РЕАКЦИЯ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ НА НАНОЧАСТИЦЫ ФЕРРИГИДРИТА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ IN VITRO

СТУПКО Валентина Юрьевна, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН» **ЗОБОВА Наталья Васильевна**, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН» **ГУРЕВИЧ Юрий Леонидович**, Красноярский научный центр, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр такжений центр «Красноярский научный центр СО РАН»

Высокая биологическая активность наночастиц делает их перспективными для использования в составе удобрений. Разработка подобных продуктов невозможна без выявления механизмов влияния активного вещества на рост и развитие растений, а также определения критических точек, когда воздействие исследуемого агента имеет максимальный эффект. Биогенные ферригидриты представляются перспективным регулятором активности антиоксидантной системы растительных клеток, в том числе в условиях эдафических стрессов. Каллусные культуры известны как удобная модельная система для отслеживания реакции тканей и клеток растений на различные экзогенные воздействия. В настоящей работе приведены результаты исследования влияния наночастиц ферригидритов, полученных авторами, на рост и развитие культуры зрелых зародышей яровой мягкой пшеницы. Показано отсутствие конкурентного по отношению к 2,4-Д влияния использованных доз наночастиц ферригидритов (1 и 10 мг/л) на процесс дедифференцировки тканей зародыша. Присутствие исследуемого агента вызывало снижение скорости роста культуры. Однако при пересадке на свежую среду проявлялся отсроченный положительный эффект – снижение темпов старения тканей, тем больший, чем выше была доза на предыдущем этапе. Данный эффект может иметь решающее значение в полевых условиях при неблагоприятных эдафических и климатических факторах, что подтверждает перспективность представленных наночастиц для использования в сельском хозяйстве.

Введение. Исследования влияния наночастиц (НЧ) на физиологические процессы, происходящие в растениях, имеют две точки приложения. С одной стороны, это оценка рисков появления химически активных наноагентов, способных оказать ингибирующее влияние на рост биологических объектов [4], с другой – это развитие нанотехнологий в области агробизнеса, значительно ускоряющее темпы роста данного сектора, параллельно снижающее нагрузку на окружающую среду [13].

Применение нанотехнологий в сельском хозяйстве затрагивает многие области, в том числе доставку удобрений и гербицидов к растениям [12, 10], разработку наночипов для дистанционной диагностики почв, фитоэкспертизы [17, 19], получение посадочного материала кустарниковых культур [3]. Особняком стоят НЧ, продуцируемые растениями и микроорганизмами. Их называют «зелеными» НЧ, и относят к более экологичным в сравнении с аналогичными, получаемыми путем химического синтеза или физическими методами [19]. В настоящей работе биогенные НЧ ферригидрита (ФГ) получены в культуре аэробных бактерий, причем образуются они во внеклеточном пространстве. После удаления бактерий они выделяются в виде коллоидного раствора. Показано их стимулирующее влияние на окоренение ивы [2], посадочного материала садовых культур [3]. Повышение всхожести семян овса и корнеобразования, получаемых проростков под действием НЧ ФГ, свидетельствует о перспективности применения данных агентов в работе с зерновыми сельскохозяйственными культурами [9]. Имеются сведения об индуцирующем влиянии НЧ биогенного ФГ, допированных кобальтом и алюминием, на рост эмбриогенной массы и замедление старения культур сосны сибирской и кедрового стланика [1].

Положительные эффекты влияния НЧ биогенного ФГ на биологические объекты разного уровня организации, вероятно, обусловлены одним механизмом реагирования на стрессовые воздействия. Предположительно наночастицы биогенного ФГ, как и других оксидов железа, при поступлении в клетки и растительные ткани увеличивают содержания активных форм кислорода (АФК) и активность антиоксидантной системы, что способствует большей их жизнеспособности и активной пролиферации [2]. Подобную реакцию на воздействие вызывают НЧ оксидов железа и другой природы [15].

