

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ БИОГЕННОГО ФЕРРИГИДРИТА НА ОКорЕНЕНИЕ ОДРЕВЕСНЕВШИХ ЧЕРЕНКОВ ИВЫ ЛЕДЕБУРА

© 2018 г. В.Л. Бопц, Н.А. Мистратова, Э.А. Петраковская*, Ю.Л. Гуревич*, М.И. Теремова*, Р.Г. Хлебопрос*

Красноярский государственный аграрный университет, 660049, Красноярск, пр. Мира, 90

E-mail: vl_kolesnikova@mail.ru

**Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», 660036, Красноярск, Академгородок, 50*

E-mail: btchem@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.18 г.

После доработки 19.04.18 г.

Исследовано влияние наночастиц биогенного ферригидрита на окоренение одревесневших черенков ивы Ледебура (*Salix ledebouriana Trautv.*). Образование корней у стеблевых черенков стимулировали замачиванием в воде с использованием фитогормона (индолил-3-уксусной кислоты) и наночастиц. Показано, что количество и общая длина придаточных корней через 5 и 15 суток окоренения были наибольшими у черенков, обработанных наночастицами, по сравнению с вариантами экспозиции черенков в воде и в растворе с индолил-3-уксусной кислотой. В начальный период корнеобразования в спектрах ЭПР растительных тканей (чечевички черенков, обработанных наночастицами) зарегистрированы повышенные уровни свободных радикалов и интенсивности линий сверхтонкой структуры Mn^{2+} , которые связаны с активностью марганецсодержащей супероксиддисмутазы. Реакция черенков на обработку наночастицами ферригидрита зафиксирована методом ЭПР до визуального проявления образования придаточных корней.

Ключевые слова: активные формы кислорода, свободные радикалы, ива, одревесневшие черенки, окоренение, наночастицы.

DOI: 10.1134/S0006302918040154

В окружающей среде часто обнаруживаются наночастицы естественного и искусственного происхождения и различной природы. В связи с этим на протяжении ряда лет проводятся исследования влияния на рост растений наночастиц металлов, оксидов металлов (Fe, Zn, Al, Ti, и др.), нанотрубок, фуллеренов и т.д. [1–5]. В число наиболее значимых факторов, определяющих состояние почв, входят соединения железа [6], которые находятся в форме гидроксидов и оксидов. В почвах, подверженных выветриванию и содержащих растворенные катионы металлов, как правило, накапливается слабо окристаллизованный наноразмерный гидроксид железа – ферригидрит. Ферригидрит может осаждаться на поверхности корней [7]. Его образованию способствуют растворимые органиче-

ские вещества ризосферы растений. Это может быть лимонная кислота или другие соединения, образующие комплексы с ионами железа [8,9]. Благодаря большой удельной площади поверхности (до $700 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$) и сорбционной емкости он оказывает значительное влияние на подвижность химических элементов [10]. Адсорбируя ионы тяжелых металлов, гербициды и другие органические соединения [11,12], гидроксиды и оксиды железа снижают их токсичность для растений. В исследованиях взаимодействия наночастиц с живыми организмами в первую очередь внимание уделяется их токсичности [1,2,13]. Вместе с этим наблюдаются и положительные эффекты их взаимодействия с растениями [14] и другими живыми организмами. Неоднозначность влияния наночастиц на рост растений отмечается в ряде работ [15–17].

Цито- и фитотоксичность наночастиц часто объясняют повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК) [5,18,19]. В состоянии окислительного стресса АФК вызывают пере-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ИУК – индолил-3-уксусная кислота, ПФЭ – полный факторный эксперимент, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ЭМР – электронный магнитный резонанс, Mn-СОД – марганецсодержащая супероксиддисмутазы.

кисное окисление липидов, деструкцию мембран, повреждение ДНК и белков. Вместе с тем АФК участвуют в регулировании экспрессии ряда генов и контролируют процессы роста растений, такие как клеточный цикл, корнеобразование и рост надземных частей [20–23]. Вероятно, именно эти эффекты воздействия наночастиц на растительные клетки служат причиной проявления положительных реакций растений. Для выяснения механизмов биологической активности наночастиц и неоднозначности эффектов взаимодействия их с растениями необходимы расширенные исследования. Задача настоящей работы – анализ влияния наночастиц биогенного ферригидрита на ризогенез (развитие корней) одревесневших черенков ивы Ледебура и уровень активных форм кислорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали одревесневшие черенки ивы Ледебура (*Salix ledebouriana* Trautv.). Черенкование проводили по общепринятой методике [24]. Черенки длиной 20 см, отобранные для эксперимента в марте, погружали на определенное время в водный раствор индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и в такой же раствор с наночастицами биогенного ферригидрита. Затем черенки перемещали в воду и после образования придаточных корней высаживали в открытый грунт. Концентрацию наночастиц (X_1) и время экспозиции черенков в растворах с фитогормоном и наночастицами (X_2) задавали согласно матрице планирования полного факторного эксперимента (ПФЭ) 2^2 с центральной точкой [25]. Интервал варьирования ($\pm \lambda$) выбран равным для X_1 – 0,5 мг/л и X_2 – 3 ч. В центральной точке плана экспериментов значения факторов X_1 и X_2 выбрали равными 1 мг/л и 13 ч соответственно. Критерием эффективности окоренения (Y) служили число и общая длина придаточных корней первого порядка ветвления. Биометрические показатели корневой системы (число и длину корней) определяли по методике В.Ф. Моисейченко [26]. Учет проводили на пятые и пятнадцатые сутки окоренения. Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, США).

