

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ НАНО-ZnFe₂O₄ НА КАЛЛУСНУЮ КУЛЬТУРУ *O. BASILICUM*

к.б.н., с.н.с. Гвоздикова А.М. (Федеральный научный центр биологических системы и агротехнологий РАН, Оренбург)

Введение. *Ocimum basilicum* L. используется в качестве растительного лекарственного средства за счет присутствия большого количества вторичных метаболитов [1], обеспечивающих стрессоустойчивость и используются в качестве лекарственных биологически активных соединений за счет выраженного антиоксидантного, противоопухолевого, противомикробного и антидиабетического эффектов [2]. Вторичные метаболиты растений, имеющие фармакологическое значение, трудно извлечь в стабильном состоянии и в высоких количествах в полевых условиях, напротив, культуры *in vitro* выступают перспективными с этой позиции биологическими системами [3]. В литературе имеются многочисленные сообщения о производстве *in vitro* биологически активных метаболитов из каллусной культуры различных сортов *O. basilicum* L. [2, 4]. Особенно перспективно использование наночастиц (НЧ) металлов как элиситоров, направленных на увеличения синтеза важных вторичных метаболитов и антиоксидантов в клеточных культурах и образующихся в родительских растениях в ограниченных количествах [5]. Однако, как и другие абиотические химические элиситоры, химически синтезированные НЧ представляют угрозу для окружающей среды при введении в более высоких концентрациях [6]. Поэтому набирают популярность наноматериалы, синтезированные «зеленым» способом в экстрактах растений, являющиеся более экологически чистыми и экономически эффективными. Биологически синтезированные НЧ могут быть важной альтернативой химических аналогов из-за их биологического происхождения и, следовательно, биосовместимости и меньшей токсичности для растений и выступать элиситорами вторичного метаболизма [7].

Основная часть. Объектами исследований являлись каллусы, полученные из эксплантов листьев и стеблей асептических растений *Ocimum basilicum*. Асептические растения получали из семян сортов Русский гигант фиолетовый (РГФ) («Гавриш», Россия). Каллусы, полученные из растительных эксплантов, выращивали на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга (MS) в присутствии 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и НЧ феррита цинка ZnFe₂O₄ диаметром ~50 нм в концентрациях 12,5, 25 и 50 мкг/л. Нанопорошки получали «зеленым» способом в водном экстракте растений *Petroselinum crispum*, как описано нами ранее [8]. При введении в питательную среду НЧ ZnFe₂O₄ предварительно проводили их обработку ультразвуком в течение 4 ч, а затем после автоклавирования и перед использованием среды в течение 2 ч. Контролем служила среда без добавления наноматериалов. Эксперимент проводили в 3-кратной повторности. Фиксацию наблюдений проводили в течение 1 пассажа (30 дней) микроскопией каллусов и определением физиологических параметров (сухая и сырая биомасса, индекс роста, жизнеспособность (ЖС) по окрашиванию клеток Эвансом синим в камере Горяева и подсчёту мертвых и живых клеток). Результаты показали, что концентрация 25 мкг/л НЧ ZnFe₂O₄ существенно увеличивала накопление сырой биомассы каллусной культуры *O. basilicum* по сравнению со всеми опытными вариантами и контролем. При этом, наибольший индекс роста наблюдали в третьем варианте среды (25 мкг/л), наименьший – в четвертом (50 мкг/л). Самая высокая ЖС наблюдалась в контрольном варианте, а при добавлении НЧ ZnFe₂O₄, во всех вариантах, показатель снижался. Следует отметить, что каллус на среде MS+2 мг/л 2,4-Д+25 мкг/л НЧ ZnFe₂O₄ был более однородным по сравнению с другими вариантами сред, более антоциан-окрашенным, самым крупным и по своему виду очень схож с контролем. В свою очередь, каллус, полученный на среде с добавлением 50 мкг/л НЧ ZnFe₂O₄, был более рыхлым, на среде с добавлением 12,5 мкг/л НЧ ZnFe₂O₄, наоборот, плотным. Согласно данным микроскопии, у контрольного варианта клетки при приготовлении давленного препарата плохо распадались