Несмотря на большое число исследований взаимодействия НЧ различной природы с растениями, вызванные ими процессы изучены не



до конца. Имеется множество свидетельств как положительного, так и негативного влияния их на растения [18]. Каллусные культуры являются удобным модельным объектом для изучения закономерностей взаимодействия растительных клеток с различными веществами и влияния их на растения. Данный подход дает возможность проследить действие агентов подробно на отдельных этапах онтогенеза, что позволяет разработать методики исследовании и применения перспективных типов НЧ. В таких системах в основном исследуются НЧ соединений меди, серебра, цинка, титана, кобальта [16].

Целью настоящей работы являлось выявление и оценка воздействия НЧ биогенного ФГ на индукцию и пролиферативную активность каллусных культур возделываемой в Красноярском крае мягкой яровой пшеницы.

Методика исследований. Объектами исследования служили каллусы зрелых зародышей яровой мягкой пшеницы сортов и линий селекции КрасНИИСХ. Для индукции каллусообразования использовали среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). В опытных вариантах ФГ вводили до стерилизации в концентрациях 1 и 10 мг/л. Через месяц образовавшиеся каллусы с каждой из сред пассировали в равных количествах на среды пролиферации двух вариантов: $MC+2M\Gamma/\pi$ 2,4-Д и $MC+2M\Gamma/\pi$ 2,4-Д+1 $M\Gamma/\pi$ $\Phi\Gamma$. Культивирование проводили на светоустановках белого света при освещенности 3500 Лк, световом режиме 14ч/10ч день/ночь и температуре 22-25 °C.

На обоих этапах на 30-е сутки фиксировали размер каллусов и наличие хлорофилл-содержащих областей (ХСО). На среде пролиферации на 30-е и 44-е сутки отмечали долю некротизированных каллусов, имевших оранжевую окраску и окрашивающих среду культивирования.

Наночастицы $\Phi\Gamma$ выделяли из культуры аэробных бактерий *Delftia tsuruhatensis* в виде коллоидного раствора [2, 20].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием Statistica 8.0 (StatSoftInc. 2008). С целью приведения к нормальному распределению данные по размерам каллуса на среде пролиферации подвергали преобразованию Бокса-Кокса по формуле:

$$y = \frac{x^{0.177523} - 1}{0.177523},\tag{1}$$

где x размер каллуса, мм 3 .

Для всех средних величин рассчитывали стандартную ошибку, достоверность влияния факторов оценивали с применением двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для частотных переменных рассчитывали точный критерий Фишера для двупольных таблиц, Хиквадрат.

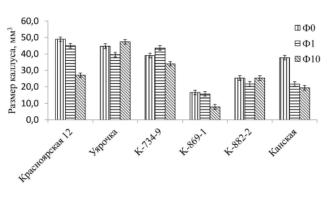
Результаты исследований. Для разработки методик применения каких-либо сельскохозяйственных препаратов необходимо точно знать, на каком этапе онтогенеза они оказывают максимальное воздействие.

Анализ воздействия НЧ на каллусогенез на стадии индукции позволяет оценить влияние исследуемого агента на дедифференцировку клеток, индуцируемую высокими концентрациями ауксина 2,4-Д. Наночастицы могут выступать также как гербициды, из-за чего прямое внесение НЧ в почву при выявленном ингибирующем влиянии ФГ на эффективность гербицидной обработки может быть нежелательно. В настоящей работе не обнаружено влияния введения НЧ ФГ в среду индукции на частоту каллусогенеза – тест Краскела-Уоллиса H (2, N = 18) = 2,72, p = 0,26.Размер формируемого каллуса, вне зависимости от состава среды ($F_{[10,285]} = 16,1; \eta^2 = 0,22, p<0,01$), определял генотип донорного растения (см. рисунок). Минимальные размеры сформированного каллуса в среднем по средам имела линия К-869-1, максимальные – сорт Уярочка. Для данного сорта наибольший размер каллусов получен на среде с 10 мг/л ФГ.

