

## Vplyv vybraných typov nanočastíc titánu na vitalitu peľu slivky čerešňoplodej (*Prunus cerasifera*)

Effect of selected types of titanium nanoparticles on cherry plum (*Prunus cerasifera*) pollen viability

ĽUBA ĎURIŠOVÁ<sup>1</sup>, SAMUEL KŠIŇAN<sup>1</sup>, PAVOL ELIÁŠ ml.<sup>1</sup>, MAREK KOLENČÍK<sup>2</sup>, LENKA TOMOVIČOVÁ<sup>1</sup> & NIKOLA KOTLÁROVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav rastlinných a environmentálnych vied FAPZ, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, luba.durisova@uniag.sk, samuel.ksinan@uniag.sk, pavel.elias1@uniag.sk, xtomicovicova@uniag.sk, xkotlarova@uniag.sk

<sup>2</sup> Ústav agrochémie a pôdoznalectva FAPZ, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, marek.kolencik@uniag.sk

**Abstract:** The cherry plum (*Prunus cerasifera* Ehrh) is an allochthonous species in Slovakia, characterized by abundant flowering and very good fruit set. It primarily grows along roads and in agricultural biocorridors, where it often replaces autochthonous species of the genus *Prunus*. It is also used as a rootstock and pollen donor for some species of the genus *Prunus*. Due to its consistent and abundant pollen production and its presence in biocorridors near cultivated crops, the cherry plum serves as a useful model for assessing the impact of agrochemicals on the natural vegetation of agricultural landscapes. In this study, we tested the impact of foliar application of titanium nanoparticles in range 1 – 100 mg.L<sup>-1</sup> on pollen germination of selected individuals. Our results showed that titanium nanoparticles have an inhibitory effect on pollen germination in this species. The lowest pollen germination rate, 22.99%, was observed at the highest concentration of titanium nanoparticles, while the control sample exhibited nearly double the germination rate at 43.40%.

**Key words:** cherry plum, pollen germination, titanium nanoparticles.

## Úvod

Slivka čerešňoplodá – myrobalán (*Prunus cerasifera* Ehrh) je opadavý ker alebo strom s jedlými guľatými plodmi červenej alebo žltej farby. Tento druh je pôvodný na Balkánskom poloostrove a na Kryme. Rastie na okrajoch lesov a v otvorenej krajine na narušených stanovištiach. Pestuje sa tiež ako okrasný alebo ovocný druh. (Popescu & Caudullo 2016; Webb 2010). Na Slovensku rastie popri cestách a preniká do biokoridorov poľnohospodárskej krajiny, kde nahrádza autochtónne druhy rodu *Prunus* (Baranec et al. 2016).

Druh kvitne v marci až máji. Kvety sú samostatné alebo v okolíku podobným zväzkoch po 2 – 5 (Popescu & Caudullo 2016). Peľové zrná myrobalánu sú charakterizované ako izopolárne, trikolporátne monády strednej veľkosti. Tvar peľových zrn je sféroidný (prolate) a peľové zrná sú sploštené. Skulptúra exiny je prúžkovaná a perforovaná (Halbritter & Auer 2021).

Produkcia a kvalita peľu je ovplyvnená viacerými vonkajšími a vnútornými faktormi. Z vonkajších faktorov má na vitalitu peľu najväčší vplyv teplota (Hedhly 2011). Avšak na fyziologické vlastnosti peľu vplyva tiež výživa, zvlášť prísun niektorých mikroelementov ako je bór alebo zinok, ktoré zlepšujú kvalitatívne vlastnosti peľu (Nyomora et al. 2000; Pandey et al. 2006). Okrem týchto prvkov používaných vo výžive rastlín, majú na klíčenie peľu vplyv tiež iné kovové prvky používané v priemysle a poľnohospodárstve. Vo viacerých odvetviach čoraz častejšie nachádzajú uplatnenie rôzne materiály na báze kovových nanočastíc napr. striebra, u ktorých bol preukázaný pozitívny (Salachna et al. 2019) alebo negatívny vplyv (Speranza et al., 2013) na reprodukčné štruktúry rastlín.

