

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка
Хіміко-біологічний факультет
Кафедра ботаніки та зоології

Кваліфікаційна (бакалаврська) робота
«БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ ВАЖКИХ
МЕТАЛІВ НА РАННІ ЕТАПИ РОСТУ ТА РОЗВИТКУ РОСЛИН

***Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawl.»**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
ОПП «Екологічна біотехнологія»

Здобувачки вищої освіти рівня першого
(бакалаврського)
Вікторії ФЕДОРЧУК

НАУКОВИЙ КЕРІВНИК:
кандидат біологічних наук, доцент
Мар'яна ПРОКОП'ЯК

РЕЦЕЗЕНТ:
кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник відділу генетики клітинних
популяцій Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України
Ірина КОНВАЛЮК

Тернопіль – 2026

АНОТАЦІЯ

Федорчук В. Біотехнологічні аспекти впливу важких металів на ранні етапи росту та розвитку рослин *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawł. Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня «бакалавр» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія. ТНПУ ім. В. Гнатюка. Тернопіль, 2026. 47 с.

Критичним етапом онтогенезу рослин є проростання насіння, яке слугує чутливим індикатором толерантності до абіотичних стресів, зокрема важких металів. У роботі досліджено вплив іонів кадмію (CdCl_2 0,1–10 мМ) та купруму (CuSO_4 0,1–5 мМ) на проростання насіння *Carlina onopordifolia in vitro* на середовищі МС/2. Встановлено дозозалежне пригнічення кінцевого відсотка проростання (FGP), середньодобового проростання (MDG) та індексу проростання (GI), а також збільшення середнього часу проростання (MGT).

Показано, що додавання лимонної кислоти (750 мг/л) до середовища МС/2 після культивування на 0,1 мМ Cu^{2+} ефективно пом'якшує негативні наслідки стресу. Приріст довжини кореня збільшився на 48,84 %, довжини листків – на 24,04 %, а інтенсивність утворення нових листків – у 1,7 раза порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про відносну стійкість *C. onopordifolia* до низьких концентрацій кадмію та високу чутливість до купруму. Використання лимонної кислоти є перспективним біотехнологічним підходом для підвищення толерантності рідкісного виду до металотоксикозу.

Ключові слова: *Carlina onopordifolia*, важкі метали, лимонна кислота, проростання насіння, морфологічні ознаки, фотосинтетичний апарат рослин.

SUMMARY

Fedorchuk V. Biotechnological aspects of the influence of heavy metals on the early stages of growth and development of *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawł. Qualification work for the degree of Bachelor in specialty 162 Biotechnology and Bioengineering. Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Ternopil, 2026. 47 p.

Critical stage of plant ontogenesis is seed germination, which serves as a sensitive indicator of tolerance to abiotic stresses, particularly heavy metals. The study investigated the effect of cadmium ions (CdCl_2 0.1–10 mM) and copper ions (CuSO_4 0.1–5 mM) on seed germination of *Carlina onopordifolia* in vitro on MS/2 medium. A dose-dependent inhibition of final germination percentage (FGP), mean daily germination (MDG), and germination index (GI), as well as an increase in mean germination time (MGT), was established.

It was shown that the addition of citric acid (750 mg/L) to the MS/2 medium after cultivation on 0.1 mM Cu^{2+} effectively mitigates the negative effects of stress. Root length increment increased by 48.84%, leaf length by 24.04%, and the intensity of new leaf formation was 1.7 times higher compared to the control. The obtained results indicate the relative resistance of *C. onopordifolia* to low concentrations of cadmium and high sensitivity to copper. The use of citric acid is a promising biotechnological approach for increasing the tolerance of this rare species to metal toxicity.

Keywords: *Carlina onopordifolia*, heavy metals, citric acid, seed germination, morphological traits, plant photosynthetic apparatus.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
РОЗДІЛ I.....	10
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПРОБЛЕМИ ДОСЛІДЖЕННЯ	10
1.1. Важкі метали в навколишньому середовищі: джерела надходження, основні забруднювачі, гранично-допустимі концентрації	10
1.2. Фізіологічні та біохімічні механізми токсичної дії важких металів на рослини.....	12
1.2.1. Вплив кадмію на ранні етапи росту і розвитку рослин.....	12
1.2.2. Вплив купруму на ранні етапи росту і розвитку рослин.....	13
1.3. Вплив важких металів на ранні етапи онтогенезу рослин	14
1.4. Біотехнологічні підходи до подолання токсичності важких металів на ріст і розвиток рослин.	16
РОЗДІЛ II	18
ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	18
РОЗДІЛ III	21
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	21
3.1. Вплив кадмію на показники проростання насіння <i>C. onopordifolia</i>	21
3.2. Вплив купруму на показники проростання насіння <i>C. onopordifolia</i>	29
3.3. Біотехнологічні аспекти підвищення толерантності через використання лимонної кислоти.	35
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

МС – живильне середовище Мурасіге, Скуга;

МС/2 – живильне середовище Мурасіге, Скуга з половинним вмістом макро- та мікросолей;

АФК – активні форми кисню;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ГДК – гранично-допустима концентрація;

АТФ – аденозинтрифосфат;

ФСА – фотосинтетичний апарат.

ВСТУП

Актуальність.

Тривале незбалансоване антропогенне навантаження на природні ресурси призвело до значної техногенної ураженості екосфери України, що, як наслідок, до деградації ґрунтів на великій частині території держави. Екзогенне надходження токсикантів у ґрунти спричиняє ґрунтово-екологічний дискомфорт, що виявляється в негативних змінах фізико-хімічних і агрохімічних властивостей ґрунту, погіршенні умов життєдіяльності ґрунтової біоти, порушенні нормального росту та розвитку культурних рослин аж до їх загибелі. Урешті-решт це суттєво знижує рівень безпеки життєдіяльності людини [1].

У останні роки термін «важкі метали», що охоплює широку групу токсичних забруднювачів і набув значного поширення. Важкі метали належать до пріоритетних забруднюючих речовин, моніторинг яких є обов'язковим у всіх компонентах навколишнього середовища.

Перспективним об'єктом для дослідження реакцій рослин на дію стресових чинників, зокрема важких металів, є *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawł. Цей представник родини Asteraceae занесений до Червоної книги України та має природоохоронний статус вразливого виду [5]. Популяції *C. onopordifolia* трапляються переважно на територіях природно-заповідного фонду, хоча окремі місцезростання виявлені й поза межами природоохоронних територій [19].

Вид характеризується здатністю накопичувати широкий спектр біологічно активних сполук, серед яких інулін, ефірні олії, флавоноїди, тритерпенові сапоніни та інші вторинні метаболіти. Незважаючи на значний науковий інтерес до фармакологічного потенціалу *C. onopordifolia*, дані щодо його реакції на вплив важких металів у літературі відсутні. Водночас для спорідненого виду – *Carlina acaulis* L. – описано метаболічні зміни, індуковані дією іонів срібла [11], що свідчить про доцільність дослідження впливу металів на представників роду *Carlina* L.

Ранні етапи онтогенезу рослин (проростання насіння, вихід проростка та початковий ріст сходів) є критичними і найбільш вразливими до дії токсичних чинників навколишнього середовища, у тому числі важких металів. Пошкодження саме на цих етапах часто призводить до суттєвого зниження схожості насіння, масової загибелі проростків та формування ослаблених рослин, що в подальшому негативно впливає на продуктивність популяцій. Виходячи з цього, розробка ефективних технологій зменшення негативного впливу важких металів на рослини має важливе, актуальне значення.

Метою було вивчити біотехнологічні аспекти впливу важких металів на ранні етапи росту та розвитку *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawł. в умовах *in vitro*, а також підібрати технології пом'якшення негативного впливу на проростання та розвиток проростків.

Відповідно до вище зазначеної мети поставлені наступні **завдання**, а саме:

- Проаналізувати сучасний стан проблеми впливу важких металів на ранні етапи онтогенезу рослин та існуючі біотехнологічні підходи до вивчення токсичності металів.
- Оцінити вплив різних концентрацій важких металів (кадмію і купруму) на показники проростання насіння *C. onopordifolia*.
- Провести порівняльний аналіз чутливості *C. onopordifolia* до різних важких металів та встановити порогові концентрації, які пригнічують ранній розвиток.
- Розробити ефективну методику *in vitro* культивування *C. onopordifolia* на середовищах, забруднених важкими металами, підібравши речовини, які мінімізували б негативний вплив металів.
- Оцінити розроблений підхід до пом'якшення негативного впливу на початковій етапу онтогенезу рослин з оцінкою морфометричних і фізіологічних параметрів рослин.

Об'єкт дослідження – ранні етапи росту та розвитку *C. onopordifolia*.

Предмет дослідження – біотехнологічні показники впливу важких металів на морфологічні показники на ранніх етапах онтогенезу *C. onopordifolia*.

Методи дослідження: Дослідження проводили *in vitro*. Вивчали вплив іонів кадмію (1–10 мМ) та купруму (0,1–5 мМ) на проростання насіння на середовищі МС/2, а також оцінювали ефективність лимонної кислоти (750 мг/л) у зменшенні токсичної дії 0,1 мМ CuSO_4 . Толерантність рослин визначали за морфометричними показниками (довжина кореня, листків, кількість нових листків) та розрахунком індексів проростання (FGP, MDG, MGT, GI) впродовж 14–28 днів культивування. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою t-критерію Стюдента в Microsoft Excel.

Наукова новизна одержаних результатів.

