

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель магистерской программы  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая  
подпись  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Биологическая активность наноразмерных форм гуминовых кислот в  
гидропонной культуре *Triticum aestivum*.

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

\_\_\_\_\_

подпись, дата

доцент, к.б.н.

\_\_\_\_\_

должность, ученая степень

Мензянова Н. Г.

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Пятина С. А.

Рецензент

\_\_\_\_\_

подпись, дата

ст.науч.сотр., к.б.н.

\_\_\_\_\_

должность, ученая степень

Жила Н. О.

Красноярск 2018

## АННОТАЦИЯ

В гидропонной культуре *T. aestivum* изучали биологическую активность препаратов гуминовых кислот (ГК) в форме наночастиц разного размера. При культивировании на средах с препаратами ГК в корнях 2-дневных проростков увеличивалось содержание карбонилированных белков, малонового диальдегида и пролина, которое определяли с помощью биохимических методов. Индуцированный ГК окислительный стресс сопровождался увеличением численности свободных пограничных клеток и размеров гелевого чехла в корневом апексе 2-дневных проростков, которые определяли с помощью методов световой и электронной микроскопии. Эффекты препаратов ГК имели дозо-зависимый характер и существенно варьировали в зависимости от размеров наночастиц ГК.

Ключевые слова:

ГИДРОПОННАЯ КУЛЬТУРА *T. AESTIVUM*, ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ПОГРАНИЧНЫЕ КЛЕТКИ, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, КОРНЕВОЙ АПЕКС, РИЗОСФЕРА, НАНОЧАСТИЦЫ.

## АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Биологическая активность наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*.» содержит 48 страниц текстового документа, 13 иллюстраций, 55 использованных источников.

**ГИДРОПОННАЯ КУЛЬТУРА *T. AESTIVUM*, ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ПОГРАНИЧНЫЕ КЛЕТКИ, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, КОРНЕВОЙ АПЕКС, РИЗОСФЕРА, НАНОЧАСТИЦЫ.**

**Цель диссертационной работы:** изучить биологическую активность наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*.

**Задачи исследования:**

1. Оценить оксидантную активность частиц гуминовых кислот разных размеров (определение содержания продуктов свободно-радикального окисления белков и липидов в корнях проростков).
2. Определить влияние частиц гуминовых кислот разных размеров на содержание пролина (адапторной молекулы в условиях окислительного стресса) в корнях проростков.
3. Определить эффекты частиц гуминовых кислот разных размеров в корневом апексе: численность пограничных клеток, морфология корневого апекса, активность экскреции корневых экзометаболитов.

**Актуальность диссертационной работы.**

Гуминовые кислоты – органические соединения, которые образуются в результате биodeградации растительных и животных останков с участием почвенных микроорганизмов. Традиционно гуминовые кислоты используются как стимуляторы роста растений. Но сейчас гуминовые кислоты рассматриваются как адаптогены, агенты, способствующие адаптации растений к различным стресс-факторам и биотической и абиотической природы, например, тяжелым металлам, нематодным инфекциям. Многочисленные экспериментальные данные позволяют полагать, что биологические эффекты гуминовых кислот реализуются через перестройку систем транскрипции и посттрансляционных событий, что приводит к значительным изменениям метаболизма и процессов развития и роста растений. Это предполагает участие гуминовых кислот в регуляции эпигенома растительной клетки и определяет поиск новых форм препаратов гуминовых кислот, обладающих выраженной эпигенетической активностью.

Одним из перспективных направлений этих исследований является получение наноразмерных форм гуминовых кислот. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что органические и неорганические материалы в наноразмерном формате приобретают новые уникальные типы биологической активности. Это позволяет предполагать, что наноразмерные формы гуминовых кислот могут быть более эффективными адаптогенами.

В условиях массового культивирования эффективность препаратов гуминовых кислот может значительно влиять на урожайность и себестоимость продукции. Это определяет практическую значимость изучения биологической активности препаратов ГК в модельных системах для прогнозирования их эффективности в условиях агрокультуры.

## ABSTRACT

Master's dissertation on the topic "Biological activity of nanoscale forms of humic acids in the hydroponic culture *Triticum aestivum*." Contains 48 pages of a text document, 13 illustrations, 55 sources used.

HYDROPONIC CULTURE *T. AESTIVUM*, HUMIC ACIDS, BORDER CELLS, OXIDATIVE STRESS, ROOT APEX, RISOSPHERE, NANOPARTICLES

**The purpose of the dissertation:** to study the biological activity of nanoscale forms of humic acids in the hydroponic culture *Triticum aestivum*.

**Research objectives:**

1. To evaluate the oxidant activity of humic acids particles of different sizes (determination of the content of free-radical oxidation products of proteins and lipids in the roots of seedlings).

2. Determine the effect of humic acids particles of different sizes on the content of proline (an adapter molecule under oxidative stress conditions) in the roots of seedlings.

3. Determine the effects of humic acids particles of different sizes in the root apex: the number of border cells, the morphology of the root apex, the activity of excretion of the root exometabolites.

**Actuality of dissertation work.**

Humic acids are organic compounds that are formed as a result of biodegradation of plant and animal remains with the participation of soil microorganisms. Traditionally, humic acids are used as plant growth stimulants. But now humic acids are considered as adaptogens, agents that promote plant adaptation to various stress factors and biotic and abiotic nature, for example, heavy metals, nematode infections. Numerous experimental data suggest that the biological effects of humic acids are realized through the restructuring of transcription and posttranslational events, which leads to significant changes in metabolism and the processes of plant development and growth. This involves the participation of humic acids in the regulation of the plant cell epigenome and determines the search for new forms of humic acid preparations with a pronounced epigenetic activity.

