

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ НА РОСТ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Ю. В. КИРИСЮК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК²⁾

¹⁾Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина,
бул. Космонавтов, 21, 224016, г. Брест, Республика Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Отмечено, что выброс металлсодержащих наночастиц в окружающую среду неуклонно растет, что связано с прогрессирующим их использованием в составе новых материалов и продуктов. По некоторым оценкам, в развитых странах мира концентрация отдельных металлсодержащих наночастиц может достигать 8–10 мг/л на 1 кг сырой почвы, а это обуславливает необходимость оценки их влияния на живые системы и в первую очередь на растения как доминирующую форму жизни на планете и важнейший восполняемый природный ресурс. Проанализировано влияние наночастиц меди, введенных в среду выращивания, на процессы каллусогенеза в незрелых зародышах *Triticum aestivum* L. Данная экспериментальная система позволяет протестировать воздействие наночастиц на рост регенеративных и защитных тканей растения. Определено, что введение в среду медных наночастиц в концентрации свыше 100 мг/л ингибирует формирование первичного каллуса и подавляет прорастание незрелых зародышей пшеницы. Наночастицы меди значительно снижали удельную скорость роста и время удвоения биомассы каллусной культуры, данный эффект имел дозозависимый характер, усиливаясь при больших концентрациях их в среде. Макрочастицы меди вызывали меньшие по силе воздействия эффекты, чем наночастицы. Установлено, что наночастицы меди обладают высокой токсичностью и могут негативно влиять на развитие регенеративных и защитных тканей растения.

Ключевые слова: наночастицы меди; пшеница; незрелые зародыши; каллус.

Благодарность. Работа проводилась в рамках проектов «Установление роли запрограммированной клеточной гибели в ответной реакции корня пшеницы на воздействие наночастиц меди» (2016–2018), № ГР 20163145 (научный руководитель – Ю. В. Кирисюк), и «Установление сигнальной роли экзогенного аскорбата в клетках корня высших растений» (2015–2017), № ГР 20151026 (научный руководитель – В. В. Демидчик), Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований. Работа также финансировалась Министерством образования Республики Беларусь и государственной программой научных исследований «Конвергенция-2020» в рамках подпрограммы «Объединение» (2016) по заданию «Разработка “зеленых” технологий синтеза наночастиц серебра на основе растительных экстрактов и тестирование их биоцидной активности» (научный руководитель – В. В. Демидчик).

Образец цитирования:

Кирисюк Ю. В., Демидчик В. В. Влияние наночастиц меди на рост каллусной культуры, полученной из незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 23–30.

For citation:

Kirysiuk Y. V., Demidchik V. V. Effect of copper nanoparticles on growth of calluses culture from immature embryos of *Triticum aestivum* L. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 23–30 (in Russ.).

Авторы:

Юлия Викторовна Кирисюк – преподаватель кафедры зоологии и генетики биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Yuliya Kirysiuk, lecturer at the department of zoology and genetics, faculty of biology.

kirysukyuliya@gmail.com

Vadzim Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

EFFECT OF COPPER NANOPARTICLES ON GROWTH OF CALLUSES CULTURE FROM IMMATURE EMBRYOS OF *TRITICUM AESTIVUM* L.

Y. V. KIRYSIUK^a, V. V. DEMIDCHIK^b

^aBrest State University named after A. S. Pushkin, boulevard Cosmonauts, 21, 224016, Brest, Republic of Belarus

^bBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: dzemidchik@bsu.by

Soil levels of metal-containing nanoparticles progressively increase. This is caused by development of nanotechnology and constantly increasing use of nanoparticles in new materials and products. Based on some estimates, the level of some metal-containing nanoparticles can reach 8–10 mg/l per kg of fresh soil in the USA and some other countries. Thus, it is important to evaluate the impact of metal-containing nanoparticles on plants, which are dominating group of organisms on our planet. Moreover the analysis of influence of metal-containing nanoparticles on growth rate and productivity of plants has a practical importance for agriculturists and ecologists. In this study, we tested the effect of copper nanoparticles added to growing medium on callus induction from immature embryos of *Triticum aestivum* L. This experimental system allows evaluating the nature of nanoparticle-induced changes in plant regenerative and protective tissues. We have found that copper nanoparticles at concentrations above 100 mg/l inhibited formation of primary calluses and germination of immature wheat embryos. In the presence of copper nanoparticles (100 mg/l), callus growth rate and the doubling time of callus biomass decreased twice. Copper bulk particles, which were used in control tests, induced less pronounced inhibition of callus growth. Obtained data demonstrated that copper nanoparticles are toxic for higher plants affecting development of regenerative and protective tissues.