Теоретично обґрунтовано і експериментально доведено можливість використання лимонної кислоти для послаблення токсичної дії важких металів на рослини *C. oporordifolia* в умовах *in vitro*. Вперше встановлено вищу фітотоксичність іонів купруму, порівняно з кадмієм для цього виду, зокрема повну інгібіцію ризогенезу навіть за низьких концентрацій Cu^{2+} (0,1 мМ). Також вперше показано ефективність екзогенного застосування лимонної кислоти (750 мг/л) для відновлення ростових процесів рослин після купрумового стресу.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати можуть бути використані для розробки методів підвищення стійкості рідкісних видів рослин до важких металів у біотехнологічних системах *in vitro*. Інформацію, подану у цій роботі, можна застосовувати при викладанні курсу біотехнологія, екологія у вищих навчальних закладах, а також вчителями біології при проведенні уроків і на позаурочних заходах.

Особистий внесок автора. Автором спільно з науковим керівником проведено планування дослідження, визначені завдання, проаналізовано огляд літератури, здійснено обговорення отриманих результатів, сформульовано висновки, написано кваліфікаційну (бакалаврську) роботу. Автором проведене експериментальне дослідження; наведені у рукописі результати отримано особисто або за безпосередньої участі під час проведення досліджень.

Апробація результатів роботи. Результати дослідження представлені й опубліковані у матеріалах Всеукраїнської онлайн-конференції «Чорнобильські

дзвони» (до 40-річчя Чорнобильської катастрофи). Тернопіль : Вектор, 2026. 322 с. (28 квітня 2026 р.).

Обсяг і структура роботи. Кваліфікаційна (бакалаврська) робота складається із вступу, огляду літератури, опису об'єкту, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження і їх обговорення, висновків, списку літератури, який включає 51 найменувань. Робота містить 2 таблиці і 7 рисунків.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПРОБЛЕМИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Важкі метали в навколишньому середовищі: джерела надходження, основні забруднювачі, гранично-допустимі концентрації

Важкі метали – це група хімічних елементів з атомною масою понад 50 і густиною більше 5 г/см³ (Pb, Cd, Hg, Cu, Zn, Ni, Cr, Mn, As та ін.). Вони є природними компонентами земної кори, але в останні десятиліття їхній вміст у навколишньому середовищі значно зріс через антропогенну діяльність. Джерела надходження важких металів поділяють на природні та техногенні. Природні джерела включають вивітрювання гірських порід, вулканічну діяльність, ерозію ґрунтів та атмосферні опади. Однак основний внесок у забруднення забезпечують техногенні джерела: промислові викиди (чорна та кольорова металургія, хімічна промисловість, енергетика), автотранспорт, видобуток і переробка корисних копалин, застосування мінеральних добрив і пестицидів у сільському господарстві, а також побутові та промислові відходи. У сучасних умовах України суттєвим джерелом додаткового забруднення стали території, що постраждали від бойових дій, де важкі метали надходять із залишків боєприпасів і згорілої техніки [24].

Основними забруднювачами серед важких металів вважаються кадмій, свинець, ртуть, мідь, цинк, нікель та хром. Ці елементи є пріоритетними токсикантами через високу токсичність, здатність до біоаккумуляції та стійкість у довкіллі. Особливо небезпечними є Cd і Pb, які навіть у низьких концентраціях виявляють канцерогенну, мутагенну та тератогенну дію [47].

Відповідно до державних стандартів токсичні хімічні елементи розділені за класами гігієнічної небезпеки. За класами вони такі: I клас: миш'як (As), берилій (Be), ртуть (Hg), селен (Sn), кадмій (Cd), свинець (Pb), цинк (Zn), фтор (F); II клас: хром (Cr), кобальт (Co), бор (B), молібден (Mn), нікель (Ni), мідь (Cu), сурма (Sb); III клас: барій (Ba), ванадій (V), вольфрам (W), марганець (Mn), стронцій (Sr) [3].

Для оцінки рівня забруднення використовують гранично-допустимі концентрації (ГДК). В Україні діють гігієнічні регламенти, затверджені наказом МОЗ № 1595 від 14.07.2020. Наприклад, для ґрунтів (валовий вміст, мг/кг з урахуванням фону) [4]:

- Свинець – 32–100 мг/кг (залежно від типу ґрунту та лімітуючого показника);

- Кадмій – 0,5–1,0 мг/кг;

- Мідь – 55–132 мг/кг;

- Цинк – 55–220 мг/кг;

- Нікель – 32–80 мг/кг.

У воді ГДК значно нижчі (наприклад, Pb – 0,01–0,1 мг/дм³, Cd – 0,001–0,005 мг/дм³). Перевищення цих норм призводить до деградації ґрунтів, зниження родючості, порушення функціонування екосистем та накопичення токсикантів у сільськогосподарській продукції.

Таким чином, контроль за надходженням і накопиченням важких металів у компонентах навколишнього середовища є важливим завданням для забезпечення екологічної безпеки та охорони здоров'я населення.

Кадмій (Cd) – токсичний важкий метал, один із найшкідливіших забруднювачів навколишнього середовища. Потрапляючи у ґрунт і воду в результаті антропогенної діяльності (міські та промислові викиди, забруднення із сільськогосподарських (добрива, пестициди) та з промислових джерел, видобуток корисних копалин, мілітарне забруднення й ін.) кадмій чинить негативний вплив на ріст і розвиток організмів, тим самим призводячи до екологічних проблем в усьому світі [29, 31].

Кадмій, цезій і рубідій, осідають у верхніх шарах ґрунту, що робить їх доступними до інтенсивного поглинання рослинами [39]. В організмах рослин і тварин період напіврозпаду кадмію становить близько 25–30 років [13, 34, 37]. Оскільки цей елемент є канцерогеном (група I класифікації Міжнародного агентства з дослідження раку), у людини він може спричиняти розвиток раку молочної залози, легень, простати, носоглотки, підшлункової залози та нирок, а

також бути фактором розвитку остеопорозу, захворювань печінки, нирок, легень, кровоносної системи, тощо [13, 34].

Активні бойові дії, пов'язані з широкомасштабним збройним вторгненням росії на територію України, призвели до значного забруднення ґрунтів: реєструються перевищені санітарні норми забруднення свинець, цинк і кадмій й іншими важкими металами [38]. У місцях під знищеною або пошкодженою військовою технікою та боєприпасами, виявлено у 8,5 разів вищу концентрація кадмію від встановленої ГДК [38]. Подібні дані описані для хорватського тропічного лісу Праснік, на замінованих територіях якого знайдено підвищений вміст Zn, Cd, Cr й інших елементів [23, 48]. Shebanina et al. (2023) показали, що внаслідок обстрілу росією хімічних підприємств Харківської області (Україна), кількість кадмію в прилеглих зонах зросла на 200 %.

1.2. Фізіологічні та біохімічні механізми токсичної дії важких металів на рослини

1.2.1. Вплив кадмію на ранні етапи росту і розвитку рослин

Кадмій не виконує біологічної функції, а саме не бере участі у процесах росту і розвитку рослин, однак він накопичується у них через метаболічні шляхи елементів, необхідних для рослин, наприклад, феруму (Fe), мангану (Mn) та цинку (Zn) [13, 40]. Токсичність кадмію для рослин проявляється на кількох рівнях організації: морфо-фізіологічному, біохімічному, молекулярному та цитогенетичному. Цей важкий метал негативно впливає на процеси проліферації та диференціації клітин [13], пригнічує проростання насіння, зменшує кількість листків, спричиняє утворення некротичних плям на листових пластинках, уповільнює ріст рослин [46] і в разі високих концентрацій може призводити до їх загибелі [13, 14, 31]. Встановлено, що іони Cd^{2+} порушують функціонування продихів, знижують відносний вміст води в тканинах, зменшують інтенсивність транспірації та фотосинтезу, викликають деградацію хлорофілу, порушують азотний обмін і змінюють активність ферментів антиоксидантної системи захисту.

Основним механізмом детоксикації є накопичення Cd^{2+} у певних частинах рослин. Іншими механізмами є синтез рослинних гормонів, активація антиоксидантної системи, синтез фітохелатинів і проліну [31].

У живих організмах однією з головних внутрішньоклітинних мішеней кадмію є мітохондрії. Під впливом цього металу порушується нормальне функціонування цих органел, розвивається оксидативний стрес, знижується синтез аденозинтрифосфату (АТФ), значно зростає утворення активних форм кисню (АФК). Крім того, пригнічується робота комплексів дихального ланцюга та змінюється проникність внутрішньої мембрани мітохондрій [13]. У нормі утворення АФК ефективно контролюється потужною антиоксидантною системою, яка включає ферментативні компоненти (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза й інші) та неферментативні антиоксиданти (глутатіон, аскорбінова кислота, токоферол й ін.) [9]. За дії Cd^{2+} надлишок АФК викликає хромосомні аберації та порушує процеси клітинного поділу; активує механізми програмованої клітинної загибелі, спричиняє мутації мітохондріальної ДНК й ін. [31].

1.2.2. Вплив купруму на ранні етапи росту і розвитку рослин

За однакових умов іон купруму адсорбується у більшій кількості, ніж іон кадмію. Купрум стимулює процеси фотосинтезу та утворення ферментів на основі заліза, у тому числі пероксидази, однак надлишок міді призводить до непропорційного розвитку, придушення росту пагонів і швидкого в'янення рослин.

Результати досліджень впливу солей міді на рослини конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) свідчать, що основним органом акумуляції цього елемента є коренева система. Рухомість міді в рослинних тканинах суттєво залежить від рівня її надходження та досягає максимуму за оптимального забезпечення. Водночас мідь характеризується відносно низькою мобільністю порівняно з іншими мікроелементами. Значна її частина залишається у коренях і листках впродовж усього життєвого циклу рослини і лише незначна кількість може

транспортуватися до молодих органів. Концентрація іонів міді в органах конюшини лучної зменшується в ряду: корені > листки > стебла [2].

