

ШУТОВА А. Г.^{1✉}, БАШИЛОВ А. В.¹, СЕДУН Е. А.¹, ВОЙЦЕХОВСКАЯ Е. А.¹, ОНЕТЕ М.²

¹ ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

² Бухарестский институт биологии Румынской академия наук,

Румыния, 060031, Бухарест, Spl. Independentei, 296, Sector 6, e-mail: marilena.onete@gmail.com

✉ anna_shutova@mail.ru, 8 (017) 284 14 64

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ВЫСОКОДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ АВТОХТОННОЙ ФЛОРЫ К ПОВЫШЕННЫМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ПОЛЛЮТАНТОВ

Цель. Оценка устойчивости высокодекоративных растений местной флоры к высокому уровню засоления и повышенным концентрациям цинка, свинца и кадмия для озеленения городских и придорожных территорий. **Методы.** Использовали проращивание семян в лабораторных условиях с замачиванием в растворах хлорида натрия и солей цинка, свинца и кадмия, а также метод селекции клеток *in vitro* для повышения устойчивости *Verbascum nigrum* L. к засолению. **Результаты.** Проведена оценка устойчивости 7 видов высокодекоративных растений, представителей автохтонной флоры Беларуси, к повышенным концентрациям солей свинца, цинка и кадмия. Оценено влияние хлорида натрия на всхожесть, длину и морфологию корней, длину проростков при проращивании семян *Betonica officinalis* L., *Centaurea jacea* L., *Verbascum nigrum*, *Knautia arvensis* (L.) Coult., *Galium verum* L., *Anthemis tinctoria* L., *Anthemis arvensis* L., *Viscaria vulgaris* Bernh., *Achillea millefolium* L. Показано, что метод селекции клеток *in vitro* перспективен для отбора устойчивых линий *Verbascum nigrum*. **Выводы.** Наличие солей свинца, цинка и кадмия оказало существенное влияние на среднюю длину корня, гипокотили и семядольных листьев, а также на всхожесть высокодекоративных видов автохтонной флоры. Наиболее устойчивыми к засолению оказались тысячелистник (*Achillea millefolium*), василек луговой (*Centaurea jacea*) и коровяк черный (*Verbascum nigrum*). На модифицированной среде Мурасиге-Скуга отобраны устойчивые линии *Verbascum nigrum*, способные расти *in vitro* при концентрации хлорида натрия 5 г/л.

Ключевые слова: засоление, тяжелые металлы, всхожесть семян, высокодекоративные виды.

В течение ряда лет во всем мире наблюдается тенденция к максимально активному привлечению видов аборигенных флор в процессы озеленения городских пространств [1–3]. Однако при отборе растений для озеленения в городской среде ключевым фактором будет являться устойчивость к засолению почв [4] и повышенным концентрациям тяжелых металлов, в частности свинца, кадмия и цинка [5]. Загрязнение почв, прилегающих к транспортным магистралям, связано в значительной степени с применением в зимнее время противогололедных реагентов в целях быстрого освобождения дорожных покрытий от снега. Большинство реагентов, которые широко используются в течение многих лет, содержат токсичный для растений ион хлора и обладают существенной фитотоксичностью [5, 6]. Техническая соль, песчано-солевые смеси, галитовые отходы, почти на 97 % состоящие из хлористого натрия, остаются основным средством борьбы с обледенением дорог в зимний период. Ежегодно на автомагистралях Беларуси для борьбы с наледями используется до 100 тыс. т противогололедных материалов, вследствие длительного применения которых происходит постепенное засоление почв, наблюдается резкое ухудшение состояния зеленых насаждений вдоль автотранспортных магистралей [5]. Отбор растений, устойчивых к повышенным концентрациям поллютантов и, более того, успешно развивающихся в стрессовых условиях, является предметом исследований последних лет [7, 8]. Однако существует ряд факторов, затрудняющих прогресс в этой области. Это связано с тем, что растения проявляют различную степень устойчивости к засолению и загрязнению поллютантами в зависимости от видовой принадлежности и на различных стадиях онтогенеза [1,7].

