

РАЗВИТИЕ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ ОГУРЦА «КОНКУРЕНТ» НА РАННИХ ЭТАПАХ РОСТА В УСЛОВИЯХ ФОТОРЕСПИРАТОРОГО СТРЕССА

Апашева Л.М.¹, Лобанов А.В.¹, Лукина Н.А.², Сергейчев К.Ф.²

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

г. Москва, РФ

² Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

г. Москва, РФ; e-mail: natlukina1946@yandex.ru

Поступила в редакцию: 04.08.2020

Аннотация. Изучалось развитие растения огурец на ранних этапах роста в герметичных стеклянных сосудах, начиная с проростков семян, развивающихся за счет внутренних ресурсов, запасенных в семени, в отсутствие почвогрунта, в ограниченных объемах воздуха, дистиллированной воды (ДВ) или воды, активированной плазмой СВЧ разряда (ВАП). ВАП получали непрерывной обработкой ДВ струей СВЧ плазмы аргона в течении 30 минут в открытой атмосфере. При СВЧ мощности 0,9 кВт температура плазмы аргона ~4000°К. ВАП представлял собой водный раствор пероксида водорода с концентрацией $[H_2 O_2] \approx 4 \times 10^{-3} M$ и окислов азота концентрацией $[NO_x] \approx 7 \times 10^{-4} M$; посторонних примесей в виде окислов металлов и др. не содержит. Условия опытов постоянные: температура 20°С, освещение свет/темнота 12/12 час. Сосуды не вскрывали на протяжении 40 суток. Показано, что растения, выращенные на ДВ доживали максимум до 15 суток, тогда как, выращенные на ВАП с разведением в 100 и 500 раз увеличивает продолжительность жизни в ~ 3 раза. ВАП способствует быстрому ускоренному развитию растений, увеличивает объем зеленой массы, продолжительность жизни, служит дополнительным по отношению к ДВ источником кислорода и азота. ВАП же разбавленный в 10 раз с $[H_2 O_2] = 10^{-4} M$ блокирует рост растений. Сравнение веса сухих семян и веса высушенных растений по окончании эксперимента, показало, что основным источником для роста и развития растений в замкнутом объеме оказался углерод, запасенный в самом семени.

Ключевые слова: плазма, активированный, замкнутый объем, пероксид, концентрация, проросток.

Выращивание растений *in vitro* было продемонстрировано Д. Латимером [1], который хотел проверить, могут ли растения развиваться и расти в автономной среде. Его «бутылочный сад» прожил 53 года с однократным поливом на необновляемом почвогрунте. Из четырех саженцев, посаженных в огромную шаровидную 45-литровую бутылку, куда он добавил 0,14л воды и закупорил, прижилась лишь один (традесканция) и продолжал расти. «Растение внутри процветало, наполняя шаровидную бутылку здоровой листвой». Через 12 лет он открыл растение, полил его небольшим количеством воды и снова закупорил. Все, что растение получало извне – был солнечный свет, который был нужен для фотосинтеза растений и выработки питательных веществ. Для равномерной инсоляции бутылку с растением поворачивали. Традесканции известны тем, что являются особенно «выносливыми» растениями. Вокруг этого эксперимента не утихают споры о возможности столь долговременной жизнеспособности автономной экосистемы.

Экосистема Д. Латимера могла существовать, вероятно, благодаря симбиозу фотосинтеза растения, поставляющего в замкнутую атмосферу кислород, и клеточного дыхания почвенной микрофлоры, выделяющей углекислый газ. Отмирающие листья растения и кислород были питательной средой бактерий, которые выделяли двуокись углерода, необходимого растению для фотосинтеза и роста. Вода, выделяемая растением вместе с кислородом, конденсировалась на листьях, стенках бутылки и возвращалась к корням в почву. Повторяющиеся суточные циклы жизни растений сопровождалась круговоротом воды, кислорода и двуокиси углерода. Нужные для роста растения минералы заимствовались из почвы. Эта живая замкнутая экосистема действовала в соответствии с законом сохранения материи.