Key words: copper nanoparticles; wheat; immature embryos; callus.

Acknowledgements. This study was carried out as a part of projects «Determination of the role of programmed cell death in wheat root response to copper nanoparticles» (2016–2018), state registration number 20163145 (supervisor – Y. V. Kirisiuk), and «Establishing signalling role of exogenous ascorbate in plant root cells» (2015–2017), state registration number 20151026 (supervisor – V. V. Demidchik), funded by Belarusian republican foundation for fundamental research. It was also supported by Belarusian ministry of education and State research program scheme «Conversion» (section «Connection»), grant title «Creation of green technologies for silver nanoparticle synthesis based on plant extracts and testing their biocide activity» (supervisor – V. V. Demidchik).

Введение

Неорганические наноматериалы находят все более широкое применение во многих отраслях промышленности, сельского хозяйства и медицины [1; 2]. Применительно к биологическим системам они используются в биоцидных целях – для обеззараживания среды, медицинского и биотехнологического оборудования, удобрений, тканей и пластиков, материалов пищевой упаковки, добавок к кормам и др. Одними из наиболее часто используемых в промышленности являются медные наночастицы [3], доля которых в общем производстве наночастиц и продуктов с их использованием постоянно увеличивается. Медные наночастицы обладают мощнейшей биоцидной активностью и считаются высокоперспективными для практического использования в области разработки антигрибковых и антибактериальных препаратов. Однако широкое применение медных наночастиц в промышленности должно сопровождаться исследованиями их токсического воздействия и адекватной оценкой соответствующей токсикологической опасности для всех групп организмов.

Токсичность наночастиц связывают с малыми размерами (1–100 нм), благодаря которым они обладают исключительно высокими каталитическими характеристиками, адгезивными свойствами, а также легче проникают в клетку, чем макрочастицы (балк) [4; 5]. Накопление наночастиц в клетках и тканях растений и животных приводит к передаче их по пищевой цепи в организм человека [6]. На примере медных наночастиц установлено, что физиологическая токсичность для животных и растений возрастает с уменьшением размеров наночастицы, увеличением времени экспозиции и концентрации в среде [7]. В настоящее время существуют экспериментальные доказательства повреждающего влияния наночастиц меди на стабильность ДНК и фотосинтетический аппарат у сельскохозяйственных растений [8]. Однако воздействие данных экотоксикантов на многие важнейшие физиологические процессы, такие как формирование регенеративных и защитных тканей, все еще остается неизученным.

Основную роль в обеспечении населения Земли продовольствием и первичной биомассой играет культивирование злаков, среди которых в Европе важнейшим является пшеница. В Беларуси пшеница также занимает лидирующую роль в сельскохозяйственном производстве. Оценки, проведенные в США, показывают, что нанозагрязнение почв негативно сказывается на культивировании пшеницы [9–11]. Несмотря на то что медь – это ключевой микроэлемент для пшеницы и других злаков, в высоких дозах

она представляет собой опасный токсикант, вызывающий окислительный стресс и повреждения мембран [12]. Таким образом, представляется актуальным протестировать воздействие наночастиц меди на растения пшеницы белорусской селекции.

Другой аспект, связанный с исследованием воздействия наночастиц металлов на злаковые культуры, – это научно обоснованная оценка эффективности применения наночастиц микроудобрений. В последние годы в Беларуси были разработаны так называемые наночастицы, которые позиционируются как высокоэффективные средства увеличения урожая. Поскольку в мире подобных разработок пока не проводится, встает вопрос глубокого и стандартизированного анализа эффективности наночастиц на всех уровнях организации растений. Принципиально важно, чтобы дозы внесения таких удобрений разрабатывались с учетом токсико-физиологических тестов на растительном материале. Пшеница классически считается растением, высоко отзывчивым к меди [13; 14]. В связи с этим оценка потенциальных рисков токсического влияния наночастиц меди имеет большое значение. Необходимо проведение для меди сравнительного анализа токсичности наночастиц и балка.

Модельной системой регенерации поврежденных тканей является каллус, полученный из меристематических тканей. При выделении его из зародышей он также отражает регенерационный потенциал эмбрионов. В связи с этим в настоящей работе были исследованы эффекты воздействия наночастиц меди и медного балка как потенциальных модификаторов физиологических процессов в растении на формирование каллусной ткани и показатели роста культуры зародышей пшеницы.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были растения яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Дарья. Для получения каллусной ткани использовали метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы [15], которые обладают высокой отзывчивостью к условиям культивирования *in vitro*. Согласно литературным данным морфогенный потенциал каллуса на основе незрелых зародышей пшеницы зависит от стадии развития зародыша: он максимален на 15–16-е сутки после опыления [16; 17].

