

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ ХИТОЗАН – СЕРЕБРО НА ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ *SOLANUM TUBEROSUM*

Л.Г. Яруллина*¹, Е.А. Заикина¹, Г.Ф. Бурханова¹, Е.А. Черепанова¹, А.В. Сорокань¹,
В.О. Цветков², И.С. Марданишин³, И.Я. Фаткуллин¹, Ж.Н. Калацкая⁴, К.С. Гилевская⁵

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054 Россия, Уфа, Проспект Октября, 71, *e-mail: evisheva@yandex.ru

²Уфимский университет науки и технологий, 450076 Россия, Уфа, ул. Заки Валиди, 32

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства УФИЦ РАН, 450059 Россия, Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19

⁴Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27

⁵Институт химии новых материалов НАН Беларуси, 220141 Беларусь, Минск, ул. Ф. Скорины
36

Исследовали влияние новых наноконкомпозитов на основе серебросодержащего хитозана с массовым соотношением хитозан-серебро 100:1 (ХитAg 100:1) и 50:1 (ХитAg 50:1), на устойчивость картофеля к инфицированию возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и недостатку влаги в почве. Выявлено, что обработка наноконкомпозитом ХитAg 100:1 приводила к снижению степени проявления симптомов фитофтороза на листьях растений до 40% по сравнению с 95% в контроле, увеличивала в них содержание белка и активность антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы) при недостатке влаги. Вероятно, увеличение массового содержания хитозана в составе наноконкомпозита ХитAg способствует повышению иммуностимулирующих свойств на растениях.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, наноконкомпозиты, хитозан, серебро, пероксид водорода, антиоксидантные ферменты, индуцированная устойчивость.

INFLUENCE OF CHITOSAN - SILVER NANOCOMPOSITES ON PROTECTIVE MECHANISMS OF *SOLANUM TUBEROSUM*

L. Yarullina¹, E. Zaikina¹, G. Burkhanova¹, E. Cherepanova¹, A. Sorokan¹, V. Tsvetkov²,
I. Mardanshin³, I. Fatkullin¹, J. Kalatskaya⁴, K. Gilevskaya⁵

¹Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 450054 Russia, Ufa, Prospekt Oktyabrya st., 71

²Ufa University of Science and Technology, 450074 Russia, Ufa, Z. Validi st., 32

³Bashkir Research Institute of Agriculture, 450059 Russia, Ufa, Zorge st., 19

⁴Institute of Experimental Botany named after V.F. Kuprevich,
220072 Belarus, Minsk, Akademicheskaya st., 27

⁵Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus,
220141 Belarus, Minsk, F. Skorina st., 36

We investigated the effect of new nanocomposites based on silver-containing chitosan with a chitosan-silver mass ratio of 100:1 (ChitAg 100:1) and 50:1 (ChitAg 50:1) on the resistance of potatoes to infection by the late blight pathogen *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and lack of moisture in the soil. It was revealed that treatment with the nanocomposite ChitAg 100:1 led to a decrease in the degree of manifestation of late blight symptoms on plant leaves by up to 40% compared to 95% in the control, and increased their protein content and the activity of antioxidant enzymes (catalase and

peroxidase) under conditions of lack of moisture. Probably, an increase in the mass content of chitosan in the composition of the ChitAg nanocomposite contributes to an increase in the immunostimulating properties of plants.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, nanocomposites, chitosan, Ag, hydrogen peroxide, antioxidant enzymes, induced resistance.

Введение. Хитозан является природным полисахаридом, обладающим большим потенциалом применения в растениеводстве, поскольку может стимулировать рост растений, повышать их иммунный статус и устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу [7]. Макромолекулы хитозана состоят из случайно связанных β -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Элиситорные свойства хитозана обусловлены как специфическим связыванием остатков N-ацетилглюкозамина с рецепторами на поверхности растительных клеток, так и неспецифическим взаимодействием остатков глюкозамина за счет свободных аминогрупп с внешними и внутренними клеточными компонентами [9]. Биологическая активность хитозана во многом зависит от его молекулярной массы и степени ацетилирования. Модификация хитозана различными биологически активными веществами позволяет создавать новые полимерные материалы с улучшенными свойствами [8].

