

УДК 633.15:58.04:581.142:547.587

НАКОПИЧЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ ЗА ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ІОНІВ МЕТАЛІВ

© 2009 р. В. С. Феденко, В. С. Стружко

Науково-дослідний інститут біології

Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара

(Дніпропетровськ, Україна)

Досліджували вплив іонів свинцю, кадмію та нікелю на накопичення фенольних сполук у коренях проростків кукурудзи. Показано, що дозова залежність цього процесу має характер періодичної функції. Встановлено, що параметри функціональної залежності визначаються природою іона металу та його фітотоксичністю.

Ключові слова: *Zea mays L.*, свинець, кадмій, нікель, фенольні сполуки

Зміни метаболізму фенольних сполук вважають малоспецифічною реакцією відповіддю рослин на стресовий вплив (Dixon, Paiva, 1995; Winkel-Shirley, 2002). За токсичної дії металів ці вторинні метаболіти можуть виконувати ряд функцій у рослинному організмі. По-перше, антиоксидантні властивості фенолів виявляються у знешкодженні активних форм кисню, вміст яких підвищується за дії токсикантів (Шемет, Феденко, 2005). По-друге, продуктами цієї взаємодії є фенокисильні радикали з прооксидантною активністю, яка може бути підсилена за рахунок хелатування з токсичними металами (Sakihama et al., 2002). По-третє, за умов стресу може відбуватися окиснювальна кон'югація фенілпропаноїдів з утворенням складних полімерних структур (Vascouch et al., 2001). По-четверте, за зміни активності ферментів, причетних до біосинтезу фенолів, можливе накопичення метаболітів різних структурних класів (Schutzendubel et al., 2001).

На нашу думку, певним відображенням складності та різноспрямованості таких метаболічних перетворень може бути встановлення функціональної залежності змін накопичення фенольних сполук від дози металів з різним ступенем фітотоксичного впливу. У

дослідженнях, проведених раніше, автори обмежувалися визначенням цього показника лише за окремих концентрацій певних металів (Кобилецька, Терек, 2002; Ali et al., 2006; Davis et al., 2001; Oncel et al., 2000; Schutzendubel et al., 2001). Вирішення цієї проблеми можливе з використанням розробленої нами математичної моделі (Пат. 85040). При виборі тест-об'єкта згідно з рекомендаціями (Мусієнко, 2006) для дослідження фізіолого-біохімічних закономірностей стійкості організму до надлишку металів у середовищі доцільно використовувати рослини-елімінатори (наприклад, кукурудзу (Серегин и др., 2003)), оскільки у цьому разі бар'єрна функція кореневої системи перешкоджає надходженню токсичних доз металу до надземної частини.

Мета роботи – з'ясувати функціональну залежність змін накопичення фенольних сполук у коренях проростків кукурудзи відповідно до фітотоксичності іонів свинцю, кадмію та нікелю.

МЕТОДИКА

Вплив металів досліджували у модельному експерименті на проростках кукурудзи (*Zea mays L.*) гібрида Кадр 267 МВ. Насіння пророщували 10 діб у рулонах фільтрувального паперу на розчинах $Pb(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Ni(NO_3)_2$ з концентрацією в діапазоні 0,025 – 1 мМ та воді (контроль) за температури 22–24°C (фотоперіод – 16 годин). Ефект токсичної дії металів оцінювали за довжиною коренів проростків.

Адреса для кореспонденції: Феденко Володимир Савелійович, НДІ біології Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна;
e-mail: opticlub@ukr.net

НАКОПИЧЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК

Вміст розчинних фенольних сполук у повітряно-сухих коренях (мкмоль хлорогенової кислоти/г сухої речовини) визначали за методом, описаним нами раніше (Феденко, 2000). На основі експериментальних результатів встановлювали параметри функціональної залежності (Пат. 85040):

$$y = a + b \cdot C + A_c \cdot \sin\left(\varphi_0 + \frac{200\pi \cdot C}{k_0 + k \cdot C}\right),$$

де y – вміст фенольних сполук, мкмоль/г сухої речовини;

a, b – коефіцієнти базової функції;

A_c – найбільше відхилення встановленого значення вмісту фенольних сполук від обчисленого згідно з базовою функцією мкмоль/г сухої речовини;

φ_0 – початкова фаза коливаний;

C – концентрація іона металу в середовищі кореневого живлення, ммоль;

k_0, k – коефіцієнти періодичної функції.

