

УДК 57.02: 58.04

**РОСТ РАСТЕНИЙ АНТАРКТИКИ *COLOBANTHUS QUITENSIS* И  
*WARNSTORFIA FONTINALIOPSIS* В ПРИСУТСТВИИ ШЕСТИВАЛЕНТОГО  
ХРОМА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

**Н.А.Матвеева, В.П. Дуплий**

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
03680, Киев-143, ул. Заболотного 148  
joyna56@gmail.com*

**Реферат.** Изучены особенности роста двух растений Антарктики – *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl и *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochuga в культуре *in vitro* в присутствии  $K_2CrO_4$ . Показано, что при концентрации хрома(VI) до 100 мг/л изменение длины стеблей *W. fontinaliopsis* практически не отличается от такового в контроле. Увеличение содержания Cr(VI) в питательной среде до 150 мг/л приводило к ингибированию роста и существенному уменьшению прироста биомассы как сосудистого растения, так и мха. Хотя динамика снижения относительного прироста массы каллуса при повышении концентрации хрома в среде у *C. quitensis* была сходна с таковой у *N. tabacum*, для колобантуса различия статистически достоверны уже при 10 мг/л хрома(VI), тогда как для табака – только начиная со 100 мг/л. Это позволяет говорить о более высокой чувствительности колобантуса к токсичному металлу. При содержании Cr(VI) в среде в концентрации 150 мг/л относительный прирост массы каллуса колобантуса был в 56,4 раза меньше, чем в контроле, а табака – в 20,5 раза и составлял в среднем 0,09 и 0,33 г на 1 г исходной массы соответственно.

**Ключевые слова:** *Colobanthus quitensis*, *Warnstorfia fontinaliopsis*, *in vitro*,  $K_2CrO_4$

**Реферат.** Вивчено особливості росту двох рослин Антарктики – *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. та *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochuga в культурі *in vitro* у присутності  $K_2CrO_4$ . Показано, що при концентрації хрому(VI) до 100 мг/л зміна довжини стебел *W. fontinaliopsis* практично не відрізняється від такої в контролі. Збільшення вмісту Cr(VI) у живильному середовищі до 150 мг/л призводило до пригнічення росту та істотного зменшення приросту біомаси як судинної рослини, так і моху. Проведено порівняння росту *C. quitensis* з динамікою росту калусної тканини *Nicotiana tabacum* у присутності Cr(VI). Хоча динаміка зниження відносного приросту маси калусу при підвищенні концентрації хрому у середовищі для *C. quitensis* була подібна до такої у *N. tabacum*, виявлені для колобантуса відмінності статистично достовірні уже при 10 мг/л хрому(VI), тоді як для тютюну – тільки починаючи з 100 мг/л. Це є свідченням більшої чуливості колобантусу до токсичного металу. При вмісті Cr(VI) 150 мг/л відносний приріст маси калусу колобантусу був у 56,4 раза менший, ніж у контролі, а тютюну – в 20,5 раза та становив відповідно в середньому 0,09 та 0,33 г на 1 г вихідної маси.

**Ключові слова:** *Colobanthus quitensis*, *Warnstorfia fontinaliopsis*, *in vitro*,  $K_2CrO_4$

**Abstract.** Influence of  $K_2CrO_4$  on the growth of two Antarctic plants – *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl and *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochuga *in vitro* culture has been studied. Under the Cr(VI) treatment at concentration from 10 to 100 mg/l the shoot length augmentation of *W. fontinaliopsis* did not differ from the augmentation in control. The increase in Cr(VI) concentration in

a nutrient medium to 150 mg/l led to inhibition of growth and essential reduction of a biomass augmentation both vascular plant and moss. There were statistically authentic distinctions in relative callus weight augmentation of *C. guitensis* and *N. tabacum* on the medium supplemented with 10 or 100 mg/l of Cr(VI) respectively. So *C. guitensis* is more sensitive to toxic metal than *N. tabacum*. Under the 150 mg/l Cr(VI) the *C. guitensis* and *N. tabacum* relative callus weight augmentations were respectively in 56,4 and 20,5 times less than in control (0,09 and 0,33 g per 1 g initial weight).

**Key words:** *Colobanthus guitensis*, *Warnstorfia fontinaliopsis*, *in vitro*,  $K_2CrO_4$

## 1. Введение

Рост и развитие растений зависят от влияния факторов окружающей среды. К таким факторам относятся природные: температура, увлажненность почвы, наличие макро- и микроэлементов, уровень освещенности. Кроме того, на рост растений влияют также факторы антропогенного происхождения, в том числе загрязненность почвы токсичными металлами.