Дополняющими традиционные способы получения форм растений, способных успешно

расти в неблагоприятных условиях среды при воздействии одного или нескольких стрессовых факторов, являются биотехнологические методы размножения микроклонов на селективных средах. Клеточная селекция – это экологически безопасная технология создания адаптивных форм растений, использующая природные резервы их изменчивости. Технологии клеточной селекции хорошо зарекомендовали себя при получении растений, толерантных к засухе, засолению, высоким концентрациям тяжелых металлов. У ряда видов отобраны солеустойчивые клоны [8, 9]. Регенеранты, полученные от них, также, в основном, толерантны к засолению, однако после регенерации солеустойчивость сохраняется не всегда [8]. Однако данных о применении этого метода в отношении растений аборигенной флоры в научной литературе нет.

Целью работы являлись отбор толерантных к повышенным концентрациям хлорида натрия, солей свинца, цинка и кадмия высокодекоративных видов автохтонной флоры, а также оценка эффективности метода клеточной селекции для повышения солеустойчивости перспективных видов.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали семена семян *Betonica officinalis* L., *Centaurea jacea* L., *Verbascum nigrum* L., *Verbascum thapsus* L., *Knautia arvensis* (L.) Coult., *Galium verum* L., *Anthemis tinctoria* L., *Anthemis arvensis* L., *Viscaria vulgaris* Bernh., *Achillea millefolium* L. Изучено действие различных концентраций солей свинца, цинка и кадмия, а также хлорида натрия на прорастание и морфогенез объектов исследования. Процент проросших семян и ростовые показатели анализировали на 4, 8, 14 сутки после замачивания семян в растворах хлорида натрия концентраций 5, 10, 20, 50 г/л и на 4, 7 сутки после замачивания семян в растворах нитрата свинца, сульфата цинка и сульфата кадмия с концентрациями 0,2, 1 и 5 г/л (объем выборки – 100 семян для каждой концентрации). Семена проращивались в климат-комнате при уровне освещенности 3500 лк, температуре 25 ± 2 °C, фотопериоде 16 часов. Результаты экспериментов представлены в виде средних арифметических со стандартными ошибками, статистическую значимость различий рассчитывали для 95 % уровня значимости ($p < 0,05$). Полученные результаты

обработаны с помощью статистического пакета программ M.Excel.

При введении в культуру тканей *in vitro* семена подвергались размачиванию в дистиллированной воде в течение 30 минут, переносились в водный 0,01 % раствор фунгицида «Прозаро» на 15 минут, следующим этапом было перенесение семян в раствор хлоргексидина биглюконата (20 %) на 15–20 минут, семена дважды подвергали промыванию в стерильной дистиллированной воде в течение 5–7 минут, затем помещали в 0,1 % раствор AgNO_3 на 5–7 минут. После обработки нитратом серебра семена дважды отмывали в стерильной дистиллированной воде и переносили непосредственно на питательную среду.

Для проращивания и дальнейшего культивирования семян была выбрана безгормональная питательная среда Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением 10 г/л сахарозы, 7,5 г/л агара (Sigma) в качестве уплотняющего вещества. Перед автоклавированием значение pH среды доводили до 5,6–5,8. В качестве модифицирующего реагента использовали NaCl (Fisher Chemical) в концентрации 0, 5, 10, 20 г/л (вариант с концентрацией 0 г/л NaCl служил контролем).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 обобщены данные по влиянию ионов свинца, цинка и кадмия на всхожесть семян 7 видов высокодекоративных растений автохтонной флоры Беларуси в трех концентрациях: 0,2, 1 и 5 г/л. Концентрация сульфата кадмия 5 г/л оказалась летальной практически для всех изученных видов. Коровяк черный оказался самым чувствительным среди изученных таксонов к ионам кадмия, для семян этого вида не наблюдалось прорастания уже при концентрации 0,2 г/л. У тысячелистника обыкновенного, пупавки красильной и посевной отсутствовал рост и при концентрации соли кадмия 1 г/л. Наиболее устойчивым к концентрации 1 г/л оказался василек луговой, всхожесть семян этого вида при данной концентрации поллютанта снижалась не более чем в два раза. Василек луговой также проявил устойчивость к ионам цинка. Около 22 % семян всходили к 7 суткам при концентрации поллютанта, равной 5 г/л. При концентрации сульфата цинка 1 г/л всхожесть составляла не ниже 50 % в случае всех видов (за исключением коровяка медвежье ухо). Василек луговой и тысячелистник обыкновенный оказа-

