

ВЛИЯНИЕ НАНОДИСПЕРСНОЙ ФОРМЫ CUO НА КЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

¹Черникова Н.П., ²Федоренко А.Г., ¹Минкина Т.М., ¹Манджиева С.С., ²Бауэр Т.В.

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация
²Южный научный центр российской академии наук, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. В статье рассмотрен вопрос воздействия наночастиц меди на организменный и клеточный уровни организации ярового ячменя. Выявлен токсический эффект наночастиц меди на морфометрические параметры и клеточную структуру растений при помощи электронного трансмиссионного микроскопа.

Ключевые слова. Наночастицы, оксид Cu, растения, клетка, токсический эффект, TEM, TEM-EDX.

INFLUENCE OF CUO NANODISPERSION FORM ON CELLULAR LEVEL OF SPRING BARLEY ORGANIZATION

¹Chernikova N.P., ²Fedorenko A.G., ¹Minkina T.M., ¹Mandzhieva S.S., Bauer T.V.

¹Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation
²Federal Research Center the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The article discusses the effect of copper nanoparticles on the organismic and cellular levels of spring barley organization. The toxic effect of copper nanoparticles on the morphometric parameters and plant cell structure was revealed using an electron transmission microscope.

Keywords. Nanoparticles, Cu oxide, plants, cell, toxic effect, TEM, TEM-EDX.

Введение. Рост производства наноразмерных материалов и их применение в разных сферах деятельности неизбежно ведут к экологическим воздействиям на окружающую среду, что усиливает актуальность изучения способности наночастиц (НЧ) проникать и накапливаться в растениях. Важно изучить токсические действия наноматериалов на основе меди, потому что они широко используется в сельском хозяйстве. Имеющиеся литературные сведения по влиянию наночастиц меди (НЧ Cu) на растения крайне противоречивы либо трудно сопоставимы как по дозам и размерности наночастиц, так и по видам растений [1]. Все эти исследования проводились на анатомическом и гистологическом уровнях (органы и ткани). Они ограничены только морфологическими параметрами и не рассматривали ультраструктурные изменения в растениях. В связи с этим, важно изучить механизм воздействия НЧ CuO на ультраструктурном, внутриклеточном уровне.

Материалы и методы. Для изучения токсичности НЧ Cu на морфобиометрию и структуру клеток корня ячменя была взята почва из Ростовской области, характеризующаяся как чернозем обыкновенный мощный карбонатный среднегумусный тяжелосуглинистый на лессовидных суглинках. Почву отобрали из поверхностного слоя (0-20 см), высушивали на воздухе и просеивали через сито 5 мм. Эксперимент проводился в пластиковых горшках с дренажной системой, каждый из которых был заполнен 2 кг почвы. В качестве контрольного образца использовали чернозем обыкновенный карбонатный, а в качестве экспериментального – чернозем обыкновенный карбонатный с искусственным загрязнением в дозе 2000 мг/кг НЧ CuO, размер которых составлял 30-50 нм. Доза 2000 мг/кг Cu по данным исследователей является критической для сельскохозяйственных культур [2,3]. Применение такой дозы металла позволяет выявить механизмы его трансформации в почве и связанный с этим токсический эффект на растения.

Семена ярового ячменя (*Hordeum sativum distichum*) высевали спустя месяц после внесения НЧ CuO, при вегетативном росте растений поддерживали наименьшую полевую влагоемкость (до 60% от полной полевой влагоемкости). Опыт заложен в трехкратной повторности. Проведение эксперимента и процедура отбора проб проводились в соответствии со стандартной методикой [4].

Для электронно-микроскопического исследования из растений в фазу колошения брали высечки в центральной части второго или третьего листа (2x2мм) и зоны корневых волосков (2мм). Все этапы

подготовки ткани к морфологическому наблюдению: контрастирование, обезвоживание, заключение в полимеризующую смесь, получение и окрашивание ультратонких срезов, проводили с использованием общепринятых методических приемов [5]. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме EM UC6 (Leica, Germany) и дополнительно контрастировали цитратом свинца. Исследование проводили при помощи электронного трансмиссионного микроскопа (ТЕМ) Tecnai G2 (Phillips, Holland) на базе ЦКП «Современная микроскопия» ЮФУ.

