

УДК 57.022

ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОРАЗМЕРНОГО СЕЛЕНА НА ВОЗБУДИТЕЛЬ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ И КАРТОФЕЛЬ *IN VITRO*

© И.А. Граскова^{1,2}, А.И. Перфильева^{1*}, О.А. Ножкина¹, А.В. Дьякова³, В.Н. Нурминский¹,
И.В. Клименков^{3,4}, Н.П. Судаков^{3,5}, Т.М. Бородин⁶, Г.П. Александрова⁶, М.В. Лесничая⁶,
Б.Г. Сухов^{2,6}, Б.А. Трофимов⁶

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033 (Россия), e-mail: alla.light@mail.ru

²Иркутский научный центр СО РАН, ул. Лермонтова, 134, Иркутск, 664033
(Россия)

³Иркутский государственный университет, ул. Карла Маркса, 1, Иркутск,
664003 (Россия)

⁴Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск,
664033 (Россия)

⁵Иркутский научный центр хирургии и травматологии, ул. Борцов
Революции, 1, Иркутск, 664003 (Россия)

⁶Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, ул. Фаворского, 1,
Иркутск, 664033 (Россия)

Изучена биологическая активность нанокompозита селена в биополимерной матрице с высоким содержанием селена – 6.4%. Ранее было показано, что нанокompозиты селена и арабиногалактана (НК Se/АГ, 1.23% и 3.4% Se) обладают бактерицидным и бактериостатическим эффектом по отношению к фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) и не оказывают негативного влияния на жизнеспособность растений картофеля *in vitro*. В настоящей работе исследования показали, что изучаемый нанокompозит обладает бактериостатическим эффектом, ингибирует прирост бактерий на 20% по сравнению с контролем и снижает способность бактерий *Cms* к образованию биопленок, способствующих их высокой устойчивости к внешним факторам. Эксперименты, проведенные на растениях, показали отсутствие негативного воздействия НК Se/АГ на биометрические показатели и уменьшение негативного эффекта заражения картофеля *Cms*. Нанокompозит снижал активность пероксидазы и содержание активных форм кислорода в тканях картофеля. Установлено, что селен не накапливается в картофеле после обработки растений НК Se/АГ. Полученные результаты позволяют рассматривать НК Se/АГ (6.4% Se) в качестве агента для оздоровления культурных растений от патогенных бактерий.

Ключевые слова: нанокompозит, арабиногалактан, селен, картофель, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, пероксидаза.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых №МК-1220.2019.11, гранта РФФИ и Правительства Иркутской области № 17-416-380001, а также Госзадания НИР ИрИХ СО РАН (№ АААА-А19-119022690046-4).

Введение

Граскова Ирина Алексеевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник,
e-mail: graskova@sifibr.irk.ru

Перфильева Алла Иннокентьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник,
e-mail: alla.light@mail.ru

Ножкина Ольга Александровна – аспирант,
e-mail: smallolga@mail.ru

Дьякова Анастасия Вячеславовна – студентка,
e-mail: flora_217@mail.ru

Различные заболевания культурных растений, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями, отрицательно влияют на урожайность в современном растениеводстве [1]. Бактерии рода *Clavibacter* поражают широкий круг культурных и сорных растений [2]. Одним из представителей этого рода является *Clavibacter*

Окончание на С. 346.

* Автор, с которым следует вести переписку.

michiganensis ssp. *sepedonicus* – возбудитель кольцевой гнили картофеля [3]. На сегодняшний день не существует эффективных и безопасных способов борьбы с большинством бактерий, вызывающих заболевания культурных растений. В связи с этим необходимо разработать способы оздоровления растений от фитопатогенных бактерий с применением препаратов на основе природных соединений, которые не будут влиять на рост растений и при этом оказывать губительного воздействия на возбудителей заболеваний.

Развитие нанотехнологий позволяет внедрять инновационные материалы во многие сферы человеческой деятельности – медицину, сельское хозяйство и пищевую промышленность [4–7], однако в фитопатологии нанокompозитные материалы практически не применяются. Ранее нами был исследован ряд нанокompозитов: с содержанием серебра и гуминовых кислот [8], серебра и арабиногалактана [9], селена и крахмала, а также селена и арабиногалактана [10–12].

Целью настоящей работы является изучение влияния нанокompозита арабиногалактана и селена на жизнеспособность бактерии *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, а также на биометрические и биохимические показатели растений картофеля *in vitro*.

Материалы и методы

Культивирование растений картофеля. Влияние нанокompозита изучали на растениях картофеля *in vitro* сорта Лукьяновский, являющегося восприимчивым к кольцевой гнили картофеля [13]. Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (Sigma-Aldrich, USA) 4.2 г/л с добавлением 30 г/л сахарозы, 1 мл/л пиридоксина, 1 мл/л тиамина и 1 мл/л феруловой кислоты, рН 5.8–6.0. Растения культивировали в течение 20 сут. при 26 °С и освещенности 5–6 кЛк.

Бактерии. Использовали штамм *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) Ac-1405, возбудителя кольцевой гнили картофеля (получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пушкино, Московская обл.). Бактерии *Cms* выращивали на среде с глюкозой, пептоном и дрожжевым экстрактом (GPY) [14, 15].

Для исследования бактериостатической активности биокомпозитов селена в отношении кольцевой гнили картофеля жидкую культуру *Cms* выращивали в темноте при 26 °С на качалке (80 об./мин) в колбах, содержащих питательную среду GPY, рН 7.2.