One of the promising directions of these studies is the production of nanoscale forms of humic acids. Numerous experimental data indicate that organic and inorganic materials in nanoscale format acquire new unique types of biological activity. This suggests that the nanoscale forms of humic acids can be more effective adaptogens.

In conditions of mass cultivation, the effectiveness of humic acid preparations can significantly affect the yield and the cost of production. This determines the practical importance of studying the biological activity of HA preparations in model systems for predicting their effectiveness in conditions of agriculture.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	7
1 Обзор литературы .....	9
1.1 Взаимодействие наночастиц с клетками растений.....	9
1.2 Гуминовые кислоты .....	13
1.3 Пограничные клетки растений .....	15
2 Материалы и методы .....	20
2.1 Материалы .....	20
2.2 Методы .....	20
3 Результаты и обсуждения.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.1 Влияние препаратов гуминовых кислот на содержание МДА, карбонилированных белков и пролина в корнях 2-дневных проростков <i>T.aestivum</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2 Влияние препаратов гуминовых кислот на популяцию ПК в корневом апексе проростков <i>T. aestivum</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Заключение .....	24
Список сокращений .....	25
Список использованных источников .....	26

## ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые кислоты (ГК) – органические соединения, которые образуются в результате биodeградации растительных и животных останков с участием почвенных микроорганизмов [1]. Традиционно ГК используются как стимуляторы роста растений [2, 3, 4]. Но сейчас ГК рассматриваются как адаптогены, агенты, способствующие адаптации растений к различным стресс-факторам [5, 6] биотической и абиотической природы, например, тяжелым металлам, нематодным инфекциям [7]. Многочисленные экспериментальные данные позволяют полагать, что биологические эффекты ГК реализуются через перестройку систем транскрипции и посттрансляционных событий, что приводит к значительным изменениям метаболизма и процессов развития и роста растений [8, 9]. Это предполагает участие ГК в регуляции эпигенома растительной клетки и определяет поиск новых форм препаратов гуминовых кислот, обладающих выраженной эпигенетической активностью.

Одним из перспективных направлений этих исследований является получение наноразмерных форм ГК. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что органические и неорганические материалы в наноразмерном формате приобретают новые уникальные типы биологической активности. Это позволяет предполагать, что наноразмерные формы ГК могут быть более эффективными адаптогенами.

В условиях массового культивирования эффективность препаратов ГК может значительно влиять на урожайность и себестоимость продукции. Это определяет практическую значимость изучения биологической активности препаратов ГК в модельных системах для прогнозирования их эффективности в условиях агрокультуры.

Целью исследования было изучение биологической активности наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

- Оценить оксидантную активность частиц ГК разных размеров (определение содержания продуктов свободно-радикального окисления белков и липидов в корнях проростков).

- Определить влияние частиц ГК разных размеров на содержание пролина (адапторной молекулы в условиях окислительного стресса) в корнях проростков.

- Определить эффекты частиц ГК разных размеров в корневом апексе: численность пограничных клеток, морфология корневого апекса, активность экскреции корневых экзометаболитов.



# 1 Обзор литературы

## 1.1 Взаимодействие наночастиц с клетками растений

### 1.1.1 Растения и наноматериалы: пути взаимодействия

Процесс, в котором система растений контактирует с наноматериалами (НМ), может быть описан следующим образом: начиная с источника выбросов, НМ транспортируются через различные среды, а в конечном итоге взаимодействуют с ризосферой (почвой, водой), а также филлосферой растения (воздухом) [10].

Dietz and Herth (2011) предоставили модель, которая объясняет различные пути поступления наночастиц (НЧ), их транслокацию и ассоциацию. Модель рассматривает взаимодействие НЧ с корнями (с корневым чехликом, кортексом, боковыми корнями) и с побегами (с кутикулой, эпидермисом, корой, устьицами). Кроме того, авторы рассмотрели различия в скорости транспортировки НЧ. Ключевую роль в изменении скорости транспорта НЧ играют размер и поверхностные характеристики частиц. Также существуют данные, свидетельствующие о том, что в процессе переноса имеет место и биотрансформация. Например, исследования Peng et al. (2015) показали, что НЧ оксида меди химически взаимодействовали с частями растения и биомолекулами в рисе, продуцируя различные соединения Cu. Таким образом, в боковых корнях большинство Cu присутствовало в виде наночастиц CuO, в то время как в молодых листьях наночастицы CuO, Cu-цистеин, Cu-цитрат и Cu<sub>2</sub>O присутствовали почти в одинаковом соотношении (около 25%). Однако следует отметить, что эти трансформации зависят от типа НЧ. Различия в типах НЧ могут влиять на поглощение и механизм транслокации, а, следовательно, и на фитотоксичность частиц [11, 12].

После прохождения через корневой барьер (в том случае, если не происходит химическое взаимодействие), диаметр ксилемы определяет

максимальный допустимый размер частицы, которую можно транспортировать. Кроме того диаметр ксилемы также определяет скорость транспорта воды, а это также является важным параметром, связанным с кинетикой и судьбой транспорта НЧ в системах растений. Прослеживая транспорт люминесцентных нанокристаллов, ученые предположили, что происходит осевой перенос, который позволяет входить в веламен растения после нескольких секунд воздействия. Через некоторое время НЧ были обнаружены в апопласте, переходящие через экзодерму в паренхиму, сосудистый цилиндр и ксилему. Согласно другим исследованиям, отслеживающим перемещение НЧ, была подтверждена последующая транслокация НЧ в листья и стебли [13].