Адекватність функціональної залежності і рівнянь регресії визначали за величиною коефіцієнта детермінації r^2 (Лакин, 1990). Статистичну обробку експериментальних даних проводили на 5%-му рівні значущості, похибка вимірювань не перевищувала 5 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Різний ступінь токсичного впливу іонів металів виявляється за рівнем їхньої концентрації, які спричиняють інгібування росту органів проростків (табл. 1). Так, найменша доза, що чинить інгібуючий ефект на ріст кореня для Cd^{2+} становить 0,025 мМ, а для Ni^{2+} та Pb^{2+} – 0,1

мМ. Максимальне інгібування росту кореня для Cd^{2+} відзначається при концентрації 0,5 мМ, а порівняльний аналіз підтверджує підвищення ступеня токсичного впливу за цієї дози у ряду $Pb^{2+} - Ni^{2+} - Cd^{2+}$. За дії низьких концентрацій найменш токсичних Pb^{2+} (0,025 і 0,05 мМ) спостерігається стимуляція (“hormesis”) згідно із нелінійною дозовою залежністю відгуку біологічної системи на стресорний вплив (Calabrese et al., 2007).

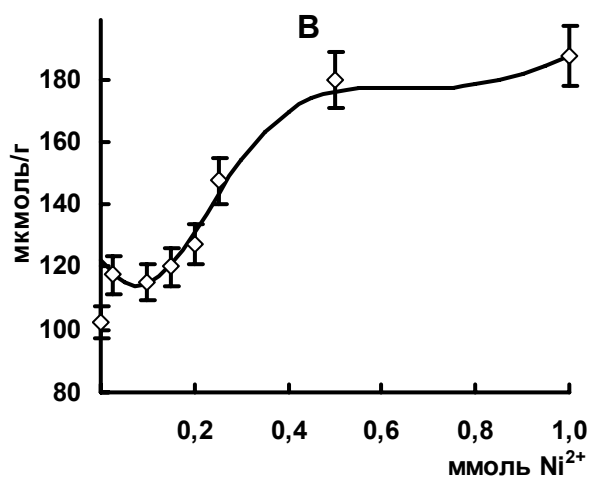
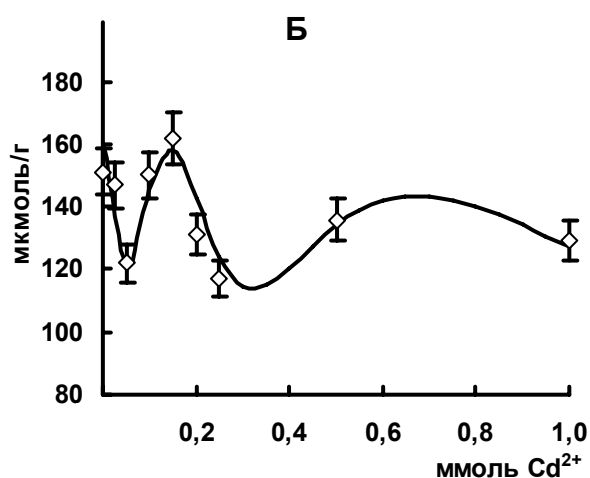
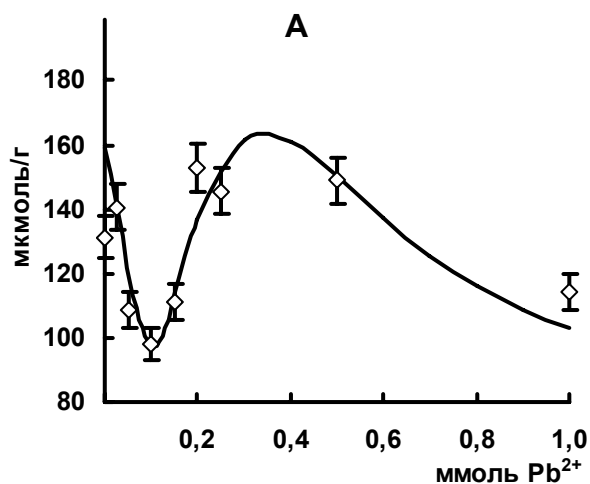
Для сумарного вмісту фенольних сполук характерна варіабельність залежно від дози іона металу (рисунок). У складі фенольних метаболітів коренів проростків кукурудзи ідентифіковано коніферилловий спирт та похідні гідроксикоричних кислот (ізоферулова, хлорогенова, кофейна, кумарова) (Dragisic-Maksimovic et al., 2008). Аналізуючи зміни кількісного рівня цих вторинних метаболітів за умов токсичної дії металів, слід відзначити такі тенденції. По-перше, характер цих змін залежить як від дози, так і від природи іона металу. По-друге, розрахована за методом (Пат. 85040) функціональна залежність складається з двох блоків. Перший блок – базова функція (лінійна залежність), що задає однакову для усіх металів спрямованість змін і створює підстави для порівняльного аналізу токсичного впливу токсикантів на основі розрахованих параметрів функціональної залежності (табл. 2). За ознакою розташування експериментальних точок у факторному просторі другий блок – періодична функція (синусоїда), амплітуда і період якої можуть змінюватися специфічно для кожного іона металу і залежно від його концентрації.