Для получения каллусов колосья растений, выращенных в полевых условиях, срезались на 15–16-е сутки после опыления и помещались в условия пониженной температуры (+2 °C) на 24 ч. Стерилизация зерновок пшеницы проводилась при помощи 30 % гипохлорита натрия (7 мин) с последующим трехкратным отмывом в стерильной дистиллированной воде. Незрелые зародыши вырезались скальпелем из зерновки и помещались на агаризованную стерильную 100 % среду Мурашиге и Скуга (МС) с витаминами [18], содержащую также 0,6 % микробиологического агара, 3 % сахарозы, 150 мг/л L-глутамин и 2 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты), pH составлял 5,6–5,8. Экспланты культивировались в термостате при постоянной температуре 26 °C в течение 30 сут.

В экспериментах использовались сертифицированные наночастицы меди диаметром 38 ± 4 нм (MTI Corporation, США) и медный балк с диаметром частиц около 70 мкм (Sigma, США). Суспензии наночастиц и балка готовились при помощи ультразвукового диспергирования с применением соникатора Digital Ultrasonic Cleaner JeKen PS-08 A (40 кГц) (Китай) в течение 15 мин. В вариантах опыта концентрация наночастиц меди и балка в питательной среде была следующей: 1; 5; 20; 100; 500 мг/л. Для Cu^{2+} диапазон исследуемых концентраций составил 0,1–1000,0 мкмоль/л.

Частота индукции каллусообразования определялась как соотношение количества эксплантов, продуцирующих каллус, с общим количеством высаженных эксплантов. Для изучения динамики прироста биомассы определялся индекс (I) роста каллусов пшеницы. Данный показатель рассчитывался по формуле

$$I = (m_{\max} - m_0) / m_0,$$

где m_0 – исходная масса каллуса, г; m_{\max} – масса каллуса непосредственно перед его пассированием, г [19]. Каллусная ткань взвешивалась на 10, 20, 30-е сутки.

Удельная скорость роста рассчитывалась по формуле

$$V = (m_t - m_0) / \Delta t \cdot m_0,$$

где m_0 – начальная масса каллуса, г; m_t – масса каллуса в конце цикла выращивания, г; t – продолжительность культивирования, сут.

Время удвоения биомассы рассчитывалось по формуле

$$\mu = \ln 2 / V,$$

где V – удельная скорость роста.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы MS Excel 2007 (Microsoft, США). Достоверность определена с помощью t -критерия Стьюдента. Данные

представлены в виде $X \pm S_x$, где X – среднее арифметическое значение показателя; S_x – ошибка среднего арифметического [20].

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе тестирования наночастиц меди изучалось их влияние на индукцию каллусогенеза (таблица). При культивировании незрелых зародышей пшеницы на 10-е сутки формирование каллусов происходило как в контрольных условиях, так и во всех вариантах обработки – медными наночастицами, балком и ионами меди (см. таблицу). Более активный, чем в контроле, рост каллусов был отмечен на питательных средах, в которые вводились медные наночастицы или балк в концентрациях 1; 5 и 20 мг/л, а также Cu^{2+} в концентрации менее 10 мкмоль/л. Этот эффект интересен с точки зрения минерального питания растений и оценки целесообразности внесения медных удобрений в наноформе. Частота каллусообразования была минимальной при обработке 1 ммоль/л Cu^{2+} ($5 \pm 5\%$), в то время как даже очень высокие уровни медных наночастиц и балка не вызывали полного подавления этого процесса ($75,0 \pm 8,7$ и $35,0 \pm 10,4\%$ соответственно).

Влияние состава питательной среды на формирование каллусной культуры *Triticum aestivum* L.
The effect of medium composition on formation of *Triticum aestivum* L. callus culture