В работе [11] описаны различия в реакции двух каллусных культур на введение в среду НЧ ${\rm TiO_2}$, ${\rm Al_2O_3}$, ${\rm ZrO_2}$, ${\rm ZnO}$. Тестирование проводили на каллусах двух сортов пшеницы контрастных по устойчивости к засухе. Авторы пришли к выводу о различиях в строении клеточных мембран, которые ответственны за взаимодействие этих сортов с НЧ. Сорт, чувствительный к воздействию засухи, оказался более чувствителен к токсическому влиянию НЧ. В нашем случае сорт Уярочка, засухоустойчивый в ряде лабораторных тестов, в полевых условиях и производственных испытаниях в Республике Бурятия [7] слабо реагировал на НЧ (см. рисунок).

Вместе с этим статистически значимое влияние на рост каллуса оказывали НЧ. В сравнении с контролем присутствие в среде индукции 1 мг/л ФГ не вызывало значимых изменений в конечном объеме недифференцированного скопления клеток (33,6±1,15 мм³ и 29,2±1,15 мм³ соответственно). Малая величина эффекта для фактора «уровень ФГ» ($F_{[2,285]}$ = 4,8; η^2 = 0,03, p = 0,009), вероятно, ассоциирована именно с этим. Однако следует заметить, что при 1 мг/л ФГ в среде индукции сорт К-734-9 показал тенденцию увеличения размера каллуса, а у остальных 6 сортов наблюдалась тенденция к снижению дан-





Влияние генотипа донорного растения и состава среды индукции (ФО – контрольная, Ф1 – 1 мг/л ФГ, Ф10 – 10 мг/л ФГ) на размер формирующегося каллуса (мм³) (среднее±ст.ош.)

ного параметра. Увеличение концентрации $\Phi\Gamma$ до 10 мг/л привело к статистически значимому уменьшению размеров каллуса до $24,1\pm1,15$ мм³ (p<0,05). В целом можно отметить, что НЧ оказывают существенное влияние на каллусогенез, которое зависит от их концентрации в среде индукции.

Ингибирующий эффект НЧ металлов на каллусогенез отмечен и в других работах, однако при значительно более высоких концентрациях. Для наночастиц меди показана токсичность для культуры незрелых зародышей пшеницы при концентрациях от 100 мг/л, что выражалось в подавлении каллусогенеза и прорастания зародышей [4]. В работе с суспендированными каллусными культурами Catharanthus roseus ингибирование роста культуры наблюдали уже при концентрации НЧ меди 1 мг/л [6]. В то же время концентрация 0,1 мг/л ФГ в исследовании культуры зрелых зародышей сосны сибирской способствовала увеличению суммарного объема каллуса в 2 раза в сравнении с данными, полученными на контрольной среде [5]. Показана токсичность для эмбриогенной культуры НЧ ФГ в концентрации 10 мг/л, приведшая к полному некрозу тканей [1]. НЧ оксида железа в концентрациях 2–33 мг/л в культуре Daucus carota снижали пролиферативную активность культуры и число соматических эмбриоидов [14]. В исследованиях на целых растениях токсический эффект НЧ Fe_3O_4 (магнетита) (5–20 мг/л) не наблюдали и отмечали увеличение активности антиоксидантных ферментов [15]. При относительно высокой концентрации и таком же механизме влияния вызванный ими рост АФК может привести к эффектам токсичности. При этом положительные или отрицательные воздействия на различные виды растений не требуют участия различных механизмов влияния (иначе потребуется исключительно много генетических, биохимических и физиологических систем реагирования на различные стрессовые воздействия). Универсальность реагирования на стрессовые воздействия энергетически выгодна организму. Таким образом, влияние НЧ на клеточную культуру более выражено, чем на целый организм.