Titán je súčasťou kozmetických (Dréno et al. 2019) a potravinárskych výrobkov (Musial et al. 2020). V závislosti od koncentrácie zlepšuje fyziologické a biochemické vlastnosti rastlín. Zistilo sa, že ako organický komplex titánu zvyšuje vitalitu peľu jahôd (Bieniasz et al. 2022), zlepšuje adhéziu a klíčenie peľu na bliznách jabloní (Bieniasz et al., 2021). Hoci je titán považovaný za rastlinný stimulans (Šebesta et al. 2021), existuje iba málo informácií o jeho účinkoch a pôsobení v rastlinách. Bolo dokázané, že zlepšuje kvalitu nažiek a výťažnosť oleja slnečnice (Kolenčík et al. 2020). Avšak jeho účinky na peľ neboli dosiaľ skúmané. Zistilo sa však, že titán môže predstavovať rizikový faktor pre zdravie včiel. Včelám vystaveným akútnemu alebo chronickému pôsobeniu titánu sa mení črevný mikrobióm (Papa et al. 2021), preto existuje riziko pre opeľovače v prípade konzumácie kontaminovaného peľu entomofilných druhov rastlín.

Myrobalán je vhodným objektom pre štúdium pôsobenia vonkajších vplyvov na peľ. Spravidla produkuje dostatok vyvinutého peľu a tiež sa vyznačuje dobrou nasadou plodov. Na testovanie vplyvu nanočastíc titánu ( $\text{TiO}_2\text{-NČ}$ ) boli preto vybrané jedince zodpovedajúce týmto kritériám.

## Metodika

Pre analýzy boli vybrané dva jedince *Prunus cerasifera* vyznačujúce sa dobrou tvorbou peľu. Jedince rástli v lokalite Nitra - Chrenová (Slovensko). Peľ bol získaný z kvetov odobratých v štádiu „baloon stage“ v apríli 2024. Peľ bol nanesený na agarové médium nasledovného zloženia: 1 % agar, 15 % sacharóza a 0,01 % kyselina boritá (Parfitt and Ganeshan 1989). Na peľ bol formou sprejovej aplikácie nanesený roztok nanočastíc titánu ( $\text{TiO}_2\text{-NČ}$ ) (veľkosť <10 nm) v nasledovnom koncentračnom rade  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $100 \text{ TiO}_2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Sprejová aplikácia simulovala fóliárnu aplikáciu nanočastíc v reálnych podmienkach (Kolenčík et al. 2020). Peľ bol kultivovaný pri  $\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Klíčivosť peľu bola hodnotená štandardne po 24 hodinách kultivácie. V každom variante experimentu boli hodnotené tri zorné polia s minimálnym počtom 100 peľových zŕn

a porovnávané s kontrolnou vzorkou bez aplikácie nanočastíc (Ďurišová 2018). Hodnotené bolo percento vyklíčených peľových zŕn z celkového počtu peľových zŕn každého pokusného variantu.

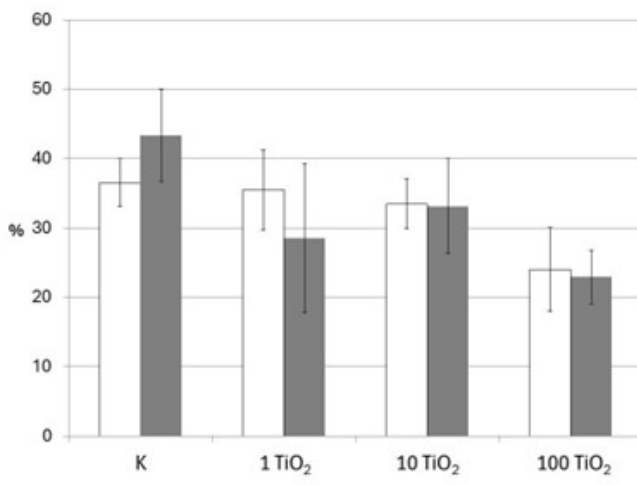
## Výsledky a diskusia

Dobrá klíčivosť peľu je pri pestovaných druhoch rodu *Prunus* nevyhnutná pre dostatočnú násadu plodov. Zvlášť to platí pre druhy a odrody, ktoré slúžia ako opel'ovače pre jedince s nižšou kvalitou peľu. Myrobalán má dobrú peľovú kompatibilitu s mnohými ďalšími druhmi rodu *Prunus*. Ukázal sa ako vhodný potenciálny opel'ovač japonských sliviek *Prunus salicina* Lindl. (Takemura et al. 2023). Okrem *P. salicina* vytvára *P. cerasifera* hybridy aj s marhuľami (*P. armeniaca* L.) (Szymajda et al., 2022). Klíčivosť peľu myrobalánu je pomerne v širokom rozpätí. Hoci má väčšina druhov a kultivarov *Prunus* spp. optimum klíčenia peľu medzi 20 – 25 °C (Ďurišová 2018), peľ niektorých línií myrobalánu klíči aj pri teplotách 10 °C (Takemura et al. 2023). Dobrú klíčivosť si peľ myrobalánu uchováva aj po uskladnení pri -20 °C. Takto skladovaný peľ najlepšie klíči pri 30 °C, kedy dosahuje klíčivosť 40% (Beltrán et al. 2019).