Наночастицы биогенного ферригидрита получали в культуре аэробных бактерий, выделенных из бокситов Средне-Тиманского месторождения (27). Для отбора бактерий использовали минеральную среду с цитратом железа в качестве единственного источника углерода и энергии. По результатам секвенирования и ана-

лиза фрагмента гена 16S рРНК отобранный штамм по уровню сходства 99,345% был определен как *Delftia tsuruhatensis* T7. Бактерии культивировали в периодическом режиме в реакторе объемом 2,5 л с аэрацией и механическим перемешиванием 500 об/мин при температуре 32°C. Питательная среда содержала минеральные соли (в г/л): NH_2SO_4 – 0,4, K_2SO_4 – 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, цитрат железа – 6,0, которые растворяли в дистиллированной воде, начальная величина рН 6,3. Длительность культивирования составляла двое–четверо суток.

Материал, полученный по завершению процесса культивирования бактерий, осаждали на центрифуге при 4000 об/мин, осадок переносили в бидистиллированную воду, диспергировали ультразвуком при 22 кГц и 8 Вт/см² (генератор УЗТА-0,4/22-ОМ, Россия). Гомогенат центрифугировали при 18500 g в течение 30 мин, надосадочную жидкость, которая представляла собой коллоидный раствор наночастиц, сливали и использовали в экспериментах. Согласно данным порошковой рентгеновской дифракции и мессбауэровской спектроскопии наночастицы представляют собой ферригидрит. Диаметр наночастиц, определенный методом малоуглового рентгеновского рассеяния, составляет 2–10 нм [27]. В золях они находятся в виде индивидуальных наночастиц и наноразмерных агрегатов с гидродинамическим диаметром от 2 до 200 нм [28].

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) образцов растительных тканей записывали на спектрометре X-диапазона (модель ELEXYS E580, Bruker Biospin GmbH, Германия). Для записи спектров образцы растительных тканей черенков, которые замачивали в названных выше растворах, отбирали через трое суток. Сравнение спектров проводили для трех вариантов образцов – гипертрофированных чечевичек, появление которых свидетельствуют об активной пролиферации клеток растительной ткани; покоящихся чечевичек, у которых визуально не наблюдали морфологические изменения (рис. 1); флоэмы (продольного среза между чечевичками). В структуре флоэмы находятся хлоропласты, генерирующие АФК. Фрагменты растительной ткани с чечевичками размером ~2 мм² (пять–шесть штук на каждую пробу) вырезали, не захватывая ксилему. На рис. 1 видно, что придаточные корни прорастали через гипертрофированные чечевички ивы Ледебура. Это известный для древесных растений факт [29–31].

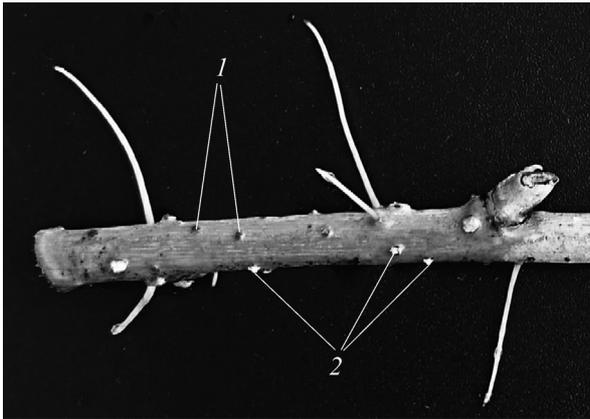


Рис. 1. Фотография одревесневшего черенка ивы Ледебур в начальной стадии инициации корнеобразования (пять суток): 1 – покоящиеся чечевички, 2 – гипертрофированные чечевички.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Матрица планирования ПФЭ-эксперимента в кодированных переменных и результаты определения биометрических показателей окоренения одревесневших черенков приведены в табл. 1. Даны средние значения числа и суммарной длины придаточных корней. Здесь же приведены данные для контрольных образцов, которые замачивали в растворах с ИУК, но без внесения наночастиц ферригидрита, и в водопроводной воде без стимуляторов корнеобразования (ИУК и наночастиц). В эксперименте по плану ПФЭ использовали 72 черенка (3 повторности по 6 шт. черенков, 4 строки плана) В экспериментах, соответствующих центральной точке плана, использовали 108 черенков.

