

EDN: PDKKRC

УДК 547.992.2:631.589.2

## **Dose-Dependent Effects of Nanoscale Forms of Humic Acids in a Hydroponic Culture of *Triticum aestivum*: Induction of Oxidative Stress and an Increase in the Number of Border Cells**

**Natalia G. Menzyanova<sup>a</sup>, Svetlana A. Pyatina<sup>a\*</sup>,  
Alexander V. Shabanov<sup>b</sup> and Ekaterina I. Shishatskaya<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Siberian Federal University  
Russian Federation, Krasnoyarsk*

<sup>b</sup> *L. V. Kirensky Institute of Physics SB RAS  
Russian Federation, Krasnoyarsk*

Received 28.02.2022, received in revised form 15.11.2022, accepted 05.12.2022

**Abstract.** The biological activity of humic acids in the form of nanoparticles with a size of 6.5 nm and 68 nm was studied in a hydroponic culture of *Triticum aestivum* L. Both smaller and larger humic nanoparticles at the studied concentrations neither inhibited root growth nor caused destructive changes in the root apices of 2-day-old seedlings. A dose-dependent increase in the contents of markers of induced oxidative stress such as carbonylated proteins, malonaldehyde, and proline was observed in the roots of seedlings on media with humic nanoparticles. Malondialdehyde was the main product of free radical oxidation for smaller nanoparticles and carbonylated proteins – for larger ones. Oxidative stress induced by humic nanoparticles was accompanied by a dose-dependent increase in the number of free border cells and the size of the mucilaginous sheaths on the root apices of 2-day-old seedlings. For smaller (6.5 nm) nanoparticles, these changes were much more pronounced than for larger (68 nm) nanoparticles. The results obtained allow us to consider humic nanoparticles as adaptogens: contributing to an increase in the population of border cells and the mucilaginous sheath system (as a product of the excretory activity of border cells), nanoparticles enhance the resistance of the root apex to the effects of unfavorable biotic and abiotic factors.

**Keywords:** hydroponic culture of *Triticum aestivum*, humic acids, border cells, oxidative stress, root apex, rhizosphere.

---

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: davebetik@mail.ru

ORCID: 0000-0003-3930-6923 (Pyatina S.); 0000-0001-7967-243X (Shishatskaya E.)

Citation: Menzyanova N. G., Pyatina S. A., Shabanov A. V., Shishatskaya E. I. Dose-dependent effects of nanoscale forms of humic acids in a hydroponic culture of *Triticum aestivum*: induction of oxidative stress and an increase in the number of border cells. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(1), 64–86. EDN: PDKKRC.



## **Дозозависимые эффекты наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*: индукция окислительного стресса и увеличение численности пограничных клеток**

**Н. Г. Мензянова<sup>а</sup>, С. А. Пятина<sup>а</sup>,  
А. В. Шабанов<sup>б</sup>, Е. И. Шишацкая<sup>а</sup>**

*<sup>а</sup>Сибирский федеральный университет  
Российская Федерация, Красноярск*

*<sup>б</sup>Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН  
Российская Федерация, Красноярск*

**Аннотация.** В гидропонной культуре *Triticum aestivum* L. изучали биологическую активность гуминовых кислот в форме наночастиц размером 6,5 нм и 68 нм. Гуминовые наночастицы (мелкие и крупные) в изученных концентрациях не ингибировали рост корня и не вызывали деструктивных изменений корневого апекса 2-дневных проростков. На средах с гуминовыми наночастицами в корнях проростков наблюдалось дозозависимое увеличение содержания карбонилированных белков, малонового альдегида и пролина – маркеров индуцированного окислительного стресса. Для мелких наночастиц основным продуктом свободнорадикального окисления был малоновый диальдегид, для крупных – карбонилированные белки. Индуцированный гуминовыми наночастицами окислительный стресс сопровождался дозозависимым увеличением численности свободных пограничных клеток и размеров гелевого чехла в корневом апексе 2-дневных проростков. Для мелких наночастиц (6,5 нм) эти изменения были выражены в значительно большей степени, чем для крупных наночастиц (68 нм). Полученные результаты позволяют рассматривать гуминовые наночастицы в качестве адаптогенов: способствуя увеличению численности популяции пограничных клеток и системы гелевого чехла (как продукта экскреторной активности пограничных клеток), наночастицы увеличивают устойчивость корневого апекса к воздействию неблагоприятных биотических и абиотических факторов.

**Ключевые слова:** гидропонная культура *Triticum aestivum*, гуминовые кислоты, пограничные клетки, окислительный стресс, корневой апекс, ризосфера.

Цитирование: Мензянова, Н. Г. Дозозависимые эффекты наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*: индукция окислительного стресса и увеличение численности пограничных клеток / Н. Г. Мензянова, С. А. Пятина, А. В. Шабанов, Е. И. Шишацкая // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 64–86. EDN: PDKKRC.

## Введение

Гуминовые кислоты (ГК) – водорастворимые органические соединения, которые образуются в результате биodeградации растительных и животных останков с участием почвенных микроорганизмов (Stevenson, 1994). ГК используются как стимуляторы роста растений (Chen et al., 2017; Busato et al., 2018; Morozesk et al., 2017) и как агенты, повышающие устойчивость растений к различным стресс-факторам (Taspinar et al., 2017; Ondrasek et al., 2018) и нематодным инфекциям (Kesba, El-Beltagi, 2012). Многочисленные экспериментальные данные позволяют полагать, что биологические эффекты ГК реализуются через перестройку систем транскрипции и посттрансляционных событий, что приводит к значительным изменениям метаболизма и процессов развития и роста растений (Mora et al., 2014; Tahiri et al., 2016). Однако сигнальные пути и эффекторные мишени ГК изучены фрагментарно и отсутствует комплексная модель биотропных эффектов ГК (Mora et al., 2014).

В большинстве случаев эффекты ГК связывают с гормон- и АФК-зависимым сигналингом (Nagasawa et al., 2016; Garcia et al., 2016 b; Olaetxea et al., 2016). Взаимодействие этих двух систем сигналинга определяет стимулирующее влияние ГК на рост побегов и корневой системы. Но тонкие регуляторные взаимодействия этих систем сигналинга могут варьировать в зависимости от вида и возраста растений, условий культивирования, а также от концентрации и способов получения ГК (Trevisan et al., 2010). Так, ГК, полученные из почвы, стимулируют углеродный метаболизм (Muscolo et al., 2007), а ГК, выделенные из вермикомпоста, – развитие боковых корней (Aguilar et al., 2013). ГК лигнита (с меньшим молекулярным весом) более эффективны как стимуляторы роста корней, чем ГК, полученные из навоза крупного рогатого скота (Nagasawa et al., 2016). Показано, что такие

параметры, как лабильность и устойчивость, могут влиять на биологическую активность препаратов ГК (García et al., 2016a).

В условиях массового культивирования вариabельность эффективности препаратов ГК может значительно влиять на урожайность и себестоимость продукции. Это определяет практическую значимость изучения биологической активности препаратов ГК в модельных системах для прогнозирования их эффективности в условиях агрокультуры.

В связи с этим целью представленной работы было изучение биологической активности препаратов ГК, полученных электрохимическим методом из водных суспензий торфа, в гидропонной культуре проростков *Triticum aestivum* L.

## Материалы и методы

### Проращивание зерна

Зерно пшеницы промывали в течение 5–6 ч под проточной водой и замачивали на 24 ч в дистиллированной воде при комнатной температуре. Проклюнувшиеся зерновки раскладывали по чашкам Петри по 50 штук в каждую. В контрольном варианте в чашки вносили по 7 мл дистиллированной воды. В экспериментальные варианты вносили по 7 мл растворов гуминовых наночастиц с концентрацией 5, 25 и 100 мг/л.

Стабильные водные растворы гуминовых кислот (концентрация 1 г/л, по методу Lamar et al., 2014) в форме наночастиц были предоставлены ООО «Биотех» (Красноярск). Гуминовые наночастицы получали из торфа (Кедровское месторождение, переходный тип торфа) электрохимическим методом. Размеры наночастиц определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., Великобритания). Исходные растворы гуминовых кислот разводили дистиллированной водой для получения необходимых концентраций.

Зерно проращивали при комнатной температуре. У 2-дневных проростков определяли длину главного корня.

#### *Оценка численности популяции пограничных клеток*

Пограничные клетки смывали с поверхности корневого апекса на магнитной мешалке. Для этого срезали 20 главных корней 2-дневных проростков, зажимали пинцетом и смывали в 1 мл дистиллированной воды на магнитной мешалке в течение 1 мин. Полученную суспензию клеток центрифугировали 3000g, 10 мин. Супернатант после центрифугирования представлял собой водный раствор компонентов гелевого чехла (белков, полисахаридов и др.). Супернатант собирали для определения общего белка по Лоури (Lowry et al., 1951). Осадок пограничных клеток суспендировали в дистиллированной воде и повторно центрифугировали 3000g, 10 мин. Клеточный осадок фиксировали в 500 мкл 2,5 % глутарового альдегида (на фосфатном буфере, pH 7,0) 1 ч. После фиксации клетки дважды промывали дистиллированной водой и окрашивали 0,01 % трипановым синим. В клеточной суспензии определяли общее количество клеток (одиночные клетки, клеточные цепочки, клеточные пласты) и количество одиночных клеток в %.

#### *Получение полутонких срезов*

У 2-дневных проростков срезали главные корни. Корни фиксировали в 2,5 % глутаровом альдегиде на фосфатно-солевом растворе, pH=7,0, в течение 3 ч. Корни отмывали от фиксатора в дистиллированной воде и повторно фиксировали в 1 % OsO<sub>4</sub>, 30 мин. После второй фиксации корни промывали дистиллированной водой, обезвоживали образцы в спиртах восходящей концентрации и ацетоне и заливали в эпон (EMbed 812 Kit, Merck). Полутонкие срезы окрашивали 1 % основ-

ным фуксином и 0,1 % толуидиновым синим в 2,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11,1). На срезы наносили эпон, накрывали покровными стеклами и после полимеризации препараты анализировали под световым микроскопом.

