

УДК 631.527:633.52:661.665.2

ВОЗДЕЙСТВИЕ КАДМИЯ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА В УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO

Е. А. ГОНЧАРУК, Е. А. КАЛАШНИКОВА, В. С. ШЕВЕЛУХА

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

Эксперимент проводился при внесении кадмия в почву 15 мг/кг. Также был проведен опыт с растениями льна-долгунца в условиях *in vitro* в присутствии различных концентраций кадмия в питательной среде. Установлено, что кадмий угнетает рост и развитие растений всех исследуемых генотипов льна-долгунца в различных условиях выращивания, что выражалось в соответствующих изменениях проанализированных морфофизиологических показателей. Присутствие кадмия в почве вызывало ускорение прохождения всех онтогенетических фаз развития растениями льна-долгунца, следующих за фазой «елочка». Приводятся данные об изменении мезоструктуры стебля льна-долгунца при воздействии кадмия.

В последние годы уделяется особое внимание проблеме загрязнения окружающей природной среды тяжелыми металлами. В связи с увеличением масштабности техногенного загрязнения окружающей среды ряд тяжелых металлов включен в международные списки загрязняющих веществ, подлежащих

контролю. Изучение кадмия в качестве стрессового фактора обосновано тем, что этот элемент относится к первому классу опасности по классификации химических веществ, попадающих в почву из выбросов, сбросов, отходов [2], а также является одним из наиболее распространенных элементов загрязнения,

избыточное количество которого поступает в окружающую среду со сточными водами в результате техногенного загрязнения [2, 4]. Таким образом, почвы в Нечерноземной зоне в значительной степени накапливают кадмий в концентрациях, превышающих ПДК.

Установление закономерностей состояния и поведения тяжелых металлов в окружающей среде — актуальная задача на сегодняшний день, определяющая разработку приемов снижения поступления данных элементов в окружающую среду и, как следствие, в растительную продукцию, потребляемую человеком. Металлы, присутствуя в организме в малых концентрациях, входят в состав биологически активных веществ [4]. Соотношение концентраций металлов в организмах устанавливалось на протяжении эволюции органического мира и отклонения от этих соотношений определяют отрицательные последствия для живых организмов [1, 2, 4]. В современных условиях количество тяжелых металлов в почвах и водах техногенных ландшафтов на несколько порядков превышает фоновые природные концентрации [4, 5].

Мероприятия по устранению вредного действия тяжелых металлов сводятся к

предотвращению загрязнения окружающей среды в процессе производства, удалению загрязненного горизонта почвы, внесению в почву химических веществ, способствующих связыванию тяжелых металлов и превращению их в недоступные для растений соединения [3, 6]. Наряду с данными приемами выделяется наиболее перспективное направление по созданию растений, естественно устойчивых к высокому содержанию в почве тяжелых металлов, с помощью методов селекции.

Привлечение методов биотехнологии способствует расширению приемов, способствующих увеличению генетического разнообразия растений, что помогает решить проблему получения растений, устойчивых к различным экологическим факторам. В связи с этой целью данной работы было изучено развитие растений льна-долгунца в стрессовых условиях *in vivo* и *in vitro*, а также провести клеточную селекцию и отобрать устойчивые к кадмию каллусные клетки.

Методика

Эксперименты проводили с 10 сортами льна — ВНИИ Ji-II, К-6, Лазурный, Торжокский 4, Псковский 359, Спар-

так, Бахмальский, Призыв 81, Тверца, дикий лен. Для получения стерильных проростков семена стерилизовали 0,1% раствором сулемы в течение 10—12 мин, промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды, после чего их помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) без регуляторов роста. Последующую работу проводили на сегментах гипокотилей, изолированных с 5—15-дневных проростков.

Для получения первичной и пересадочной каллусной ткани использовали модифицированную питательную среду МС, содержащую 2% сахарозы, а также гормоны ауксинового и цитокининового действия. Было изучено влияние 2,4-Д в концентрациях 0,5; 1; 2 мг/л и НУК — 1 мг/л на процесс каллусогенеза и сочетания Б АП 1 мг/л и НУК 0,1 мг/л на процесс морфогенеза каллусной ткани.

