

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ НАНОАКВАХЕЛАТУ ЗАЛІЗА В КУЛЬТУРІ РОСЛИН *IN VITRO*

О. В. СУБІН, А. А. КЛЮВАДЕНКО, О. В. ЛОБОВА, А. Ф. ЛІХАНОВ

Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
e-mail: subin_o@nubip.edu.ua

В роботі представлені дослідження впливу наноаквахелату заліза на ростові процеси рослин-регенерантів тютюну звичайного в культурі ізольованих тканин. Порівняно морфологічні ознаки пагонів *Nicotiana tabacum* L. за використання FeEDTA, в умовах його дефіциту та за використання розчинів наноаквахелатів. Показано особливості розвитку рослин-регенерантів тютюну звичайного в умовах дефіциту заліза.

Встановлено, що за умов тривалого культивування (28 діб) за використання наноаквахелату заліза в концентрації 140 мкг/мл рослини-регенеранти не виявляли жодних ознак пригнічення життєдіяльності, хлоротичної депігментації або старіння у порівнянні з контролем.

Показано анатомічні та гістохімічні особливості рослин-регенерантів тютюну звичайного, які культивувалися на живильних середовищах з різною формою та вмістом заліза.

Ключові слова: залізо, *Nicotiana tabacum*, живильне середовище, наноаквахелати

Вступ. Залізо (Fe) є ключовим елементом для процесів життєдіяльності всіх живих організмів. (Maathuis, Diatloff, 2013; Rajniak, et al., 2018). У рослин Fe необхідний для різних клітинних процесів, таких як дихання та біосинтез хлорофілу (Maity et al., 2018; Xiao et al., 2021). Залізо також виступає в ролі кофактора для багатьох ферментів, які залучені у процеси переносу електронів та кисню, зокрема, цитохрому P450 (CYP) і 2-оксоглутарат-залежних діоксигеназ (2-ODDS) (Hänsch, Mendel, 2009; Balk, Pilon, 2011), а також для пероксидаз, які виконують захисні та конституційні функції (Molassiotis et al., 2004; Jalali et al., 2014; Rout, Sahoo, 2015). Fe бере участь в складних процесах диференціації клітин та гормональній регуляції рослинного організму (Kobayashi, Nishizawa, 2012). Нестача заліза спричиняє зниження вмісту хлорофілів, найбільш очевидним симптомом є затримка росту та індукція хлорозів в листках (Al-Mayahi, 2021). В культурі ізольованих тканин, як компонент живильного середовища, залізо використовується у хелатованій формі (FeEDTA). Така сполука є нестабільною і через певний час, Fe стає недоступним для рослин-регенерантів, утворюючи залізо-фосфатні сполуки (Dalton et al., 1983). Тому, пошук нових доступних форм заліза є перспективним напрямком не тільки в культурі ізольованих тканин, а й у сільському господарстві загалом (Akhtar et al., 2022).

За нашими попередніми даними встановлено, що введення в живильні середовища комплексів мікроелементів у формі їх наноаквахелатів здатне

суттєво змінити морфологічні показники тест-об'єктів, впливати на їхні конституційні ознаки, швидкість обмінних процесів, зокрема на активність ферментів класу оксидаз, складних білкових комплексів та хлорофілу (Likhanov et al., 2014; Oliynyk et al., 2016; Likhanov et al., 2022).

Матеріали і методи досліджень. Вирощування тютюну звичайного (*Nicotiana tabacum* L.) в культурі *in vitro* проводили за наступною схемою (рис. 1).

В якості контролю (варіант 1) використовували безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) з стандартною концентрацією FeEDTA (36,7 мг/мл) (Murashige, Skoog, 1962). У варіанті 2 – безгормональне МС без заліза. При застосуванні наноаквахелату заліза використана еквівалентна концентрація Fe 1,44 мг/мл (варіант 3) та зменшена в 10 раз концентрація 140 мкг/мл (варіант 4). Рослини-регенеранти культивували за освітлення 1,5-4 тис. лк, температури – $24 \pm 2^\circ\text{C}$, та 16-годинним фотоперіодом.