#### *Подготовка образцов для сканирующей электронной микроскопии*

Образцы фиксировали и обезвоживали как описано в предыдущем пункте, напыляли платиной и анализировали с помощью сканирующего микроскопа TM-3000 (Japan).

#### *Определение содержания карбонилированных белков, малонового диальдегида и пролина*

У 2-дневных проростков срезали главные корни с корневыми апексами длиной в 1 см. Полученную биомассу корней гомогенизировали в 0,05 М Трис-НСl буфере, pH=7,4, при T=4 °C. Гомогенаты центрифугировали для удаления грубого дебриса при 5000g, 45 мин, при T=4 °C. Супернатант собирали и использовали для определения содержания карбонилированных белков по методу Carty et al. (2000), малонового диальдегида по методу Bailly et al. (1996) и пролина по методу Bates et al. (1973). Содержание карбонилированных белков, малонового диальдегида и пролина пересчитывали на 1 мг белка гомогената корней. Содержание белка в гомогенате корней определяли по методу Lowry et al. (1951). Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

## **Результаты**

### *Влияние гуминовых наночастиц на длину корня и популяцию пограничных клеток в корневом апексе проростков T. aestivum*

Мелкие гуминовые наночастицы (средний размер 6,5 нм) в изученных концентраци-

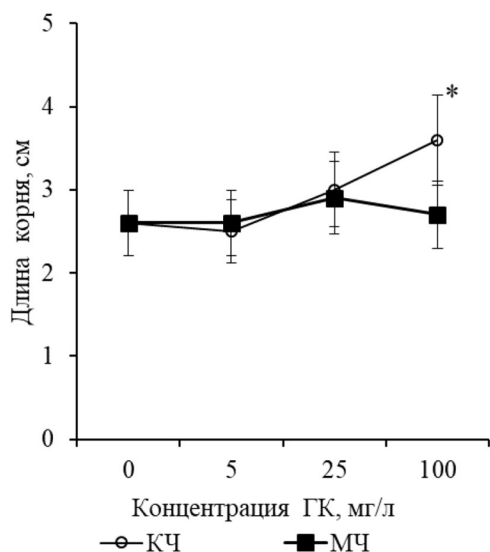


Рис. 1. Длина главного корня 2-дневных проростков пшеницы. Культивирование на средах с различными концентрациями гуминовых наночастиц. \* – значение, достоверно отличающееся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные наночастицы (68 нм), МЧ – мелкие наночастицы (6,5 нм)

Fig. 1. Length of the main roots of 2-day-old wheat seedlings. Cultivation on media with different concentrations of humic nanoparticles. \* – value significantly different from the control ( $p < 0,05$ ). КЧ – larger nanoparticles (68 nm), МЧ – smaller nanoparticles (6.5 nm)

ях не влияли на длину корней 2-дневных проростков. Крупные гуминовые наночастицы (средний размер 68 нм) стимулировали рост корней только в концентрации 100 мг/л: длина корней была в 1,4 раза больше, чем в контроле (рис. 1). Таким образом, в гидропонной культуре существенной стимуляции роста корней на средах с гуминовыми наночастицами не наблюдалось.

На следующем этапе работы эффекты гуминовых наночастиц оценивали на уровне ризосферы. Ризосфера является одной из потенциальных эффекторных мишеней стандартных препаратов ГК. Важную роль в формировании ризосферной системы развивающегося проростка играют пограничные

клетки (ПК) корневого апекса. ПК на поверхности корневого апекса выявляются на самых ранних этапах прорастания корня; вероятно, эта популяция клеток формируется еще под колеризой (рис. 2).

ПК представляют собой морфологически гетерогенную популяцию клеток (рис. 3). На вершине апекса локализуются округлые клетки, по мере удаления от вершины апекса клетки удлиняются, приобретая палочковидную форму. На микрофотографиях можно наблюдать различные фазы и особенности отделения ПК от корневого апекса. Округлые и овальные клетки на вершине апекса «уходят» в матрикс гелевого чехла «по одиночке». На боковых поверхностях удлиненные клетки, и особенно палочковидные клетки, отслаиваются группами, в форме длинных цепочек и пластов: ПК теряют контакты с поверхностью апекса, но сохраняют контакты с соседними клетками в отделяющемся монослое.

Свободные одиночные ПК и агрегаты ПК удерживаются вблизи корневого апекса матриксом гелевого чехла, сформированным продуктами экскреции ПК (рис. 3 б-г). Известно, что ПК активно экскретируют в ризосферу более 100 различных белков (Knox et al., 2007; Wen et al., 2007).

О размерах гелевого чехла можно судить по величине «разброса» свободных ПК. Небольшие гелевые чехлы с немногочисленной популяцией ПК наблюдаются в контрольном варианте (проращивание на дистиллированной воде) (рис. 3 а). При культивировании на средах с гуминовыми наночастицами размеры гелевых чехлов значительно увеличиваются: свободные ПК могут находиться на расстоянии 500–600 мкм от поверхности корневого апекса (рис. 3 б-г). При этом значительно увеличивается и численность свободных ПК в составе гелевого чехла.

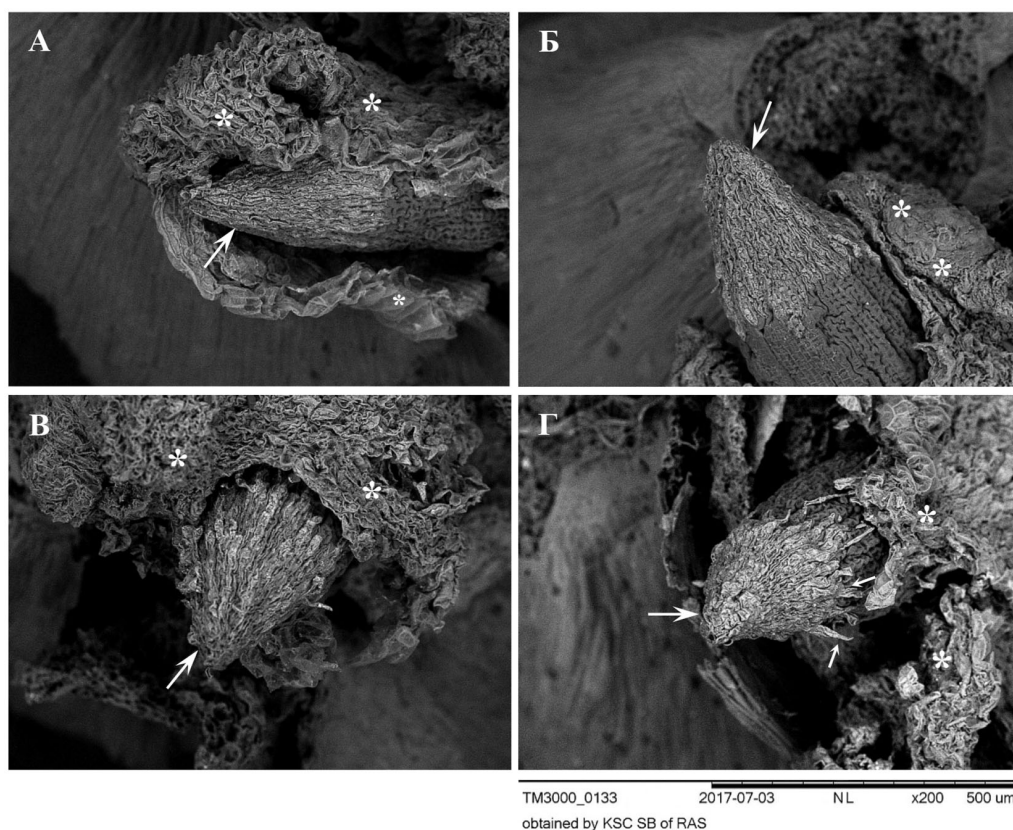


Рис. 2. Популяция пограничных клеток (ПК) в корневом апексе проростков пшеницы (8–10 ч прорастивания). Длина главного корня 250–500 мкм. А, Б – контрольный вариант (прорастивание на дистиллированной воде); В, Г – прорастивание на среде с гуминовыми наночастицами. Корни окружены разорванной колеоризой (белые звездочки). Корневые апексы покрыты ПК: шапочками из светло-серых клеток с выступающими на поверхности округлыми ядрами (белые стрелки). В контрольном варианте (А, Б) ПК плотно прилегают к поверхности апекса. На средах с гуминовыми наночастицами наблюдается разрыхление слоя ПК (В) и отслаивание клеток от поверхности (Г, по нижнему краю шапочки ПК, короткие тонкие стрелки)

Fig. 2. Border cell (BC) population in the root apex of wheat seedlings (8–10 h, germination). The length of the main root is 250–500  $\mu\text{m}$ . А, Б – control (germination on distilled water); В, Г – germination on the medium with humic nanoparticles. Roots are surrounded by ruptured coleorhiza (white stars). Root apices are covered with BCs: caps of light gray cells with rounded nuclei protruding on the surface (white arrows). In the control (А, Б), BCs closely adhere to the surface of the apex. On media with humic nanoparticles, loosening of the BC layer (В) and exfoliation of cells from the surface (Г, along the lower edge of the BC cap, short thin arrows) are observed

Для вариантов культивирования с гуминовыми наночастицами можно выделить 3 морфотипа ризосферного пространства вокруг апекса (рис. 3 б-г):

1. Активное боковое отслаивание цепочек удлиненных, палочковидных клеток. Из цепочек ПК вокруг апекса формируется «венчик», который сохраняет контакт с корневым апексом (за счет клеток в основании

«венчика») (рис. 3 б). При культивировании на среде с наночастицами размером 6,5 нм (100 мг/л) почти у половины проанализированных корневых апексов (47 $\pm$ 8 %) наблюдалось выраженное боковое отслаивание ПК.

2. Активное отделение ПК с вершины апекса (одиночные клетки) и с боковой поверхности апекса (рис. 3 в).