Порівняльний аналіз параметрів функціональної залежності дозволяє виявити деякі особливості змін біогенезу вторинних метаболітів.

Таблиця 1

Вплив іонів металів на довжину кореня проростків кукурудзи

Концентрація іонів металів, мМ	Pb^{2+}		Cd^{2+}		Ni^{2+}	
	мМ	% до контролю	мМ	% до контролю	мМ	% до контролю
Контроль	131,9±6,1	100	131,9±6,1	100	130,0±7,2	100
0,025	157,1±9,3	119,1	121,5±3,8	92,1	128,3±7,2	98,7
0,05	161,5±6,7	122,4	84,5±4,6	64,1	121,5±5,0	93,4
0,1	103,2±4,7	78,2	65,5±3,4	49,7	82,9±2,4	63,7
0,2	73,3±1,4	55,6	51,4±2,5	41,0	60,9±2,7	46,8
0,25	71,8±3,1	54,4	54,1±2,2	38,9	49,9±2,4	38,4
0,5	59,5±2,1	45,1	42,0±1,4	31,8	45,4±2,8	34,9
1	47,5±0,8	36,0	41,7±7,4	31,6	27,5±2,1	21,2



Залежність накопичення фенольних сполук (мкмоль хлорогенової кислоти/г сухої речовини) у корнях проростків кукурудзи від концентрації (ммоль) іонів Pb²⁺(А), Cd²⁺(Б), Ni²⁺(В).

літів залежно від природи іона металу. Так, від'ємний знак коефіцієнта *b* у разі Pb²⁺ та Cd²⁺ свідчить про спрямованість базової функції до

