

## ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ТОМАТА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Вардуни Т.В.<sup>1</sup>, Серeda М.М.<sup>1</sup>, Капралова О.А.<sup>1</sup>, Чохели В.А.<sup>1</sup>, Вардуни В.М.<sup>1</sup>, Шиманская Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону, Россия e-mail: shimamed@yandex.ru

Целью данного исследования было изучение действия наночастиц диоксида титана на рост и развитие семян и стерильных эксплантов томата (*Lycopersicon esculentum*). В качестве эксплантов использовались побеги на стадии первого настоящего листа, полученные из сеянцев. С целью деkontаминации растений вначале проводилась поверхностная стерилизация семян. Семена проращивались при температуре 25°, фотопериоде 16/8 ч, при освещенности 2500 Кл. Для оценки энергии прорастания семян производилась их обработка наночастицами диоксида титана (НЧ TiO<sub>2</sub>) различной концентрации. Для получения стерильных эксплантов использовали стерилизованные, не обработанные НЧ TiO<sub>2</sub> семена. В этих же условиях развивались экспланты in vitro. Для каждого варианта эксперимента с определенной концентрацией наночастиц брали по 70 семян. При культивировании растений томата во всех вариантах оценивали морфологические характеристики эксплантов: длину стебля, количество настоящих листьев, длину корешка. Для внесения в питательную среду использовали НЧ TiO<sub>2</sub>, < 100 нм, рутильная форма. Исследования особенностей роста и развития семян и проростков томата на среде с добавлением наночастиц TiO<sub>2</sub> разных концентраций показали, что высокие концентрации наночастиц оксида титана (100 и 150 мг/л) оказывают угнетающее воздействие на длину корня, длину стебля, количество настоящих листьев. Некоторое стимулирующее воздействие на рост стебля наночастицы диоксида титана в концентрации 40 мг/л оказывали на 14-й и 21-й дни. Исследование выполнено в лаборатории экологии физиологии растений Ботанического сада ЮФУ.

Ключевые слова: наночастицы, диоксид титана, стерильные экспланты томата, *Lycopersicon esculentum*, энергия прорастания семян, морфологические параметры растений.

## INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF TOMATO (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*) IN VITRO

Varduni T.V.<sup>1</sup>, Sereda M.M.<sup>1</sup>, Kapralova O.A.<sup>1</sup>, Chokheli V.A.<sup>1</sup>, Varduni V.M.<sup>1</sup>, Shimanskaya E.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Academy of biology and biotechnology of Southern Federal University, Rostov-on-Don, e-mail: shimamed@yandex.ru

The aim of this study was to investigate the effects of nanoparticles of titanium dioxide on the growth and development of seeds and sterile explants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). As the explants used shoots at the stage of first true leaf, obtained from seedlings. With the purpose of decontamination of plant was initially carried out surface sterilization of seeds. The seeds progresivos at a temperature of 25, the photoperiod 16/8 h, at an illumination of 2500 KL. To assess the seed vigor subjected to treatment with nanoparticles of titanium dioxide (NC TiO<sub>2</sub>) with different concentrations. To obtain sterile explants used sterilized, not processed NCH TiO<sub>2</sub> seeds. Under the same conditions developed explants in vitro. For each experiment a certain concentration of nanoparticles taken for 70 seeds. In the cultivation of tomato plants in all variants, evaluated the morphological characteristics of explants: the length of the stem, number of leaves, length of the spine. For inclusion in the nutrient medium used NCH TiO<sub>2</sub> < 100 nm rutile form. Research of features of growth and development of seeds and seedlings of tomato on a medium with addition of TiO<sub>2</sub> nanoparticles of different concentrations showed that high concentrations of nanoparticles of titanium oxide (100 and 150 mg/l) have a dampening effect on (root length, stem length, number of true leaves). A stimulating effect on the growth of the stem, nanoparticles of titanium dioxide in a concentration of 40 mg/l had on the 14th and 21st days. The study was performed in the laboratory of ecological physiology of plants the Botanical garden of SFU.

Keywords: nanoparticles, titanium dioxide, sterile explants of tomato, *Lycopersicon esculentum*, the energy of seed germination, morphological parameters of plants.

