

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК МАГНЕТИТУ НА РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН *Nicotiana tabacum in vivo* І В КУЛЬТУРІ *in vitro*

С.В. Горобець¹, Н.М. Ільчук¹, І.В. Дем'яненко^{1*}, М.О. Банникова^{1,2}

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

*Corresponding author: iryna.demjanenko@gmail.com

Received 2 Juny 2021; Accepted 29 August 2021

Проблематика. Наноматеріали легко піддаються модифікації та мають унікальні властивості, пов'язані з великою реакційноздатною поверхнею. Завдяки цим властивостям наноматеріали використовуються в різних галузях науки і технологій, таких як фармакологія, біотехнологія, хімічні технології тощо. Останнім часом активно досліджується вплив наночастинок магнетиту на морфологічні властивості рослин для подальшого використання їх як нанодобрив для підвищення врожайності та покращення властивостей сільськогосподарських рослин. Тютюн (*Nicotiana tabacum*) є модельним об'єктом рослинних біотехнологій, він використовується при вивченні впливу різних чинників на дводольні рослини, тому його було вибрано для дослідження впливу наночастинок магнетиту на ріст, розвиток і накопичення біомаси рослини.

Мета. Дослідження впливу наночастинок магнетиту на ріст і розвиток *Nicotiana tabacum* в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Методика реалізації. Методами порівняльної геноміки досліджено здатність тютюну продукувати біогенні магнітні наночастинок шляхом пошуку гомологів мам-білків у протеомі *Nicotiana tabacum* за допомогою програми Blast NCBI. Рослини було розділено на групи (контроль, концентрація наночастинок магнетиту 0,1 мг/см³, концентрація наночастинок магнетиту 1 мг/см³) для експерименту як *in vivo*, так й *in vitro*. Параметри рослин аналізували кожні 14 днів для виявлення динаміки впливу наночастинок магнетиту.

Результати. Установлено, що наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ у культурі *in vitro* та *in vivo* суттєво впливають на ріст кореневої системи та пагонів *Nicotiana tabacum*. На 56-ту добу культивування рослин *in vitro* на живильному середовищі з додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ спостерігали збільшення довжини пагона на 13 %, довжини кореня на 32 %, маси абсолютно сухих речовин на 19 % відносно контролю. Обробка рослин суспензією наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ приводила до більш виражених наслідків при вирощуванні тютюну в умовах *in vivo*. Так, на 56-ту добу довжина кореня збільшувалась на 23 %, довжина пагона – на 19 %, а маса абсолютно сухих речовин – у 2 рази, перші листочки з'являлись на 2 доби раніше порівняно з контролем. Додавання наночастинок магнетиту в субстрат, на якому вирощувались рослини *in vivo*, у концентрації 1 мг/см³ пригнічував ріст тютюну.

Висновки. Проведені дослідження показали доцільність використання магнітних наночастинок у концентрації 0,1 мг/см³ як нанодобрива при вирощуванні тютюну.

Ключові слова: нанодобрива; тютюн; *Nicotiana tabacum*; наночастинок магнетиту; біомінералізація; біогенні магнітні наночастинок; накопичення біомаси.

Вступ

Нанотехнології, особливо використання наночастинок оксидів заліза (магнетит, грейгіт), поступово набувають практичного застосування в сільському господарстві та рослинництві. Підвищення ефективності використання води, добрив, гербіцидів і пестицидів за рахунок бурхливого росту коренів та пагонів, модифікування обмінних процесів у рослинах, включаючи процес фотосинтезу, – ось деякі з наслідків використання наночастинок оксидів заліза в сільськогосподарському секторі [1].

Наночастинок оксидів заліза впливають на ефективність росту та підвищення врожайності рослин, починаючи від сходів насіння до локалізації резервних запасів поживних речовин. Застосування наночастинок оксиду заліза пришвидшує проростання насіння, ріст пагонів і коренів [2–7], стимулює обмінні процеси в рослинах [8–10]. Механізми взаємодії між рослинами, бактеріями, оксидами заліза, важкими металами потребують більш детального з'ясування.

Ще однією складовою дослідження впливу наночастинок оксиду заліза є доведена експериментально та теоретично (біоінформаційними

методами) [6] наявність біогенних магнітних наночастинок (БМН) у рослинах. У роботах [5, 8, 11, 12] показано існування єдиного генетичного механізму біомінералізації БМН для прокариот й еукаріот, у т.ч. для рослин. Особливої уваги вимагає той факт, що БМН розташовуються на стінках ситоподібних трубок (судинної системи рослин) [3] аналогічно розташуванню БМН у зразках грибів на стінках гіфів [4, 13], у тканинах та органах тварин (у т.ч. людини) на стінках капілярів [3] і впливають на везикулярний транспорт, оскільки величина градієнта магнітного поля розсіяння навколо БМН є достатньою для магнітного захоплення везикул під дією відповідної градієнтної магнітної сили [11, 14, 15].

Тютюн є однією з найбільш поширених сільськогосподарських культур. Сфери використання тютюну не обмежуються лише тютюновою промисловістю. З відходів тютюнової промисловості екстрагують алкалоїд нікотин, який широко використовується в сільському господарстві як інсектицид для боротьби з комахами-шкідниками. Насіння *Nicotiana tabacum* не містить нікотину, тож рафінована олія з нього використовується як заміник олії арахісу чи рапсу при створенні біопалива та у виробництві олійних фарб і лаків [16]. Тютюн є модельним об'єктом біотехнології рослин: фізіологія, морфологія та генетика тютюну добре вивчені, його геном розшифровано. Тютюн був першою генетично модифікованою вищою рослиною. Тютюн використовують для відпрацювання генноінженерних методик, перевірки створених генетичних конструкцій [17]. Генетично модифікований тютюн є "фабрикою" з виробництва рекомбінантних білків: від простих пептидів до складних мултимерних молекул, таких як інтерферон, гемоглобін або секреторні антитіла. Більшість цих білків має терапевтичне або промислове використання [18]. Наприклад, у 2012 р. Medicago, Inc. за місяць виготовила 10 млн доз вакцини від грипу на замовлення американського оборонного агентства DARPA, використовуючи як продуцент *Nicotiana tabacum* [19].