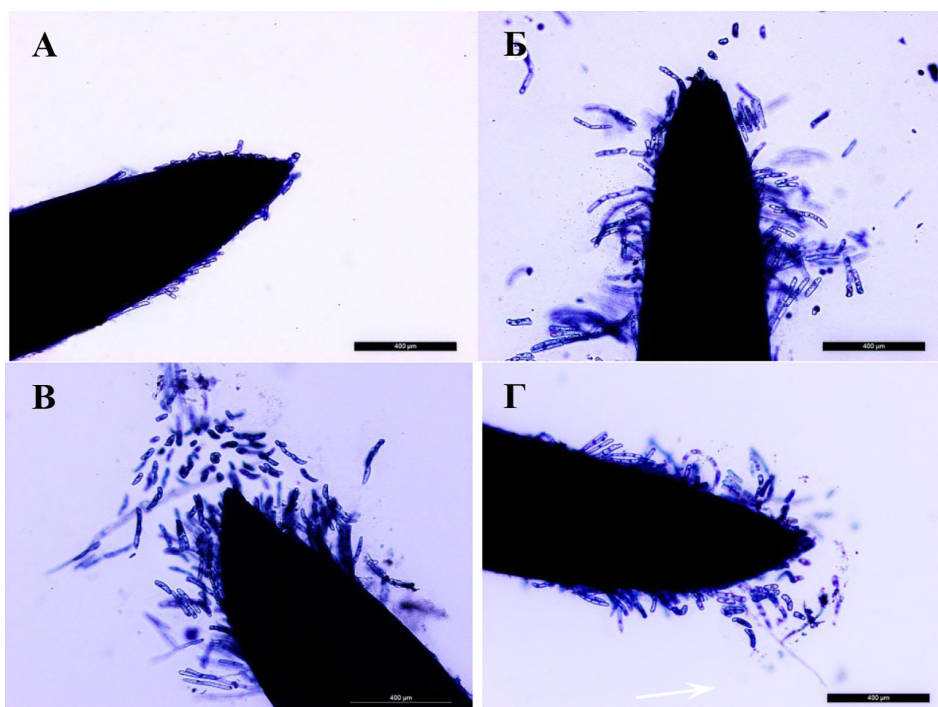


Рис. 3. Корневой апекс 2-дневных проростков пшеницы. Окраска трипановым синим. Масштабная линейка 400 мкм. А – культивирование на дистиллированной воде. Б, В, Г – культивирование на среде с гуминовыми наночастицами. Б – активное боковое отслаивание цепочек удлиненных, палочковидных клеток. Из цепочек пограничных клеток (ПК) вокруг апекса формируется «венчик», который сохраняет контакт с корневым апексом (за счет клеток в основании «венчика»); В – активное отделение ПК с вершины апекса (одиночные клетки) и с боковой поверхности апекса; Г – поверхность апекса покрыта рыхло расположенными клетками, многие из которых еще сохраняют контакты с поверхностью апекса

Fig. 3. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. Trypan blue stain. Scale bar 400 µm. A – cultivation on distilled water. Б, В, Г – cultivation on the medium with humic nanoparticles. Б – active lateral exfoliation of chains of elongated, rod-shaped cells. The border cell (BC) chains form a “circler” around the apex, which maintains contact with the root apex (due to the cells at the base of the “circler”); В – active separation of BCs from the top of the apex (single cells) and from the lateral surface of the apex; Г – the surface of the apex is covered with loosely located cells, many of which still retain contact with the surface of the apex

3. Вся поверхность апекса покрыта рыхло расположенными клетками, многие из которых еще сохраняют контакты с поверхностью апекса (рис. 3 г).

Эффекты гуминовых наночастиц были выявлены только в популяции ПК. Анализ серийных поперечных срезов корневого апекса не выявил деструктивных изменений цитоархитектоники апикальной меристемы проростков в условиях культивирования на средах с мелкими и крупными гуминовыми наночастицами (для всех исследованных

концентраций, рис. 4 г-и, 5 б). В то же время на поперечных и продольных полутонких срезах выявляется хорошо развитый гелевый чехол с многочисленными ПК, утратившими контакт с поверхностью корневого апекса (рис. 4 г-и, 5 б). В контроле (дистиллированная вода) гелевый чехол был идентифицирован в виде узкого цветного кольца по периметру среза (рис. 4 а-в, 5 а). Анализ корневых апексов проростков с помощью сканирующей электронной микроскопии показал, что поверхность эпиблемы (ризодермы) при культи-

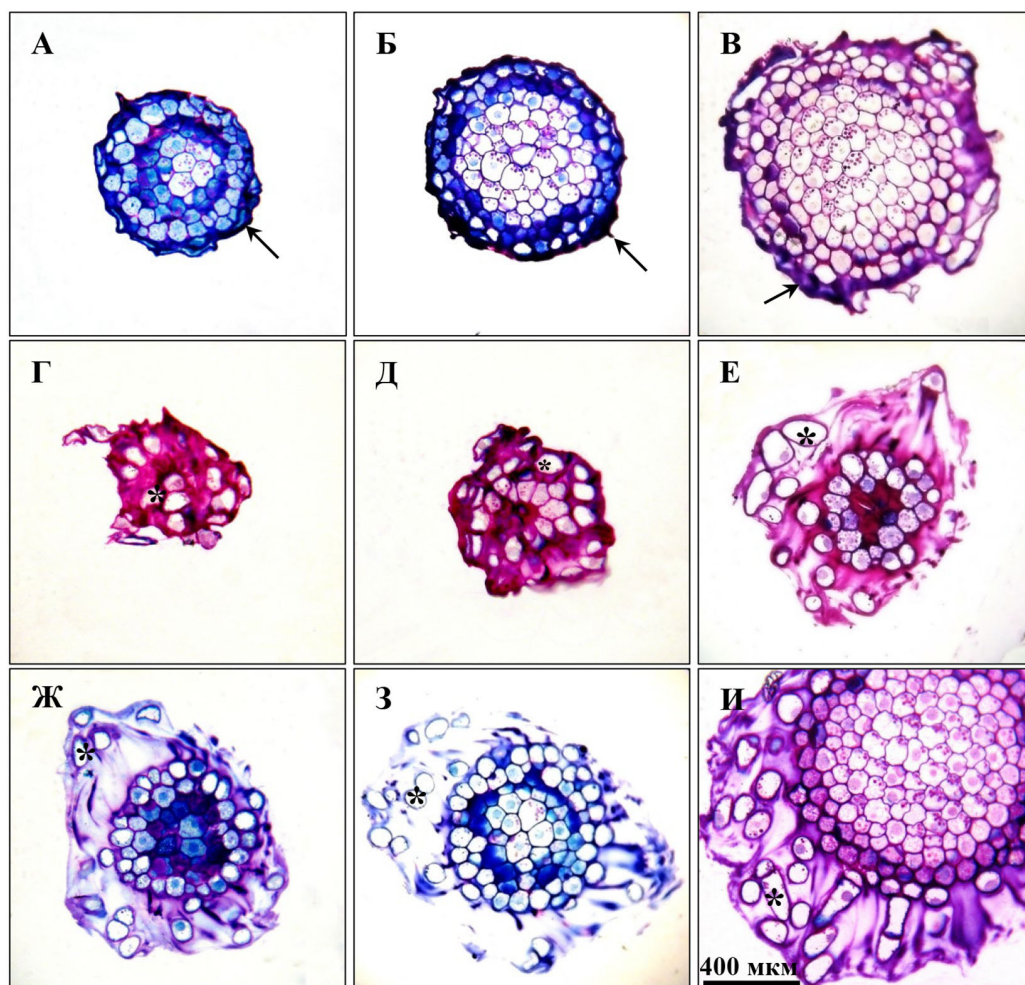


Рис. 4. Корневой апекс 2-дневных проростков пшеницы. Серийные поперечные полутонкие срезы, от вершины апекса к основанию. Окраска основным фуксином и толуидиновым синим. А, Б, В – корневой апекс в контроле (прорастивание на дистиллированной воде). По периметру срезов локализуется узкий ободок гелевого чехла фиолетового цвета (указано стрелками). Г-И – корневой апекс на среде с гуминовыми наночастицами. Апекс окружен хорошо развитым гелевым чехлом: субстанция, окрашенная в фиолетово-пурпурный цвет, в которой находятся пограничные клетки (ПК), утратившие контакт с поверхностью апекса (ПК отмечены черными звездочками). Гелевый чехол закрывает вершину и боковую поверхность апекса. Г, Д – срез верхней части гелевого чехла со свободными ПК, без среза самого корневого апекса

Fig. 4. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. Serial transverse semi-thin sections, from the top to the base of the apex. Stained with basic magenta and toluidine blue. А, Б, В – root apex in control (germination in distilled water). Along the perimeter of the sections, there is a narrow rim of a violet mucilaginous sheath (indicated by arrows). Г-И – root apex on a medium with humic nanoparticles. The apex is surrounded by a well-developed mucilaginous sheath: a violet-purple colored substance containing border cells (BCs) that have lost contact with the apex surface (BCs are marked with black asterisks). The mucilaginous sheath covers the top and the lateral surface of the apex. Г, Д – section of the upper part of the mucilaginous sheath with free BCs, with root apex uncut



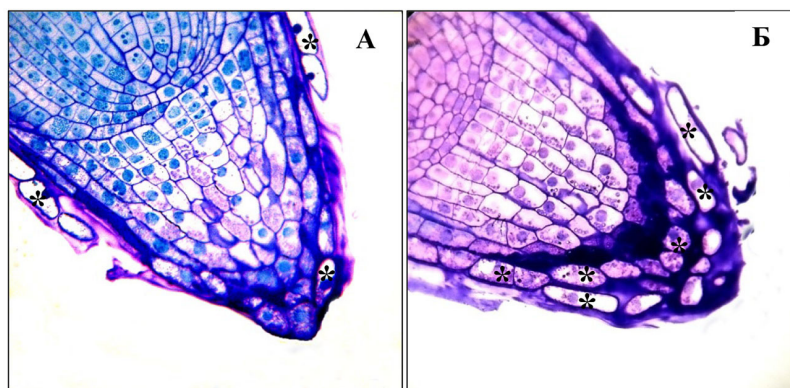


Рис. 5. Корневой апекс 2-дневных проростков пшеницы. Полутонкие продольные срезы. Плоскость среза проходит выше середины апекса. А – апекс в контрольном варианте (прорастивание на дистиллированной воде). Б – апекс на среде с гуминовыми наночастицами. На вершине апекса располагаются пограничные клетки (отмечены черными звездочками), которые утратили контакт с боковой поверхностью апекса, но удерживаются за счет гелевого чехла

Fig. 5. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. Semi-thin longitudinal sections. The plane of the cut passes above the middle of the apex. А – apex in the control (germination in distilled water). Б – apex on the medium with humic nanoparticles. At the top of the apex, there are border cells (marked with black asterisks) that have lost contact with the lateral surface of the apex but are held by the mucilaginous sheath

вировании на средах с гуминовыми наночастицами оставалась интактной, без видимых изменений (рис. 6 б-г). На участках поверхности эпиблемы, от которых отделялись ПК, также отсутствовали видимые деструктивные изменения (рис. 7 б-г).

