

БУЗІАШВІЛІ А. Ю.^{1✉}, МЕЛЬНИЧУК О. В.¹, ПРИЛУЦЬКА С. В.², ЄМЕЦЬ А. І.¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0000-0002-8283-5401, 0000-0001-6887-0705

² Національний університет біоресурсів і природокористування,

Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, ORCID: 0000-0001-5280-8341

✉ buziashvili.an@gmail.com, (095) 302-89-30

ВИКОРИСТАННЯ ALLIUM-ТЕСТУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ФІТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ФУЛЕРЕНУ C₆₀

Мета. Дослідити цитогенетичні ефекти водорозчинного фулерену C₆₀ за використання Allium-тесту. Вивчити вплив різних концентрацій фулерену C₆₀ на морфофізіологічні параметри *A. cepa*. **Методи.** Досліджували вплив різних концентрацій фулерену C₆₀ (25–100 мкг/мл) на індукцію утворення коренів та їх ріст, а також його цитогенетичні ефекти на меристематичні клітини кореневих апексів. **Результати.** Встановлено, що фулерен C₆₀ у концентраціях 50 та 75 мкг/мл індукує коренеутворення і стимулює ріст коренів, однак при цьому призводить до їх незначних деформацій. Також було виявлено, що фулерен C₆₀ викликає порушення проходження різних фаз мітозу меристематичними клітинами коренів, а також появу хромосомних аберацій при дії усіх досліджуваних його концентрацій. **Висновки.** Вперше досліджено цитогенетичні ефекти водорозчинного фулерену C₆₀ за допомогою Allium-тесту та показано як позитивний вплив на морфофізіологічні параметри *Allium cepa* L., так і його певну генотоксичність, що може свідчити про порушення механізмів формування веретена поділу.

Ключові слова: вуглецеві наноматеріали, фулерен C₆₀, *Allium cepa*, генотоксичність.

Фулерен є одним із найбільш популярних наноматеріалів та інтенсивно досліджується у різних галузях, зокрема в нанобіотехнологіях і біомедицині [1]. Завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям фулеренів зростає інтерес у науковців щодо використання цих наноматеріалів для підвищення продуктивності рослин та їх захисту від стресових чинників. Однак, дані щодо впливу фулеренів на рослинні об'єкти є суперечливими, оскільки відомо як про фітотоксичний, так і ріст-стимулюючий вплив на рослини. Саме тому, з огляду на перспективи застосування фулеренів у сільському

господарстві для підвищення врожайності рослинних культур і мінімізації використання та негативного впливу агрохімікатів [2, 3], необхідно ретельно дослідити механізми та ефекти цих наночастинок впливу на різні види рослин.

З огляду на зазначене, метою нашої роботи було дослідити цитогенетичні ефекти водорозчинного фулерену C₆₀ за допомогою Allium-тесту, як еталонної тест-системи для аналізу мутагенності, цито- та генотоксичності різних сполук і наноматеріалів, а також його впливу на морфофізіологічні параметри рослин *A. cepa*.

Матеріали і методи

Фулерен C₆₀ було синтезовано, приготовлено їх водні колоїдні розчини та охарактеризовано структуру і стабільність у хімічній лабораторії Інституту Біотехнологій Технічного університету м. Ільменау (ФРН) і люб'язно надано для досліджень проф. Уве Ріттером. Детальний опис методики отримання та дослідження фізико-хімічних характеристик колоїдних розчинів фулерену C₆₀ описано у [1]. Нами у роботі було використано стабільний колоїдний водорозчинний фулерен C₆₀ у чотирьох різних концентраціях: 25, 50, 75 та 100 мкг/мл.