Актуальність нашої роботи полягає в дослідженні впливу наночастинок магнетиту та біогенних магнітних наночастинок на ріст і розвиток тютюну в умовах *in vivo* та *in vitro* з точки зору магнітодипольної взаємодії БМН і наночастинок магнетиту, що може дати нові уявлення про роль цих частинок у функціонуванні рослинного організму. Вплив наночасти-

нок магнетиту на рослинний організм у культурі *in vitro* вивчався вперше.

Матеріали і методи

Для одержання наночастинок магнетиту використовували реакцію швидкої нейтралізації надлишком водного розчину аміаку суміші солей дво- і тривалентного заліза [20], дисперсний розмір наночастинок становив 8–10 нм.

У досліді *in vitro* насіння тютюну стерилізували та пророщували в асептичних умовах згідно зі стандартною методикою [18]. Пророщені насінини (рис. 1) по одній асептично висаджували у скляні банки з трьома видами середовищ відповідно до сформованих груп (по 20 рослин у кожній групі). Рослини *Nicotiana tabacum* у досліді *in vitro* вирощували на середовищі MS [21] при 16-годинному фотоперіоді за температури 25 °С, освітлення ~4 тис. лк.

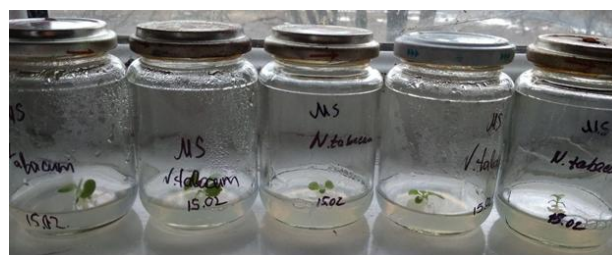


Рисунок 1: Пророщування насіння тютюну *in vitro* на безгормональному агаризованому середовищі MS

Досліджувані рослини розділили на 3 дослідні групи залежно від концентрації розчину магнетиту:

- К *in vitro* (контроль *in vitro*) – культивування на агаризованому середовищі MS;
- МНЧ 0,1 *in vitro* – культивування на середовищі MS, доповненому наночастинками магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³;
- МНЧ 1 *in vitro* – культивування на середовищі MS, доповненому наночастинками магнетиту в концентрації 1 мг/см³.

Для досліді *in vivo* відібрали 60 насінин *Nicotiana tabacum*, пророщених на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі. Сформовані паростки висадили в горщики об'ємом 1 см³ із ґрунтосумішшю (ґрунт універсальний складу: торф низинний, дернова земля, сопропіл, пісок, макро- і мікроелементи в необхідних пропорціях, вміст поживних речовин збалансований, рН 6–6,5, Україна). Вирощування відбувалося в умовах природнього освітлення (10 год/день, 14 год/ніч, 15 тис. лк) за температури в приміщенні 18–20 °С.

Досліджувані рослини розділили на 3 дослідні групи залежно від концентрації розчину магнетиту, аналогічно до експерименту *in vitro*:

- К *in vivo* (контроль *in vivo*) – культивування в горщиках, полив звичайною водою;
- МНЧ 0,1 *in vivo* – культивування у горщиках із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³;
- МНЧ 1 *in vivo* – культивування у горщиках із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 1 мг/см³.

Кожні 14 діб протягом 2-х місяців на морфологічні дослідження брали 15 рослин (по 5 із кожної групи) та вимірювали такі показники: довжина кореня, довжина пагона, середня площа листя, кількість листків, маса абсолютно сухих речовин (після ліофільного висушування [22]).

Статистичну обробку даних проводили в програмі Excel MS Office згідно зі стандартними методиками.

Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків *Nicotiana tabacum* із білками магнітотаксисної бактерії (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 проведено за стандартною методикою [23] з використанням програми BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), National Center for Biotechnology Information [24]. Основні параметри, за якими оцінювали наявність білків: статистична значимість вирівнювання (E-число), процент ідентичних амінокислот (Ident, %) і довжина білків.

Результати

Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків *Nicotiana tabacum* із білками магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR

Проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mam, без яких не-

можлива біомінералізація БМН у *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (табл. 1).

Морфологічний аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що росли в умовах *in vitro*

Вирощування рослин відбувалося протягом двох місяців відповідно до методики, описаної вище. Кожну 14-ту добу проводили оцінку морфологічних параметрів рослин (рис. 2, табл. 3). Динаміку зміни маси абсолютно сухих речовин у кожній експериментальній групі показано на рис. 3.



Рисунок 2: Рослини тютюну, вирощені в умовах *in vitro* за різних концентрацій наночастинок магнетиту в середовищі MS (56-та доба): (А) контроль, (Б) концентрація 0,1 мг/см³, (В) концентрація 1 мг/см³

Морфологічний аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що росли в умовах *in vivo*

Аналогічно описаному вище дослідженню *in vitro* проводили вирощування тютюну *in vivo* із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 та 1 мг/см³ шляхом поливу суспензією наночастинок магнетиту різної концентрації. Кожну 14-ту добу проводили оцінку морфологічних параметрів рослин (табл. 4). На рис. 4 представлено динаміку зміни маси абсолютно сухих речовин у рослинах досліджуваних груп.

Таблиця 1: Порівняння білків (незамінних для біомінералізації) магнітосомного острівця магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 і білків *Nicotiana tabacum*

Організм	Повнота геному	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1						
		Довжина білка						
		MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK	MamN
		217	297	318	632	772	360	437
<i>Nicotiana tabacum</i>	39 %	3e-05	3e-29	6e-26	1e-07	2e-33	0,006	1e-11
		27,74	26,71	29,57	24,57	45,68	22,05373	29
		332	512	512	431	431	77	517

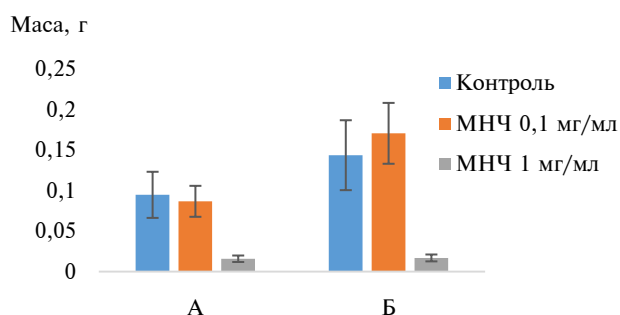


Рисунок 3: Діаграма зміни маси абсолютно сухих речовин у рослин тютюну, вирощених в умовах *in vitro*, на 42-гу (А) та 56-ту (Б) добу залежно від концентрації наночастинок магнетиту в середовищі MS