Токсичные металлы действуют как непосредственно, так и опосредованно, путем активизации свободно-радикального окисления и развития оксидативного стресса. Одним из наиболее токсичных металлов является хром. Для большинства растений его содержание в тканях в количестве 100 мкг/кг сухого веса является токсичным (Davies et al., 2002). Хотя специальные транспортные системы попадания хрома в растительные клетки отсутствуют, этот процесс происходит благодаря механизмам, которые используются клетками для транспорта жизненно необходимых элементов и соединений, в частности, железа и сульфатов (Cervantes et al., 2001; Wallace et al., 1976).

Токсичное действие хрома проявляется в уменьшении длины и массы корней, увеличении их диаметра, уменьшении количества листьев, их площади и массы, нарушении сроков цветения и созревания семян (Rout et al., 2000; Jain et al., 2000; Panda et al., 2000; Suseela et al., 2002; Mei et al., 2002; Shanker et al., 2005).

Изучение механизмов действия токсичных металлов на растения и конструирование суперустойчивых к металлам растений представляет интерес, т.к. такие растения могут быть использованы для биоремедиации загрязненных территорий, см. диаграмму:



Антарктика – единственный на Земле «чистый» континент, на котором отсутствует прямое антропогенное загрязнение (промышленные предприятия, сельское хозяйство, бытовые отходы). Содержание хрома в почве островов внутреннего шельфа Антарктического полуострова невелико и составляет 0,4...2,25 мг/кг (аналитическое определение выполнено Ю.П. Копытовым, Институт биологии южных морей НАНУ). Таким образом, там отсутствуют

как природные, так и антропогенные факторы, которые могут направить отбор растений в сторону повышенной устойчивости к токсичному хрому. Вместе с тем в почве ряда островов обнаружены микроорганизмы, которые растут при концентрации хрома(VI), приближающейся к одномолярной (Таширев и др., 2007.). Поэтому представляет интерес изучение особенностей роста неадаптированных растений Антарктики в условиях повышенного содержания хрома. Проведение экспериментов в условиях *in vitro* дает возможность стандартизировать условия и исключить потенциальное участие почвенных микроорганизмов в детоксикации хрома.

## 2. Материалы и методы

Для исследований использовали растения *Colobanthus quitensis* и *Warnstorfia fontinaliopsis* из нативных образцов, собранных в 2010 г. на биогеографическом полигоне о. Галиндез, а также растения *Nicotiana tabacum* из коллекции растений Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины.

Для введения в асептическую культуру экспланты (части стеблей) стерилизовали 30 сек. в 70% этаноле, одну или 5 мин. (соответственно для *W. fontinaliopsis* и *C. quitensis*) в 20% растворе препарата «Белизна», трижды по 5 мин. промывали стерильной дистиллированной водой и культивировали на агаризованной среде 1/2МС (Murashige, Skoog, 1962) при температуре 24 °С и 16-часовом фотопериоде.

Рост каллусной ткани индуцировали на среде 1/2МС+ (среда МС с добавлением 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D), 0,5 мг/л кинетина, 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК).

В эксперименте растения *W. fontinaliopsis*, а также каллусную ткань *C. quitensis* и *N. tabacum* культивировали на средах 1/2МС (растения) и 1/2 МС+ (каллус) с добавлением  $K_2CrO_4$  в концентрациях, в пересчете на Cr(VI), 10, 25, 50, 100, 150 мг/л.

Массу каллусной ткани *C. quitensis* и *N. tabacum* взвешивали до начала эксперимента и через 30 сут. роста на средах с Cr(VI). Рост *W. fontinaliopsis* определяли путем измерения длины растений через 30 суток (исходная длина составляла 10 мм).

Относительный прирост массы определяли как отношение прироста массы каллуса через 30 сут. к его начальной массе.

Эксперименты проводили в трех повторностях, для статистической обработки данных использовали стандартную методику (Лакин, 1990).

Качественное определение присутствия Cr(VI) проводили с использованием дифенилкарбозид (ДФК) (Лаврухина, 1979). 0,5 мл конц.  $H_2SO_4$  наливали на питательную среду и добавляли 0,5 мл 0,5% раствора ДФК в спирте. Присутствие Cr(VI) определяли по появлению красного окрашивания среды.