лись устойчивы к повышенным концентрациям нитрата свинца. Для василька лугового снижение всхожести при 5 г/л поллютанта не превышало 44 %, а для тысячелистника обыкновенного – 74 %. Присутствие нитрата свинца в концентрации 0,2 г/л не оказывало существенного (более 20 %) влияния на снижение всхожести.

Следует отметить, что для ряда видов наблюдалось замедление процесса прорастания семян на фоне повышенных концентраций поллютантов. Коровяк медвежье ухо при концентрации сульфата свинца 1 г/л на 4-е сутки демонстрировал снижение всхожести на 78 % и отсутствие признаков прорастания при концентрации 5 г/л, тогда как на 7-е сутки всхожесть по отношению к контролю составляла уже 78 и 100 % соответственно.

Коровяк медвежье ухо сохранял высокую всхожесть в присутствии ионов цинка в концентрации 0,2 г/л. Однако при повышении концентрации поллютанта до 1 г/л наблюдалось снижение всхожести, причем семена прорастали, однако дальнейшего развития не наблюдалось. Некоторая часть проросших семян коровяка обыкновенного развивалась при концентрации ионов кадмия 0,2 г/л, и наблюдалось постепенное отмирание проклюнувшихся семян при больших концентрациях этого поллютанта.

Пупавка посевная проявила устойчивость, сравнимую с контролем, в отношении ионов свинца и цинка в концентрации 0,2 г/л. При концентрации цинка 1 г/л процесс прорастания

значительно тормозился, и на 4 сутки всхожесть составила только около 50 %, но к 7 суткам всхожесть повышалась. Также на 7 сутки наблюдалось частичное прорастание семян пупавки в присутствии ионов цинка в концентрации 1 г/л. Ионы кадмия уже в концентрации 0,2 г/л тормозили прорастание семян пупавки полевой. При концентрации 1 г/л наблюдалось полное отсутствие роста.

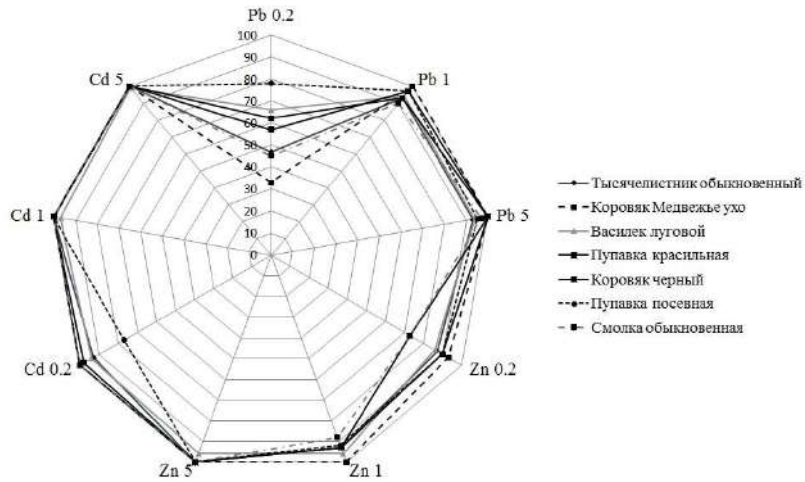
Присутствие тяжелых металлов оказало существенное влияние на показатели средней длины корня, гипокотыля и семядольного листа, при этом корни оказались наиболее чувствительными к повышенным концентрациям поллютантов.

Как видно с рис.1, наименьшее влияние на среднюю длину корня оказал нитрат свинца в концентрации 0,2 г/л.