1.3. Вплив важких металів на ранні етапи онтогенезу рослин

Ранні етапи онтогенезу рослин, зокрема проростання насіння та початковий ріст сіянців, є найбільш чутливими до дії абіотичних стресорів, у тому числі важких металів. Важкі метали потрапляють у ґрунт внаслідок техногенної діяльності і викликають значне пригнічення рослин на рівні клітинних, фізіологічних та біохімічних процесів [35].

Багато досліджень показують, що важкі метали негативно впливають на проростання насіння. Вони знижують енергію та відсоток проростання, подовжують період проростання, зменшують життєздатність насіння. Найчутливішим параметром часто є ріст коренів проростків, який інгібується сильніше, ніж ріст пагонів. Це пов'язано з прямим контактом кореневої системи з токсичними іонами та накопиченням металів у меристематичних тканинах.

Серед важких металів особливо токсичними для ранніх етапів розвитку вважаються кадмій (Cd), свинець (Pb) та ртуть (Hg). Кадмій навіть у низьких концентраціях порушує мобілізацію запасних речовин у насінні, інгібує активність ферментів (α -амілази, протеаз), викликає окисний стрес та пошкоджує мембрани. Свинець порушує водний обмін, зменшує синтез хлорофілу та пригнічує поділ клітин. Мідь і цинк у надлишку також токсичні, хоча в мікрокількостях є есенціальними елементами.

Дослідження на різних видах рослин (пшениця, ячмінь, соя, томати, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica* spp. й ін.) підтверджують, що чутливість до важких металів є видоспецифічною. Наприклад, проростки *Triticum aestivum* та *Brassica nigra* сильно реагують на підвищення концентрацій плюмбуму та кадмію зниженням довжини коренів і пагонів. У проростуві *Cucurbita pepo* кадмій і купрум зменшували показники проростання насіння [7].

Механізми токсичної дії важких металів на ранні етапи онтогенезу включають [33]:

- Індукцію окисного стресу (підвищення рівня H_2O_2 , малонового діальдегіду);

- Порушення балансу фітогормонів;
- Інгібування фотосинтезу та дихання;
- Зміни проникності мембран і транспорту поживних речовин.

Водночас деякі рослини виявляють толерантність до певних металів завдяки активації антиоксидантної системи, зв'язуванню металів у клітинній стінці або вакуолях та синтезу фітохелатинів.

Особливу увагу в сучасній науковій літературі приділяють механізмам толерантності рослин до важких металів саме на ранніх етапах онтогенезу. Деякі види та сорти здатні ефективно активувати багатокomпонентні захисні системи, зокрема ферментативну антиоксидантну оборону (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатіонредуктаза), синтезувати низькомолекулярні хелатори (фітохелатини, металотіонеїни) та акумулювати токсичні метали в менш метаболічно активних тканинах. Завдяки таким адаптивним реакціям окремі рослини, наприклад *Brassica juncea*, *Helianthus annuus* та *Thlaspi caerulescens*, не лише успішно виживають в умовах забруднення, але й активно використовуються для фітотремедіації ґрунтів.

Останні дослідження свідчать, що дія важких металів має виражений генотоксичний ефект. Зокрема, кадмій і свинець спричиняють пошкодження ДНК, хромосомні аберації та формування мікроядер у меристематичних клітинах коренів. Це призводить до зниження митотичного індексу та порушень розвитку сіянців. Молекулярно-генетичні дослідження на ельному об'єкті *Arabidopsis thaliana* продемонстрували активацію генів стресової відповіді (*HSP*, *GST*, *PCS*) вже на стадії проростання насіння.

Важливим аспектом є синергічна взаємодія важких металів з іншими абіотичними стрес-факторами. Комбінований вплив іонів кадмію і посухи або іонів плумбуму і засолення суттєво посилює пригнічення проростання та ранній ріст рослин, порівняно з дією окремих чинників. Ця проблема особливо

актуальна для агроєкосистем України, де техногенне забруднення часто поєднується з несприятливими кліматичними умовами.

Таким чином, аналіз сучасних літературних даних підкреслює, що ранні етапи онтогенезу є критичним періодом підвищеної вразливості рослин до важких металів. Водночас вони відкривають значні можливості для селекції стійких генотипів, біомоніторингу забруднення довкілля, а також розробки технологій фітостабілізації та фітовилучення токсикантів. Перспективними напрямками подальших досліджень є з'ясування молекулярно-генетичних механізмів толерантності з метою створення трансгенних ліній та відбору адаптованих традиційних сортів для використання на техногенно порушених територіях [15].

1.4. Біотехнологічні підходи до подолання токсичності важких металів на ріст і розвиток рослин.

У сучасному вивченні механізмів токсичності важких металів та розробці способів підвищення стійкості рослин біотехнологічні методи відіграють одну з ключових ролей. Вони дають змогу проводити експерименти в контрольованих умовах і мінімізувати вплив сторонніх факторів. Наприклад, культивування калусів рапсу, тютюну, пшениці на середовищах з підвищеним вмістом Cd, Pb і Zn дозволяє швидко оцінювати рівень окисного стресу, активність антиоксидантних ферментів і накопичення важких металів [15, 49].

Окрім цього для подолання токсичності важких металів активно застосовуються методи генетичної інженерії. Зокрема, створюють трансгенні рослини зі вставленими генами *PCS*, *MT* (металотіонеїнів), *GSH1* та антиоксидантних ферментів дозволяє суттєво підвищити толерантність і накопичувальну здатність рослин. Прикладами є дослідження на видах *Nicotiana tabacum*, *Brassica juncea*, *Oryza sativa* та *Populus* spp. [32]. Ще одним перспективним напрямком є використання CRISPR/Cas9 технології для точного редагування генів, відповідальних за чутливість до металів. Ефективною є інокуляція рослин рістостимулюючими бактеріями (PGPR) або арбускулярними

мікоризними грибами, які можуть знижувати доступність важких металів для рослин або покращувати їхній антиоксидантний статус [30].

Біотехнологічні підходи дозволяють не лише вивчати токсичність, але й створювати сорти рослин з підвищеною стійкістю, придатні для вирощування на забруднених землях, а також ефективні гіперакумулятори для цілей фітотремедіації.

Отже, використання методів клітинної, молекулярної біотехнології та генетичної інженерії відкриває нові можливості для мінімізації негативного впливу важких металів на агроєкосистеми та відновлення техногенно порушених територій.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Насіння *C. onopordifolia* зібране із місцезростань на г. Голиця, с. Гутисько, Бережанського району Тернопільської області (295 м н. р. м.).

2.2. Підготовка розчинів важких металів (соли CdCl_2 , CuSO_4) та підбір концентрацій.

Проаналізували вплив йонів кадмію (CdCl_2) у концентраціях 1 мМ, 5 мМ і 10 мМ на проростання насіння *C. onopordifolia*. Кожний дослідний варіант закладали у трьох повторностях. Як контроль використовували насіння, яке пророщували на середовищі без йонів кадмію, у трьох повторностях.

Проаналізували вплив йонів експруму (CuSO_4) у концентраціях 0,1 мМ, 1 мМ і 5 мМ на проростання насіння *C. onopordifolia*. Кожний дослідний варіант закладали у трьох повторностях. Як контроль використовували насіння, яке пророщували на середовищі без йонів купрумк, у трьох повторностях.

2.3. Пророщування насіння

Простерилізоване і попередньо замочене у 1 мг/мл індол-3-оцтовій кислоті (ІОК) насіння висаджували у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге, Скуга (МС) [27] з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2) без регуляторів росту. Насіння проростало за температури 20–22°C, фотоперіоду 16 год світлового дня / 8 год темряви, інтенсивності світла 3000 люкс і відносній вологості повітря 55–60 %.

2.4. Оцінка толерантності

Процес проростання насіння відстежували впродовж 14 днів. Кількість пророслого насіння фіксували щодня, починаючи з першого дня після висіву. Вибір показників ґрунтувався на їхній релевантності та частоті використання у подібних дослідженнях. Розраховували індекси проростання насіння: кінцевий

відсоток проростання (final germination percentage, FGP), середньодобове проростання (mean daily germination, MDG), середній час проростання (mean germination time, MGT), індекс проростання (germination index, GI) [8].

Кінцевий відсоток проростання (FGP) обчислювали за такою формулою:

$$FGP = \frac{n}{N} * 100,$$

де n – кількість пророслого насіння, N – загальна кількість насінин.

Середньодобове проростання (MDG) визначали за методом:

$$MDG = \frac{FGP}{D},$$

де FGP – кінцевий відсоток проростання, D – загальна кількість днів спостереження.

Середній час проростання (MGT) обчислювали за рівнянням:

$$MGT = \frac{\sum(n*d)}{\sum N},$$

де n – кількість насінин, що проросли на певний день d , N – загальна кількість пророслого насіння.

Індекс проростання (GI) визначали за формулою:

$$GI = \sum\left(\frac{n_i}{D_i}\right),$$

де n_i – кількість пророслого насіння у день i , D_i – номер відповідного дня.

Статистичну обробку виконували у програмі Microsoft Office Excel. Аналіз даних здійснювали з визначенням середнього значення та стандартної похибки ($M \pm SE$). Достовірність відмінностей між варіантами оцінювали за рівнями статистичної значущості $p < 0,05$.

Для подальших досліджень проростки *C. onopordifolia*, отримані на живильному середовищі без йонів кадмію, висаджували у ємності об'ємом 250 мл на рідке живильне середовище MC/2 без регуляторів росту. Контрольні рослини культивували на середовищі без кадмію хлориду ($CdCl_2$), тоді як дослідні рослини вирощували на середовищі з додаванням кадмію у концентраціях 0,1 мМ, 1 мМ, 5 мМ і 10 мМ. На початку досліді і на 11 добу вимірювали висоту та масу рослини, а також визначали кількість листків.

Результати дослідження опрацюванні статистично. Визначено стандартні відхилення. Для перевірки рівності середніх значень у двох вибірках (контрольній і дослідній) застосовували t-критерій Стюдента.