В настоящее время в связи с бурным развитием нанотехнологий начинают изучаться перспективы использования наночастиц металлов в сельском хозяйстве, среди которых особое внимание привлекают наночастицы серебра (НЧАg) из-за их способности стимулировать рост и урожайность различных сельскохозяйственных культур. Имеются сведения об иммуномодулирующей активности НЧАg, их фунгицидном и ростостимулирующем действии [6]. Влияние НЧАg на ростовые показатели растений определяется их дозировкой, которая может как усиливать, так и подавлять рост. Токсическое действие наночастиц серебра на растения включает снижение общей массы растений и подавление роста корней, уменьшение размеров стебля и побега, прерывание репликации ДНК и влияние на экспрессию генов [2]. Перспективным способом синтеза наночастиц серебра, снижающим их негативное воздействие на физиологические показатели растений, является химическое восстановление катионов Ag^+ полисахаридами. Следует отметить, что синтезируемые таким способом наноконпозиты полисахарид-Ag являются биосовместимыми и могут обладать свойствами, присущими каждому из компонентов, что позволяет говорить о перспективах разработки на их основе нового типа биопестицидов.

Цель работы – изучение влияния композитов хитозана с наночастицами серебра на формирование защитных механизмов у растений картофеля к инфицированию *Phytophthora infestans* и недостатку почвенной влаги.

Методы

Исследования проводили на растениях, выращенных из безвирусных мини клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача башкирской селекции, полученных в Башкирском НИИСХ УФИЦ РАН (г. Уфа). Растения выращивали в климатической камере (световой период 16 ч, 20–22°C) спектр -15KP (Россия).

Для искусственного инфицирования изолированных листьев растений использовали зооспоры возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 сут после повторного выделения из инфицированных мини-клубней картофеля для восстановления агрессивности патогена. Поверхность колоний изолята *P. infestans* заливали дистиллированной водой и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Концентрацию спорангиев оценивали с помощью камеры Фукса – Розенталя, суспензию спор разводили до титра 1×10^5 спор/мл.

Наноконпозиты хитозан-Ag (ХитAg) были получены в Институте химии новых материалов НАН Беларуси путем химического восстановления нитрата серебра хитозаном [4]. Для обработки растений использовали коллоидные растворы наноконпозитов с различным содержанием Ag. Наноконпозит №1 (ХитAg I, соотношение хитозан:Ag=100:1) и наноконпозит

№2 (ХитAg II, соотношение хитозан: Ag =50:1). Концентрация хитозана в обоих гидрозолях была одинаковой и составляла 34,0 мг/мл.

Растения выращивали в условиях оптимального полива (80–85 % от влагоемкости почвогрунта) и при недостатке почвенной влаги (40–45% влагоемкости), которую создавали путем сокращения полива. Через 7 суток после обработки растений растворами Хит-Ag в разведении 1: 50 и 1:100, в них оценивали содержание H_2O_2 и пролина, активность каталазы, пероксидазы и степень пораженности изолированных листьев возбудителем фитофтороза *P. infestans*.

Для определения содержания H_2O_2 использовали метод, описанный в работе Jiang с соавт. [5] с модификациями. Концентрацию пероксида водорода определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

Для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) использовали метод Hadwan и Abed [3] с модификациями. Активность каталазы рассчитывали по формуле: $U = (A_k - A_o) * K / (V * T)$, где A_k и A_o - абсорбция контрольных (содержащих воду вместо образца) и опытных образцов, соответственно, V – объем пробы, 0.1 мл, T – время инкубации, 600 с, K – коэффициент миллимолярного поглощения H_2O_2 , равный $22.2 * 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность КАТ выражали в единицах на 1 мг белка.

Для определения активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7, ПО) использовали метод Fornera и Walde [1] с модификациями, путем окисления субстрата 20 mM ортофенилендиамина 10 mM H_2O_2 , развитие окраски прекращали 4 н. H_2SO_4 . Оптическую плотность раствора измеряли при 490 нм на приборе Perkin Elmer LS 55 (США). Единица активности фермента соответствовала изменению оптической плотности раствора за 1 мин. Активность ПО выражали в единицах на 1 мг белка. Для определения содержания пролина навеску растений заливали 2.5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки помещали в водяную баню, которую затем доводили до кипения, после чего пробирки вынимали и охлаждали. Пробирки, содержащие 2 мл холодного образца, 2 мл реагента нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа, затем охлаждали. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на оборудовании Ep-Spire («Perkin Elmer», США) при длине волны 522 нм. Опыты проводили в пятикратной биологической повторности. На гистограммах показаны выборочные средние, в качестве показателя погрешности показан 95%-ный доверительный интервал. Для оценки достоверности различий выборочных средних проводили дисперсионный анализ и последующий многогранговый тест Дункана в программе Statistica 13 (уровень надежности 95 %).