Использование НЧ в предобработке семян и черенков посадочного материала [3; 19] предполагает наличие их последействия. В настоящей работе на этапе пролиферации для каллусов, пассированных со среды с $\Phi\Gamma$ (1 мг/л) на среду того же состава ($\Phi\Gamma$ 1 мг/л), выявлено увеличение доли некротизированых каллусов по сравнению с каллусами, пассированными на контрольную среду (без $\Phi\Gamma$) (p = 0,04 для точного критерия Фишера). 43,5 % образцов на среде с ФГ в этих условиях к 30-м суткам культивирования имели оранжевую окраску и затемнения в среде культивирования. На контрольной среде этот показатель был 27,9 %. Однако у образцов, пассированных с контрольной среды (без НЧ) на два варианта сред пролиферации (с 1 мг/л НЧ $\Phi\Gamma$ и без $\Phi\Gamma$), подобная реакция не наблюдалась. Таким образом, мы имеем дело именно с последействием НЧ, в то время как наличие ФГ в исследуемой концентрации в самой среде пролиферации никак не сказывалось на данном параметре.

Также отсутствовало значимое влияние внесения ФГ в среду пролиферации на увеличение объемов каллусов. Однако в этих условиях, вне зависимости от предшествующей среды культивирования, зафиксирована доля ХСО в два раза меньшая (14 %) чем на контрольной среде (30 %), что говорит, как было показано нами ранее, о снижении регенерационного потенциала культуры [8].

К 44-м суткам (при стандартном сроке культивирования на одной среде 30 суток) доля некротизированных каллусов на среде пролиферации, пассированных с контрольной среды и сред, содержащих 1 мг/л $\Phi\Gamma$ и 10 мг/л, в среднем составила 46,2; 35,7 и 24,5 % (χ^2 = 5,89, p = 0,05) соответственно, вне зависимости от присутствия $\Phi\Gamma$ в среде пролиферации.

Замедление старения культуры на средах с НЧ ФГ показано и в работе [5]. Максимальный эффект достигался при концентрации 0,1 мг/л. Данное явление позволяет сэкономить ресурсы на поддержание жизнеспособности культуры за счет более редкого пассирования каллусов на свежую среду. Таким образом, с увеличением сроков культивирования на среде пролиферации становится очевидным бенефис от внесения НЧ ФГ в среду индукции каллусогенеза. Поскольку каллусы пшеницы в нашей работе пассировались все, независимо от размера, то можно говорить о том, что, несмотря на ингибирующий эффект, оказываемый ФГ на рост каллусов при «прямом»



воздействии на среде индукции, имеется явное преимущество сформированных в этих условиях каллусов по жизнеспособности над аналогичными, сформировавшимися в отсутствии НЧ ФГ в среде.

Заключение. На основании представленных данных можно утверждать, что наночастицы биогенного ферригидрита снижают частоту дедифференцировки клеток и размер (объем) каллусов при внесении их в среду индукции. Статистически значимый рост токсичности при увеличении концентрации говорит о высокой биологической активности наночастиц ФГ и концентрационной зависимости эффекта воздействия. Этот вывод нельзя рассматривать как частный случай, т.к. тестирование активности наночастиц проводили на 6 сортах пшеницы.

Проявление видимого эффекта уже при концентрации 10 мг/л в свете имеющихся данных о токсическом воздействии НЧ, например, меди в больших концентрациях так же свидетельствует о повышенной активности исследуемого агента. Вероятно, в ходе формирования каллусов происходит поглощение НЧ тканями, что проявляется при пересадке на свежую среду пролиферации как последействие НЧ — снижается скорость некротизации (старения) каллуса.

Таким образом, прямое воздействие НЧ при внесении их в питательную среду в исследованных количествах можно считать скорее токсическим в отличие от выявленного отсроченного положительного эффекта. Остается неясным, связано ли последействие с накоплением малых доз НЧ внутри формирующихся каллусных тканей, что может свидетельствовать о необходимости работы с более низкими дозами НЧ. Возможно, меньшие концентрации НЧ ФГ позволят не только снизить их токсичность при сохранении высокой антиоксидантной активности в клетках, связанной с замедлением некротизации тканей, но и получить устойчивый положительный эффект.