2.5. Методи зниження токсичної дії важких металів

Для визначення ефективності застосування органічних кислот у підвищенні стійкості рослин *in vitro* до впливу важких металів використовували стерильні 2-тижневі проростки *C. onopordifolia*, попередньо пророщені на живильному середовищі МС/2 з концентрацією 0,1 мМ Купруму. Проростки переносили у культиваційні колби об'ємом 200 мл на наступні варіанти живильних середовищ:

- Контроль – середовище МС/2 без регуляторів росту;
- Дослідний варіант – МС/2, доповнене лимонною кислотою у концентрації 750 мг/л.

Ефективність застосування лимонної кислоти оцінювали за показниками росту та розвитку рослин після попереднього впливу купрумового стресу. Оцінка толерантності рослин до впливу важких металів проводилась на основі порівняння зміни морфометричних параметрів та стану фотосинтетичного апарату (ФСА) *C. onopordifolia in vitro* на протестованих варіантах живильних середовищ. Вимірювання показників проводили кожні 14 діб культивування.

Для визначення вмісту пігментів відбирали зразки 4-тижневих проростків рослин *C. onopordifolia*. Для оцінки впливу важких металів та ефективності лимонної кислоти на стан ФСА рослин *in vitro* за контроль було взято рослини відкасників, насіння яких було пророщено на середовищі без надлишкової концентрації металів. Вміст пігментів визначали за загальноприйнятими методиками. Пігменти було екстраговано із рослинного матеріалу диметилсульфоксидом (ДМСО) згідно з методикою [16].

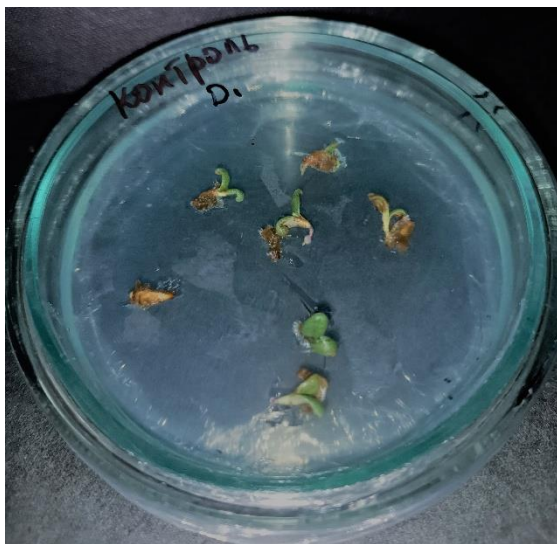
РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив кадмію на показники проростання насіння *C. onopordifolia*

Критичним етапом життєвого циклу рослини і важливим критерієм для оцінки стійкості зародкової плазми до різних стресів, у тому числі індукованих важкими металами є проростання насіння [10]. Кадмій надходить з ґрунтового розчину до коренів через клітинні стінки за допомогою пасивного і активного транспорту. Його накопичення у тканинах рослин уповільнює ріст і розвиток рослин на різних етапах, починаючи з проростання насіння [31].

Нами досліджено вплив йонів кадмію (CdCl_2) у концентраціях 1 мМ, 5 мМ і 10 мМ на проростання насіння *C. onopordifolia*. Виявлено, що у контрольних варіантах (на живильному середовищі MC/2 без іонів Cd^{2+}) насіння *C. onopordifolia* почало проростати на 6 день після висадки, а у дослідних – на 9 день (рис. 3.1).



А



Б



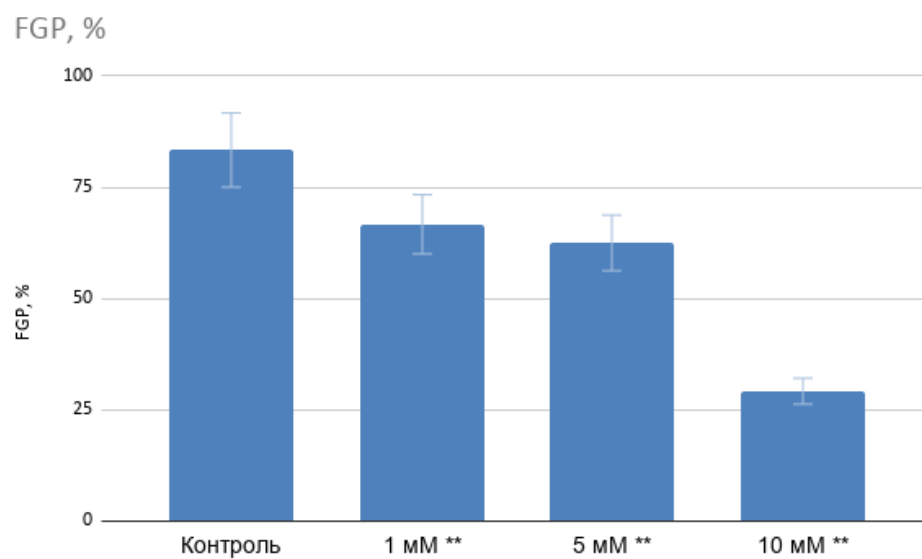
В



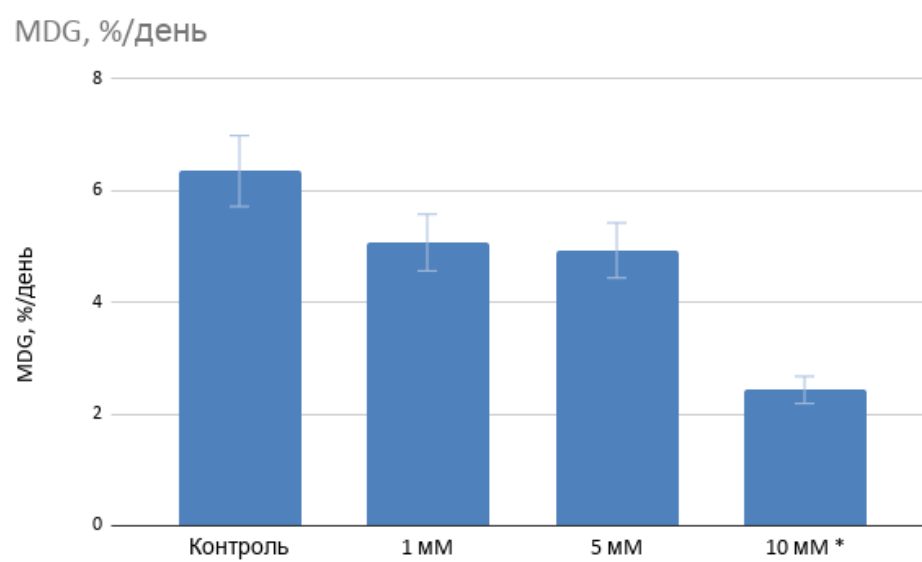
Г

Рис. 3.1. Проростання насіння *C. onopordifolia* за різних концентрацій йонів кадмію (CdCl_2): А – контроль, Б – 1 мМ, В – 5 мМ, Г – 10 мМ.

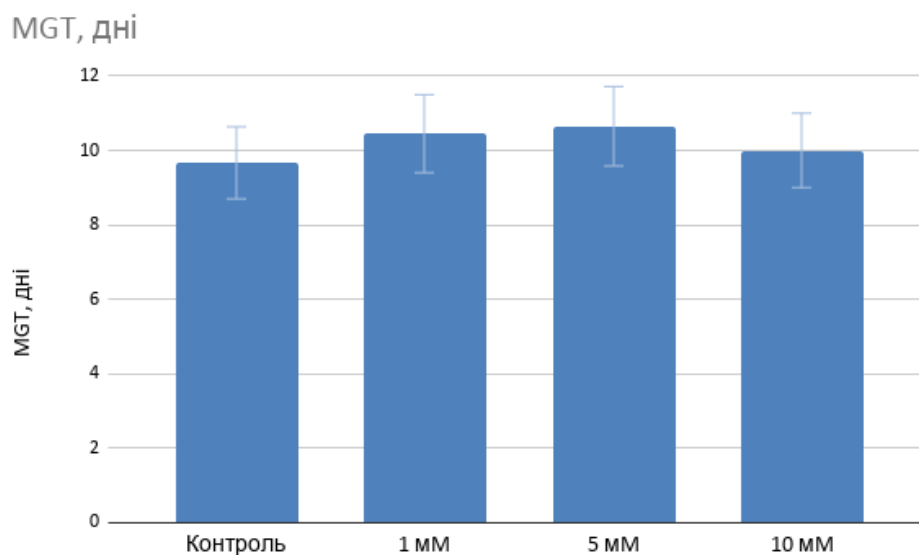
Нами розраховано показники проростання насіння: кінцевий відсоток проростання (FGP), середньодобове проростання (MDG), середній час проростання (MGT) та індекс проростання (GI) [8]. Насіння у контрольних умовах демонструвало максимальні показники FGP (83,3%) на 14 добу (рис. 3.2), що перевищувало такий ж показник за концентрації іонів Cd^{2+} 1 мМ і 5 мМ приблизно в 1,3, а 10 мМ – 3 рази. Схожа ситуація виявлена і на 8 добу. Однак за концентрації 5 мМ Cd^{2+} FGP був на рівні з контролем, але згодом почав знижуватися. Аналогічна ситуація спостерігалася і з показником MDG (рис. 3.2), який знижувався із зростанням концентрації Cd^{2+} . Очевидно, це вказує на загальне сповільнення темпів проростання. Пропорційно до збільшення концентрації Cd^{2+} зменшувався індекс проростання (GI), що, очевидно, підтверджує сильний стрес-індукований вплив на швидкість і якість проростання. Середній час проростання за концентрації 1 мМ і 5 мМ становив $10,45 \pm 0,440$ днів і $10,65 \pm 0,965$ днів відповідно, а у контролі $9,67 \pm 0,383$ днів (рис. 3.2).



