

ЦІАНІДИН ЯК ЕНДОГЕННИЙ ХЕЛАТОР ІОНІВ МЕТАЛІВ У КОРЕНЯХ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ

В. С. ФЕДЕНКО

Науково-дослідний інститут біології Дніпропетровського національного університету, Україна;
e-mail: opticlub@ukr.net

Виявлено здатність ціанідину до зв'язування іонів різних металів у коренях проростків кукурудзи, ґрунтуючись на даних спектрів відбиття та колориметрії. Установлено спектральні критерії асоціації пігменту з металами *in vivo*.

Ключові слова: ціанідин, іони металів, хелати, спектроскопія відбиття, колориметрія.

Використання рослин у технологіях фітотримередіації обумовлено наявністю механізмів стійкості, які включають детоксикацію полютантів [1–3]. У процесі детоксикації металів на клітинному рівні виділяють два етапи: хімічну модифікацію та компартаментацію їх у вакуолях [4], де іони металів найчастіше містяться в комплексах з ендogenousними хелаторами [5].

Нами доведено [6–8], що до хелаторів належать антоціани, які локалізуються у вакуолях клітин коренів проростків кукурудзи. Іншими авторами було також підтверджено здатність цих пігментів зв'язуватись з іонами молібдату та вольфрамату в гіпокотиліях рослин *Brassica* [9, 10]. Після встановлення оборотності процесу асоціації антоціанових сполук залежно від вмісту в середовищі іонів свинцю [7, 8] ми вважали доцільним на наступному етапі дослідження з'ясувати загальні особливості взаємодії фенольного хелатора з іонами різних металів, зважаючи на такі обставини:

– для забезпечення ефективного функціонування рослин ендogenousні хелатори мають зв'язувати різні елементи кореневого живлення в катіонній або аніонній формах;

– під час еволюційного розвитку у рослин за дії стресорних чинників формуються адаптивні реакції, і тому хелатування відбувається як із біогенними елементами, так і токсичними металами.

Методичним підґрунтям для вивчення зазначених питань ми запропонували підхід, який ґрунтується на ідентифікації асоційованої форми антоціану з металом [11–13]. Вибираючи, згідно з рекомендаціями М. М. Мусієнка [14], тест-об'єкт для з'ясування фізіолого-біохімічних аспектів стійкості організму до надлишку металів у середовищі, доцільно використо-

вувати рослини-елімінатори, у яких бар'єрна функція кореневої системи перешкоджає надходженню токсичних доз металу до надземної частини. До таких рослин належить кукурудза [15].

Метою роботи було дослідити ефект зв'язування антоціану з іонами металів у катіонній та аніонній формі в коренях проростків кукурудзи.

Матеріали і методи

Як тест-об'єкт використовували проростки кукурудзи гібриду Промінь-170 МВ, які вирощували 8 діб у рулонах вологого фільтрувального паперу. Зв'язування іонів металів з ціанідином *in vivo* досліджували як рекомендовано в роботі [16]. У модельному експерименті використовували 0,5-сантиметрові сегменти коренів зони диференціації, в якій локалізується пігмент. Препарати коренів обробляли 1 год 10^{-2} М розчинами $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, Na_2MoO_4 , MgCl_2 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, NH_4VO_3 , а в контрольному варіанті – водою. Тривалість експозиції підбирали експериментально з урахуванням даних, які свідчать, що упродовж експерименту зберігається нормальне надходження іонів до сегментів коренів [16]. Зміни стану ціанідину у тканинах визначали за параметрами спектрів відбиття та колориметрії зразків. Ідентичність процедури підготовки препаратів і реєстрації їхніх спектральних характеристик досягалась шляхом використання стандартного тримача для твердих зразків з однаковою площею поверхні.