Замедление старения культуры в условиях доказанного последействия НЧ ФГ представляет собой хозяйственно-ценный эффект. В полевых условиях данное явление может иметь важное значение при неблагоприятных условиях среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Аксиненко М.А., Носкова М.А. Влияние наночастиц на пролиферацию эмбриогенных масс сибирских хвойных // Экология России и сопредельных территорий: материалы XXII Междунар. эколог. студ. конф. Новосибирск, 2017. С. 147.
- 2. Влияние наночастиц биогенного ферригидрита на окоренение одревесневших черенков ивы Ледебура / В.Л. Бопп [и др.] // Биофизика. 2018б. Т. 63. N° 4. С. 621–628.

- 3. Исследование влияния наночастиц биогенного ферригидрита на ризогенез черенкового материала садовых культур / В.Л. Бопп [и др.] // Адаптивность сельскохозяйственных культур в экстремальных условиях Центрально- и Восточно-Азиатского макрорегиона: материалы симпозиума с международным участием. Красноярск, 2018а. С. 149–160.
- 4. *Кирисюк Ю.В., Демидчик В.В.* Влияние наночастиц меди на рост каллусной культуры, полученной из незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. // Журнал Белорусского гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 23–30.
- 5. Носкова М.А., Аксиненко М.А. Перспективы использования наночастиц биогенного ферригидрита для индукции соматического эмбриогенеза у сибирских хвойных // Экология России и сопредельных территорий: материалы XXII Междунар. эколог. студ. конф. Новосибирск, 2017. С. 158.
- 6. Потороченко О.С., Филиппова С.Н. Влияние наночастиц меди на ростовые параметры и содержание фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don // Биологическая осень 2017: к Году науки в Беларуси: тезисы докладов Междунар. науч. конф. молодых ученых, 9 ноября 2017 г., Минск, Беларусь. Минск: БГУ, 2017. С. 42–44.
- 7. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Сидоров А.В., Гаевский Н.А. Перспективные способы оценки яровой мягкой пшеницы на чувствительность к эдафическим стрессам // Достижения науки и техники АПК. 2019. Т. 33. № 10. С. 45–50.
- 8. Фотоморфогенез эмбриогенных каллусов пшеницы в условиях эдафических стрессов / Н.В. Терлецкая [идр.] // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. $2018. N^{\circ} 3-5. C.43-51.$
- 9. Шевелев Д.И., Хижняк С.В., Гуревич Ю.Л., Теремова М.И. Влияние биогенных наночастиц ферригидрита на всхожесть семян и биометрические показатели проросток овса Avena sativa L. // Успехи современной науки. $2017. T. 5. N^{\circ} 2. C. 57-61.$
- 10. *Anderson A. J.* The Power of Being Small: Nanosized Products for Agriculture // Res. Plant Dis., 2018, Vol. 24(2), P. 99–112.
- 11. *Czyzowska A., Barbasz A.* Effect of ZnO, TiO_2 , Al_2O_3 and ZrO_2 nanoparticles on wheat callus cells // Acta Biochimica Polonica, 2019, Vol. 66(3), P. 365–370.
- 12. *Ditta A., Arshad M.* Applications and perspectives of using nanomaterials for sustainable plant nutrition // Nanotechnol. Rev., 2016, Vol. 5(2), P. 209–229.
- 13. Fraceto L.F., Grillo R., de Medeiros G.A., Scognamiglio V., Rea G., Bartolucci C. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? // Front. Environ. Sci., 2016, Vol. 4, P. 20.
- 14. Giorgetti L., Ruffini Castiglione M., Bernabini M., Geri C. Nanoparticles effects on growth and differentiation in cell culture of carrot (*Daucus carota* L.) // Agrochimica-Pisa, 2011, Vol. 55(1), P. 45–53.
- 15. *Iannone M.F., Groppa M.D., de Sousa M.E., van Raap M.B.F., Benavides M.P.* Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: evaluation of oxidative damage // Environ. Exp. Bot., 2016, Vol. 131, P.77–88.



