

**УДК 581.143.6;574.24**

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К МЕДИ  
(КАК К НЕБЛАГОПРИЯТНОМУ ЭКОЛОГИЧЕСКОМУ ФАКТОРУ) И  
ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ НА ПРИМЕРЕ КАЛЛУСОВ ЛЬНА  
МНОГОЛЕТНЕГО (*LINUM PERENNE* L.)**

*Степанова А. Ю., Соловьева А. И., Ташильева И. И., Гладков Е. А.*

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва,  
Россия  
E-mail: gladkovu@mail.ru*

Известно, что многие изменения окружающей среды, в том числе загрязнение тяжелыми металлами, приводят к образованию избыточного количества активных форм кислорода, которые вызывают деградацию биомолекул и развитие окислительного стресса. В нашей работе оценена интенсивность развития окислительного стресса в каллусах льна многолетнего (*Linum perenne* L.) при действии меди, как неблагоприятного экологического фактора. Показано, что ионы меди при концентрации 300–1000  $\mu\text{M}$  сильно ингибируют рост каллусов и приводят к увеличению содержания малонового диальдегида (МДА) – индикатора перекисного окисления липидов, что свидетельствует о возникновении окислительного стресса. В результате проведенных экспериментов было установлено, что ранее отобранная на параквате (агент, вызывающим образование активных форм кислорода) клеточная линия льна, обладала более высокой устойчивостью к ионам меди, чем контрольные каллусы.

**Ключевые слова:** *Linum perenne* L., каллус, медь, окислительный стресс.

**ВВЕДЕНИЕ**

В связи с быстрым ростом и развитием городской инфраструктуры (промышленного производства, транспортной системы) нарастает антропогенное давление на окружающую среду, в том числе увеличивается содержание тяжелых металлов, которые в настоящее время являются одними из основных загрязнителей городских экосистем [1]. Загрязнение тяжелыми металлами оказывает негативное влияние на растения: ингибирует их рост, продуктивность и существенно снижает декоративные качества [2, 3]. Степень негативного действия тяжелых металлов, даже тех, которые в небольших количествах необходимы растению для нормальной жизнедеятельности, зависит от их концентрации. При высоком содержании тяжелых металлов происходит ингибирование активности ферментов, в результате связывания их ионов с функциональными группами белков; инактивация ферментов и других биомолекул, путем прямого замещения катионов из специфических сайтов связывания (например, замещение  $\text{Mg}^{2+}$  на  $\text{Cd}^{2+}$  в рибулозодифосфаткарбоксилазе) [4–6]. Однако многие исследования последних лет указывают, что существенную роль в повреждении растительных клеток играет окислительный стресс. Тяжелые

металлы с переменной валентностью (медь, хром, железо) относят к “редокс-активным” металлам, генерирующим образование гидроксильных радикалов, которые являются наиболее агрессивным типом активных форм кислорода (АФК) [7, 8]. Другие тяжелые металлы, такие как кадмий, свинец, никель и цинк, могут опосредовано влиять на образование АФК за счет вызываемых ими нарушений процесса фотосинтеза [9, 10]. Медь – один из основных загрязнителей окружающей среды, поскольку она широко используется в промышленности и сельском хозяйстве [11, 12]. Медь один из основных неблагоприятных экологических факторов для растений городских экосистем, из-за высокого содержания в почве [1] и фитотоксичности, например для некоторых исследуемых видов растений ряд токсичности выглядит следующим образом  $Cu > Ni > Cd > Pb > Hg > Fe > Mo > Mn$  [13]. Высокое содержание меди в почве обусловлено не только выбросами промышленных предприятий, но и движением автотранспорта. В составе загрязнителей у автомагистралей присутствует медь [14].

В прямых экспериментах было показано, что катионы меди вызывают как увеличение содержания малонового диальдегида (МДА), свидетельствующее о перекисном окислении липидов, так и повышение активности ряда ферментов антиоксидантной защиты, в первую очередь супероксиддисмутазы (СОД) [15, 16]. Следовательно, существует вероятность, что клеточные механизмы, отвечающие за устойчивость клеток к окислительному стрессу, могут также способствовать и их толерантности к повышенным концентрациям ионов меди.

Лён многолетний – растение, широко используемое в цветоводстве и городском озеленении для создания рабаток, альпинариев и мавританских газонов. Однако в настоящий момент существует мало сведений о его реакции на действие тяжелых металлов. Культуры *in vitro* являются удачной системой для изучения влияния стресса непосредственно на клетки и получения устойчивых клеточных линий и растений. Поэтому в качестве объекта исследования в нашей работе были использованы каллусы льна многолетнего.