Спектри відбиття корневих сегментів визначали в діапазоні 350–800 нм на спектрофотометрі Sperecord M-40 (Німеччина), який був додатково обладнаний приставкою з фотометричною кулею і касетою "Data Handling I"

для математичного оброблення одержаних даних [17]. Ефект розширення максимуму відбиття тестували за коефіцієнтом форми спектральних кривих при 535–780 нм ($KФ_{535-780}$), для діапазону якого характерна контрастність змін між параметрами зразків [18]. Диференційний спектр обчислювали за різницею абсорбції ΔA при відповідній довжині хвилі у спектрах відбиття дослідного і контрольного зразків. Забарвлення тканин кореня оцінювали на основі колориметричних вимірювань на спектрофотометрі Specord M-40 з використанням касети “Color Measurement” для математичного оброблення даних згідно з рекомендаціями, описаними в роботі [17]. Кольорові характеристики наведено в колориметричних системах XYZ (координати кольоровості x , y ; домінувальна довжина хвилі λ_d ; умовна частота кольору P_c ; коефіцієнт яскравості L) та *CIE Lab 77* (колориметричні коефіцієнти). Грунтуючись на значеннях колориметричних коефіцієнтів L , a та b обчислювали різницю кольору ΔE між обробленими і необробленими іонами металів зразками, а також розподіл цієї інтегральної величини на складові різниці за яскравістю ΔL , кольоровістю ΔC та кольоровим тоном ΔH . Одержані дані обробляли стандартними статистичними методами, похибка вимірів не перевищувала 5%.

Результати і обговорення

Одержані параметри спектрів відбиття коренів у видимому діапазоні світла за дії на них іонів металу підтвердили загальні тенденції змін стану антоціану (ціанідин 3-глюкозиду), який накопичується в контролі у флавілієвій формі [19]. Так, у коренях, оброблених іонами металів, спостерігається довгохвильове зміщення максимуму відносно контрольного варіанта (рис. 1, оброблення зразка MoO_4^{2-} для порівняння з даними, наведеними в роботі [9]). Такі зміни є загальними для досліджених нами іонів металів, а діапазон зміщення максимуму пігменту у спектрах відбиття коренів становив 4,3–23,7 нм (табл. 1). Інша особливість дії іонів металу на корені – розширення максимуму (рис. 1). Виявленим нами змінам притаманні загальні властивості, які не залежать від природи іонів металів, що підтверджується збільшенням значення коефіцієнтів форми спектральних кривих у діапазоні 535–780 нм ($KФ_{535-780}$; табл. 1).

Установлені в досліді відмінності спектральних характеристик пов'язані з утворенням *in vivo* зв'язаного з металом ціанідину на тлі неасоційованої форми пігменту. Виник-

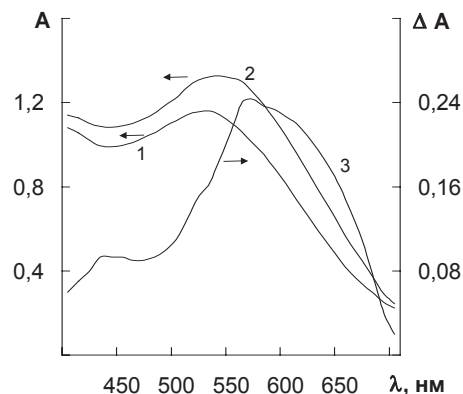


Рис. 1. Спектри відбиття коренів проростків кукурудзи: 1 – контроль, 2 – оброблення розчином 10^{-2} М MoO_4^{2-} , 3 – диференційний спектр коренів, оброблених 10^{-2} М MoO_4^{2-} , порівняно з контролем

нення поблизу максимуму флавілієвої структури додаткової смуги асоціату з підвищеним ступенем спряження у хромофорній системі внаслідок підсумовування приводить до розширеного максимуму, який зміщується в бік довгих хвиль. Для відокремлення внеску асоціату ціанідин – метал до максимуму, утвореного додаванням двох форм пігменту, використано диференційну спектрофотометрію [8]. Графічне пояснення цього методичного прийому наведено на рис. 1. Аналізуючи зміни різниці абсорбції ΔA між інтенсивністю відбиття коренів, оброблених іонами MoO_4^{2-} , та коренями контрольного варіанта за відповідної довжини хвилі, слід відзначити наявність в диференційному спектрі характерного максимуму при 560 нм (рис. 1), який обумовлено внеском саме асоціату. Присутність такого максимуму є загальною ознакою диференційних спектрів у разі оброблення коренів кукурудзи іонами різних металів, а зміна положення цієї смуги в діапазоні 560–660 нм (табл. 1) пояснюється модифікувальним впливом природи металу на спектральні параметри асоційованого пігменту [10]. Крім того, порівняння інформативності параметрів спектрів відбиття, які характеризують взаємодію ціанідину з іонами MoO_4^{2-} в коренях проростків кукурудзи (рис. 1), та рентгенівських абсорбційних спектрів, що свідчать про зв'язування антоціану з іонами молібдату в гіпокотиліях рослин *Brassica* [18], було встановлено, що запропонований нами методичний підхід надає можливість досліджувати також інший аспект процесу – зміну стану хромофорної системи біоліганду у складі металокомплексу.