Состав среды	Количество незрелых зародышей, шт.	Количество полученных каллусов, шт.	Частота каллусообразования, % ($X \pm S_x$)	Частота прорастания незрелых зародышей, % ($X \pm S_x$)
Контрольные условия: среда МС, 0,6 % агар, 3 % сахара, 150 мг/л L-глутамин*	113	113	100	$39,8 \pm 4,6$
Медные наночастицы, мг/л:				
1	60	60	100	$18,3 \pm 4,4^{**}$
5	60	60	100	$41,7 \pm 1,7$
20	116	116	100	$20,0 \pm 4,5^{**}$
100	61	60	$98,3 \pm 1,7$	$5,0 \pm 2,9^{**}$
500	60	45	$75,0 \pm 8,7$	0
Медный балк, мг/л:				
1	61	61	100	$29,6 \pm 3,2$
5	60	60	100	$38,3 \pm 4,4$
20	60	60	100	$33,3 \pm 1,7$
100	59	59	$98,3 \pm 1,7$	$16,9 \pm 1,6^{**}$
500	60	60	$35,0 \pm 10,4$	0
Cu^{2+} , мкмоль/л:				
0,1	60	60	100	$40,0 \pm 2,89$
1,0	60	60	100	$36,7 \pm 8,82$
10,0	40	40	100	$32,5 \pm 2,5$
100,0	61	61	100	$27,9 \pm 4,34$
1000,0	50	3	5 ± 5	0

*Среда, использованная в контрольных опытах, – базовая для тестов с наночастицами, балком и ионами меди; **достоверно при $p \leq 0,05$.

*This medium that was used as basic medium in control and nanoparticle, bulk and copper ion tests; **significant at $p \leq 0.05$.

Таким образом, каллусообразование слабо подвергалось негативному воздействию наночастиц меди. В то же время вероятность прорастания незрелых зародышей была многократно ниже при обработке медными наночастицами по сравнению с частицами балка (см. таблицу). В проведенных опытах установлено, что 500 мг/л медных наночастиц (рис. 1) или балка, так же как и 1 ммоль/л Cu^{2+} , полностью подавляли прорастание незрелых зародышей.

Следующим этапом тестирования медных частиц было изучение их воздействия на рост каллусной ткани пшеницы (рис. 2). Наиболее высокие показатели индекса роста, удельной скорости роста и наименьшее время удвоения биомассы были характерны для каллусов, культивируемых на питательных

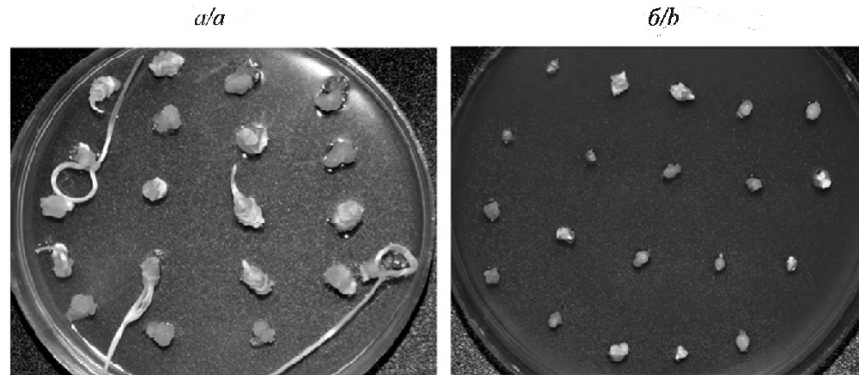


Рис. 1. Незрелые зародыши пшеницы при культивировании в течение 10 сут на различных средах: а – среда МС (контроль); б – среда МС с добавлением 500 мг/л наночастиц меди. Диаметр чашки – 90 мм

Fig. 1. Immature wheat embryos after cultivation during 10 days on different media: а – MS (control); б – MS, 500 mg/l Cu nanoparticles. The diameter of Petri dish – 90 mm