Для дослідження генотоксичної дії фулерену C₆₀ та його впливу на морфофізіологічні параметри, як модельний об'єкт було обрано цибулю городню (*Allium cepa* L.) сорту Stuttgarter riesen. Як контроль використовували дистильовану воду. Для кожної досліджуваної концентрації фулерену C₆₀ та контролю було використано по 25 цибулин майже однакового розміру (2 см), середня маса кожної була 4 ± 0,15 г. Цибулини було очищено від верхніх сухих лусок і денця так, щоб не була ушкоджена ділянка корневих зачатків і розміщено у пробірках висотою 1,5 см, які містили досліджувані концентрації фулерену C₆₀. Дослідні та контро-

© БУЗІАШВІЛІ А. Ю., МЕЛЬНИЧУК О. В., ПРИЛУЦЬКА С. В., ЄМЕЦЬ А. І.

льні зразки розміщували у затемненому контейнері та переносили у культуральну кімнату для утворення корінців при температурі 25°C. Після 72-годинної експозиції рослинний матеріал фотографували, корінці відокремлювали та переносили у пробірки з фіксатором для подальшого мікроскопічного дослідження. Всі експерименти були проведені як мінімум з триразовим повторенням. Середню кількість і довжину корінців обраховували за використання програми ImageJ.

Для оцінки мітотичного індексу та частоти хромосомних аберацій у меристематичних клітинах *A. сера* корінці переносили в пробірки з фіксатором Кларка (96 % етиловий спирт і 99,8 % льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3:1) та зберігалися у холодильнику при температурі +4°C упродовж 2 місяців. При підготовці зразків для мікроскопічного дослідження корінці *A. сера* фарбували ацетокарміном за стандартною методикою [4], для приготування препаратів також використовували 1 %-ву молочну кислоту. Мікроскопічні дослідження проводили за використання мікроскопа Axioskop 40 FL із вбудованою фотокамерою (Carl Zeiss, Німеччина) 100-240 V AC, 50–60 Hz за збільшення 10 × 40 та 10 × 100 (імерсія).

Мітотичний індекс обраховували як відношення кількості клітин, що перебувають у мітозі, до загальної кількості проаналізованих клітин на мікропрепараті за формулою [5]:

$$MI, \% = \frac{(\Pi + M + A + T)}{N} \times 100\%$$

де (Π + М + А + Т) – сума клітин, що знаходяться на стадії профазі, метафазі, анафазі, телофазі; N – загальна кількість клітин.

Генотоксичність визначали за формулою [5]:

$$Г, \% = \frac{\text{кількість мітотичних клітин з абераціями}}{\text{загальна кількість мітотичних клітин}} \times 100\%$$

Статистичну достовірність отриманих даних підтверджували за використання t-критерію Ст'юдента для 5 % рівня значущості.

Результати та обговорення

Вплив фулерену на індукцію коренеутворення та ріст коренів A. сера. У результаті аналізу впливу різних концентрацій було встановлено, що фулерен C₆₀ у концентраціях 50 та 75 мкг/мл стимулював індукцію коренеутворення у *A. сера* (рис. 1). Також було виявлено, що корені цибулин, які росли у присутності фулерену C₆₀,

були дещо деформовані, мали затуплені та загнуті кінці, в той час як контрольні зразки мали нормальну морфологію (рис. 2), що може свідчити про його можливий фітотоксичний вплив [6, 7]. Раніше було продемонстровано, що, наприклад, водорозчинний фулерен (FMAD) C₇₀(C(COOH)₂)₄₋₈ інгібує ріст і розвиток коренів *Arabidopsis thaliana*. У проростків, вирощених у присутності цього наноматеріалу, спостерігали відставання в рості коренів, тому вони мали укорочену довжину, а також втрачали гравітропізм. Дослідження на клітинному рівні показали, що такі зміни були пов'язані з порушенням у розподілі ауксину в клітинах кінчиків коренів, клітинному поділі, організації мікротрубочок і мітохондріальній активності [7]. В іншій роботі [6] було продемонстровано, що водорозчинний карбоксифулерен (C₇₀(C(COOH)₂)₂₋₄) викликав порушення клітинної стінки та мембрани клітин суспензійної культури BY-2 *Nicotiana tabacum*.