## 3. Результаты исследований

Изучение роста растений *W. fontinaliopsis* показало, что добавление в питательную среду Cr(VI) в концентрации до 75 мг/л не приводило к достоверным отличиям прироста длины растений по сравнению с контролем (рис. 1).

Дальнейшее увеличение концентрации хрома(VI) до 100 и 150 мг/л ингибировало рост растений, что определялось по уменьшению прироста длины побегов в 2,5 раза по сравнению с контролем.

Статистически значимое уменьшение прироста массы каллусной ткани *C. quitensis* наблюдалось при содержании Cr(VI) в средах для культивирования начиная с 25 мг/л – соответственно на средах с 25, 50 и 75 мг/л в 1,44, 1,77 и 1,77 раза меньше, чем в контроле. При

концентрации Cr(VI) 100 мг/л прирост биомассы был в 3,2 раза меньше, чем в контроле, а при 50 мг/л – в 38,9 раза (рис. 2).

Значения прироста биомассы каллусной ткани *N. tabacum* при культивировании на средах, содержащих Cr(VI) в концентрациях 0...100 мг/л, находились в пределах погрешности эксперимента. В то же время увеличение концентрации до 150 мг/л уменьшало показатели прироста массы каллусной ткани по сравнению с контролем в 17,6 раза (рис. 3).

Поскольку исходные массы каллусной ткани в проводимых экспериментах отличались, представляло интерес сравнить относительный прирост массы, т.е. отношение прироста биомассы, к исходной массе ткани, т.к. именно этот показатель может выявить потенциальную способность роста и адаптации к действию токсичного металла.

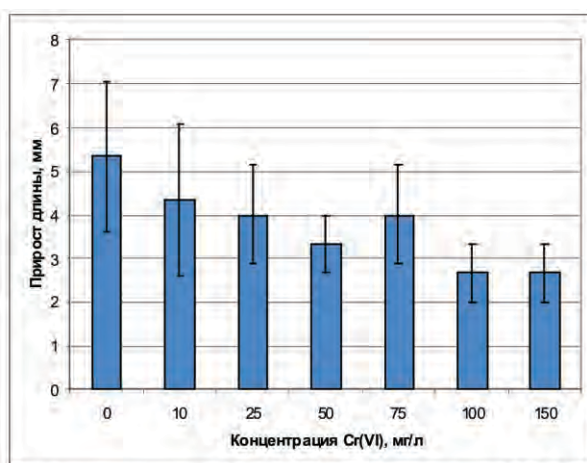


Рис. 1. Прирост длины растений *W. fontinaliopsis* на среде с Cr(VI) в концентрации 10...150 мг/л.

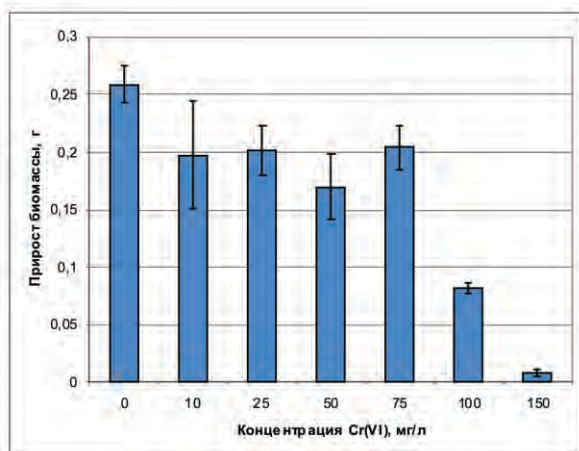


Рис. 2. Прирост массы каллусной ткани *C. quitensis* на среде с Cr(VI) в концентрации 10...150 мг/л.

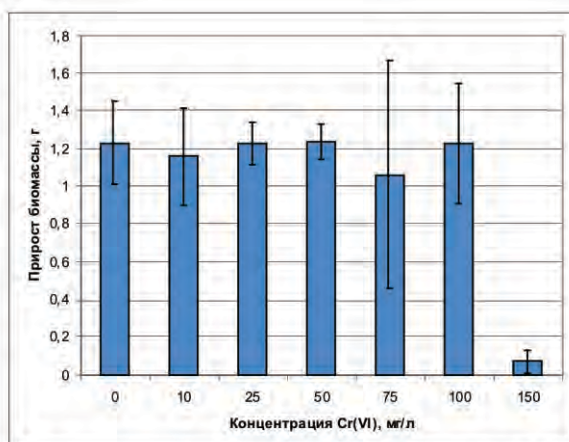


Рис. 3. Прирост массы каллусной ткани *N. tabacum* на среде с Cr(VI) в концентрации 10...150 мг/л.