Влияние нанокompозита селена на биопленкообразование *Cms* исследовали с применением планшетного метода [16].

Синтез нанокompозита 6.4% Se проводили окислением органилдиселенофосфината натрия пероксидом водорода. Подробно процесс синтеза описан ранее [17–19]. Для экспериментов использовали водные растворы нанокompозитов, в которых содержание селена составляло 0.000625%.

Схема эксперимента с растениями. Для проведения эксперимента в ростовую среду картофеля вносили

Нурминский Вадим Николаевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: cell@sifibr.irk.ru

Климиков Игорь Викторович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: iklimen@mail.ru

Судаков Николай Петрович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: npsudakov@gambler.ru

Бородина Татьяна Николаевна – младший научный сотрудник, e-mail: borodina@irioch.irk

Александрова Галина Петровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, e-mail: alexa@irioch.irk.ru

Лесничая Марина Владимировна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, e-mail: mlesnichaya@mail.ru

Сухов Борис Геннадьевич – кандидат химических наук, заведующий лабораторией наноматериалов, e-mail: sukhov@irioch.irk.ru

Трофимов Борис Александрович – академик РАН, научный руководитель института, e-mail: boris_trofimov@irioch.irk.ru

раствор нанокompозитов. В вариантах с заражением в среду вносили 1-суточную бактериальную суспензию *Cms*. Растения инкубировали 26 сут, отслеживая каждые 2-е сут биометрические показатели (длину растений и количество листьев, длину междоузлий, массу корней и массу надземной части) и активность пероксидазы во всех органах: листьях, корнях и стеблях.

Активность гволякозависимой пероксидазы определяли по методу Бояркина [20]. Активность фермента измеряли спустя сутки коинкубации растений с нанокompозитом.

Для выявления областей продукции активных форм кислорода (АФК) растения заражали *Cms*, выдерживали 2 сут, затем обрабатывали нанокompозитом, спустя 1 ч кокультивирования осуществляли подготовку проб для анализа. Образцы ткани растений инкубировали 30 мин с 5 μM

CellROX Deep Red Reagent (ex/em 644/665 nm) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), растворенном в фосфатном буфере. Далее ткань фиксировали 2% параформальдегидом в течение 15 мин. Ядра клеток окрашивали DAPI (ex/em 340/488 nm), 0.5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, USA) в течение 15 мин. Полученные препараты заключали в ProLong Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и исследовали в LSM 710 (Zeiss, Germany). Для исследования применяли следующие лазеры: 405, 561 нм; фильтры: Ch1 410–522.

Методика рентгеновского спектрального энергодисперсионного микроанализа (РСЭДМА). Растения заражали *Cms*, через 2 сут, когда оно полностью колонизировано патогеном, его обрабатывали наноккомпозитом. Спустя 2 сут кокультивирования в факторостатных условиях осуществляли подготовку проб для анализа. Пробы, полученные из растертой и слегка подсушенной растительной ткани, наклеивали на электропроводный клей и помещали в камеру для съемки при помощи электронного сканирующего микроскопа «Hitachi TM 3000» с X-детектором SDD Xflash 4304, где они подвергались электронному удару. С помощью пучка электронов атомы исследуемого образца возбуждались, испуская характерное для каждого химического элемента рентгеновское излучение. Исследуя энергетический спектр такого излучения, делали выводы о качественном и количественном составе образца.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета программ MS Excel.

Результаты и обсуждение

Первоначальной задачей настоящего исследования было выявление влияния исследуемого наноккомпозита на бактерию *Cms*. Для обнаружения бактериостатического эффекта наноккомпозита использовали метод измерения оптической плотности бактериальной суспензии. Были получены следующие результаты (рис. 1).

В контроле наблюдалась типичная логарифмическая кривая роста бактерий. Было обнаружено, что спустя 20 ч инкубации бактерий с НК Se/АГ их количество значительно снижалось по сравнению с контролем. Такая тенденция сохранялась при дальнейшем наблюдении за приростом бактерий. Наноккомпозит с содержанием селена 6.4%, также как и наноккомпозиты селена и арабиногалактана (1.23% и 3.4%), исследованные ранее [8, 10–12], обладал ингибирующим эффектом на прирост бактерий.

В прежних исследованиях нами было показано, что НК Se/АГ с содержанием селена 1.23%, синтезированный из оксида селена, оказывает на *Cms* бактерицидный эффект путем прикрепления наночастиц селена к клеткам бактерий, что нарушает их окислительно-восстановительный потенциал и ведет к гибели клетки. При этом было обнаружено отсутствие негативного эффекта НК Se/АГ на прирост растений картофеля и активность пероксидазы в его тканях [11, 12]. Далее нами было исследовано влияние на бактерию *Cms* и растения картофеля НК Se/АГ с большим содержанием селена 3.4%, который был синтезирован из бис(фенилэтил)диселенофосфината натрия. Такой наноккомпозит обладал бактериостатическим и бактерицидным эффектом [8] и не оказывал негативного влияния на прирост растений картофеля. На основании полученных результатов возникло предположение, что НК Se/АГ с еще большим содержанием селена будет более эффективен для регуляции численности фитопатогенных бактерий, однако неизвестно, каким образом подействует такой наноккомпозит на растения, будет ли безопасен для них. В связи с этим нами был синтезирован НК Se/АГ с содержанием селена 6.4%.