Ми встановили, що середні показники довжини коренів цибулі в результаті впливу фулерену C₆₀ за різних концентрацій були вищими, порівнюючи з контролем: за дії 25 мкг/мл фулерену C₆₀ – вищими на 27,2 %; 50 мкг/мл – на 78 %; 75 мкг/мл – на 92,7 %; 100 мкг/мл – на 35,2 %. (рис. 3, а). Отже, фулерен C₆₀ стимулював ріст і призвів до збільшення довжини корінців *A. сера*. Найбільший ефект спостерігали при концентрації фулерену C₆₀ 75 мкг/мл – середня довжина корінців збільшилась майже у 2 рази порівняно з контролем (рис. 3, а).

Показники кількості коренів також підвищувались, порівнюючи з контролем: за концентрації 25 мкг/мл – на 16,2 %, 50 мкг/мл – на 100 %, 75 мкг/мл – на 86,5 %, 100 мкг/мл – на 73 %. (рис. 3, б). Отже, фулерен C₆₀ виявляв позитивний ефект на індукцію та ріст коренів, призводив до збільшення їх кількості та довжини, що може свідчити про підвищення інтенсивності поділу клітин *A. сера*.

Вплив фулерену C₆₀ на мітоз меристематичних клітин коренів A. сера. Нами було встановлено, що фулерен C₆₀ підвищував мітотичний індекс у меристематичних клітинах коренів, порівнюючи з контролем, зокрема, при концентрації 25 мкг/мл – на 2,3 %, 50 мкг/мл – на 3,18 %, 75 мкг/мл – на 2,32 %, 100 мкг/мл – на 0,28 % (рис. 4, б).

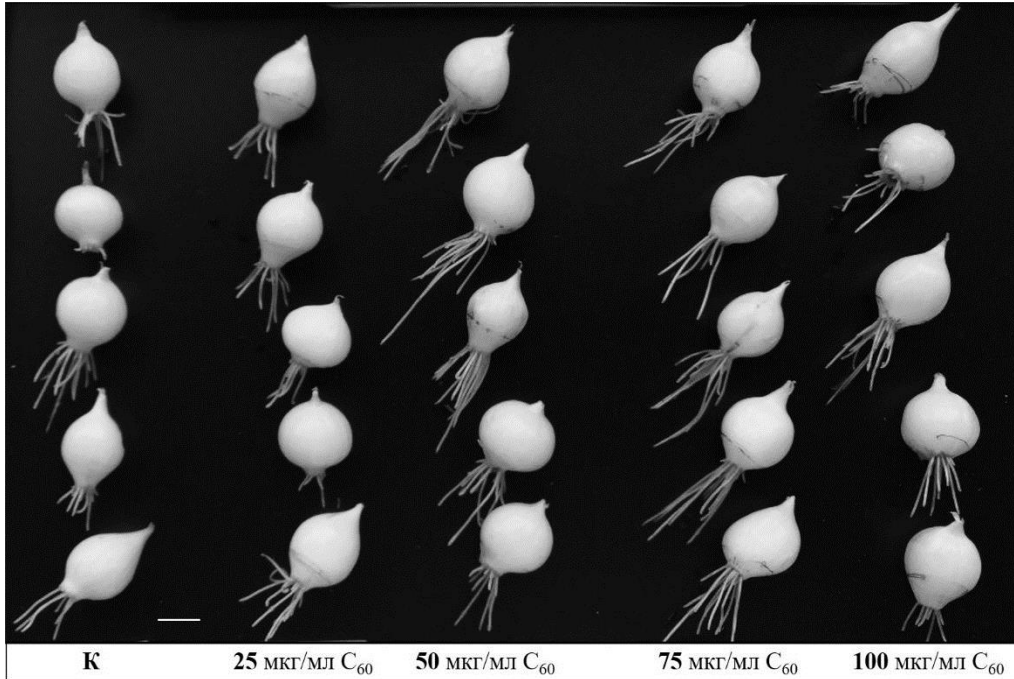


Рис. 1. Вплив фулерену C₆₀ за різних концентрацій (25, 50, 75 та 100 мкг/мл) на утворення і ріст коренів *A. сера* через 72 год порівняно з контролем (К). Масштаб: у 1 см – 1,4 см.

