

УДК 633.15:58.04:581.144.2

СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТКАНИН КОРЕНЯ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ ЗА ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

© 2011 р. В. С. Феденко, С. А. Шемет

Науково-дослідний інститут біології

Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара

(Дніпропетровськ, Україна)

Досліджували відбивальні та колориметричні характеристики тканин кореня проростків кукурудзи із бурим забарвленням, яке утворюється у результаті токсичного впливу іонів свинцю, нікелю та кадмію. Показано, що ступінь стрес-індукованої пігментації рослинних тканин зумовлена фітотоксичністю металу. Встановлено спектральні показники для інтегральної оцінки редокс-стану рослин.

Ключові слова: *Zea mays L., свинець, нікель, кадмій, побуріння тканин, відбивальні та колориметричні характеристики*

Редокс-регульований гомеостаз клітини визначає функціонування рослинного організму і формування реакцій у відповідь на стресовий вплив (Desikan et al., 2005; Foyer, Noctor, 2005; Колупасєв, 2009). Згідно із концепцією редокс-стану клітини («cellular redox state») для визначення взаємодії між редокс-компонентами та впливу на цей процес чинників середовища необхідна розробка відповідних діагностичних прийомів (Potters et al., 2010). Існуючі методичні підходи кількісної оцінки редокс-стану розподіляють на кілька груп (Potters et al., 2010). До першої групи відносять методи визначення окремих репрезентативних редокс-компонентів. Друга група включає оцінку загальної антиоксидантної активності із використанням радикальних реагентів. Діагностичні прийоми третьої групи ґрунтуються на флуоресцентних методах виявлення специфічних редокс-активних компонентів з їх наступною візуалізацією.

Оскільки відомі методи оцінки редокс-стану базуються на окремих властивостях компонентів окиснювального метаболізму, на нашу думку, необхідна розробка таких діагностичних прийомів, які б інтегрально відображали зміни

окиснювального метаболізму рослин. У зв'язку з тим, що різні стресори можуть спричинити схожі морфогенетичні зміни (Potters et al., 2010), доцільно використовувати саме неспецифічні реакції відповіді.

Однією з таких реакцій рослинного організму на стресорний вплив вважають побуріння («browning») тканин (Богдан, 1981). Фізіолого-біохімічні аспекти цієї реакції остаточно не з'ясовані. Відомо, що побуріння рослинних тканин відбувається за підвищеного вмісту розчинних фенолів і зростання активності феніланінамонійліази – ключового ферменту фенольного біосинтезу (Cantwell et al., 2002). Доведено, що утворений пігмент має полімерну структуру, яка включає окиснені форми коричневих кислот, зв'язаних із лігніном та суберином у клітинних стінках (Amromah, Friend, 1988).

Утворення бурого пігменту за стресорних умов визначають на основі зорової оцінки (Hernandez et al., 1998; Vassilev, 1998; Бессонова, 1999; Wenger et al., 2003; Granati, 2005) або із використанням мікроскопічного аналізу (Schutzendubel et al., 2001) та колориметрії (Cantwell et al., 2002; Aquino-Bolanos, Mercado-Silva, 2004). Разом з тим відомі методичні підходи не вирішують проблему оцінки редокс-стану рослин за умов стресорного впливу.

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

Раніше нами розроблено метод оцінки фізіологічного стану рослин за спектральними параметрами бурої зони кореня, утворення якої індукується токсичною дією хімічних стресорів (Декл. пат. № 71468). Доведена діагностична значимість цих показників на прикладі стресорного впливу органічного ксенобіотику (Феденко та ін., 2005). У зв'язку з цим можна запропонувати гіпотезу, згідно з якою спектральні параметри стрес-індукованої пігментації рослинних тканин слід розглядати як інтегральні показники окиснювального стресу.

Мета роботи – провести порівняльний аналіз відбивальних та колориметричних параметрів бурої зони кореня проростків кукурудзи, утворення якої індуковано токсичною дією іонів свинцю, нікелю та кадмію.