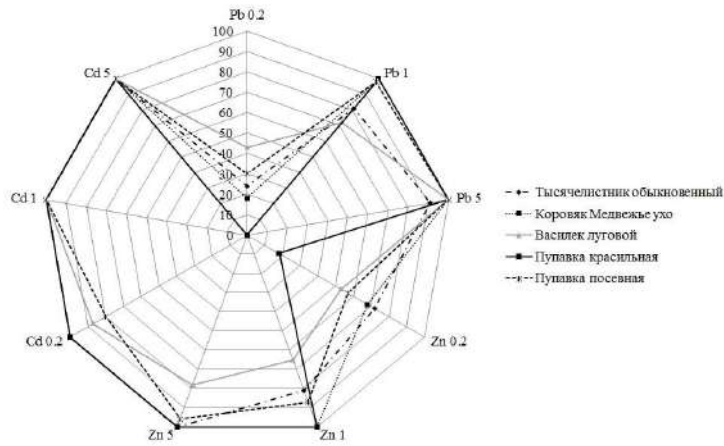
Присутствие ионов свинца в данной концентрации привело к снижению средней длины корня менее чем наполовину у коровяка медвежье ухо, тысячелистника обыкновенного и смолки обыкновенной. Однако и у остальных видов такая концентрация ионов свинца не вызывала полной остановки роста корня. Наиболее чувствительными к данному поллютанту оказались корни пупавки посевной, снижение средней длины корня составило для данного растения около 78 %. Ионы свинца в больших концентрациях приводили к снижению длины корней более чем на 90 %. При этом наблюдался некроз и постепенное отмирание органов.

Таблица 1. Влияние поллютантов на снижение всхожести семян автохтонных видов

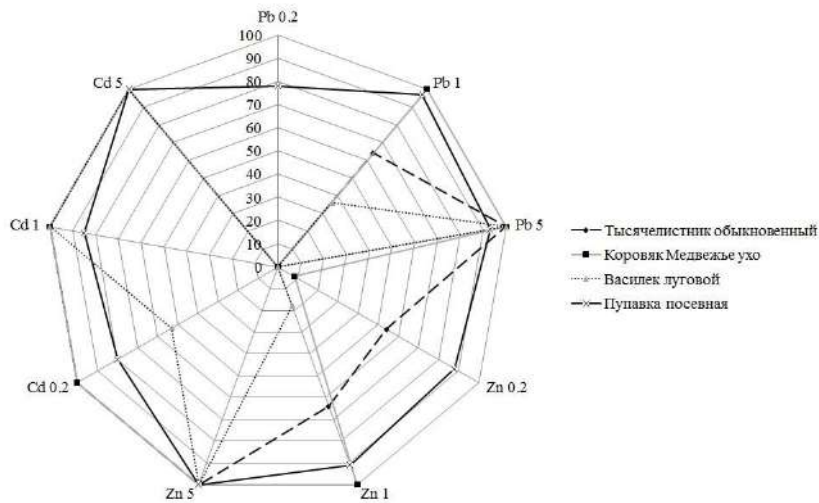
Таксон	Сутки	Поллютант, г/л								
		Свинец			Цинк			Кадмий		
		0,2	1	5	0,2	1	5	0,2	1	5
Снижение всхожести по отношению к контролю, %										
Тысячелистник обыкновенный	4	10	54	74	13	15	77	49	100	100
	7	0	21	74	8	46	100	85	100	100
Коровяк медвежье ухо	4	2	78	100	16	52	100	60	80	100
	7	2	30	52	44	52	100	62	66	100
Василек луговой	4	3	22	31	44	28	44	42	47	100
	7	0	8	44	28	50	78	53	25	97
Пупавка красильная	4	0	90	100	2	36	88	83	100	100
	7	0	88	100	33	33	100	90	100	100
Коровяк черный	4	18	18	100	33	28	100	100	100	100
	7	3	59	100	18	28	100	100	100	100
Смолка обыкновенная	4	0	100	100	0	2	100	100	100	100
	7	13	83	90	50	50	67	90	90	100
Пупавка посевная	4	0	84	100	0	52	100	90	100	100
	7	0	75	100	2	13	73	90	100	100



а



б



в

Рис. 1. Влияние поллютантов на морфологические параметры автохтонных видов (7 суток), снижение, %: а – средней длины корня; б – средней длины гипокотыля, в – средней длины семядольного листа.