Также нами было исследовано влияние НК Se/АГ (6.4%) на способность бактерии образовывать биопленки. Известно, что биопленкообразование – важная функция бактерий, способствующая их высокой устойчивости к внешним факторам [21–25]. Кроме того, бактерия *Cms* в сосудах растений образует пробки [2], основным составляющим которых, вероятно, являются биопленки. Результаты по влиянию наноккомпозита на биопленкообразование представили на рисунке 2. Было обнаружено, что обработка бактерий наноккомпозитом снижает их способность образовывать биопленки. Это является важным свойством наноккомпозита как потенциального агента для обеззараживания растений от бактерий.

Таким образом, эксперименты, проведенные на бактериях, показали наличие у наноккомпозита селена и арабиногалактана с содержанием селена 6.4% бактериостатического и антибиопленочного эффектов.

Следующим этапом исследования являлось изучение влияния наноккомпозитов на растения, зараженные возбудителем кольцевой гнили картофеля. Нами были исследованы биометрические характеристики растений, а также биохимические – активность пероксидазы и АФК в тканях картофеля. Для наиболее яркого выявления эффекта НК Se/АГ эксперименты проводили на картофеле восприимчивого сорта Лукьяновский.

Результаты показали, что обработка НК Se/АГ не оказывала негативного влияния на биометрические показатели картофеля (рис. 3).

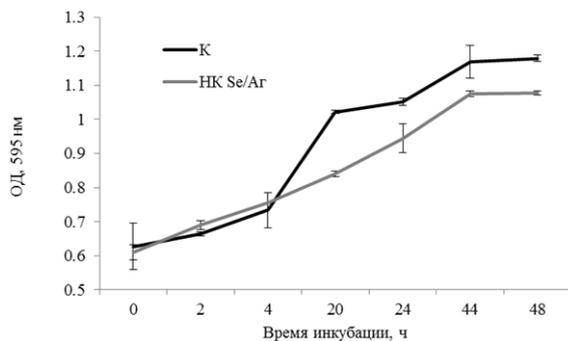


Рис. 1. Влияние НК Se/AG (6.4%) на прирост бактерий *Cms*

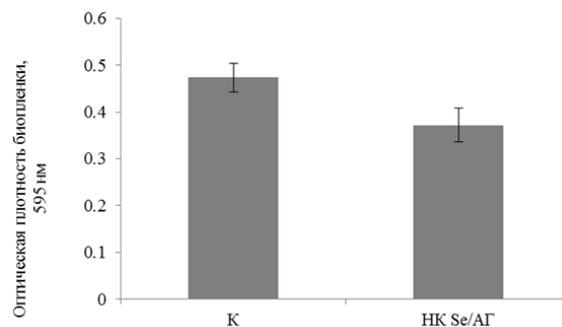


Рис. 2. Уменьшение биопленкообразования бактерий *Cms* под влиянием НК Se/AG (6.4%)

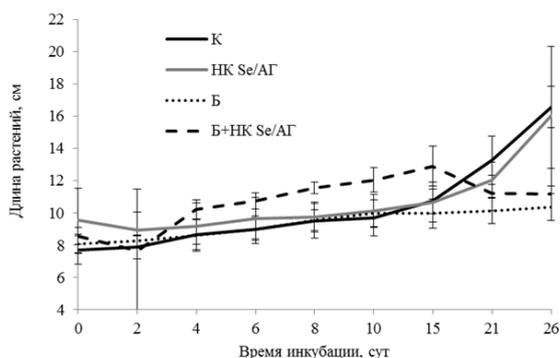


Рис. 3. Влияние заражения *Cms* и НК Se/AG (6.4%) на прирост растений картофеля. К – растения без заражения и обработки НК Se/AG; НК Se/AG – растения, подвергнутые обработке НК Se/AG; Б – зараженные *Cms* растения картофеля; Б+НК Se/AG – зараженные *Cms* и подвергнутые обработке НК Se/AG растения картофеля

Также нами был исследован такой биометрический показатель, как количество листьев у растений картофеля, подвергнутых обработке нанокompозитами (табл. 1).

Анализ количества листьев показал, что первые две недели наблюдения обработка неинфицированных растений НК Se/AG стимулировала образование листьев, далее исследуемый показатель был на уровне контроля (табл. 1). Зараженные *Cms* растения картофеля характеризовались меньшим количеством листьев по сравнению с контролем. Обработка НК Se/AG зараженных *Cms* растений в течение первых двух недель наблюдения значительно сильнее по сравнению с другими опытными образцами стимулировала образование листьев. Однако в течение дальнейшего наблюдения за этими растениями наблюдалось снижение количества листьев. Вероятно, к тому времени весь вносимый нанокompозит был утилизирован *Cms* и оставшиеся бактерии начали размножение, вызывая закупоривание стеблей картофеля, что препятствовало образованию листьев и снижению прироста растений. При этом не наблюдалось «эффекта вытягивания» растений (табл. 2).

В конце эксперимента нами была определена биомасса надземной части растений и их корней (табл. 2). Выявлено, что НК Se/AG у картофеля стимулировал как образование корней, так и прирост вегетативной части по сравнению с контролем. Такой эффект нанокompозита, вероятно, может быть связан с наличием у арабиногалактана биологической активности [26], которая, возможно, приводит к стимуляции прироста биомассы растений. Заражение растений бактерией *Cms* значительно снижало исследуемые показатели, однако обработка НК Se/AG уменьшала негативное влияние заражения на массу корней и вегетативной части растений (табл. 2).