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 1 мМ та воді (контроль) за температури 22-24°C (фотоперіод – 16 год). Ефект токсичної дії металів оцінювали за індексом толерантності (довжиною лінійного розміру кореня у % до контролю), а також за кількістю тест-рослин із бурюю зоною кореня.

Ефект побуріння тканин кореня за токсичної дії іонів металів досліджували за спектральними характеристиками відносно непігментованого контрольного зразка. Для підготовки зразків до вимірювань оптичних параметрів пігментів бурої зони кореня та непігментованого контрольного зразка користувалися стандартним тримачем твердих препаратів за повного покриття поверхні (діаметр – 2 см), що забезпечувало ідентичність умов для усіх варіантів досліджу.

Спектри відбивання коренів у діапазоні 350-800 нм отримували на спектрофотометрі Specord M 40 (Німеччина), додатково обладнаному приставкою з фотометричною кулею і касетою для математичної обробки «Data Handling I», що дозволило проводити згладжування спектрів із виключенням випадкових шумових піків, а також реєструвати похідні спектрів у режимі нормування (Феденко, Стружко, 1998). Корекцію 100%-ої лінії проводили за стандартом MgO , оптичної нульової точки – за стандартом чорного порожнистого

тіла. Інтенсивність спектрів відбивання наводили в одиницях абсорбції.

Для колориметричних вимірювань користувалися спектрофотометром Specord M 40 та іншою касетою для математичної обробки «Color Measurement» з метою визначення координат кольору (X, Y, Z), координат кольоровості (x, y) та колориметричних коефіцієнтів (L, a, b) препаратів. Значення домінуючої довжини хвилі λ_d і умовної чистоти кольорового тону P_e знаходили графічним методом за кольоровим графіком (Феденко, Стружко, 1998). Кольорові характеристики подавали в колориметричних системах XYZ (λ_d, P_e, L) та $CIELab$ 77. На основі колориметричних коефіцієнтів розраховували кольорову різницю ΔE для коренів із бурюю пігментацією відносно непігментованого контрольного зразка з розподілом цієї інтегральної величини на різниці за яскравістю (ΔL), кольоровістю (ΔC) та кольоровим тоном (ΔH) (Феденко, Стружко, 1998).

Похибка вимірювань оптичних параметрів не перевищувала 5%. Достовірність різниці експериментальних даних оцінювали при $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлені значення індексу толерантності тест-рослин (рис. 1) підтвердили значний ступінь токсичного впливу іонів металів за дослідженої концентрації (1 мМ). Максимальна фітотоксичність відзначена для Cd^{2+} . При вирощуванні рослин за наявності іонів металів у середовищі кореневого живлення спостерігалось формування бурої зони кореня. У разі дії Ni^{2+} кількість рослин із стрес-індукованою пігментацією кореня становила 80,6% від загальної кількості у експерименті, тоді як для Pb^{2+} та Cd^{2+} така сукупність була 100%.

Відбивання бурої зони кореня характеризувалося спектральною кривою з максимумами при 396-398, 445-450, 475-480 нм (рис. 2). Слід зазначити, що у спектрі відбивання непігментованого контрольного зразка спостерігалися близькі за положенням низькоінтенсивні максимуми (рис. 2). Інтенсивність максимумів для рослинних тканин, сформованих за дії металів, підвищена у 1,7-2,1 раза (рис. 2). Подібність положення максимумів для контрольного і дослідного зразків свідчить про однакову хімічну природу біохрому *in vivo*, а підвищення інтенсивності цих екстремумів підтвердило індукцію його накопичення у разі токсичного ефекту іонів металів.

СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

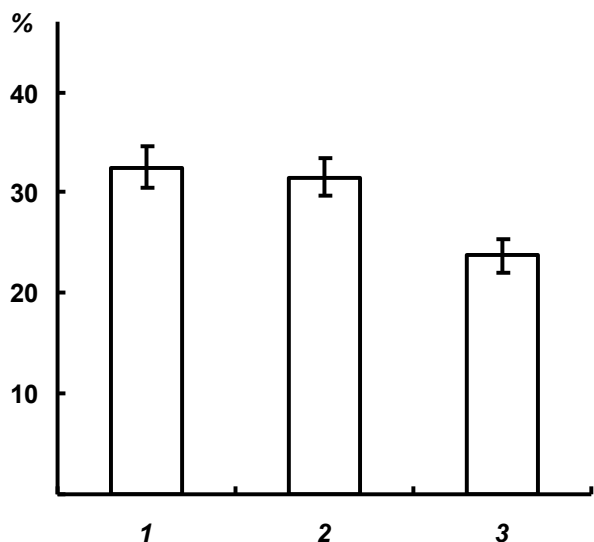


Рис. 1. Індекс толерантності (%) проростків кукурудзи за токсичної дії іонів Pb²⁺ (1), Ni²⁺ (2) і Cd²⁺ (3) (концентрація 1 мМ).

Хімічна структура бурого пігменту дотепер не з'ясована. Однак, відомо (Bernads et al., 1995), що до складу біополімерів такого типу входить ароматичний фрагмент фенольної природи, який може зумовлювати властивість поглинання світла у видимому діапазоні. Основу ароматичного фрагмента складає полімерна матриця, яка утворена ковалентно зв'язаними похідними гідроксикоричної кислоти. Саме такий структурний фрагмент може бути хромофорною системою, що зумовлює селективне поглинання видимого випромінювання тканиною кореня з бурим пігментом, який утворюється за токсичної дії металу. З одного боку, полімерна природа біохрому, а з іншого боку, можливість різних поєднань похідних гідроксикоричної кислоти в процесі стрес-індукованої окиснювальної кон'югації зумовлює тип спектральної кривої без чіткого прояву максимумів, що характерно саме для полімерних хромофорних систем (Бриттон, 1986).

Ступінь розподілу максимумів підвищена шляхом диференціювання спектральної кривої. Наявність максимумів при 397, 420, 445, 475 нм і мінімумів при 410, 432, 459, 490 нм (рис. 3) підтверджує складний характер смуги відбивання бурого пігмента, утвореної за рахунок суперпозиції хромофорів із близькими спектральними характеристиками.

Встановлення колориметричних параметрів дозволило кількісно охарактеризувати стрес-індуковану пігментацію рослинних тка-

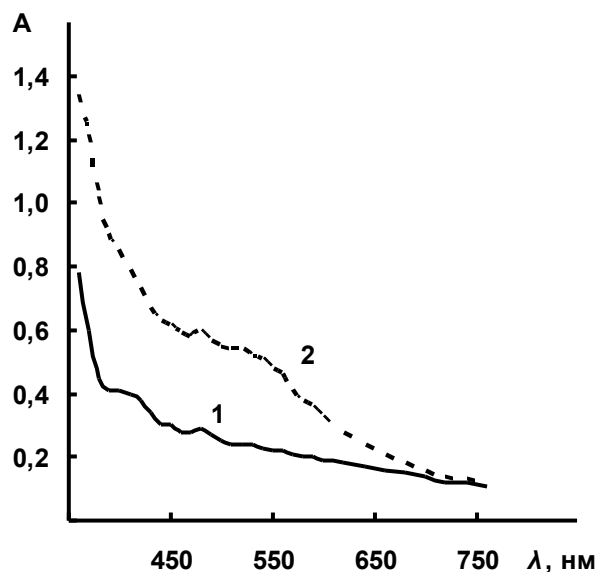


Рис. 2. Спектри відбивання коренів проростків кукурудзи. 1 – непігментована зона (контроль), 2 – бура зона (1 мМ Pb²⁺).