Целью настоящей работы было, изучить развитие растений на ранних этапах роста *in vitro* в замкнутом стеклянном сосуде, начиная с проростков, в отсутствие почвогрунта, в присутствии лишь ограниченных объемов дистиллированной воды и воздуха с начальным давлением, равным нормальной атмосфере. Опыты проводились в одинаковых условиях с двумя разными типами воды: дистиллированная вода (ДВ) и дистиллированная вода, активированная плазмой СВЧ разряда (далее ВАП). Задачами экспериментов было:

1. Выяснить способность проростков выбранного вида расти и развиваться за счет внутренних ресурсов, запасенных в семени;
2. Сравнить скорости роста с указанными типами воды при одинаковых внешних условиях по температуре и освещенности и разными по концентрации растворами ВАП.

Материалы и методы.

Для выращивания растений в замкнутом объеме использовали стеклянные культуральные сосуды с притертыми крышками, которые для надежной консервации заливали парафином. В каждом опыте велся учет следующих параметров (в пересчете на одно выращиваемое растение):

1. объем воздуха;
2. площадь дна сосуда;

3. количество воды (ДВ) и раствора ВАП.

Внешние условия опытов: температура $+19\pm 21^\circ\text{C}$; освещенность 400 Лм с цикличностью: свет/темнота 12/12 часов.

Опыты проводились с семенами огурца «Конкурент», регистрационный номер 7605854, в Гос. реестре селекционных достижений [2], сорт раннеспелый, устойчивый к мучнистой росе. Средние весовые характеристики испытуемых семян в расчете на 5 растений: сухих семян – 0,14 г, наклонувшихся – 0,2 г, вес проростков с начально раскрытым листом – 0,5 г.

В экспериментах использовались: вода бистиллированная и ВАП, полученная непрерывной обработкой дистиллированной воды струей плазмы аргона в течение 30 минут в открытой атмосфере при мощности СВЧ-плазмотрона 0,9 кВт, температура плазмы аргона 4000 К. Исходный состав ВАП представляет собой водный раствор пероксида водорода H_2O_2 с концентрацией $4\times 10^{-3}\text{M}$ (измерено методом йодометрии [4]) и нитратов NO_x , с концентрацией $7\times 10^{-4}\text{M}$, определенной по проводимости раствора [5]. Вклад H_2O_2 в общую проводимость раствора ничтожно мал и не учитывался. Посторонних примесей в виде окислов металлов и др. ВАП не содержит. В опытах использовались растворы ВАП различного разведения от 10 до 1000 раз

В сосуды на дно наливали порцию воды или раствора ВАП, в одном из опытов закрывали слоем фильтровальной бумаги и сверху помещали наклонувшиеся семена, которые предварительно замачивали в течение 24 часов в дистиллированной воде. Сосуды не вскрывали на протяжении 40 суток до окончания опытов. Регулярно вели наблюдение за развитием растений. Отмечали время появления первого свободного зеленого листа, время появления и исчезновения водного конденсата на стенках сосудов, изменение высоты проростков, а к окончанию опытов - потерю тургора и начало побурения листьев,

Эксперимент.

Опыт 1.

Наклонувшиеся семена огурца в количестве 5 штук высажены в культуральные сосуды со следующими параметрами в пересчете на 1 растение:

Площадь дна 1,4 см

Объем воздуха 4,4. мл

Количество ДВ (в контроле) и раствора ВАП 0,2 мл. Растворы ВАП в опытах, разводились в 20, 50, 100, 500 и 1000 раз.

При разведении ВАП в 10 раз растения не развивались с самого начала опыта вследствие эффекта блокировки из-за высокой концентрации раствора. При разведении ВАП в 100 и 500 раз (таблица 1) семядольный зеленый лист появился на 3 сутки у половины растений, тогда как в ДВ и при разведении ВАП в 1000 раз появление листа произошло к 5 суткам только у 1/5 части растений, при этом их число по сравнению с 3 сутками возросло в 1,5-2 раза. На 5 сутки также наблюдалось появление конденсата на стенках сосуда, причем наиболее обильный конденсат был в случаях разведения ВАП в 100 и 500 раз. На 8 сутки все растения с разведением ВАП в 100 и 500 раз достигли высоты 2 см, тогда как в контроле с ДВ и разведением ВАП в 1000 раз до 2 см выросла только пятая часть растений. К 25 суткам половина растений с разведением ВАП 100 и 500 потеряли тургор и более 4/5 их числа приобрели бурый окрас уже на 30 сутки. Почти все растения с ДВ и с 1000-кратным разведением ВАП побурели на 25 сутки.

Опыт 2.

Этот опыт был поставлен при увеличенных параметрах объема воды и раствора более, чем в 3 раза, а по объему воздуха – в 1,25 раза. Разведение ВАП в 1000 раз было исключено, так как сравнению с ДВ слабый раствор не показал заметного влияния на развитие растений, но были добавлены разведения ВАП в 20 и 50 раз.