Как видно из табл. 1, в сравнении с контрольными образцами обработка черенков наночастицами биогенного ферригидрита вызвала

увеличение числа придаточных корней на пятые и пятнадцатые сутки наблюдений. Это видно относительно средних значений для всех строк таблицы результатов наблюдений. Наибольшее отличие проявилось у опытных образцов (табл. 1, строки ПФЭ 1–4) и несколько меньшее в центральной точке факторного эксперимента (табл. 1, строка 5). Влияние наночастиц на рост придаточных корней демонстрируют также данные об увеличении общей длины придаточных корней. Изменения этого показателя роста проанализировали с использованием линейного уравнения регрессии вида $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2$. При вычислении коэффициентов уравнения за критерий Y принимали общую длину придаточных корней, так как она в большей степени соответствует площади поверхности корневой системы, ответственной за поглощение питательных элементов и выделение экссудатов, чем среднее значение длины корней. Для кодированных значений переменных X_1 и X_2 (± 1) уравнение, характеризующее корнеобразование на пятые сутки, имеет вид

$$Y = 10,8 + 2,3X_1 + 1,4X_2, \quad (1)$$

где Y – общая длина придаточных корней; X_1 – концентрация наночастиц ферригидрита, X_2 – время экспозиции в кодированных единицах.

Коэффициенты b_1 и b_2 вычисляли по данным опытов 1–4 (табл. 1) [25]. Они количественно характеризуют влияние факторов X_1 и X_2 на окоренение черенков (Y) с уровнем значимости 0,05 и 0,2 соответственно. Положительные значения коэффициентов означают, что увеличение концентрации наночастиц и времени экспозиции относительно центральных значений (1 мг/л и 13 ч) должно приводить к увеличению суммарной длины придаточных корней, а уменьшение – наоборот. Коэффициент b_0 – это рас-

Таблица 1. Матрица планирования эксперимента и биометрические показатели окоренения при обработке черенков ИУК и наночастицами биогенного ферригидрита

	Концентрация, мг/л	Экспозиция, ч	Количество корней, шт.	Суммарная длина корней, см	Количество корней, шт	Суммарная длина корней, см
			на пятые сутки		на пятнадцатые сутки	
1	–	–	6	8,8	8	56,7
2	+	–	4	10,0	7	41,3
3	–	+	3	8,0	6	14,7
4	+	+	5	16,2	8	31,7
5	0	0	3,2	5,1	6,2	26,5
Контроль						
6	ИУК		3	4,2	5	23
7	Вода		2	2,7	4	18

четное значение показателя в центральной точке ПФЭ, рассчитанное по данным экспериментов, проведенным в соответствии с планом (табл. 1, строки 1–4). Результат сравнения значения b_0 с фактическими данными, полученными в экспериментах при значениях X_1 и X_2 1 мг/л и 13 ч, которые соответствуют центральной точке плана (табл. 1, строка 5), характеризует отклонение от линейности.

Средняя общая длина придаточных корней черенков, обработанных в растворе с концентрацией наночастиц ферригидрита 1 мг/л и экспозицией 13 ч, составила 5,1 см. Таким образом, в центральной точке плана (табл. 1, строка 5) наблюдаемая общая длина корней в два раза меньше, чем расчетное значение 10,8 см (уравнение (1), коэффициент b_0). Это означает, что зависимость суммарной длины корней от концентрации наночастиц и времени экспозиции нелинейная и наилучшие условия инициации корнеобразования можно получить при определенной комбинации концентрации наночастиц биогенного ферригидрита и времени экспозиции. При этом окореняемость в данном случае может быть существенно выше, чем наблюдалась в эксперименте. Согласно уравнению (1) окореняемость одревесневших черенков можно повысить, увеличивая концентрацию наночастиц (X_1) и время экспозиции в иницирующем растворе (X_2). Однако поиск оптимальных условий для окоренения не проводился, так как задача работы состояла в оценке активности наночастиц биогенного ферригидрита. В связи с этим отметим, что средняя общая длина придаточных корней контрольных образцов (4,2 и 2,7 см согласно табл. 1) значительно меньше (в два–четыре раза!), чем опытных, которые обрабатывали наночастицами (табл. 1, строки 1–4).

Биометрические показатели развития придаточных корней на пятнадцатые сутки описывает уравнение регрессии:

$$Y = 36,2 + 0,8X_1 - 12,8X_2. \quad (2)$$

Изменение знака и величины коэффициентов b_1 и b_2 в уравнении (2) характеризует продленный эффект воздействия наночастиц на корнеобразование. Уровень значимости коэффициента b_2 , который дает количественную оценку влияния времени экспозиции черенков в растворе с наночастицами, повысился до 0,05. Значимость коэффициента b_1 снизилась, но в общем эффект от воздействия наночастиц остался высоким. Данные наблюдений через 15 суток показывают, что обработка с введением наночастиц биогенного ферригидрита увеличила общую длину придаточных корней на 32%

(с 23 до 30,4 см – среднее по всем строкам ПФЭ, табл. 1) относительно контрольного опыта с ИУК. Относительно контрольных черенков, которые замачивали в воде без стимуляторов корнеобразования, увеличение составило 69%.