Результаты и обсуждение

Исследовали устойчивость растений картофеля, обработанных нанокompозитами на основе серебросодержащего хитозана с массовым соотношением хитозан-Ag 100:1 (ХитAg I) и с массовым соотношением хитозан-Ag 50:1 (ХитAg II), использованных для обработки растений в разведениях 1:50 и 1:100, через 45 дней после высадки мини клубней в контейнеры методом искусственного инфицирования изолированных листьев. Было показано, что через 5 суток после инфицирования площадь развития симптомов фитофтороза на листьях обработанных водой растений, растущих в условиях оптимальной увлажнённости, достигала 95-100% от всей листовой пластинки, конъюгатом ХитAg I в разведении 1:50 - чуть более 40% (рис. 1). Действие ХитAg II (разведение 1:100) приводило к меньшему снижению степени проявления симптомов фитофтороза на листьях растений (60-65% листа). Другие варианты не были эффективны.

При анализе содержания пероксида водорода, пролина, активности каталазы и пероксидазы в растениях, растущих в нормальных условиях обеспечения почвенной влагой, было продемонстрировано отсутствие стрессового воздействия исследуемых серебросодержащих нанокompозитов хитозана. В условиях недостатка влаги обработка растений нанокompозитом ХитAg I увеличивала содержание белка и активность антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы). Обработка ХитAg I значительно снижала пероксидазную активность в нормальных условиях увлажнения, а в условиях дефицита влаги уровень ее активности значительно превышал все остальные варианты. Обработка композитами ХитAg

способствовали увеличению концентрации пероксида водорода в растениях, как в нормальных условиях, так и при недостатке влаги.

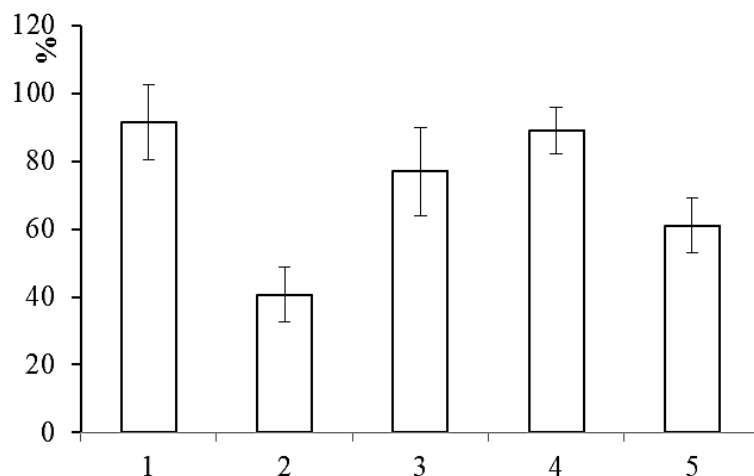


Рис. 1. Симптомы фитофтороза на листьях растений картофеля Удача, обработанных нанокompозитами хитозана с серебром (ХитAg I и ХитAg II) в разведении 50 и 100 раз через 5 суток после искусственного инфицирования *P. infestans*.

1 - контроль, 2 – ХитAg I (1:50), 3 – ХитAg II (1:50), 4 - ХитAg I (1:100), 5 - ХитAg II (1 :50).

Возможно, повышение уровня H_2O_2 было связано со снижением активности каталазы под влиянием обработок ХитAg в исследуемых вариантах. Причем, при обработке растений ХитAg I снижение активности каталазы в условиях засухи было менее значительным, чем при обработке ХитAg II. Полученные данные свидетельствуют о связи между структурой нанокompозита и его биологической активностью: увеличение массового содержания хитозана в составе композита способствует повышению его иммуностимулирующих свойств на растения.

Благодарности. Работа выполнялась при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-16-00139

Библиографический список

1. Fornera S, Walde P. Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. *Analytical Biochemistry* 2010, 407(2), 293-295. DOI: 10.1016/j.ab.2010.07.034.
2. Geisler-Lee J., Brooks M., Gerfen J.R. et al. Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana* // *Nanomaterials*. – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 301-318.
3. Hadwan M.H., Abed H.N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*. 2016, 6, 194-99. DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.012.
4. Hileuskaya K.S., Mashkin M.E., Kraskouski A.N. et al. Hydrothermal Synthesis and Properties of Chitosan–Silver Nanocomposites // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. – 2021. – Vol. 66. – P. 1128-1134.
5. Jiang Z.Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.*, 1990, 268, 69-71. DOI: 10.1006/abio.1999.4208.
6. Khan S., Zahoor M., Khan R.S. The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 8, Is. 6. – P. e16928.
7. Kou S. G., Peters L. M., Mucalo M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 169. – P. 85-94.
8. Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R.C. et al. Engineered chitosan based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 113. – P. 494-506.
9. Li K., Xing R., Liu S. et al. Chitin and chitosan fragments responsible for plant elicitor and growth stimulator // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68, №. 44. – P. 12203-12211.