Несколько другой механизм происходит при транспортировке НЧ через экзодерму, содержащую кутин и/или суберин. Эти биополимеры являются гидрофобными, поэтому предотвращают поступление воды и водных растворов из почвы в центральный цилиндр. Однако боковые корни, лишённые экзодермы, позволяют входить водным растворам НЧ в центральный цилиндр и ксилему. Кроме того вероятно, что гидрофобные НЧ могут взаимодействовать в корневых гидрофобными биополимерами. Таким образом, ключевыми факторами, влияющими на транспорт НЧ, являются их размер и гидрофобность [10, 13].

### **1.1.2 Физиологический ответ растений на НЧ**

Взаимодействие НЧ с живыми системами, согласно исследованиям Dietz and Herth (2011), включают в себя следующие аспекты:

- химические эффекты (например, образование ионов металлов после растворения НЧ);
- механические эффекты (размер);
- каталитические эффекты;
- свойства связывания (НЧ-биомолекулы)
- изменения в химическом микроокружении.

Кроме того должны учитываться эффекты связывания не только с биомолекулами, но и с химическими остатками, а также механизмы биотрансформации. Все эти эффекты могут влиять на формирование физиологического ответа на воздействие НЧ, а, как следствие, и на токсичность НЧ [10, 11].

### **1.1.3 Влияние НЧ на прорастание и рост растений**

Токсические эффекты НЧ могут быть оценены на макро (прорастание и рост) и микро/молекулярном уровне (например, клеточная морфология, продукция метаболитов, генотоксичность). Прорастание и рост важны, так как в конечном итоге определяют популяцию растений по количеству представителей и производству биомассы и, как следствие, по структуре.

В исследовании Corral-Diaz et al., 2014 в почву с семенами *Raphanus sativus* L. добавляли НЧ  $\text{CeO}_2$  в концентрации 500 мг/кг. По сравнению с контрольным вариантом на 4 день после экспозиции прорастание семян было снижено, однако уже на 15 день эти эффекты были незначительными. Таким образом, НЧ воздействуют на ранних стадиях прорастания [14].

### **1.1.4 Биохимический ответ растений на НЧ: оксидативный стресс**

На молекулярном уровне растения защищают себя против экологического стресса с помощью разных механизмов, таких как продукция ферментов окислительного стресса и субстратов, таких как малоновый диальдегид и гликопротеиды. Согласно различным исследованиям, после добавления НЧ различной химической природы, в растениях не наблюдалось существенных изменений на макроуровне, однако отмечались следствия окислительного стресса: повышение активности супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы, аскорбатпероксидазы [10].

### **1.1.5 Эффекты НМ на продукцию белков в растениях**

Было отмечено влияние НЧ на снижение продукции белка в различных частях растения. Этот параметр важен, так как он напрямую влияет на пищевую ценность сельскохозяйственных культур [15].

### **1.1.6 Генотоксичность НЧ в растениях**

Некоторые из сигнальных путей, запускаемые наночастицами, включают в себя, среди прочего, ауксин, абсцизовую кислоту и этилен. Эти сигнальные пути вовлечены в процессы эмбриогенеза, сосудистой дифференцировки, органогенеза, элонгации растения, а также развития корней и побегов. Изменения в паттернах экспрессии этих генов отражают токсический эффект, связанный с изменениями удлинения корней и побегов растений, подвергнутых воздействию ЭНМ [10, 16]

### **1.1.7 Влияние НЧ на почвенную микробиоту**

Взаимодействия между растениями и биотическими и абиотическими элементами почвы обеспечивают условия для обмена нутриентов, метаболитов и отходов. Так как почва является главным рецептором нанозагрязнений, а большинство растений ассоциировано с почвенными микроорганизмами, очень важно понимать их взаимодействие с экологическими токсикантами, такими как НЧ.

Ряд исследований показал, что при воздействии НЧ на почвенную микробиоту, отмечаются следующие эффекты: прямые эффекты (токсичность), изменения в биодоступности токсинов и нутриентов и косвенные эффекты, возникающие в результате взаимодействия НЧ с токсичными органическими соединениями, тем самым уменьшая или увеличивая их токсичность. Например, некоторые НЧ вступают в реакцию с пероксидами,

присутствующими в почве, генерируя свободные радикалы, высокотоксичные для ряда микроорганизмов, в том числе бактерий-симбионтов [10, 17].

## **1.2 Гуминовые кислоты**

Гуминовые кислоты (ГК), крупнейшая составляющая органического вещества почвы ( $\approx 60\%$ ), являются ключевым компонентом наземной экосистемы, ответственной за многие сложные химические реакции в почве [1].

Известно, что гуминовые вещества усиливают агрегацию почвенных частиц [18, 19], уплотняемость [20], водоудерживающую способность [21] и катионообменную способность [1]. ГК способствуют росту растений, воздействуя на проницаемость мембран в качестве белковых носителей ионов, активируя дыхание, цикл Кребса, фотосинтез и продукцию аденозинтрифосфата и аминокислот [22, 23, 24]. Гуминовые кислоты проявляют различную биологическую активность в зависимости от их происхождения, молекулярного размера, химических характеристик и концентрации. [25, 26].