Pre zistenie vplyvu nanočastíc titánu boli vybrané jedince s pravidelnou a dostatočnou násadou plodov. Skúmané jedince v testoch klíčivosti v *in vitro* podmienkach dosiahli podobné hodnoty vitality peľu, 36,63 % a 43,40 % (obr. 1). Po aplikácii nanočastíc titánu sa u oboch jedincov prejavil inhibičný účinok na klíčenie peľu myrobalánu pri všetkých použitých koncentráciách nanočastíc titánu (obr. 1).

Rozdielnu individuálnu odpoveď sme zaznamenali pri rôznych koncentráciách  $\text{TiO}_2\text{-NČ}$ . Zatiaľ čo u jedného jedinca klíčivosť peľu kontinuálne klesala so zvyšujúcou sa koncentráciou  $\text{TiO}_2\text{-NČ}$  (obr. 1), u druhého jedinca bola najvyššia klíčivosť v pokusných variantoch s  $\text{TiO}_2\text{-NČ}$  dosiahnutá pri koncentrácii 10  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{TiO}_2\text{-NČ}$ . Zhodne sa najvyšší inhibičný efekt nanočastíc titánu u oboch jedincov prejavil pri koncentrácii 100  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{TiO}_2\text{-NČ}$ , kedy klíčivosť peľu skúmaných jedincov bola 24,59% a 22,99%.

Negatívne účinky kovových nanočastíc na peľ boli zaznamenané pri viacerých druhoch rastlín. Keďže predpokladom dobrej životaschopnosti peľu je morfológická vyvinutosť peľových zŕn, poruchy mikrosporogenézy a mikrogametogenézy vedú k produkcii nevyvinutého a morfológicky nevyrovnaného peľu so zníženou schopnosťou klíčiť a prispieť k oplodneniu samičieho gametofytu. Poruchy gametogenézy s následnou tvorbou defektného peľu po aplikácii  $\text{CeO}_2$  u *Phaseolus vulgaris* pozorovali Salehi et al. (2021). Podobné účinky na vývin samčieho gametofytu zaznamenali tiež po aplikácii



Obr. 1. Klíčivosť peľu *Prunus cerasifera*: biele stĺpce – jedinec I; sivé stĺpce – jedinec II (K – kontrola, 1-100 TiO<sub>2</sub>-NČ mg.L<sup>-1</sup>)

Fig. 1. Pollen germination of *Prunus cerasifera*: white columns - an individual I; gray columns - an individual II (K – control, 1-100 mg.L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>- NPs)

ZnO, kedy dochádzalo k poruchám tapeta a defektom vonkajšieho obalu peľových zŕn exíny (Salehi et al., 2022). Negatívny vplyv na štruktúru peľových zŕn majú tiež Pd-NČ, ktoré spôsobujú anomálie v ultraštruktúre peľových zŕn *Actinidia deliciosa* (Speranza et al. 2010) s následkom poklesu vitality peľu. Rovnaký efekt na peľ majú tiež Ag-NČ u toho istého druhu (Speranza et al. 2013). AgNČ spôsobujú tiež pokles klíčivosti peľu u *Arabidopsis* (Ke et al. 2020) a zvýšená abortivita peľu a znížená klíčivosť peľu pri tomto druhu sa objavujú tiež po pôsobení negatívne nabitých nanočastíc železa (IONP) (Bombin et al. 2015).

Zistili sme, že so zvyšujúcou sa koncentráciou TiO<sub>2</sub>-NČ dochádza k inhibícii klíčenia peľu myrobalánu. Opačný efekt bol zaznamenaný po krátkej expozícii nanočastíc titánu na púčiky samčích kvetov liči, kde koncentrácia 150 mg/L<sup>-1</sup> spôsobila zvýšenie klíčivosti peľu o 2,67 až 3,67 % (Huang et al. 2022). Zdá sa, že okrem koncentrácie dôležitú úlohu pri aplikácii nanočastíc zohráva dĺžka expozície a priamy či nepriamy kontakt nanočastíc s peľovými zrnami.

Ako ukazujú predošlé výskumy, vplyv iných typov nanočastíc na peľ zástupcov rodu *Prunus* je rôzny. Zatiaľ čo nanočastice zinku spôsobili pri použitých koncentráciách 2,5 až 7,5 ml.L<sup>-1</sup> početné aberácie peľových zŕn pri *P. persica*, komerčné nanočastice striebra v koncentrácii 10 až 15 ml.L<sup>-1</sup> mali pozitívny účinok na životaschopnosť peľu (Mosa et al. 2021). K podobným záverom dospeli aj Tomovičová et al. (2024), ktorí po aplikácii nanočastíc zinku v koncentráciách 2,8 až 280 mg.L<sup>-1</sup> zaznamenali pokles klíčivosti peľu *P. cerasifera*.