зниження вмісту фенолів при зростанні концентрації іонів металів; при цьому більш значна величина цього показника підтверджує суттєвіший негативний вплив Cd²⁺ з підвищеною фітотоксичністю. Навпаки, у разі Ni²⁺ позитивний знак коефіцієнта *b* вказує на протилежну спрямованість базової функції у напрямі зростання накопичення фенольних сполук при збільшенні концентрації токсиканту. Згідно зі значеннями коефіцієнта *A_c* найсуттєвіша варіабельність вмісту фенолів відзначається у разі Pb²⁺ із найменшою токсичністю серед досліджених іонів металів. Параметр φ_0 свідчить, що початкова фаза коливань відповідає зменшенню біогенезу фенольних сполук, а варіабельність їх значень відбиває специфічність процесу для кожного іона металу. Коефіцієнти *k₀* та *k* визначають відповідно сталу та змінну складові періоду функціональної залежності. При цьому значення *k₀* відрізняється для досліджених іонів металів. Зниження коефіцієнта *k* у ряду Pb²⁺ – Ni²⁺ – Cd²⁺ збігається з посиленням токсичного впливу за індексом толерантності: 0,1 мМ – 78,2 % (Pb²⁺), 63,7 % (Ni²⁺), 49,7 % (Cd²⁺); 0,5 мМ – 45,1 % (Pb²⁺), 34,9 % (Ni²⁺), 31,8 % (Cd²⁺). Тобто значення коефіцієнта *k* інтегрально відбиває ступінь фітотоксичного впливу згідно з встановленою функціональною залежністю в діапазоні концентрацій металів, що надходять в рослини через корені. Оскільки зв'язок вмісту фенольних сполук з критеріями фітотоксичності металів практично не досліджено, нами проведено регресійний аналіз між цими показниками. При цьому вірогідні регресивні залежності встановлені тільки за дії Ni²⁺. Так, збільшення накопичення вторинних метаболітів зі зменшенням лінійного розміру кореня на фоні зростаючих концентрацій Ni²⁺ має нелінійний характер згідно з рівнянням $y = 0,014x^2 - 3,05x + 267,68$; $r^2 = 0,89$, $p = 0,004$.

Встановлений нами суттєвий регресійний зв'язок між змінами біогенезу фенольних метаболітів та інтегральним критерієм розвитку рослин доповнює уявлення про деякі фізіолого-біохімічні особливості токсичної дії Ni²⁺ порівняно з Pb²⁺ та Cd²⁺ (Серегин, Кожевникова, 2006). Так, при транспортуванні Pb²⁺ та Cd²⁺ до вакуолі існують первинні фізіологічні бар'єри – ендодерма на тканинному та плазмалема на клітинному рівнях (Серегин и др., 2003). При цьому значна кількість Pb²⁺ та Cd²⁺ зв'язується в апопласті з функціональними групами вуглеводів (Серегин и др., 2003). Ці фізіологічні бар'єри не перешкоджають надходженню до клітини значної частки поглинутого Ni²⁺. Влас-

Параметри функціональної залежності вмісту фенольних сполук (мкмоль/г сухої речовини) у коренях проростків кукурудзи від концентрації іонів металів (мМ)

Іон металу	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>A_c</i>	φ_0	<i>K₀</i>	<i>K</i>	<i>r</i> ² *
Pb ²⁺	131,7	-6,0	34,0	2,20	17,0	62,0	0,26
Cd ²⁺	142,5	-27,0	20,0	2,00	10,0	38,0	0,77
Ni ²⁺	122,0	81,0	-15,6	3,14	38,0	44,0	0,48

* - *p* = 0,001

тивість Ni²⁺ утворювати у вакуолі комплекси з цитратом та малатом пояснює існуючу залежність між вмістом цих метаболітів та швидкістю ксилемного транспорту Ni²⁺, а також стійкість рослин кукурудзи за рахунок високої здатності коренів до зв'язування цього металу (Серегин и др., 2003), що призводить до його переважної акумуляції у коренях порівняно з надземною частиною (Сишиков, Гришко, 2006). Тому, на відміну від Pb²⁺ та Cd²⁺, відповідно до зростання концентрації Ni²⁺ у середовищі кореневого живлення поступово відбуваються такі зміни: підвищення акумуляції металу в коренях, його надходження до клітин, посилення окиснювального стресу, індукція біогенезу фенольних сполук, переважне інгібування росту кореня, що виявляється в існуванні нелінійного регресивного зв'язку між дослідженими фізіолого-біохімічними характеристиками. Наявність додаткових шляхів детоксикації Pb²⁺ та Cd²⁺ призводить до менш рівномірного надходження цих металів до клітини та розвитку відповідних стрес-індукованих реакцій організму, що позначається у послабленні регресивного зв'язку між показниками на фоні зростання концентрацій екзогенних іонів металу.