Целью нашей работы было изучение интенсивности развития окислительного стресса в культивируемых *in vitro* клетках льна многолетнего при действии ионов меди и оценка толерантности к ним линий устойчивых к окислительному стрессу, которые были ранее получены с помощью клеточной селекции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали лён многолетний (*Linum perenne* L., сорт “Синий шёлк”). Семена льна стерилизовали 7 % раствором гипохлорита натрия в течение 20 мин, с последующей трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин.

Для получения каллусной ткани семядоли стерильно выращенных 14-дневных проростков помещали на модифицированную среду Мурасиге-Скуга [17] с 2 мг/л НУК, 4 мг/л кинетина, 0,1 мг/л 2,4-Д. Используемая среда была подобрана в нашем предыдущем исследовании [18]. Культивирование полученных каллусов проводили при температуре +25 °С и 16-часовом фотопериоде. Цикл культивирования составлял четыре недели.

Для оценки реакции клеток на стресс, вызванный ионами меди, каллусы были помещены на стерильную фильтровальную бумагу, пропитанную жидкой средой, содержащей сульфат меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) с конечным содержанием  $\text{Cu}^{2+}$  – 300  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ . В качестве контроля использовали каллусы, выращиваемые на той же среде, но без добавления меди.

Для характеристики роста культуры использовали показатель «индекс роста» (I). Вычисление проводили по следующей формуле:  $I = (X_{\text{max}} - X_0) / X_0$ ,

где  $X_{\text{max}}$  – наибольшее достигнутой культурой значение сырой массы (г),  $X_0$  – начальная сырая масса культуры (г). Индекс роста выражали в % относительно контроля.

Содержание МДА в каллусах определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основанному на образовании в кислой среде окрашенного триметинового комплекса, имеющего характерный спектр поглощения с максимумом  $\lambda = 532$  нм [19]. Количество МДА выражали в мкмоль/г сырой массы. Определение проводили на 3, 7 и 14 сутки после помещения каллусов на среды с различными концентрациями меди.

В экспериментах, связанных с изучением устойчивости к меди каллусов толерантных к окислительному стрессу, использовали линии, полученные ранее [18].

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft® Excel. В тексте и таблицах приведены средние арифметические величины параметров и их доверительные интервалы при 95%-ном уровне вероятности по t-критерию Стьюдента. На диаграммах указаны величины доверительных интервалов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки реакции на стресс, вызванный ионами меди, используют широкий диапазон концентраций (от 0,1  $\mu\text{M}$  до 1000  $\text{mM}$  и выше), поскольку чувствительность растений и каллусов к ионам данного металла значительно зависит от вида растения. Например, для каллусов табака применяли концентрации 1–100  $\mu\text{M}$  [20]; для каллусов редиса – 10–1000  $\mu\text{M}$  [21]; для газонных трав от 1000  $\mu\text{M}$  и выше [22].

В почвенных условиях небольшое ингибирование роста побегов в почве (ингибирование более 20 %, по сравнению с контролем – растениями, растущими в почве без меди) наблюдалось при концентрации 300  $\mu\text{M}$ , при содержании 600  $\mu\text{M}$  проявлялось большее негативное действие меди – рост побегов составлял 62 % от контроля. Таким образом, показано большее ингибирование роста побегов при повышении содержания меди.

Однако, наибольшей чувствительностью к действию меди обладает корневая система. Исследования в водных растворах показали большую токсичность меди для корней, при содержании 600  $\mu\text{M}$  меди длина главного корня составляла 10 % от контроля, концентрация 1000  $\mu\text{M}$  меди была практически летальной. Поэтому

данная концентрация меди была использована в качестве максимальной для дальнейших исследований.

На следующем этапе было оценено влияние разных концентраций меди на рост каллусов льна. Ранее были разработаны модифицированные среды Мурасиге-Скуга и Гамборга для получения каллусов различных видов декоративного льна [19, 23].

Нами было установлено, что на среде с 300  $\mu\text{M}$  меди происходило подавление роста каллусов на 60 % относительно контроля. При 600 и 1000  $\mu\text{M}$  меди жизнеспособность сохранялась только у 13 и 5 % каллусов, соответственно (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что культивируемые клетки льна обладают средней толерантностью к меди: они обладают большей устойчивостью, чем каллусы редиса и табака [19, 20], но меньшей, чем каллусы газонных трав [21]. Вероятно, это связано с тем, что однодольные растения менее чувствительны к меди, чем двудольные.

