



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85043 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A01G 7/00  
G01N 1/00  
G01N 21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ МЕТАЛІВ В РОСЛИННИХ ТКАНИНАХ

1

(21) 20041109810  
(22) 29.11.2004  
(24) 25.12.2008  
(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.  
(72) ФЕДЕНКО ВОЛОДИМИР САВЕЛІЙОВИЧ, UA,  
ШЕМЕТ СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, UA, СТРУЖКО  
ВІКТОР СТЕПАНОВИЧ, UA, ПРИЙМАК КАТЕРИНА  
ПЕТРІВНА, UA  
(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ, UA  
(56) UA 71468 A, 15.11.2004.  
WO 0036422 A1, 22.06.2000.  
(57) Спосіб визначення зв'язування металів в рос-  
линних тканинах, що включає обробку рослин до-  
ступними формами металу, підготовку рослинного

2

препарату до аналізу та встановлення ефекту  
зв'язування металу за спектральними параметра-  
ми продукту його взаємодії з хелатором феноль-  
ного типу, який **відрізняється** тим, що визначають  
розподіл інтенсивності відбитого світлового потоку  
препаратами коренів дослідних і контрольних рос-  
лин залежно від довжини хвилі випромінювання в  
діапазоні 450-750нм, розраховують диференцій-  
ний спектр за різницею оптичної густини при одна-  
ковій довжині хвилі дослідних і контрольних зраз-  
ків з інтервалом 5-10нм і за наявності максимуму в  
диференційному спектрі при 540-670нм встанов-  
люють ефект зв'язування металу хелатором в ро-  
слинній тканині.

Винахід стосується рослинництва, а саме ви-  
рощування рослин за наявності доступних форм  
металів у середовищі.

Спосіб може бути використаний в технологіях  
фітореMediaції для відбору видів рослин, стійкість  
яких забезпечується їх здатністю до детоксикації  
важких металів, а також для оцінки фізіологічного  
стану за дії надлишку біогенних металів, що зни-  
жують продуктивність рослин.

Відомий спосіб визначення ефекту зв'язування  
металів у рослинних тканинах, згідно з яким оцінку  
проводять на основі аналізу продукту взаємодії  
металу з хелатором сульфгідрильного типу [1].

До причин, що перешкоджають спрощенню  
процедур підготовки препарату до аналізу і виміру  
діагностичного показника, слід віднести необхід-  
ність тривалої і складної екстракції металокомпле-  
ксних сполук із фіксованого рослинного зразка з  
використанням рідкого азоту, буферних розчинів і  
соляної кислоти, гель-фільтрації з застосуванням  
високоєфективної рідинної хроматографії, аналіз  
хроматографічних фракцій за двома методами -  
атомно-абсорбційний аналіз металу та фотомет-  
ричний аналіз фітохелатинів. Крім того, складні  
операції пробопідготовки і аналізу можуть привес-

ти до руйнування металокомплексних сполук, які  
утворюються в нативній рослинній тканині.

Найбільш близьким до об'єкта, що заявляєть-  
ся, є спосіб визначення ефекту зв'язування мета-  
лів в рослинних тканинах, що включає обробку  
рослин доступними формами металу, підготовку  
рослинного препарату до аналізу та встановлення  
ефекту зв'язування металу за спектральними па-  
раметрами продукту його взаємодії з хелатором  
фенольного типу [2].

Відомий спосіб передбачає, що після вирощу-  
вання рослин в присутності та відсутності солі ме-  
талу операцію підготовки препарату проводять  
наступним чином: відбирають зразки рослинних  
тканин, подрібнюють їх та зберігають при -80°C  
Підготовлений препарат розміщують в кюветі, яку  
термостатують при -258°C за допомогою кріостату  
з рідким гелієм в процесі виміру та визначають  
параметри рентгенівського абсорбційного спектру.  
Ефект взаємодії металу з антоціаном визначають  
за зміною спектральних характеристик зв'язку ме-  
тал-кисень у складі біоліганда відносно стандарт-  
ного розчину солі металу.