Результаты и их обсуждение. Внесение дозы 2000 мг/кг нано CuO обусловило достоверное снижение высоты растений, длины стеблей, длины колоса, массы 1000 зерен и длины корней ячменя. По сравнению с контролем происходит уменьшение: длины корней – на 39%, высоты растений – на 11%, длины стеблей – на 7%, длины листа – на 24%, длины колоса без остей – на 33%, длины колоса с остями – на 29%; снижение продуктивности на 27% и урожайности на 55%, урожайность ярового ячменя на контроле в среднем составила 196,4 г/м² (15,5 ц/га). В ряде работ по воздействию НЧ Cu на сельскохозяйственные растения, установлено, что НЧ уменьшали рост, всхожесть, качество урожая, приводили к повреждению корней, уменьшению длины побегов, а также снижению биомассы в растениях пшеницы, бобов, кукурузы и риса [6-8].

Электронно-микроскопический анализ показал, что корни контрольного растения имели нормальные ультраструктурные характеристики в клетках [9] с неповрежденными клеточными стенками, центральной вакуолью, гранулярным ретикулумом, митохондриями и ядром (рис. 1а).

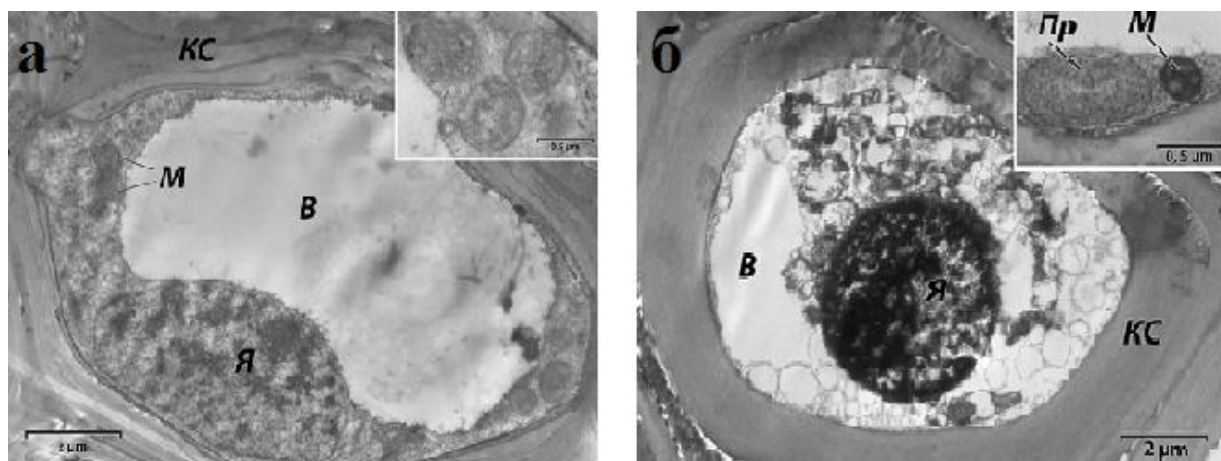


Рисунок 1 - Клетка центрального цилиндра корня ячменя: а – контроль; б – загрязнение наночастицами меди.

КС – клеточная стенка, В – вакуоль, М – митохондрия, Пр – пропластида, Я – ядро

С помощью ТЕМ было обнаружено, что загрязнение медью в форме нано оксида меди вызвало ультраструктурные изменения основных клеточных органелл в корне (рис. 1б). Клеточные стенки имели нарушения и перфорации в своей ламеллярной структуре, а в некоторых местах и разрушения. Исследования ряда авторов показывают, что избыток меди также может привести к повреждению клеточных мембран в результате связывания меди с сульфгидрильными группами мембранных белков [10]. Авторы так же указывают, что накопление Cu происходило либо через апопластический путь, либо оно могло быть связано с углеводными фракциями, пектином и белками клеточной стенки. Таким образом клеточная стенка корня, по мнению авторов, сильнее всего депонирует медь у растений.