нин. Накопичення бурого пігменту в тканинах кореня призвело до підвищення домінуючої довжини хвилі на 4,4-4,9 нм, а максимальне значення λ_d виявлено у разі дії найтоксичніших іонів Cd²⁺ (табл. 1). При цьому побуріння рослинних тканин у разі обробки іонами металів спричиняло підвищення значення умовної чистоти кольорового тону (табл. 1). Тенденції змін λ_d та P_e тканин кореня за умов токсичного ефекту представлені на кольоровому графіку (рис. 4). Токсичний вплив металів зменшував величину коефіцієнта яскравості як інтегрального показника світлового потоку, який відбивається від рослинної тканини (табл. 1). При цьому найсуттєвіше зменшення величини L відносно контролю встановлене для найтоксичніших іонів Cd²⁺. Значення колориметричних коефіцієнтів a та b , чутливих до змін забарвлення, збільшувалося з підвищенням накопиченням бурого пігменту за умов стресорного впливу (табл. 1).

Відмінності стрес-індукованої пігментації рослинних тканин відносно контрольного зразка охарактеризовані також на основі розрахованих кольорових різниць (табл. 2). Найсуттєвіший внесок в інтегральну величину ΔE для усіх металів встановлений для різниці за кольоровістю ΔC , яка безпосередньо зумовлює зміну кольорового стимулу рослинних тканин.

Аналізуючи отримані результати, слід зазначити подібність спектральних характеристик для рослинних тканин, сформованих за дії різних металів, що свідчить про однотипність

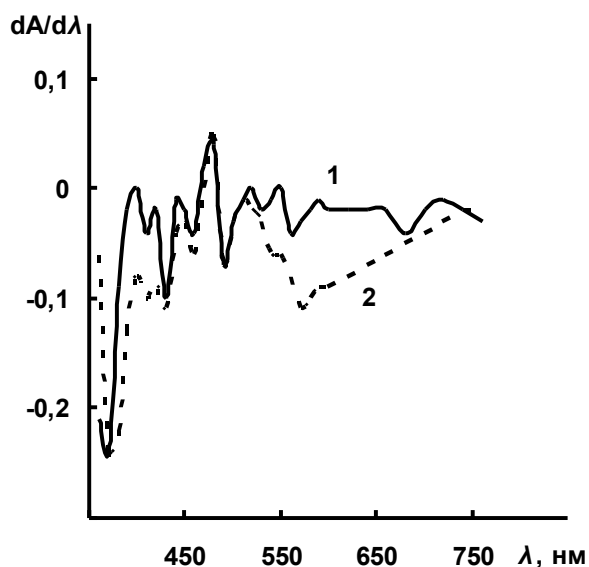


Рис. 3. Перші похідні спектрів відбивання коренів проростків кукурудзи. 1 – непігментована зона (контроль), 2 – бура зона (1 мМ Pb²⁺).

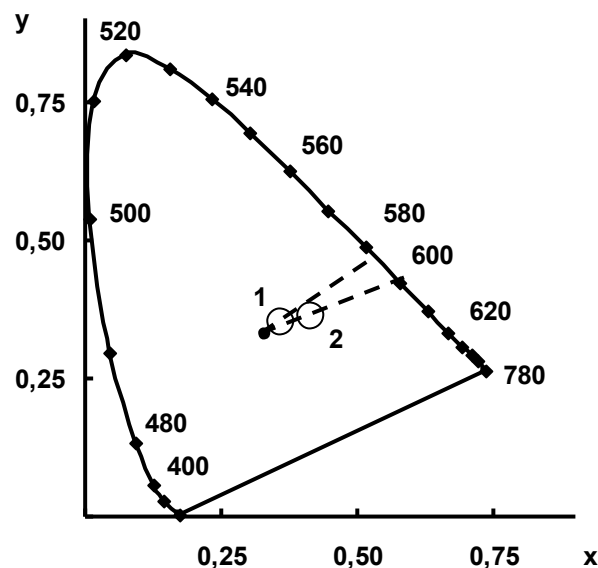


Рис. 4. Координати кольоровості коренів проростків кукурудзи. 1 – непігментована зона (контроль), 2 – бура зона (1 мМ Pb²⁺).