Пересадку каллусной ткани осуществляли один раз в месяц, при этом учитывали следующие показатели: интенсивность роста каллуса, его консистенция, формирование морфогенных структур.

Стерильные проростки и каллусную ткань выращивали в световой комнате, где поддерживалась температу-

ра $25+(-1)^{\circ}$ С, 70% относительная влажность воздуха, 24-часовое освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 3000 лк.

Клеточную селекцию проводили на каллусной ткани, которую культивировали на модифицированной питательной среде МС, содержащей соль кадмия в 4 концентрациях — 5, 15, 25, 35 мг/л (по элементу) и 2,4-Д в установленной ранее оптимальной концентрации 1 мг/л. Каллусную ткань разных вариантов пересаживали 1 раз в месяц, учитывая при этом цвет, плотность и консистенцию ткани.

Лабораторные исследования проводили на 4 генотипах льна. Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водным раствором с добавлением кадмия в концентрациях 5, 15, 25, 35 мг/л. В течение 7 дней фильтровальную бумагу смачивали приготовленными растворами с соответствующими концентрациями кадмия. По истечении 7 дней у опытных растений измеряли длину и массу стеблевой и корневой частей.

Для проведения микроструктурного анализа стеблей льна, выращенных в стрессовых условиях, был заложен вегетационный опыт.

Растения выращивали в пластиковых сосудах, вмещающих 5 кг воздушно-сухой дерново-подзолистой легко-суглинистой почвы. Кадмий вносили при набивке сосудов в виде нитрата кадмия по 15 мг/кг. Эксперимент был проведен на сортах Псковский и Спартак. Образцы для исследований отбирали из средней части стебля в онтогенетическую фазу быстрого роста. При этом в дальнейшем просматривали волокна, лежащие на периферии волокнистых пучков.

Результаты

В первой части эксперимента установлено, что разные генотипы льна формируют морфологически разные стерильные проростки. Семена сортов ВНИИЛ-11, Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Призыв 81 в течение 7 дней формировали на безгормональной питательной среде нормальные по морфологии проростки. Остальные генотипы образовывали слабые проростки с физиологическими нарушениями.

Было также установлено, что возраст проростков влияет на процесс формирования первичной и пересадочной каллусной ткани. Так, сегменты гипокотилей, взятые от 5—7-дневных проростков,

в 100% случаев образовывали ярко-желтый среднетплотный каллус, который можно было использовать в дальнейшей работе. У 10—15-дневных проростков каллусная ткань не образовывалась. Поэтому в последующих экспериментах в качестве первичного экспланта использовали сегменты гипокотилей, изолированные с 5—7-дневных проростков.

В ходе эксперимента наблюдалось развитие внутритканевой инфекции, поэтому в питательную среду непосредственно перед посадкой растительного материала вводили антибиотик (бензилпенициллин) в концентрации 100 мг/л.

При изучении действия различных концентраций 2,4-Д на каллусогенез было установлено, что этот процесс зависит не только от концентрации используемого гормона, но и от изучаемого генотипа. Так, изолированные сегменты гипокотилей сортов К-6, Лазурный, Бахмальский, Тверца во всех изучаемых вариантах не были способны формировать первичный каллус, в то время как сорта ВНИИЛ-11, Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Призыв 81 образовывали хорошо пролиферирующую каллусную ткань, которую можно было использовать в последующих экспериментах.

Исходя из того, что на первых этапах культивирования семян и сегментов гипокотилей проростков была выявлена зависимость морфогенетического процесса от исходного генотипа, то последующие эксперименты были

проведены лишь на 5 сортах (ВНИИЛ-11, Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Призыв 81), которые обладали постоянной, повышенной морфогенетической активностью в условиях *in vitro* (рис. 1, 2).



Рис. 1. Регенерация из каллусных клеток.