Отже, запропонований нами критерій диференційної діагностики токсичного впливу іонів металів на стійкість рослин (коефіцієнт *k*) дає можливість порівняльного аналізу кількісно визначених тенденцій накопичення фенольних сполук залежно від дози іонів металів з різним рівнем фітотоксичності, на відміну від встановлення змін метаболізму цих сполук за певних концентрацій окремих токсикантів згідно з відомими даними (Кобилецька, Терек, 2002; Ali et al., 2006; Davis et al., 2001; Oncel et al., 2000; Schutzendubel et al., 2001).

Встановлену складність тенденцій накопичення вторинних метаболітів за дії металів

можна пояснити, враховуючи різні аспекти. По-перше, згідно із сучасними уявленнями (Calabrese et al., 2007), залежність реакцій відповідей організму від дози стресового впливу включає кілька фаз зі стимуляцією ("hormesis") та пригніченням тест-функцій. По-друге, стрес-індукований метаболізм фенольних сполук може реалізуватися за різними напрямками відповідно до специфічних особливостей дії Pb²⁺, Cd²⁺ та Ni²⁺. Це стосується змін фенолів як компонентів антиоксидант-прооксидантної системи, участі у процесах окиснювальної кон'югації, перерозподілі метаболітів різного класу внаслідок регуляції активності відповідних ферментів. Вплив Pb²⁺, Cd²⁺ та Ni²⁺ на активність ферментів може відбуватися прямо (за рахунок зв'язування з ферментом (Youngs et al., 2000)) та опосередковано шляхом порушення іонного балансу внаслідок конкурентного зниження надходження і впливу на транспорт біологічно важливих Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ (Серегин, Кожевникова, 2006). Інший шлях впливу може бути пов'язаний з хімічною модифікацією фенольного субстрату за участю металу, що унеможливує процес його розпізнавання і знижує активність ферменту (Ford et al., 1998). Можливим напрямом перерозподілу метаболітів за дії металів може бути індукція накопичення одного з кінцевих продуктів метаболізму – ціанідину, локалізованого у зовнішніх шарах клітин корової паренхіми кореня проростків кукурудзи і здатного до детоксикації іонів металів за рахунок зв'язування (Феденко, 2006; 2008; Шемет, Феденко, 2005) дозова залежність якого має нелінійний характер (Феденко, 2007).

Таким чином, залежність накопичення фенольних сполук у коренях проростків кукурудзи від концентрації іонів свинцю, кадмію та нікелю у середовищі кореневого живлення має характер періодичної функції, параметри якої визначаються природою металу та його фітотоксичністю.