Mechanizmus inhibície klíčenia peľu sa prejavuje na rôznej úrovni. Ukázalo sa, že negatívny účinok na klíčenie peľu a predlžovanie peľových vrecúšok je spôsobený kontinuálnym uvoľňovaním zinku zo ZnO-NČ (Yoshihara et al. 2021). Okrem toho môžu nanočastice prilnúť na povrch peľových zŕn, upchávať apertúry v sporoderme peľových zŕn a tým znemožňovať klíčenie peľu (Aoyagi & Ugwu 2011). Deformácie peľových vrecúšok zasa vznikajú pri zmene pH cytoplazmy v dôsledku oxysľovania bunkového prostredia nanočasticami grafénu (Candotto Carniel et al. 2018).

Nakoľko sa možnosti využívania prípravkov na báze nanočastíc v poľnohospodárstve a priemysle neustále rozširujú, otázky ich bezpečného využívania bude potrebné dôkladne preskúmať.

## Pod'akovanie

Výskumné aktivity boli financované riešením projektu Grantovej agentúry Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov, SPU v Nitre „GA FAPZ 3/2023 – Hodnotenie environmentálnych rizík po aplikácii nanočastíc v poľnohospodárskej výrobe“ a projektu VEGA 1/0359/22.

## Literatúra

- Aoyagi H., Ugwu Ch. U. 2011. Fullerene fine particles adhere to pollen grains and affect autofluorescence and germination. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 4: 67–71.
- Baranec, T., Ikrényi, I. & Galuščáková, L. 2016. Biokoridory a invázne druhy rastlín. Biokoridory and invasive woody plants. In *Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016 – zborník príspevkov z vedeckej konferencie*. p. 5–13.
- Beltrán, R., Valls, A., Cebrián, N., Zornoza, C., García Brejjo, F., Reig Armiñana, J., Garmendia, A. & Merle, H. 2019. Effect of temperature on pollen germination for several Rosaceae species: influence of freezing conservation time on germination patterns. *PeerJ* 7:e8195.
- Bieniasz, M. & Konieczny, A. 2021. The Effect of Titanium Organic Complex on Pollination Process and Fruit Development of Apple cv. Topaz. *Agronomy* 11: 2591.
- Bieniasz, M., Konieczny, A. & Błaszczyk, J. 2022. Titanium Organic Complex Improves Pollination and Fruit development of Remontant Strawberry Cultivars under High-Temperature Conditions. *Agriculture* 12: 1795.
- Bombin, S., Le Febvre, M., Sherwood, J., Xu, Y., Bao, Y. & Ramonell, K. M. Developmental and reproductive effects of iron oxide nanoparticles in *Arabidopsis thaliana*. 2015. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 24174–24193.