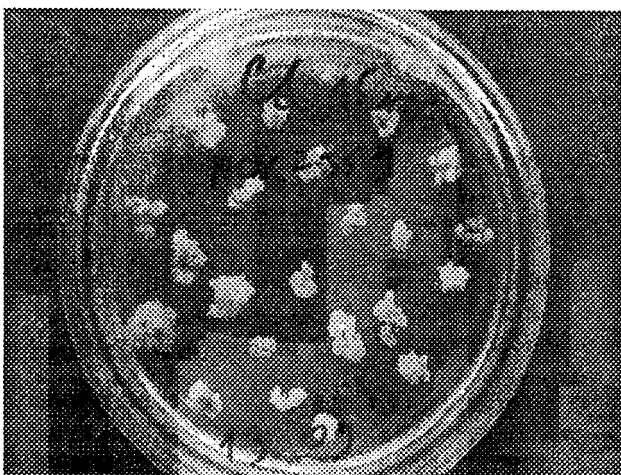


Рис. 2. Каллусные клетки с морфогенными очагами.

Помимо зависимости формирования каллусной ткани от исследуемого генотипа, особое место при этом также отводится и составу питательной среды, в частности ауксинам и их концентрациям. В наших экспериментах оптимальная концентрация 2,4-Д составила 1 мг/л. В этих условиях формировался каллус светло-желтого цвета средней плотности. Наиболее интенсивно этот процесс происходил у сорта Спартак, причем образуемый каллус имел высокую плотность и на его поверхности были заметны меристематические очаги зеленого цвета. Одновременно с изучением влияния 2,4-Д на каллусогенез изучали действие НУК в концентрации 1 мг/л на этот процесс. Было установлено, что добавление в питательную среду этого гормона приводило к формированию каллусной ткани с одновременной активизацией процесса ризогенеза у растительных тканей. Так, наиболее высокая интенсивность процесса наблюдалась у сортов Торжокский 4 и Псковский 359, что, видимо, связано с сортовыми особенностями данных генотипов.

Таким образом, экспериментальным путем было установлено, что для индуцирования каллусогенеза из изолированных сегментов

гипокотилей 7-дневных проростков льна наиболее эффективно использовать 2,4-Д, так как процесс ризогенеза, вызываемый у растений применением гормона НУК на этапе формирования каллусной ткани, нежелателен для дальнейших исследований. Поэтому полученный первичный каллус был перенесен для дальнейшего культивирования на питательную среду МС, содержащую 2,4-Д 1 мг/л.

В ходе второго этапа эксперимента кадмий в различных концентрациях по-разному влиял на рост и развитие полученной каллусной ткани. При введении в питательную среду кадмия в концентрации 5 мг/л видимых изменений в развитии каллусной ткани не наблюдалось. Каллус был желтого цвета, имел плотную консистенцию. Нарастание массы каллуса происходило на 30% менее активно, чем в контроле. Использование концентрации 15 мг/л приводило к 50% гибели материала, при этом оставшийся каллус был желтого или кремоватого цвета, нарастание каллусной ткани происходило на 50% менее активно, чем в контроле. Использование концентрации кадмия 25 и 35 мг/л приводило к некролизации и отмиранию каллусной ткани. При построении дозовой кривой опреде-

лилась концентрация 15 мг/л, при которой проводится последующая селекция. В процессе селекции было также выявлено, что генотип определяет возможность проведения отбора на устойчивость к тяжелому металлу. Так, каллусная ткань, полученная из сегментов гипокотилей

растений сортов ВНИИЛ-11, Торжокский 4, Призыв 81, угнеталась более чем на 70% по сравнению с контролем при внесении кадмия в питательную среду, поэтому эксперименты по селекции были заложены с сортами Спартак и Псковский 359 (рис. 3).

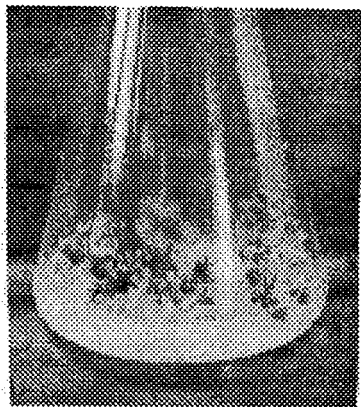


Рис. 3. Растения льна-долгунца, выращенные в условиях *in vitro* в различных вариантах внесения кадмия в питательную среду.