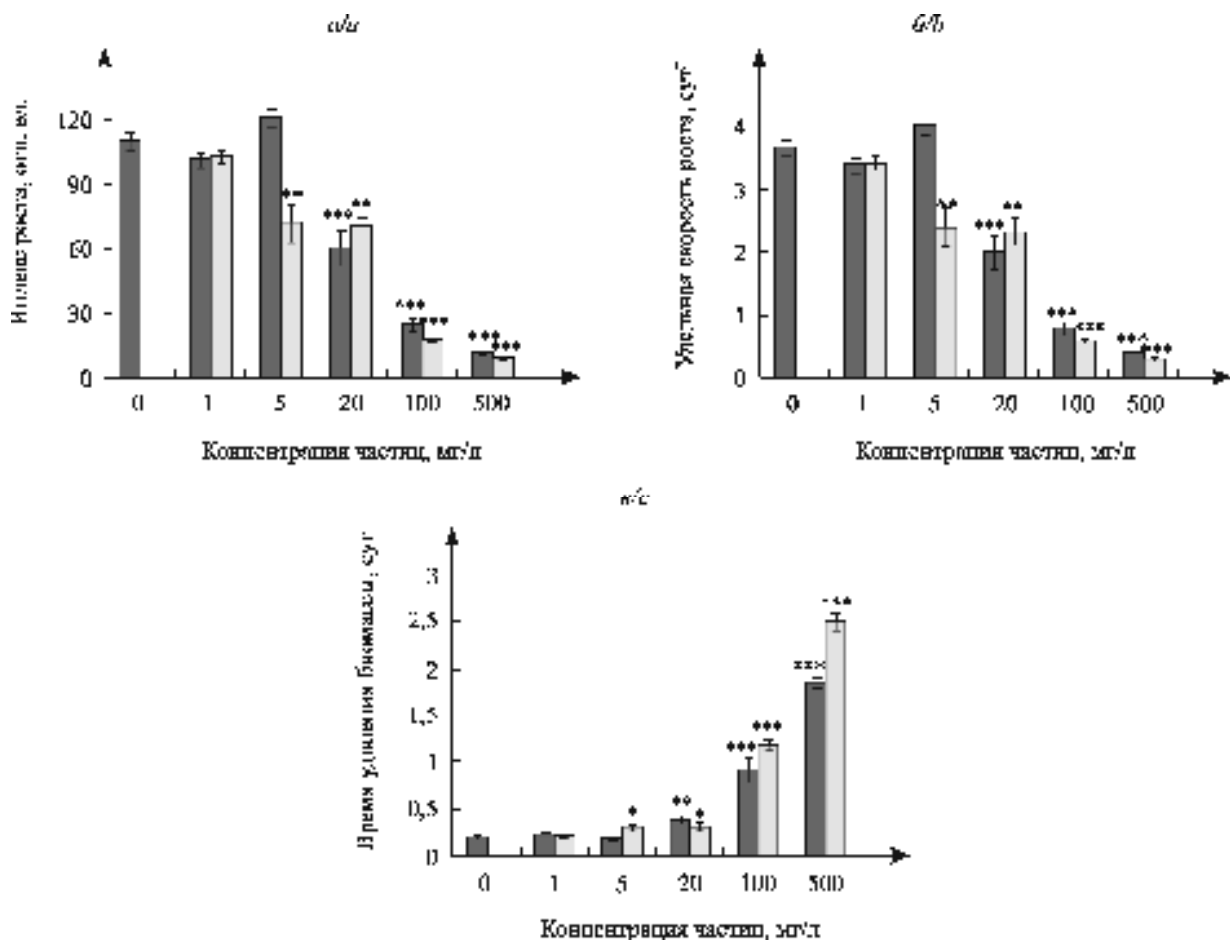


Рис. 2. Зависимость показателей роста каллусной культуры *Triticum aestivum* L. от концентрации медных частиц в питательной среде: а – индекса роста; б – удельной скорости роста; в – времени удвоения биомассы.

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. □ – наночастицы; ■ – балк

Fig. 2. Growth parameters of *Triticum aestivum* L. callus culture measured at different concentrations of Cu nanoparticles and bulk: а – index of the growth; б – specific growth rate; в – time of doubling biomass.

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. □ – nanoparticles; ■ – bulk

средах, дополненных наночастицами меди в концентрации 5 мг/л. Полученные значения существенно отличались от данных, зарегистрированных для медного балка, что указывает на специфический характер влияния наночастиц. Сильное ингибирование удельной скорости роста и других ростовых показателей наблюдалось при высоких уровнях наночастиц в среде (свыше 100 мг/л). В этом случае относительно контрольных значений ростовые процессы замедлялись на 85–95 %.

Определение времени удвоения биомассы каллусной культуры *Triticum aestivum* L. на средах с различным содержанием медных наночастиц почти во всех вариантах опыта показало достоверные различия между средними значениями данного показателя. Необходимо отметить, что время удвоения биомассы каллуса коррелирует с содержанием медных частиц в питательной среде. Так, наименьшее время требуется для удвоения биомассы каллусов, выращенных на среде с добавлением медных наночастиц и балка в концентрации 1 мг/л, что составляет 0,21 и 0,2 сут соответственно. Наибольшее время необходимо для удвоения биомассы каллусов, культивируемых на среде, дополненной высокими концентрациями медных наночастиц. При добавлении в питательную среду 500 мг/л наночастиц данный показатель превышает контрольные значения почти в 10 раз.