Для выявления наличия стрессового состояния у растений при их обработке НК Se/AG нами были изучены такие биохимические характеристики, как активность пероксидазы и содержание АФК в тканях листьев картофеля. В таблице 2 представлены результаты по активности пероксидазы. Было выявлено, что обработка растений НК Se/AG не влияет на активность фермента в тканях картофеля (табл. 2). Заражение *Cms* незначительно снижает активность фермента. Внесение нанокompозита к зараженным *Cms* растениям демонстрирует повышение активности фермента. Такой результат свидетельствует об усилении защитной реакции растения на биотический стресс под влиянием НК Se/AG.

Таблица 1. Влияние заражения *Cms* и НК Se/AG (6.4%) на количество листьев у растений картофеля *in vitro*

	0 сут	2 сут	4 сут	6 сут	8 сут	10 сут	15 сут	21 сут	26 сут
К	9±0.0	10±0.0	10±1.0	10.3±0.5	13.3±2.1	13.7±2.3	16.7±2.1	18.3±2.9	19.7±4.5
НК Se/AG	9±1	11±3.4	14±4	15±4	15.3±4.7	17±5.2	16.6±5.0	17.7±4.0	18±3.60
Б	11.7±3.8	11±2.6	11.3±4.0	13.3±3.5	16.3±4.7	17±3.6	17±4.6	15.7±3.2	15.3±2.1
Б+НК Se/AG	7.7±0.6	13.7±1.5	16.3±1.2	17±1.7	19.3±1.2	19.3±1.2	19.7±2.1	15±5.3	13±5.7

Примечание: К – растения без заражения и обработки НК Se/AG; НК Se/AG – растения, подвергнутые обработке НК Se/AG; Б – зараженные *Cms* растения картофеля; Б+НК Se/AG – зараженные *Cms* и подвергнутые обработке НК Se/AG растения картофеля.

Таблица 2. Влияние заражения *Cms* и НК Se/AG (6.4%) на биометрические характеристики картофеля и активность пероксидазы

	К	НК Se/AG	Б	Б+НК Se/AG
Длина междоузлий, см	1.18±0.03	1.27±0.25	1.03±0.15	1.15±0.10
Масса корней, г	0.29±0.16	0.35±0.17	0.13±0.02	0.17±0.08
Масса ВЧ, г	0.70±0.18	0.78±0.15	0.47±0.12	0.60±0.34
Активность пероксидазы, у.е.	0.021±0.001	0.020±0.002	0.019±0.001	0.0025±0.001

Примечание: К – растения без заражения и обработки НК Se/AG; НК Se/AG – растения, подвергнутые обработке НК Se/AG; Б – зараженные *Cms* растения картофеля; Б+НК Se/AG – зараженные *Cms* и подвергнутые обработке НК Se/AG растения картофеля; ВЧ – вегетативная часть растений.

Также нами было визуально определено наличие АФК в тканях зараженного картофеля как обработанного НК Se/AG, так и без обработки наноккомпозитом (рис. 4). На рисунке синим цветом обозначены ядра клеток, красным – активные формы кислорода.

Было обнаружено, что НК Se/AG усиливает образование АФК в клетках инфицированного возбудителем кольцевой гнили картофеля. Вероятно, это объясняется тем, что наноккомпозит способен активировать в растении защитные механизмы для борьбы со стрессом. Известно, что АФК являются сигнальными молекулами и путем повышения своей концентрации в клетке способны активировать множество защитных программ при стрессах как биотической, так и абиотической природы [27–30]. Поэтому наблюдаемая картина повышенного содержания АФК при добавлении наноккомпозита может свидетельствовать об ускоренной активации защитной реакции на стресс, вызванный инфицированием бактериями.

Так как в исследуемом в настоящей работе наноккомпозите содержание селена было повышенным по сравнению с ранее используемыми наноккомпозитами, необходимо было проверить, накапливается ли селен в тканях картофеля после обработки НК Se/AG. Для этого нами проведены исследования тканей картофеля на содержание селена методом РСЭДМА спустя сутки после обработки (рис. 5). Результаты элементного анализа тканей картофеля показали отсутствие селена в пределах обнаружения прибора (табл. 3).

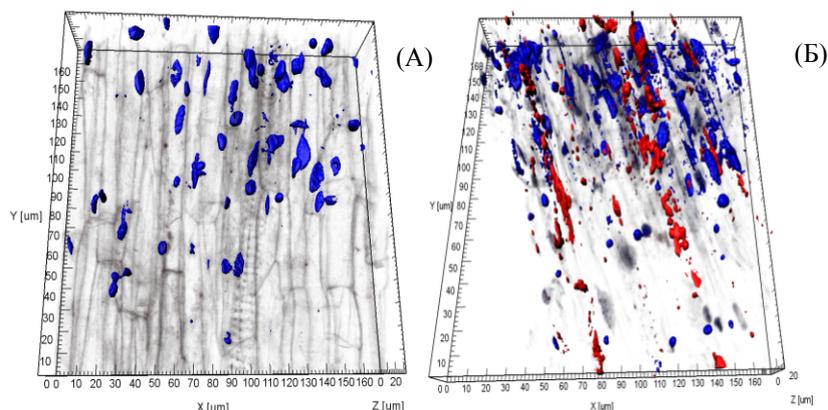


Рис. 4. Увеличение продукции АФК в тканях картофеля после их обработки НК Se/AG (6.4%). Окраска на АФК (CellROX deep red reagent, красный) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия, 3D-реконструкции. А – контроль; Б – участки ткани с многочисленными крупными кластерами АФК после обработки растений НК Se/AG (6.4%)