Наклонувшиеся семена огурца в количестве 5 штук высажены в культуральные сосуды со следующими параметрами в пересчете на 1 растение:

Площадь дна 1,7 см;

Объем воздуха 5,5 мл;

Количество ДВ (в контроле) и раствора ВАП 0,65 мл, Растворы ВАП в этом опыте, разводились в 20, 50, 100, 500 раз. На дно сосудов положены стандартные химические бумажные фильтры, толщиной 1 мм для фиксации корней в горизонтальном положении.

Таблица 1. Этапы развитие растений в ВАП с разведением 100, 500 и 1000 в течение 30 суток

t_{22} , сутки	3	5	8	25	30
Коэффициент разведения раствора ПАВ	Появление свободного листа		Высота растений, см	Потеря тургора	Побурение листа
	Количество живых растений, %				
ДВ (контроль)	20	40	20	90	100
100	50	100	100	50	90
500	50	100	100	60	80
1000	20	30	20	100	100

Таблица 2. Этапы развития растений в ВАП с разведением 20, 50, 100 и 500 раз в течение 40 суток

<i>t</i> , сутки	4	10	18	35	40
Коэффициент разведения раствора ВАП	Появление свободного листа	Высота растений, см			
		3,5	5,5	6,0	6,0
	Количество живых растений, %				
ДВ (контроль)	30	20	нет	нет	нет
20	35	20	40	Потеря зеленого окраса и тургора	нет
50*	90	50	75		нет
100*	100	70	90	30	20
500*	100	70	90	20	20

На 4 сутки опыта наблюдалось появление свободного листа у всех растений и образование конденсата на стенках сосуда, наиболее насыщенное при коэффициентах разведения ВАП 50, 100 и 500, помеченных (табл. 2) знаком (*). При разведении в 20 раз и в ДВ появление свободного листа на 4-е сутки состоялось лишь у 1/3 растений, дальнейший рост которых был слабым, к 15-м суткам у них побурели листья (потеря зеленого окраса), в итоге растения с ДВ не дожили до 18-х суток. Явная потеря зеленого окраса листа и потеря тургора у растений зафиксированы к 35 суткам в ВАП с 20 и 50-кратным разведением. К 40 суткам опыта живые растения до 20% сохранились лишь в растворах ВАП со 100- и 500-кратным разведениями. Максимальная высота растений к 25 суткам достигла 6 см в ВАП с разведением в 100 и 500 раз, но у 30% растений. Высота растений была лимитирована высотой сосуда.

Обсуждение результатов опытов

Из опытов можно сделать несколько выводов:

- Семена растений, начинающие прорастать (проростки) можно доращивать до размеров рассады в замкнутом, изолированном от окружающей среды объеме аналогично «бутылочному саду» Д. Латимера с тем отличием, что культуральный сосуд содержит лишь дистиллированную воду (а или воду, активированную плазмой СВЧ разряд (б), и не содержит почвогрунта и питательных добавок.
- На 3-5 сутки в обоих вариантах опыта (а) и (б) наблюдалось появление свободного листа, но в варианте (а) только у 30% растений, а в варианте (б) уже у 100% растений при оптимальном разведении раствора ВАП от 100 до 500 раз, что соответствует значениям концентрации $[H_2O_2]$ от 4×10^{-5} М до 8×10^{-6} М.
- Раствор ВАП, разбавленный в 10 раз: $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-2}$ М блокирует рост растений.
- Процесс фотосинтеза начинается с появлением зеленого листа, сопровождается периодическим выпадением конденсата, а исчезает с прекращением фотосинтеза, при гибели растения.
- Растения, выращенные на ДВ (а) доживали максимум до 15 суток, тогда как, выращенные на ВАП с разведением в 100 и 500 раз (б), доживали до 40-х суток, к 35-м суткам их высота достигала высоты сосуда 6 см.
- ВАП способствует быстрому развитию растения и увеличивает продолжительность его жизни. Служит также дополнительным по отношению к воде источником кислорода.
- Увеличение объема воды во 2-м опыте дает увеличение объема зеленой массы.
- Взвешивание культуральных сосудов в начале и в конце опытов подтвердило постоянство их весов, т.е. соответствие закону сохранения материи.