ЛІТЕРАТУРА

- Кобилецька М., Терек О. Вплив іонів кадмію на вміст фенольних сполук та вільного проліну в рослинах кукурудзи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2002. – Вип. 28. – С. 311-316.
- Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
- Мусієнко М.М. Екологія рослин. – К.: Либідь, 2006. – 432 с.
- Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 2. – С. 285-308.
- Серегин И.В., Кожевникова А.Д., Казюмина Е.М. и др. Токсическое действие и распределение никеля в корнях кукурузы // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 5. – С. 793-800.
- Сищиков Д.В., Гришко В.М. Накопичення нікелю вегетативними органами проростків гороху та кукурудзи // Доп. НАН України. – 2006. – № 1. – С. 167-172.
- Феденко В.С. Взаимосвязь спектральных характеристик и содержание фенольных соединений в растительных экстрактах // Физиология и биохимия культ. растений. – 2000. – Т. 32, № 3. – С. 236-239.
- Феденко В.С. Зв'язування іонів свинцю з ціанідом у коренях проростків кукурудзи // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 1. – С. 67-74.
- Феденко В.С. Дозовий ефект взаємодії ціанідину з іонами свинцю в коренях проростків кукурудзи // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 2. – С. 24-29.
- Феденко В.С. Ціанідин як ендogenous хелатор іонів металів у коренях проростків кукурудзи // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 1. – С. 102-106.
- Шемет С.А., Феденко В.С. Накопичення фенольних сполук у проростках кукурудзи за токсичної дії іонів кадмію // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 6. – С. 505-512.
- Пат. 85040, Україна, МПК⁸ А 01 G 7/00. Спосіб диференційної діагностики впливу ксенобіотиків на стійкість рослин / В.С.Феденко, В.С.Стружко. – Опубл. 25.12.08, Бюл. № 24.
- Ali M.B., Singh N., Shohael A.M. et al. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress // Plant Sci. – 2006. – V. 171. – P. 147-154.
- Baccouch S., Chaori A., El Ferjani E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots // J. Plant Nutr. – 2001. – V. 24, № 7. – P. 1085-1097.
- Calabrese E.J., Bechmann K.A., Bailer A.J. et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2007. – V. 222. – P. 122-128.
- Davis M.A., Pritchard S.G., Boyd R.S. et al. Developmental and induced responses of nickel-based and organic defences of the nickel-hyperaccumulating shrub, *Psychotria donarrei* // New Phytol. – 2001. – V. 150. – P. 49-58.
- Dixon R.A., Paiva N.T. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1085-1097.
- Dragisic-Maksimovic J., Maksimovic V., Zivanovic B. et al. Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth // Plant. Sci. – 2008. – V. 175. – P. 656-662.
- Ford C.M., Boss P.K., Hoj P.B. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyl-transferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo* // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273, № 15. – P. 9224-9233.
- Oncel I., Keles I., Ustun A.S. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings // Environ. Pol. – 2000. – V. 103. – P. 315-320.
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plants // Toxicology. – 2002. – V. 177. – P. 67-80.
- Schutzendubel A., Schwartz P., Teichman T. et al. Cadmium-induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots // Plant Physiol. – 2001. – V. 127. – P. 887-898.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Curr. Opin. Plant Biol. – 2002. – V. 5, № 3. – P. 218-223.
- Youngs H.L., Sundaramoorthy M., Gold M.H. Effects of cadmium on manganese peroxidase. Competitive inhibition of Mn^{II} oxidation and thermal stabilization on the enzyme // Eur. J. Biochem. – 2000. – V. 267. – P. 1761-1769.

Надійшла до редакції
10.04.2009 р.

НАКОПИЧЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК

PHENOLIC COMPOUNDS ACCUMULATION IN MAIZE SEEDLINGS UNDER METAL IONS TOXIC INFLUENCE

V. S. Fedenko, V. S. Struzhko

*Biology Research Institute
of Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University
(Dnipropetrovsk, Ukraine)*

Influence of lead, cadmium and nickel ions on the phenolic compounds accumulation in maize seedlings roots was investigated. Dose dependence of this process was shown to be periodic function. Parameters of functional dependence were found to be determined by nature of metal ion and its phytotoxicity.

Key words: *Zea mays L., lead, cadmium, nickel, phenolic compounds*

НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

В. С. Феденко, В. С. Стружко

*Научно-исследовательский институт биологии
Днепропетровского национального университета им. Олесь Гончара
(Днепропетровск, Украина)*

Исследовали влияние ионов свинца, кадмия и никеля на накопление фенольных соединений в корнях проростков кукурузы. Показано, что дозовая зависимость этого процесса имеет характер периодической функции. Установлено, что параметры функциональной зависимости определяются природой иона металла и его фитотоксичностью.

Ключевые слова: *Zea mays L., свинец, кадмий, никель, фенольные соединения*