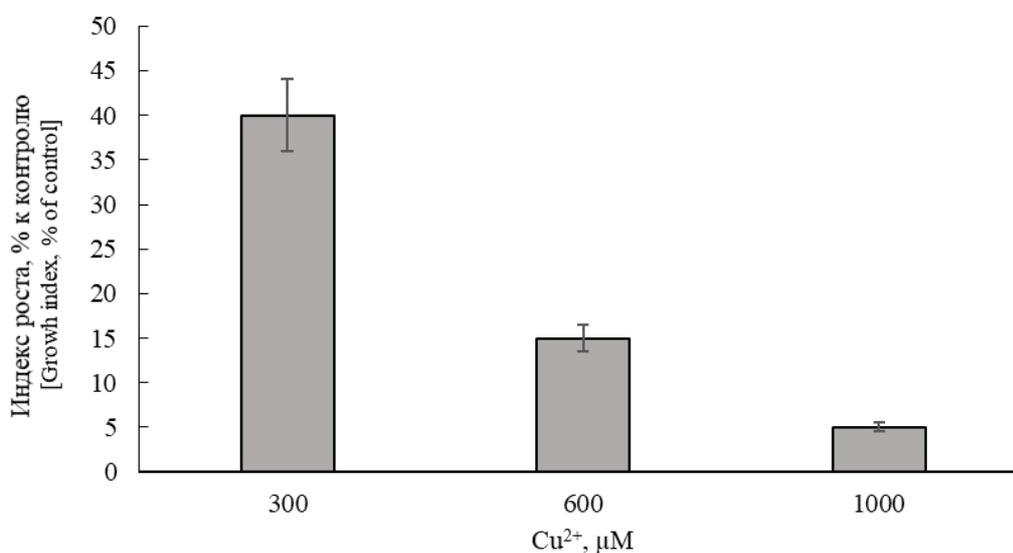


Рис. 1. Влияние различных концентраций меди на рост каллусов *Linum perenne* L.

В результате перекисного окисления липидов в клетках растений происходит образование МДА, поэтому уровень его содержания в растительном материале используют в качестве показателя интенсивности окислительного стресса. В нашем исследовании содержание МДА во всех вариантах, выращиваемых в присутствии меди, был выше, чем в контроле (рис. 2). Уже через 3 суток после перемещения каллусов на среды с повышенным содержанием меди было отмечено постепенное развитие окислительного стресса. При этом содержание МДА на 3 суток коррелировало с концентрацией ионов меди в среде. Следует отметить, что на среде с 1000  $\mu\text{M}$  меди на 7 сутки опыта было зарегистрировано некоторое снижение содержания МДА, которое на 14 сутки еще больше сокращалось. Вероятно, это связано с постепенной гибелью клеток в данном варианте опыта. При этом

максимальное содержание МДА на 14 сутки эксперимента было зарегистрировано на среде, содержащей 300  $\mu\text{M}$  меди. Таким образом, при воздействии  $\text{Cu}^{2+}$  у каллусов льна развивается окислительный стресс, сила которого зависит от концентрации ионов и продолжительности воздействия.

