

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛОВ В СОСТАВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ:

### ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

доктор биологических наук, доцент **А. А. Гусев**<sup>1,2,4</sup>

кандидат биологических наук **О. В. Захарова**<sup>1,2</sup>

кандидат биологических наук **Е. О. Колесникова**<sup>3</sup>

**И. А. Васюкова**<sup>1</sup>

**Н. А. Евтушенко**<sup>4</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»,  
г. Тамбов, Российская Федерация

2 – ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,  
г. Москва, Российская Федерация

3 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара  
им. А.Л. Мазлумова», посёлок ВНИИСС, Российская Федерация

4 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова»,  
г. Воронеж, Российская Федерация

Актуальным вопросом является исследование проблем и разработка методов получения посадочного материала древесных культур с использованием культуры изолированных тканей, способствующей быстрому массовому размножению, оздоровлению чистых ценных древесных генотипов для восстановления лесных насаждений, а также в ходе селекции. В процессе исследований были приготовлены питательные среды MS, модифицированные наночастицами на основе металлов для повышения эффективности технологии микроклонального размножения древесных культур. Такие модификации должны усилить рост и морфогенез растений, а также снизить микробную нагрузку как в питательной среде, так и во вводимых из нестерильных условий эксплантах. Кроме того, снижение себестоимости производимых эксплантов путем замены на коллоидные растворы наночастиц традиционно используемых стимуляторов роста и уменьшение числа процедур по дезинфекции может существенно повысить привлекательность метода микроклонального размножения для лесного и сельского хозяйства. Предварительные исследования показали повышение выживаемости микроклонов гибридной формы тополя белого и осины, что указывает на перспективность выбранного подхода.

**Ключевые слова:** древесные культуры, микроклональное размножение, наночастицы металлов, питательные среды.

## USE OF NANOPARTICLES BASED ON METALS IN THE COMPOSITION OF MODIFIED MEDIA FOR MICROCLONAL REPRODUCTION OF WOODY PLANTS: PRELIMINARY RESULTS

DSc (Biology), Associate Professor **A. A. Gusev**<sup>1,2,4</sup>

PhD (Biology) **O. V. Zakharova**<sup>1,2</sup>

PhD (Biology) **E. O. Kolesnikova**<sup>3</sup>

**I. A. Vasyukova**<sup>1</sup>

**N. A. Evtushenko**<sup>4</sup>

1 – Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Tambov State University named after G.R. Derzhavin», Tambov, Russian Federation

2 – Federal State Autonomic Education Institution of Higher Education «National Research Technological University «MISiS», Moscow, Russian Federation

3 - FSBU «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumova», village VNISS, Russian Federation

4 – Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov», Voronezh, Russian Federation

### Abstract

Study of the problems and development of methods for obtaining tree-like plant material using a culture of isolated tissues that promotes rapid mass reproduction and healing of pure valuable tree genotypes for the restoration of forest plantations, as well as in selection is highly relative issue. We have prepared MS-modified nutrient media modified with metal nanoparticles to increase the efficiency of microclonal propagation of woody cultures. It is assumed that this modification will enhance the growth and morphogenesis of plants, as well as reduce the microbial load, both in the nutrient medium and in the resulting explants. In addition, reducing the cost of explants produced by replacing nanoparticles with traditionally used growth stimulants with colloidal solutions and reducing the number of disinfection procedures can significantly increase the attractiveness of the microclonal propagation method for forestry and agriculture. Preliminary studies have showed an increase in the survival of white poplar and aspen hybrid microclones, which indicates the promise of the chosen approach.

**Keywords:** woody plants, microclonal reproduction, metal nanoparticles, cultivation media.

Актуальным вопросом является изучение проблем и разработка методов получения посадочного материала древесных культур с использованием культуры изолированных тканей, способствующей быстрому массовому размножению, оздоровлению чистых ценных древесных генотипов для восстановления лесных насаждений, а также в ходе селекции.

В современном сельском хозяйстве и биотехнологических приложениях все большую популярность набирают препараты, содержащие наночастицы (НЧ), обладающие огромным потенциалом. Более того, предполагается, что интеграция передовых нанотехнологий в сельском хозяйстве приведет к глобальному экономическому росту до ~ 3,4 триллиона долларов США к 2020 году [1, 2]. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам НЧ перспективны для повышения качества продуктов питания, защиты растений, выявления болезней, мониторинга роста расте-

ний, сокращения количества отходов и др. [3, 4, 5, 6, 7, 8]. При этом влияние НЧ на различные виды растений может значительно варьироваться в зависимости от стадии роста, способа и продолжительности воздействия на растения и зависит от формы, размера, химического состава, концентрации, структуры поверхности, агрегации и растворимости НЧ [9, 10, 11].