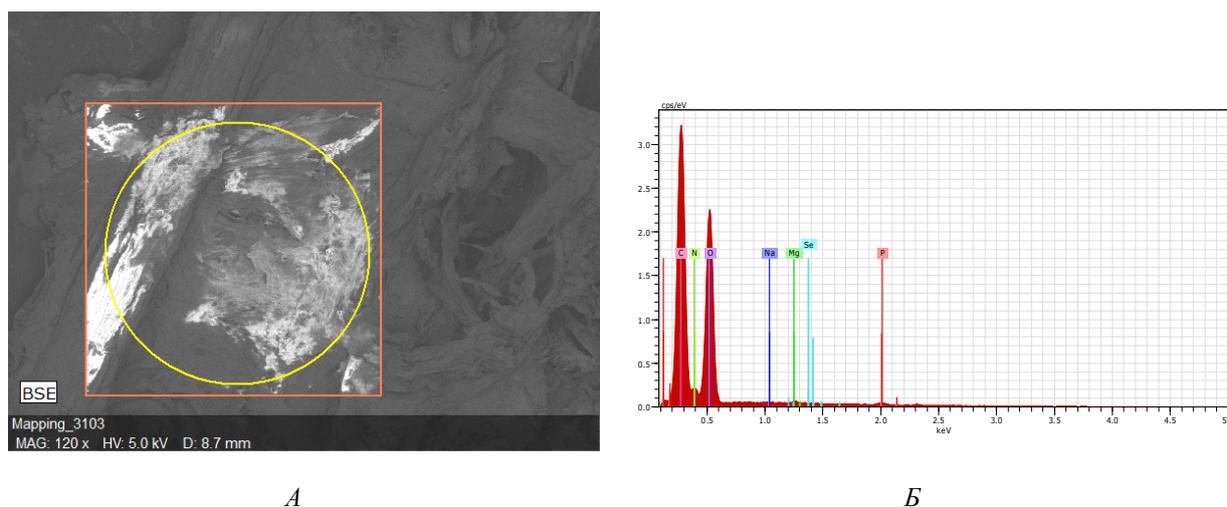


Рис. 5. Результаты рентгеновского спектрального энергодисперсионного микроанализа тканей растений картофеля, обработанных нанокompозитом. Изображение анализируемой ткани картофеля (А), карта распределения Se и основных органогенных элементов (Б)

Таблица 3. Результаты рентгеновского спектрального энергодисперсионного микроанализа тканей растений картофеля, обработанных нанокompозитом

Элемент	Нормализованное содержание (масс. %)	Атомное содержание (ат. %)	Ошибка, %
Кислород	45.77	39.54	5.1
Углерод	45.36	52.19	5.0
Азот	7.92	7.82	1.1
Фосфор	0.69	0.31	0.1
Магний	0.26	0.15	0.0
Натрий	0.00	0.00	0.0
Селен	0.00	0.00	0.0
Всего:	100.0	100.0	

Выводы

В результате проведенных экспериментов с нанокompозитом селена и арабиногалактана с повышенным содержанием селена 6.4% было обнаружено, что он обладает бактериостатическим и антибиопленочным эффектами.

НК Se/АГ обладает положительным влиянием на растения картофеля благодаря повышению его иммунного статуса за счет увеличения содержания АФК и повышения активности пероксидазы. После обработки растений НК Se/АГ селен не обнаруживается в тканях картофеля.

Полученные результаты позволяют рассматривать нанокompозит селена и арабиногалактана в качестве экологически безопасного агента для оздоровления сельскохозяйственных растений от патогенных бактерий.

Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, ЦКП «Ультрамикрoанализ» ЛИИ СО РАН (Иркутск), а также Байкальского аналитического ЦКП ИРИХ СО РАН.

Список литературы

1. Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А., Еланский С.Н., Журомский Г.К., Завриев С.К., Зейрук В.Н., Иванюк В.Г., Кузнецова М.А., Пляхневич М.П., Пшеченков К.А., Симаков Е.А., Складорова Н.П., Шташевски З., Усков А.И., Яшина И.М. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М., 2009. 272 с.
2. Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annual Review of Phytopathology. 2011. Vol. 49. Pp. 445–464. DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095258.