Для оценки количества ПК, уже потерявших контакт с поверхностью корневого апекса, гелевый чехол смывали на магнитной мешалке и анализировали полученную популяцию клеток. Было показано, что после «растворения» гелевого чехла контакты между клетками сохраняются: в клеточной суспензии наряду с одиночными клетками наблюдались клеточные цепочки и клеточные пласты (рис. 8). В контроле количество одиночных клеток составило 47 % от общего числа ПК, смытых с поверхности корневого апекса. Внесение в культуральную среду крупных гуминовых наночастиц (68 нм) в концентрации 100 мг/л приводило к увеличению числа одиночных клеток в 1,4 раза, а мелких наночастиц (6,5 нм) в той же концентрации, наобо-

рот, – к снижению количества одиночных ПК в 1,6 раза по сравнению с контролем (рис. 9). То есть на среде с крупными наночастицами ПК уходили в ризосферу в основном в виде одиночных клеток (64 % одиночных клеток), а на среде с мелкими наночастицами – в основном в виде клеточных пластов и клеточных цепочек (71 % всех ПК).

Гуминовые наночастицы не только влияли на «способ» перехода ПК в ризосферу, но и вызывали дозозависимое увеличение численности ПК в ризосфере. Так, крупные наночастицы в концентрации 100 мг/л увеличивали количество ПК в 1,6 раза, а мелкие наночастицы – в 3,7 раза, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 10).

Активное смывание позволило не только собрать ПК, но и получить раствор компонентов гелевого чехла и определить содержание общего белка в нем. На средах с гуминовыми наночастицами наблюдалось дозозависимое увеличение содержания белка в гелевом чехле корневого апекса 2-дневных проростков

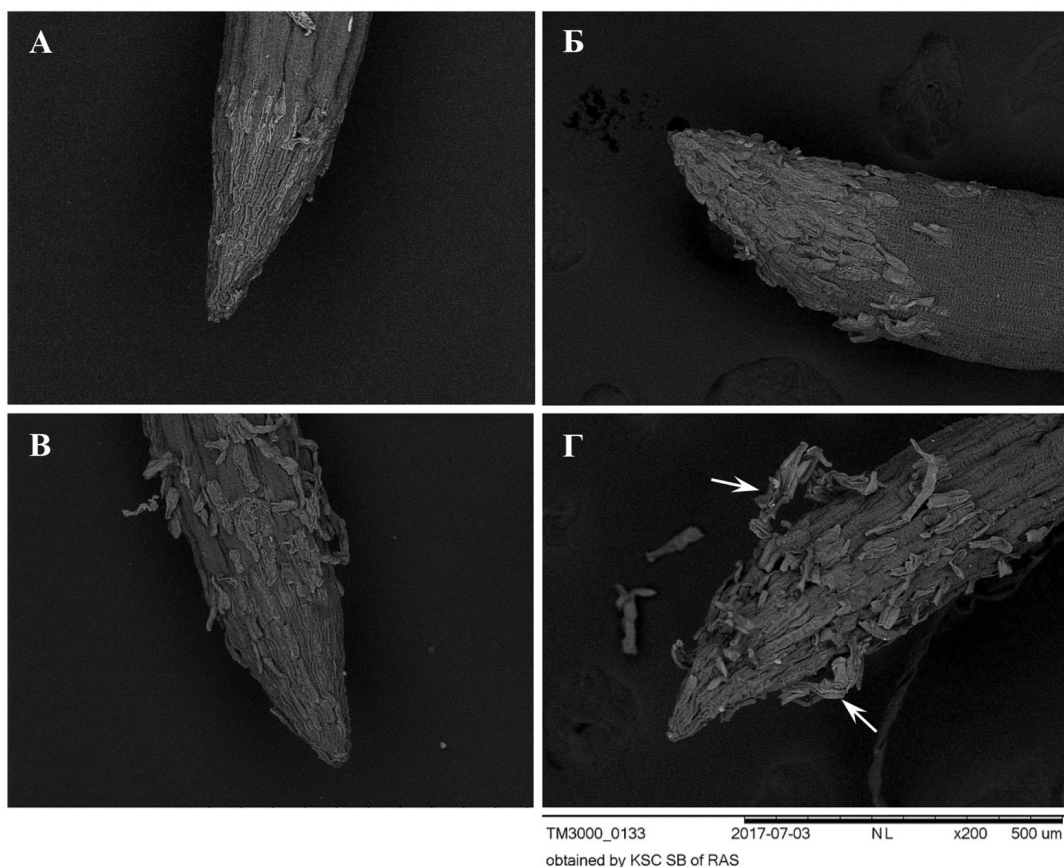


Рис. 6. Корневые апексы 2-дневных проростков пшеницы. А – контрольный вариант, прорастание на дистиллированной воде; пограничные клетки (ПК) плотно прижаты к поверхности апекса. Б, В, Г – прорастание на среде с гуминовыми наночастицами. Б – рыхлый слой ПК, которые еще не утратили связи с апексом; В – от поверхности апекса отделяются одиночные клетки; Г – ПК отделяются от поверхности апекса пластинами (указано стрелками). Поверхность эпibleмы (ризодермы) в контроле и экспериментальных вариантах одинакова (темно-серые гофрированные участки поверхности корня). Под отделяющимися ПК поверхность эпibleмы сохраняет свою интактность

Fig. 6. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. А – control, germination on distilled water; border cells (BCs) closely adhere to the surface of the apex. Б, В, Г – germination on the medium with humic nanoparticles. Б – loose layer of BCs that have not yet lost contact with the apex; В – single cells are separated from the surface of the apex; Г – BCs are separated from the surface of the apex in layers (indicated by arrows). The surface of the epiblema (rhizodermis) in the control and treatments is the same (dark gray corrugated areas of the root surface). Under the flaking BCs, the surface of the epiblema remains intact

(рис. 11). Поскольку компоненты гелевого чехла (в том числе и белки) экскретируются ПК, выявленные закономерности могут быть связаны как с увеличением количества ПК, так и с увеличением их секреторной активности. Для оценки влияния гуминовых наночастиц на экскреторную активность ПК использовали расчетный показатель: отно-

шение «содержание белка в одном гелевом чехле»/«количество ПК на апексе». Это соотношение определяли как экскреторную активность ПК.

Гуминовые наночастицы достоверно повышали экскреторную активность ПК, но дозозависимая динамика экскреторной активности существенно отличалась для круп-

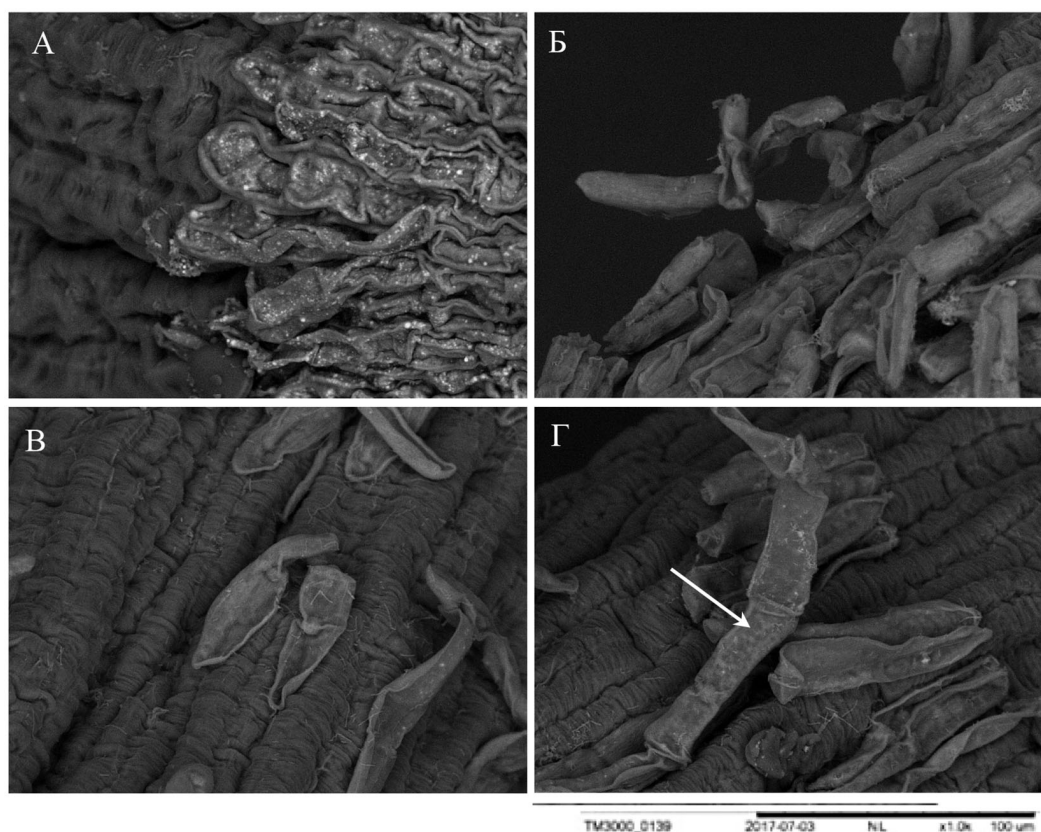


Рис. 7. Пограничные клетки (ПК) корневого апекса 2-дневных проростков пшеницы. А – контрольный вариант, проращивание на дистиллированной воде; ПК плотно прижаты к поверхности апекса и контактируют друг с другом, образуя монослой. Б, В, Г – проращивание на среде с гуминовыми наночастицами. Б – рыхлый слой ПК на поверхности апекса, контакты в слое ПК уже нарушены, но есть точки «соприкосновения» с поверхностью апекса; В – одиночные ПК, отделяющиеся от поверхности апекса; Г – ПК отделяются от поверхности апекса цепочкой (указано стрелкой)