### **1.2.1 Гуминовые кислоты и развитие растений**

В многочисленных исследованиях сообщалось о положительном эффекте растворенного органического вещества (РОВ) как в минеральном питании, так и в развитии растений, культивируемых в разных типах почв [27, 28, 29]. Эти эффекты РОВ обычно связаны с наличием определенной фракции органических молекул, известных как гуминовые кислоты. Присутствие ГК в РОВ является результатом солюбилизации и / или стока пула органического вещества почвы, образующегося при трансформации растительных и животных остатков под действием почвенных микроорганизмов и химических реакций (окислительно-восстановительные реакции, гидролиз и полимеризация), и под влиянием условий окружающей среды (температура, влажность, текстура почвы и pH)

[1]. В зависимости от химического состава почвы и физических особенностей в почвенной матрице преобразованное органическое вещество обычно связано с минералами, в основном глинами и силикатами, образующими органоминеральные комплексы [1]. Эти органоминеральные комплексы играют ключевую роль в образовании почвенных микроагрегатов, что, в свою очередь, улучшает почвенную пористость, проникновение воды и обмен кислорода, тем самым усиливая плодородие почвы [1, 28]. В водном растворе ГК имеют тенденцию к агрегации, образуя новые стабильные многомолекулярные системы с конкретной химической и биологической активностью [30, 31].

ГК обычно проявляют косвенные прямые эффекты [8, 32]. Косвенные эффекты связаны с действием ГК на рост растений путем изменения свойств почвы или субстрата в ризосферной области, главным образом пула потенциально биодоступных питательных веществ и физической структуры [8, 32]. Прямые эффекты возникают в результате прямого взаимодействия ГК с корнями растений или листьями [8, 32]. Эти эффекты отражены в значительных изменениях процессов метаболизма и развития в растении на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях [8].

Хотя механизм действия ГК широко изучен на протяжении многих лет, знания о них довольно фрагментарны и еще не интегрированы в комплексную модель [8]. До сих пор не доказано проникновение ГК в клетки корня растения, но доказано физическое накопление ГК на поверхности корня [8, 33, 34].

Что касается прямого влияния ГК на развитие корня, можно выделить два основных типа фенотипических эффектов: микроморфологические эффекты (увеличение боковых волосков) и макроморфологические эффекты (увеличение длины корня) [35-38].

В целом, весь механизм, ответственный за благоприятные прямые эффекты ГК на рост растений, вероятно, включает в себя несколько дополнительных и взаимосвязанных сигнальных путей, связанных как с соответствующими гормональными сетями, так и с вторичными мессенджерами, такими как ROS и  $Ca^{2+}$  [8, 33, 36, 39].

### 1.3 Пограничные клетки растений

Тысячи уникально дифференцированных клеток корневой границы синтезируются и программируются для отделения от корневых апексов (область на верхушке, на которой расположены апикальная меристема и корневой чехлик) высших растений [40, 41]. По определению, пограничные клетки - это те клетки, которые диспергируются в суспензии в течение нескольких секунд, когда апексы корней помещаются в воду. Эти клетки происходят из меристематических клеток корневой оболочки, что приводит к образованию клеточных слоев, которые постепенно дифференцируются и в конечном итоге отделяются от корневого апекса [42]. До того как отдельная пограничная клетка достигает своего конечного пункта назначения, внешнего по отношению к корню, она уже выполняет несколько функций, таких как секреция слизи, восприятие силы тяжести и других сигналов окружающей среды. Пограничные клетки большинства видов жизнеспособны после отрыва от корня, а в культуре клетки могут делиться и дифференцироваться в организованную ткань. После отделения от апекса корня метаболическая активность в пограничных клетках увеличивается [43]. Пограничные клетки (ПК) продуцируют специфические метаболиты, такие как антоцианы и антибиотики [44], а так же различные ферменты. Эти необычные клетки называются корневыми «пограничными» клетками, так как они составляют биотический пограничный слой между поверхностью корня и почвой [45].

В прошлом пограничные клетки в значительной степени не исследовались как структурный и функциональный компонент корневых систем, так как эти клетки эффективно отделяются в ответ на свободную воду и даже самая мягкая промывка корневых систем для удаления почвы до экспериментальных манипуляций удаляет все пограничные клетки [41].

### 1.3.1 Предполагаемые функции корневых пограничных клеток

Корневой чехлик обеспечивает физическую защиту для апикальной меристемы. Долго предполагалось, что пограничные клетки и связанное с ними клейкое вещество служат для обеспечения прохода корневого апекса. На сегодняшний день гипотеза о том, что пограничные клетки смазывают кончик корня, не подтверждается экспериментальными данными [40, 46]. Тот факт, что растения включают и выключают производство пограничных клеток, не препятствуя их способности проникать в твердые среды, а также то, что несколько видов, по-видимому, не подвергаются производству пограничных клеток, опровергают данную гипотезу [40, 41]. Предполагается, что пограничные клетки позволяют корням определять свою экологию.

В зависимости от генотипа, пограничные клетки могут:

- привлечь зооспоры;
- синтезировать защитные структуры в ответ на грибковые атаки [47];
- отталкивать или связывать патогенные бактерии;
- контролировать рост и экспрессию генов в симбиотических бактериях.

