмию проводили по гибели каллусов после месяца культивирования на средах с разным содержанием этих тяжёлых металлов.

В почву для определения фитотоксичности тяжёлые металлы вносили в виде водного раствора, концентрацию рассчитывали по отношению к весу сухого грунта. В контрольных условиях растения выращивали в почве без токсиканта.

### 3. Результаты

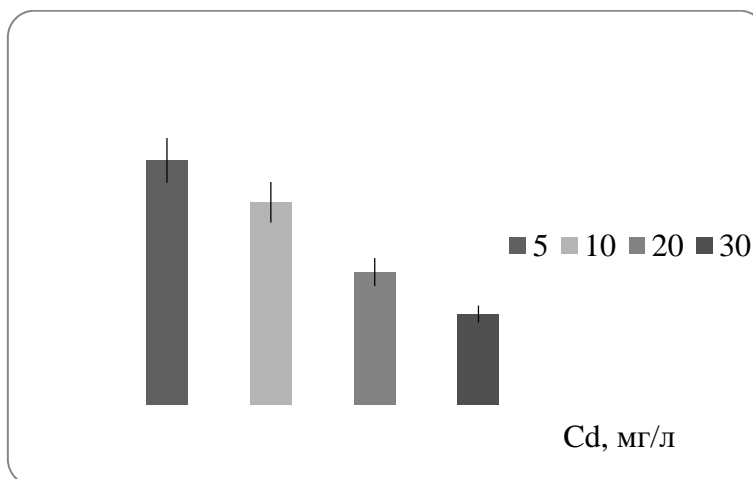
Медь оказывала существенное воздействие на каллусы полевицы побегоносной (рисунок 1). Значительная гибель каллусов наблюдалась при концентрации 150 мг/л. При концентрации 300 мг/л на каллус *Agrostis stolonifera* наблюдалась гибель большинства каллусов.



**Рисунок 1.** Влияние меди на жизнеспособность каллусов *Agrostis stolonifera*

**Figure 1.** The effect of copper on the viability of the calli of *Agrostis stolonifera*

Кадмий продемонстрировал очень высокую степень фитотоксичности, более высокую, чем медь, его влияние проявлялось при содержании 5 мг/л, а при концентрации 10 мг/л наблюдались не только гибель значительного количества каллусов, но и замедление прироста вдвое по сравнению с каллусами, растущими без этого тяжёлого металла (рисунок 2). Несмотря на отставание в росте, при концентрации 10 мг/л часть каллусов по цвету не отличалась от контроля, цвет светло-жёлтый.



**Рисунок 2.** Влияние кадмия на жизнеспособность каллусов *Agrostis stolonifera*

**Figure 2.** The effect of cadmium on the viability of the calli of *Agrostis stolonifera*

Потемнение каллусов происходило при содержании кадмия 20 мг/л через 3—4 недели, часть каллусов сохраняли жизнеспособность и светло-жёлтую окраску, однако прирост их был незначительный. Более сильное потемнение происходило при концентрации кадмия 30 мг/л через 14 дней, наблюдалась гибель большинства каллусов. Жизнеспособность каллусов была ещё ниже, если первичный каллус культивировали на среде МС для получения каллуса меньше месяца, а затем пересаживали на среду МС с кадмием.

Таким образом, была показана более высокая степень токсичности кадмия по сравнению с медью для клеток *Agrostis stolonifera*. Подобная тенденция наблюдалась для другого вида газонной травы — овсяницы красной. Однако каллусы овсяницы красной продемонстрировали бóльшую чувствительность к меди по сравнению с полевицей побегообразующей, жизнеспособными при содержании меди 100 мг/л оставались только 56 % каллусов, а при содержании меди 200 мг/л бóльшая часть каллусов овсяницы красной погибала в течение 10 дней.

Иная тенденция наблюдалась для растений полевицы побегообразующей. Ингибирование роста более 30 % наблюдалось на 28-й день при 40 мг/кг меди. При 30 мг/кг меди в почве растения полевицы побегообразующей сохраняли декоративные качества, отставание в росте составляло в пределах 20—25 %. У обоих видов газонных трав наблюдались сильное ингибирование роста, уменьшение всхожести, снижение декоративности и хлороз у некоторых растений при содержании меди 100—150 мг/кг (в зависимости от вида газонной травы). Существенное уменьшение роста полевицы побегообразующей в почве (рост побегов составлял 56 % от контроля) наблюдалось только при содержании кадмия 30 мг/кг.

Таким образом, растения в почвенных условиях продемонстрировали относительно сопоставимую чувствительность к меди и меньшую — к кадмию, чем каллусы на стадии культивирования.

#### 4. Обсуждение и заключение

Исходя из полученных данных, показаны относительная сопоставимость уровня фитотоксичности кадмия и меди для растений газонных трав и существенные различия для каллусных культур.

Следовательно, при разработке эковиотехнологических схем получения растений, устойчивых к этим токсикантам, принимая во внимание чувствительность клеток, нужно использовать разные концепции. При получении растений, устойчивых к кадмию, необходимо использовать относительно невысокие концентрации кадмия на стадии культивирования, а затем увеличивать содержание этого тяжёлого металла в следующих пассажах. При получении растений, устойчивых к меди, можно использовать относительно высокие концентрации меди уже на этапе культивирования. Эти концепции применимы и для других тяжёлых металлов [11].