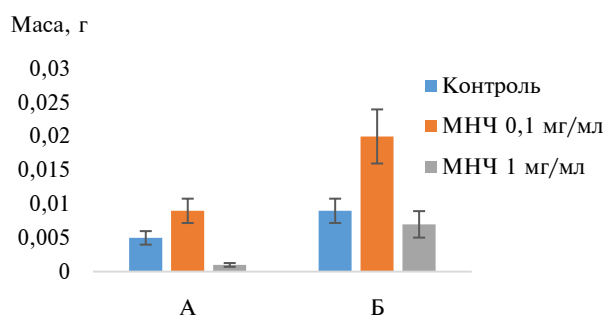


Рисунок 4: Динаміка зміни маси абсолютно сухих речовин у рослин тютюну, вирощених в умовах *in vivo*, на 42-гу (А) та 56-ту (Б) добу залежно від концентрації наночастинок магнетиту в суспензії для поливу

Таблиця 3: Зміна морфологічних параметрів рослин тютюну, вирощених в умовах *in vitro*, залежно від концентрації наночастинок магнетиту в середовищі MS

Дослідна група	Показник	Доба вирощування			
		14	28	42	56
Контроль (група К <i>in vitro</i>)	Довжина кореня, мм	23 ± 6	30 ± 6	40 ± 5	40 ± 8
	Довжина пагона, мм	5 ± 1,1	6,6 ± 0,9	12 ± 3	17 ± 2
	Площа листя, см ²	29 ± 6	65 ± 16,5	133,0 ± 79	156 ± 16,5
	Кількість листків, шт	6 ± 1	6 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
	Маса абсолютно сухих речовин, г	—	—	0,10 ± 0,03	0,14 ± 0,03
0,1 мг/см ³ магнетиту (MNЧ 0,1 <i>in vitro</i>)	Довжина кореня, мм	21 ± 6	43 ± 2	52 ± 6	58 ± 6
	Довжина пагона, мм	3,4 ± 0,5	7,6 ± 1,1	13 ± 4	20 ± 4
	Площа листя, см ²	21 ± 7	83 ± 18	108 ± 47	153 ± 36
	Кількість листків, шт	5 ± 1	7 ± 0	10 ± 1	12 ± 1
	Маса абсолютно сухих речовин, г	—	—	0,09 ± 0,02	0,17 ± 0,05
1 мг/см ³ магнетиту (MNЧ 1 <i>in vitro</i>)	Довжина кореня, мм	9 ± 2	10 ± 3	24 ± 5	25 ± 5
	Довжина пагона, мм	3 ± 1,5	2,5 ± 1,0	6,5 ± 2,5	7 ± 2
	Площа листя, см ²	9 ± 3	16 ± 6	73 ± 32	80 ± 37
	Кількість листків, шт	5 ± 2	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 2
	Маса абсолютно сухих речовин, г	—	—	0,016 ± 0,004	0,017 ± 0,003

Таблиця 4: Зміна морфологічних параметрів рослин тютюну, вирощених *in vivo*, залежно від концентрації суспензії магнетиту

Дослідна група	Показник	Доба вирощування			
		14	28	42	56
Контроль (група К <i>in vivo</i>)	Довжина кореня, мм	7,6 ± 0,5	11 ± 2	11 ± 1	11,5 ± 1,4
	Довжина пагона, мм	3,2 ± 0,4	7 ± 1	9 ± 2,5	12 ± 1,3
	Площа листя, см ²	4,5 ± 1	13 ± 6	50 ± 26	76 ± 28
	Кількість листків, шт	2 ± 0	4 ± 1	5 ± 1	8 ± 1
	Маса абсолютно сухих речовин, г	—	—	0,005 ± 0,001	0,009 ± 0,002
0,1 мг/см ³ магнетиту (MNЧ 0,1 <i>in vivo</i>)	Довжина кореня, мм	9 ± 3	12 ± 1,5	13 ± 1	15 ± 1,6
	Довжина пагона, мм	3,4 ± 0,9	7 ± 1,4	12 ± 2	15 ± 1
	Площа листя, см ²	3,8 ± 1,4	10,5 ± 2,9	43 ± 16	92 ± 41
	Кількість листків, шт	2 ± 1	8 ± 1	9 ± 2	12 ± 2
	Маса абсолютно сухих речовин, г	—	—	0,009 ± 0,001	0,020 ± 0,004
1 мг/см ³ магнетиту (MNЧ 1 <i>in vivo</i>)	Довжина кореня, мм	7,8 ± 1,6	10 ± 2	10 ± 2	11 ± 2
	Довжина пагона, мм	2,8 ± 0,4	3 ± 1	4,4 ± 1,1	9 ± 1
	Площа листя, см ²	2,8 ± 0,6	8 ± 1,5	31 ± 10	54 ± 18
	Кількість листків, шт	2 ± 0	4 ± 1	6 ± 1	8 ± 2
	Маса абсолютно сухих речовин, г	—	—	0,001 ± 0,001	0,007 ± 0,002

Обговорення

Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків *Nicotiana tabacum* із білками магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR

Проведений біоінформаційний аналіз (див. табл. 1) показав, що в рослин тютюну виявлено гомологи всіх білків групи Mam, необхідних для біомінералізації; отже, цей організм є продуцентом БМН. Згідно з класифікацією [25], тютюн синтезує внутрішньоклітинні кристалічні біогенні магнітні наночастинки.

Також підтвердженням гіпотези є аналогічність функції білків біомінералізації та їх гомологів у тютюні [25], що є прикладом базового фізіологічного процесу, характерного для більшості живих організмів (табл. 5).