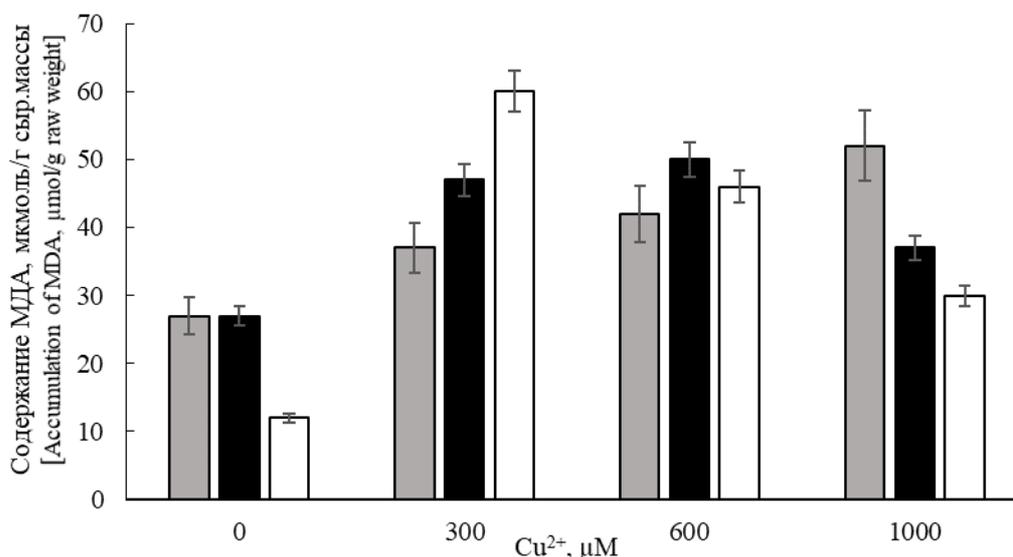


Рис. 2. Влияние различных концентраций меди на накопление МДА в каллусах *Linum perenne* L.; серые колонки – 3 сут, черные – 7 сут, белые – 14 сут

Была проведена оценка клеточных линий, полученных ранее с помощью клеточной селекции и обладающих высокой активностью СОД, на устойчивость к меди. Использование параквата для получения клеточных линий с повышенной устойчивостью к окислительному стрессу связано с тем, что он вызывает образование супероксид радикала и провоцирует гибель чувствительных к АФК клеток и отбору устойчивых. Нами было показано, что линии, отобранные на параквате, значительно лучше росли на среде с 300  $\mu\text{M}$  меди, жизнеспособность отобранных клеточных линий была в 2,5 раза выше, чем у контрольных каллусов.

Таким образом, клеточные линии с более высокой устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному паракватом, могут быть основой для получения растений, устойчивых к загрязнению медью.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе была оценена реакция каллусных клеток льна многолетнего на стресс, вызванный повышенными концентрациями ионов меди (300–1000  $\mu\text{M}$ ). Показано, что во всех вариантах происходило значительное повышение МДА, указывающее на развитие окислительного стресса. Наиболее высокое содержание

МДА было зарегистрировано на среде с добавлением 300  $\mu\text{M}$  меди на 14 сут. Именно эту концентрацию мы использовали для дальнейшей проверки линий, ранее отобранных на параквате (гербициде, основное повреждающее действие которого связано с продуцированием окислительного стресса). Жизнеспособность отобранных клеточных линий была в 2,5 раза выше, чем в контроле, что свидетельствует о перспективности использования агентов, вызывающих образование АФК для получения устойчивых к меди форм растений.

### Список литературы

1. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в РФ за 2018 год / Под ред. Черногаевой Г. М. – М.: Институт глобального климата и экологии Росгидромета и РАН, 2019. – 226 с.
2. Hall J. L. Transition metal transporters in plants / Hall J. L., Williams L. E. // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – V. 54(393). – P 2601–2613.
3. Nagajyoti P. C. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review / Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. // *Environmental Chemistry Letters*. – 2010. – V. 8(3). – P. 199–216.
4. Schützendubel A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization / Schützendubel A., Polle A. // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – V. 53. – P. 1351–1365
5. Sharma S. S. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance / Sharma S. S., Dietz K. J. // *Trends in Plant Science*. – 2009. – V. 14(1). – P. 43–50.
6. Benavides M. P. Cadmium toxicity in plants / Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2005. – V. 17. – P. 21–34
7. Okamoto O. K. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts / Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P. // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2000. – V. 40. – P. 18–24.
8. Panda S. K. Chromium stress in plant / Panda S. K., Choudhury S. // *Brazilian journal of plant physiology*. – 2005. – V. 17. – P. 95–102.
9. Hegedus A. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress / Hegedus A., Erdei S., Horvath G. // *Plant Science*. – 2001. – V. 160. – P. 1085–1093.
10. Krämer U. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants / Krämer U., Clemens S. // *Topics in Current Genetics*. – 2005. – V. 14. – P. 215–272.
11. Graedel T. E. Multilevel cycle of anthropogenic copper. / Graedel T. E., Van Beers D., Bertram M., Fuse K., Gordon R. B., Gritsinin A., et al. // *Environmental Science Technology*. – 2004. – V. 38. – P. 1242–1252.
12. Shrivastava A. K. A review of copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies / Shrivastava A. K. // *Indian Journal of Environmental Protection*. – 2009. – V. 29. – P. 552–560.
13. Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам / Гуральчук Ж. З. // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 107–117.
14. Добровольский С. А. О загрязнении участков вдоль автомагистралей г. Москвы тяжелыми металлами / Добровольский С. А. // *Инженерные изыскания*. – 2010. – №10. – С. 52–56.
15. Juknys R. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley / Juknys R., Vitkauskaitė G., Račaitė M., Vencloviėnė J. // *Central European Journal of Biology*. – 2012. – V. 7(2). – P. 299–306.
16. Sgherri C. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. / Sgherri C., Quartacci M. F., Navari-Izzo F. // *Journal of plant physiology*. – 2007. – V. 164. – P. 1152–1160.
17. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skoog F. // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V.15, №. 13. – P. 473–497.
18. Староверов В. В. Клеточная селекция в культуре *in vitro* льна многолетнего (*Linum perenne* L.) на устойчивость к окислительному стрессу / Староверов В. В., Степанова А. Ю., Терешонок Д. В., Литвинова И. И. // *Плодоводство и ягодоводство*. – 2011. – Т. 26. – С. 230–236.