3. Van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzler M., Muller P., Hukkanen A., Karjalainen R. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. Wageningen: Plant Research International B.V., 2005. Report 95.
4. Tran P.A., Webster T. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth // International Journal of Nanomedicine. 2011. Vol. 6. Pp. 1553–1558. DOI: 10.2147/IJN.S21729.
5. Фадеева Т.В., Шурыгина И.А., Сухов Б.Г., Раи М.К., Шурыгин М.Г., Уманец В.А., Лесничая М.В., Конькова Т.В., Шурыгин Д.М. Взаимосвязь между строением и антимикробной активностью нанокompозитов серебра // Известия РАН. Серия физическая. 2015. Т. 79. №2. С. 297–299. DOI: 10.7868/S036767651502009X.
6. Yang X., Yang M., Pang B., Vara M., Xia Y. Gold nanomaterials at work in biomedicine // Chemical Reviews 2015. Vol. 115. N19. Pp. 10410–10488. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00193.
7. Колесникова Л.И., Карпова Е.А., Власов Б.Я., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Состояние системы липопероксидации-антиоксидантной защиты при токсическом поражении печени и его профилактике нанокompозитным препаратом селена и арабиногалактана // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159. №2. С. 183–187. DOI: 10.1007/s10517-015-2928-3.
8. Перфильева А.И., Ножкина О.А., Граскова И.А., Сидоров А.В., Лесничая М.В., Александрова Г.П., Долмаа Г., Клименков И.В., Сухов Б.Г. Синтез нанобиокompозитов селена и серебра и их влияние на фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Известия Академии наук. Серия химическая. 2018. №1. С. 157–163. DOI 10.31255/978-5-94797-319-8-626-629.
9. Perfilova A.I., Zhivet'yev M.A., Gasisova A.V., Borovskii G.B., Graskova I.A., Sukhov B.G., Trofimov B.A. Bactericidal influence of silver nanocomposites on *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2016. Vol. 12. N2. Pp. 11–16.
10. Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А., Боровский Г.Б., Граскова И.А., Лесничая М.В., Клименков И.В., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Влияние нанокompозита селена и арабиногалактана на жизнеспособность фитопатогена *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Доклады академии наук. 2015. Т. 461. №2. С. 239–241. DOI: 10.7868/S0869565215030305.
11. Papkina A.V., Perfilova A.I., Zhivet'yev M.A., Borovskii G.B., Graskova I.A., Klimenkov I.V., Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Trofimov B.A. Complex effects of selenium-arabinogalactan nanocomposite on both phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and potato plants // Nanotechnologies in Russia. 2015. Vol. 10. N5–6. Pp. 484–491. DOI: 10.1134/S1995078015030131.
12. Perfilova A.I., Moty'leva S.M., Klimenkov I.V., Graskova I.A., Skhov B.G., Trofimov B.A. Development of antimicrobial nano-selenium biocomposite for protecting potatoes from bacterial phytopathogens // Nanotechnologies in Russia. 2017. Vol. 12. N9–10. Pp. 553–558. DOI: 10.1134/S1995078017050093.
13. Romanenko A.S., Riffel A.A., Graskova I.A., Rachenko M.A. The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring-rot pathogen // Journal of Phytopathology. 1999. Vol. 147. N11–12. Pp. 679–686. DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.00450.x.
14. Roozen N.J.M., van Vuurde J.W.L. Development of a semi-selective medium and an immunofluorescence colony-staining procedure for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in cattle manure slurry // Netherlands Journal of Plant Pathology. 1991. Vol. 97. N5. Pp. 321–334.
15. Florack D.E., Visser B., de Vries P.M., van Vuurde J.W.L., Stiekema W.J. Analysis of the toxicity of purothionins and hordothionins for plant pathogenic bacteria // Netherlands Journal of Plant Pathology. 1993. Vol. 99. N5–6. Pp. 259–268.
16. Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Батов А.Б. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007. №1. С. 3–8.
17. Патент №2557992 (РФ). Антиоксидантное средство с гепатопротекторным эффектом на основе наноструктурированного селена и способы его получения и применения / Е.А. Карпова, Б.Г. Сухов, Л.И. Колесникова, Б.Я. Власов, А.В. Артемьев, М.В. Лесничая, Н.Н. Погодаева, О.П. Ильина, С.А. Сайванова, С.В. Кузнецов, Б.А. Трофимов / 2015.
18. Шурыгина И.А., Родионова Л.В., Шурыгин М.Г., Сухов Б.Г., Кузнецов С.В., Попова Л.Г., Дремина Н.Н. Конфокальная микроскопия в изучении влияния оригинальных проферментных наногликоконъюгатов элементного селена на регенерацию опорных тканей // Известия РАН. Серия физическая. 2015. Т. 79. №2. С. 280–282. DOI: 10.7868/S0367676515020271.
19. Родионова Л.В., Шурыгина И.А., Сухов Б.Г., Попова Л.Г., Шурыгин М.Г., Артемьев А.В., Погодаева Н.Н., Кузнецов С.В., Гусарова Н.К., Трофимов Б.А. Нанобиокompозит селена и арабиногалактана: синтез, строение и применение // Журнал общей химии. 2015. Т. 85, вып. 2. С. 314–316. DOI: 10.1134/S1070363215020218.
20. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. 1951. Т. 16. С. 352–355.
21. Bogino P.C., Oliva M. de las M., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // International Journal of Molecular Sciences. 2013. Vol. 30. N14(8). Pp. 15838–15859. DOI: 10.3390/ijms140815838.
22. Рахматулина М.Р., Нечаева И.А. Биопленки микроорганизмов и их роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. №2. С. 58–62. DOI: 10.25208/0042-4609-2015-0-2-58-62.
23. Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск, 2017. 300 с.

24. Velmourougane K., Prasanna R., Saxena A.K. Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects // *Journal of Basic Microbiology*. 2017. Vol. 57. N7. Pp. 548–573. DOI: 10.1002/jobm.201700046.
25. Danhorn T., Fuqua C. Biofilm formation by plant-associated bacteria // *Annual Review of Microbiology*. 2007. Vol. 61. Pp. 401–422. DOI:10.1146/annurev.micro.61.080706.093316.
26. Дубровина В.И., Медведева С.А., Витязева С.А., Колесникова О.Б., Александрова Г.П., Гуцол Л.О., Грищенко Л.А., Четверякова Т.Д. Структура и иммуномодулирующее действие арабиногалактана лиственницы сибирской и его металлопроизводных. Иркутск, 2007. 145 с.
27. Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // *Plant Cell And Environment*. 2012. Vol. 35. N2. Pp. 259–270. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.
28. Lehmann S., Serrano M., L'Haridon F., Tjamos S.E., Metraux J.P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens // *Phytochemistry*. 2015. Vol. 112. Pp. 54–62. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.08.027.
29. Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // *Plant Journal*. 2017. Vol. 90. N5. Pp. 856–867. DOI: 10.1111/tpj.13299.
30. Liebthal M., Dietz K.J. The fundamental role of reactive oxygen species in plant stress response // *Methods in Molecular Biology*. 2017. Vol. 1631. Pp. 23–39. DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_2.