На рисунке 1 представлены свойства пограничных клеток корня: отделение пограничных клеток от корня растения в течение 30 секунд после погружения корня в воду (а); жизнеспособность клеток, после их отделения от корня (b); деление пограничных клеток в культуре (с); выделение пограничными клетками антибиотика (d); выделение галактозидазы с низким рН (e); привлечение зооспор (f); специфическое связывание бактерий (g) [45].



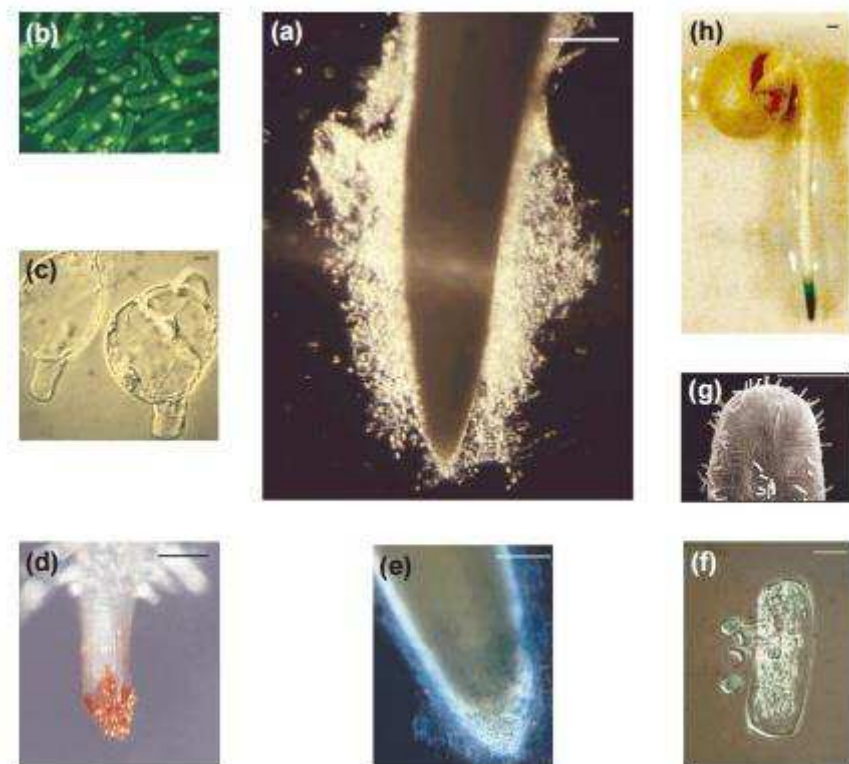


Рисунок 1 – Свойства корневых пограничных клеток [45]

Модулируя свойства внешней среды, окружающей продвигающийся кончик корня, регулируемое производство пограничных клеток может прямо или косвенно влиять практически на все физические и химические параметры (т.е. pH, растворимость питательных веществ или структуру почвы) корневой почвенной экосистемы [45].

Наблюдаемые реакции пограничных клеток с алюминием, нематодами и патогенными грибами согласуются двухступенчатой моделью, в которой наконечник корня защищен необычным и сложным процессом. Во-первых, меристема с корневым чехликом активно создает «фронт», состоящий из тысяч пограничных клеток, которые могут спроектировать среду, чтобы сделать угрозу временно безобидной. Важно еще раз отметить, что только при наличии прилива свободной воды, например после дождя или орошения, произойдет массовое высвобождение популяций пограничных клеток. В отсутствие воды существующие пограничные клетки остаются прижатыми к периферии корня и

переносятся по мере роста корня. Кроме того, только при наличии свободной воды микроорганизмы или токсины представляют угрозу для растений [45].

### **1.3.2 Перспективы изучения пограничных клеток**

Почти все патогенные и симбиотические отношения в корнях растений инициируются не на конце, а в области удлинения, как раз за кончиком, где образование пограничных клеток не происходит. Возможно основной причиной того, что воздействие пограничных клеток на инфекцию корня никогда не изучалось, является его эффективность. Если присутствие пограничных клеток является причиной того, что концы корня в основном непроницаемы для инфекции, то ингибирование их продукции и/или высвобождения приведет к изменению места и/или характера инфекции. Если это так, то изучение того, как пограничные клетки могут так успешно защищать вершину корня, могло бы пролить свет на новые стратегии защиты, которые могут быть применены к тканям, которые не снабжены своими клеточными защитниками. Возможно, подходы генной инженерии могут использоваться для воссоздания клеточного и внеклеточного механизмов, посредством которых пограничные клетки нейтрализуют опасные молекулы или организмы в тканях, которые не так хорошо защищены, как кончик корня [45].

### **1.3.3 Пограничные клетки в современных биотехнологиях**

Пограничные клетки корня растений выделяют слизь и запрограммированы на отделение от чехлика по мере роста корня, либо по отдельности, либо в небольших группах, либо в виде листов [45]. Процесс разделения обеспечивается активностью ферментов, разрушающих клеточные стенки, таких как полигалактуроноза и пектиновая метилэстераза [48]. Корневые пограничные клетки могут играть роль в защите растений, выступая в качестве приманки для предотвращения патогенов, в том числе грибов и

нематод [45, 49]. Однако в настоящее время неясно взаимодействие *in vivo* между пограничными клетками, экссудатами корнеплодов и паразитическими нематодами растений [50]. Пограничные клетки подходят для трансгенного продуцирования секретируемого пептида, так как они обеспечивают большую часть выделений корней, выделяемых в почву из неповрежденных корней [51].

