

ВЛИЯНИЕ НАНО-ФЕРРИТА ЦИНКА НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСА IN VITRO

Гвоздиков А. М.¹, Поливанова О. Б.², Федорова Д. Г.¹¹Оренбургский государственный университет²РГАУ-МСХАanastasiaporv@mail.ru

Исследование посвящено биосинтезированным наночастицам (НЧ) феррита цинка ($ZnFe_2O_4$) в аспекте влияния на индукцию каллуса и регенерацию побегов культур базилика (*Ocimum basilicum* L.) *in vitro*. Полученные растительные культуры *in vitro* вызывают все больший интерес во всем мире из-за их потенциала как элиситоров вторичных метаболитов с антиоксидантными свойствами. В настоящем исследовании различные концентрации НЧ $ZnFe_2O_4$ и регуляторов роста растений (цитокинов и ауксинов) были добавлены к культурам *in vitro* для устойчивого производства биомассы каллусных культур базилика *O. basilicum*. Мелкодисперсные порошки феррита цинка $ZnFe_2O_4$ (диаметром менее ~50 нм) получали биологическим способом (методом «зеленого» синтеза) в щелочной среде из водного экстракта петрушки *Petroselinum crispum*.

Каллус, полученный из листовых и стеблевых эксплантов растений базилика душистого (*O. basilicum*) различных сортов (*Русский гигант зеленый*, *Русский гигант фиолетовый*, *Василиск* и *Ереванский сапфир*) («Гавриш», Россия), был получен на средах MS (Мурасиге-Скута) с различными концентрациями и соотношением ауксинов – дихлорфеноксиуксусной (2,4-Д) и β -индолилуксусной кислот (ИУК), и цитокининов (БАП): 1 мг/л 2,4-Д; 2 мг/л 2,4-Д; 3 мг/л 2,4-Д; 3мг/лБАП+0,3мг/лИУК. НЧ $ZnFe_2O_4$ использовали в концентрациях 12,5, 25 и 50 мкг/л, при введении в питательную среду которые предварительно диспергировали ультразвуком в течение 4 ч. После автоклавирования и перед использованием среды также проводилась обработка ультразвуком в течение 2 ч. Контролем служила среда без добавления НЧ $ZnFe_2O_4$. Эксперимент проводился в 3-кратной повторности. Фиксация наблюдений проводилась в течение 1 пассажа (30 дней). Проводилось микроскопирование клеток каллуса. Определяли сухую и сырую биомассу, жизнеспособность, ЖС (окрашивание клеток синькой Эванса в камере Горяева и подсчет мертвых и жизнеспособных клеток) и рассчитывали индекс роста. Образцом для эксперимента был выбран каллус, полученный из растений сорта Русский гигант фиолетовый на среде MS+2 мг/л 2,4-Д (первичный эксплант – стебли). Данный вариант был выбран в связи с самой высокой ЖС и типичности каллуса для данного сорта.

В результате проведенных исследований установлено, что самая высокая ЖС наблюдалась в контрольном варианте (MS+2 мг/л 2,4-Д) на первичных эксплантах растений сорта Русский гигант фиолетовый. В свою очередь, при добавлении НЧ $ZnFe_2O_4$, во всех вариантах, ЖС клеток каллуса снижалась. Существенных различий между контролем и средой с добавлением 12,5 мкг/л НЧ $ZnFe_2O_4$ не наблюдалось. Существенных различий в накоплении сухой биомассы между всеми вариантами и контролем не установлено. Наибольший индекс роста наблюдался в варианте среды MS+2 мг/л 2,4-Д + 25 мкг/л НЧ, наименьший – MS+2 мг/л 2,4-Д + 50 мкг/л НЧ.

Установлено, что сочетание 25 мкг/л $ZnFe_2O_4$ с MS и 2 мг/л 2,4-Д приводило к пролиферации каллуса, который был более однороден по сравнению с другими вариантами сред, более антоциан-окрашен, самый крупный и по своему виду очень схож с контролем (MS + 2 мг/л 2,4-Д). Применение $ZnFe_2O_4$ именно в дозе 25 мкг/л индуцировало максимальный прирост сырой биомассы ($1,50 \pm 0,06$ г) и наибольший индекс роста (3,55) каллусов по сравнению со всеми опытными вариантами, при этом для получения жизнеспособных каллусных линий необходимо присутствие в MS- среде ауксина (2,4-Д). Каллус, полученный на среде с добавлением 50 мкг/л НЧ $ZnFe_2O_4$, получился рыхлым, а на среде с добавлением 12,5 мкг/л НЧ $ZnFe_2O_4$, наоборот – плотным.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда No 23-76-10060.