В эксперименте средняя суммарная длина придаточных корней в центральной точке плана ПФЭ составила 26,5 см, что значительно меньше, чем расчетное значение, равное 36,2 см (b_0). То есть нелинейность зависимости длины придаточных корней от концентрации наночастиц и времени экспозиции черенков в растворе выражена меньше, в сравнении с данными, полученными на 5-е сутки, но остается высокой. Наибольшее значение общей длины придаточных корней (56 см), которое наблюдали при обработке черенков в растворе с концентрацией наночастиц 0,5 мг/л в течение 10 ч (табл. 1, строка 1), превышает контрольные значения (23 и 18 см) в 2,4–3,1 раза. Ясно, что при оптимальных значениях факторов X_1 и X_2 , которые не сложно найти методами планирования эксперимента [25], продленный эффект воздействия наночастиц на окореняемость также будет выше среднего значения, которое наблюдалось в данном опыте (+32%).

Ивовые легко окореняются, тем более при стимулировании роста корней фитогормонами. Естественно ожидать, что на фоне окоренения черенков с использованием ИУК эффект каких-либо иных стимуляторов (в данном случае наночастиц) должен быть менее выражен. Однако экспериментальные данные, полученные с ивой Ледебура, свидетельствуют о биологической активности наночастиц биогенного ферригидрита, которая достаточно высока, чтобы фиксировать их влияние на фоне фитогормона роста (ИУК). Нелинейный характер зависимости окоренения черенков от концентрации наночастиц в растворе замачивания усложняет определение наиболее эффективных доз наночастиц биогенного ферригидрита и времени экспозиции, но не изменяет этот вывод. Эффективность окоренения черенков с использованием наночастиц биогенного ферригидрита подтвердили результаты приживаемости их при посадке в открытый грунт.

Сигнальные функции для инициации образования и роста корней, а также других процессов органогенеза у растений выполняют АФК [20,32,33]. Для регистрации их уровня в тканях ивы Ледебура использовали ЭПР-спектроскопию.

Характерный вид спектров ЭПР образцов тканей одревесневших контрольных и опытных черенков, взятых в период инициации и на-

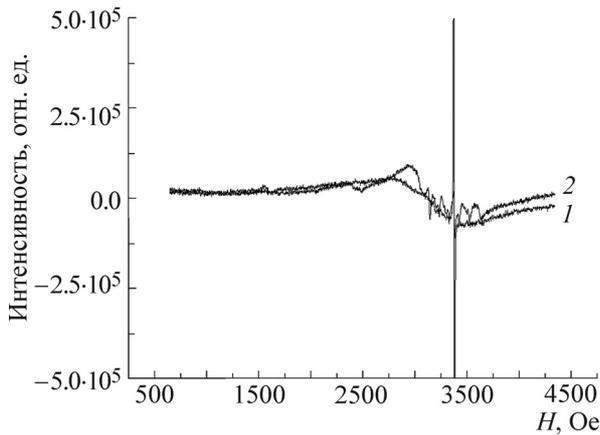


Рис. 2. Спектры ЭПР растительной ткани гипертрофированных чечевичек черенков, обработанных раствором с ИУК (1 – 295 К, 2 – 90 К).

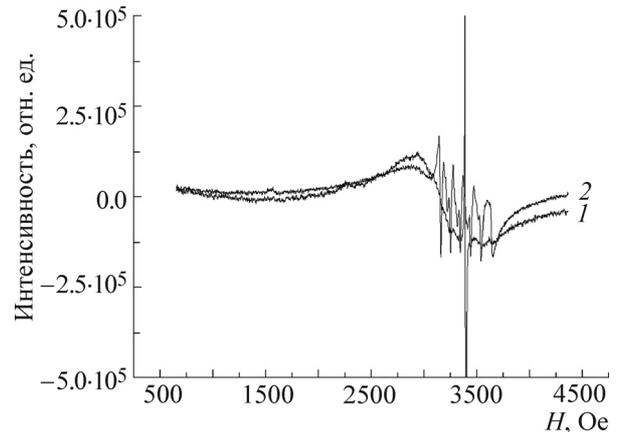


Рис. 4. Спектры ЭПР флоэмы черенков, обработанных раствором с ИУК и наночастицами биогенного ферригидрита (1 – 295 К, 2 – 90 К).

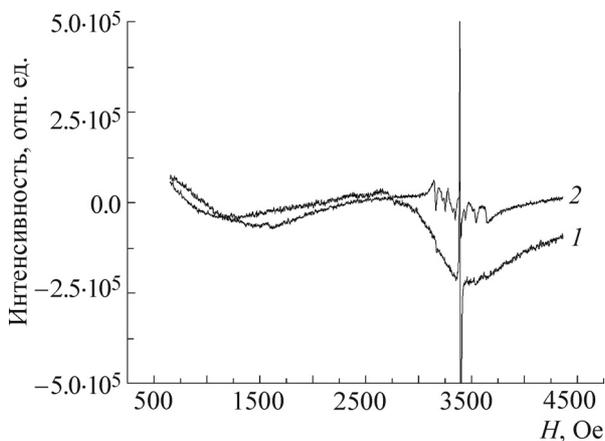


Рис. 3. Спектры ЭПР гипертрофированных чечевичек черенков, обработанных раствором с ИУК и наночастицами биогенного ферригидрита (1 – 295 К, 2 – 90 К).