Наряду с экспериментами *in vitro* были проведены лабораторные исследования, в которых изучалось влияние различных концентраций кадмия на рост и развитие проростков 5 генотипов льна. Анализ полученных результатов (таблица) показывает, что независимо от исследуемого генотипа наблюдается снижение всех учитываемых

показателей в опытном варианте по сравнению с контролем. Причем существует обратная зависимость в развитии растений от используемой концентрации кадмия в субстрате. Так, с увеличением концентрации кадмия от 15 до 35 мг/л уменьшается длина стебля в среднем на 0,5—1,5 см, длина корня — на 1,0—3,5 см, масса стеб-

Биометрические показатели проростков льна при внесении различных концентраций кадмия в водный раствор

Сорт	Концентрация кадмия, мг/л	Средняя масса стеблей, г	Средняя масса корней, г	Средняя длина стебля, см	Средняя длина корня, см
ВНИИЛ-11	0	0,66±0,03	0,22±0,01	2,2±0,1	2,5±0,1
	15	0,57±0,03	0,38±0,02	1,9±0,2	2,9±0,1
	25	0,90±0,05	0,29±0,01	1,6±0,1	2,2±0,1
	35	0,73±0,04	0,17±0,01	1,4±0,1	1,6±0,1
Псковский 359	0	1,04±0,05	0,32±0,01	1,8±0,1	4,3±0,2
	15	1,05±0,05	0,31±0,02	2,2±0,1	3,6±0,2
	25	0,84±0,03	0,19±0,01	1,4±0,1	2,2±0,1
	35	0,81±0,04	0,24±0,01	1,3±0,1	1,7±0,1
Смоленский	0	1,41±0,07	0,46±0,02	1,7±0,1	2,8±0,1
	15	1,02±0,03	0,33±0,02	1,0±0,1	2,2±0,1
	25	0,70±0,03	0,17±0,01	0,7±0,1	1,2±0,1
	35	0,58±0,02	0,15±0,01	0,5±0,1	0,8±0,1
Торжокский 4	0	1,08±0,04	0,36±0,01	1,9±0,1	3,5±0,2
	15	1,07±0,03	0,25±0,01	1,1±0,1	2,4±0,1
	25	0,84±0,03	0,29±0,01	1,1±0,1	1,5±0,1
	35	1,03±0,04	0,23±0,01	1,2±0,1	0,5±0,1
Спартак	0	1,48±0,06	0,61±0,03	2,1±0,1	4,1±0,2
	15	1,19±0,04	0,34±0,01	1,6±0,1	3,0±0,2
	25	0,68±0,03	0,15±0,01	1,0±0,1	1,0±0,1
	35	0,49±0,02	0,10±0,01	0,7±0,1	0,5±0,1

ля — на 0,1—1,0 г, масса корня — на 0,1—0,5 г. Исключение составляет лишь сорт ВНИИЛ-11, у которого в вариантах с внесением кадмия в концентрации 25 и 35 мг/л средняя масса стеблей и корней выше контроля на 10—36% при общей тенденции к снижению роста надземной и подземной частей проростков. Увеличение массы стеблей, особенно корней, в этом варианте можно объяснить тем, что при избытке кадмия

в растворе нарушаются морфофизиологические процессы, которые в первую очередь проявились в изменении морфологии корней. Корни в этих вариантах были сильно утолщенные, вероятно, за счет появления оводненных клеток.

Таким образом, экспериментально установлено, что и в вегетационном, и в лабораторном опытах кадмий ингибировал ростовые процессы, причем у проростков, полу-

ченных в лабораторном опыте, снижался прирост как стеблевой, так и корневой частей растений. В вегетационных опытах имели место и морфологические различия между растениями опытного и контрольного вариантов. Помимо изменений в развитии стебля, выражающихся в замедлении роста растений и образовании боковых побегов в вариантах с внесением кадмия, было отмечено более раннее прохождение онтогенетических фаз развития в данном варианте по сравнению с контролем.