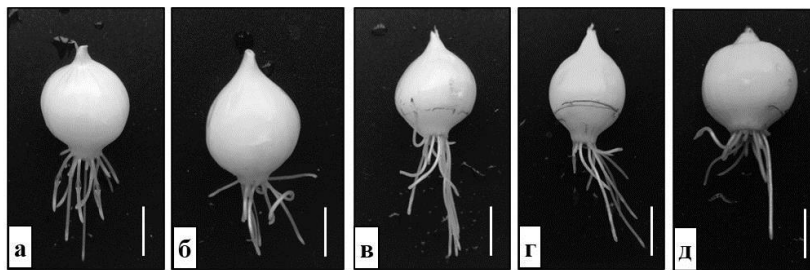


Рис. 2. Морфологія коренів цибулі через 72 год культивування у присутності фулерену C₆₀ за різних концентрацій (а – контроль, б – 25 мкг/мл, в – 50 мкг/мл, г – 75 мкг/мл і д – 100 мкг/мл). Масштаб: в 1 см – 1,4 см.

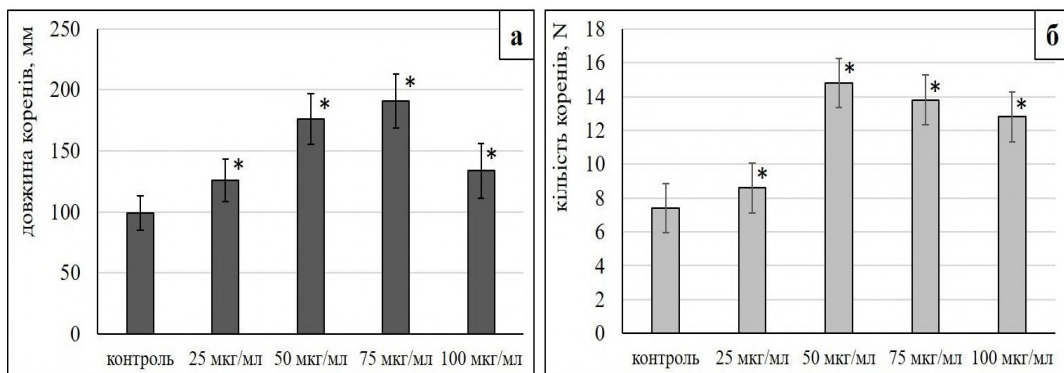


Рис. 3. Довжина (а) та кількість (б) утворених коренів цибулі за дії фулерену C₆₀ за різних концентрацій. * $p < 0,05$, порівнюючи з контролем.