Относительный прирост биомассы у колобантуса (рис. 4) в контроле оказался в 1,4 раза ниже, чем у табака (рис. 5). Это может быть обусловлено особенностями биологии растения, растущего в достаточно суровых условиях Антарктики и имеющего замедленный рост. Хотя динамика снижения относительного прироста массы каллуса при повышении концентрации хрома в среде у *C. guitensis* была сходна с таковой у *N. tabacum*, для колобантуса различия становятся статистически достоверными уже при 10 мг/л хрома(VI), тогда как для табака – только начиная с 100 мг/л. Это позволяет говорить о более высокой чувствительности колобантуса к токсичному металлу. При содержании Cr(VI) в среде в концентрации 150 мг/л относительный прирост массы каллуса колобантуса был в 56,4 раза меньше, чем в контроле, а табака – только в 20,5 раза и составлял в среднем 0,09 и 0,33 г на 1 г исходной массы соответственно.

Такое явление, возможно, объясняется тем, что колобантус растет в Антарктике при отсутствии прессинга высоких концентраций хрома, в то время как табак – культивируемое растение, выращиваемое на почвах, которые могут быть загрязнены токсичными металлами и др. ксенобиотиками.

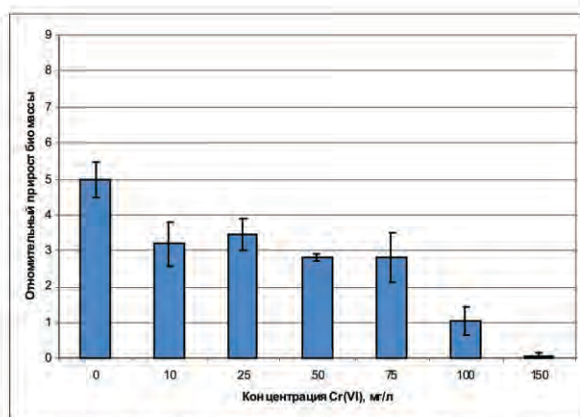


Рис. 4. Относительный прирост массы каллусной ткани *C. guitensis* на среде с Cr(VI) в концентрации 10...150 мг/л.

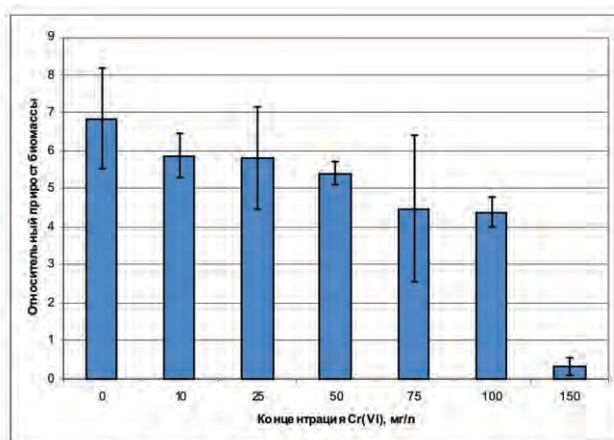


Рис. 5. Относительный прирост массы каллусной ткани *N. tabacum* на среде с Cr(VI) в концентрации 10...150 мг/л.

Для изучения изменений концентрации Cr(VI) в питательной среде был проведен анализ с использованием дифенилкарбазида (ДФК). ДФК является специфическим реактивом для определения Cr(VI): в кислой среде ДФК в присутствии хрома(VI) окрашивается в красный цвет при концентрации ионов хрома не ниже 1 мг/л.

Аналитическое определение показало, что уже через 15 суток Cr(VI) в среде при росте *W. fontinaliopsis* отсутствовал. Это может быть или следствием восстановления Cr(VI) до Cr(III), или накоплением Cr(VI) в растительных тканях, или присутствием двух механизмов одновременно. Определение хрома(VI) в среде, на которой культивировали каллусные ткани *N. tabacum* и *C. quitensis*, через 11 суток не вызвало окрашивания, что свидетельствовало об отсутствии шестивалентного хрома.

При росте всех исследуемых образцов (*N. tabacum*, *C. quitensis*, *W. fontinaliopsis*) после 10–15 сут. наблюдалось постепенное изменение окрашивания питательной среды: первоначально желтый цвет, вызванный присутствием хрома(VI), изменялся на зеленовато-голубой. Такое окрашивание является характерным признаком появления  $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  – нерастворимого гидратированного гидроксида хрома(III).