Поступила в редакцию 13 декабря 2018 г.

После переработки 11 января 2019 г.

Принята к публикации 31 января 2019 г.

Для цитирования: Граскова И.А., Перфильева А.И., Ножкина О.А., Дьякова А.В., Нурминский В.Н., Клименков И.В., Судаков Н.П., Бородина Т.М., Александрова Г.П., Лесничая М.В., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Воздействие наноразмерного селена на возбудитель кольцевой гнили и картофель *in vitro* // *Химия растительного сырья*. 2019. №3. С. 345–354. DOI: 10.14258/jcprm.2019034794.

Graskova I.A.^{1,2}, Perfiljeva A.I.^{1*}, Nozhkina O.A.¹, Dyakova A.V.³, Nurminsky V.N.¹, Klimenkov I.V.^{3,4}, Sudakov N.P.^{3,5}, Borodina T.M.⁶, Aleksandrova G.P.⁶, Lesnichaya M.V.⁶, Sukhov B.G.^{2,6}, Trofimov B.A.⁶ THE EFFECT OF NANOSCALE SELENIUM ON THE CAUSATIVE AGENT OF RING ROT AND POTATO *IN VITRO*

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, ul. Lermontova, 132, Irkutsk, 664033 (Russia), e-mail: alla.light@mail.ru

² Irkutsk Scientific Center SB RAS, ul. Lermontova, 134, Irkutsk, 664033 (Russia)

³ Irkutsk State University, ul. Karla Marksa, 1, Irkutsk, 664003 (Russia)

⁴ Limnological Institute SB RAS, ul. Ulan-Batorskaya, 3, Irkutsk, 664033 (Russia)

⁵ Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, ul. Bortsov Revolyutsii, 1, Irkutsk, 664003 (Russia)

⁶ Irkutsk A.E. Favorsky Institute of Chemistry SB RAS, ul. Favorskogo, 1, Irkutsk, 664033 (Russia)

The biological activity of biopolymer-based selenium nanocomposite with a high selenium content of 6.4% was investigated. It was shown earlier that nanocomposites of selenium and arabinogalactan (NC Se/AG, 1.23% and 3.4% Se) have a bactericidal and bacteriostatic effect on the pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) and do not adversely affect the vitality of potato plants *in vitro*. In this work, it was shown that the nanocomposite under scrutiny has a bacteriostatic effect, inhibits bacterial growth by 20% compared with the check variant and reduces the ability of *Cms* to form biofilms, which contribute to their high resistance to external factors. In the experiments conducted on plants, it was shown, there was not negative effect of NC Se/AG on biometric parameters, furthermore, this NC reduces the negative effect of potato infection with *Cms*. The nanocomposite reduced the activity of peroxidase and the content of reactive oxygen species in potato tissues. It was established that selenium does not accumulate in potato plants after the treatment with NC Se/AG. The results obtained allow us to consider NC Se/AG (6.4% Se) as an agent for healing cultivated plants from pathogenic bacteria.

Keywords: nanocomposite, arabinogalactan, selenium, potato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, peroxidase.

* Corresponding author.