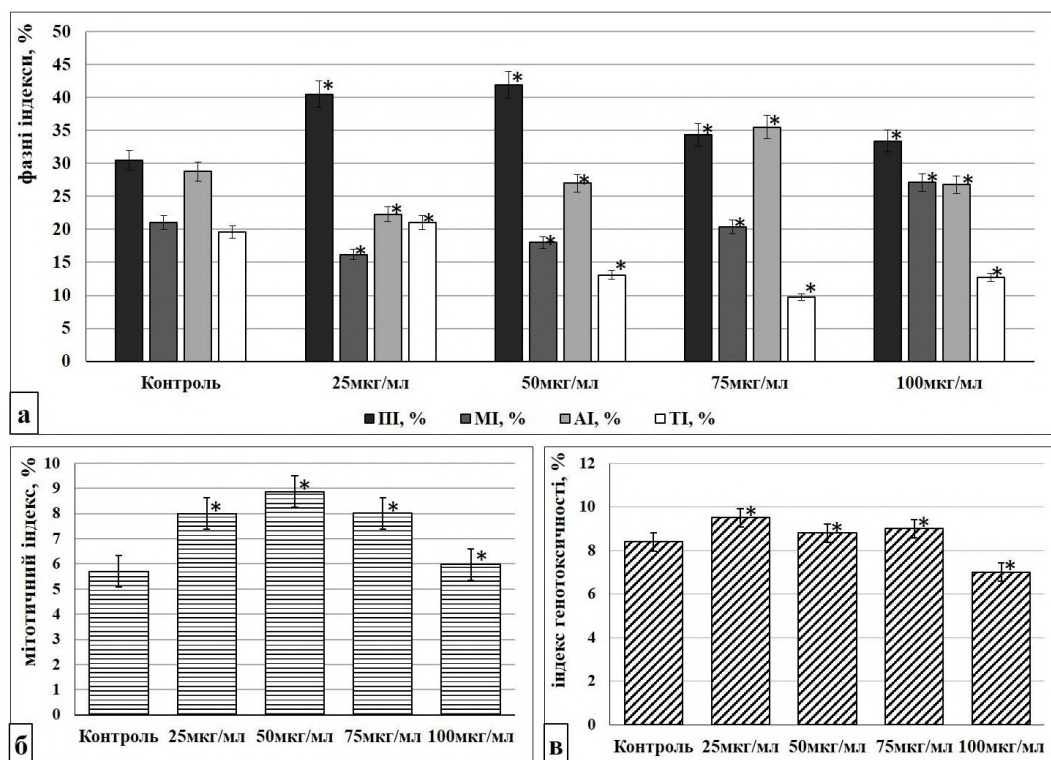


Рис. 4. Фазний (а), мітотичний (б) індекс та індекс генотоксичності (в) у корінцях цибулі, які вирощували протягом 72 год у присутності фулерену C₆₀ за різних концентрацій. * p < 0,05, порівнюючи з контролем.

Підвищення значення мітотичного індексу може бути пов'язано зі зміною тривалості різних фаз мітозу, тобто затримкою клітин на певних стадіях мітозу. Щоб зрозуміти причини зміни мітотичного індексу в меристемі корінців цибулі, спричинені дією фулерену C₆₀, було розглянуто фазні індекси (кількість клітин, які перебувають на стадії профазі (PI), метафазі (MI), анафазі (AI) і телофазі (TI) до загальної кількості клітин, що аналізували (рис. 4, а). Результати дослідження показали, що найбільших значень PI набуває після дії фулерену C₆₀ за концентрації 50 мкг/мл (41,9 %). Порівнюючи з контролем, значення MI знижуються після дії фулерену C₆₀ за концентрацій 25, 50 та 75 мкг/мл на 4,9 %, 3,1 %, 0,7 % відповідно.

За додавання фулерену C₆₀ у концентрації 100 мкг/мл значення MI підвищувалося на 6 %, порівнюючи з контролем. Значення AI знижувалося після додавання фулерену C₆₀ за концентрацій 25, 50 та 100 мкг/мл на 6,5 %, 1,8 % та 2 % відповідно. Однак, при концентрації 75 мкг/мл

фулерену C₆₀ значення AI підвищувалося на 6,7 %, порівнюючи з контролем. Показник TI знижувався за дії 50, 75 та 100 мкг/мл фулерену C₆₀ на 6,5 %, 9,9 % та 6,9 % відповідно, тоді як за концентрації 25 мкг/мл фулерену C₆₀ показник TI підвищувався на 1,4 %, порівнюючи з контролем.