В настоящее время особую остроту приобретают проблемы изучения положительного и отрицательного влияния наноматериалов на биологические объекты. Подобные

исследования становятся чрезвычайно актуальными, так как расширяется спектр и количество наночастиц, попадающих в окружающую среду, требуется разработка методов оценки последствий воздействия наночастиц на живые организмы, а развитие нанотехнологий становится неотъемлемой частью реализации плана научно-инновационного развития России [1-3].

Биобезопасность нанотехнологий, изучение особенностей поведения наночастиц в окружающей среде, живых организмах, в том числе растениях, является предметом многочисленных исследований [4-6]. Наноматериалы широко используются в оптике, химических технологиях, в медицине, в парфюмерно-косметической промышленности, сельском хозяйстве [7; 8] и т.д.

В первых экспериментальных исследованиях по биотестированию наночастиц предпочтение было отдано растениям. Растения являются разнообразными и доступными объектами, обладают чувствительностью к внешним слабоинтенсивным факторам, иногда на порядок превышающей чувствительность объектов животного происхождения [9]. Известно, что наночастицы размером менее 10 нм способны не только проникать внутрь растительной клетки, но и встраиваться в мембрану. Растения, культивируемые в условиях *in vitro*, являются хорошим модельным тест-объектом для оценки воздействия наночастиц, которые могут вноситься в питательную среду. Перспективным является изучение особенностей морфогенеза, цитогенетических показателей, взаимодействия наночастиц с внутриклеточными структурами [10].

Наночастицы  $\text{TiO}_2$  широко используются в современной промышленности как в чистом виде, так и в составе наноматериалов. Только в США четыре крупные компании (Altainano, Dupont, Nanophase, Nanogram) вырабатывают в год более 100 000 тонн НЧ  $\text{TiO}_2$ , а к 2025 году их производство прогнозируется довести до 2,5 млн тонн. НЧ  $\text{TiO}_2$  обладают более высоким фотокаталитическим эффектом, чем микрочастицы  $\text{TiO}_2$  [11; 12], формируя под воздействием УФ-излучения активные формы кислорода, гидроксильные радикалы,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и др. [13; 14].

Несмотря на широкий спектр исследований по изучению токсических свойств НЧ  $\text{TiO}_2$ , тему нельзя считать достаточно изученной. Исследование токсичности НЧ  $\text{TiO}_2$  *in vitro* на разных культурах показало наличие у них выраженных цитотоксических свойств [15; 16]. Фитотоксический эффект НЧ  $\text{TiO}_2$  был показан на однодольных и двудольных растениях [17] при изучении скорости прорастания семян и удлинения корней, а генотоксический эффект - при анализе показателей митотического индекса, уровня аббераций хромосом и количества микроядер в клетках растений. Основным механизмом токсического действия наночастиц оксида титана является индукция активных форм кислорода, причем реактивность зависит не

только от размеров наночастиц, но и от того, какой структурой представлен TiO<sub>2</sub> [18].

**Целью** данного исследования было изучение действия НЧ TiO<sub>2</sub> на рост и развитие семян и стерильных эксплантов томата (*Lycopersicon esculentum*).

**Задачи** исследования включали:

- оценку энергии прорастания семян, обработанных раствором НЧ TiO<sub>2</sub>;
- получение стерильных эксплантов томата и введение их в культуру *in vitro*;
- изучение морфологических характеристик эксплантов томата при культивировании на среде с добавлением НЧ TiO<sub>2</sub>.

#### **Объекты и методы исследования**

Объектами для проведения исследований послужили семена томата (*Lycopersicon esculentum*) сорта Зарница. Выбор сорта обусловлен его широким применением на юге России, в том числе и в Ростовской области [1].