Объем воздуха, заключенного в изолированном культуральном сосуде, не обеспечивает процесс фотосинтеза двуокисью углерода, которого в атмосфере сосуда содержится не более 0,04%, т.е. $1,75 \times 10^{17}$ – $2,2 \times 10^{17}$ молекул. Известно, что наибольшая массовая доля в растениях приходится на органические элементы: углерод 45%, кислород 42%, водород 6,5%, азот 1,5. Т.е., если вода перешла в биомассу растений, то 1/2 веса должен составлять углерод. Масса атома углерода $\sim 2 \times 10^{-23}$ г. Общее число атомов углерода в биомассе растений должно достигать значений порядка 10^{23} , столько же молекул двуокиси углерода должно было быть заимствовано из объема воздуха (у нас объем воздуха в сосуде 4,4 мл). Разница составляет почти 6 порядков. Возникает вопрос об источнике углерода в замкнутом сосуде. Сравнение веса 10 сухих семян (0,28 г) и 10 высушенных растений (0,275 г) по окончании эксперимента (по прошествии 23 суток), показало, что вес практически не изменен. Это говорит о том, что основным источником для роста и развития растений в замкнутом объеме оказался углерод, запасенный в самом семени.

Список литературы / References:

1. Anna Norris. Man's Thriving Garden, Sealed in a Bottle, Hasn't Been Watered in Decades. *Home and Garden*, 2016.
2. Гос. реестре селекционных достижений. State breeding achievement register. <http://reestr.gossotrf.ru>
3. Андреев С.Н., Апашева Л.М., Лобанов А.Б., Лукина Н.А., Савранский В.В., Сергейчев К.Ф. *Способ плазменной активации воды или водных растворов и устройство для его осуществления*. Патент РФ № 2702594, публикация от 08 октября 2019 г. [Andreev S.N., Apasheva L.M., Lobanov A.B., Lukina N.A., Savranskij V.V., Sergejchev K.F. *A method for plasma activation of water or aqueous solutions and a device for its implementation*. RF Patent No. 2702594, publication dated October 08, 2019. (In Russ.)]

4. Lobanov A.B., Rubtsova N.A., Vedeneeva Yu.A., Komissarov G.G. Photocatalytic activity of chlorophyll in the formation of hydrogen peroxide in water. *Reports of the Academy of Sciences*, 2008, vol. 421 (6), pp. 773-776.

5. CRC Handbook of Chemistry, and Physics. 70th Edition, Weast, R.C., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. D-221.

DEVELOPMENT OF CUCUMBER PLANT *IN VITRO* ON EARLY GROWTH STAGES UNDER CONDITIONS OF PHOTORESPIRATOR STRESS

Apasheva L.M.¹, Lobanov A.V.¹, Lukina N.A.², Sergeichev K.F.²

¹ Semenov Chemical Physics In-t of the Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia

² Prokhorov General Physics In-t of the Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia; e-mail: nathukina1946@yandex.ru

Abstract. The development of the cucumber plant was studied in the early stages of growth in sealed glass vessels, starting with seedlings developing from internal resources, stored in the seed, in the absence of soil, in limited volumes of air, distilled water (DW) or water activated by microwave discharge plasma (VAP). VAP was obtained by continuous treatment of DW with a stream of microwave argon plasma within 30 minutes in an open atmosphere. At a microwave power of 0.9 kW, the Argon plasma temperature is ~4000oK. VAP was an aqueous solution of hydrogen peroxide with a concentration of $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-3}$ M and nitrogen oxides with a concentration of $[NO_x] \approx 7 \times 10^{-4}$ M; does not contain foreign impurities in the form of metal oxides, etc. Experimental conditions are constant: temperature 20 °C, lighting light/dark 12/12 hours. The vessels were not opened for 40. It was shown that plants grown on the Far East survived up to a maximum of 15 days, while those grown on VAP with a dilution of 100 and 500 times increases the lifespan by ~3 times. VAP promotes the rapid accelerated development of plants, increases the volume of green mass, life expectancy serves as a source of oxygen and nitrogen as an additional source of oxygen and nitrogen in relation to DV. VAP diluted by a factor of 10: with $[H_2O_2] = 10^{-4}$ M blocks plant growth. Comparison of the weight of dry seeds and the weight of dried plants at the end of the experiment showed that the main source for the growth and development of plants in a closed volume was the carbon stored in the seed itself.

Key words: *plasma, activated, closed volume, peroxide, concentration, sprout.*