Для коровяка черного и смолки обыкновенной показано снижение средней длины корня в присутствии сульфата цинка в концентрации 0,2 г/л на 73 %, остальные виды оказались еще менее устойчивыми к данному поллютанту. Корни изученных видов оказались наиболее чувствительными к ионам кадмия, лишь для пупавки посевной снижение длины корня составило менее 90 %.

На длину гипокотыля в наименьшей степени влияло присутствие ионов свинца и цинка в концентрации 0,2 г/л (рис. 1б). Наименьшее снижение длины гипокотыля отмечено у пупавки посевной в присутствии минимальной из исследованных концентраций ионов кадмия. Присутствие тяжелых металлов также влияло на длину семядольного листа (рис. 1в).

При засолении наблюдалось полное подавление прорастания семян в концентрациях равных и выше 20 г/л у всех изученных видов растений, при концентрации 10 г/л полностью отсутствовал рост у таких видов, как пупавка красильная, пупавка полевая, короставник полевой, буквица лекарственная, василек луговой, коровяк черный. При 5 г/л также наблюдалось полное подавление прорастания у подмаренника желтого.

Из данных таблицы 2 следует, что в большинстве случаев присутствие хлорида на-

трия в концентрации 5 г/л снижало среднюю длину корня на 50–60 %. Для смолки это снижение не превышало 30 %. Средняя длина корня пупавки красильной на 4-е сутки была на 57 % ниже, чем в контроле, однако к 14-м суткам этот эффект нивелировался. Для пупавки полевой влияние засоления на длину корня усиливалось со временем.

В цикле экспериментов по солеустойчивости растений *in vitro*, проделанных нами ранее [10], введение в культуру коровяка черного семенами осуществлялось на модифицированную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0, 5, 10 г/л NaCl. Были отобраны линии, для которых наблюдался интенсивный рост на среде МС, содержащей 5 г/л соли (рис. 2).

У микрочеренков, которые до этого росли на среде, содержащей 5 г/л NaCl, и были посажены на среду с повышенной концентрацией соли (10 г/л), наступала гибель в течение 10 дней. Микрочеренки, которые были получены из культуры, растущей на среде с 5 г/л, были пересажены на аналогичную среду и среду без добавления хлорида натрия. Можно отметить, что культура значительно замедлила рост относительно контроля и первичного пассажа. Данная концентрация соли не является предельной для объекта, однако растение испытывает выраженный солевой стресс (рис. 3).

Таблица 2. Изменение средней длины корня при засолении, % к контролю

Таксон	Снижение средней длины корня, %		
	Содержание хлорида натрия 5г/л		
	4 сутки	8 сутки	14 сутки
Смолка клейкая	16,7	24,8	29,7
Василек луговой	65,2	50,4	47,7
Тысячелистник обыкновенный	62,7	67,2	51,1
Коровяк черный	55,2	57,7	60,6
Пупавка красильная	56,9	8,2	2,5
Пупавка полевая	68,9	33,3	59,4
Короставник полевой	-	-	50,8



Рис. 2. Растения коровяка черного в условиях *in vitro* контроль (слева) и при засолении 5 г/л (справа).

У микроклонов, которые были пересажены на среду, которая не содержала NaCl, можно отметить быстрый рост, увеличение габитуса растений, отсутствие желтоватой окраски листьев.

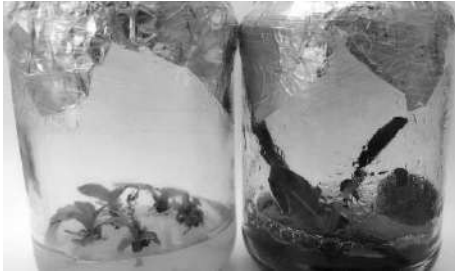


Рис. 3. Растения коровьяка черного, перенесенные со среды, содержащей 5 г/л хлорида натрия, на среду (2-ой пассаж) с таким же содержанием соли (слева) и без соли (справа).