чальной стадии роста придаточных корней, показан на рис. 2–4. Здесь представлены спектры гипертрофированных и покоящихся чечевичек, а также флоэмы, записанные через трое суток после замачивания одревесневших черенков в растворах ИУК с наночастицами биогенного ферригидрита и без наночастиц.

Рис. 2 и 3 представляют изменения спектров ЭПР, которые происходят в результате обработки черенков наночастицами, внесенными в раствор ИУК. При сопоставлении их со спектром флоэмы (рис. 4) также хорошо видно изменение основной линии (Fe^{3+}) и шести линий сверхтонкой структуры спектров Mn^{2+} . Спектры, записанные при температуре 295 К, имеют характерные для свободных радикалов (АФК) узкие линии при $g \sim 2,0$. При температуре 90 К интенсивность линий свободного радикала значительно меньше. Обратная картина наблюда-

ется в спектрах Mn^{2+} . При понижении температуры интенсивность их возрастает, особенно в спектре ЭПР флоэмы (рис. 4).

Параметры линий, полученных в результате моделирования спектров электронного магнитного резонанса (ЭМР), характеризующих состояние ионов Fe^{3+} в растительных тканях ивы, приведены в табл. 2. При моделировании основной линии спектра, которая относится к иону Fe^{3+} , при температуре 295 К у образцов Feh_d1, Feh_h1, Feh_ph1 и ИУК_d1 выделяются две линии, а при 90 К – три линии (L1, L2, L3). В варианте ИУК_h1 независимо от температуры экспериментальный спектр моделируют три линии. В спектре образца ИУК_d1 выделяется также линия L2.1 с g -фактором 2,5073. Линии L2, L2.1 и L3 свидетельствуют о нахождении в анализируемых растительных тканях атомов железа в составе гемовых и негемовых железосодержащих белков, содержание и активность которых изменяется в процессе инициации образования придаточных корней. В отличие от линии L1, эти линии характеризуются более высокими значениями g -фактора. Они различаются также и по другим параметрам – ширине (DH) и интенсивности линий (I) (табл. 2). Не останавливаясь на идентификации нахождения ионов железа в тех или иных биологических соединениях, обратим внимание на изменения параметров спектров, которые свидетельствуют о влиянии наночастиц биогенного ферригидрита на окоренение одревесневших черенков ивы Ледебура.

В спектрах ЭМР чечевичек и флоэмы, взятых у черенков, которые были обработаны наночастицами, величина g -факторов линий L1 при температуре 295 К составляет 2,1112–2,139. При температуре 90 К значения g -факторов

Таблица 2. Результаты разложения и определения параметров расчетных линий спектров ЭМР растительных тканей одревесневших черенков ивы Ледебура

№ линии	Вид образца					Параметр
	Feh_phl	Feh_hl	Feh_dl	ИУК_hl	ИУК_dl	
L1	2,139	2,1112	н.о.	2,1125	2,0198	g-factor, 295 К
L2	2,923	2,415		2,223	2,223	
L2.1				2,8		
L1	2,099	2,0423	2,0433	2,152	2,1066	g-factor, 90 К
L2		2,602	2,381	2,326	2,3258	
L2.1					2,5073	
L3	4,28	4,45	4,251	4,285	4,28	DH, Э 295 К
L1	484,5	405,7	н.о.	516,5	311,8	
L2	77,2	534,2		131	417,8	
L3				194		DH, Э 90 К
L1	561,5	618	466,7	524,9	512,7	
L2		688	308,4	612	220,7	
L2.1					564	I, отн. ед. 295 К
L3	32,4	46	96	45,2	53,6	
L1	243687	187427	н.о.	130298	155799	
L2	11733	119088		58602	209496	I, отн. ед. 90 К
L3				25432		
L1	153229	102478	106150	63132	68113	
L2		53292	50505	35972	28691	I, отн. ед. 90 К
L2.1					39665	
L3	23495	13118	8351	17201	12802	

Примечание. н.о. – Спектр не записывали; ИУК – черенки, обработанные раствором ИУК, Feh – черенки, обработанные раствором ИУК с наночастицами биогенного ферригидрита; индексы phl, dl и hl обозначают варианты образцов – флоэму, покоящиеся и гипертрофированные чечевички (phloem, dormant lenticel, hypertrophic lenticel) соответственно.