При введении в среду культивирования ионов меди в различных концентрациях наблюдалась тенденция уменьшения исследуемых параметров при увеличении содержания меди в среде (рис. 3). Близкие к контрольным (0) значения зарегистрированы при добавлении в среду 0,1 и 1,0 мкмоль/л Cu^{2+} . Достоверное уменьшение средних показателей индекса роста (см. рис. 3, а) и удельной скорости роста (см. рис. 3, б) наблюдалось при культивировании каллусной культуры на среде, содержащей 10,0; 100,0 и 1000,0 мкмоль/л ионов меди. Рост каллусной культуры замедлялся при введении в среду 1000,0 мкмоль/л Cu^{2+} , при этом время удвоения биомассы (см. рис. 3, в) увеличилось в 16,5 раза по сравнению с контролем.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых также было продемонстрировано сильное ингибирующее действие наночастиц меди на скорость набора биомассы растения *Cucurbita pepo* [21]. Следует отметить, что хорошо изучено воздействие на растения некоторых

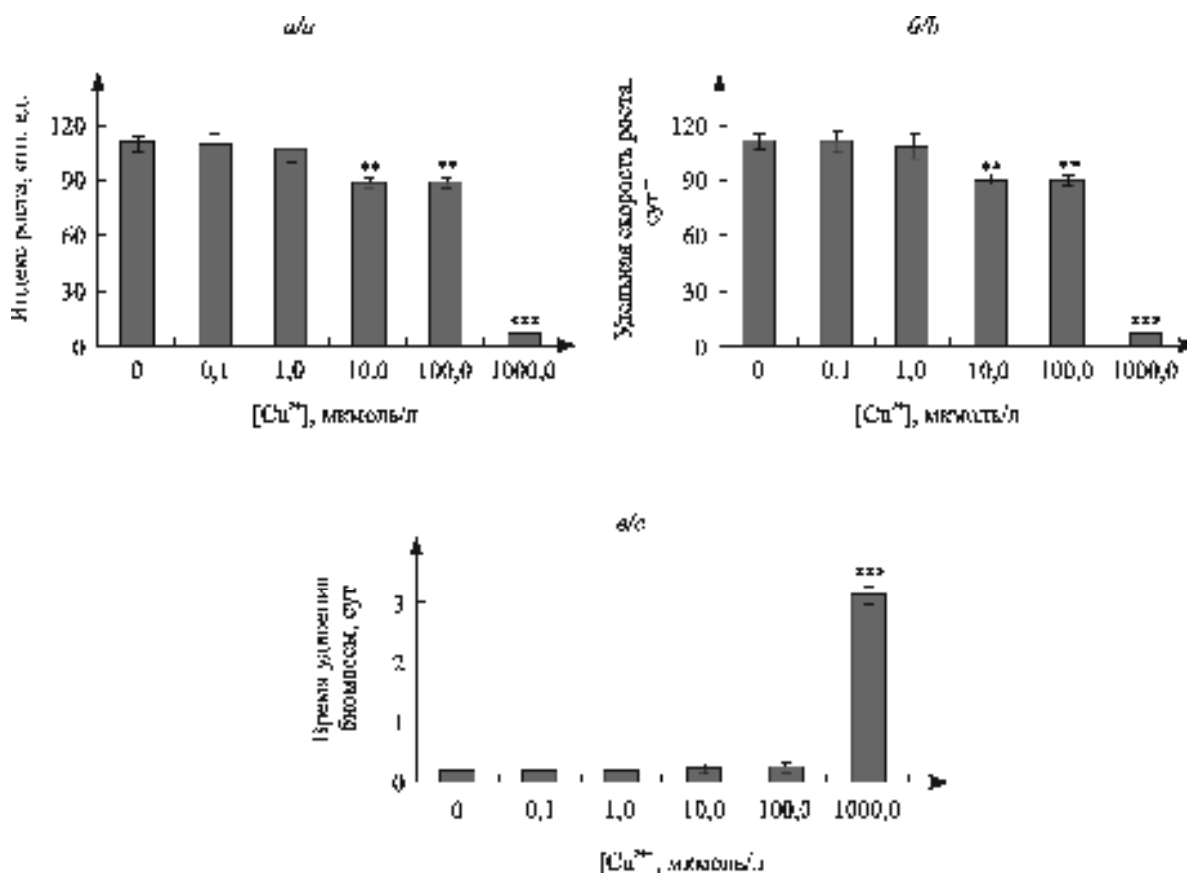


Рис. 3. Изменение роста каллусной культуры *Triticum aestivum* L. при введении в среду выращивания Cu^{2+} в различных концентрациях:

а – индекса роста; б – удельной скорости роста; в – времени удвоения биомассы. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Fig. 3. Growth parameters of *Triticum aestivum* L. callus culture measured at different concentrations of Cu^{2+} in medium: а – index of the growth; б – specific growth rate; в – time of doubling biomass. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