Выводы

Оценена устойчивость высокодекоративных растений, представителей автохтонной флоры Беларуси, к возрастающим концентрациям солей свинца, цинка, кадмия и хлорида натрия. Отобраны устойчивые линии *V. nigrum*, способные расти *in vitro* при концентрации хлорида натрия 5 г/л.

Работа выполнена в рамках международного научного проекта Б20РА-018, выполняемого совместно с Центральным ботаническим садом НАН Беларуси и Бухарестским институтом биологии Румынской академии наук.

References

1. Southona G.E., Jorgensena A., Dunnett N., Hoylea H., Evans K.L. Biodiverse perennial meadows have aesthetic value and increase residents' perceptions of site quality in urban green-space. *Landscape and Urban Planning*. 2016. Vol. 158. P. 105–118.
2. Standish R.J., Hobbs R.J., Miller J.R. Improving city life: options for ecological restoration in urban landscapes and how these might influence interactions between people and nature. *Landscape Ecology*. 2013. Vol. 28. P. 1213–1221.
3. Alam H., Khattak J.Z.K., Poyil S.B.T., Kurup S., Ksiksi T.S. Landscaping with native plants in the UAE: A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2017. Vol. 29. No. 10. P. 729–741. doi: 10.9755/ejfa.2017.v29.i10.319.
4. Mastalerczuk G., Borawska-Jarmulowicz B., Kalaji H.M. How Kentucky bluegrass tolerate stress caused by sodium chloride used for road de-icing? *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019. Vol. 26, No. 1. P. 913–922. doi: 10.1007/s11356-018-3640-4.
5. Rud A.V. Heavy soil pollution of vegetation of roadside lanes of the Minsk region. *Bulletin of the Belarusian State University*. Ser. 2, Chemistry. Biology. Geography. 2007. No. 1. P. 111–115. [in Russian]
6. Czarna M. Overview of chemicals applied to winter road maintenance in Poland. *Zesz Nauk UZ Inż Środ.* 2013. Vol. 151, No. 31. P. 18–35.
7. Wrochna M., Małeczka-Przybysz M., Gawrońska H. Effect of road de-icing salts with anticorrosion agents on selected plant species. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 2010. Vol. 9, No. 4. P. 171–182.
8. Dolgikh Yu.I., Gladkova O.N., Glushetskaya L.S. Evaluation of the efficiency of using cell selection in the creation of lawns growing under conditions of increased copper content in the environment. *Izvestiya Moskovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta MAMI*. 2014. Vol. 4, No. 3. P. 15–19. [in Russian]
9. Gladkov E.A., Dolgikh Yu.I., Biryukov V.V. Selection of salt-resistant lawn grasses using biotechnological methods. *Biotechnology*. 2003. Vol. 5. P. 11–15. [in Russian]
10. Shutava H.G., Bashilov A.V., Sedun E.A. Selection of highly decorative aboriginal plants of the flora of Belarus resistant to chloride salinization for use in landscaping of the urban environment. *Fiziologiya roslin i genetika*. 2020. Vol. 52, No. 6. P. 518–527. [in Ukrainian]

SHUTAVA H.G.¹, BASHILOV A.V.¹, SEDUN E.A.¹, VAITSEKHOUSKAYA A.A.¹, ONETE M.²

¹ Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220012, Minsk, Sarganova str., 2V

² Institute of Biology Bucharest of the Romanian Academy,

Romania, 060031 Bucharest, Spl. Independentei, 296, Sector 6, e-mail: marilena.onete@gmail.com

ASSESSMENT OF THE RESISTANCE OF HIGHLY ORNAMENTAL PLANTS OF AUTOCHTHONOUS FLORA TO INCREASED CONCENTRATIONS OF POLLUTANTS

Aim. The purpose of the work is to assess the resistance of highly decorative plants of the native flora to a high level of salinity and the content of zinc, lead and cadmium for landscaping urban and roadside areas. **Methods.** We used seed germination under laboratory conditions with soaking in solutions of sodium chloride and salts of zinc, lead and cadmium, as well as the method of *in vitro* cell selection to increase resistance to salinity of *Verbascum nigrum* L.