References

- Anisimov B.V., Belov G.L., Varitsev YU.A., Yelanskiy S.N., Zhuromskiy G.K., Zavriyev S.K., Zeyruk V.N., Ivanyuk V.G., Kuznetsova M.A., Plyakhnevich M.P., Pshechenkov K.A., Simakov Ye.A., Sklyarova N.P., Stashevski Z., Uskov A.I., Yashina I.M. *Zashchita kartofelya ot bolezney, vreditel'ey i sornyakov*. [Protecting potatoes from diseases, pests and weeds.]. Moscow, 2009. 272 p. (in Russ.).
- Eichenlaub R., Gartemann K.H. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, vol. 49, pp. 445–464, DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095258.
- Van der Wolf J.M., Elphinstone J.G., Stead D.E., Metzler M., Muller P., Hukkanen A., Karjalainen R. *Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot*. Wageningen: Plant Research International B.V., 2005, report 95.
- Tran P.A., Webster T. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, vol. 6, pp. 1553–1558, DOI: 10.2147/IJN.S21729.
- Fadeyeva T.V., Shurygina I.A., Sukhov B.G., Rai M.K., Shurygin M.G., Umanets V.A., Lesnichaya M.V., Kon'kova T.V., Shurygin D.M. *Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya*, 2015, vol. 79, no. 2, pp. 297–299, DOI: 10.7868/S036767651502009X. (in Russ.).
- Yang X., Yang M., Pang B., Vara M., Xia Y. *Chemical Reviews*, 2015, vol. 115, no. 19, pp. 10410–10488, DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00193.
- Kolesnikova L.I., Karpova Ye.A., Vlasov B.Ya., Sukhov B.G., Trofimov B.A. *Byullyuten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 2015, vol. 159, no. 2, pp. 183–187, DOI: 10.1007/s10517-015-2928-3. (in Russ.).
- Perfil'yeva A.I., Nozhkina O.A., Graskova I.A., Sidorov A.V., Lesnichaya M.V., Aleksandrova G.P., Dolmaa G., Klimenkov I.V., Sukhov B.G. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*, 2018, no. 1, pp. 157–163, DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-626-629. (in Russ.).
- Perfileva A.I., Zhivet'yev M.A., Gasisova A.V., Borovskii G.B., Graskova I.A., Sukhov B.G., Trofimov B.A. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2016, vol. 12, no. 2, pp. 11–16.
- Papkina A.V., Perfil'yeva A.I., Zhivet'yev M.A., Borovskiy G.B., Graskova I.A., Lesnichaya M.V., Klimenkov I.V., Sukhov B.G., Trofimov B.A. *Doklady akademii nauk*, 2015, vol. 461, no. 2, pp. 239–241, DOI: 10.7868/S0869565215030305. (in Russ.).
- Papkina A.V., Perfileva A.I., Zhivet'yev M.A., Borovskii G.B., Graskova I.A., Klimenkov I.V., Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Trofimov B.A. *Nanotechnologies in Russia*, 2015, vol. 10, no. 5–6, pp. 484–491, DOI: 10.1134/S1995078015030131.
- Perfileva A.I., Moty'leva S.M., Klimenkov I.V., Graskova I.A., Skhov B.G., Trofimov B.A. *Nanotechnologies in Russia*, 2017, vol. 12, no. 9–10, pp. 553–558, DOI: 10.1134/S1995078017050093.
- Romanenko A.S., Riffel A.A., Graskova I.A., Rachenko M.A. *Journal of Phytopathology*, 1999, vol. 147, no. 11–12, pp. 679–686, DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.00450.x.
- Roozen N.J.M., van Vuurde J.W.L. *Journal of Plant Pathology*, 1991, vol. 97, no. 5, pp. 321–334.
- Florack D.E., Visser B., de Vries P.M., van Vuurde J.W.L., Stiekema W.J. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1993, vol. 99, no. 5–6, pp. 259–268.
- Shaginyan I.A., Danilina G.A., Chernukha M.YU., Alekseyeva G.V., Batov A.B. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 2007, no. 1, pp. 3–8. (in Russ.).
- Patent 2557992 (RU). 2015. (in Russ.).
- Shurygina I.A., Rodionova L.V., Shurygin M.G., Sukhov B.G., Kuznetsov S.V., Popova L.G., Dremina N.N. *Iz-vestiya RAN. Seriya fizicheskaya*, 2015, vol. 79, no. 2, pp. 280–282, DOI: 10.7868/S0367676515020271. (in Russ.).
- Rodionova L.V., Shurygina I.A., Sukhov B.G., Popova L.G., Shurygin M.G., Artem'yev A.V., Pogodayeva N.N., Kuznetsov S.V., Gusarova N.K., Trofimov B.A. *Zhurnal obshchey khimii*, 2015, vol. 85, no. 2, pp. 314–316, DOI: 10.1134/S1070363215020218. (in Russ.).
- Boyarkin A.N. *Biokhimiya*, 1951, vol. 16, pp. 352–355. (in Russ.).
- Bogino P.C., Oliva M. de las M., Sorroche F.G., Giordano W. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, vol. 30, no. 14(8), pp. 15838–15859, DOI: 10.3390/ijms140815838.
- Rakhmatulina M.R., Nechayeva I.A. *Vestnik dermatologii i venerologii*, 2015, no. 2, pp. 58–62, DOI: 10.25208/0042-4609-2015-0-2-58-62. (in Russ.).
- Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. *Mikrobnyye bioplenki v klinicheskoy mikrobiologii i antibakterial'noy terapii*. [Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy]. Vitebsk, 2017, 300 p. (in Russ.).
- Velmourougane K., Prasanna R., Saxena A.K. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, vol. 57, no. 7, pp. 548–573, DOI: 10.1002/jobm.201700046.
- Danhorn T., Fuqua C. *Annual Review of Microbiology*, 2007, vol. 61, pp. 401–422, DOI:10.1146/annurev-micro.61.080706.093316.
- Dubrovina V.I., Medvedeva S.A., Vityazeva S.A., Kolesnikova O.B., Aleksandrova G.P., Gutsol L.O., Grishchenko L.A., Chetveryakova T.D. *Struktura i immunomoduliruyushcheye deystviye arabinogalaktana listvennitsy sibirskoy i yego metalloproduktov*. [Structure and immunomodulatory effect of arabinogalactan of Siberian larch and its metal derivatives]. Irkutsk, 2007, 145 p. (in Russ.).
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. *Plant Cell. And Environment*, 2012, vol. 35, no. 2, pp. 259–270, DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.

28. Lehmann S., Serrano M., L'Haridon F., Tjamos S.E., Metraux J.P. *Phytochemistry*, 2015, vol. 112, pp. 54–62, DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.08.027.
29. Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. *Plant Journal*, 2017, vol. 90, no. 5, pp. 856–867, DOI: 10.1111/tpj.13299.
30. Liebthal M., Dietz K.J. *Methods in Molecular Biology*, 2017, vol. 1631, pp. 23–39, DOI: 10.1007/978-1-4939-7136-7_2.

Received December 13, 2018

Revised January 11, 2019

Accepted January 31, 2019

For citing: Graskova I.A., Perfileva A.I., Nozhkina O.A., Dyakova A.V., Nurminsky V.N., Klimenkov I.V., Sudakov N.P., Borodina T.M., Aleksandrova G.P., Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Trofimov B.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 345–354. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019034794.