Отже, за дії фулерену C₆₀ було зафіксовано підвищення показника PI, порівнюючи з контролем у клітинах меристеми коренів (рис. 4), що свідчить про затримку проходження клітинами стадії профазі у досліджуваному діапазоні концентрацій наночастинок. Однак, при концентраціях 50 мкг/мл, 75 мкг/мл і 100 мкг/мл фулерену C₆₀ значення TI знижувалося, що свідчить про зменшення кількості цих фаз мітозу в меристематичних клітинах.

При дослідженні генотоксичного впливу фулерену C₆₀ на меристематичні клітини коренів *A.сера* було виявлено такі хромосомні аберації, як C – мітоз, відставання хромосом, поліплоїдизація, хромосомні мости й ін. (рис. 5).

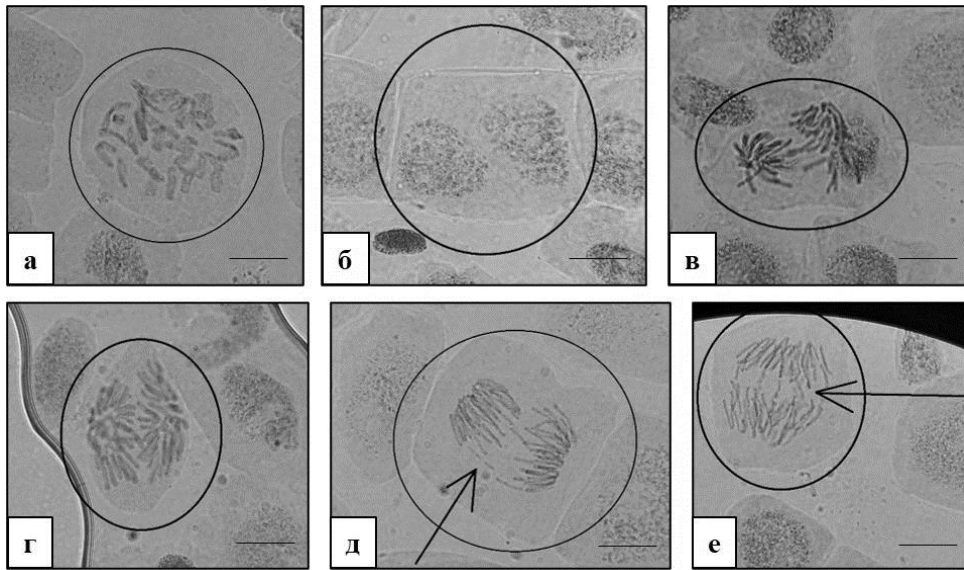


Рис. 5. Хромосомні аберації в меристематичних клітинах *A. cepa* за дії фулерену C₆₀: а – С-мітоз, б – дво-ядерна клітина, в, д – відставання хромосом, г – поліплоїдизація, е – хромосомні мости. Збільшення x1000, масштаб 100 мкм.

Встановлено, що за дії наночастинок частота хромосомних аберацій у меристематичних клітинах коренів *A. cepa* була вищою, порівнюючи з контролем: за дії 25 мкг/мл фулерену C₆₀ – на 13 %, 50 мкг/мл – на 4,8 %, 75 мкг/мл – на 7 %. За дії фулерену C₆₀ при концентрації 100 мкг/мл рівень генотоксичності знижувався на 16,7 % (рис. 4, в). Найбільша кількість хромосомних аберацій спостерігалась після дії фулерену C₆₀ за концентрації 50 мкг/мл. Це може свідчити про те, що фулерен C₆₀ негативно впливає на веретено поділу, перешкоджаючи розходженню хромосом і спричиняючи мутагенний вплив з подальшим утворенням анафазних мостів, втрачених і подвоєних хромосом й ін.