#### *Стерилизация семян*

В качестве эксплантов использовались побеги на стадии первого настоящего листа, полученные из сеянцев. С целью деконтаминации растений вначале проводилась поверхностная стерилизация семян. Для этого семена промывались 20 минут в водопроводной воде с добавлением TWIN-80, затем в ламинар-боксе обрабатывались 1 минуту в 70%-ном этиловом спирте, 5 минут в 20%-ном тимеразоле и 3 раза по 20 минут в стерильной дистиллированной воде. После просушки семена помещались на питательную среду Мурасиге-Скуга с половинным составом без добавления гормонов. На второй неделе культивирования, когда сеянцы достигали стадии первого настоящего листа, вычленились верхушки сеянца размером около 1 см и переносились на питательную среду с добавлением наночастиц в различной концентрации: 10, 40, 60, 100, 150 мг/л.

Семена проращивались при температуре 25°, фотопериоде 16/8 ч, при освещенности 2500 Кл (для оценки энергии прорастания семян производилась их обработка НЧ TiO<sub>2</sub> различной концентрации, для получения стерильных эксплантов использовали стерилизованные, не обработанные НЧ TiO<sub>2</sub> семена). В этих же условиях развивались экспланты *in vitro*. Для каждого варианта эксперимента с определенной концентрацией наночастиц брали по 70 семян.

При культивировании растений томата во всех вариантах оценивали морфологические характеристики эксплантов: длину стебля, количество настоящих листьев, длину корешка.

Для внесения в питательную среду использовали НЧ TiO<sub>2</sub>, < 100 нм, рутильная форма.

#### **Результаты и их обсуждение**

Прорастание семян началось на 7-й день (рис. 1).



Рис. 1. Семена томата на 7-й день после пассажа

Оценка энергии прорастания семян на 14-й день наблюдения показала, что воздействие НЧ  $\text{TiO}_2$  концентрацией 40 мг/л не оказало воздействия на значение этого показателя и осталось на уровне контрольных значений (75%). С увеличением концентрации НЧ  $\text{TiO}_2$  происходило снижение значения энергии прорастания. Наименьшее значение энергии прорастания характерно для семян, проросших на питательной среде с добавлением диоксида титана концентрацией 150 мг/л. Результаты представлены в таблице.

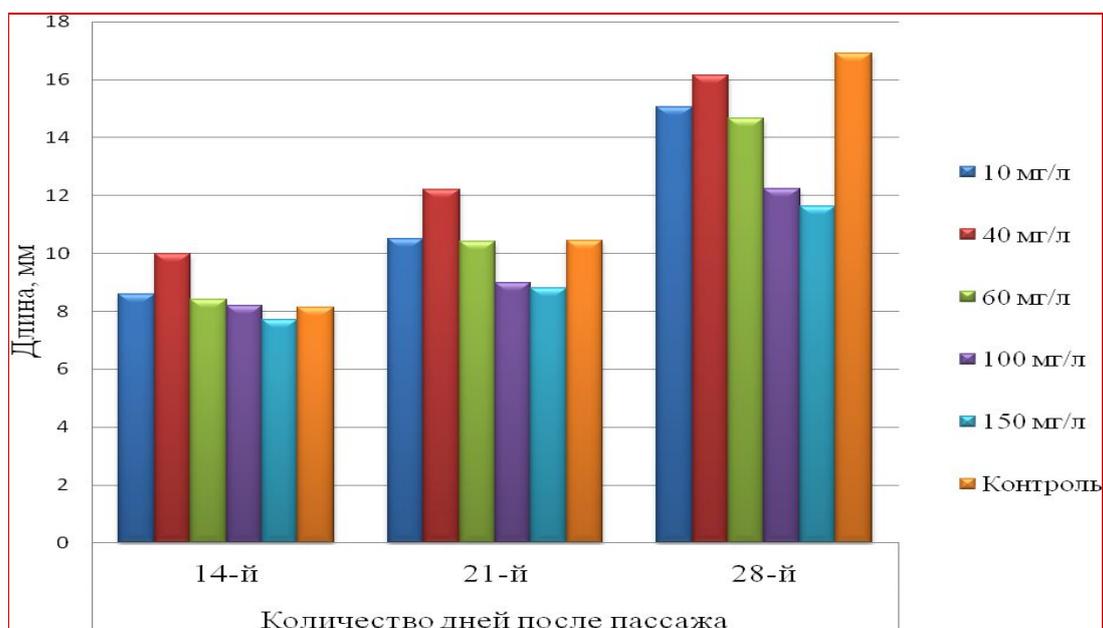
Энергия прорастания семян томата на 14-й день, %

