

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ *WOLFFIA ARRHIZA* (L.) К ВОЗДЕЙСТВИЮ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕРБИЦИДА 2,4-D

Галицкая А.А.^{1,2}, Селиванов Н.Ю.², Селиванова О.Г.², Соколов О.И.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов Саратов, Россия (410012, Саратов, ул. Астраханская, 83) ann.gal@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН) Саратов, Россия (410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13)

Исследована соматическая изменчивость одного из представителей семейства рясковых – вольфии бескорневой *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimmer. Показано, что при действии синтетического гербицида 2,4-D около 20 % растений в популяции формируют новые устойчивые фенотипические формы. Выявлено несколько типов вариаций, различающихся по размерам, биосинтезу пигментного аппарата и клеточных стенок. Показано, что макроформа растений характеризуется повышенными требованиями к минеральному питанию и интенсивным ростом культуры. Выявленный спектр соматических фенотипов может рассматриваться как проявление универсального механизма адаптации популяции водных растений к действию ксенобиотиков, который способствует более полному проявлению адаптивной стратегии, обеспечивающей устойчивость популяции в неблагоприятных условиях. Полученные данные позволяют рассматривать вольфию бескорневую как перспективный биотехнологический объект.

Ключевые слова: рясковые, вольфия бескорневая, соматическая изменчивость.

SOMACLONAL VARIABILITY IN THE ADAPTATION OF *WOLFFIA ARRHIZA* (L.) HORKEL EX WIMMER PLANTS TO THE EFFECTS OF SYNTHETIC HERBICIDE 2,4-D

Galitskaya A.A.^{1,2}, Selivanov N.Yu.², Selivanova O.G.², Sokolov O.I.²

¹ State Educational Establishment of Higher Professional Education, Saratov state university named after N.G. Chernyshevsky, Saratov

Saratov, Russia (410012, Saratov, ul. Astrakhanskaya, 83) ann.gal@mail.ru

² State Establishment of Science the Russian Academy of Sciences' Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms (IBPPM RAS)

Saratov, Russia (410049, Saratov, prospekt Entuziastov, 13)

Somaclonal variability of one of the representatives of the Lemnaceae family - wolffia rootless *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimmer was investigated. It is shown that under the action of synthetic herbicide 2,4-D about 20% of the plants in the population form new stable phenotypic forms. Several types of variations that differ in the size of plants, abnormalities of the biosynthesis of pigments apparatus and cell wall were found. It is shown that large-size form of wolffia plants is characterised by increased needs in mineral nutrition accompanied by the intensive growth of the culture. The revealed range of the wolffia rootless somaclonal phenotypes may be considered as display of mechanism of adaptation to the xenobiotics action which can promote to the more complete expression of the adaptive strategy ensuring the stability of the population in adverse conditions. Received data allow consider wolffia rootless plants as promising object for biotechnology.

Key words: Lemnaceae, wolffia rootless, somaclonal variability.

Хозяйственная деятельность человека приводит к загрязнению окружающей среды и нарушению природных биогеохимических циклов. В наибольшей степени этому разрушающему воздействию подвержена гидросфера, поскольку любые загрязнения, затрагивающие атмосферу, почву и т.п., через атмосферные осадки, почвенный сток,

миграцию подземных вод и другие процессы, связанные с круговоротом воды, попадают в водоемы [1]. Подобные воздействия могут приводить к нарушению структуры гидробиоценозов и изменению видового состава сообществ. Очевидно, что сохранение видового разнообразия в случае антропогенных нарушений среды во многом определяется устойчивостью доминирующих видов, так как именно они в наибольшей степени подвержены токсическому действию поллютантов [1, 3]. Важной составляющей устойчивости вида является его генетическая неоднородность, позволяющая формировать различные фенотипы, отличающиеся по широкому спектру признаков, в том числе по устойчивости к действию различных внешних факторов, включая химические и биологические загрязнители органической и неорганической природы.