Таблиця 1. Колориметричні параметри бруї зони кореня проростків кукурудзи за дії іонів металів

Іон металу	$\lambda_{об}$ нм	P_{σ} %	L	a	b
Контроль	585,3	13,16	84,53	-8,49	-56,53
Pb ²⁺	590,0	29,60	70,70	6,03	-30,92
Ni ²⁺	589,7	28,04	75,85	1,92	-37,08
Cd ²⁺	590,2	38,38	43,95	5,14	-15,74

Таблиця 2. Кольорові різниці бруї зони кореня проростків кукурудзи за дії іонів металів відносно контролю

Іон металу	ΔE	ΔL	ΔC	ΔH
Pb ²⁺	32,53	-13,83	-25,66	14,43
Ni ²⁺	23,71	-8,68	-20,03	9,24
Cd ²⁺	33,84	-19,36	-24,94	12,18

утвореного *in vivo* стрес-індукованого біохрому. З іншого боку, найконтрастніші відмінності відносно контролю встановлені для найтоксичніших іонів Cd²⁺. Така залежність оптичних параметрів пігментованих тканин від фітотоксичності металу може бути пов'язана із різним ступенем індукованого окиснювального стресу. Слід також враховувати складну функціональну залежність накопичення фенольних сполук (метаболічних попередників бурого пігменту) на фоні токсикантів (Феденко, Стружко, 2009; Пат. 85040).

Подібність спектральних характеристик бурого пігменту в коренях проростків кукуру-

дзи за дії металів і ацетохлору (Феденко та ін., 2005) підтверджує неспецифічність цієї реакції для органічних та неорганічних ксенобіотиків, які спричиняють подібні зміни окиснювального метаболізму.

Використані нами спектроскопія відбивання у видимому діапазоні та колориметрія розширюють методичну основу дослідження стрес-індукованої пігментації рослинних тканин. Однак, на відміну від інших прийомів, такі методи найбільш адекватні для встановлення цього ефекту, оскільки є кількісними показниками забарвлення. На відміну від візуалізації окремих редокс-компонентів за допомогою

СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

флуоресцентного методу (Potters et al., 2010), колориметричні параметри базуються на фізичній теорії кольору і тому дозволяють замінити суб'єктивну візуальну оцінку забарвлення об'єктивно визначеними оптичними характеристиками рослинних тканин.

Діагностична значимість відбивальних і колориметричних параметрів полягає у можливості оцінки редокс-стану рослин неруйнівним способом.

Таким чином, реакція-відповідь побуріння тканин кореня проростків, індукована токсичною дією іонів свинцю, нікелю та кадмію, може бути визначена за відбивальними та колориметричними параметрами. Ступінь стрес-індукованої пігментації рослинних тканин зумовлена фітотоксичністю металу.