| Концентрация, $\text{TiO}_2$ | Энергия прорастания семян, % |
|------------------------------|------------------------------|
| 40 мг/л                      | $84,75 \pm 1,79$             |
| 60 мг/л                      | $67 \pm 2,35^*$              |
| 100 мг/л                     | $63,5 \pm 2,40^{**}$         |
| 150 мг/л                     | $62 \pm 2,42^{**}$           |
| Контроль                     | $83,5 \pm 1,85$              |

\* - тенденция к достоверности;

\*\* - достоверность по Т-критерию Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Было проанализировано изменение длины стебля растений на 14, 21 и 28-й дни наблюдений. Результаты наблюдений представлены на рисунке 2. Наиболее интенсивное развитие проходило в культуре на питательной среде с низким содержанием наночастиц (10, 40 мг/л). Наблюдалась некоторая стимуляция роста стебля на 14-й и 21-й день на среде с добавлением НЧ  $\text{TiO}_2$  концентрации 40 мг/л. Наиболее существенное угнетение роста стебля наблюдали на 21-й и 28-й день на среде с добавлением НЧ  $\text{TiO}_2$  концентрацией 100 и 150 мг/л.



*Рис. 2. Среднее значение длины стебля после пассажа и культивирования на 14, 21 и 28-й день, мм*

Далее определяли визуально количество настоящих листочков во всех вариантах (рис. 3-5). Как видно из представленных данных, ни в одном из вариантов с добавлением наночастиц  $\text{TiO}_2$  не наблюдалось превышение контрольных значений, а рост на среде с добавлением наночастиц оксида титана концентрациями 100 и 150 мг/л вызывал существенное угнетение процесса роста листьев.



*Рис. 3. Растения томата на 14-й день после посева на среде, концентрация наночастиц  $\text{TiO}_2$  100 мг/л*



Рис. 4. Томаты после посева на среду на 21-й день, концентрация наночастиц  $TiO_2$  100 мг/л

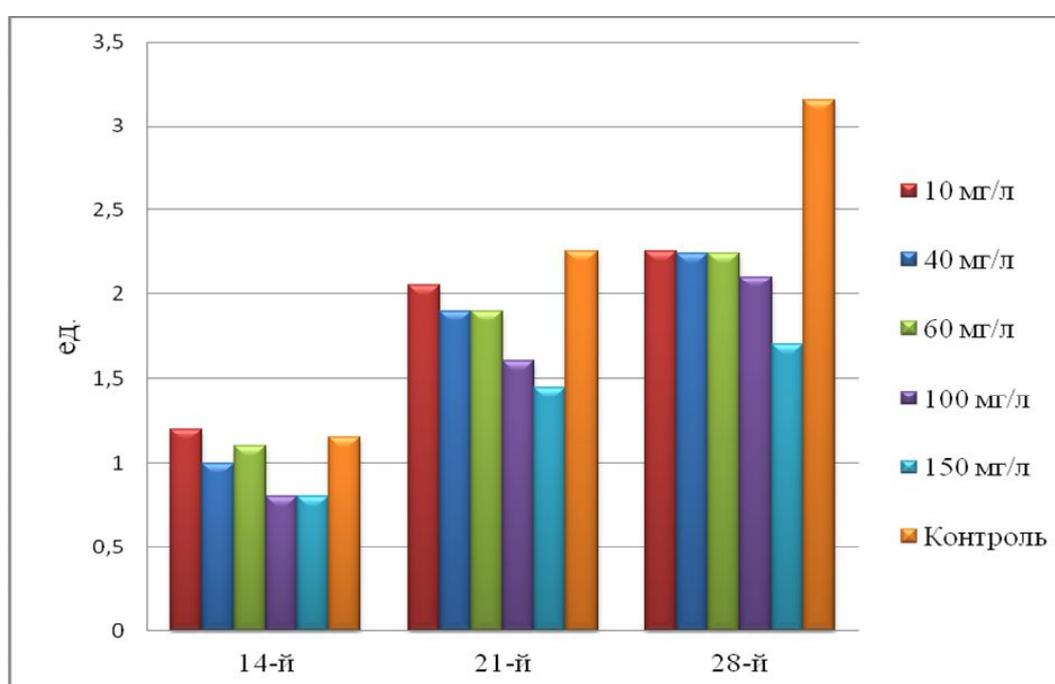


Рис. 5. Среднее количество настоящих листьев на 14, 21 и 28-й день культивирования томата на питательной среде, ед.