Загалом, результати цього дослідження корелюють з результатами попередніх робіт. Зокрема, у роботі [8] було показано вплив полігідроксифулеренів на поділ клітин у зелених водоростей *Pseudokirchneriella subcapitata* та на ріст проростків *Arabidopsis thaliana*). В іншій роботі [9] було показано, що оброблення насіння дині гіркої (*Momordica charantia*) фулеролом сприяло збільшенню кількості, розміру плодів і об'єму урожаю 128 %, а також підвищенню вмісту біологічно активних сполук у плодах, таких як кукурбітацин-В, лікопін, чарантин та інулін. В інших роботах також було показано, що вуглецеві наноматеріали активувати експресію генів синтезу фітогормонів і захисту від

абіотичних стресів у рослин, а також активувати процеси росту та розвитку, підвищувати ефективність фотосинтезу, врожайність, вміст цукрів, підвищувати стійкість рослини до водного дефіциту та сольового стресу й ін. [10–12]. Однак, існують дані про нейтральний і негативний вплив фулеренів на ріст і розвиток рослин, а також деякий рівень фітотоксичності [6, 7, 10–13], який пов'язують із руйнуванням клітинної стінки, блокуванням судин рослин кластерами фулеренів [14], руйнуванням мікротрубочок веретена поділу та зменшенням вмісту активних форм кисню у мітохондріях клітин, що діляться й ін. [7].

Висновки

Результати цієї роботи показують як позитивний вплив фулерену C₆₀ на рослини *A. cepa*, зокрема, підвищення мітотичного індексу, збільшення довжини та кількості корінців цибулі, так і певні ознаки фітотоксичності – деформація кінчиків коренів, порушення фазних індексів і збільшення кількості хромосомних аберацій під час мітозу, яких було найбільше за дії 25 мкг/мл фулерену C₆₀. Було показано, що одним із механізмів негативного впливу фулерену на кореневу систему цибулі є затримка клітин, що діляться, на стадії профазі та численні хромосомні аберації під час анафазі, що може свідчити про порушення механізмів формування веретена поділу. Однак, для більш гру-

нтового розуміння механізмів та ефектів впливу фулерену C₆₀ на рослинний організм на клітинному та молекулярному рівні необхідні подальші дослідження.

Роботу виконано частково в рамках проекту МОН України «Регуляція внутрішньоклітинних механізмів стресостійкості сільськогосподарських рослин за використання вуглецевих наноматеріалів» (2023–2025 рр.) і за фінансової підтримки НАН України (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024–2028 рр.).