Морфологічний аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що росли в умовах *in vitro*

Починаючи з 28-ї доби росту, середня довжина кореня в групі, що росла на середовищі MS, доповненому наночастинками магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³, починає істотно перевищувати показники контрольної групи

Таблиця 5. Функції білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок групи Mam магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та функції білків гомологів у тютюну

Блок магнітотаксисної бактерії	Функції білка магнітотаксисної бактерії	Назва та функції гомологічного білка тютюну
MamB	Транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni	(CDF) Cation efflux family protein – інтегральні мембранні білки, які підвищують толерантність до іонів двовалентних металів, таких як кадмій, цинк, кобальт тощо
MamE	Серинова протеаза PDZ-домен трипсиноподібної серинової протеази залучений до відгуку на тепловий шок, функції шаперонів, апоптозу, може бути відповідальним за впізнавання субстрату і/або зв'язування	DegP protease 1 – серинова протеаза Серинові протеази мають широкий спектр пептидазної активності, включаючи екзопептидазу, ендопептидазу, олігопептидазу та омегапептидазну активність. Серинові протеази залучені до важливих фізіологічних процесів, включаючи регулювання мітохондріального гомеостазу, апоптозу та передачу клітинних сигналів, залучені до розвитку патологічних процесів
MamA	Містить домен TPR, який є консенсусною послідовністю. TPR-домен залучений у різноманіття функцій, включаючи білок-білкові взаємодії, функції шаперонів, клітинний цикл, транскрипцію, транспорт білків	Pex5-білок – пероксисома – поширений, оточений мембраною органоїд клітини з великим різноманіттям метаболічних функцій: руйнування токсичних сполук, побудова мієлінової оболонки нервових волокон тощо. Ферменти органели використовують молекулярний кисень для відщеплення атомів водню від н/о субстратів з утворенням перекису. Pex5 містить домен TPR
MamO	Серинова протеаза	DegP protease 1 – серинова протеаза
MamM	Транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni	(CDF) Cation efflux family protein – інтегральні мембранні білки, які підвищують толерантність до іонів двовалентних металів, таких як кадмій, цинк, кобальт тощо
MamN	Аніон пермеаза ArsB/NhaD Бере участь у процесі біомінералізації. Регулює рівень рН у магнітосомі. Відповідає за трансмембранний транспорт речовин	Аніон пермеаза ArsB/NhaD Забезпечує перенесення розчиненої речовини або розчинених речовин з одного боку мембрани на інший відповідно до реакції: ATP + H ₂ O + arsenite(in) = ADP + phosphate + arsenite(out)

рослин. На 56-ту добу довжина кореня в рослин із групи МНЧ 0,1 *in vitro* у середньому на 46 % більша, ніж у контрольних. Крім того, в рослин із групи МНЧ 0,1 *in vitro* у середньому було більше бічних коренів, що свідчить про вплив наночастинок магнетиту на метаболічні процеси в кореневій системі.

У рослин (рис. 5, в, г), що були вирощені на середовищі MS із концентрацією наночастинок магнетиту 1 мг/см³, вже з 14-ї доби спостерігалось пригнічення розвитку кореневої системи: довжина кореня в середньому на 59 % була менша, ніж у контрольної групи, й удвічі менша, ніж у групи, що росла на середовищі MS із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³.

Також варто зазначити, що на 42-гу добу досліду було помічено, що корені рослин із групи МНЧ 1 *in vitro* перестають вrostати вглиб агаризованого середовища і розташовуються на його поверхні. В деяких випадках спостерігалось навіть явище їх відриву від поверхні середовища разом із пагоном, на поверхні середовища лишались тільки кінчики коренів. У дослідженні впливу сольового стресу на архітектуру кореневої системи *Arabidopsis*

thaliana [26] виявлено, що корені, за надто високої концентрації хлориду натрію в певних ділянках середовища, припиняють проявляти позитивний геотропізм і починають оминати зони підвищеної солоності. За аналогією можна припустити подібний вплив високих концентрацій наночастинок магнетиту на кореневу систему *N. tabacum* – такий ріст коренів є адаптацією рослини до стресових умов.

Різниця в середній довжині пагона між контролем та групою, яка росла на середовищі MS із наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³, була в межах похибки. Після перших двох тижнів культивування довжина пагона у рослин із групи К *in vitro* (контроль) була вищою на 45 %, однак з 28-ї доби і до кінця експерименту група МНЧ 0,1 *in vitro* постійно випереджала групу К *in vitro* на 6–14 %. Хоча значення стандартного відхилення не дає можливості стверджувати, що різниця достовірна, той факт, що така тенденція зберігалась протягом 6-ти тижнів, дає змогу припустити, що магнетит позитивно вплинув на ріст пагона. Пригнічення росту на початку дослідження на середовищі MS, доповненому наночастинок магнетиту в