Таблиця 1. Характеристика спектрів відбиття та диференційних спектрів коренів проростків кукурудзи за дії на них іонів різних металів

Варіанти дослідів	Спектр відбиття		КФ ₅₃₅₋₇₈₀	Диференційний спектр $\lambda_{\text{макс}}$, нм
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\Delta\lambda$, нм		
Контроль	519,9	—	1,40	—
Оброблення Cd ²⁺	543,6	+23,7	1,79	650
Контроль	522,0	—	1,32	—
Оброблення Fe ²⁺	544,8	+22,8	1,52	640
Контроль	518,8	—	1,36	—
Оброблення MoO ₄ ²⁻	542,4	+23,6	1,71	560
Контроль	515,6	—	1,40	—
Оброблення Mg ²⁺	519,9	+4,3	1,63	590
Оброблення Al ³⁺	524,2	+8,6	1,88	560
Контроль	518,0	—	1,32	—
Оброблення Ni ²⁺	526,2	+8,2	1,55	660
Контроль	519,9	—	1,31	—
Оброблення VO ₃ ⁻	524,2	+4,3	1,72	595

Примітка: КФ₅₃₅₋₇₈₀ — коефіцієнт форми спектральних кривих (λ 535–580 нм)

Сукупність колориметричних параметрів коренів за дії іонів металів визначається сумою двох кольорових стимулів із різних діапазонів: червоного для неасоційованого ціанідину та синього — для пігменту, зв'язаного з металом. Унаслідок цього переважає тенденція змін координат кольоровості коренів, оброблених

іонами металів, яка наближується до діапазону пурпурних кольорів із переходом у цю область після оброблення іонами Fe²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, MoO₄²⁻, що підтверджується величиною домінувальної довжини хвилі поглинання (табл. 2). У колориметричній системі CIELab зазначені зміни, які підтверджуються взаємопов'язаними

Таблиця 2. Колориметричні параметри коренів кукурудзи за дії на них іонів різних металів

Варіанти дослідів	λ_d , нм	P_e , %	L	a	b
Контроль	621	39,68	45,26	27,40	-21,63
Оброблення Cd ²⁺	642	26,95	41,87	19,23	-29,03
Контроль	613	35,82	50,55	22,82	-25,08
Оброблення Fe ²⁺	500*	20,97	34,70	10,11	-37,27
Контроль	636	30,65	42,80	22,21	-27,16
Оброблення MoO ₄ ²⁻	494*	32,15	35,73	22,94	-26,16
Контроль	620	35,01	47,13	23,40	-24,91
Оброблення Mg ²⁺	493*	28,23	43,44	21,87	-30,29
Оброблення Al ³⁺	496*	31,51	36,16	20,64	-32,05
Контроль	610	40,23	50,40	24,52	-21,48
Оброблення Ni ²⁺	623	30,72	42,91	19,95	-26,14
Контроль	609	33,13	56,89	19,92	-29,13
Оброблення VO ₃ ⁻	636	21,95	41,97	13,93	-31,36

Примітка: * додаткова довжина хвилі в області пурпурних кольорів, λ_d — домінувальна довжина хвилі, P_e — умовна чистота кольору, L — коефіцієнт яскравості, a та b — колориметричні коефіцієнти