других наноматериалов, таких как нанокристаллы и углеродные нанотрубки, которые демонстрируют выраженное токсическое влияние на клетки каллусных и суспензионных культур *Medicago sativa* и *Arabidopsis thaliana* [22; 23]. Концентрационный диапазон токсического воздействия медных наночастиц был значительно ниже, чем для изученного ранее негативного влияния серебряных наночастиц на растения арабидопсиса [24]. Токсическое влияние медных наночастиц на растения потенциально может быть связано как с постепенной утечкой металла в ионной форме – Cu^{2+} , так и с воздействием металлической наноформы, способной к ранее неизвестным реакциям, таким как активация механочувствительных ионных каналов, катализирующих чрезмерную загрузку в клетки корня ионов кальция, или подавление фотосинтетических реакций в результате снижения эффективности усвоения квантов света фотосистемой II [24]. Введение 1 ммоль/л Cu^{2+} вызывало воздействие, близкое по силе к наночастицам меди (см. таблицу, рис. 1 и 2), что указывает на специфичность влияния именно металлической наноформы, так как утечка Cu^{2+} даже при концентрации наночастиц 1 г/л не превышает 0,001 % их массы за 1 ч при интенсивном перемешивании суспензии [3; 5]. Балк тоже действовал довольно сильно, однако частицы, использованные в работе, также имели небольшие размеры. Близкое по силе воздействие нано- и макрочастиц показывает, что его эффекты могут быть обусловлены контактом металлической формы меди и балка, а не ионами меди.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлен характер влияния наночастиц меди в составе питательной среды на индукцию каллусогенеза и ростовые показатели каллусной культуры пшеницы. Выявлена разнонаправленная реакция каллусов на действие наночастиц меди и медного балка. На среде культивирования, дополненной низкими концентрациями медных наночастиц, наблюдалось незначительное (статистически недостоверное – от 1 до 2 %) увеличение скорости роста и набора биомассы, в то время как высокие уровни наночастиц многократно снижали скорость роста и другие ростовые показатели. Примечательно, что эффекты наночастиц были сопоставимы с действием Cu^{2+} в концентрации 1 ммоль/л, а стимуляция роста ионами меди в низких концентрациях была выше, чем наночастицами. Интересен также факт, что в случае токсического эффекта низкие уровни Cu^{2+} действовали слабее, нежели наночастицы. Это указывает на особый, базирующийся на наносвойствах механизм токсического действия наночастиц меди на ткани пшеницы в условиях *in vitro*.

Библиографические ссылки

1. Lee W. M., An Y. J., Yoon H., et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water insoluble nanoparticles // Environ. Toxicol. Chem. 2008. Vol. 27, № 9. P. 1915–1921.
2. Mura S., Seddaiu G., Bacchini F., et al. Advances of nanotechnology in agro-environmental studies // IJA. 2013.
3. Anjum N. A., Adam V., Kizek R., et al. Nanoscale copper in the soil-plant system – toxicity and underlying potential mechanisms // Environ. Res. 2015. Vol. 138. P. 306–325.
4. Remedios C., Rosario F., Bastos V. Environmental nanoparticles interactions with plants: morphological, physiological, and genotoxic aspects // J. of Botany. 2012.
5. Christian P., von der Kammer F., Baalousha M., et al. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media // Ecotoxicology. 2008. Vol. 17, № 5. P. 326–343.
6. Gibaud S., Demoy M., Andreux J. P., et al. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs // J. Pharm. Sci. 1996. Vol. 85. P. 944–950.
7. Prabhu B. M., Ali S. F., Murdock R. C., et al. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat // Nanotoxicology. 2010. Vol. 4, № 2. P. 150–160.
8. Atha D. H., Wang H., Petersen E. J., et al. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models // Environ. Sci. Technol. 2012. Vol. 46, № 3. P. 1819–1827.
9. Gottschalk F., Nowack B. The release of engineered nanomaterials to the environment // J. Environ. Monitor. 2011. № 13. P. 1145–1155.
10. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions // Environ. Sci. Technol. 2009. Vol. 43, № 24. P. 9216–9222.
11. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis // Environ. Toxicol. Chem. 2010. Vol. 29, № 5. P. 1036–1048.
12. Демидчик В. В., Соколик А. И., Юрин В. М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи совр. биологии. 2001. Т. 12, № 5. С. 511–525.
13. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London, 1995.
14. Bergmann W. Nutritional disorders of plants – development, visual and analytical diagnosis. Jena, 1992.
15. Суханов В. М., Папазян Н. Д. Условия получения каллуса и регенерантов в культуре незрелых зародышей пшеницы // Апомиксис и цитозембриология растений. 1983. № 5. С. 124–128.
16. Круглова Н. Н., Катасонова А. А. Незрелый зародыш как морфогенетически компетентный эксплант // Физиология и биохимия культур растений. 2009. Т. 41, № 2. С. 124–131.