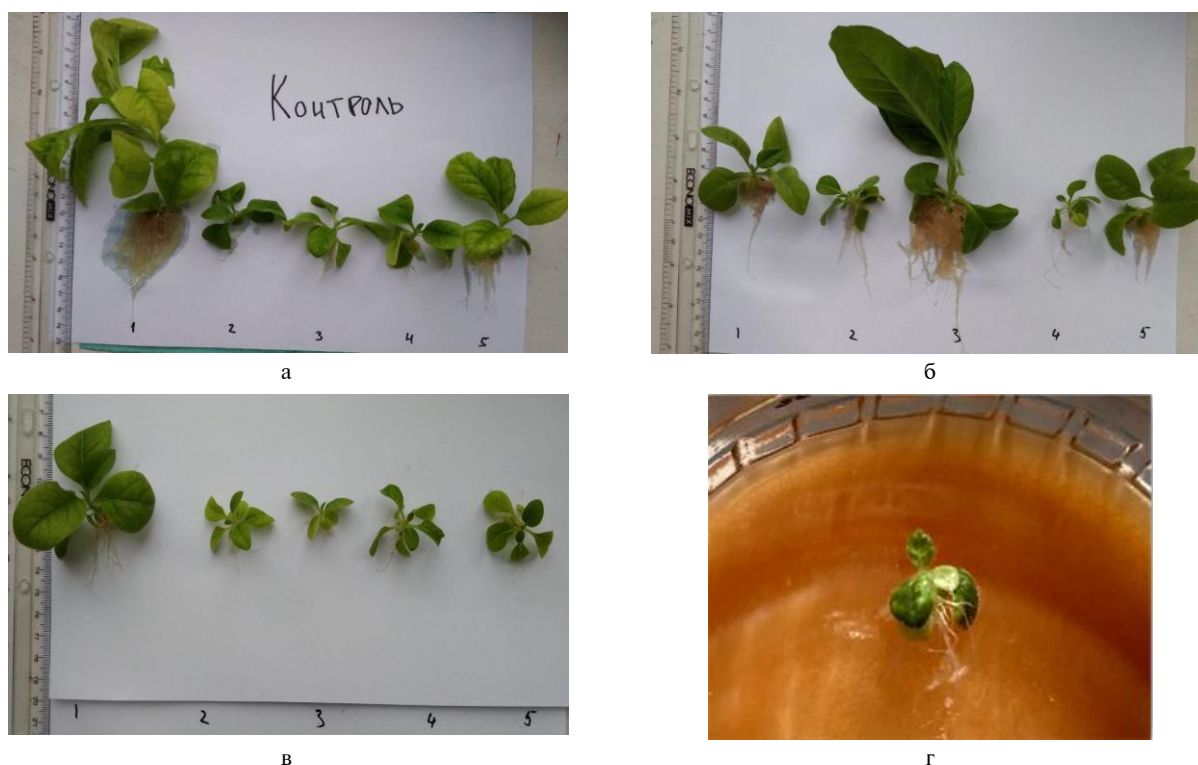


Рисунок 5: Рослини тютюну, вирощені на середовищі MS в умовах *in vitro*, на 56-ту добу: (а) контроль; (б) із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³; (в, г) із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 1 мг/см³

концентрації $0,1 \text{ мг/см}^3$, може бути пов'язане з підвищеною чутливістю молодих паростків до такої концентрації магнетиту, оскільки для збереження асептичності весь магнетит вносився в середовище одноразово. У групи, що росла на середовищі MS із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 1 мг/см^3 , показники довжини пагона нижчі на 62 % (28-ма доба) та на 58 % (56-та доба) порівняно з групою K *in vitro*.

На 28-му добу культивування середня площа листя в групі МНЧ $0,1 \text{ in vitro}$ збільшилася на 28 % відносно контролю, але на 56-ту добу значення показника в цих двох групах вирівнявся в межах похибки. При збільшенні концентрації спостерігали пригнічення розвитку листя, тому на 28-му добу показник середньої площі листя групи МНЧ 1 in vitro був меншим за контроль на 75 %, а на 56-ту добу – на 49 %.

Внесення суспензії магнетиту в концентрації 1 мг/см^3 призводить до зменшення накопичення маси абсолютно сухих речовин (див. рис. 3). У рослинах групи МНЧ 1 in vitro на 42-гу добу цей показник знижується на 84 %, на 56-ту добу тенденція зберігається. Різниця в масі абсолютно сухих речовин між групою K *in vitro* та МНЧ $0,1 \text{ in vitro}$ майже відсутня.

Цікавим є той факт, що кількість листків у рослин 3-х експериментальних груп коливається в межах похибки. Але у рослин групи МНЧ 1 in vitro спостерігається зупинка розвитку листків (8 ± 1), починаючи з 28-ї доби, що може бути спричинено надто високою концентрацією магнетиту в середовищі MS.

Виявлено сильний вплив магнетиту на кореневу систему рослин досліджуваних груп. На 28-му добу росту в групі МНЧ $0,1 \text{ in vitro}$ довжина кореня була на 43 % більша, ніж у контрольній групі. Аналогічно до попередніх показників, висока концентрація магнетиту (1 мг/см^3) у середовищі MS негативно вплинула на розвиток кореня: 28-ма доба – довжина кореня менша на 75 % за контроль, 56-та доба – менша на 48 %.

У деяких рослин із групи МНЧ 1 in vitro , починаючи з 28-ї доби, спостерігалось сильне побіління листя, що свідчить про хлороз. Його причиною зазвичай є нестача мінеральних речовин. Оскільки в самому живильному середовищі їх нестачі на такому ранньому етапі не могло виникнути, ймовірно, що поживні речовини просто не надходили всередину рослини. Згідно з літературними даними [3, 10], причи-

ною токсичності наночастинок магнетиту може бути зниження проникності провідних шляхів кореневої системи (ситоподібних трубок) через магнітодипольну взаємодію штучних магнітних наночастинок, що поступають із субстрату та БМН, аналогічно дослідженням [3, 15, 25]. Також у рослин групи K *in vitro* на 56-ту добу досліду спостерігалось менш виражене, але помітне посвітління листя, що свідчить про хлороз, який виникає внаслідок виснаження живильного середовища. А в рослин, які культивували на середовищі MS із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації $0,1 \text{ мг/см}^3$, ознак хлорозу не спостерігалось. Можна зробити припущення, що наночастинок магнетиту підвищують ефективність всмоктування і транспортування поживних речовин, які ще лишились у середовищі.

Таким чином, магнетит у концентрації 1 мг/см^3 негативно впливає на ріст і розвиток рослин тютюну в умовах *in vitro* при одноразовому внесенні всього магнетиту в живильне середовище: зменшується довжина коренів, спостерігається їх негативний геотропізм, наявні ознаки сильного хлорозу. А наночастинок магнетиту в концентрації $0,1 \text{ мг/см}^3$ позитивно впливають на ріст і розвиток рослин тютюну.

У роботі [27] при дослідженні калюсних культур льону було встановлено, що наночастинок Fe_3O_4 у концентрації $0,5\text{--}1,5 \text{ мг/дм}^3$ проникають у клітини калюсу та викликають низький рівень токсичності в культурах. Також в експлантатах льону, вирощених на середовищі MS із додаванням магнетиту в концентрації $0,5\text{--}1,5 \text{ мг/дм}^3$, спостерігали значне збільшення ембріогенезу.

Морфологічний аналіз рослин *Nicotiana tabacum*, що росли в умовах *in vivo*

Динаміка росту пагонів у рослин, які поливали суспензією наночастинок магнетиту в концентрації $0,1 \text{ мг/см}^3$ (МНЧ $0,1 \text{ in vivo}$) перевищувала динаміку росту контрольних рослин (K *in vivo*) на 28-му добу на 18 %, на 56 добу – на 24 %. У рослин, які поливали суспензією наночастинок магнетиту в концентрації $0,1 \text{ мг/см}^3$, значно швидше, ніж у рослин із двох інших груп, з'явилися нові листки, але кількість листків у досліджуваних групах коливалась у межах похибки.