Приготування зразків тканин рослин *Nicotiana tabacum* проводили за загальноприйнятими у гістохімії методиками (Jensen 1965; Pochinok 1976; Furst 1979). Тканини рослини, які були вирощені на середовищах із різним вмістом та формою хелатів заліза, а також в умовах Fe-дефіциту фіксували одразу після вилучення з живильного середовища. Під час відбору фрагментів живих тканин *Nicotiana tabacum* для гістохімічного аналізу враховували стадії вегетації рослин, їхній вік, а також час відбору проб. Для забезпечення

репрезентативності вибірки проби з кожного варіанту досліду відбирали у 10 повторностях.

Результати досліджень. За отриманими даними після перенесення експлантатів тютюну звичайного в умови *in vitro*, на середовищах з стандартною концентрацією FeEDTA комплексу (варіант 1) коренева система розвивалася більш інтенсивно, ніж на середовищі без додавання залізовмісних сполук (варіант 2). На середовищі без заліза у експлантатів тютюну спостерігалось гальмування

процесів утворення коренів другого порядку. Кореневі волоски, які в нормі добре розвиваються в зоні всмоктування, за умов дефіциту заліза майже не формувались. Бічні корені другого порядку краще розвивалися на середовищі з FeEDTA в умовах низького та середнього рівня освітленості (1500-2000 Лк). На середовищі без заліза (варіант 2), спостерігалася тенденція до покращення росту коренів за умов збільшення кількості світла (понад 3000 Лк), тобто була протилежна до контролю.

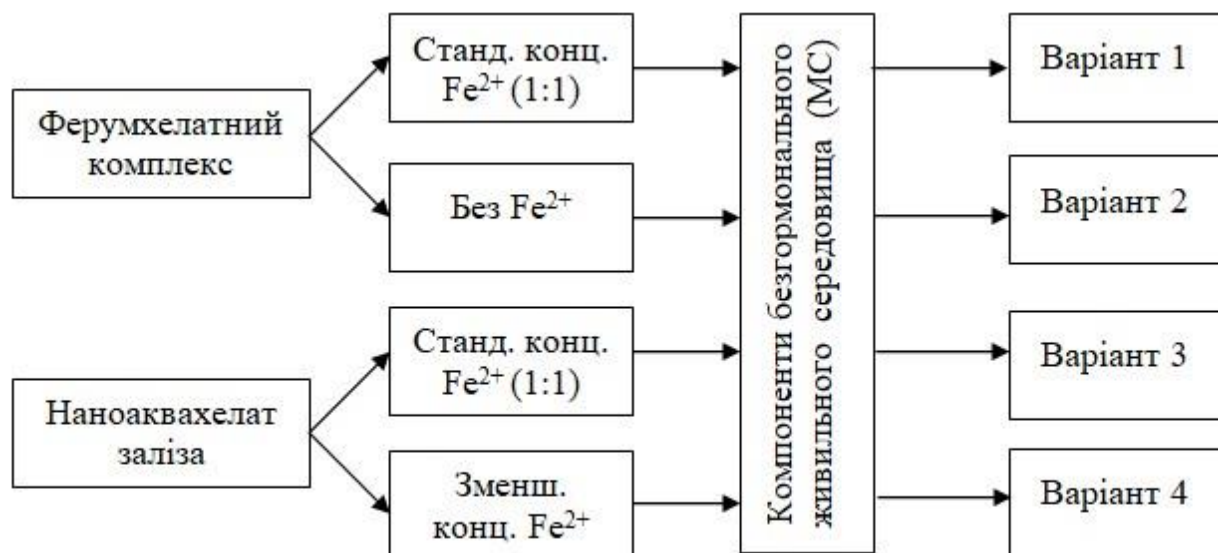


Рис. 1. Схема приготування живильних середовищ для експериментального дослідження впливу наноаквахелатного комплексу заліза на тест-рослини *Nicotiana tabacum*

Fig. 1. Scheme of preparation of nutrient media for experimental research on the effect of nanoaquachelate complex of iron on test plants *Nicotiana tabacum*

У рослин, що вирощувалися на стандартних живильних середовищах листки (варіант 1) були нормальної еліптичної або яйцеподібної форми та мали тенденцію до скручування. На середовищі без заліза (варіант 2) листки протягом всього експерименту були витягнутими, дещо скрученими назовні тонкими пластинками, жовто-зеленого кольору з хлоротичними плямами в міжжилкових ореолах.

На живильних середовищах МС з наноаквахелатом заліза (варіант 3-4) листки у рослин були темно-зеленими з вираженим тургором, еліптичної або яйцеподібної форми. Коренева система формувалась активніше, але була коротша і тонша в діаметрі, з недостатньо розвиненими кореновими волосками.