Fig. 7. Border cells (BCs) of the root apices of 2-day-old wheat seedlings. А – control, germination on distilled water; BCs closely adhere to the surface of the apex and are in contact with each other, forming a monolayer. Б, В, Г – germination on the medium with humic nanoparticles. Б – loose BC layer on the apex surface; contacts in the BC layer are already broken, but there are points of “contact” with the apex surface; В – single BCs separating from the surface of the apex; Г – BC chains are detached from the surface of the apex (indicated by an arrow)

ных и мелких наночастиц (рис. 12). Так, наночастицы размером 68 нм в концентрации 5 мг/л повышали экскреторную активность ПК, но дальнейшее увеличение концентрации наночастиц не приводило к существенным изменениям экскреторной активности. Для мелких наночастиц (6,5 нм) максимальный стимулирующий эффект наблюдался для концентрации 25 мг/л, а при концентрации 100 мг/л наблюдалось резкое снижение экскреторной активности ПК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гуминовые наночастицы увеличивают активность отделения ПК от поверхности корневого апекса и в результате численность свободных ПК в гелевом чехле. Выявленные эффекты имеют дозо-зависимый характер и существенно отличаются для наночастиц размером 68 нм и 6,5 нм.

Еще одной эффекторной системой гуминовых наночастиц является окислительно-восстановительный гомеостаз: их биологиче-

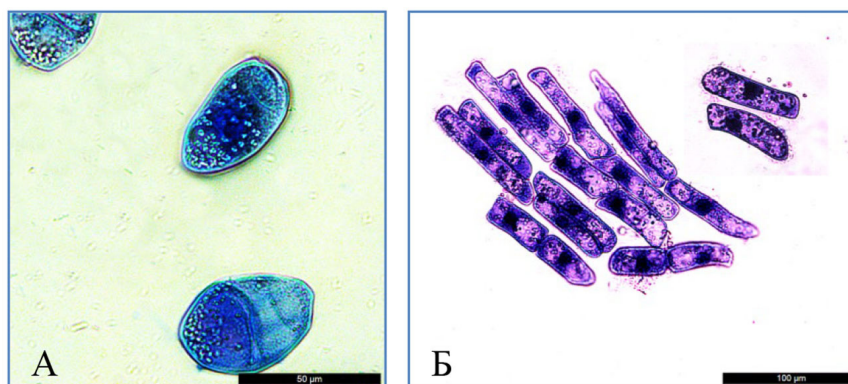


Рис. 8. Пограничные клетки в суспензии после активного смывания. А – одиночные овальные клетки с гранулами крахмала в цитоплазме. Масштабная линейка 50 мкм. Б – фрагмент монослоя из палочковидных клеток и две одиночные палочковидные клетки. Масштабная линейка 100 мкм

Fig. 8. Border cells in suspension after active rinsing. A – single oval cells with starch granules in the cytoplasm. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . Б – a fragment of a monolayer of rod-shaped cells and two single rod-shaped cells. Scale bar 100  $\mu\text{m}$

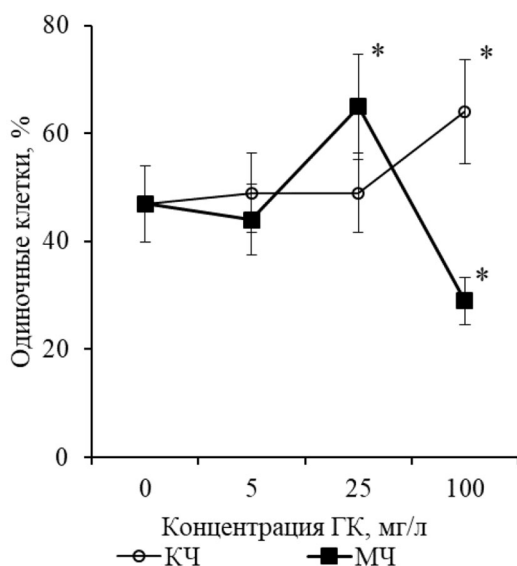


Рис. 9. Количество одиночных клеток в суспензии пограничных клеток. Активное смывание клеток с корневых апексов 2-дневных проростков. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 9. Number of single cells in border cell suspension. Active washing off of cells from root apices of 2-day-old seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ( $p < 0,05$ ). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

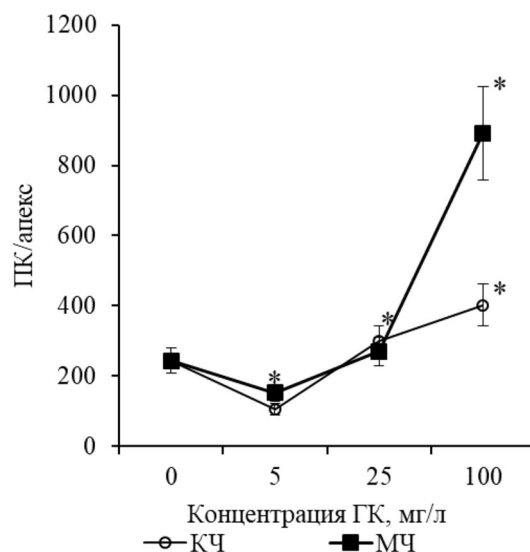


Рис. 10. Количество пограничных клеток в корневом апексе 2-дневных проростков пшеницы. Активное смывание клеток с корневых апексов. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 10. The number of border cells in the root apices of 2-day-old wheat seedlings. Active washing off of cells from root apices. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ( $p < 0,05$ ). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

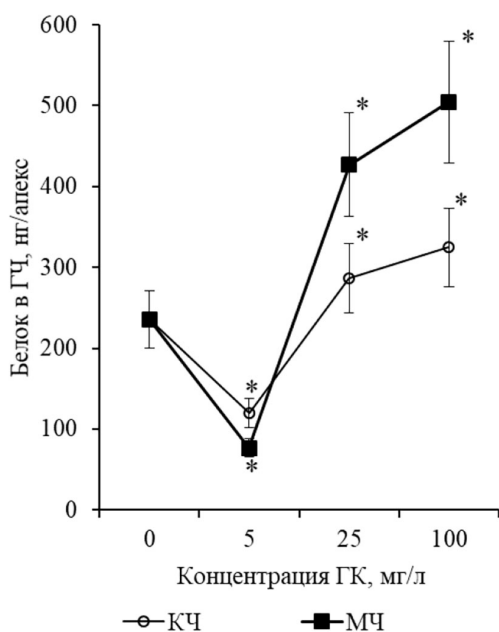


Рис. 11. Содержание белка (нг/апекс) в гелевом чехле корневого апекса 2-дневных проростков пшеницы. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 11. Protein content (ng/apex) in the mucilaginous sheath of the root apex of 2-day-old wheat seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ( $p < 0,05$ ). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

ская активность может реализоваться через индукцию мягкого окислительного стресса. В связи с этим на следующем этапе работы оценивали содержание карбонилированных белков (КБ), малонового диальдегида (МДА) и пролина (как маркеров окислительного стресса) в корнях 2-дневных проростков.

*Влияние гуминовых наночастиц на содержание МДА, карбонилированных белков и пролина в корнях 2-дневных проростков T. aestivum*

При культивировании на средах с крупными наночастицами в концентрации 25 мг/л и 100 мг/л в корнях 2-суточных проростков содержание КБ значительно возрастало, соот-

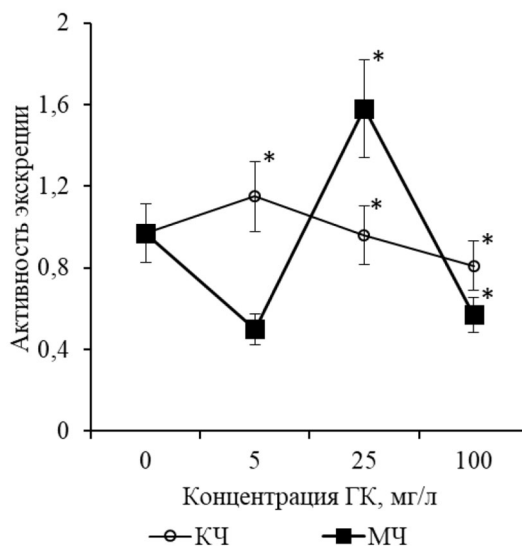


Рис. 12. Экскреторная активность пограничных клеток (ПК). Экскреторную активность оценивали как соотношение количества белка в гелевом чехле апекса и количества ПК на апекс. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 12. Excretory activity of border cells (BCs). Excretory activity was assessed as the ratio of the amount of protein in the mucilaginous sheath of the apex to the number of BCs per apex. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ( $p < 0,05$ ). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

ветственно, в 2 и 5 раз, по сравнению с контролем (рис. 13 б). Крупные наночастицы в изученных концентрациях не влияли на содержание МДА (рис. 13 а).

Сравнение динамики содержания КБ и МДА позволяет предположить, что на среде с крупными гуминовыми наночастицами значительная часть образующегося в корнях МДА включается в окислительные модификации белков, а ТБК-активный пул остается в пределах значений, характерных для контрольного варианта (рис. 13).