19. Стальная И. И. Современные методы в биохимии / И. И. Стальная, Т. Г. Гаришвили; Под ред. Ореховича В. Н. – М.: Изд-во «Медицина», 1977. – 392 с.
20. Taddei S. Effect of copper on callus growth and gene expression of in vitro-cultured pith explants of *Nicotiana glauca* / Taddei S., Bernardi R., Salvini M., Pugliesi C., Durante M. // *Plant Biosystems*. – 2007. – V. 141(2). – P. 194–203.
21. Lukatkin A. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo / Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K. // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2014. – V. 28. – P. 80–86.
22. Гладков Е. А. Использование клеточной селекции для получения толерантных к тяжелым металлам газонных трав. / Гладков Е. А., Долгих Ю. И., Гладкова О. В. // *Известия Самарского научного центра РАН*. – 2013. – № 4. – С. 1258–1262.
23. Литвинова И. И. Введение в культуру клеток у растений, используемых в качестве кормовых, лекарственных и декоративных, для получения стрессоустойчивых форм / Литвинова И. И., Гладков Е. А. // *Сельскохозяйственная биология*. – 2012. – № 4. – С. 94–99.

### THE RELATIONSHIP BETWEEN COPPER RESISTANCEAS (AN ADVERSE ECOLOGICAL FACTOR) AND OXIDATIVE STRESS IN CALLUSES OF PERENNIAL FLAX (*LINUM PERENNE* L.)

*Stepanova A. Yu., Solov'eva A. I., Tashlieva I. I., Gladkov E. A.*

*K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russian Federation  
E-mail: step\_ann@mail.ru*

The heavy metal pollution has a negative effect on plants – it inhibits their growth, productivity and significantly reduces their decorative qualities. Recent studies indicate that oxidative stress plays a significant role in cell damage under heavy metal. Indeed, several heavy metals such as Cu, Cr, Fe are redox-active metals producing hydroxyl radicals, which are the most toxic form of ROS (reactive oxygen species), as a result of the Haber-Weiss reaction. Copper is a one of the major environmental pollutants of the environment due to its widespread use in industry and agriculture.

Direct experiments it was shown that copper cause the formation of hydroxyl radicals. However, studies on cross-resistance to heavy metals and oxidative stress have not been conducted. The aim of our work is to study the intensity of oxidative stress development in flax cells cultivated in vitro under the action of copper and to evaluate the possibility of obtaining cell lines that are resistant to both oxidative stress and copper using cell selection.

As an object of study used *Linum perenne* L. cv. "Blue silk". To obtain callus, cotyledons of sterile grown 14-day-old seedlings were placed in a modified MS medium with 2 mg/l of NAA, 4 mg/l of kinetin, 0.1 mg/l of 2.4-D. Evaluating the cell response to stress caused by copper, the callus were transferred on filter paper impregnated with a liquid medium containing  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  with a final  $\text{Cu}^{2+}$  content of 300  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ . To analyze the level of oxidative stress induced by Cu treatment in calluses the MDA content was measured. The plant material was incubated at *photoperiod of 16/8 h and the temperature was set to  $24 \pm 1$  °C*. To assess the viability used the indicator "growth index", as the difference between the final and initial mass divided by the initial and expressed in % relative to the control, which was taken as 100 %.

The first stage of work was to evaluate the influence of different concentrations of copper on callus growth. It was shown that Cu concentration of 300  $\mu\text{M}$  significantly decreased callus growth (about 60 % compared to the control), which indicates a strong inhibitory effect of this concentration. With increasing Cu content to 600 and 1000  $\mu\text{M}$ , viability was sustained only at 13 % and 5 % of calluses compared to the control, respectively (See Figure 1).