Ключевые слова: «зеленый» синтез, феррит цинка, каллусогенез, базилик

EFFECT OF ZINC FERRITE NANOPARTICLES ON CALLUS INDUCTION IN VITRO

Gvozdikova A. M.¹, Polivanova O. B.², Fedorova D. G.¹¹Orenburg State University²RSAU-MTAAanastasiaporv@mail.ru

The study is devoted to biosynthesized zinc ferrite nanoparticles (NPs) (ZnFe_2O_4) in terms of their effect on callus induction and shoot regeneration of basil (*Ocimum basilicum* L.) crops in vitro. The obtained plant cultures in vitro are of increasing interest worldwide due to their potential as elicitors of secondary metabolites with antioxidant properties. In the present study, different concentrations of ZnFe_2O_4 NPs and plant growth regulators (cytokines and auxins) were added to in vitro cultures for sustainable production of basil callus culture biomass *O. basilicum*.

Fine zinc ferrite ZnFe_2O_4 powders (less than ~50 nm in diameter) were obtained biologically (by the "green" synthesis method) in an alkaline medium from an aqueous extract of parsley *Petroselinum crispum*. Callus obtained from leaf and stem explants of sweet basil (*O. basilicum*) plants of different varieties (Russian Giant Green, Russian Giant Purple, Basilisk and Yerevan Sapphire) (Gavrish, Russia) was obtained on MS (Murashige-Skoog) media with different concentrations and ratios of auxins – 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and β -indoleacetic acids (IAA), and cytokinins (BAP): 1 mg/L 2,4-D; 2 mg/L 2,4-D; 3 mg/L 2,4-D; 3 mg/L BAP + 0.3 mg/L IAA. ZnFe_2O_4 NPs were used in concentrations of 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/l}$, when introduced into the nutrient medium, which was preliminarily dispersed by ultrasound for 4 hours. After autoclaving and before use, the medium was also sonicated for 2 hours. The medium without the addition of ZnFe_2O_4 NPs served as a control. The experiment was carried out in triplicate. Observations were recorded for 1 passage (30 days). Microscopic examination of callus cells was carried out. Dry and wet biomass, viability, FS (cell staining with Evans blue in a Goryaev chamber and counting dead and viable cells) were determined, and the growth index was calculated. Callus obtained from plants of the Russian Giant Violet variety on MS+2 mg/l 2,4-D medium (primary explant - stems) was chosen as a sample for the experiment. This variant was chosen due to the highest FS and typicality of callus for this variety.

As a result of the conducted studies, it was established that the highest FS was observed in the control variant (MS + 2 mg / l 2,4-D) on primary explants of plants of the Russian Giant Violet variety. In turn, with the addition of ZnFe_2O_4 NPs, in all variants, the FS of callus cells decreased. No significant differences were observed between the control and the medium with the addition of 12.5 $\mu\text{g/l}$ ZnFe_2O_4 NPs. No significant differences in the accumulation of dry biomass were found between all variants and the control. The highest growth index was observed in the medium variant MS + 2 mg/l 2,4-D + 25 $\mu\text{g/l}$ NPs, the lowest - MS + 2 mg/l 2,4-D + 50 $\mu\text{g/l}$ NPs. It was found that the combination of 25 $\mu\text{g/l}$ ZnFe_2O_4 with MS and 2 mg/l 2,4-D resulted in the proliferation of callus, which was more uniform compared to other media variants, more anthocyanin-colored, the largest and very similar in appearance to the control (MS + 2 mg/l 2,4-D). The use of ZnFe_2O_4 exactly at a dose of 25 $\mu\text{g/l}$ induced the maximum increase in raw biomass (1.50 ± 0.06 g) and the highest growth index (3.55) of calli compared to all experimental variants, while the presence of auxin (2,4-D) in the MS medium is necessary to obtain viable callus lines. The callus obtained on the medium with the addition of 50 $\mu\text{g/l}$ ZnFe_2O_4 NPs turned out to be loose, and on the medium with the addition of 12.5 $\mu\text{g/l}$ ZnFe_2O_4 NPs, on the contrary, it was dense.

The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 23-76-10060, <https://rscf.ru/project/23-76-10060/>

Keywords: "green" synthesis, zinc ferrite, callusogenesis, basil