Цель данной работы – исследование соматоклональной изменчивости вольфии бескорневой *Wolffia arrhiza* (L.) Horkeel ex Wimmer, относящейся к семейству рясковых. Представители семейства рясковых широко распространены в водоемах с невысокой скоростью течения, включая непроточные. Они характеризуются относительной простотой строения, высокой скоростью размножения, преимущественно вегетативного, которое сопровождается быстрым накоплением биомассы. Известно, что представители семейства отличаются устойчивостью к целому ряду ксенобиотиков. Во многих работах показано, что различные виды рясковых могут расти в водных системах с высокой степенью антропогенного загрязнения и участвовать в процессах биodeградации органических поллютантов различной природы и/или аккумуляции ионов тяжелых металлов с высоким индексом обогащения [4, 5, 7]. С другой стороны, поглощение и накопление некоторых токсических веществ приводит к физиологическим и выраженным фенотипическим изменениям этих растений, не вызывая при этом их гибели, на чем основано использование различных видов рясок в качестве объектов для проведения биотестов [6, 10]. При этом показано, что внутри одной популяции растения могут в значительной степени различаться по степени устойчивости к действию внешних факторов [8, 9]. Подобная вариабельность в пределах одного биотопа определяется генетической и фенотипической гетерогенностью природных популяций и лежит в основе устойчивости популяции к изменению условий обитания [2].

Материалы и методы

В работе исследовали соматоклональную фенотипическую изменчивость вольфии бескорневой под воздействием синтетического гербицида ауксинового ряда – 2,4-D, обладающего мутагенными свойствами. Поверхностно стерилизованные растения выращивали на среде Гамборга – Эвелега В-5 с разной степенью разведения: в 5 раз (1/5

среды В-5) и в 50 раз (1/50 среды В-5) при 24 °С с искусственным освещением интенсивностью 6000 люкс при 16-ти часовом фотопериоде.

Для получения растений с измененным фенотипом в состав среды асептически вводили раствор 2,4- D в диапазоне концентраций от 1мкМ до 100мкМ и культивировали растения в течение 3 недель, как при 16-ти часовом фотопериоде, так и в темноте, после чего осуществляли первичный анализ полученных форм. Растения с измененным фенотипом пересаживали на свежую питательную среду и культивировали в оптимальном для них температурном режиме и фотопериоде. Для культивирования обесцвеченных клонов использовали жидкие и агаризованные минеральные среды, содержащие 0,5–1 % сахарозы.

Эксперименты проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel 2003. На рисунке представлены средние арифметические значения результатов, полученных в отдельных экспериментах и их стандартное отклонение от среднего значения.

Полученные результаты и их обсуждение

Культивирование растений вольфии в присутствии 2,4-D показало, что введение в среду 2,4-D в концентрации 1 – 20 мкМ приводит к заметному ускорению вегетативного размножения и к значительному приросту сырой биомассы. Однако при увеличении концентрации до 50 – 100 мкМ наблюдается ингибирование роста и развития растений, что проявляется в торможении процесса вегетативного размножения – почкования, вплоть до его полного прекращения, а также появлении мутантных форм растений. При этом высокие дозы ауксина приводили к гибели основной части растений, а среди выживших растений формировались фенотипически измененные формы.

При анализе вариабельности культуры было показано, что в среднем до 20 % растений в популяции проявляют фенотипическую изменчивость. Среди наблюдаемых фенотипических вариаций можно выделить три основных типа, которые представлены на рисунке 1.