Операція підготовки препарату проводиться з  
руйнуванням рослинної тканини і відзначається  
складністю, оскільки здійснюється при низьких

(13) C2

(11) 85043

(19) UA

температурах з використанням рідкого азоту. Додаткове ускладнення при вимірах спектральних параметрів пов'язано з необхідністю підтримки низької температури із застосуванням кріостату з рідким гелієм. Крім того, встановлення ефекту зв'язування базується на спектральних характеристиках певного металу.

В основу винаходу поставлено задачу у способі визначення ефекту зв'язування металів у рослинних тканинах шляхом виключення прийомів заморожування і низькотемпературного зберігання зразка в операції підготовки рослинного препарату до аналізу, прийому термостатування кювети із зразком при вимірах спектральних характеристик та встановлення параметрів розподілу відбитого) світлового потоку препаратами коренів забезпечити спрощення процедур підготовки препарату до аналізу і виміру діагностичного показника.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення ефекту зв'язування металів в рослинних тканинах, який включає обробку рослин доступними формами металу, підготовку рослинного препарату до аналізу та встановлення ефекту зв'язування металу за спектральними параметрами продукту його взаємодії з хелатором фенольного типу згідно з винаходом визначають розподіл інтенсивності відбитого світлового потоку препаратами коренів дослідних і контрольних рослин залежно від довжини хвилі випромінювання в діапазоні 450-750нм, розраховують диференційний спектр за різницею оптичної густини при однаковій довжині хвилі дослідних і контрольних зразків з інтервалом 5-10нм і при наявності максимуму в диференційному спектрі при 540-670нм встановлюють ефект зв'язування металу хелатором в рослинній тканині.

Спосіб базується на закономірностях формування стійкості рослин до токсичної дії металів на різних рівнях функціонування організму, у тому числі і на внутрішньоклітинному рівні за рахунок наявності ендogenous хелаторів. Терміном "хелатор" позначено низькомолекулярні метаболіти, які локалізовані у клітині і здатні забезпечувати детоксикацію металу за рахунок його зв'язування в метаболічно неактивні комплексні сполуки. Доступними формами металу є такі, що здатні поглинатися і надходити до рослин із поживного середовища. Дослідними рослинами вважають рослини, які вирощені при дії металу, а контрольними рослинами - рослини, які вирощені при відсутності такої дії.

Підготовка препарату до аналізу не потребує додаткових прийомів заморожування і низькотемпературного зберігання зразка, оскільки для вимірів і використовуються препарати без руйнування тканин кореня одразу по завершенні операції обробки рослин доступними формами металу. Термостатування кювети із зразком в процесі отримання спектральних параметрів стає непотрібним. Ефект зв'язування металу встановлюють за диференційним спектром, який визначено за різницею спектрального розподілу відбитого світлового потоку препаратами дослідних і контрольних рослин безпосередньо в тканині кореня за власними характеристиками хелатора, який модифіковано

комплексоутворенням з різними металами замість спектральних параметрів певного металу в зруйнованій рослинній тканині порівняно із стандартним розчином солі металу. Внаслідок цього забезпечується спрощення процедур підготовки препарату до аналізу і виміру діагностичного показника.

Проводять обробку коренів рослин розчинами солей металів або пророщують насіння дослідних рослин на живильних розчинах з доступними формами металів. Одночасно проводять обробку контрольних рослин в аналогічних умовах при відсутності дії металу. Заповнюють кювету коренями дослідних рослин. Аналогічно готують препарат для контрольних рослин. Вимірюють на спектрофотометрі розподіл інтенсивності відбитого світлового потоку препаратами залежно від довжини хвилі випромінювання в діапазоні 450-750нм. Розраховують диференційний спектр за різницею оптичної густини при однаковій довжині хвилі дослідних і контрольних зразків з інтервалом 5-10нм. При наявності максимуму в диференційному спектрі при 540-670нм встановлюють ефект зв'язування металу хелатором в рослинній тканині.