#### Список литературы

1. Jackson P. J., Roth E. J., McClure P. R., Naranjo C. M. Selection, isolation and characterization of cadmium-resistant *Datura innoxia* suspension culture // Plant Physiology. 1984. Vol. 75. P. 914—918.
2. Huang B., Hatch E., Goldsbrough P. B. Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato // Plant Physiology. 1987. Vol. 52. P. 211—221.
3. Gilissen L. J. W., Van Staveren M. J. Zinc-resistant cell lines of *Haplopappus gracilis* // J. plant Physiology. 1986. Vol. 125. P. 95—103.
4. Евсеева Р. П. Оценка толерантности яблони к загрязнению среды никелем с использованием культуры микрочеренков *in vitro* // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2009. № 01. С. 14—18.
5. Егорова И. В., Лукаткин А. С., Духовскис П. В. Сравнительная оценка действия ионов меди на редис в культуре *in vitro* и *in vivo* // Вестник Мордовского университета. Серия: Биологические науки. 2010. № 1. С. 91—96.
6. Ермошин А. А., Киселева И. С. Клеточная селекция растений клевера и табака на устойчивость к высоким дозам меди: Заключительный отчёт о НИР. Екатеринбург: Урал. федер. ун-т, 2013. 21 с.
7. Gomes-Junior Rui A., Moldes Carlos A., Delite Fabricio S., Pompeu Georgia B., Gratão Priscila L., Mazzafera Paulo, Lea Peter J., Azevedo Ricardo A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium // Chemosphere. 2006. Vol. 65. P. 1330—1337.
8. Vera-Estrella R., Miranda-Vergara M. C., Barkla B. J. Zinc tolerance and accumulation in stable cell suspension cultures and *in vitro* regenerated plants of the emerging model plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) // Planta. 2009. Mar., no. 229(4). P. 977—986.
9. Гладков Е. А., Долгих Ю. И., Гладкова О. В. Использование клеточной селекции для получения толерантных к тяжёлым металлам газонных трав // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. № 4. С. 1258—1262.
10. Гладков Е. А., Долгих Ю. И., Гладкова О. В. Использование биотехнологических подходов для решения экологических проблем городского озеленения // Экология урбанизированных территорий. 2014. № 4. С. 56—58.
11. Gladkov E. A., Dolgikh Y. I., Gladkova O. V. Increasing ecological valence plants to lead // Ecology, Environment and Conservation. India. Enviro Media. 2016. № 1. P. 437—440.

## References

1. Jackson P. J., Roth E. J., McClure P. R., Naranjo C. M. Selection, isolation and characterization of cadmium-resistant *Datura innoxia* suspension culture. *Plant Physiology*, 1984, vol. 75, pp. 914—918.
2. Huang B., Hatch E., Goldsbrough P. B. Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. *Plant Physiology*, 1987, vol. 52, pp. 211—221.
3. Gilissen L. J. W., Van Staveren M. J. Zinc-resistant cell lines of *Haplopappus gracilis*. *J. plant Physiology*, 1986, vol. 125, pp. 95—103.
4. Evseeva P. P. Evaluation of apple tree tolerance to environmental pollution with nickel using microcut culture *in vitro*. *Bulletin of Michurin State Agrarian University*, 2009, no. 01, pp. 14—18. (In Russ.)
5. Egorova I. V., Lukatkin A. S., Dukhovskis P. V. Comparative assessment of the effect of copper ions on radishes in culture *in vitro* and *in vivo*. *Bulletin of Mordovia University. Series: Biological Sciences*. 2010, no. 1, pp. 91—96. (In Russ.)
6. Ermoshin A. A., Kiseleva I. S. *Cell breeding of clover and tobacco plants for resistance to high doses of copper: Final report on research*. Yekaterinburg: Ural. Feder. un-t, 2013. 21 p. (In Russ.)
7. Gomes-Junior Rui A., Moldes Carlos A., Delite Fabricio S., Pompeu Georgia B., Grato Priscila L., Mazzafera Paulo, Lea Peter J., Azevedo Ricardo A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 2006, vol. 65, pp. 1330—1337.
8. Vera-Estrella R., Miranda-Vergara M. C., Barkla B. J. Zinc tolerance and accumulation in stable cell suspension cultures and *in vitro* regenerated plants of the emerging model plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Planta*, 2009, Mar., no. 229(4), pp. 977—986.
9. Gladkov E. A., Dolgikh Yu. I., Gladkova O. V. The use of cell selection to obtain heavy metal tolerant lawn grasses. *Izvestia of samara scientific center of the Russian academy of sciences*, 2013, no. 4, pp. 1258—1262. (In Russ.)
10. Gladkov E. A., Dolgikh Yu. I., Gladkova O. V. Using biotechnological approaches to solve environmental problems of urban greening. *Ecology of urbanized areas*, 2014, no. 4, pp. 56—58. (In Russ.)
11. Gladkov E. A., Dolgikh Y. I., Gladkova O. V. Increasing ecological valence plants to lead. *Ecology, Environment and Conservation. India. Enviro Media*, 2016, no. 1, pp. 437—440.