Results. The resistance of 7 species of highly decorative plants, representatives of the autochthonous flora of Belarus, to increasing concentrations of lead, zinc and cadmium salts was assessed. Germination capacity, length and morphology of roots, length of seedlings during germination of seeds of *Betonica officinalis* L., *Centaurea jacea* L., *Verbascum*

nigrum, *Knautia arvensis* (L.) Coult., *Galium verum* L., *Anthemis tinctoria* L., *Anthemis arvensis* L., *Viscaria vulgaris* Bernh., *Achillea millefolium* L. in the presence of sodium chloride are shown. It has been shown that the *in vitro* cell selection method is promising for the selection of resistant lines of *Verbascum nigrum*. **Conclusions.** The presence of lead, zinc and cadmium salts had a significant effect on the average length of the root, hypocotyl, and cotyledonous leaves, as well as the germination capacity of highly decorative species of autochthonous flora. The most resistant to salinity were yarrow (*Achillea millefolium*), brown knapweed (*Centaurea jacea*) and black mullein (*Verbascum nigrum*). Lines of *Verbascum nigrum*, capable of growing *in vitro* at a sodium chloride concentration of 5 g/L, were selected.

Keywords: salinity, heavy metals, seed germination, highly decorative species.

ШУТОВА Г. Г.¹, БАШИЛОВ А. В.¹, СЕДУН К. А.¹, ВОЙЦЕХОВСКАЯ Е. А.¹, ОНЕТЕ М.²

¹ Центральний ботанічний сад НАН Білорусі,

Білорусь, 220012, м. Мінськ, вул. Сурганова, 2в, e-mail: anna_shutova@mail.ru

² Institute of Biology Bucharest of the Romanian Academy,

Romania, 060031, Bucharest, Spl. Independentei, 296, Sector 6, e-mail: marilena.onete@gmail.com

ОЦІНКА СТІЙКОСТІ ВИСОКОДЕКОРАТИВНИХ РОСЛИН АВТОХТОННОЇ ФЛОРИ ДО ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПОЛЮТАНТІВ

Мета. Оцінка стійкості високодекоративних рослин місцевої флори до високого рівня засолення та вмісту цинку, свинцю і кадмію для озеленення міських і придорожних територій. **Методи.** Використовували пророщування насіння в лабораторних умовах із замочуванням в розчинах хлориду натрію і солей цинку, свинцю і кадмію, а також метод селекції клітин *in vitro* для підвищення стійкості *Verbascum nigrum* L. до засолення. **Результати.** Проведено оцінку стійкості 7 видів високодекоративних рослин, представників автохтонної флори Білорусі, до підвищення концентрації солей свинцю, цинку та кадмію. Оцінено вплив хлориду натрію на схожість, довжину і морфологію коренів, довжину проростків за проростання насіння *Betonica officinalis* L., *Centaurea jacea* L., *Verbascum nigrum*, *Knautia arvensis* (L.) Coult., *Galium verum* L., *Anthemis tinctoria* L., *Anthemis arvensis* L., *Viscaria vulgaris* Bernh., *Achillea millefolium* L. **Висновки.** Наявність солей свинцю, цинку і кадмію справила значний вплив на середню довжину кореня, гіпокотилія і сім'ядольних листків, а також на схожість високодекоративних видів автохтонної флори. Найбільш стійкими до засолення виявилися деревій (*Achillea millefolium*), волошка лугова (*Centaurea jacea*) і коров'як чорний (*Verbascum nigrum*). На модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга відібрані стійкі лінії *Verbascum nigrum* здатні рости *in vitro* за концентрації хлориду натрію 5 г/л.

Ключові слова: засолення, важкі метали, схожість насіння, високодекоративні види.