снизилось до 2,0423–2,099. Снижается также интенсивность линий L1 (табл. 2). Подобная картина не наблюдается в спектрах ЭМР чечевичек ИУК_hl и ИУК_dl, взятых у черенков, которые не обрабатывали наночастицами. Наблюдаемая зависимость g-факторов линий L1 от температуры свидетельствует о нахождении иона Fe^{3+} в суперпарамагнитном состоянии. Отсюда следует, что наночастицы биогенного ферригидрита с ионами железа в суперпарамагнитном состоянии транспортировались во все проанализированные образцы растительной ткани черенков ивы, которые замачивали в растворе с наночастицами.

Растительные ткани черенков ивы, не обработанные наночастицами, могут содержать ферритин, в котором находится эндогенный ферригидрит с ионами Fe^{3+} в суперпарамагнитном состоянии. Однако интенсивность линии L1 у образцов Feh_hl и Feh_dl существенно выше, чем у образцов ИУК_hl и ИУК_dl (табл. 2), что обусловлено наличием в первых синтетических наночастиц, внесенных при замачивании черенков в иницирующем растворе, и относительно низкой концентрацией эндогенного ферригидрита.

Интенсивность линий L2 при 295 К значительно меньше, а g-фактор выше (2,223–2,923). При 90 К интенсивность линий L2 также меньше, а g-фактор определяется в диапазоне (2,326–2,602) (табл. 2). Линии с g-фактором порядка 2,3–2,9 не регистрировались ранее нами в спектрах ЭМР наночастиц биогенного ферригидрита [27]. Они характеризуют ионы железа в октаэдрическом окружении, которые, вероятно, находятся в простетических группах различных белков. При температуре 90 К наблюдаются также сигналы более низкой интенсивности со значениями g-фактора 4,28–4,45 (табл. 2, линии L3), которые характерны для ионов Fe^{3+} в тетраэдрическом или сильно искаженном октаэдрическом окружении и находящихся в составе негемовых железосерных белков. В спектрах ЭМР наночастиц биогенного ферригидрита мы не наблюдали атомы железа в тетраэдральном окружении [27].

Спектр ЭМР флоэмы при низкой температуре отличается от спектров чечевичек, обработанных наночастицами, тем, что независимо от температуры экспериментальный спектр моделируют только две линии. При 295 К спектры ЭМР чечевичек, взятых у черенков, обработан-

Таблица 3. Интенсивности линий сверхтонкой структуры Mn^{2+} и радикального центра в спектрах ЭПР растительных тканей одревесневших черенков ивы Ледебура (при температуре 90 К)

Образец	Интенсивность линии Mn^{2+} , отн. ед.	Интенсивность линии свободного радикала отн. ед.	Ранг интенсивности линии свободного радикала	Ранг интенсивности линии Mn^{2+}
Feh_fl	333572	~0	–	1
Feh_dl	278902	301181	1	2
Feh_hl	81651	154355	2	4
ИУК_hl	89211	130070	3	3
ИУК_dl	81224	103621	4	5

ных наночастицами, также моделируют две линии. Однако значения параметров (g -фактор, ширина и интенсивность) линий существенно различаются. Вероятно, это обусловлено различиями в содержании и активности металлсодержащих белков в клетках флоэмы и чечевичек, а также с инициацией и ростом придаточных корней. Атомы железа, которые характеризуются линиями L2 и L3, связаны с биологическими структурами и не входят в минеральную часть образцов, т.е. нанокристаллитов биогенного ферригидрита.

Первичные эффекты от воздействия наночастиц биогенного ферригидрита на образование придаточных корней наиболее сильно проявляются в интенсивности линий свободных радикалов и иона марганца (Mn^{2+}) в спектрах ЭПР. Результаты сравнительного анализа интенсивностей линий свободных радикалов и марганца приведены в табл. 3. Ранг линий свободного радикала коррелирует с инициацией ростовых процессов ($Feh_dl > Feh_hl > ИУК_hl > ИУК_dl \gg Feh_phl$) (см. табл. 3). При инициации корнеобразования с использованием только ИУК интенсивность линий свободных радикалов в спектре ЭПР ниже, чем в образцах от черенков, обработанных дополнительно наночастицами ферригидрита. Более высокая интенсивность линии свободного радикала в покоящихся чечевичках (Feh_dl), вероятно, связана с тем, что они находятся в начальной фазе инициации пролиферации меристемных клеток придаточных корней, которая внешне не наблюдается (рис. 1), но уровень сигнала, запускающего процессы их образования, максимален. Отметим, что начальный период ранней ответной реакции растительных клеток (черенков) на воздействие наночастиц обнаружен благодаря использованию ЭПР-анализа. В образцах флоэмы свободные радикалы практически не наблюдались. Возможно, это связано с тем, что в отличие от клеток чечевичек и сопутствующих им клеток меристемы, которые находятся в стадии инициации корнеобра-

зования, клетки флоэмы в период наблюдений активно не пролиферировали. Ранее нами было показано, что наночастицы биогенного ферригидрита обладают биологической активностью независимо от присутствия ИУК. В частности, они увеличивали всхожесть и рост корней семян овса [34] и генерацию АФК в клетках печени крыс [35].