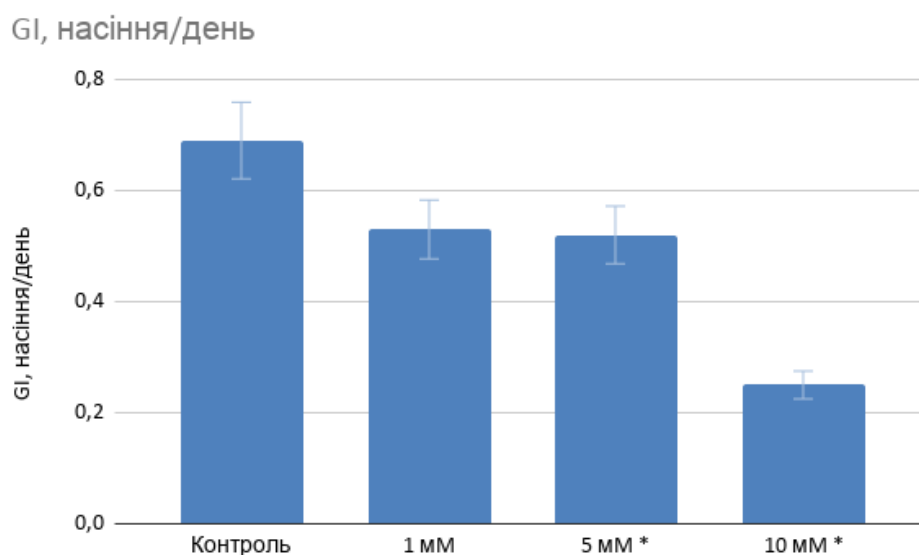
А



Б



В



Г

Рис. 3.2. Вплив різних концентрацій іонів Cd^{2+} (1 мМ, 5 мМ, 10 мМ) на кінцевий відсоток проростання (FGP) (А), середньодобову схожість (MDG) (Б), середній час проростання (MGT) (В), індекс проростання (GI) (Г) насіння *S. onopordifolia*. Результати представлені як середнє значення $\pm$ SE ($n = 3$). Значущі відмінності між варіантами обробки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$.

Насіння *C. onopordifolia* могло проростати за найвищої концентрації металу, незважаючи на негативний вплив Cd-stress. Проте, згодом спостерігалось утворення некротичних плям коричневого забарвлення на листках проростків, отриманих з усіх насінин культивованих на середовищі з кадмієм концентрацією 10 мМ, а також деяких, оброблених 5 мМ на 8 добу дослідів (рис. 3.1). З 12 дня усі листки проростків на 5 мМ були вкриті плямами (рис. 3.1), а за 10 мМ спостерігалися менші розміри листків, у порівнянні із іншими варіантами. Проростки варіантів на 5 мМ і 10 мМ повністю пожовтіли на 20 добу. Проростки за концентрації 1 мМ не в'янули і через місяць експерименту, однак нові листки не формувалися. На жодному із дослідних варіантів не спостерігали утворення коренів, тоді як на контрольному вони з'явилися на 12 добу.

Показано подібний ефект при обробці важкими металами (Zn, Cu, Pb) різної концентрації (від 25 до 100 ppm) на проростання насіння *Medicago arborea* L. [10], а також для інших бобових під впливом Cd, Cu, Ni та Pb [6]. У той же час, за обробки 10 мг/л Cd^{2+} насіння *Caragana korshinskii* Kom., його проростання підвищувалося, тоді як за концентрації 100 мг/л – знижувалося. У *Brassica napus* L. низькі концентрації цього металу не мали істотного впливу, а у *Nicotiana tabacum* L. концентрація понад 16 мг/л Cd^{2+} значно інгібувала проростання насіння [46]. Подібні дані про вплив кадмію на уповільнення проростання насіння отримані для зернових культур: у пшениці знижувалася на 31% за концентрацій від 0,03 до 4,8 мМ; ячменю – на 23,0% за 0,1 мМ [31]. У роботі Zayneb et al. (2015) показано, що аналогічні показники для *Trigonella foenum-graecum* L. у контролі і за впливу 0,1 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ Cd^{2+} були схожими, а значне зниження швидкості проростання (на 33 %) спостерігалось при обробці 10 мМ кадмію.

При аналізі морфометричних параметрів рослин *C. onopordifolia* нами виявлено зниження абсолютного і відносного приросту довжини рослини у 2,6 рази за впливу 10 мМ іонів Cd^{2+} , що є типовим ефектом токсичної дії цього важкого металу (табл. 3.1). За концентрацій 0,1 та 1 мМ Cd^{2+} відносний приріст

довжини рослин суттєво не відрізнявся від контролю, що вказує на здатність *C. onopordifolia* підтримувати ріст в умовах слабого кадмієвого стресу. Водночас підвищення концентрації кадмію до 5 та 10 мМ спричиняло значне пригнічення ростових процесів у рослин досліджуваного виду. Zagrichuk et al. (???) при вивченні впливу кадмію (0,1–20 мМ) на рослини *in vitro* *Deschampsia antarctica* з'ясували, що граничною концентрацією була 1 мМ іонів Cd^{2+} , за якої ще відбувається ріст і розвиток рослин, тоді як за вищих концентрацій рослини гинули через 3 (5–20 мМ Cd^{2+}) або 4 тижні (1,5–5 мМ Cd^{2+}).

Таблиця 3.1. Морфометричні параметри рослин *C. onopordifolia*, що зазнали впливу різних концентрацій хлориду кадмію

Показники	Контроль	0,1 мМ	1 мМ	5 мМ	10 мМ
Сира маса рослини ^к (г)	1,24±0,188	1,35±0,139	0,66**±0,061	0,44**±0,041	0,67*±0,047
Довжина рослини ^п (см)	5,07±0,188	5,79±0,523	4,68±0,484	4,67±0,494	6,60*±0,400
Довжина рослини ^к (см)	6,36±0,762	7,21±0,596	4,68*±0,484	4,83±0,478	6,80±0,200
Абсолютний приріст довжини рослини (см)	1,29	1,43	0,90	0,17	0,20
Відносний приріст довжини рослини (%)	+25,35	+24,69	+23,67	+3,57	+3,03
Кількість листків ^п	7,43±0,612	8,00±0,617	6,45±0,481	6,67±0,422	7,80±0,860
Кількість листків ^к	8,43±0,812	9,29±0,644	6,55±0,340	5,50*±0,500	3,60**±0,245
Абсолютний приріст кількості листків (см)	1,00	1,29	0,09	-1,17	-4,20
Відносний приріст кількості листків (%)	+11,86	+13,85	+1,39	-21,21	-116,67

Примітки: п – вимірювання рослин використовували на початку дослідження, к – вимірювання рослин використовували на 11 день від початку дослідження. $M \pm SE$ ($n = 7$), * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$.

Подібні результати отримано за впливу Cd^{2+} на рослини *Pisum sativum* L., *Sassafras tzumu*, *Ricinus communis* (Hemsl.) Hemsl. лінії SKP 84 й ін. [18, 21, 40, 43]. Показано, що концентрації Cd^{2+} від 0,1 мМ до 10 мМ впливали на ранній ріст проростків пажитника і пригнічували ріст коренів і гіпокотилу [22, 44].

Аналіз морфометричних показників *C. onopordifolia* показав, що за дії 5 та 10 мМ Cd^{2+} кількість листків зменшувалася на 50–100 % порівняно з контролем. Такі зміни супроводжувалися характерними проявами кадмієвого стресу, зокрема хлорозом, порушенням розвитку листкових пластинок та їх передчасним відмиранням. Найбільш виражений інгібувальний ефект спостерігався за концентрації 10 мМ Cd^{2+} , де процес утворення нових листків був майже повністю пригнічений. Уже за 5 мМ Cd^{2+} на листках з'являлися некротичні ураження, кількість і площа яких збільшувалися зі зростанням концентрації металу до 10 мМ.

Водночас за впливу 0,1 мМ Cd^{2+} видимих негативних змін морфологічного стану рослин не виявлено. Навпаки, відносний приріст кількості листків становив 13,85 %, що перевищувало відповідний показник контрольного варіанта. Така реакція може свідчити про активацію адаптивних механізмів у відповідь на низький рівень стресового навантаження.

Слід також зазначити, що, незважаючи на однаковий вік рослин, приріст сирової маси у контрольному варіанті був у 1,9–2,8 раза вищим порівняно з рослинами, які культивувалися за наявності кадмію в поживному середовищі.

Отримані результати свідчать про виражений дозозалежний вплив іонів Cd^{2+} на процеси проростання насіння та росту рослин *C. onopordifolia*. Підвищення концентрації кадмію до 5 та 10 мМ призводило до затримки й зниження схожості насіння, пригнічення морфогенетичних процесів, відсутності коренеутворення, появи хлорозу та некрозу листків, а також істотного зменшення ростових показників. Натомість за дії низьких концентрацій Cd^{2+} (0,1 та 1 мМ) рослини *C. onopordifolia* не демонстрували суттєвих порушень росту і розвитку, що може свідчити про наявність певного рівня толерантності до помірного кадмієвого стресу. Таким чином, *C. onopordifolia* характеризується

відносною стійкістю до низьких концентрацій кадмію, тоді як вищі концентрації цього важкого металу чинять виражений токсичний вплив на ранні етапи онтогенезу та подальший ріст рослин.

3.2. Вплив купруму на показники проростання насіння *C. onopordifolia*

Аналізуючи кількісні показники проростання під впливом купруму нами встановлено, що у контролі кінцевий відсоток проростання склав 83,33 %, що свідчить про високу життєздатність насіння в оптимальних умовах (рис. 3.3, 3.4). Застосування купруму призвело до суттєвого пригнічення: 0,1 мМ – 66,67 % (помірне зниження, статистично не значуще), 1 мМ – 45,83 % (статистично значуще зниження); 5 мМ – 12,5 % (критичне пригнічення, статистично значуще). Зниження FGP при вищих концентраціях вказує на пряму токсичну дію купруму, який порушує процеси водопоглинання, активацію ферментів та мобілізацію запасних речовин у насінні.