ЛІТЕРАТУРА

- Бессонова В.П.* Цитофизиологические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. – Запорожье, 1999. – 208 с.
- Богдан Г.П.* Природа защитной реакции растений. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.
- Бриттон Г.* Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
- Колупаев Ю.С.* Роль основных сигнальных интермедиатов у формировании адаптивных реакций растений на действие абiotических стрессоров // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. – К.: Логос, 2009. – Т. 2. – С. 166-194.
- Феденко В.С., Стружко В.С.* Колориметрия у фізіології та біохімії рослин. – Дніпропетровськ: ДДУ, 1998. – 68 с.
- Феденко В.С., Стружко В.С.* Накопичення фенольних сполук у проростках кукурудзи за токсичної дії іонів металів // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 56-61.
- Феденко В.С., Шемет С.А.* Біохроміка як напрям системної біології // Фізичні процеси та поля технічних і біологічних об'єктів. Тези наук. доп. VIII Всеукр. наук.-техн. конф. (Кременчук, 6-8 листопада 2009 р.). – Кременчук, 2009. – С. 80.
- Феденко В.С., Шемет С.А., Стружко В.С.* Відбивні параметри тканин кореня проростків кукурудзи за токсичної дії ацетохлору // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2005. – Вип. 1 (6). – С. 57-63.
- Декл. пат. № 71468*, Україна, МКВ⁷ А 01 G 7/00. Спосіб діагностики фізіологічного стану рослин / В.С. Феденко, С.А. Шемет, В.С. Стружко. – Опубл. 15.11.2004, Бюл. № 11.
- Пат. № 85040*, Україна, МПК⁸ А 01 G 7/00. Спосіб диференційної діагностики впливу ксенобіотиків на стійкість рослин / В.С. Феденко, В.С. Стружко. – Опубл. 25.12.2008, Бюл. № 24.
- Ampomah Y.A., Friend J.* Insoluble phenolic compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora* and *Phoma* // Phytochemistry. – 1988. – V. 27. – P. 2533-2541.
- Aquino-Bolanos E.N., Mercado-Silva E.* Effects of polyphenol oxydase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama // Postharv. Biol. Technol. – 2004. – V. 33. – P. 275-283.
- Bernards M.A., Lopez M.L., Zajicek J., Lewis N.G.* Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – P. 7382-7386.
- Cantwell M.I., Peiser G., Mercado-Silva E.* Induction of chilling injury in jicama (*Pachyrhizus erosus*) roots: changes in texture, color and phenolics // Postharv. Biol. Technol. – 2002. – V. 25. – P. 311-320.
- Desikan R., Hancock J., Neil S.* Reactive oxygen species as signalling molecules // Antioxidants and reactive oxygen species in plants / Ed. N. Smirnoff. – Oxford: Blackwell Publishing, 2005. – P. 169-196.
- Foyer C.H., Noctor G.* Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context // Plant Cell Environ. – 2005. – V. 28. – P. 1056-1071.
- Ghanati E., Morita A., Yokota H.* Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system // Plant Soil. – 2005. – V. 276. – P. 133-141.
- Hernandez L.E., Lozano-Rodriguez E., Garate A., Carpena-Ruiz R.* Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings // Plant Sci. – 1998. – V. 132. – P. 139-151.
- Potters G., Horemans N., Jansen M.A.K.* The cellular redox state in plant stress biology – a charging concept // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – V. 48. – P. 292-300.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Jansen M.A.K.* Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32. – P. 158-169.
- Schutzenhubel A., Schwanz P., Teichmann T. et al.* Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in

ФЕДЕНКО, ШЕМЕТ

Scots pine roots // Plant Physiol. – 2001. – V. 127. – P. 887-898.

mium contamination in soil during ontogenesis // Environ. Pol. – 1998. – V. 103. – P. 287-293.

Vassilev A., Tsonev T., Yordanov I. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cad-

Wenger K., Gupta S.K., Furrer G., Schulin R. The role of nitrilotriacetate in copper uptake by tobacco // J. Environ. Qual. – 2003. – V. 32. – P. 1669-1676.

*Надійшла до редакції
30.09.2010 р.*

SPECTRAL PARAMETERS OF ROOT TISSUES OF MAIZE SEEDLINGS UNDER TOXIC HEAVY METALS ACTION

V. S. Fedenko, S. A. Shemet

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

Reflective and colourimetric parameters of root tissues of maize seedlings with brown pigmentation formed under toxic action of lead, nickel and cadmium were investigated. The level of stress-induced pigmentation of plant tissues was shown to be determined by the metal phytotoxicity. Spectral indicators for integral estimation of plant redox state were derived.

Key words: *Zea mays L., lead, nickel, cadmium, tissue browning, reflective and colourimetric parameters*

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТКАНЕЙ КОРНЯ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В. С. Феденко, С. А. Шемет

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

Исследовали отражательные и колориметрические характеристики тканей корня проростков кукурузы с бурой окраской, которая образуется в результате токсического влияния ионов свинца, никеля и кадмия. Показано, что степень стресс-индуцированной пигментации растительных тканей обусловлена фитотоксичностью металлов. Установлены спектральные показатели для интегральной оценки редокс-состояния растений.

Ключевые слова: *Zea mays L., свинец, никель, кадмий, побурение тканей, отражательные и колориметрические характеристики*