17. Круглова Н. Н. Периодизация развития зародыша пшеницы для биотехнологических исследований // Аграр. Россия. 2008. № 3. С. 20–22.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1968. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
19. Загребельный С. Н. Биотехнология : в 2 ч. Новосибирск, 2000. Ч. 1 : Культивирование продуцентов и очистка продуктов.
20. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. М., 1978.
21. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants // *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, № 24. P. 9473–9479.
22. Santos A. R., Miguel A. S., Tomaz L., et al. The impact of CdSe/ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture [Electronic resource]. 2010. URL: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/24> (date of access: 25.10.2016).
23. Lin C., Fugetsu B., Su Y., et al. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* suspension cells // *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 170, № 2/3. P. 578–583.
24. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants // *Plant J.* 2016. Vol. 85, № 2. P. 245–257.

References

1. Lee W. M., An Y. J., Yoon H., et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water insoluble nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. Vol. 27, No. 9. P. 1915–1921.
2. Mura S., Seddaiu G., Bacchini F., et al. Advances of nanotechnology in agro-environmental studies. *IJA.* 2013. DOI: 10.4081/ija.2013.e18.
3. Anjum N. A., Adam V., Kizek R., et al. Nanoscale copper in the soil-plant system – toxicity and underlying potential mechanisms. *Environ. Res.* 2015. Vol. 138. P. 306–325. DOI: 10.1016/j.envres.2015.02.019.
4. Remedios C., Rosario F., Bastos V. Environmental nanoparticles interactions with plants: morphological, physiological, and genotoxic aspects. *J. of Botany.* 2012. ID 751686. DOI: 10.1155/2012/751686.
5. Christian P., von der Kammer F., Baalousha M., et al. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology.* 2008. Vol. 17, No. 5. P. 326–343.
6. Gibaud S., Demoy M., Andreux J. P., et al. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J. Pharm. Sci.* 1996. Vol. 85. P. 944–950.
7. Prabhu B. M., Ali S. F., Murdock R. C., et al. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology.* 2010. Vol. 4, No. 2. P. 150–160.
8. Atha D. H., Wang H., Petersen E. J., et al. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 46, No. 3. P. 1819–1827.
9. Gottschalk F., Nowack B. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J. Environ. Monitor.* 2011. No. 13. P. 1145–1155. DOI: 10.1039/c0em00547a.
10. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, No. 24. P. 9216–9222. DOI: 10.1021/es9015553.
11. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R. W., et al. Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010. Vol. 29, No. 5. P. 1036–1048. DOI: 10.1002/etc.135.
12. Demidchik V. V., Sokolik A. I., Yurin V. M. The toxicity of excess copper and tolerance to it plants. *Successes of modern biology.* 2001. Vol. 12, No. 5. P. 511–525 (in Russ.).
13. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London, 1995.
14. Bergmann W. Nutritional disorders of plants – development, visual and analytical diagnosis. Jena, 1992.
15. Sukhanov V. M., Papazian N. D. Conditions for obtaining a callus and regenerated in the culture of immature embryos of wheat. *Apomixis and cytoembryology plants.* 1983. No. 5. P. 124–128 (in Russ.).
16. Kruglova N. N., Katasonova A. A. Immature wheat embryo as the morphogenetically competent explant. *Physiol. and biochem. of plants cult.* 2009. Vol. 41, No. 2. P. 124–131 (in Russ.).
17. Kruglova N. N. Periodization of wheat embryo germ for biotechnology research. *Agrarian Russia.* 2008. No. 3. P. 20–22 (in Russ.).
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1968. Vol. 15, No. 13. P. 473–497.
19. Zagrebelyi S. N. Biotechnology : in 2 parts. Novosibirsk, 2000. Part 1 : Cultivation of producers and cleaning products (in Russ.).
20. Rokitsky P. F. Biological Statistics. Moscow, 1978 (in Russ.).
21. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, No. 24. P. 9473–9479.
22. Santos A. R., Miguel A. S., Tomaz L., et al. The impact of CdSe/ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture [Electronic resource]. 2010. URL: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/24> (date of access: 25.10.2016).
23. Lin C., Fugetsu B., Su Y., et al. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* suspension cells. *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 170, No. 2/3. P. 578–583.
24. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 2016. Vol. 85, No. 2. P. 245–257.

Статья поступила в редколлегию 16.01.2017.
Received by editorial board 16.01.2017.