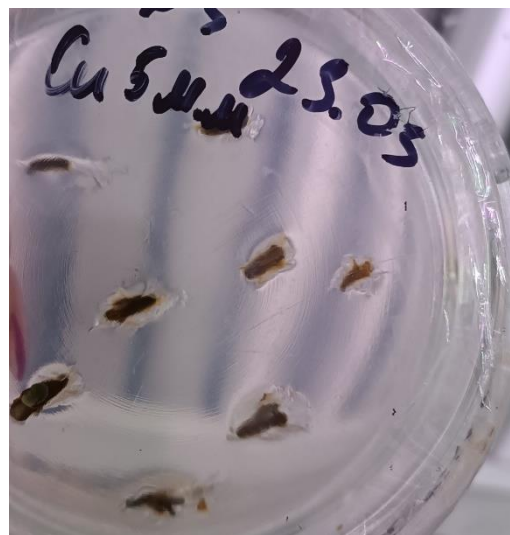


А

Б

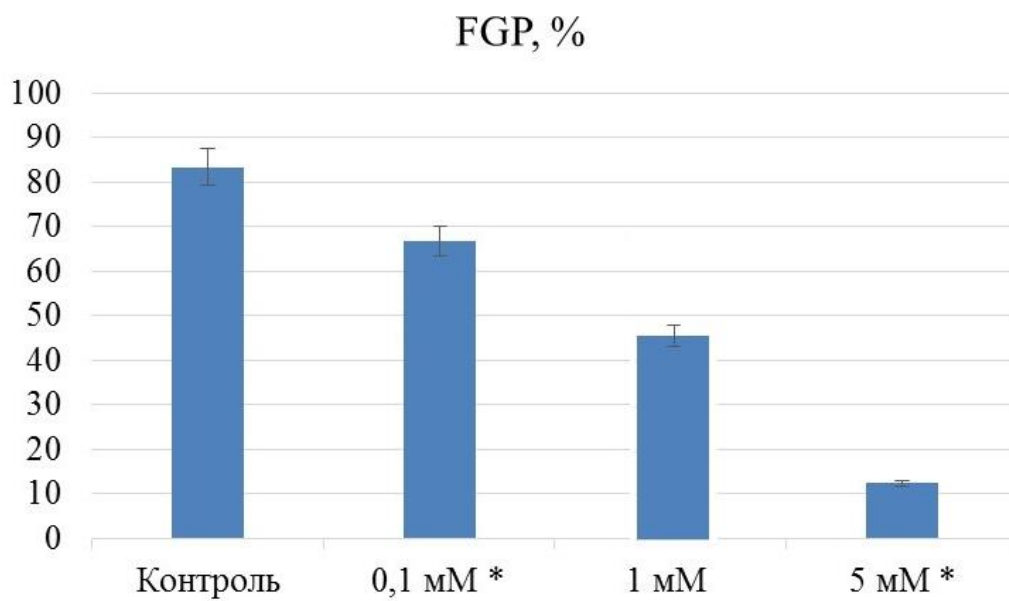


В

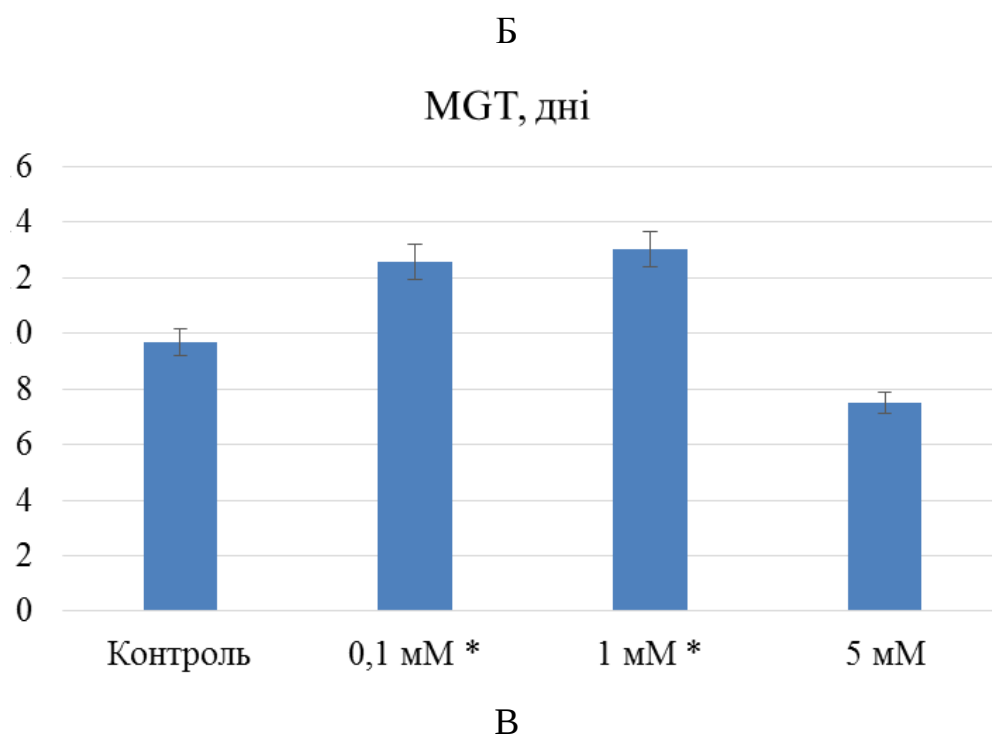
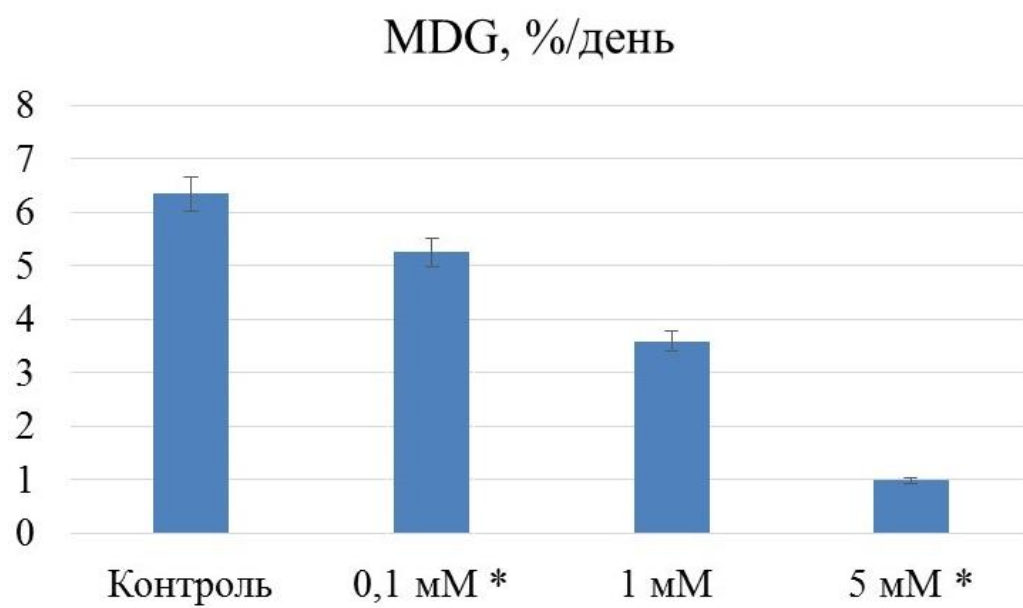


Г

Рис. 3.3. Проростання насіння *C. oporordifolia* за різних концентрацій іонів Cu^{2+} : А – контроль, Б – 0,1 мМ, В – 1 мМ, Г – 5 мМ.



А



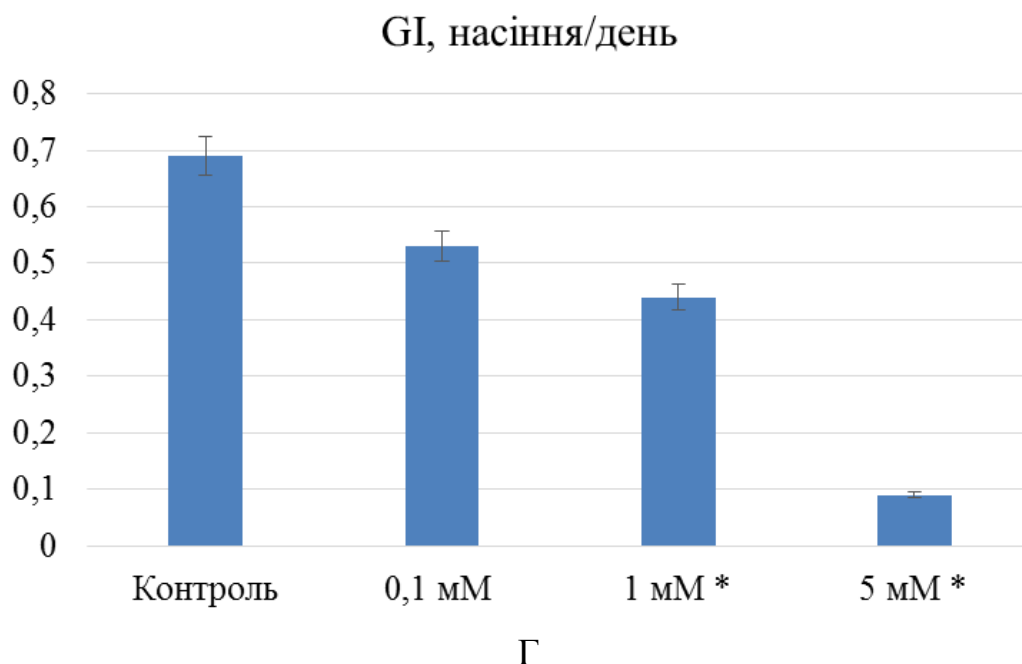


Рис. 3.4. Вплив різних концентрацій іонів Cu^{2+} (0,1 мМ, 1 мМ, 5 мМ) на кінцевий відсоток проростання (FGP) (А), середньодобову схожість (MDG) (Б), середній час проростання (MGT) (В), індекс проростання (GI) (Г) насіння *C. onopordifolia*. Результати представлені як середнє значення $\pm$ SE ($n = 3$). Значущі відмінності між варіантами обробки: * – $p < 0,05$.