Зовнішні симптоми хлорозу листків переважно були пов'язані зі станом пігментного комплексу: кількістю хлорофілу та каротиноїдів.

З часом збільшення рослинної біомаси в культурі *in vitro* загострювало дефіцит Fe і його прояви ставали дедалі сильнішими. Наприкінці четвертого тижня культивування хлоротичні

зміни листків набували системного характеру, що притаманно рослинам, які ростуть в умовах гострого дефіциту заліза (рис. 2).

Протягом перших п'яти діб з моменту початку росту експлантатів тютюну звичайного суттєвих відмінностей не спостерігали. Перші ознаки гальмування ростових процесів експлантатів на середовищах без йонів заліза були визначені на 7-9 добу. Ріст першого листка прискорювався у рослин на середовищі із низьким вмістом наноаквахелату заліза (варіант 4) на 14-15 добу.

В нормі формування тканин листової пластинки головним чином залежить від активності меристем, проліферації, розтягнення та диференціації клітин. Поділ меристематичних клітин без розтягнення призводить до дрібноклітинності мезофілу, епідермісу та інших структурних елементів листка. В цьому експерименті найчутливішим до хімічної форми та вмісту заліза виявився показник ширини листової пластинки. За умов збільшення йонів наноаквахелату заліза в до концентрації, що еквівалентна стандартному живильному

середовищу ріст перших листків достовірно не відрізнявся. Третій листок активніше розвивався у рослин на стандартному середовищі. В порівнянні з середовищами з еквівалентною

стандарту кількістю наноаквахелатів заліза (варіант 3), показники росту листків в ширину і довжину на середовищах з ферумхелатними комплексами були в 2-3 рази вище.

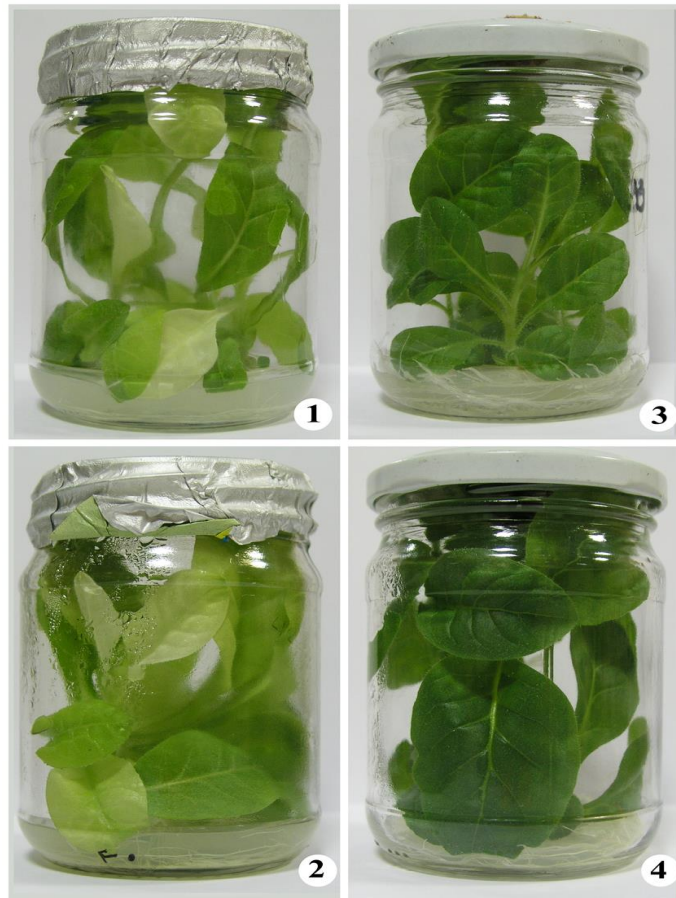


Рис. 2. Морфологічні ознаки пагонів *Nicotiana tabacum* на 28 добу після введення експлантатів в культуру *in vitro* на безгормональне середовище МС: 1 – контроль (FeEDTA); 2 – без заліза; 3 – з наноаквахелатом заліза (конц. 1:1); 4 – наноаквахелат заліза (конц. 1:10)

Fig. 2. Morphological features of *Nicotiana tabacum* shoots 28 days after the introduction of explants into *in vitro* culture on a hormone-free MS medium: 1 – control (FeEDTA); 2 – without iron; 3 – with iron nanoaquachelate (conc. 1:1); 4 – iron nanoaquachelate (concentration 1:10)

З часом динаміка ростових процесів рослин-регенерантів зазнавала суттєвих змін. Поступове виснаження живильного середовища, збільшення розмірів та кількості метамерів, накопичення продуктів вторинного метаболізму, призводило до появи симптомів погіршення стану рослин: зниження тургору листків, хлорози, призупинення ростових процесів. Водночас, на середовищі з наноаквахелатом (варіант 4) рослини не мали ознак пригнічення, хлоротичної депігментації або старіння.