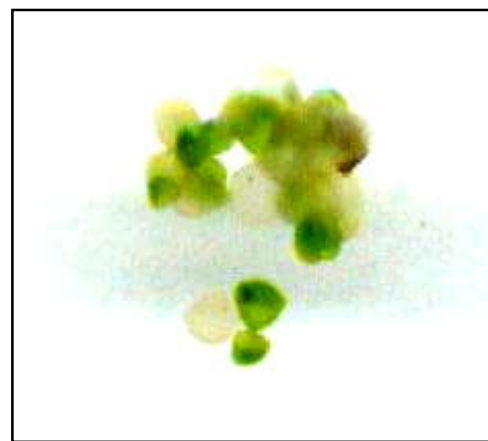
Первый тип характеризуется изменением средних размеров растений вольфии. Были получены макро- и микроформы, размеры которых были соответственно в 2 раза больше и в 1,5 раза меньше размеров исходных растений. Стабильность макро- и микроформ в процессе длительного культивирования существенно отличалась, что позволяет предполагать участие разных механизмов в их образовании. Микроформы реверсировали в процессе нескольких пассажей, тогда как увеличенные размеры растений сохранялись в течение многих поколений без изменения способности растений к миксотрофному (фото-гетеротрофному) типу питания. Кроме того, эти растения отличались и тканевой морфологией: у них четко

выражены "верхняя пластинка" – зона, где сконцентрированы фотосинтезирующие клетки, а также слабоокрашенная, сильно вакуолизированная вентральная зона.

Второй тип соматклонов характеризуется образованием конгломератов (агрегатов) неразделившихся растений. Данный тип сохранялся при многократных пассажах и зачастую сопровождался изменением формы отдельных растений в агрегатах – появлялись удлинённые растения, а также наблюдались "размытые", нечеткие границы отдельных растений, входящих в конгломерат. Вероятно, в этом случае могли быть затронуты механизмы биосинтеза полимеров клеточных стенок растений, либо регуляции экспрессии гликолитических ферментов, определяющих собственно разделение «материнских» и «дочерних» растений.



а)



б)



в)



г)

Рис. 1. Соматклональная изменчивость *W. arrhiza*:

- а) тип 1 - линия с измененными размерами (слева – макроформа, справа – исходный фенотип);

- б) тип 2 - линия с измененным синтезом клеточных стенок (конгломераты растений);
- в, г) тип 3 – линии растений, дефектные по синтезу пигментов

Третий тип изменений затрагивает механизм биосинтеза пигментного аппарата и проявляется в уменьшении содержания хлорофилла и формировании желтых и белых форм растений. При изменении условий культивирования – пересадке на свежую среду – у части таких клонов растений наблюдалась частичная спонтанная реверсия до слабоокрашенных форм, но она была временной и исчезала в процессе роста культуры. Однако эти изменения не затрагивают способности вольфии к вегетативному размножению и гетеротрофному питанию.

Получение искусственных соматоклонально измененных форм растений позволило выявить несколько закономерностей.

Во-первых, показано, что чувствительность вольфии к действию 2,4-D зависит от освещенности. Так, при культивировании на свету была отмечена большая токсичность ауксина: концентрация 20 мкМ обеспечивала ингибирование вегетативного размножения растений по сравнению с концентрациями 1-10 мкМ, а последующее увеличение содержания 2,4-D в среде культивирования приводит к тому, что выживают единичные растения. В темноте токсичность 2,4-D была гораздо менее выражена и не приводит к массовой гибели растений. Образование неразделившихся форм происходит преимущественно на свету (дозовый порог ауксина при этом ниже, а процент выхода – больше), тогда как образование крупных растений – выше при культивировании в темноте. Возможно, это связано с различиями в действии препарата при различных типах метаболизма.

Вторая закономерность заключается в том, что измененные формы проявляются преимущественно при перенесении растений на свежую (минеральную) среду культивирования, мы условно обозначили как «отдаленный эффект». Тот факт, что фенотипические изменения наблюдаются у целых растений и сохраняются на протяжении многих поколений и пассажей, предполагает, что изменениям подвергаются отдельные инициальные меристематические клетки, формирующие измененные растения после деления почкованием.