The MDA content in all flax calluses that was grown under Cu stress is higher than in the control. The maximum MDA content on 14-day-growth was observed in a medium containing 300  $\mu\text{M}$  of copper (See Figure 2). Thus, under the influence of heavy metals on flax callus there is an increase in the level of MDA, which indicates the development of oxidative stress. The next stage of the work was the evaluation of cell lines with high activity of SOD for resistance to Cu. The lines with high activity of SOD were selected at 1  $\mu\text{M}$  paraquat as an agent causing oxidative stress. It is shown that the lines selected on the paraquat showed higher resistance to Cu compared to the control calluses.

Thus, oxidative stress plays an important role in the damage of plant cells in the conditions of Cu pollution. Cell lines with higher resistance to oxidative stress caused by paraquat can be the basis for the producing of plants resistant to heavy metal contamination

The paper contains 2 Figures and 23 References

**Keywords:** *Linum perenne* L., callus, copper, oxidative stress.

#### References

1. Обзор состојанија и загађуваност околине у РФ за 2018 год/ Под ред. Черноговајев Г. М. 226 p. (М.: Институт глобалног климата и екологије Росгидромета и РАН, 2019). (In Russian).
2. Hall J. L., Williams L. E. Transition metal transporters in plants, *Journal of Experimental Botany*, **54(393)**, 2601 (2003).
3. Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environmental Chemistry Letters.*, **8(3)**, 199 (2010).
4. Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *Journal of Experimental Botany.*, **53**, 1351 (2001).
5. Sharma S. S., Dietz K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, *Trends in Plant Science.*, **14(1)**, 43 (2009).
6. Benavides M. P., Gallego S. M., Tomaro M. L. Cadmium toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**, 21 (2005).
7. Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.*, **40**, 18 (2000).
8. Panda S. K., Choudhury S. Chromium stress in plant, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**, 95 (2005).
9. Hegedus A., Erdei S., Horvath G. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress, *Plant Science.*, **160**, 1085 (2001).
10. Krämer U., Clemens S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants, *Topics in Current Genetics.*, **14**, 215 (2005).
11. Graedel T. E., Van Beers D., Bertram M., Fuse K., Gordon R. B., Gritsinin A., et al. Multilevel cycle of anthropogenic copper, *Environmental Science Technology.*, **38**, 1242 (2004).
12. Shrivastava A. K. A review of copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies, *Indian Journal of Environmental Protection*, **29**, 552 (2009).
13. Guralchuk Zh. Z. Mechanisms of Plant Resistance to Heavy Metals, *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants.*, **26, 2**, 107 (1994).

14. Dobrovolsky S. A. On the pollution of sections along highways of Moscow with heavy metals, *Engineering Surveys.*, **10**, 52 (2010).
15. Juknys R., Vitkauskaitė G., Račaitė M., Vencloviėnė J. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley, *Central European Journal of Biology*, **7**(2), 299 (2012).
16. Sgherri C., Quartacci M.F., Navari-Izzo F. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 1152 (2007).
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**(13), 473 (1962).
18. Staroverov V. V., Stepanova A. Yu., Tereshonok D. V., Litvinova I. I. Kletchnaya selektsiya v kul'ture in vitro l'na mnogoletnego (*Linum perenne* L.) na ustoychivost' k okislitel'nomu stressu, *Plodovodstvo i yagodovodstvo*, **26**, 230 (2011) (In Russian).
19. Stal'naya I. D. *Sovremennye metody v biokhimii*. 392 p. (M: Meditsina; 1977) (In Russian)
20. Taddei S., Bernardi R., Salvini M., Pugliesi C., Durante M. Effect of copper on callus growth and gene expression of in vitro-cultured pith explants of *Nicotiana glauca*. *Plant Biosystems*. **141**(2), 194 (2007).
21. Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.*, **28**, 80 (2014).
22. Gladkov E. A., Dolgih Yu. I., Gladkova O. V. Using of cell selection for lawn grass tolerance to heavy metals. *Izvestia of samara scientific center of the Russian academy of sciences*, **4**, 1258 (2013).
23. Litvinova I. I., Gladkov E. A. Introduction to cell culture used for obtaining fodder and decorative plants resistant to stress. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology.*, **4**, 94 (2012).