В последнее время был продемонстрирован потенциал использования наночастиц в микроклональном размножении растений. НЧ влияли на культуры растительных клеток и в связи с этим могут существенно повлиять на различные аспекты биотехнологии растений, в том числе методы дезинфекции клеточных культур, дифференцировки каллуса, генетических трансформаций, соматональных вариаций и производства вторичных метаболитов [12]. Примером могут служить результаты экспериментов с НЧ серебра [13, 14], применяемых для дезинфекции эксплантов. В ряде иссле-

дований показано положительное влияние НЧ на индукцию каллуса, регенерацию и рост побегов растений. В [15] оценивали влияние НЧ серебра в концентрациях от 5 до 80 мг/л отдельно или в сочетании с 6-бензиламино-пурином и индолуксусной кислотой на свойства роста *Tecomella undulata* в асептическом состоянии. Экспланты подвергали поверхностной стерилизации с использованием 10 % Слогох в течение 7-8 минут. Результаты показали, что добавление НЧ Ag в концентрации 10 мг/л в среду МС увеличивало среднее количество свежих побегов, процент эксплантов, продуцирующих побеги, а также выживание растений за счет ингибирующего действия НЧ на выработку этилена. При культивировании узловых эксплантов *T. undulata* на среде МС, обогащенной 60 мг/л НЧ Ag, 2,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,1 мг/л индолуксусной кислоты, наблюдалось значительное увеличение длины индуцированных и процент произведенных побегов [16]. При клональном микроразмножении растений *Mentha longifolia* добавление 0,5 мг/л НЧ Cu и 0,8 мг/л НЧ Co в модифицированную среду МС привело к увеличению высоты и индекса роста растений на 45-48,4 %, количества междоузлий на 29,4-33,9 %, количества побегов на 55,6-66,2 %, а коэффициент воспроизводства составил 30-40 % [17]. Анваар и др. сообщили, что добавление НЧ CuO в концентрации 10 мг/л увеличивает скорость органогенеза в культурах риса до 94 % [18].

Стоит отметить, что эффективность НЧ в устранении микробных загрязнений в культурах растительных тканей зависит от их типа НЧ, размера распределения в тканях. Несколько исследователей сообщили о токсических эффектах НЧ на экспланты, поэтому необходимо исследовать влияние различных типов и уровней НЧ на клеточные культуры, полученные от разных видов растений, для определения эффективного типа НЧ и наилучшей дозы, не оказывающей фитотоксического действия. Эффективность НЧ также может быть улучшена с помощью синергических эффектов, когда они сочетаются со стерилизующими агентами или антибиотиками. Следует отметить, что исследования по микроразмножению лесных древесных культур с использованием НЧ единичны.

В данной работе использовались питательные среды MS, модифицированные НЧ серебра и оксида меди для повышения эффективности технологии мик-

роклонального размножения гибридной формы тополя белого и осины. Предполагается, что данная модификация позволит усилить рост и морфогенез растений, а также снизить микробную нагрузку как в питательной среде, так и в получаемых эксплантах. Кроме того, снижение себестоимости производимых эксплантов путем замены на коллоидные растворы наночастиц традиционно используемых стимуляторов роста и снижение числа процедур по дезинфекции может существенно повысить привлекательность метода микроразмножения для лесного и сельского хозяйства.

НЧ серебра и оксида меди размером 5-20 нм были синтезированы в НИТУ «МИСиС» (Россия) методом химического осаждения из растворов солей с последующим восстановлением [19]. Затем был осуществлен перевод НЧ в коллоидное состояние с помощью ультразвуковой обработки с использованием погружного ультразвукового гомогенизатора Sonics VC750, Bandelin SONOPULS HD 2200 (Bandelin electronic, Германия). Оценка качественных и количественных характеристик частиц в коллоидном растворе проводилась с использованием просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEM 2100 высокого разрешения фирмы JEOL (Япония). Для точного обнаружения агрегатов и измерения разбавленных образцов применялся высокоэффективный двухугловой анализатор размеров частиц и молекул Zetasizer Nano ZS фирмы Malvern Instruments (Великобритания) и атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) iCAP 6300 Radial View фирмы Thermo Fisher Scientific Inc. (США).