Качественная реакция с ДФК выявила присутствие в каллусной ткани *N. tabacum* и *C. quitensis* шестивалентного хрома. Таким образом, вероятно, что при росте исследуемых растений на среде, содержащей Cr(VI), имеют место два механизма его детоксикации – восстановление в среде до нетоксичного  $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  и накопление в тканях растений Cr(VI).

#### 4. Выводы

В результате исследования роста растений или каллусных тканей *N. tabacum*, *C. quitensis*, *W. fontinaliopsis* на питательных средах, содержащих Cr(VI) в концентрациях 10...150 мг/л, определено, что:

- концентрация 150 мг/л в значительной степени ингибирует рост каллусных тканей *N. tabacum*, *C. quitensis* и растений *W. fontinaliopsis*;
- каллус *N. tabacum* более устойчив к действию Cr(VI), чем каллус *C. quitensis*; относительный прирост каллуса *N. tabacum* в присутствии 10 мг/л Cr(VI) не отличался от относительного прироста в контроле, в то же время относительный прирост каллуса *C. quitensis* в тех же условиях был в 1,6 раза ниже контрольного;
- вероятно, присутствуют два механизма детоксикации хрома использованными в

экспериментах растениями – восстановление токсичного Cr(VI) в среде до малотоксичного Cr(III) и накопление Cr(VI) в растительных тканях.

**Авторы выражают признательность Национальному антарктическому научному центру и его директору В.А. Литвинову за поддержку исследований и предоставление возможности получить образцы растений.**

#### Список литературы

**Лакин Г.Ф.** Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.

**Лаврухина А.К., Юкина Л.В.** Аналитическая химия хрома: Академия наук СССР. Серия «Аналитическая химия элементов». – М.: Наука, 1979. – 219 с.

**Таширев А.Б., Матвеева Н.А., Романовская В.А., Таширева А.А., Рокитко П.В.** Полирезистентность и сверхустойчивость к тяжёлым металлам антарктических микроорганизмов// Доповіді Національної Академії наук України. – 2007. – № 11. – С. 170–175.

**Cervantes C., Garcia J.C., Devars S., Corona F.G., Tavera H.L., Torres-Guzman J. et al.** Interactions of chromium with micro-organisms and Plants// FEMS Microbiol. Rev. – 2001/ - V. 25. – P. 335–347.

**Davies F.T., Puryear J.D., Newton R.J., Egilla J.N., Grossi J.A.S.** Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange // J. Plant Nutr. – 2002. – V.25/ – P. 2389–2407.

**Jain R., Srivastava S., Madan V.K., Jain R.** Influence of chromium on growth and cell division of sugarcane // Indian J. Plant Physiol. – 2000. – V. 5. – P. 228–231.

**Mei B., Puryear J.D., Newton R.J.** Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species// Plant Soil. – 2002. – V. 247. – P. 223–231.

**Meenakshi Banerjee, Shanoo Mishra, Jhuma Chatterjee.** Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes// Electronic Journal of Biotechnology Vol. 7 No.3, Issue of December 15, 2004. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue3/full/9/>

**Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – V. 15, N. 3. – P. 473–497.

**Panda S.K., Patra H.K.** Nitrate and ammonium ions effect on the chromium toxicity in developing wheat seedlings // P Natl. Acad. Sci. India B. – 2000. – V. 70. – P. 75–80.

**Rout G.R., Sanghamitra S., Das P.** Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L) // Chemosphere. – 2000. – V. 40. – P. 855–859.

**Sanjib Kumar Panda.** Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings // Journal of Plant Physiology. – 2007. – Vol 164, № 11. – P. 1419–1428.

**Shanker Arun K., Cervantes Carlos, Loza-Tavera Herminia, Avudainayagam S.** Chromium toxicity in plants// Environment International. – 2005. – Vol. 31. – P. 739–753.

**Suseela M.R., Sinha S., Singh S., Saxena R.** Accumulation of chromium and scanning electron microscopic studies in *scirpus lacustris* L treated with metal and tannery effluent// Bull Environ. Contam. Toxicol. – 2002. – V. 68. – P. 540–548.

**Wallace A., Soufi S.M., Cha J.W., Romney E.M.** Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil // Plant Soil. – 1976. – V. 44. – 471–473.