Для биотехнологии представляют высокий интерес гены пограничных клеток растений, которые обуславливают синтез веществ необходимых для борьбы с нематодами, паразитирующими на корнях растений [52].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Материалы**

В экспериментах использовали зерно пшеницы *T. aestivum*. Наночастицы ГК были предоставлены частной компанией. Для получения гуминовых кислот ими использовался торф переходный, добытый на Кедровском или Ольховском месторождении. ГК получали электрохимическим способом из водной суспензии. Наночастицы гуминовых кислот получали с помощью импульсного электрофизического воздействия.

### **2.2 Методы**

#### **2.2.1 Получение проростков пшеницы**

Зерно промывали под проточной водой, обрабатывали раствором  $K_2MnO_4$  в течение 20-30 мин., тщательно промывали дистиллированной водой и замачивали на ночь в дистиллированной воде. На следующий день зерно промывали дистиллированной водой. Проклюнувшиеся зерновки (зерновки с колеоризой) раскладывали по чашкам Петри в количестве 50 штук на 1 чашку. В чашки вносили растворы препаратов ГК в форме крупных и мелких частиц в конечной концентрации гуминовых кислот 100 мг/л; 25 мг/л; 5 мг/л. В качестве контрольной среды проращивания использовали дистиллированную воду. В экспериментах использовали 2-суточные проростки.

#### **2.2.2 Оценка численности популяции пограничных клеток**

ПК смывали с поверхности корневого апекса в дистиллированную воду в пластиковой ячейке на магнитной мешалке. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 3000 об./мин., 10 мин. Супернатант после

центрифугирования представлял собой водный раствор компонентов гелевого чехла (белков, полисахаридов и др.). Супернатант собирали для дальнейшего анализа. Осадок ПК суспендировали в дист. воде и повторно центрифугировали при 3000 об./мин., 10 мин. Клеточный осадок фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде, 1 ч. После фиксации клетки дважды промывали дист. Водой и окрашивали 0,01% метиленовым синим. В клеточной суспензии определяли количество одиночных клеток, клеточных цепочек, клеточных пластов.

### **2.2.3 Определение содержания белка в гелевом чехле**

Белок из водного раствора компонентов гелевого чехла осаждали 5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Осадки белка дважды промывали 96% этанолом и высушивали. Осадки белка растворяли в 1N NaOH и определяли содержание белка по Лоури. Содержание белка выражали в мкг/апекс.

### **2.2.4 Определение содержания карбонилированных белков**

Содержание карбонилированных белков определяли по методу Carty et al. [53]. Сырую навеску корней гомогенизировали в фосфатном буфере (PBS) при температуре 4°C. В гомогенате определяли содержание белка и отбирали аликвоты, содержащие 1 мг белка. Белок осаждали 5% ТХУ. Осадки дважды промывали 96% этанолом.

Для каждого биологического повтора в контрольную пробу вносили 50мкл 2N соляной кислоты (HCl), в опытную пробу 50мкл 10 mM динитрофенилгидразина. Пробы инкубировали 60 мин при комнатной температуре. После завершения инкубации белок осаждали 20% ТХУ. Полученные осадки белка промывали 3 раза смесью этанол : этилацетат (1:1). Осадки высушивали и растворяли в 8M мочеvine. Экстинкцию проб

определяли при длине волны 415нм. Содержание карбонилированных белков выражали в нМ/мг белка.

### **2.2.5 Определение содержания малонового диальдегида (ТБК-активных продуктов)**

Определение малонового диальдегида проводили по методу Baily et al. [54]. Из гомогената корней отбирали аликвоты и осаждали белок 5% ТХУ. Пробы центрифугировали при 4.000 об/мин, 10 мин. Супернатант использовали для определения ТБК-активных продуктов. В аликвоты супернатанта вносили 0,8% тиобарбитуровую кислоту (ТБК). В фоновой пробе 0,8% ТБК вносили в аликвоту 0,1М Трис-НСl буфера (рН=7.0). Инкубировали на водяной бане 10 мин при 100°С. Оптическую плотность определяли при длине волны 550нм. Содержание малонового диальдегида (МДА) выражали в нМ/мг белка.

### **2.2.6 Определение содержания пролина**

Пролин в гомогенате корней определяли по методу Bates et al. [55]: к аликвотам гомогената добавляли аликвоты ледяной уксусной кислоты и нингидринового реактива (1: 1: 1, по объему). В фоновую пробу вносили аликвоту 0,1N Трис-НСl буфера (рН 7,0). Пробы инкубировали на водяной бане, 60 мин при 100 С. Оптическую плотность определяли при длине волны 490 нм. Содержание пролина определяли по калибровочной кривой и выражали в мкг/мг белка гомогената.

### **2.2.8 Подготовка образцов для сканирующей электронной микроскопии**

Корни 2-дневных проростков фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленном на фосфатно-солевом растворе (PBS, рН=7.0) в течение 3 ч.

Корни отмывали от фиксатора в дист. воде и повторно фиксировали в 1% OsO<sub>4</sub>, 30 мин. После второй фиксации корни отмывали дист. водой, обезвоживали в этиловом спирте восходящей концентрации (10%..... 100%) и ацетоне. Образцы анализировали с помощью сканирующего микроскопа ТМ-3000 (Japan) в институте Физики СО РАН.