На 28-й день исследования определяли длину корешка у растений томата во всех вариантах. Средние значения длины корня представлены на рисунке 6.

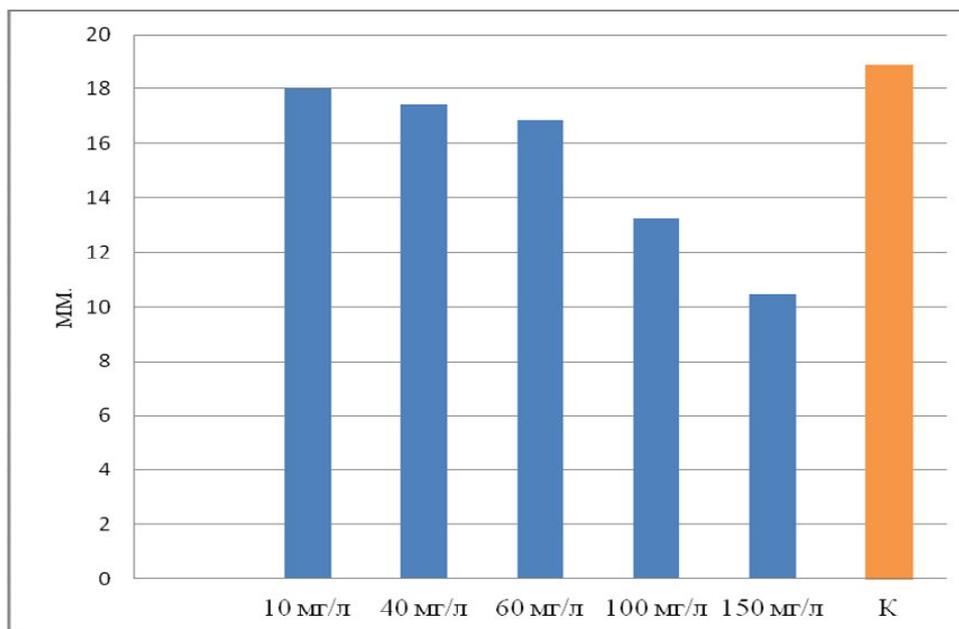


Рис. 6. Среднее значение длины корешка томатов на 28-й день культивирования, мм

Растения на среде с добавлением самых высоких концентраций наночастиц диоксида титана (100 и 150 мг/л) показали наименьшие значения длины корня. В остальных случаях существенных изменений по сравнению с контролем не наблюдалось.

### **Заключение**

Исследования особенностей роста и развития семян и проростков томата на среде с добавлением наночастиц  $TiO_2$  разных концентраций показали, что высокие концентрации наночастиц оксида титана (100 и 150 мг/л) оказывают угнетающее воздействие на энергию прорастания семян, морфологические параметры растений (длина корня, длина стебля, количество настоящих листьев). Некоторое стимулирующее воздействие на рост стебля наночастицы диоксида титана в концентрации 40 мг/л оказывали на 14-й и 21-й дни.

*Исследование выполнено в лаборатории экологии физиологии растений Ботанического сада ЮФУ в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности Министерства образования и науки РФ № 6.6222.2017/БЧ и Гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ «Экологические и сельскохозяйственные функции почв в условиях антропогенной нагрузки» № НШ-9072.2016.11. (2016-2017 гг.) с использованием оборудования ЦКП «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг».*

### **Список литературы**

1. Огнев В.В. Современные тенденции развития овощеводства Ростовской области / В.В. Огнев, В.Е. Зинченко, Н.И. Берников // Актуальные проблемы и пути их решения в современном плодоводстве, овощеводстве и виноградарстве Дона: материалы междунар. науч.-производ. конф. - Персиановский: ДонГАУ, 2014. - Ч. 1. - С. 122-125.