В отличие от крупных наночастиц, на среде с мелкими гуминовыми наночастицами (6,5 нм) содержание МДА в корнях

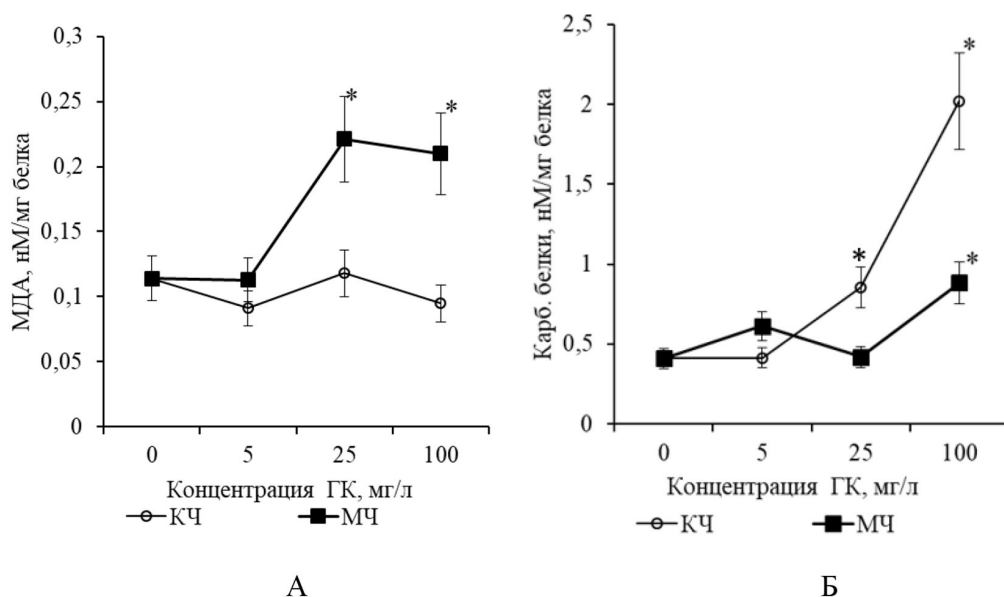


Рис. 13. Содержание МДА (А) и карбонилированных белков (Б) (нМ/мг белка) в корнях 2-дневных проростков пшеницы. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 13. The contents of MDA (A) and carbonylated proteins (Б) (nM/mg of protein) in the roots of 2-day-old wheat seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ( $p < 0.05$ ). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

проростков увеличивалось в 2 раза (концентрации 25 мг/л и 100 мг/л). Увеличение содержания КБ в корнях было отмечено только для концентрации 100 мг/л (рис. 13).

Увеличение содержания КБ и МДА сопровождалось дозозависимым увеличением содержания пролина в корнях проростков при культивировании на среде и с мелкими, и крупными гуминовыми наночастицами (рис. 14).

Полученные результаты свидетельствуют, что в условиях гидропонной культуры гуминовые наночастицы индуцируют окислительный стресс в корнях 2-дневных проростков. Уровень продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов зависит от концентрации и размера наночастиц. Следует отметить, что индуцированный гуминовыми наночастицами окислительный стресс не сопровождался ингибированием роста корней.

## Обсуждение

В литературе эффекты ГК часто объясняют их влиянием на ризосферный метаболизм (García et al., 2016a; Olaetxea et al., 2015, 2016). Ризосфера, прикорневая зона, формируется в процессе корневой экскреции и играет важную роль в процессах адаптации развивающегося корня проростка и взрослого растения к различным биотическим и абиотическим факторам среды (De-la-Peña, Loyola-Vargas, 2014; Holz et al., 2018; Javed et al., 2018; Rekha et al., 2018; Preece et al., 2018).

Показано, что важнейшим структурно-функциональным элементом ризосферной системы являются ПК (Hawes et al., 1998, 2002, 2016 a, b). ПК представляют собой специфическую популяцию соматических метаболически активных клеток. На разных этапах дифференцировки ПК могут реализовать свои функции в условиях физического контакта

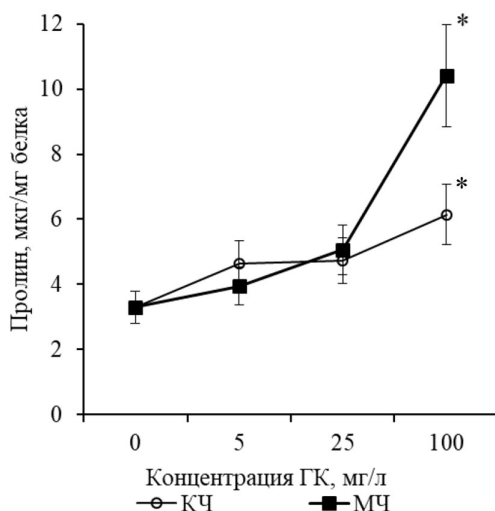


Рис. 14. Содержание пролина (мкг/мг белка) в корнях 2-дневных проростков пшеницы. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 14. Proline content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) in the roots of 2-day-old wheat seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ( $p < 0.05$ ). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

с корневым апексом, а после утраты физического контакта с корневым апексом – в гелевом чехле, полисахаридно-гликопротеиновом матриксе, который окружает апекс и является продуктом экскреторной активности ПК. О возможности длительного автономного функционирования свидетельствуют многочисленные гранулы крахмала в цитоплазме ПК (рис. 8 а).

Гуминовые наночастицы увеличивали активность отделения ПК от поверхности корневого апекса и перехода в гелевый чехол (рис. 3). Отделение ПК связано с ремоделированием клеточных стенок. Известно, что в ремоделировании клеточных стенок участвуют не только ферменты (эндо-1,4-манназы, пектинметилэстеразы, целлюлазы), но и активные формы кислорода (АФК): неферментативная окислительная модификация компонентов клеточной стенки вносит существенный вклад в разрыхление клеточных стенок на ранних этапах развития про-

ростка (Nonogaki et al., 2010; Scheler et al., 2015; Chen et al., 2016 a, b). Так как гуминовые наночастицы индуцировали окислительный стресс (повышали содержание КБ, МДА, пролина, рис. 13–14), можно полагать, что увеличение активности отделения ПК от поверхности корневого апекса в значительной степени связано с окислительным ремоделированием клеточных стенок. При этом следует отметить, что вклад АФК в процессы ремоделирования участков клеточных стенок, контактирующих с поверхностью корневого апекса, и участков клеточных стенок между самими ПК может быть различным. Так, гуминовые наночастицы увеличивали активность бокового отслаивания ПК от поверхности корневого апекса, но при этом сохранялись контакты ПК друг с другом (рис. 8).

На средах с гуминовыми наночастицами увеличивалась не только численность свободных ПК, но и размеры гелевого чехла (рис. 3). Динамика расчетного параметра ак-

тивности экскреции позволяет полагать, что увеличение размеров гелевого чехла связано не только с увеличением численности продуцентов (ПК), но и с увеличением экскреторной активности ПК (рис. 12). Известно, что ПК активно экскретируют в ризосферу более 100 различных белков (Knox et al., 2007; Wen et al., 2007). Возможно, что влияние гуминовых наночастиц на экскреторную активность ПК реализуется через индукцию окислительного стресса. Известно, что индукторы окислительного стресса увеличивают активность экскреции корневых экзометаболитов (UdDin et al., 2015; Javed et al., 2018).

Гуминовые наночастицы не стимулировали рост корней проростков, но индуцированное наночастицами формирование многочисленной популяции свободных ПК и активная экскреция экзометаболитов может способствовать быстрому становлению ризосферной системы и в результате обеспечивать быстрый рост и развитие корневой системы, ее устойчивость к различным биотическим и абиотическим факторам на более поздних этапах развития проростка.

Реализацию биологических эффектов ГК связывают с индукцией мягкого окислительного стресса: ГК увеличивают продукцию АФК в растительных клетках (García et al., 2016a, b). АФК-сигналинг, окислительная модификация белков, липидов и РНК играют важную роль на ранних этапах прорастания зерновки (Job et al., 2005; El-Maarouf-Bouteau et al., 2013; Oracz, Karpiński, 2016; Li et al., 2017). В прорастающей зерновке окислительная модификация белков увеличивает активность их протеолитической деградации в различных типах протеосомных систем и определяет доступность аминокислот для включения в синтез новых белков (Oracz, Stawska, 2016). Можно полагать, что активность окислительной модификации белков

в значительной степени определяет скорость изменений протеома проростка на ранних этапах его развития.

Гуминовые наночастицы способствовали дозозависимому увеличению содержания КБ (рис. 13 б). Опираясь на данные литературы, этот факт можно рассматривать как свидетельство более активного синтеза белков *de novo* в проростках при культивировании на средах с гуминовыми наночастицами.

Дозозависимое увеличение содержания МДА наблюдалось только для гуминовых наночастиц размером 6,5 нм (рис. 13 а). Уровень МДА является маркером структурно-функциональных перестроек мембранных систем клетки. Окислительные модификации липидов могут влиять на стабильность мембранных рафтов, плотность упаковки жирнокислотных цепей и микровязкость мембраны (Conte et al., 2015; Neto, Cordeiro, 2016), индуцировать деформации липидного бислоя, образование пор и переход в мицеллярную фазу (Voornou et al., 2015). Эти структурные перестройки рассматриваются как регуляторные механизмы, определяющие активность мембраносвязанных процессов и функциональный статус клетки. Белковый синтез в значительной степени зависит от мембранных систем клетки и окислительные модификации мембранных липидов могут играть важную роль в активации синтеза белков *de novo* и перестройках протеома проростка при культивировании на средах с гуминовыми наночастицами.