В качестве основы для создания модифицированных сред использовалась питательная среда Мура-сиге-Скуга (MS) (табл. 1), наиболее часто используемая для выращивания растительной культуры клеток или целых растений.

Для модификации питательных сред использовались полученные водные коллоидные водные растворы НЧ Ag и CuO в концентрации от 0,1 до 0,0001 г/л.

Культивирование эксплантов проводилось в стерильной климатической камере при 16-часовом фотопериоде, температуре 23-25 °С, освещённости 5 тыс. люкс и влажности воздуха 70 %.

Через два месяца культивирования было отмечено положительное влияние растворов наночастиц на ростовые процессы меристем растений в культуре тканей (рис. 1).

Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

	Компоненты	Содержание, мг/л
1	Калий азотнокислый $KNO_3$	1900
2	Калий дигидрофосфат $KH_2PO_4$	170
3	Нитрат аммония $NH_4NO_3$	1650
4	Сульфат магния $MgSO_4 \times 7H_2O$	370
5	Хлорид кальция $CaCl_2 \times 2H_2O$	440
6	Сульфат железа (II) $FeSO_4 \times 7H_2O$	37,3
7	Натрий железная соль этилендиаминтетрауксусной кислоты $Na_2EDTA \times 2H_2O$	27,8
8	Йодид калия KI	0,83
9	Борная кислота $H_3BO_3$	6,2
10	Сульфат марганца (II) $MnSO_4 \times 4H_2O$	22,3
11	Хлорид кобальта $CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025
12	Сульфат меди (II) $CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025
13	Сульфат цинка $ZnSO_4 \times 7H_2O$	8,6
14	Молибдат натрия $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,25
15	Тиамин-HCl	0,5-1,5
16	Пиридоксин-HCl	0,4-0,6



Рис. 1. Микроклоны на питательных средах с добавлением НЧ серебра и оксида меди разных концентраций. Справа – контроль

Количество выживших в процессе пассирования микроклонов было больше на 20-10 % по сравнению с контролем (питательная среда без добавления наночастиц) (табл. 2).

Полученные нами данные согласуются с результатами других работ [15, 16, 17]. Таким образом, предварительные исследования эффективности добавления модифицированных НЧ серебра и оксида меди в питательные среды MS для микроклонирования показали повышение выживаемости эксплантов гибридной формы тополя белого и осины, что указывает на пер-

Таблица 2

Показатели развития микроклонов через 2 месяца после начала эксперимента

№	Содержание наночастиц в питательной среде, мкл/л	Количество выживших микроклонов, %	Высота микроклонов, см.	Состояние по 5-ти бальной шкале	Число дополнительных побегов, шт.
1	Контроль	80,0	3,5	5	0
	500 AgNpS	90,0	4,2	5	2
	500 CuO	90,0	3,8	5	1
2	Контроль	82,0	3,3	5	0
	1000 AgNpS	100,0	4,0	5	2
	1000 CuO	100,0	3,0	5	1

спективность выбранного направления. Однако требуется проведение дополнительных исследований, включающих биохимические, гистологические и микробиологические методы оценки.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект RFMEFI57417X0159).