16. *Kim D.H.*, *Gopal J.*, *Sivanesan I.* Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed // RSC Adv., 2017, Vol. 7(58), P. 36492–36505.

17. Park H.J., Sung H.K., Hwa J.K., Seong H.C. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases // Plant Pathol. J., 2006, Vol. 22(3), P. 295–302.

18. Rastogi A., Zivcak M., Sytar O., Kalaji H.M., He X., Mbarki S., Brestic M. Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Plant: A Critical Review // Front. Chem., 2017, Vol. 5, P. 78.

19. *Shang Y., Hasan M.D.K., Ahammed G.J., Li M., Yin H., Zhou J.* Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review // Molecules, 2019, Vol. 24(14), P. 2558.

20. Teremova M.I., Petrakovskaya E.A., Romanchen-ko A.S., Tuzikov F.V., Gurevich Yu.L., Tsibina O.V., Yakubailik E.K., Abhilash Dr. Ferritization of industrial waste water and microbial synthesis of iron-based magnetic nanomaterials from sediments // Environmental Progress & Sustainable Energy, 2016, Vol. 35(5), P. 1407–1414.

Ступко Валентина Юрьевна, канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН». Россия.

Зобова Наталья Васильевна, д-р с.-х. наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН». Россия.

660041, Красноярский край, г. Красноярск, просп. Свободный, 66.

Тел.: (391) 247-20-85; e-mail: zobovnat@mail.ru.

Гуревич Юрий Леонидович, д-р физ.-мат. наук, главный научный сотрудник, Красноярский научный центр, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН». Россия.

660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50. Тел.: 89029159940; e-mail: btchem@mail.ru.

Ключевые слова: яровая пшеница; наночастицы; биогенные ферригидриты; каллусная культура; модельные системы; удобрения.

RESPONSE OF WHEAT CELLS TO FERRIHYDRITE NANOPARTICLES UNDER MODEL SYSTEM IN VITRO

Stupko Valentina Yurievna, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Researcher, Kras-noyarsk Research Institute of Agriculture, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS", Russia.

Zobova Natalya Vasilevna, Doctor of Agricultural Sciences, Senior Researcher, Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS", Russia.

Gurevich Yuri Leonidovich, Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Senior Re-searcher, Krasnoyarsk Scientific Center, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS", Russia.

Keywords: spring wheat; nanoparticles; biogenic ferrihydrites; callus culture; model sys-tems; fertilizers

High biological activity of nanoparticles (NPs) makes them promising for using in fertilizers composition. Design of such products is impossible without detection of active substance influence mechanisms on growth and development of plant as well as without detection of critical points, when influence of the investigated

agent is at its maximum. Bio-genic ferrihydrites (FH) are promising regulators of plant cell antioxidant system activity, also under edaphic stresses. Callus cultures are well known as convenient model system for screening of tissue and cell response to different environmental exposure. Investigation re-sults of FH NP`s, which were produced by authors, influence on growth and development of callus culture of soft spring wheat mature wheat embryos of are presented in present arti-cle. The absence of competitive in relation to 2,4-D influence of involved levels of FH NPs (1 and 10 mg/l) on dedifferentiation process of embryo tissues was indicated. The presence of investigated agent induced the decrease of culture growth rate. However, postponed pos-itive effect manifested in reduction of ageing rate after passing to fresh medium, the bigger, the higher had been FH NP's level at the previous cultivation stage. The present effect may be of critical importance under field conditions under the influence of unfavorable edaphic and climatic factors, which adds further credence the potential of presented NPs applicabil-ity in agriculture.