2. Проданчук Н.Г., Балан Г.М. Наночастицы диоксида титана и их потенциальный риск для здоровья и окружающей среды // Современные проблемы токсикологии пищевой и химической безопасности. - 2011. - № 4 (54). - С. 11-27.
3. Вардуни Т.В., Капралова О.А., Королева О.Г. и др. Влияние наночастиц оксида цинка и диоксида титана на растения редиса посевного (*RAPHANUS SATIVUS*) // Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии: сб. мат. междунар. науч. конф. и молодеж. науч. конф. памяти чл.-корр. РАН Д.Г. Матишова. - 2016. - С. 513-515.
4. Varduni T.V., Minkina T.M., Gorbov S.N. et al. Analysis of heavy metals in pylaisiella moss (*pylaysia polyantha*) growing in the city of ROSTOV-ON-DON // Middle East Journal of Scientific Research. - 2015. - Т. 23. - № 2. - С. 165-169.
5. Aruoja V. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* / V. Aruoja, H.C. Dubourguier, K. Kasemets // Sci. Total Environ. - 2009. - 407 (4). - P. 1461-1468.
6. Blaise C. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms / C. Blaise, F. Gagne, J.F. Ferard // Environ. Toxicol. - 2008. - 23. - P. 591-598.
7. Varduni T.V., Minkina T.M., Buraeva E.A. et al. Accumulation of radionuclides by pylaisiella moss (*pylaysia polyantha*) under urboecosystem conditions // American Journal of Applied Sciences. - 2014. - Т. 11. - № 10. - С. 1735-1742.
8. EC. EU nanotechnology R&D in the field of health and environmental impact of nanoparticles. – 2008. - 124 p. European Commission.
9. Faes C. Model averaging using fractional polynomials to estimate a safe level of exposure / C. Faes, M. Aerts // Risk. Anal. - 2007. - 27. - № 1. - P. 111-123.
10. Hou Juan. Effects of titanium dioxide nanoparticles on development and maturation of rat preantral follicle in vitro / Juan Hou, Wang Xuying // Academic Journal of Second Military Medical University. - 2009. - 8. - P. 16-24.
11. Oberdorster G. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles / G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster // Environmental Health Perspectives. - 2005. - 7 (13). - P. 823-839.
12. Robichaud K.O. Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO<sub>2</sub> Production As a Basis for Exposure Assessment / K.O. Robichaud, A.E. Uyar, M.R. Darby // Environ. Sci. Technol. - 2009. - 43 (12). - P. 4227-4233.
13. Ruffini Castiglione M. The effects of nanoTiO<sub>2</sub> on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L / M. Ruffini Castiglione, L. Giorgetti // Journal of Nanoparticle Research. - 2010. - 10. - P. 24-30.

14. Soonchul Kwon. Photocatalytic Applications of Micro- and nano-TiO<sub>2</sub> in Environmental Engineering / Soonchul Kwon, Maohong Fan // Critical Reviews in environmental Science and Technology. - 2008. - V. 38. - 3. - P. 197-226.
15. Velzeboer I. Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials / I. Velzeboer, A. Jan Hendriks // Environ. Toxicol. and Chem. - 2008. - 27. - № 9. - P. 1942-1947.
16. Wang J.J. Cyto and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells / J.J. Wang, B.J. Sanderson, H. Wang // Mutat res. - 2007. - 628. - P. 99-106.
17. Zhonghua Zhou. The stable and uniform characteristics of nitrogen in nitrogen doped titanium dioxide nanophotocatalytic particles / Zhonghua Zhou, Yue Huang // Journal of physics: Conference Series. - 2009. - 188. - 012033. - P. 1-5.
18. Гуськов Е.П., Шкурят Т.П., Вардуни Т.В. и др. Генетика окислительного стресса / Южный федеральный ун-т; Науч.-исслед. ин-т биологии; Северо-Кавказский науч. центр высш. шк. – Ростов н/Д, 2009. – 159 с.