Интенсивность линий марганца в образцах флоэмы (Feh_phl) и покоящихся чечевичек (Feh_dl), которые обрабатывали наночастицами, в три–четыре раза выше, чем в образцах гипертрофированных чечевичек (Feh_hl) и обработанных только ИУК (табл. 3). В качестве маркера интенсивности линий сверхтонкой структуры выбрана первая линия в низкополевой части спектров ЭПР марганца. Более высокая интенсивность линий марганца в спектре покоящихся чечевичек (Feh_dl) в сравнении с гипертрофированными чечевичками (Feh_hl), обработанными наночастицами, объясняется тем же, что и интенсивность сигнала свободных радикалов. Можно сказать, что интенсивность линий сверхтонкой структуры спектра ЭПР марганца также коррелирует с инициацией ростовых процессов – $Feh_dl \gg ИУК_hl \approx Feh_hl \approx ИУК_dl$ (табл. 3).

Мы предполагаем, что ионы марганца в образцах чечевичек входят в активный центр марганецсодержащей супероксиддисмутазы (Mn-SOD). Ион марганца в активном центре Mn-SOD циклически меняет валентность ($Mn^{2+} \leftrightarrow Mn^{3+}$) в двухступенчатой реакции диспропорционирования супероксид радикала [36]. Вероятно, при низкой температуре (90 К) равновесное состояние Mn-SOD сдвинуто в сторону восстановленного состояния фермента (иона Mn^{2+}), а при 295 К – в сторону окисленного состояния (иона Mn^{3+}). Спектр Mn^{3+} в наших условиях практически не регистрируется, поэтому интенсивность линий марганца при температуре 295 К низкая. Вероятно, в анализируемых растительных клетках чечевичек анти-

окисидантная система находится в состоянии наибольшего напряжения и, следовательно, высока активность Mn-СОД. Подобный характер изменения интенсивности сигнала ЭПР от ионов Mn^{2+} в зависимости от температуры наблюдали в работе [37], однако авторы не связали этот факт с наличием в прорастающих зернах пшеницы Mn-СОД. Максимальная интенсивность линий марганца зафиксирована в образце флоэмы. Это связано с тем, что флоэма содержит хлоропласты, а ионы марганца, как известно [38], входят в активный центр комплекса фотосистемы II (участвующей в фотоллизе воды). Поэтому весьма вероятно, что они дают вклад в интенсивность сигнала ЭПР, характерного для иона Mn^{2+} .

В целом из сопоставления данных биометрического анализа окоренения одревесневших черенков ивы Ледебур с результатами анализа состояния растительных тканей в начальный период корнеобразования, полученными методом электронного парамагнитного резонанса, однозначно следует, что наночастицы биогенного ферригидрита оказывают стимулирующее действие на образование придаточных корней. Инициации роста корнеобразующих меристемных клеток должен сопутствовать повышенный уровень АФК [32,33 и др.]. В соответствии с этим представлением анализ спектров ЭПР показал, что в период активации корнеобразования при замачивании одревесневших черенков в растворе ИУК с наночастицами биогенного ферригидрита клетки растительной ткани (чечевички) имеют повышенный уровень свободных радикалов (АФК) и сигнала спектра ЭПР иона Mn^{2+} .