Далее исследовали зависимость развития полученной линии макроформ вольфии от обеспеченности элементами минерального питания, которая отражает особенности взаимодействия данной популяции со средой обитания в сравнении с исходным фенотипом. Для этого проводили длительное культивирование на среде Гамборга – Эвелега В-5 с разной степенью разведения: в 5 раз (1/5 среды В-5) и в 50 раз (1/50 среды В-5).

Полученные экспериментальные данные приведены на рисунке 2. На ранних этапах развития общая численность обеих популяций увеличивается на обеих средах, причем по скорости вегетативного размножения макроформа превосходит исходный фенотип. Вероятно, при росте на оптимальной минеральной среде происходит быстрое накопление биополимеров, необходимых для развития. При этом сокращается время, необходимое для генерации новых вегетативных почек и формирования молодых растений. Однако по мере истощения питательной среды скорость деления макроформы начинает замедляться и после трех недель культивирования уступает родительской форме. Надо заметить, что длительность периода генерации новых почек может зависеть и от внутривидовых взаимодействий между растениями, которые опосредуются экскрецией биологически активных метаболитов. Однако эти аспекты требуют дополнительных исследований.

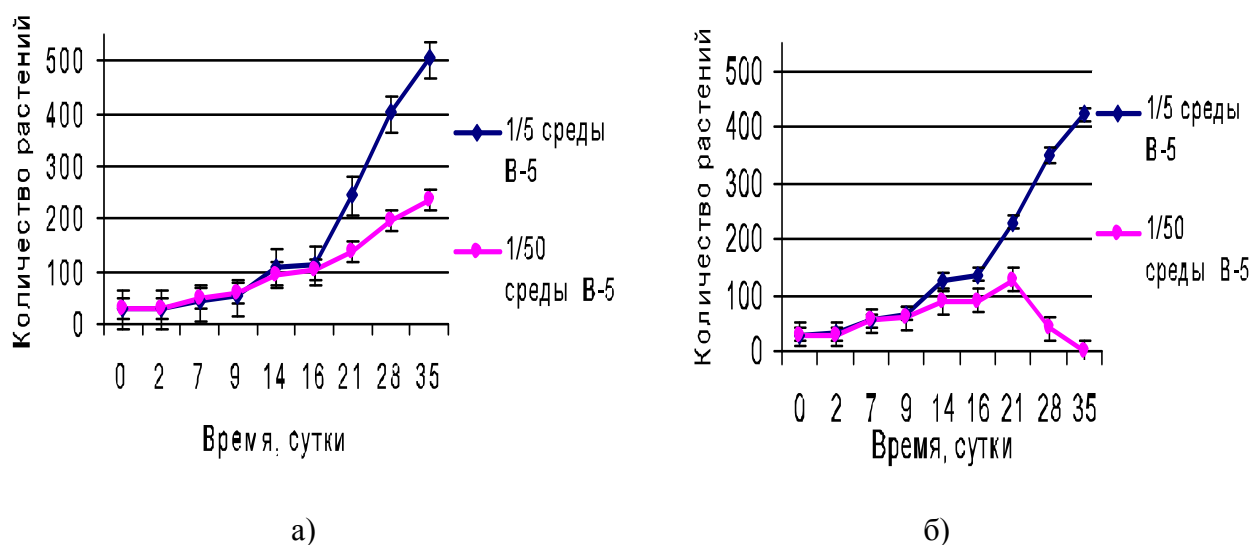


Рис. 2. Развитие популяции растений *W. arrhiza* при разной обеспеченности элементами минерального питания: а) исходный фенотип; б) макроформа

Еще более ярко этот феномен проявляется на обедненной питательной среде. В условиях минимального минерального питания (на 1/50 среды В-5) дольше развивается исходная форма. При этом все растения мутантной формы погибают к 35-ому дню культивирования. Таким образом, можно сделать вывод, что исходная культура лучше приспособлена к среде с малым количеством питательных веществ по сравнению с макроформой, тогда как растения макроформы характеризуются повышенной потребностью в минеральном питании.