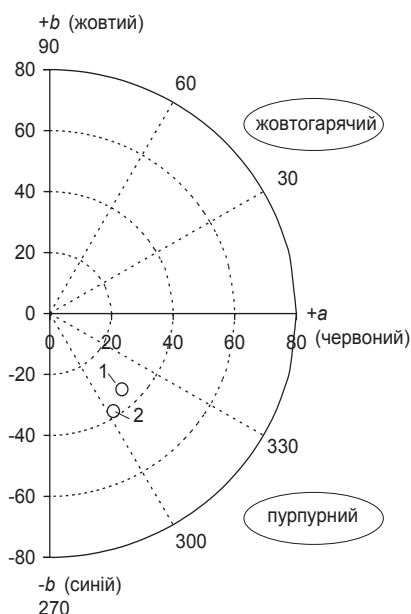


Рис. 2. Діаграма кольоровості коренів проростків кукурудзи: 1 – контроль, 2 – оброблення коренів розчином 10^{-2} М Al^{3+}

значеннями коефіцієнтів a і b (табл. 2), наведено на діаграмі кольоровості коренів, оброблених розчином 10^{-2} М Al^{3+} (рис. 2).

Зменшення умовної чистоти кольорового тону коренів за дії на них іонів металів (табл. 2) узгоджується з відомою фізичною закономірністю в разі додавання двох кольорових стимулів [20]. Аналогічну тенденцію виявлено для колориметричних коефіцієнтів – інтегрального показника L та величин a і b , які чутливі до змін забарвлення (табл. 2). Обчислена на основі колориметричних коефіцієнтів інтегральна величина кольорової різниці ΔE міститься в діапазоні 6,70–23,69 і включає специфічну сукупність внесків складових різниць

за яскравістю ΔL , кольоровістю ΔC і кольорового тону ΔH (табл. 3) залежно від властивостей металу.

Відмінності у спектральних параметрах утворених *in vivo* металохелатів можуть бути пов'язані з такими чинниками: структурою комплексу залежно від природи металу, варіабельністю величини співвідношення вільної та асоційованої форм пігменту, різним ступенем проникнення іонів до клітин та надходженням до вакуолей. На відміну від даних, описаних у статтях [9, 10], щодо утворення металокомплексу антоціану з іонами молібдату та вольфрамату в гіпокотиллях проростків *Brassica*, нами було виявлено, що ефект зв'язування ціанідом різних іонів металів має загальний характер і відбувається в кореневій системі рослини-елімінатора. З огляду на дані стосовно значення металохелатів у метаболізмі рослин [5], ефект зв'язування антоціанами металів може використовуватись в розробленні заходів як для виведення цих токсичних елементів з обміну, так і для регулювання на певному рівні їхньої концентрації, необхідної для забезпечення життєдіяльності рослинного організму. Виявлені нами особливості взаємодії ціанідину з різними металами притаманні також і іншим хелаторам (фітохелатинам, органічним кислотам та амінокислотам) [5].

Таким чином, встановлено, що ціанідин, локалізований в коренях проростків кукурудзи, здатен зв'язувати іони біогенних та токсичних металів у катіонній і аніонній формах. Маркерними ознаками ефекту зв'язування є довгохвильове зміщення та розширення максимуму спектрів відбиття, наближення координат кольоровості рослинних тканин до пурпурного діапазону, зменшення умовної чистоти кольорового тону та колориметричних коефіцієнтів. Загальна здатність ендogenous

Таблиця 3. Дані кольорової різниці коренів проростків кукурудзи порівняно з контролем за дії на них іонів різних металів

Іон металу	ΔE	ΔL	ΔC	ΔH
Cd^{2+}	11,53	-3,39	-0,09	11,02
Fe^{2+}	23,69	-15,85	4,71	16,97
MoO_4^{2-}	7,18	-7,07	-0,29	1,20
Mg^{2+}	6,70	-3,69	3,18	4,60
Al^{3+}	13,38	-10,97	3,94	6,56
Ni^{2+}	9,93	-7,49	0,28	6,52
VO_3^-	16,23	-14,92	-0,97	6,32

Примітка: ΔE , ΔL , ΔC , ΔH – різниця кольору, яскравості, кольоровості та кольорового тону відповідно

хелатору зв'язувати метали обумовлено наявністю у рослин адаптивних реакцій, які були еволюційно сформовані у них до елементів кореневого живлення. Дані щодо здатності фенольного хелатору зв'язувати метали розширює наші уявлення щодо детоксикації ксенобіотиків на внутрішньоклітинному рівні рослин.