Структурно-анатомічний аналіз рослин, які були вирощені в умовах *in vitro* на живильних середовищах із додаванням комплексу наноаквахелатів заліза, дозволив виявити у тканинах пагонів суттєві гістохімічні відмінності (рис. 3). У стеблах ювенільних рослин *Nicotiana tabacum* клітини верхнього епідермісу мали

округлу або куполоподібну форму з нещільно зімкнутими антиклінальними стінками і слабо розвиненою кутикулою.

Відповідна структура покривної тканини, першочерговою функцією якої є захист органу від дії негативних зовнішніх чинників, супроводжувалась активною вакуолізацією клітин і високою еластичністю клітинних стінок епідерми. У підлягаючій тканині спорадично утворювалися тонкостінні клітини з густою зернистою цитоплазмою, які тривалий час зберігали живий протопласт. Ядро в таких клітинах, зазвичай, займало латеральне положення. Далі, у процесі онтогенезу в умовах *in vitro*, біохімічно спеціалізовані клітини трансформувалися в ідіобласти, що містили речовини, головним чином, фенольної природи (підтверджено гістохімічно реакцією на феноли).

Глибокого і всебічного вивчення заслуговує той факт, що на тлі загального пригнічення асиміляційних процесів у листах і стеблах тютюну, що зазнає нестачі заліза, спостерігається посилення ксилогенезу (в 1,6-1,8 раз). З огляду на

те, що лінійні розміри елементів ксилеми залишалися майже незмінними (діаметр клітин – 14-16 мкм), збільшення ширини ксилеми відбувалось через посилення камбіальної активності.

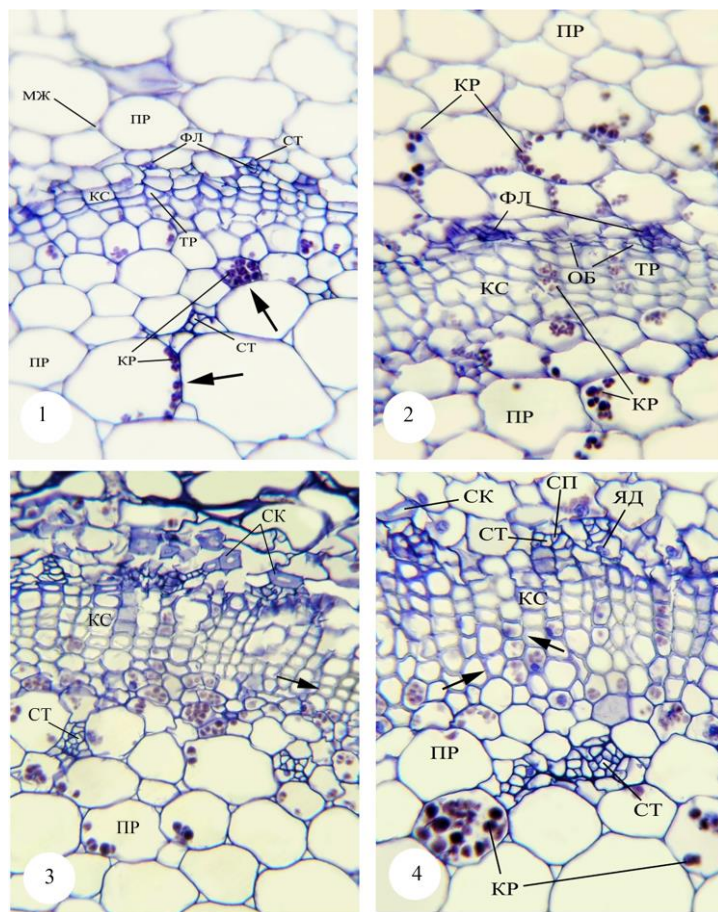


Рис. 3. Гістогенез пагонів *Nicotiana tabacum* в культурі *in vitro* на живильних середовищах: 1 – контроль (FeEDTA); 2 – без заліза; 3 – з наноаквхелатом заліза в концентрації 1,44 мг/мл; 4 – з наноаквхелатом заліза в концентрації 140 мкг/мл; пр – паренхіма; мж – міжклітинники; фл – флоема; ст – ситоподібна трубка протофлоеми; ск – клітина-супутниця; кр – крохмальні зерна; тр – трахеїда; кс – ксилема; об – облітерація клітин; ск – склереїда; яд – ядро