#### Приклад 1

Для оцінки ефекту зв'язування іонів свинцю в тканині кореня пророщували насіння кукурудзи гібриду Дніпровський 145МВ в рулонах фільтрувального паперу на  $1,8 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчині нітрату свинцю та воді (контроль) при однаковій кількості тест-рослин ( $n=30$ ) та об'ємі живильного розчину (200мл). По завершенні тестування (8 діб) заповнювали кювету коренями дослідних рослин. Для порівняння аналогічно готували препарат для контрольних рослин. На спектрофотометрі Спекорд М40 з фотометричною кулею вимірювали розподіл інтенсивності відбитого світлового потоку препаратами залежно від довжини хвилі випромінювання в діапазоні 450-750нм. Розраховували диференційний спектр за різницею оптичної густини при однаковій довжині хвилі дослідних і контрольних зразків з інтервалом 5-10нм. В диференційному спектрі відзначали наявність максимуму при 540нм, який обумовлено ефектом зв'язування іонів свинцю хелатором фенольного типу (ціанідом) в тканині кореня.

Отримані результати підтверджують, що для рослин-елімінаторів, до яких належить кукурудза, бар'єрна функція кореневої системи забезпечує стійкість шляхом детоксикації металу за рахунок його зв'язування з ендogenous хелатором.

#### Приклад 2

Аналогічно прикладу 1 проводили визначення ефекту зв'язування при обробці рослин кукурудзи різними концентраціями нітрату кадмію ( $3 \cdot 10^{-5}$  і  $9 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Для підтвердження змін продуктивності паралельно визначали загальноприйнятні показники - нагромадження маси кореня та надземної частини дослідних рослин відносно контролю як індекс толерантності (I, %).

Для концентрації  $3 \cdot 10^{-5}$  Cd<sup>2+</sup> моль/л в диференційному спектрі максимум не виявлено, що пов'язано з незначним токсичним ефектом цієї дози металу і відсутністю ефекту його детоксикації за рахунок зв'язування. Цей факт підтверджено не-

значним зниженням маси кореня ( $I=93\%$ ) і відсутністю токсичного впливу на розвиток пагона ( $I=104\%$ ).

Посилення токсичного ефекту при збільшенні концентрації  $\text{Cd}^{2+}$  до  $9 \cdot 10^{-5}$  моль/л призводить до підвищення ступеню інгібування росту кореня ( $I=69\%$ ) та наявності максимуму в диференційному спектрі при 590 нм як підтвердження детоксикації  $\text{Cd}^{2+}$  за рахунок його зв'язування ціанідом. Реалізація цього ефекту в тканині кореня призводить до менш значного токсичного ефекту металу на розвиток пагона ( $I=95\%$ ) порівняно з кореневою системою.

#### Приклад 3

Аналогічно прикладу 1 визначали ефект зв'язування при комбінованій дії свинцю та кадмію на рослини зернового сорго сорту Судзерн-87, для якого характерно нагромадження в коренях хелатора фенольного типу проантоціанідину. Наявність максимуму при 560 нм в диференційному спектрі підтвердила ефект зв'язування хелатора з іонами важких металів.

#### Приклад 4

Насіння кукурудзи гібриду Дніпровський 145МВ пророщували на воді в рулонах фільтрувального паперу 11 діб. Проводили обробку протягом 1 години відбитків коренів  $10^{-2}$  моль/л розчинами солей біогенних металів в катіонній формі ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,

$\text{Mn}^{2+}$ ) та водою (контроль). Спектральні параметри вимірювали аналогічно прикладу 1. Утворення зв'язку ціанідину з іонами металів в тканині кореня підтверджено наявністю максимумів в диференційних спектрах ( $\text{Mg}^{2+}$ -605 нм,  $\text{Al}^{3+}$ -580 нм,  $\text{Mn}^{2+}$ -670 нм).

#### Приклад 5

Аналогічно прикладу 4 встановили ефект зв'язування ціанідину з металами в аніонній формі по наявності максимуму в диференційних спектрах:

$\text{MoO}_4^{2-}$  – 570,  $\text{VO}_3^-$  – 600,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  – 645 нм.

Таким чином, наведені приклади підтверджують, що при здійсненні заявленого способу досягнуто спрощення процедур підготовки препарату до аналізу і виміру діагностичного показника при встановленні ефекту зв'язування хелаторами фенольного типу різних металів в рослинній тканині без її руйнування.

#### Джерела інформації:

1. Souza J. F., Rauser W.E. Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways // Plant Sci.-2003. - V.165. - P.1009-1022.
2. Hale K.L., McGrath S.P., Lombi E. et al. Molybdenum sequestration in Brassica species. A role for anthocyanins? // Plant Physiol. - 2001. - V.126. - P.1391-1402.