Під впливом купруму спостерігається чітка дозозалежна тенденція до зниження середньодобового проростання: 0,1 мМ – 5,25 %/день; 1 мМ – 3,59 %/день (значуще); 5 мМ – 0,99 %/день (значуще). Це свідчить про уповільнення темпів проростання, що може бути пов'язано з окисним стресом, спричиненим іонами Cu^{2+} , які каталізують утворення активних форм кисню (АФК) і пошкоджують клітинні мембрани.

Цікаво, що при концентраціях 0,1 мМ (12,57 днів) та 1 мМ (13,03 днів) спостерігалось статистично значуще збільшення MGT, що, очевидно, означає, що насіння, якому все ж вдалося прорости, робило це повільніше, що є класичним проявом стресу. При 5 мМ MGT склав лише 7,5 днів – ймовірно, через те, що проросли лише найстійкіші (або випадкові) екземпляри, і їх кількість була мізерною.

Усі концентрації купруму призвели до зниження індексу проростання: 0,1 мМ – 0,53; 1 мМ – 0,44 (значуще); 5 мМ – 0,09 (значуще). GI є інтегральним показником, що враховує як швидкість, так і повноту проростання. Його різке падіння при 5 мМ підтверджує високу фітотоксичність цієї концентрації.

Під впливом купруму у всіх концентраціях спостерігалася характерна патологія:

- Відсутність формування кореня – ключова відмінність від контролю. Це може бути наслідком інгібування поділу клітин у кореновому апексі або порушення синтезу ауксинів.

- Листки часто проростали з коричневими плямами, жовтуватим забарвленням (хлороз) або повністю коричневими (некроз) при 5 мМ.

- При 1 мМ листки мали жовтий колір з темними плямами, що вказує на порушення фотосинтетичного апарату та накопичення металу в тканинах.

Отримані дані свідчать про виражену фітотоксичну дію купруму. Купрум, будучи есенціальним мікроелементом, при надлишку швидко переходить у токсичну форму, викликаючи окисний стрес і порушення гормонального балансу. Зниження всіх параметрів проростання (FGP, MDG, GI) та збільшення MGT при низьких і середніх концентраціях купруму – класичні симптоми металотоксикозу. Відсутність кореня у купрумових варіантів особливо тривожна, оскільки навіть при задовільному проростанні надземної частини рослина не зможе нормально вкоренитися та вижити в природних умовах.

Морфологічні зміни (хлороз, некроз, плямистості) вказують на пошкодження хлорофілу та мембран. *C. onopordifolia* демонструє відносно високу чутливість до іонів купруму, що робить її потенційним біоіндикатором забруднення ґрунтів важкими металами.

Результати проведеного дослідження чітко демонструють виражену фітотоксичну дію купруму на насіння *C. onopordifolia*. Ці дані добре узгоджуються з численними дослідженнями впливу важких металів на проростання насіння різних видів рослин. Згідно з оглядом Sethy та Sahu (2013), купрум належить до металів, які суттєво пригнічують процеси проростання через

індукцію окисного стресу, генерацію АФК, пошкодження клітинних мембран та інгібування ферментів, відповідальних за мобілізацію запасних поживних речовин (зокрема α -амілази та інвертази). Автори зазначають, що токсичність цього металу часто проявляється в порядку $\text{Hg} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cu}$, але все одно призводить до значного зниження життєздатності насіння.

Подібні ефекти спостерігали Muccifora та Bellani (2013) на насінні *Vicia sativa*. Дослідники встановили, що при концентраціях Cu від 10^{-3} М (близько 1 мМ) уже відбувається значне пригнічення росту кореня, хоча відсоток проростання може залишатися відносно високим до 5×10^{-3} М. Це майже ідеально корелює з нашими результатами: при 1 мМ купруму проростання ще відбувалося (FGP 66,67%), але корінь не формувався, а при 5 мМ проростання було мінімальним. Автори підкреслюють, що купрум дозволяє початкове проростання, але блокує подальший розвиток проростка за рахунок порушення мітотичного поділу в кореневому апексі.

Аналогічні морфологічні порушення (відсутність нормального кореня, хлороз, некроз) описані в дослідженні Gautam та ін. (2016) на сафлорі (*Carthamus tinctorius*). Високі концентрації CuSO_4 призводили до зниження біомаси, пригнічення росту коренів та стебел, а також активації антиоксидантних систем як відповіді на окисний стрес. Це підтверджує, що представники родини Айстрових демонструють характерну чутливість до надлишку міді.

Важливим аспектом наших результатів є збільшення MGT (затримка проростання) при 0,1–1 мМ Cu . Це явище також відмічене в багатьох роботах, зокрема Li та ін. (2005), які показали, що на ранніх етапах проростання насіння більш стійке, ніж ростові процеси проростків. Проростки виявляються значно чутливішими до важких металів, ніж саме насіння. У нашому випадку насіння *S. onopordifolia* при низьких концентраціях купруму ще проростало, але повільніше і з серйозними дефектами розвитку.

Купрум у нашому досліді проявив специфічну токсичність саме щодо кореневої системи. Це узгоджується з даними An та Lee (2006) та інших авторів,

які вказують, що купрум частіше порушує саме кореневий ріст через високу рухливість іонів Cu^{2+} та їхню здатність заміщувати інші метали в ферментах.

Дані нашого експерименту підтверджують загальну закономірність фітотоксичної дії купруму, описану в літературі: дозозалежне пригнічення проростання, затримка розвитку, пошкодження кореневої системи та симптоми окисного стресу. Специфіка реакції *C. onopordifolia* (повна блокада коренеутворення) вказує на її підвищену вразливість, порівняно з сільськогосподарськими культурами, що актуально для охорони рідкісних видів у забруднених регіонах.

3.3. Біотехнологічні аспекти підвищення толерантності через використання лимонної кислоти.

Після пророщування насіння *C. onopordifolia* на середовищі МС/2 з концентрацією 0,1 мМ Купруму асептичні проростки відкашників переносили у культиваційні колби з середовищем МС/2 та МС/2 з лимонною кислотою (750 мг/л). Відомо, що екзогенне внесення лимонної кислоти може ефективно модулювати різні реакції росту рослин за різних стресових умов навколишнього середовища [17, 41]. Як результат, покращується ріст та розвиток рослин, підвищується ефективність фотосинтетичних процесів, зменшується осмотичний дисбаланс та послаблюється оксидативний стрес шляхом активації як ферментативної, так і неферментативної антиоксидантної системи захисту. Підвищення стійкості рослин до стресу, індукованого важкими металами, пов'язують зі здатністю лимонної кислоти утворювати хелатні комплекси з іонами металів та сприяти їх секвестрації, що знижує токсичний вплив цих елементів на клітинні структури та метаболічні процеси [41].

Результати досліджень продемонстрували інтенсивніше відновлення ростових процесів у рослин, які вирощувались на субстраті із додаванням лимонної кислоти, особливо у перші 14 діб культивування *in vitro*. Зокрема, приріст довжини кореня на середовищі МС/2, доповненому лимонною кислотою

становив $2,6 \pm 0,43$ см, що на 48,84% більше, ніж на середовищі без лимонної кислоти (рис. 3.5).

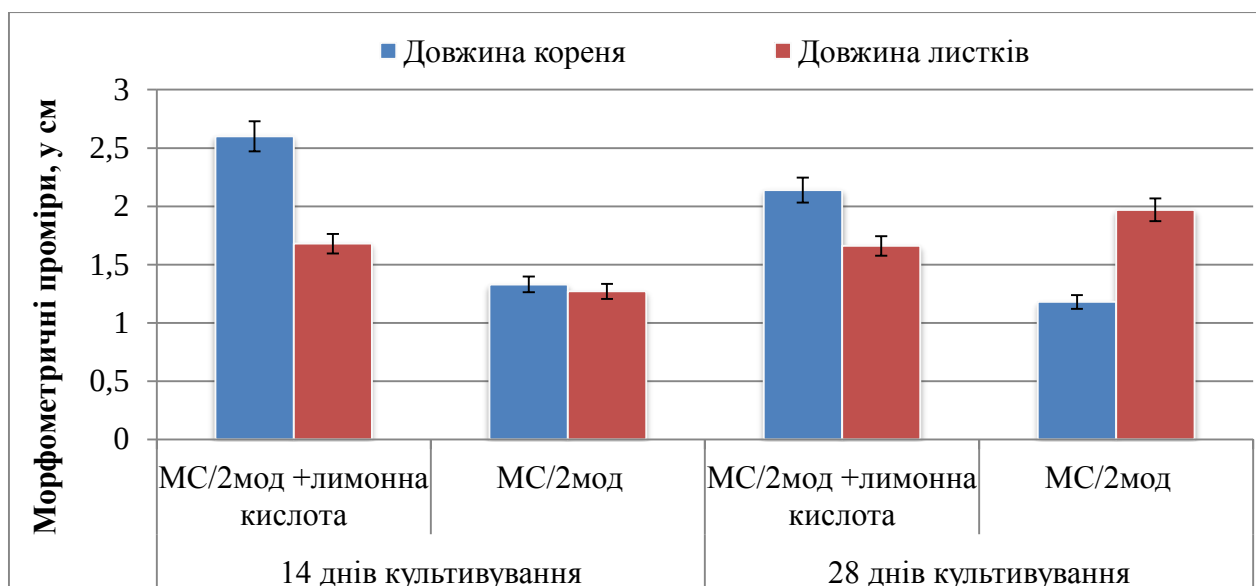


Рис. 3.5. Зміна ростових параметрів рослин виду *C. onopordifolia* in vitro на середовищі MC/2 та MC/2 з додаванням лимонної кислоти.