В умовах *in vivo* полив тютюну суспензією наночастинок магнетиту в концентрації $0,1 \text{ мг/см}^3$ мав найбільший вплив на показники росту кореня рослин на 56-ту добу, довжина кореня збільшилася на 30 %.

У групі рослин МНЧ 1 *in vivo* виявлено затримку росту та розвитку рослин, про що свідчать такі показники: довжина пагона коротша порівняно з контролем на 56 % (28-ма доба), а на 56-ту добу різниця між довжинами пагонів скорочується до 25 %; середня площа листя є меншою на 38 % на 28-му добу вирощування, та при подальшому рості (56-та доба) цей показник збільшується до 28 %.

Рослини з групи МНЧ 0,1 *in vivo* також значно перевищують інші за масою абсолютно сухих речовин: на 42-гу добу різниця з контрольною групою становила 80 %, а на 56-ту добу – 120 %. Цікавим є той факт, що на 42-гу добу дослідження в групі МНЧ 1 *in vivo* маса абсолютно сухих речовин нижча за контроль на 80 %, а на 56-ту добу досягала приблизно того ж значення, що й контроль. Можливо, це пов'язано з надмірною акумуляцією наночастинок магнетиту в провідних тканинах, що й пригнічувало ріст наземної частини рослини.

Порівнюючи результати дослідів *in vitro* та *in vivo*, можна зробити висновок, що вплив наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ на рослини тютюну є позитивним. Як описано вище, збільшуються розмір зеленої наземної частини рослини (а отже, і її зеленої маси), середня площа листя та маса абсолютно сухих речовин. В досліді *in vitro* вплив МНЧ був виражений меншою мірою, ніж у досліді *in vivo*. Аналогічні результати отримано для інших культур (пшениця, петрушка звичайна та кучерява, горох, печериці, глива звичайна [3, 4, 28]). Наприклад, у процесі культивування грибів із додаванням розчину магнетиту концентрацією 0,1 мг/см³ середня маса гриба збільшилася на 40 % (печериця) та на 37,5 % (глива) відносно контролю. В роботі [29] встановлено, що магнетит у концентрації 0,05 та 0,2 мг/см³ підвищує схожість насіння (93 та 97 % відповідно порівняно з 92 % у контролі), тоді як вищі концентрації (0,4–0,8 мг/см³) майже не спричиняють ефекту. Довжина коренів і паростків також збільшувалась при підвищенні концентрації наночастинок із 0,05 до 0,2 мг/см³ і поступово зменшувалась при подальшому підвищенні концентрації: максимальна довжина коренів (66 мм) спостерігалась за концентрації 0,1 мг/см³, пагонів (64 мм) – за 0,2 мг/см³, тоді як у контрольних проростків корінь і паросток досягали у середньому довжини 52 і 39 мм відповідно [29].

Висновки

Уперше проведено дослідження впливу розчину магнетиту концентраціями 0,1 і 1 мг/см³ на рослини тютюну в умовах *in vitro*. Виявлено, що закономірності росту та розвитку рослин тютюну під впливом різних концентрацій розчину магнетиту в умовах *in vitro* та *in vivo* аналогічні.

Визначено, що наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ у культурі *in vitro* і в умовах *in vivo* суттєво впливають на ріст кореневої системи та пагонів *Nicotiana tabacum*. При культивуванні рослин *in vitro* на середовищі MS із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ на 56-ту добу довжина пагона збільшилася на 13 %, довжина кореня – на 46 %, маса абсолютно сухих речовин – на 19 % порівняно з контролем. Суттєвіший вплив наночастинок магнетиту в концентрації 0,1 мг/см³ виражений у тютюну, вирощеного в умовах *in vivo*. Так, на 56-ту добу довжина кореня збільшилася на 30 %, довжина пагона – на 24 %, маса абсолютно сухих речовин – в 2 рази, на 2 доби раніше з'явилися перші листочки порівняно з контролем.

При вирощуванні тютюну *in vitro* на середовищі MS із додаванням наночастинок магнетиту концентрацією 1 мг/см³ всі ростові показники зменшилися відносно контролю (довжина коренів – на 37 %, довжина пагонів – на 56 %, маса абсолютно сухих речовин – на 88 %). У рослин, вирощених *in vivo* із додаванням наночастинок магнетиту в концентрації 1 мг/см³ довжина кореня зменшилася на 8 %, а наземна частина рослини – на 27 %, маса абсолютно сухих речовин коливалась у межах похибки порівняно з контролем, крім того, розвивався хлороз.

Методами порівняльної геноміки виявлено гомологи мам-білків магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense MSR* у протеомі *Nicotiana tabacum*, про що свідчать відповідні значення E-числа (є меншим за 10⁻³) та процента ідентичності (Indet % ≥ 25 %). Згідно з класифікацією показано, що тютюн є продуцентом внутрішньоклітинних кристалічних БМН.

Ланцюжки БМН є компонентами клітин, які розташовані на стінках провідної тканини рослин (ситоподібних трубок флоєми). Оскільки флоєма рослин слугує для перенесення по організму органічних речовин, гормонів тощо [30], то внесення наночастинок магнетиту в концен-

трації 0,1 мг/см³ стимулює ріст і розвиток рослини, про що свідчать отримані дані. Згідно з дослідженнями, така локалізація характерна для різних організмів (провідної тканини рослин – флоєми [3], гіфів у грибів [12, 31] і судин у зразках тканин тварин, включаючи людину [32], що вказує на генетично запрограмований ме-

ханізм біосинтезу БМН [33] та спільні метаболічні функції. Ланцюжки БМН створюють градієнтні магнітні поля порядку декількох тисяч Е та можуть суттєво впливати на процеси масопереносу везикул, гранул, органел та інших структурних елементів поблизу мембрани клітин.