Клітини корової паренхіми у дослідних рослин, на відміну від контрольних, мали товстіші вторинні клітинні стінки. Крохмальні зерна в невеликій кількості (до 2-5 на зріз) траплялися в клітинах перимедулярної зони серцевинної паренхіми, а також у серцевинних променях та в клітинах паренхіми кори. Інтраксілярні флоемні пучки просторово були розташовані в типовій для тютюну зоні. Ситоподібні елементи й клітини-супутниці були нормально розвинені, правильної форми, і не мали ознак закупорювання перфорацій калозою. В корі траплялися поодинокі або зібрані у невеликі групи склереїди з товстими вторинними

Fig. 3. Histogenesis of *Nicotiana tabacum* shoots in *in vitro* culture on nutritive media: 1 – control (FeEDTA); 2 – without iron; 3 – with nanoaquechelate of iron in a concentration of 1.44 mg/ml; 4 – with iron nanoaquechelate at a concentration of 140 µg/ml; pr – parenchyma; mzh – intercellular; fl – phloem; st – sieve-like tube of protophloem; sp – satellite cell; kr – starch grains; tr – tracheid; ks – xylem; ob – obliteration of cells; sk – sclereid; poison is the core

клітинними стінками та простими нерозгалуженими порами (рис. 3, 3-4). Утворення склереїд або брахисклереїд є типовим для рослин, що вирощуються в умовах *in vivo*.

В умовах *in vitro* потовщення вторинних оболонок клітин відбувається досить повільно. Висока активність пероксидази сприяє полімеризації речовин попередників лігніну та здерев'янінню клітинних оболонок. Зниження загального пулу гормонів ауксинової природи може призводити до ослаблення апікального домінування, а також викликати вихід зі стану спокою пазушних бруньок та стимулювати розвиток адвентивних коренів на стеблах рослин

(Haissig, 1974; Rout, 2006; Tivendale, Millar, 2022).

Цілком очевидно, що інтенсивний синтез пероксидаз та її активних ізоформ, що індукуються наноаквахелатом заліза, сприяє прискорюванню процесів формування та визрівання провідних та механічних елементів пагонів, що важливо для успішної адаптації рослин до умов відкритого ґрунту. Окрім того, високий вміст вільних та слабкозв'язаних кислих пероксидаз дозволяє підвищити стійкість рослин до фітопатогенних організмів, що особливо

важливо на етапах їх перенесення з умов *in vitro* на ґрунтові субстрати.

Отже, проведені дослідження показали, що зменшення вмісту наноаквахелатного комплексу заліза в живильних середовищах в 10 раз призводить до кращого стимулюючого ефекту, аніж в кількості еквівалентного стандарту. Це свідчить про фізіологічну доступність і не токсичність досліджуваного залізовмісного препарату.

Список літератури / References:

1. Akhtar N, Ilyas N, Meraj TA, et al. Improvement of plant responses by nanobiofertilizer: A step towards sustainable agriculture. *Nanomaterials*. 2022; 12(6): 965. <https://doi.org/10.3390/nano12060965>
2. Al-Mayahi AM. In vitro plant regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Effect of chelated Iron Sources. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021; 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00177-4>
3. Balk J, Pilon M. Ancient and essential: The Assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science*. 2011;16(4):218-226. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.006>
4. Dalton CC, Iqbal K, Turver DA. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiol Plant*. 1983; 57(4): 472-476. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb02771.x>
5. Haissig BE. Influences of auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development. *NZ J. For. Sci*. 1974; 4: 311-323.
6. Hänsch R, Mendel RR. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*. 2009; 12(3): 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
7. Jalali M, Zargani M. The impact of nano Fe-chelate, Fe-EDDHA nonnano and FeSO₄ on the growth and physiological index in lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties grown in NFT. *J Bio Env Sci*. 2014;4(2):434-442. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1043378>
8. Jensen WA. *Botanical Histochemistry: Principles and Practice*. Freeman; 1962.
9. Kobayashi T, Nishizawa NK. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2012; 63(1): 131-152. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>
10. Likhanov A, Chornobrov O, Kliuvadenko A, et al. Biotechnological aspects of creation collection in vitro of varieties raspberry in NUBiP Ukraine. *Scientific reports of NULES of Ukraine*. 2014; 5(47): 8-8.
11. Likhanov A, Kliuvadenko A, Subin O, et al. Gallic acid as a non-specific regulator of phenol synthesis and growth of regenerate plants of *Corylus avellana* (L.) H. Karst. and *Salix alba* L. in vitro. *Ukrainian journal of forest and wood science*. 2022; 13(4): 52-63. [https://doi.org/10.31548/forest.13\(4\).2022.52-63](https://doi.org/10.31548/forest.13(4).2022.52-63)
12. Maathuis FJM, Diatloff E. Roles and Functions of Plant Mineral Nutrients. In: Maathuis FJM, ed. *Plant Mineral Nutrients. Methods in Molecular Biology*. Vol 953. Humana Press; 2012: 1-21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3_1
13. Maity A, Natarajan N, Vijay D, et al. Influence of metal nanoparticles (NPs) on germination and yield of oat (*Avena sativa*) and berseem (*Trifolium alexandrinum*). *Pro. Nat. Acad. Sci. India. Sect. B.: Biol. Sci*. 2018; 88: 595-607. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0796-x>
14. Molassiotis AN, Dimassi K, Diamantidis G, et al. Changes in peroxidase and catalase activity during *in vitro* rooting. *Biol Plantarum*. 2004; 48(1): 1-5. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000024267.68394.96>
15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 1962; 15: 473-497.
16. Oliynyk OO, Kluvadenko AA, Melnychuk MD. Optimization of culture media content for acceleration of growth and cultivation of *Rosa Damascena* Mill. in *in vitro* culture. *Scientific bulletin of UNFU*. 2016; 26(7): 134-139. <https://doi.org/10.15421/40260721>
17. Rajniak J, Giehl RF, Chang E, et al. Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nat. Chem. Biol*. 2018; 14: 442-450. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0019-2>
18. Rout GR. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) kuntze and associated biochemical changes. *Plant Growth Regulation*. 2006; 48(2): 111-117. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-5665-1>
19. Rout GR, Sahoo S. Role of iron in plant growth and metabolism. *Rev Agric Sci*. 2015; 3(0): 1-24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>
20. Tivendale ND, Millar AH. How is auxin linked with cellular energy pathways to promote growth? *New Phytologist*. 2022; 233(6): 2397-2404. <https://doi.org/10.1111/nph.17946>
21. Xiao J, Park YG, Guo G, et al. Effect of iron source and medium pH on growth and development of *Sorbus commixta in vitro*. *Int. J. Mol. Sci*. 2021; 22: 133. <https://doi.org/10.3390/ijms22010133>
22. Pochinok HN. *Methods of biochemical analysis of plants*. Naukova dumka; 1976.
23. Furst GG. *Methods of anatomical and histochemical research of plant tissues*. Nauka; 1979.

EVALUATION OF THE EFFICIENCY AND PROSPECTS OF THE USE OF IRON NANOQUACHELATE *IN VITRO* PLANT CULTURE

O. V. Subin, A. A. Klyuvadenko, O. V. Lobova, A. F. Likhanov

The paper presents studies of the effect of nanoquachelate of iron on the growth processes of tobacco plants-regenerants in in vitro plant culture. Morphological features of Nicotiana tabacum L. shoots were compared with the use of FeEDTA, in conditions of its deficiency, and with the use of nanoquachelate solutions. The peculiarities of the development of regenerating plants of tobacco in conditions of iron deficiency are shown.

It was established that under the conditions of long-term cultivation (28 days) with the use of iron nanoquachelate at a concentration of 140 µg/ml, regenerating plants did not show any signs of inhibition of vital activity, chlorotic depigmentation or aging compared to the control.

Anatomical and histochemical features of regenerating plants of tobacco, which were cultivated on nutrient media with different forms and iron content, are shown..

Keywords: iron, Nicotiana tabacum, nutrient medium, nanoquachelates

Отримано редколегією 28.05.2023 р.