Наряду с КБ и МДА, маркером индуцированного окислительного стресса в растительных клетках является содержание пролина. АФК являются медиаторами сигнальных систем, которые контролируют метаболизм пролина (Yang et al., 2009; Zhang, Becker, 2015; Copley et al., 2017). Проллин в условиях окислительного стресса «работает» как: а) хими-



ческий шаперон, стабилизирует белки и предотвращает их агрегацию (Samuel et al., 2000); б) молекулярный сквенджер АФК (Kaul et al., 2008; Signorelli et al., 2014); в) предотвращает истощение внутриклеточного пула глутатиона GSH (Hoque et al., 2008; Xu et al., 2009). Окисление 1 молекулы пролина в митохондриях приводит к образованию приблизительно 30 АТФ-эквивалентов (Hare, Cress, 1997; Cabassa-Hourton et al., 2016), которые используются для реализации компенсаторно-адаптивных перестроек метаболизма в условиях стресса. В связи с этим дозозависимое увеличение содержания пролина в корнях проростков при культивировании на средах с гуминовыми наночастицами (рис. 14) можно рассматривать как свидетельство перестроек энергетического метаболизма проростка: увеличения пула энергетических эквивалентов, которые могут использоваться для активного синтеза белков *de novo* (и других энергозависимых процессов).

С другой стороны, индуцированное гуминовыми наночастицами повышение уровня пролина может поддерживать активность окислительных модификаций белков и липидов на «регуляторном уровне» и предотвращать развитие деструктивных процессов.

Окисление пролина в митохондриях и образование АТФ-эквивалентов сопровождается образованием АФК и вторичной активацией процессов окислительной модификации белков и липидов и АФК-сигналинга (Garcia de la Garma et al., 2015). Этот феномен не позволяет оценить «величину» окислительного стресса, который вызывают сами гуминовые наночастицы.

Полученные результаты позволяют предполагать, что гуминовые наночастицы индуцируют глубокие перестройки метаболизма корня развивающегося проростка. Эти перестройки на более поздних этапах разви-

тия проростка могут реализоваться в выраженной стимуляции роста корневой системы и надземной части проростка.

В заключении следует отметить, что выявленные дозозависимые эффекты существенно различались для мелких и крупных наночастиц. Наночастицы размером 6,5 нм оказывали значительно более выраженное влияние на изученные параметры (рис. 13–14). При этом взаимоотношения между параметрами (соотношения Пролин/КБ, Пролин/МДА, КБ/МДА) значительно варьировали в зависимости от размеров наночастиц (рис. 15). Особенности динамики соотношений Пролин/КБ, Пролин/МДА, КБ/МДА позволяют предположить, что АФК-зависимый сигналинг может существенно различаться для гуминовых наночастиц разных размерных классов.

Известно, что биологические эффекты наночастиц в значительной степени зависят от размеров (Kulikova et al., 2017; Wang et al., 2018; Zheng et al., 2018). В целом мелкие наночастицы биологически более активны, чем крупные: уровень индуцированного окислительного стресса для мелких наночастиц выше, чем для крупных (Carlson et al., 2008; Makama et al., 2018). Предполагается, что способность гуминовых наночастиц индуцировать окислительный стресс в корневой системе связан с тем, что наночастицы могут временно «закупоривать» поровые комплексы в клеточных стенках и тем самым индуцировать дозозависимый окислительный стресс. Под влиянием корневых экзометаболитов происходит молекулярная дезинтеграция гуминовых наночастиц и поровые комплексы освобождаются (Piccolo, 2002; Olaetxea et al., 2015). Авторы не изучали зависимость окислительного стресса от размеров молекулярных агрегатов ГК, но можно предположить, что более мелкие частицы ГК «закупорива-

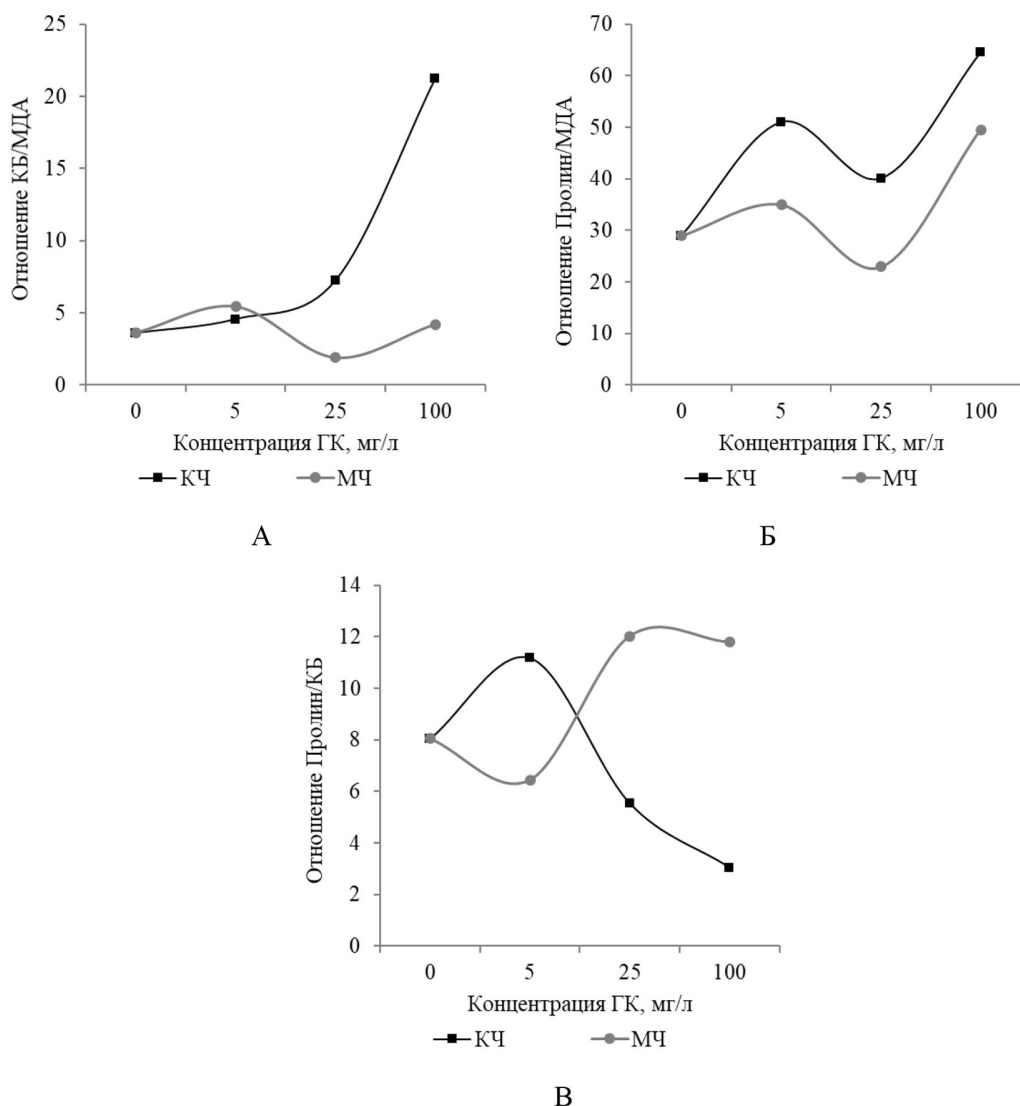


Рис. 15. Динамика соотношений между основными маркерами окислительного стресса (пролин, карбонилированные белки и МДА). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 15. Dynamics of proportions of the main markers of oxidative stress (proline, carbonylated proteins, and MDA). КЧ – larger humic nanoparticles, МЧ – smaller humic nanoparticles

ют» поровые комплексы на более длительное время и в результате индуцированный ими окислительный стресс будет выражен в большей степени, чем для более крупных частиц ГК.

Полученные результаты позволяют предполагать, что варьирование размеров гуминовых наночастиц может быть использовано

для целенаправленной регуляции их биологической активности в ризосфере на ранних этапах прорастания.

### Заключение

Гуминовые наночастицы увеличивали численность популяции ПК корневого апекса 2-дневных проростков. Размеры гелевого

чехла и содержание общего белка в составе гелевого чехла корневого апекса 2-дневных проростков на средах с гуминовыми наночастицами значительно увеличивались. При проращивании на средах с гуминовыми наночастицами деструктивные изменения в корневом апексе 2-дневных проростков не выявлялись. Гуминовые наночастицы ин-

дуцировали окислительный стресс: в корнях 2-дневных проростков увеличивалось содержание КБ, МДА и пролина. Индуцированный гуминовыми наночастицами окислительный стресс не сопровождался ингибированием роста корня. Эффекты гуминовых наночастиц имели дозозависимый характер и существенно варьировали в зависимости от их размеров.

### Список литературы / References

- Aguiar N.O., Novotny E.H., Oliveira A.L., Rumjanek V.M., Olivares F.L., Canellas L.P. (2013) Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration*, 129: 95–102
- Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Come D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, 97(1): 104–110
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant & Soil*, 39(1): 205–207
- Boonnoy P., Jarerattanachai V., Karttunen M., Wong-ekkabut J. (2015) Bilayer deformation, pores, and micellation induced by oxidized lipids. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(24): 4884–4888
- Busato J.G., de Carvalho C.M., Zandonadi D.B., Sodr  F.F., Ribeiro Mol A., Lima de Oliveira A., Navarro R.D. (2018) Recycling of wastes from fish beneficiation by composting: chemical characteristics of the compost and efficiency of their humic acids in stimulating the growth of lettuce. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(36): 35811–35820
- Cabassa-Hourton C., Schertl P., Bordenave-Jacquemin M., Saadallah K., Guivarc'h A., Lebreton S., Planchais S., Klodmann J., Eubel H., Crilat E., Lefebvre-De Vos D., Ghelis T., Richard L., Abdelly C., Carol P., Braun H.P., Savour  A. (2016) Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 473(17): 2623–2634
- Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L. K., Hess K.L., Jones R.L., Schlager J.J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(43): 13608–13619
- Carty J.L., Bevan R., Waller H., Mistry N., Cooke M., Lunec J., Griffiths H.R. (2000) The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2): 729–735
- Chen B., Ma J., Xu Z., Wang X. (2016a) Abscisic acid and ethephon regulation of cellulase in the endosperm cap and radicle during lettuce seed germination. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(10): 859–869
- Chen B.X., Li W.Y., Gao Y.T., Chen Z.J., Zhang W.N., Liu Q.J., Chen Z., Liu J. (2016b) Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1219