References

- [1] Mohamed MA, Mohamed AE-MA, Abd-Elsalam KA. Magnetic nanoparticles in plant protection: Promises and risks. In: *Magnetic Nanostructures*. Cham: Springer; 2019. p. 225-46. DOI: 10.1007/978-3-030-16439-3_12
- [2] Wang H, Kou X, Pei Z, Xiao JQ, Shan X, Xing B. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*. 2011 Mar 15;5(1):30-42. DOI: 10.3109/17435390.2010.489206
- [3] Gorobets O, Gorobets S, Gorobets Y. *Biogenic magnetic nanoparticles in metabolism from bacteria to human*. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2020. 164 p.
- [4] Gorobets S, Gorobets O, Duduk A, Bulaievska M, Sharay I. Comparative characteristics of biogenic magnetic nanoparticles in plant, fungi and animal organisms. In: *Proceedings of IEEE AIM 2018*. La Thuile; 2018.
- [5] Gorobets SV, Gorobets OY. Functions of biogenic magnetic nanoparticles in organisms. *Funct Mater*. 2012;19(1):18-26.
- [6] Gorobets SV, Bulaievska MO, Zelinska OM. Method of detection of biogenic magnetic nanoparticles in representatives of the kingdom Plantae. In: *Proceedings of IV International Conference Problems and prospects for the development of modern science in Europe and Asia*. 2018. p. 21-4.
- [7] Gorobets SV, Gorobets OY, Yevzyk LA, Maherman AM. Biotechnology of growing peas *pisum sativum* on soils with magnetic nanoparticles. In: *Proceedings of XV International Conference Biologically active preparations for plant growing scientific background - recommendations - practical results*. 2019. p. 67.
- [8] Siddiqi KS, Husen A. Plant Response to Engineered metal oxide nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. 2017 Dec 6;12(1):92. DOI: 10.1186/s11671-017-1861-y
- [9] Alkhatib R, Alkhatib B, Abdo N, AL-Eitan L, Creamer R. Physio-biochemical and ultrastructural impact of (Fe₃O₄) nanoparticles on tobacco. *BMC Plant Biol*. 2019 Dec 13;19(1):253. DOI: 10.1186/s12870-019-1864-1
- [10] Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, Kalaji HM, He X, Mbarki S, et al. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Front Chem*. 2017 Oct 12;5. DOI: 10.3389/fchem.2017.00078
- [11] Gorobets OY, Gorobets SV, Gorobets YI. Biogenic magnetic nanoparticles: Biomineralization in prokaryotes and eukaryotes. In: *Dekker encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. 3rd edition. 2014. p. 300-8.
- [12] Gorobets SV, Gorobets OY, Gorobets YI. Biomineralization of intracellular biogenic magnetic nanoparticles and their functions. *Naukovi Visti NTUU KPI*. 2013;3:28-33.
- [13] Gorobets SV, Yevzyk LA, Kovalchuk IA, Kovalev OV. Production of magnetically controlled biosorbents based on fungi *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes*. *Biotechnol Acta*. 2019 Oct;12(5):63-71. DOI: 10.15407/biotech12.05.063
- [14] Chekhun VF, Gorobets SV, Gorobets YI, Demianenko IV. Magnetic nanostructures in tumor cells. *Visn Nac Akad Nauk Ukr*. 2011;11:13-20.
- [15] Mikesyhina HI, Darmenko YA, Gorobets OY, Gorobets SV, Sharay IV, Lazarenko OM. Influence of biogenic magnetic nanoparticles on the vesicular transport. *Acta Phys Pol A*. 2018 Mar;133(3):731-3. DOI: 10.12693/APhysPolA.133.731
- [16] Vossen vander HAM. *Plant Resources of South-East Asia*. Leiden, Netherlands: Backhuys Publisher; 1999. 708 p.
- [17] Ganapathi T, Suprasanna P, Rao P, Bapat V. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian J Biotechnol*. 2004;3:171-84.
- [18] Rymerson RT, Menassa R, Brandle JE. Tobacco, a platform for the production of recombinant proteins. In: *Molecular farming of plants and animals for human and veterinary medicine*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2002. p. 1-31. DOI: 10.1007/978-94-017-2317-6_1
- [19] Powell J. From pandemic preparedness to biofuel production: tobacco finds its biotechnology niche in north america. *Agriculture*. 2015 Sep 25;5(4):901-17. DOI: 10.3390/agriculture5040901
- [20] Gorbyk PP. Magnetosensitive nanocomposites with functions of nanorobots for applications in medicine and biology. *Surface*. 2015;297-310.
- [21] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962 Jul;15(3):473-97. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

- [22] Melnyk S. Methods for determining the quality of crop products. Ministry of Agricultural Policy and Food of Ukraine, Ukrainian Institute of Examination of Plant Varieties; 2016 p. 158.
- [23] Gorobets SV, Gorobets OYu, Demyanenko IV. Bioinformatics. Workshop. Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute; 2020. 86 p. Available from: <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/38813>
- [24] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Blast.ncbi.nlm.nih.gov. 2021 [cited 2021 May 25]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [25] Gorobets OY, Gorobets SV, Sorokina LV. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and magneto-sensitive inclusions in microorganisms and fungi. *Funct Mater*. 2014 Dec 30;21(4):427-36. DOI: 10.15407/fm21.04.427
- [26] Sun F, Zhang W, Hu H, Li B, Wang Y, Zhao Y, et al. Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in arabidopsis. *Plant Physiol*. 2008 Jan;146(1):178-88. DOI: 10.1104/pp.107.109413
- [27] Kokina I, Mickeviča I, Jahundoviča I, Ogurcovs A, Krasovska M, Jermaļonoka M, et al. Plant explants grown on medium supplemented with Fe₃O₄ nanoparticles have a significant increase in embryogenesis. *J Nanomater*. 2017;2017:1-11. DOI: 10.1155/2017/4587147
- [28] Gorobets S, Gorobets O, Magerman A, Gorobets Y, Sharay I. Biogenic magnetic nanoparticles in plants. ArXiv [Preprint] 2019. arXiv:1901.07212
- [29] Shankramma K, Yallappa S, Shivanna MB, Manjanna J. Fe₂O₃ magnetic nanoparticles to enhance *S. lycopersicum* (tomato) plant growth and their biomineralization. *Appl Nanosci*. 2016 Oct 20;6(7):983-90. DOI: 10.1007/s13204-015-0510-y
- [30] Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol*. 2004 Jun 2;55(1):341-72. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141758
- [31] Gorobets SV, Duduk AV, Bulaievska MO. Comparative characteristics of biogenic magnetic nanoparticles in Plants, Fungi and Animals. In: *Proceedings of XII Conference Biotechnology of the XXI century*. Kyiv: Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute; 2018. p. 82.
- [32] Gorobets S, Gorobets O, Bulaievska M. The presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans. In: *Proceedings of II International Scientific and Practical Conference Biotechnology: experience, traditions and innovations*. 2018. p. 88.
- [33] Glansdorff N, Xu Y, Labedan B. The Last Universal Common Ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biol Direct*. 2008;3(1):29. DOI: 10.1186/1745-6150-3-29