### References

1. Sabourin V., Ayande A. Commercial opportunities and market demand for nanotechnologies in agribusiness sector. *Journal Technol. Manag. Innov.*, 2015, no. 10, p. 40-51.
2. Sodano V., Verneau F. Competition policy and food sector in the European Union. *Journal Int. Food Agribus. Mark.*, 2014, no. 26, 155-172 p.
3. Ruttkay-Nedecky B., Krystofova O., Nejdil L., Adam V. Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, no 15. 33 p.
4. Bandyopadhyay S., Peralta-Videa J. R., Gardea-Torresdey J. L. Advanced analytical techniques for the measurement of nanomaterials in food and agricultural samples: a review. *Environmental Engineering Science*, 2013, vol. 30, no 3, 118-125 p.
5. Nadiminti P. P. et al. Nanostructured liquid crystalline particles as an alternative delivery vehicle for plant agrochemicals *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2013, vol. 5, no 5, pp. 1818-1826.
6. Sekhon B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview *Nanotechnol Sci Appl.*, 2014, no 7, pp. 31-53.
7. Fraceto L. F. [et al.] Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? *Front. Environ. Sci.*, 2016, no 4, 20 p.
8. Pérez-de-Luque A., Hermosin M. C. Nanotechnology and its use in agriculture *Bio-nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*; eds. D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, F. Shahidi. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 2013, pp. 299-405.
9. Ghormade V., Deshpande M. V., Paknikar K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants *Biotechnol Adv.*, 2011, no 29(6), 792-803 p.
10. Aslani F. et al. Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview *The Scientific World Journal Volume*, 2014, Article ID 641759, 28 p.
11. Siddiqi K. S., Husen A. Plant Response to Engineered Metal Oxide Nanoparticles *Nanoscale Res Lett.*, 2017, no 12, 92 p.
12. Kim D. H., Gopal J., Sivanesan I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed *RSC Adv.*, 2017, no 7, p. 36492-36505.
13. Abdi G. H., Salehiand H., Khosh-Khui M. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis L.*) tissue culture *Acta Physiol. Plant.*, 2008, no 30, pp. 709-714.
14. Gouran A. et al. Effect of silver nanoparticles on grapevine leaf explants sterilization at in vitro conditions *2nd National Conference on Nanotechnology from Theory to Application. Isfahan. Iran.*, 2014, 20 February. p. 1-6.
15. Aghdaei M., Salehi H., Sarmast M. K. Effects of silver nanoparticles on *Tecomella undulata (Roxb.) Seem*, micropropagation *Adv. Hortic. Sci.*, 2012, no 26, p. 21-24.
16. Sarmast M. K., Niazi A., Salehi H., Abolmoghadam A. Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* in vitro culture *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 2015, no 121, p. 227-236.
17. Talankova-Sereda T. E. et al. The Influence of Cu and Co Nanoparticles on Growth Characteristics and Biochemical Structure of *Mentha Longifolia* in Vitro *Nanosci. Nanoeng.*, 2016, no 4, p. 31-39.
18. Anwaar S. et al. The Effect of Green Synthesized CuO Nanoparticles on Callogenesis and Regeneration of *Oryza sativa L.* *Front. Plant Sci.*, 2016, no 7, p. 1330.
19. Pandian A. M. K., Karthikeyan C., Rajasimman M., Dinesh M. G. Synthesis of silver nanoparticle and its application *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2015, V. 121, p. 211-217.

### Сведения об авторах

*Гусев Александр Анатольевич* – директор НИИ экологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина», старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова», доктор биологических наук, доцент, г. Тамбов, Российская Федерация; e-mail: nanosecurity@mail.ru.

*Захарова Ольга Владимировна* – помощник директора НИИ экологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина», эксперт ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», кандидат биологических наук, доцент, г. Тамбов, Российская Федерация; e-mail: olgazakharova1@mail.ru.

*Колесникова Елена Олеговна* – заведующая лабораторией культуры тканей сахарной свеклы и редких видов растений отдела биотехнологии ФГБНУ «ВНИИСС имени А.Л. Мазлумова», старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, поселок ВНИИСС, Воронежская область, Российская Федерация; e-mail: kolelkb@mail.ru.

*Васюкова Инна Анатольевна* – аспирант ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина», г. Тамбов, Российская Федерация; e-mail: vasyukovaia@gmail.com

*Евтушенко Надежда Александровна* – аспирант ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова», г. Воронеж, Российская Федерация, e-mail: nadya.evtushenko.94@mail.ru.

### Information about authors

*Gusev Alexander Anatolyevich* – Director of the Scientific and Research Institute for Environmental Science and Biotechnology of the Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Derzhavin Tambov State University», Senior Researcher of the NUST «MISiS», Researcher of the Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov», DSc in Biology, Associate Professor, Tambov, Russian Federation; e-mail: nanosecurity@mail.ru.

*Zakharova Olga Vladimirovna* – Assistant Director of the Scientific and Research Institute for Environmental Science and Biotechnology of the Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Derzhavin Tambov State University», Expert of the NUST «MISiS», PhD in Biology, Tambov, Russian Federation; e-mail: olgazakharova1@mail.ru.

*Kolesnikova Elena Olegovna* – research officer of the tissue culture laboratory, head of the laboratory of tissue culture, Federal State Budgetary Scientific Institution «The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar», PhD in Biology, vil. VNISS, Voronezh region, Russian Federation; e-mail: kolelkb@mail.ru.

*Vasyukova Inna Anatolyevna* – Post-graduate student of the Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Derzhavin Tambov State University», Tambov, Russian Federation; e-mail: vasyukovaia@gmail.com.

*Evtushenko Nadezhda Aleksandrovna* – Post-graduate student of the Federal State Budget Education Institution of Higher Education «Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov», Voronezh, Russian Federation; e-mail: nadya.evtushenko.94@mail.ru.