Chen X., Kou M., Tang Z., Zhang A., Li H., Wei M. (2017) Responses of root physiological characteristics and yield of sweet potato to humic acid urea fertilizer. *PLoS One*, 12(12): e0189715

Conte E., Bardi E., Losito I., Annese C., Ciminale F., Megli F.M. (2015) Does hydrogen bonding contribute to lipoperoxidation-dependent membrane fluidity variation? An EPR-spin labeling study. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1848(10): 2040–2049

Copley T.R., Aliferis K.A., Kliebenstein D.J., Jabaji S.H. (2017) An integrated RNAseq-1H NMR metabolomics approach to understand soybean primary metabolism regulation in response to *Rhizoctonia* foliar blight disease. *BMC Plant Biology*, 17(1): 84

De-la-Peña C., Loyola-Vargas V. M. (2014) Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. *Plant Physiology*, 166(2): 701–719

El-Maarouf-Bouteau H., Meimoun P., Job C., Job D., Bailly C. (2013) Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4: 77

García A. C., de Souza L. G., Pereira M. G., Castro R. N., García-Mina J. M., Zonta E., Lisboa F. J., Berbara R. L. (2016a) Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports*, 6: 20798

García A. C., Olaetxea M., Santos L. A., Mora V., Baigorri R., Fuentes M., Zamarreño A.M., Berbara R. L., Garcia-Mina J. M. (2016b) Involvement of hormone- and ROS-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. *BioMed Research International*, 2016: 3747501

Garcia de la Garma J., Fernandez-Garcia N., Bardisi E., Pallol B., Asensio-Rubio J. S., Bru R., Olmos E. (2015) New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system. *New Phytologist*, 205(1): 216–239

Hare P.D., Cress W.A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21: 79–102

Hawes M.C., Brigham L.A., Wen F., Woo H.H., Zhu Y. (1998) Function of root border cells in plant health: Pioneers in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 311–327

Hawes M.C., Bengough G., Cassab G., Ponce G. (2002) Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4): 352–367

Hawes M., Allen C., Turgeon B.G., Curlango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D.A., Xiong Z. (2016a) Root border cells and their role in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 143–161

Hawes M.C., McLain J., Ramirez-Andreotta M., Curlango-Rivera G., Flores-Lara Y., Brigham L.A. (2016b) Extracellular trapping of soil contaminants by root border cells: New insights into plant defense. *Agronomy*, 6(1): 5

Holz M., Zarebanadkouki M., Kuzyakov Y., Pausch J., Carminati A. (2018) Root hairs increase rhizosphere extension and carbon input to soil. *Annals of Botany*, 121(1): 61–69

Hoque M. A., Banu M.N., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. (2008) Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 165(8): 813–824

Javed M.T., Akram M.S., Habib N., Tanwir K., Ali Q., Niazi N.K., Gul H., Iqbal N. (2018) Deciphering the growth, organic acid exudations, and ionic homeostasis of *Amaranthus viridis* L. and *Portulaca oleracea* L. under lead chloride stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3): 2958–2971

Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D. (2005) Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiology*, 138(2): 790–802

Kaul S., Sharma S. S., Mehta I. K. (2008) Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids*, 34(2): 315–320

Kesba H. H., El-Beltagi H. S. (2012) Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4): 287–293

Knox O. G. G., Gupta V. V. S. R., Nehl D. B., Stiller W. N. (2007) Constitutive expression of Cry proteins in roots and border cells of transgenic cotton. *Euphytica*, 154(1–2): 83–90

Kulikova N. A., Polyakov A. Y., Lebedev V. A., Abroskin D. P., Volkov D. S., Pankratov D. A., Klein O. I., Senik S. V., Sorkina T. A., Garshev A. V., Veligzhanin A. A., Garcia Mina J. M., Perminova I. V. (2017) Key roles of size and crystallinity of nanosized iron hydr(oxides) stabilized by humic substances in iron bioavailability to plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(51): 11157–11169

Lamar R. T., Olk D. C., Mayhew L., Bloom P. R. (2014) A new standardized method for quantification of humic and fulvic acids in humic ores and commercial products. *Journal of AOAC International*, 97(3): 721–730

Li W. Y., Chen B. X., Chen Z. J., Gao Y. T., Chen Z., Liu J. (2017) Reactive oxygen species generated by NADPH oxidases promote radicle protrusion and root elongation during rice seed germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1): 110

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275

Makama S., Kloet S. K., Piella J., van den Berg H., de Ruijter N. C. A., Puentes V. F., Rietjens I. M. C. M., van den Brink N. W. (2018) Effects of systematic variation in size and surface coating of silver nanoparticles on their in vitro toxicity to macrophage RAW 264.7 cells. *Toxicological Sciences*, 162(1): 79–88

Mora V., Olaetxea M., Bacaicoa E., Baigorri R., Fuentes M., Zamarreño A. M., Garcia-Mina J. M. (2014) Abiotic stress tolerance in plants: exploring the role of nitric oxide and humic substances. *Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology*. Khan M., Mobin M., Mohammad F., Corpas F. (eds.) Amsterdam, Springer Cham, p. 243–264

Morozesk M., Bonomo M. M., Souza I. D. C., Rocha L. D., Duarte I. D., Martins I. O., Dobbss L. B., Carneiro M. T. W. D., Fernandes M. N., Matsumoto S. T. (2017) Effects of humic acids from landfill leachate on plants: An integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis. *Chemosphere*, 184: 309–317

Muscolo A., Sidari M., Attinà E., Francioso O., Tugnoli V., Nardi S. (2007) Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal*, 71(1): 75–85

Nagasawa K., Wang B., Nishiya K., Ushijima K., Zhu Q., Fukushima M., Ichijo T. (2016) Effects of humic acids derived from lignite and cattle manure on antioxidant enzymatic activities of barley root. *Journal of Environmental Science and Health – Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(2): 81–89

Neto A. J. P., Cordeiro R. M. (2016) Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(9): 2191–2198

Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D. (2010) Germination—still a mystery. *Plant Science*, 179(6): 574–581

Olaetxea M., Mora V., Bacaicoa E., Garnica M., Fuentes M., Casanova E., Zamarreño A.M., Iriarte J.C., Etayo D., Ederra I., Gonzalo R., Baigorri R., García-Mina J. M. (2015) Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiology*, 169(4): 2587–2596

Olaetxea M., Mora V., García A. C., Santos L. A., Baigorri R., Fuentes M., Garnica M., Berbara R. L., Zamarreño A. M., Garcia-Mina J. M. (2016) Root-shoot signaling crosstalk involved in the shoot growth promoting action of rhizospheric humic acids. *Plant Signaling & Behavior*, 11(4): e1161878

Ondrasek G., Rengel Z., Romic D. (2018) Humic acids decrease uptake and distribution of trace metals, but not the growth of radish exposed to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151: 55–61

Oracz K., Karpinski S. (2016) Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 7: 864

Oracz K., Stawska M. (2016) Cellular recycling of proteins in seed dormancy alleviation and germination. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1128

Piccolo A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75: 57–134

Preece C., Farré-Armengol G., Llusà J., Peñuelas J. (2018) Thirsty tree roots exude more carbon. *Tree Physiology*, 38(5): 690–695

Rekha K., Baskar B., Srinath S., Usha B. (2018) Plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* RR 4 isolated from rice rhizosphere induces malic acid biosynthesis in rice roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(1): 20–27

Samuel D., Kumar T.K., Ganesh G., Jayaraman G., Yang P.W., Chang M.M., Trivedi V.D., Wang S.L., Hwang K.C., Chang D.K., Yu C. (2000) Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Science*, 9(2): 344–352

Scheler C., Weitbrecht K., Pearce S.P., Hampstead A., Büttner-Mainik A., Lee K.J., Voegele A., Oracz K., Dekkers B.J., Wang X., Wood A.T., Bentsink L., King J.R., Knox J.P., Holdsworth M.J., Müller K., Leubner-Metzger G. (2015) Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiology*, 167(1): 200–215

Signorelli S., Coitiño E.L., Borsani O., Monza J. (2014) Molecular mechanisms for the reaction between OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(1): 37–47

Stevenson F.J. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd edition. Wiley, 512 p.

Tahiri A., Delporte F., Muhovski Y., Ongena M., Thonart P., Druart P. (2016) Change in ATP-binding cassette B 1/19, glutamine synthetase and alcohol dehydrogenase gene expression during root elongation in *Betula pendula* Roth and *Alnus glutinosa* L. Gaertn in response to leachate and leonardite humic substances. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98: 25–38

Taspinar M.S., Aydin M., Sigmaz B., Yildirim N., Agar G. (2017) Protective role of humic acids against picloram-induced genomic instability and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(29): 22948–22953

Trevisan S., Francioso O., Quaggiotti S., Nardi S. (2010) Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6): 635–643

UdDin I., Bano A., Masood S. (2015) Chromium toxicity tolerance of *Solanum nigrum* L. and *Parthenium hysterophorus* L. plants with reference to ion pattern, antioxidation activity and root exudation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 271–278

Wang Y., Cui Y., Zhao Y., Zhao Q., He B., Zhang Q., Wang S. (2018) Effects of surface modification and size on oral drug delivery of mesoporous silica formulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 513: 736–747

Wen F., VanEtten H. D., Tsaprailis G., Hawes M. C. (2007) Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiology*, 143(2): 773–783

Xu J., Yin H., Li X. (2009) Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Reports*, 28(2): 325–333

Yang S. L., Lan S. S., Gong M. (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 166(15): 1694–1699

Zhang L., Becker D. F. (2015) Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6: 552

Zheng W., Xu Y. M., Wu D. D., Yao Y., Liang Z. L., Tan H. W., Lau A. T. Y. (2018) Acute and chronic cadmium telluride quantum dots-exposed human bronchial epithelial cells: The effects of particle sizes on their cytotoxicity and carcinogenicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1): 899–903