- Candotto Carniel, F., Gorelli D., Flahaut, E., Fortun, a L., Del Casino, C., Cai, G., Nepi, M., Prato, M. & Trtiach M. 2018. Graphene oxide impairs the pollen performance of *Nicotiana tabacum* and *Corylus avellana* suggesting potential negative effects on the sexual reproduction of seed plants. *Environ. Sci.: Nano.* 5: 1608–1617.
- Drěno, B., Alexis, A., Chuberre, B. & Marinovich, M. 2019. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 33 (Suppl. 7): 34–46.
- Ďurišová, L. 2018. Vývin a vitalita peľu zástupcov rodu *Prunus*. SPU, Nitra. 116 pp.
- Halbritter, H. & Auer, W. 2021. *Prunus cerasifera*. [https://www.paldat.org/pub/Prunus\\_cerasifera/306333;jsessionid=C2072F4205A20646B0680C2C8F65DFCC](https://www.paldat.org/pub/Prunus_cerasifera/306333;jsessionid=C2072F4205A20646B0680C2C8F65DFCC); cit. 04.10.2024.
- Hedhly, A. 2011. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environ. Exp. Bot.* 74: 9–16.
- Huang, Y., Dong, Y., Ding, X., Ning, Z., Shen, J., Chen, H. & Su, Z. 2022. Effect of Nano-TiO<sub>2</sub> Composite on teh Fertilization and Fruit-Setting of Litchi. *Nanomaterials* 12(23): 4287.
- Ke, M., Li, Y., Qu, Q., Ye, Y., Peijnenburg, W. J. G. M., Zhang, Z., Xu, N., Lu, T., Sun, L. & Qian H. 2020. Offspring toxicity of silver nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* flowering and floral development. *J. Hazard. Mater.* 386: 121975.
- Kolenčík, M., Ernst, D., Urik, M. & Ďurišová, L. et al. 2020. Foliar application of low concentrations of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles to the common sunflower under field conditions. *Nanomaterials* 10(8): 1619.
- Mosa, W. F. A., El-Shehawi, A. M., Macled, M. I., Salem, M. Z. M., Ghareeb, R. Y., Hafez, E. E., Behiry S. I. & Abdelsalam N. R. 2021. Productivity performance of peach trees, insecticidal and antibacterial bioactivities of leaf extracts as affected by nanofertilizer foliar application. *Sci. Reports* 11: 10205.
- Musial, J., Krakowiak, R., Mlynarczyk, D. T., Goslinski, T. & Stanisz, B. J. 2020. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products – What do we know about their safety? *Nanomaterials (Basel).* 10(6): 1100.
- Nyomora, A., Brown, P. H., Pinney, K. & Polito, V. S. 2000. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. *J. Am. Soc. Hortic Sci.* 125(2): 265–270.
- Pandey, N., Pathak, G. Ch. & Sharma, Ch. P. 2006. Zinc is critically required for pollen function and fertilisation in lentil. *J Trace Elem Med Biol.* 20(2): 89–96.
- Papa, G., Di Prisco, G., Spini, G., Puglisi, E. & Negri I. 2021. Acute and cgronic effects of Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) PM1 on honey bee gut microbiota under laboratory conditions. *Sci. Reports* 11: 5946.
- Parfitt, D. E. & Ganeshan, S. 1989. Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *Hort. Science.* 14(2): 354–356.
- Popescu, I. & Caudullo, G. 2016. *Prunus cerasifera* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.) *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg. e01dfbb+ pp.
- Salachna, P., Byczyńska, A., Zawadzińska, A., Piechocki, R. & Mizielnińska, M. 2019. Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering of potted oriental lilies. *Agronomy.* 9: 610.
- Salehi, H., Rad, A. C., Raz, a A. & Chen, J.-T. 2021. Foliar application of CeO<sub>2</sub> nanoparticles alters generative components fitness and seed productivity in bean crop (*Phaseolus vulgaris* L.). *Nanomaterials.* 11: 862.

- Salehi, H., Rad, A. C., Sharifan, H., Raza, A. & Varshney, R. K. 2022. Aerially applied zinc oxide nanoparticle affect reproductive components and seed quality in fully grown bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) Front. Plant Sci. 12: 808141.
- Speranza, A., Crinelli, R., Scoccianti, V., Taddei, A. R., Iacobucci, M., Bhattacharya, P. & Ke, P. Ch. 2013. In vitro toxicity of silver nanoparticle to kiwifruit pollen exhibits peculiar traits beyond the cause of silver ion release. Environ. Pollut. 179: 258–267.
- Speranza, A., Leopold, K., Maier, M., Taddei, A. R. & Scoccianti V. 2010. Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble pd (II) Environ. Pollut. 158: 873–882.
- Szymajda, M., Studnicki, M., Kuras, A. & Zurawicz E. 2022. Cross-compatibility in interspecific hybridization between three *Prunus* species. S. Afr. J. Bot. 146: 624–633.
- Šebesta, M., Kolenčík, M., Ratna Sunil, B. & Illa, R. et al. 2021. Field application of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on agricultural plants. Agronomy. 11: 2281.
- Takemura, Y., Tochimoto, K., Kitamura, M., Moroto, H., Sakata, M. et al. 2023. Potential of Myrobalan Plum as a New Pollinizer for Japanese Plum Cultivars. Hort. J. 92: 22–29.
- Tomovičová, L., Ďurišová, L., Kšiňan, S., Kolenčík, M., Ernst, D., Eliáš, P., Kotlárová, N. & Straka, V. 2024. The effect of zinc nanoparticles on the cherry plum germination. In Carović-Stanko & Kljak, K. (eds), Croatia SA International Symposium on Agriculture. University of Zagreb, p. 62.
- Webb, D. A. 2010. Rosaceae to Umbelliferae. Flora Europaea Volume 2. Cambridge University Press. p. 78.
- Yoshihara, S., Hirata, S., Yamamoto, K., Nakajima, Y. et al. 2021. ZnO nanoparticles effect on pollen grain germination and pollen tube elongation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 145: 405–415.

Došlo 23. 10. 2024

Prijaté 12. 11. 2024