ЦИАНИДИН КАК ЭНДОГЕННЫЙ ХЕЛАТОР ИОНОВ МЕТАЛЛОВ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

В. С. Феденко

Научно-исследовательский институт биологии Днепропетровского национального университета, Украина;
e-mail: opticl@ukr.net

Установлена способность цианидина к связыванию ионов разных металлов в корнях проростков кукурузы по параметрам спектров отражения и колориметрии. Выявлены спектральные критерии ассоциации пигмента с металлами *in vivo*.

Ключевые слова: цианидин, ионы металлов, хелаты, спектроскопия отражения, колориметрия.

CYANIDIN AS ENDOGENOUS CHELATOR OF METAL IONS IN MAIZE SEEDLING ROOTS

V. S. Fedenko

Scientific Research Institute of Biology, Dnepropetrovsk National University, Ukraine;
e-mail: opticl@ukr.net

S u m m a r y

The property of cyanidin complexation with different metal ions in maize seedlings roots was established using parameters of reflectance spectroscopy and colorimetry. The spectral criteria of pigment association with metals *in vivo* were evaluated.

Key words: cyanidin, metal ions, chelates, reflectance spectroscopy, colorimetry.

1. Скопецька О. В., Косик О. І., Мусієнко М. М. // Физиол. и биохим. культ. растений. — 2004. — 36, № 1. — С. 27–33.

2. Гуральчук Ж. З., Гудков І. М. // Там же. — 2005. — 37, № 5. — С. 371–383.
3. Косаківська І. В. // Там же. — 2007. — 39, № 4. — С. 279–290.
4. Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M. A., Davies T. G. E. // Trends Plant Sci. — 1997. — 2, N 4. — P. 144–151.
5. Rauser W. E. // Cell Biochem. Biophys. — 1999. — 31, N 1. — P. 19–48.
6. Шемет С. А., Феденко В. С. // Физиол. и биохим. культ. растений. — 2005. — 37, № 6. — С. 505–512.
7. Феденко В. С. // Там же. — 2006. — 38, № 1. — С. 67–74.
8. Феденко В. С. // Укр. біохім. журн. — 2007. — 79, № 2. — С. 124–129.
9. Hale K. L., Tufan H. A., Pickering I. J. et al. // Physiol. Plant. — 2002. — 116. — P. 351–358.
10. Hale K. L., McGrath S. P., Lombi E. et al. // Ibid. — 2001. — 126. — P. 1391–1402.
11. Феденко В. С., Шемет С. А., Стружко В. С. // Укр. біохім. журн. — 2005. — 77, № 1. — С. 104–109.
12. Феденко В. С. // Там само. — 2006. — 78, № 2. — С. 149–157.
13. Пат. 4426 UA, G01N 33/02. Спосіб ідентифікації металокомплексних сполук антоціанових пігментів / В. С. Феденко, В. С. Стружко, Т. В. Стеценко. — Опубл. 17.01.05. Бюл. № 1.
14. Мусієнко М. М. Екологія рослин. — К.: Либідь, 2006. — 432 с.
15. Серегин І. В., Кожевникова А. Д. // Физиол. растений. — 2003. — 50, № 5. — С. 793–800.
16. Pineros M. A., Magalhaes J. V., Carvalho Alves V. M., Kochian L. V. // Plant Physiol. — 2002. — 129, N 7. — P. 1194–1206.
17. Феденко В. С., Стружко В. С. Колориметрія у фізіології та біохімії рослин. — Дніпропетровськ: Вид-во Дніпр. держ. ун-ту, 1998. — 68 с.
18. Феденко В. С., Стружко В. С. // Физиол. и биохим. культ. растений. — 1996. — 28, № 4. — С. 273–281.
19. Holton T. A., Cornish E. C. // Plant Cell. — 1995. — 7. — P. 1071–1083.
20. Джадд Д., Вышецки Г. Цвет в науке и технике. — М.: Мир, 1978. — 592 с.

Отримано 27.10.2007