В работе [11] показано, что НЧ Cu доступны проросткам фасоли и пшеницы, При этом токсический эффект связан с проникновением НЧ непосредственно в клетку. Связывание ионов тяжёлых металлов (ТМ) клеточными стенками корня позволяет снизить их проникновение из почвенного раствора в цитоплазму. Имобилизация в клеточной стенке ионов ТМ является одним из важнейших процессов, влияющих на устойчивость растений к их избытку. Однако в случае действия на растения высокой концентрации, клеточная стенка достигает своеобразного «насыщения», ее барьерные функции нарушаются, теряется способность защитить клетку от токсического действия металла [12]. Попадание меди в клетку вызывает ультраструктурные повреждения в клеточной мембране, цитоплазме, эндодерме, митохондриях и вакуолях.

Помимо центральной вакуоли, в цитоплазме наблюдались множественные вторичные вакуоли. Цитоплазма просветленная, основные органеллы отечные и набухшие. Ядро округлое, электронно-плотное. Ядерный хроматин сконденсирован в плотные глыбки, рассеянные по всему объему ядра. Митохондрии округлой формы, с электронно-плотным матриксом и набухшими кристами. Изредка встречаются пропластиды.

На клеточных стенках и плазмолеммах наблюдалось образование электронно-плотного осадка, предположительно, это отложения меди. В работе других авторов [13], проводивших исследования по поглощению тяжелых металлов в гидропонном рисе с помощью рентгеноструктурного анализа, такой электронно-плотный материал идентифицировали в корневых структурах, как отложения Cu.

Заключение. Влияние нанодисперсной формы CuO, негативно отразилось на развитии ярового ячменя. Электронно-микроскопический анализ показал, что токсическое воздействие НЧ CuO проявляется и на внутриклеточном уровне, вызывая различную степень повреждения компонентов клеток корня ярового ячменя. Отмеченные ультраструктурные изменения напрямую влияют на физиологические процессы растений, что сказывается на их росте и развитии.

Список использованных источников

1. Райкова А.П., Паничкин Л.А., Райкова Н.Н. Исследование влияния ультрадисперсных порошков металлов, полученных различными способами, на рост и развитие растений // Нанотехнологии и информационные технологии – технологии XXI века: матер. Междунар. науч.-практич. конф. – М., 2006. С. 108–111.
2. Закруткин В.Е., Шишкина Д.Ю., Романюк О.Л., Заболотная О.Н. Особенности распределения тяжелых металлов в почвах агроландшафтов малых водосборов (на примере рек Кундрючья и Кагальник Ростовской области) // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2005. №2. – С. 98–102.
3. Дмитраков, Л.М. Транслокация свинца в растениях овса. // Агрехимия. 2006. №2. – С. 71–77.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. – М.: Книга по Требованию, 2012. – 349 с.
5. Fedorenko, G. M., Fedorenko, A. G., Minkina, T. M., Mandzhieva, S. S., Rajput, V. D., Usatov, A. V., & Sushkova, S. N. (2018). Method for hydrophytic plant sample preparation for light and electron microscopy (studies on *Phragmites australis* Cav.). *MethodsX*, 5, 1213-1220. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.09.009>
6. Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H., & Kweon, H. S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1915-1921. <https://doi.org/10.1897/07-481.1>
7. Wang, Z., Xie, X., Zhao, J., Liu, X., Feng, W., White, J. C., & Xing, B. (2012). Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental science & technology*, 46(8), 4434-4441. <https://doi.org/10.1021/es204212z>
8. Shaw, A. K., & Hossain, Z. (2013). Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 93(6), 906-915. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.044>
9. Атлас ультраструктуры растительных клеток [Текст] / Под. ред. Г.М. Козубова, М.Ф. Даниловой. - Петрозаводск, 1972. – 296 с.
10. Rico, C. M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3485-3498. doi: 10.1021/jf104517j
11. Некрасова Г.Ф., Ушакова О.С., Ермаков А.Е. и др. Действие ионов Cu(II) и наночастиц оксидов Cu // Экология. – 2011. № 6. – С. 422–428.
12. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учебное пособие. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. – 77 с
13. Peng C., Duan D.C, Xu C., et al. (2015). Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environ. Pollut.*, 197, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.008>

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФИ 19-05-50097 и 19-34-60041.