Полученные данные позволяют рассматривать макрокультуру вольфии бескорневой как перспективный объект для разработки технологий фиторемедиации водоемов. Высокая скорость размножения при быстром накоплении биомассы на богатых минеральными и

органическими веществами эвтрофных водоемах будет способствовать быстрой утилизации нетоксичных загрязнений. При этом по мере очистки («истощение среды») скорость размножения популяции макроформы вольфии заметно снижается, количество растений уменьшается, что может облегчать их сбор и удаление.

Заключение

Способность к образованию устойчивых жизнеспособных форм под воздействием внешних факторов указывает на высокую морфогенетическую пластичность популяции растений вольфии бескорневой, в основе которой лежит генетическая гетерогенность. Образование нескольких фенотипически измененных линий растений вольфии можно рассматривать как проявление универсального механизма адаптации популяции водных растений к действию ксенобиотиков, приводящего к более полному проявлению адаптивной стратегии [2]. Например, образование макроформ с повышенными трофическими потребностями и высокой продуктивностью может обеспечивать более быструю и эффективную детоксикацию поллютантов, в том числе за счет их использования в качестве источника углерода при переходе на гетеротрофное питание.

Таким образом, полученные данные позволяют охарактеризовать вольфию бескорневую как весьма перспективный биотехнологический источник получения селекционных форм для фитобиоценозов с высокой продуктивностью или использования таких форм для биоремедиации водоемов и в целях биотехнологического производства.

Список литературы

1. Брагинский Л.П. Принципы классификации и некоторые механизмы структурно-функциональных перестроек пресноводных экосистем в условиях антропогенного пресса // Гидробиол. журн. – 1998. – Т.34, №6. – С. 72 – 94.
2. Жуйкова Т.В., Безель В.С. Адаптация растительных систем к химическому стрессу: популяционный аспект // Вестник Удмуртского ун-та. Биология. Науки о Земле. – 2009. – Вып.1. – С. 31 – 42.
3. Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений. – М.: Логос, 2001. – 224 с.
4. Cheng J., Bergmann B.A., Clasen J.J., Stomp A.M., Howard J.W. Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodella polirrhiza* // Bioresour. Technol. – 2002. – V.81, N.1. – P. 81 – 85.

5. Hattink J., Wolterbeek H.T. Accumulation of ^{99}Tc in duckweed *Lemna minor* L. as a function of growth rate and ^{99}Tc concentration // J. of Environmental Radioactivity. – 2001. – V.57. – P. 117 – 138.
6. Hubalek T., Vosahlova S., Matějů V. Ecotoxicity Monitoring of Hydrocarbon-Contaminated Soil During Bioremediation: A Case Study // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2007. – V. 52. – P.1 – 7.
7. Körner S., Vermaat J.E., Veenstra S. The capacity of duckweed to treat wastewater: ecological considerations for a sound design // J. Environ. Qual. – 2003. – V.32. – P.1583 – 1590.
8. Mazzeo N., Dardano B., Marticorena A. Interclonal variation in response to simazine stress in *Lemna gibba* (Lemnaceae) // Ecotoxicology. – 1998. – V.7. – P. 151 – 160.
9. Slovin J.P., Cohen J. Levels of indole-3-acetic acid in *Lemna gibba* G-3 and a large *Lemna* mutant regenerated from tissue culture // Plant. Physiol. – 1998. – V.86. – P. 522 – 526.
10. Stesevic D., Feiler U., Sundic D. Application of a new sediment contact test with *Myriophyllum aquaticum* and of the aquatic *Lemna* test to assess the sediment quality of Lake Skadar // J. Soils Sediments. – 2007. – V. 7 (5). – P. 342 – 349.

Рецензенты:

Бородулин В.Б., профессор, д.м.н., зав. кафедрой биохимии ГБОУ ВПО „Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского“ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Саратов.

Карпунина Л.В., профессор, д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова» (ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ») (Министерство сельского хозяйства РФ), г. Саратов.