### **2.2.9 Статистические методы исследования**

По результатам проведенного исследования в программе MS Excel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ производился статистический анализ. Достоверность различий между показателями контрольной и опытной групп оценивали по t-критерию Стьюдента.

### **3 Результаты и обсуждения**

Из текста магистерской диссертации изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГК - гуминовые кислоты

КБ - карбонилированные белки

КЧ - крупные частицы

МДА - малоновый диальдегид

МЧ - мелкие частицы

НМ - наноматериалы

НЧ - наночастицы

ПК - пограничные клетки

РОВ - растворенное органическое вещество

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТХУ - трихлоруксусная кислота

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Stevenson, F.J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions / F.J. Stevenson. – New York: John Wiley & Sons, 1994. – 496 p.
2. Chen, X. Responses of root physiological characteristics and yield of sweet potato to humic acid urea fertilizer / X. Chen [et al.] // PloS one. – 2017. – №12. – P. 1-11.
3. Busato, J.G. Recycling of wastes from fish beneficiation by composting: chemical characteristics of the compost and efficiency of their humic acids in stimulating the growth of lettuce / J.G. Busato [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – P. 1-10.
4. Morozesk, M. Effects of humic acids from landfill leachate on plants: An integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis / M. Morozesk [et al.] // Chemosphere. – 2017. – P. 1-33.
5. Taspinar, M.S. Protective role of humic acids against picloram-induced genomic instability and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris* / M.S. Taspinar [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – № 24. – P. 22948-22953.
6. Ondrasek, G. Humic acids decrease uptake and distribution of trace metals, but not the growth of radish exposed to cadmium toxicity / G. Ondrasek, Z. Rengel, D. Romic // Ecotoxicol Environ Saf. – 2018. – № 151. – P. 55-61.
7. Kesba, H. H. Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection / H. H. Kesba, H. S. El-Beltagi // Asian Pac J Trop Biomed. – 2012. – № 2(4). – P. 287-93.
8. Mora, V. Abiotic stress tolerance in plants: exploring the role of nitric oxide and humic substances / V. Mora [et al.] // Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology. – 2014. – P. 243–264.
9. Tahiri, A. Change in ATP-binding cassette B1/19, glutamine synthetase and alcohol dehydrogenase gene expression during root elongation in *Betula pendula* Roth

and *Alnus glutinosa* L. Gaertn in response to leachate and leonardite humic substances / A. Tahiri [et al.] // *Plant PhysiolBiochem.* – 2016. – № 98. – P. 25-38.

10. De la Rosa, G. Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: Implications on future design / G. de la Rosa [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2016. – № 30. – P. 1-10.

11. Dietz, K.J. Plant nanotoxicology / K.J. Dietz, S. Herth // *Trends Plant Sci.* – 2011. – № 16. – P. 582-589.

12. Peng, C. Translocation and biotransformation of CuO nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) plants / C. Peng [et al.] // *Environmental Pollution.* – 2015. – № 197. – P. 99-107.

13. Khalili, F. J. A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles / F.J. Khalili, S. Jafari, M.A. Eghbal // *Advanced pharmaceutical bulletin.* – 2015. – № 5(4). – P. 447-454.

14. Corral-Diaz, B. Cerium oxide nanoparticles alter the antioxidant capacity but do not impact tuber ionome in *Raphanus sativus* (L) / B. Corral-Diaz [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2014. – № 84. – P. 277-285.

15. Krishnaraj, C. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) / C. Krishnaraj [et al.] // *Process Biochemistry.* – 2012. – № 47. – P. 651-658.

16. Syu, Y.Y. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression / Y.Y. Syu [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2014. – № 83. – P. 57-64.

17. Simonet, B.M. Monitoring nanoparticles in the environment / B.M. Simonet, M. Valcarcoel // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2009. – № 393. – P. 17-21.

18. Bremner, J.M. A review of recent work on soil organic matter / J.M. Bremner // *European Journal of Soil Science.* – 1954. – № 5. – P. 514–532.

19. Whitehead, D.C. Some aspects of the influence of soil organic matter on soil fertility / D.C. Whitehead // *Soils and Fertilizers.* – 1963. – № 26. – P. 217–223.

20. Soane, B.D. The role of organic matter in soil compactability: A review of some practical aspects / B.D. Soane // *Soil and Tillage Research*. – 1990. – № 16. – P. 179–201.
21. De Jong, R. Water retention equations and their relationship to soil organic matter and their particle size distributions for disturbed samples / R. De Jong, C. A. Campbell, W. Nicholaichuk // *Canadian Journal of Soil Science*. – 1983. – № 63. – P. 291–302.
22. Malcolm, R.E. Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues / R.E. Malcolm, D. Vaughan // *Soil biology and biochemistry*. – 1978. – № 11. – P. 65–72.
23. Malcolm, R.E. Humic substances and phosphatase activities in plant tissues/ R.E. Malcolm, D. Vaughan // *Soil biology and biochemistry*. – 1979. – № 11. – P. 253–259.
24. Vaughan, D. Influence of humic substances on growth and physiological processes / D. Vaughan, R.E. Malcolm // *Soil organic matter and biological activity*. – Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. – P. 37–75.
25. Nardi, S. Physiological effects of humic substances in higher plants. / S. Nardi [et al.] // *Soil biology and biochemistry*. – 2002. – № 34. – P. 1527–1537.
26. Muscolo, A. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure / A. Muscolo, M. Sidari, E. Attinà // *Soil Science Society of America Journal*. – 2007. – V. 71, № 1. – P. 75-85.
27. MacCarthy, P. Humic substances in soil and crop sciences: Selected readings / P. MacCarthy [et al.]. – Madison: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 1990. – 281 p.
28. Magdoff, F. Soil organic matter in sustainable agriculture / F. Magdoff, R. Weil. – New York: CRC Press, 2004. – 412 p.
29. Rose, M. T. A meta-analysis and review of plant growth response to humic substances: practical implications for agriculture / M. T. Rose [et al.] // *Advances in Agronomy*. – 2014. – V. 124. – P. 37–89.

30. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science / A. Piccolo // *Advances in Agronomy*. – 2002. – V. 75. – P. 57–134.
31. Garc'ia-Mina, J. M. Advantages and limitations of the use of an extended polyelectrolyte model to describe the protonbinding process in macromolecular systems. Application to a poly(acrylic acid) and a humic acid / J. M. Garc'ia-Mina // *Journal of Physical Chemistry B*, 2007. – V. 111, № 17. – P. 4488–4494.
32. Chen, Y. Effects of humic substances on plant growth / Y. Chen, T. Aviad // *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*, 1990. – P. 161–187.
33. Berbara, R. L. L. Humic substances and plant defense metabolism / R. L. L. Berbara, A. C. Garc'ia // *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*, 2014. – P. 297–319.
34. Olaetxea, M. Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids / M. Olaetxea [et al.] // *Plant Physiology*, 2015. – V. 169, № 4. – P. 2587–2596.
35. Mora, V. The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber / V. Mora [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*, 2012. – V. 76. – P. 24–32.
36. Nardi, S. Biological activities of humic substances / S. Nardi [et al.] // *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*, 2009. – V. 2. – P. 309–335.
37. Canellas, L. P. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter / L. P. Canellas and F. L. Olivares // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2014. – V. 1, № 1. – P. 3–13.
38. Trevisan, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis* / S. Trevisan [et al.] // *Plant Biology*, 2010. – V. 12, № 4. – P. 604–614.

39. Canellas, L. P. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture / L. P. Canellas [et al.] // *Scientia Horticulturae*, 2015. – V. 196. – P. 15–27.
40. Hawes, M.C. Function of root border cells in plant health: pioneers in the rhizosphere / M.C. Hawes, [et al.] // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1998. – Vol. 36. – P. 311–327.
41. Hawes, M.C. Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere / M.C. Hawes, L.B. Brigham // *Adv. Plant Pathol.* – 1992. – Vol. 8. – P. 119–148.
42. Feldman, L.J. Development and dynamics of the root apical meristem / L.J. Feldman // *Am. J. Bot.* – 1984. – Vol. 7. – P. 1308–1314.
43. Brigham, L.A. Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of pea / L.A. Brigham, [et al.] // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 109. – P. 457–463.
44. Brigham, L.A. Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon* / L.A. Brigham, [et al.] // *Plant Physiol.* – 1999. – Vol. 119. – P. 417–428.
45. Hawes, M.C. The role of root border cells in plant defense / M.C. Hawes, [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2000. – Vol. 5, № 3. – P. 128 – 133.
46. Guinel, F.C. Some water-related physical properties of maize root cap mucilage / F.C. Guinel, M.E. McCully // *Plant Cell Environ.* 1986. – Vol. 9. – P. 657–666.
47. Sherwood, R. Papilla formation in corn root cap cells and leaves inoculated with *Colletotrichum graminicola* / R. Sherwood // *Phytopathology.* – 1987. – Vol. 77. – P. 930–934.
48. Driouich, A. Formation and separation of root border cells / A. Driouich, C. Durand, M. Vicre'-Gibouin // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 14–19.
49. Gunawardena, U. Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: role of root border cells / U. Gunawardena, M.C. Hawes // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2002. – Vol. 15. – P. 1128–1136.

50. Wuyts, N. Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis* / N. Wuyts, [et al.] // *Plant Soil*. – 2006. – Vol. 283. – P. 217–228.

51. Hawes, M.C. Root caps and rhizosphere / M.C. Hawes, [et al.] // *J. Plant Growth Regul.* – 2003. – Vol. 21. – P. 352–367.


52. Lilley, C.J. Effective delivery of a nematode-repellent peptide using a root-cap-specific promoter / C.J. Lilley // *Plant Biotechnology Journal*. – 2011. – Vol. 9. – P. 151–161.

53. Carty, J. L. The Effects of Vitamin C Supplementation on Protein Oxidation in Healthy Volunteers / J. L. Carty [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2000. – Vol. 273. – P. 729–735.

54. Bailly, C. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging / C. Bailly [et al.] // *Physiologia plantarum*. – 1996. – Vol. 97. – P. 104–110.

55. Bates, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates, R. P. Waldren, I. D. Teare // *Plant and Soil*. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель магистерской программы  
  
подпись Е. И. Шишацкая  
« 18 » июне 2018 г.

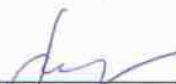
**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Биологическая активность наноразмерных форм гуминовых кислот в  
гидропонной культуре *Triticum aestivum*.

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

  
подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Мензянова Н. Г.

Выпускник

  
подпись, дата

Пятина С. А.

Рецензент

  
подпись, дата

ст.науч.сотр., к.б.н.

должность, ученая степень

Жила Н. О.

Красноярск 2018