References

1. Prylutska S. V., Matyshevskaya O. P., Grynyuk I. I., Prylutsky Yu. I., Ritter U., Scharff P. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2007. Vol. 468. P. 265–274. doi: 10.1080/15421400701230105.
2. De La Torre-Roche R., Hawthorne J., Deng Y., Xing B., Cai W., Newman L., Wang Q., Ma X., Helmi H., White J. C. Multi-walled carbon nanotubes and C₆₀ fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. *Environ. Sci. Technol.* 2013. Vol. 7. P. 12539–12547. doi: 10.1021/es4034809.
3. Ma X., Wang, C. Fullerene nanoparticles affect the fate and uptake of trichloroethylene in phytoremediation systems. *Environ. Eng. Sci.* 2010. Vol. 27. P. 989–992. doi: 10.1089/ees.2010.0141
4. Syakhriil B. Aceto-orcein staining for counting somatic chromosomes in castor (*Ricinus communis* L.). *Biosci. Res.* 2019. Vol. 16, № 2. P. 2336–2342.
5. Ouzid Y., Kaci-Boudiaf M.N., Zeghouini A., Madi A.-O., Smail-Saadoun N., Houali K. Antimitotic and genotoxic effect of methanolic extracts of leaves of *Peganum harmala* L. on the meristematic cells of *Allium cepa* L. *Bioagro.* 2023. Vol. 35 (2). P. 97–104. doi: 10.51372/bioagro352.2.
6. Liu Q., Zhang X., Zhao Y., Lin J., Shu C., Wang C., Fang X. Fullerene-induced increase of glycosyl residue on living plant cell wall. *Environ. Sci. Technol.* 2013. Vol. 47 (13). P. 7490–7498. doi: 10.1021/es4010224.
7. Liu Q., Zhao Y., Wan Y., Zheng J., Zhang X., Wang C., Fang X., Lin J. Study of the inhibitory effect of water-soluble fullerenes on plant growth at the cellular level. *ACS Nano.* 2010. Vol. 4 (10). P. 5743–5748. doi: 10.1021/nn101430g.
8. Gao J., Wang Y., Folta K. M., Krishna V., Bai W., Indeglia P., et al. Polyhydroxy fullerenes (fullerols or fullerlenols): beneficial effects on growth and lifespan in diverse biological models. *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6 (5). e19976. doi: 10.1371/journal.pone.0019976.
9. Kole C., Kole P., Randunu K. M., Choudhary P., Podila R., Ke P. C., Rao A. M., Marcus R. K. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnol.* 2013. Vol. 13 (1). 37. doi:10.1186/1472-6750-13-37.
10. Prylutska S. V., Franskevych D. V., Yemets A. I. Cellular biological and molecular genetic effects of carbon nanomaterials in plants. *Cytol. Genet.* 2022. Vol. 56. P. 351–360. doi: 10.3103/S0095452722040077.
11. Singh A., Bhati A., Tripathi K. M., Sonkar S. K. Nanocarbons in agricultural plants: can be a potential nanofertilizer? In *Nanotechnology in Environmental Science* (editors: Hussain C. M., Mishra A. K.). Wiley- VCH Verlag GmbH & Co, KGaA. 2018. P. 153–190. doi: 10.1002/9783527808854.ch6.
12. Husen A., Siddiqi K. S. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system. *J Nanobiotechnol.* 2014. Vol. 12. 16. doi: 10.1186/1477-3155-12-16.
13. Li H., Huang J., Lu F., Liu Y., Song Y., Sun Y., Zhong J., Huang H., Wang Y., Li S., Lifshitz Y., Lee S. T., Kang Z. Impacts of carbon dots on rice plants: boosting the growth and improving the disease resistance. *ACS Appl. Bio. Mater.* 2018. Vol. 1 (3). P. 663–672. doi: 10.1021/acsbm.8b00345.
14. He A., Jiang J., Ding J., Sheng G. D. Blocking effect of fullerene nanoparticles (nC₆₀) on the plant cell structure and its phytotoxicity. *Chemosphere.* 2021. Vol. 278. 130474. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130474.

BUZIASHILI A. Yu.¹, MELNYCHUK O. V.¹, PRYLUTSKA S. V.², YEMETS A. I.¹

¹ Institute of food biotechnology and genomics of the NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskogo str., 2a

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 13

INVESTIGATION OF PHYTOTOXIC EFFECTS OF FULLERENE C₆₀ WITH THE USE OF ALLIUM-TEST

Aim. To investigate the cytogenetic effects of water-soluble fullerene C₆₀ with the use of *Allium* test. To study the influence of various concentrations of fullerene C₆₀ on the morpho-physiological parameters of *A. cepa*. **Methods.** The influence of different concentrations of fullerene C₆₀ (25–100 µg/ml) on the induction of root formation and their growth, as well as its cytogenetic effects on the meristematic cells of root apices, were investigated. **Results.** It was found that fullerene C₆₀ at concentrations of 50 and 75 µg/ml induced root formation and stimulated root growth, though causing minor deformations. Also, it was shown that fullerene C₆₀ disrupts the progression of various phases of mitosis in the meristematic cells of roots, along with the occurrence of chromosomal aberrations at all investigated concentrations. **Conclusions.** The cytogenetic effects of water-soluble fullerene C₆₀ were investigated for the first time using the *Allium*-test. Both positive effects on the morphophysiological parameters of *A. cepa* and its genotoxicity were demonstrated, which could indicate the disruptions in the mechanisms of spindle formation.

Keywords: carbon nanomaterials, fullerene C₆₀, *Allium cepa*, genotoxicity.