(сильно выраженное межклеточное взаимодействие), имели округлую форму, были гетерогенны по размеру и форме. Клетки фиолетовых участков каллуса имели насыщенный фиолетовый цвет, в окрашенных клетках обнаруживались черные точки (включения). В варианте с добавлением 12,5 мкг/л НЧ $ZnFe_2O_4$ различий с контролем обнаружено не было, клетки были округлыми и гетерогенными. При добавлении 25 мкг/л клетки увеличивались в размерах и приобретали более округлую форму по сравнению с предыдущими вариантами. На фиолетовых участках увеличивалось количество включений. Отметим, что на среде с добавлением 50 мкг/л НЧ $ZnFe_2O_4$ было сложно рассмотреть одиночные клетки, при этом все они были собраны в конгломераты, количество включений существенно увеличивалось и они были не только в окрашенных клетках, но и в обычных.

Выводы. В настоящем исследовании данные продемонстрировали дозозависимые эффекты «зеленых» синтезированных нанопорошков $ZnFe_2O_4$ диаметром 50 нм в анализируемых концентрациях (12,5, 25 и 50 мкг/л). Согласно которым обнаружено снижение активного роста каллусов *O. basilicum* после 30 дней культивирования *in vitro*. Внесение в среду 25 мкг/л НЧ $ZnFe_2O_4$ существенно увеличивало накопление сырой биомассы каллусной культуры по сравнению со всеми опытными вариантами и контролем. Установлено также влияние НЧ $ZnFe_2O_4$ на морфологию клеток каллуса, выразившееся в увеличении размеров клеток и количества включений, что говорит о действии данного агента как инициатора метаболических изменений. Вследствие этого требуются дальнейшие исследования в отношении воздействия меньших концентраций на каллусную культуру и скрининга концентраций, обеспечивающих устойчивое производство биомассы и выгодной вторичной индукции метаболитов *in vitro*.

Список использованных источников:

1. Peng Y., Sun Q., Park Y. The Bioactive effects of chicoric acid as a functional food ingredient // J. Med. Food. – 2019. – №22. – P. 645-652.
2. Nazir M., Asad-Ullah M., Mumtaz S., Siddiquah A., Shah M. Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*) // Molecules. – 2020. – №25. – P. 1072.
3. Khurshid R., Khan T., Zaeem A., Garros L. Biosynthesis of precious metabolites in callus cultures of *Eclipta alba* // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2018. – №135. – P. 287-298.
4. Drouet S., Garros L., Hano C., Tungmunnithum D. Critical view of different botanical, molecular, and chemical techniques used in authentication of plant materials for cosmetic applications // Cosmetic. – 2018. – №5. – P. 30.
5. Anjum S., Anjum I., Hano C., and Kousar S. Advances in nanomaterials as novel elicitors of pharmacologically active plant specialized metabolites: current status and future outlooks // RSC Adv. – 2019. – №9(69). – P. 40404-40423.
6. Acharya P., Jayaprakasha G.K., Crosby K.M., Jifon J.L., and Patil B.S. Green-synthesized nanoparticles enhanced seedling growth, yield, and quality of onion (*Allium cepa* L.) // ACS Sustain. Chem. Eng. – 2019. – №7. – P. 14580-14590.
7. Sehna K. et al. An assessment of the effect of green synthesized silver nanoparticles using sage leaves (*Salvia officinalis* L.) on germinated plants of maize (*Zea mays* L.) // Nanomaterials. – 2019. – №9. – P:1550.
8. Korotkova A.M., Polivanova O.B., Gavrish I.A., E.N. Baranova, S.V. Lebedev. Green synthesis of zinc based nanoparticles zinc ferrite by *Petroselinum crispum* // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – Vol. 34. – P.012175.