Результаты вегетационного опыта показали, что внесение кадмия в концентрации 15 мг/кг влияло на морфогенетические

характеристики растений обоих испытываемых генотипов. Проводились визуальные наблюдения за растениями в течение вегетационного опыта, в результате которых установлено, что растения испытываемых вариантов по сравнению с контрольными быстрее проходили все фазы онтогенеза, что, вероятно, является реакцией на введение в почву стрессового фактора (рис. 4).

В процессе вегетации установлены физиологические различия между вариантами, которые выражались в образовании боковых побегов у растений, выращиваемых на почве с внесением кадмия, тогда как у контрольных



Рис. 4. Растения льна-долгунца, выращенные в условиях вегетационного опыта в различных вариантах.

растений наблюдалось преобладание линейного роста стебля. Длина стеблей растений, выращиваемых при внесении тяжелого металла, колебалась от 60 до 63 см, что было меньше длины контрольных растений на 10%.

Проведение микроструктурного анализа стеблей льна показало, что анатомическое строение стебля обоих исследуемых генотипов значительно изменяется в вариантах с применением кадмия. Так, в контрольном варианте у исследуемых генотипов сосудисто-волокнистые пучки находились в стадии формирования, имели аморфные оболочки со слабой дифференциацией на группы отдельных клеток, при этом форма самих возникающих пучков близка к тангентальной или овальной. В вариантах с внесением металла волокнистые пучки были практически сформированы, но имели полиморфную форму, неровные края. Данное различие в стадии образования волокнистых пучков может быть обосновано стремлением растений при действии стрессового фактора быстрее «пройти» все фазы онтогенеза и достигнуть созревания, изменение же формы самих пучков до полиморфной скорее всего вызвано действием стрессового фактора.

Клетки элементарных волоконцев, хорошо различимые в лубяных пучках растений вариантов с применением кадмия, отличались большой неравномерностью в поперечных размерах в пределах одного волокнистого пучка, что является косвенным показателем небольшой длины элементарных волокон, т. е. более низкого качества волокна. Эти клетки также имели неправильную форму, что указывает на определенные аномалии в анатомическом развитии стеблевой части растений под влиянием тяжелого металла.

Выводы

1. Интенсивный каллусогенез у всех испытуемых сортов льна наблюдается при введении в питательную среду гормона 2,4-Д в концентрации 1 мг/л.
2. Внесение кадмия в почву ускоряет прохождение растениями льна всех фаз онтогенеза на неделю и тормозит их линейный рост, стимулируя образование боковых побегов.
3. Под влиянием кадмия клетки элементарных волокон стебля льна исследуемых генотипов имеют разные размеры и неправильную форму, образуя полиморфные волокнистые пучки, что кос-

венно отрицательно сказывается на качестве волокна и меняет анатомическую структуру стебля.

4. У растений всех исследуемых генотипов льна-долгунца при возрастании концентрации кадмия в водном растворе наблюдается тенденция к угнетению развития, выражающееся в снижении массы стеблей и корней и в уменьшении длины последних относительно контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеева-Попова Н. В.* Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. Л.: 1991. — 2. *Артюшин А. М.* Методические указания по определению тяже-

лых металлов в почвах сельскохозяйственных и продукции растениеводства. М.: 1992. — 3. *Байдина Н. Л.* К использованию цеолитов в качестве поглотителей тяжелых металлов в техногенно загрязненной почве. — Сиб. биол. ж., 1991, № 6, с. 32—35. — 4. *Добровольский В. В.* Тяжелые металлы в окружающей среде. МГУ, 1980. — 5. *Кабата-Пендиас А., Пендиас Х.* Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. — 6. *Праздников С. С.* Способы рекультивации загрязненных почв. — Совершенствование методологии агрохимических исследований. 1997, МГУ, с. 173—177.

*Статья поступила
7 марта 2000 г.*

SUMMARY

The experiment was conducted on the soil addition of cadmium in concentration 15 mg/l. Also the experiment was conducted on the nutrition solution in cadmium presence. As was founded plants of all varieties in different growth conditions were depressed by cadmium. Present of cadmium in the soil caused acceleration of ontogenetic phases. The structure of flax stem was studied in cadmium presence.