С.В. Горобец¹, Н.М. Ильчук¹, И.В. Демьяненко¹, М.А. Банникова^{1,2}

¹КПИ им. Игоря Сикорского, Киев, Украина

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ *Nicotiana tabacum in vivo* И В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

Проблематика. Наноматериалы легко поддаются модификации и имеют уникальные свойства, связанные с большой реакционноспособной поверхностью. Благодаря этим свойствам наноматериалы используются в разных отраслях науки и технологии, таких как фармацевтика, биотехнология, химические технологии и т.п. В последнее время активно исследуется влияние наночастичек магнетита на морфологические свойства растений для дальнейшего их использования как нанодобровений для повышения урожайности и улучшения свойств сельскохозяйственных растений. Табак (*Nicotiana tabacum*) – модельный объект растительных биотехнологий, он используется при изучении влияния различных факторов на двудольные растения, поэтому его выбрали для исследования влияния магнетита на рост, развитие и накопление массы растениями.

Цель. Исследовать влияние наночастичек магнетита на рост и развитие *Nicotiana tabacum* в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Методика реализации. Методами сравнительной геномики исследована способность табака продуцировать биогенные магнитные наночастички путем поиска гомологов мам-белков в протеоме *Nicotiana tabacum* с помощью программы Blast NCBI. Растения были разделены на группы (контроль, концентрация наночастиц магнетита 0,1 мг/см³, концентрация наночастиц магнетита 1 мг/см³) для эксперимента как *in vivo*, так и *in vitro*. Параметры растений анализировали каждые 14 дней для определения динамики влияния наночастиц магнетита.

Результаты. Определено, что наночастицы магнетита в концентрации 0,1 мг/см³ в культуре *in vitro* и *in vivo* существенно влияют на рост корневой системы и побегов *Nicotiana tabacum*. На 56-е сутки культивирования растений *in vitro* на питательной среде, дополненной наночастичками магнетита в концентрации 0,1 мг/см³, наблюдали увеличение длины побега на 13,3 %, длины корня – на 31,7 %, массы абсолютно сухих веществ – на 18,75 % по сравнению с контролем. Обработка суспензией наночастичек магнетита в концентрации 0,1 мг/см³ приводила к более выраженным результатам при выращивании табака *in vivo*. Так, на 56-е сутки длина корня увеличивалась на 23,3 %, длина побега – на 19,2 %, а масса абсолютно сухих веществ – в 2 раза, первые листочки появлялись на 2 дня раньше по сравнению с контролем. Добавление наночастичек магнетита в субстрат, на котором выращивались растения *in vivo*, в концентрации 1 мг/см³ угнетало рост табака.

Выводы. Проведенные исследования показали целесообразность использования магнитных наночастиц в концентрации 0,1 мг/см³ в качестве нанодобровений при выращивании табака.

Ключевые слова: нанодобровения; табак; *Nicotiana tabacum*; наночастички магнетита; биоминерализация; биогенные магнитные наночастички; накопление биомассы.

S.V. Gorobets¹, N.M. Ilchuk¹, I. V. Demianenko¹, M.O. Bannikova^{1,2}

¹Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT OF MAGNETITE NANOPARTICLES ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF *Nicotiana tabacum* PLANTS *in vivo* AND *in vitro* CULTURE

Background. Nanomaterials are easily modified and have unique characteristics associated with a large reactive surface. Due to these properties, nanomaterials are used in various branches of sciences and technology, such as pharmaceuticals, biotechnology, chemical technology, etc. Recently, the effect of magnetite nanoparticles on the morphological properties of plants has been actively studied for their further use as nanoadditives to increase yields and improve the properties of agricultural plants. Tobacco (*Nicotiana tabacum*) is a model object of plant biotechnology, it is used to study the effect of various factors on dicotyledonous plants, so it was chosen to study the effect of magnetite on the growth, development, and mass accumulation by plants.

Objective. We are aimed to study the effect of magnetite nanoparticles on the growth and development of *Nicotiana tabacum in vivo* and *in vitro*.

Methods. The ability of tobacco to produce biogenic magnetic nanoparticles by searching for mammal proteins homologues in the *Nicotiana tabacum* proteome using the Blast NCBI program was studied using comparative genomics methods. The plants were divided into groups (control, magnetite nanoparticle concentration 0.1 mg/cm³, magnetite nanoparticle concentration 1 mg/cm³) for both *in vivo* and *in vitro* experiments. Analysis of plant parameters was performed every 14 days to study the dynamics of the effects of magnetite nanoparticles.

Results. It was determined that magnetite nanoparticles at a concentration of 0.1 mg/cm³ in culture *in vitro* and *in vivo* significantly affect the growth of the root system and sprouts of *Nicotiana tabacum*. On the 56th day of plant cultivation *in vitro* on a salivary medium supplemented with magnetite nanoparticles at a concentration of 0.1 mg/cm³, an increase in the shoot length by 13.3%, root length by 31.7%, and the mass of absolutely dry substances by 18.75% was observed compared to the control. Treatment of magnetite nanoparticles with a suspension at a concentration of 0.1 mg/cm³ led to more pronounced results when growing tobacco *in vivo*. So, on the 56th day, the root length increased by 23.3%, the length of the shoot – by 19.2%, and the mass of absolutely dry substances – by 2 times, the first leaves appeared 2 days earlier compared to the control. The addition of magnetite nanoparticles to the substrate on which the plants were grown *in vivo* at a concentration of 1 mg/cm³ inhibits the growth of tobacco.

Conclusions. Studies have shown the expediency of using magnetic nanoparticles at a concentration of 0.1 mg/cm³ as nanofertilizers in tobacco cultivation.

Keywords: nanofertilizers; tobacco; *Nicotiana tabacum*; magnetite nanoparticles; biomineralization; biogenic magnetic nanoparticles; biomass accumulation.