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках научного проекта №16-48-242158.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Remédios, F. Rosário, V. Bastos, J. Botany, Article ID 751686 (2012).
2. V. Ruttkay-Nedecky, O. Krystofova, L. Nejdil, and V. Adam, J. Nanobiotechnol. **15** (33), (2017).
3. А. М. Короткова, С. В. Лебедев, Ф. Г. Каюмов и Е. А. Сизова, С.-х. биология **52** (1), 182 (2017).
4. В. М. Юрин и О. В. Молчан, Труды БГУ, **10** (1), 9 (2015).
5. P. P. Fu, Q. S. Xia, H. M. Hwang, et al., J. Food Drug. Anal. **22**, 64 (2014).
6. Ю. Н. Водяницкий, *Соединения железа и их роль в охране почв* (Наука, М., 2010).
7. R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The Iron Oxides* (Wiley, Weinheim, 2003).
8. K. Eusterhues, T. Rennert, H. Knicker, et al., Environ. Sci. Technol. **45** (2), 527 (2011).
9. A. Violante and A. G. Caporale, J. Soil Sci. Plant Nutrition **15** (2), 422 (2015).
10. C. W. Childs, Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **155** (5), 441 (1992).
11. C. M. Jonsson, P. Persson, S. Sjöberg, and J. S. Loring, Environ. Sci. Technol. **42** (7), 2464 (2008).
12. E. Čadková, M. Komárek, R. Kaliszová, et al., Environ. Sci. Pollut. Res. Int. **20** (6), 4205 (2013).
13. T. Xia, M. Kovochich, J. Brant, et al., Nano Lett. **6** (8), 1794 (2006).
14. K. Jeyasubramanian, U. U. G. Thoppey, G. S. Hikku, et al., RSC Adv. **6**, 15451 (2016).
15. Д. В. Колбанов, Е. О. Легерова, И. И. Донская и др., в сб. «Материалы международной научной конференции «Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений»» (Минск, 2014), сс. 114–117.
16. J. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranová, et al., Cell. Mol. Life Sci. **57**, 779 (2000).
17. Т. П. Астафурова, Ю. Н. Моргалёв, А. П. Зотикова и др., Вестн. Томск. гос. ун-та. Биология **1** (13), 122 (2011).
18. X. J. Xia, Y. H. Zhou, K. Shi, et al., J. Exp. Bot. **66** (10), 2839 (2015).
19. B. Wang, J.-J. Yin, X. Zhou, et al., J. Phys. Chem. C **117** (1), 383 (2013).
20. В. Д. Креславский, Д. А. Лось, С. И. Аллахвердиев и В. В. Кузнецов, Физиология растений **59** (2) 163, (2012).
21. Ю. А. Лабас, А. В. Гордеева, Ю. И. Дерябина и др., Успехи соврем. биологии **130** (4), 323 (2010).
22. S. Choudhury, P. Panda, L. Sahoo, and S. K. Panda, Plant Signal Behav. **8** (4), 751686 (2013).
23. S. Mangano, S. P. D. Juárez, and J. M. Estevez, Plant Physiol. **171**, 1593 (2016).
24. М. Т. Тарасенко, *Размножение растений зелеными черенками* (Колос, М., 1967).
25. В. Н. Максимов, *Многофакторный эксперимент в биологии* (Издательство Московского университета, М., 1980).
26. В. Ф. Моисейченко, *Методика опытного дела в плодоводстве и овощеводстве* (Выща шк. Головное изд-во, Киев, 1988).
27. М. И. Теремова, Е. А. Petrakovskaya, A. S. Romanchenko, et al., Environmental Progress and Sustainable Energy **35** (5), 1407 (2016).
28. Ю. Л. Гуревич, С. В. Марков, Ю. И. Маньков и др., в сб. *Ультрадисперсные порошки, наноструктуры. Материалы VII Ставеровских чтений (Труды научно-технической конф. с международным участием)* (Красноярск, 2015), сс. 98–101.
29. A. R. S. Gomes and T. T. Kozłowski, Plant Physiol. **66**, 267 (1980).

30. K. Haase, O. D. E. Simone, J. J. Wolfgang, and S. Wolfgang, *Tree Physiol.* **23**, 1069 (2003).
31. Y. A. Kuzovkina, M. Knee, and M. F. Quigley, *J. Environ. Hort.* **22** (3), 155 (2004).
32. M. J. Bennett, C. Perilleux, T. Beeckman, and X. Draye, *Development* **143**, 3328 (2016).
33. G. Gapper and L. Dolan, *Plant Physiol.* **141**, 341 (2006).
34. Д. И. Шевелёв, С. В. Хижняк, Ю. Л. Гуревич и М. И. Теремова, *Успехи соврем. наук* **5** (2), 57 (2017).
35. В. Г. Пахомова, К. В. Шадрин, Г. В. Макарская и др., *Здоровье. Медицинская экология. Наука* **70** (3), 136 (2017).
36. A.-F. Miller, *FEBS Lett.* **586** (5), 585 (2012).
37. M. Filek, M. abanowska, M. Kurdziel, and A. Sierawska, *Toxins* **9** (6), 178 (2017).
38. М. М. Наджафпур, М. З. Гхобад, Ф. Хагхигхи и др., *Биохимия* **79** (4), 413 (2014).

Influence of Nanoparticles of Biogenic Ferrihydrite on Rooting of Lignified Cuttings of Ledebour Willow

V.L. Bopp*, N.A. Mistratova*, E.A. Petrakovskaya**, Yu.L. Gurevich**,
M.I. Teremova**, and R.G. Khlebopros**

*Krasnoyarsk State Agrarian University, prosp. Mira 90, Krasnoyarsk, 660049 Russia

**Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The influence of nanoparticles of biogenic ferrihydrite on the root formation of lignified cuttings of Ledebour willow (*Salix ledebouriana Trautv.*) was investigated. The rooting of stem cuttings was carried out in water using phytohormone (indolyl-3-acetic acid) and nanoparticles. In comparison with the variants of the flooding of cuttings in water and in solution with indolyl-3-acetic acid, the amount and total length of the adventitious roots after 5 and 15 days of rooting were greatest in cuttings treated with nanoparticles. In the early period of root development, increased levels of free radicals and intensities of the hyperfine structure lines of Mn²⁺ cleavage were recorded in the EPR spectra of plant tissues (lenticels of cuttings treated with nanoparticles). The latter is related to the activity of manganese-containing superoxide dismutase. The reaction of cuttings to the effect of nanoparticles was recorded by the EPR method before manifestation of adventitious root primordium initiation and development.

Keywords: reactive oxygen species, free radicals, willow, lignified cuttings, rooting, nanoparticles