Схожу тенденцію спостерігали і при вимірюванні приросту довжини листків. Зокрема, на середовищі MC/2 із додаванням лимонної кислоти довжина листків збільшилась на $1,68 \pm 0,31$ см, що на 24,04% більше ніж на живильному середовищі без лимонної кислоти. Окрім цього, встановлено позитивний вплив лимонної кислоти на формування нових листових пластинок відкашників в умовах *in vitro*. Зокрема, у рослин, культивованих на живильному середовищі, доповненому лимонною кислотою, інтенсивність утворення нових листків у 1,7 раза була вищою, порівняно з контролем (рис. 3.6).

Подальше культивування відкашників також продемонструвало вищі показники ризогенезу та формування нових листків на середовищі з лимонною кислотою, порівняно з контрольною групою на 44,86% та у 1,7 раза відповідно. Водночас на другому етапі дослідження інтенсивніший приріст листків спостерігався на середовищі без лимонної кислоти, де цей показник перевищував відповідне значення дослідного варіанта на 15,75% (рис. 3.6). Це, ймовірно, свідчить про необхідність оптимізації концентрації лимонної кислоти в

живильному середовищі для забезпечення одночасної стимуляції коренеутворення та росту надземної частини рослин.

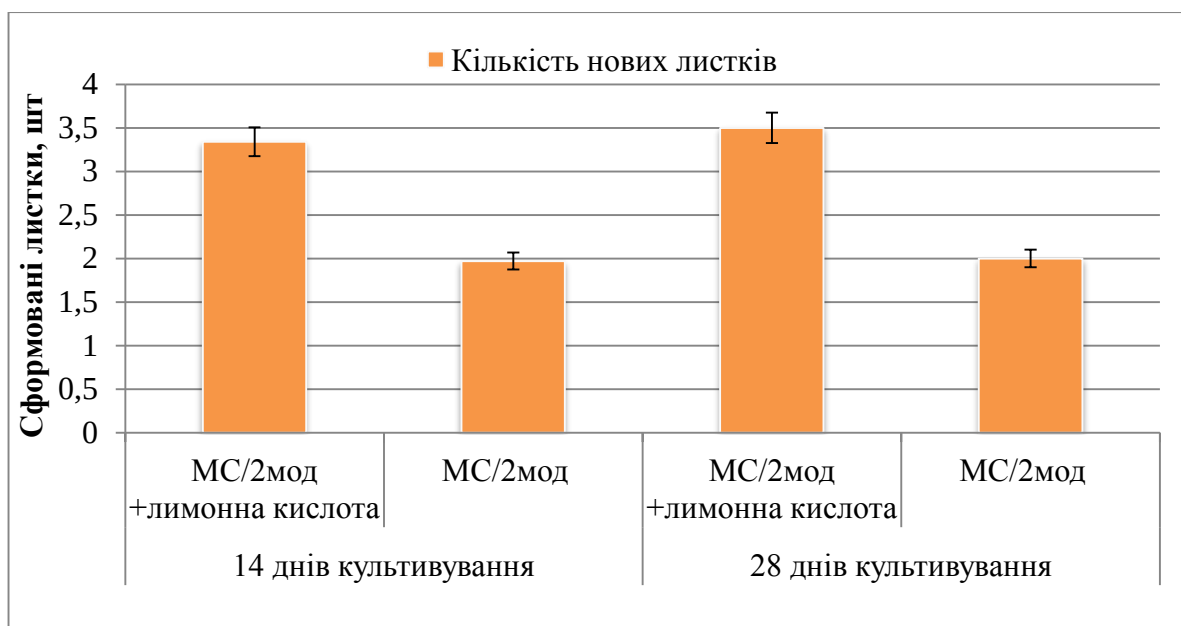


Рис. 3.6. Утворення нових листків у рослин виду *C. onopordifolia in vitro* на середовищі МС/2 та МС/2 з додаванням лимонної кислоти.

Отримані результати досліджень вказують на здатність лимонної кислоти послаблювати негативні наслідки купрумового стресу за культивування в умовах *in vitro*. Ймовірно, позитивний ефект на процеси ризогенезу пов'язаний із здатністю лимонної кислоти брати участь у регуляції метаболічних процесів та детоксикації іонів Купруму, які могли акумулюватись в тканинах відкасників під час пророщування насіння на середовищі з металом. Відомо, що лимонна кислота має здатність до утворення комплексів з іонами важких металів, що знижує їхню реакційну здатність та послаблює фітотоксичність. Крім того, лимонна кислота може підвищувати активність антиоксидантних ферментів, що знижує інтенсивність оксидативного стресу [5, 45].

Покращення росту листових пластинок та утворення нових листків, можливо, пов'язано із участю лимонної кислоти в енергетичному обміні та відновленні фізіолого-біохімічних процесів, порушених унаслідок купрумового стресу [50]. Накопичення органічних кислот у тканинах рослин може сприяти зменшенню токсичності важких металів, покращенню функціонування

клітинних структур та активізації ростових процесів, що загалом підвищує адаптаційний потенціал рослин після дії надлишку металів [17, 51].

Літературні джерела свідчать, що надлишок купруму порушує структурну організацію хлоропластів і тилакоїдних мембран, індукує розвиток оксидативного стресу в рослинних клітинах, знижує вміст фотосинтетичних пігментів і переносників електронів, що в результаті призводить до пригнічення транспорту електронів та зменшення ефективності фотосинтезу. При цьому спостерігається значне зниження вмісту фотосинтетичних пігментів, таких як хлорофіл а, хлорофіл b та каротиноїди [25, 28, 42]. Наші дослідження не виявили значних відмінностей у стані ФСА рослин, пророщених за високої концентрації Cu^{2+} (0,1 мМ) порівняно з рослинами, які не піддавались купрумовому стресу. Разом з цим загальний вміст фотосинтетичних пігментів був найвищим в умовах середовища МС/2мод без лимонної кислоти (139,76 мг/г) (рис. 3.7).

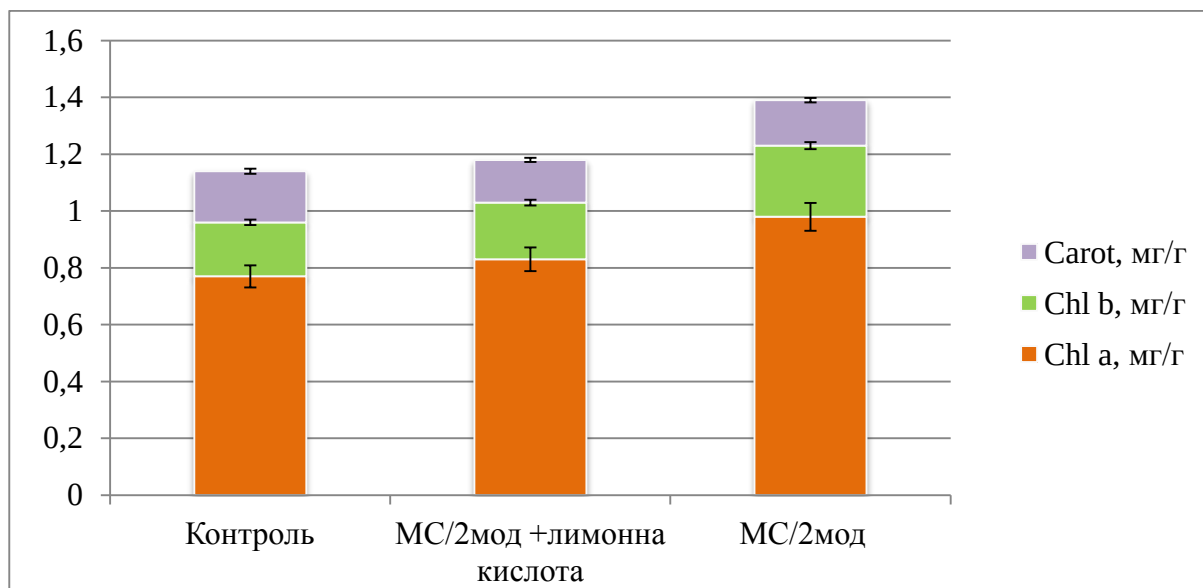


Рис. 3.7. Вміст фотосинтетичних пігментів рослин виду *C. onopordifolia* *in vitro* на середовищі на різних типах живильних середовищ.

Водночас зміна показників співвідношення фотосинтетичних пігментів рослин за дії лимонної кислоти дозволила встановити певні тенденції. Зокрема, було виявлено зростання співвідношення Chl a/b і зниження співвідношення (Chl a+b)/Carot на середовищі МС/2 з лимонною кислотою, що може свідчити про структурно-функціональні перебудови ФСА та активацію захисних

антиоксидантних механізмів у відповідь на купрумовий стрес (табл. 3.2). Такі зміни характерні для адаптаційної реакції рослин на токсичну дію надлишкових концентрацій Cu^{2+} [25,28].

Таблиця 3.2. Співвідношення фотосинтетичних пігментів рослин виду *C. onopordifolia in vitro* на середовищі на різних типах живильних середовищ

	Chl a / Chl b	Chl a + b / Carot	Chl a / Carot	Chl b / Carot
Контроль	4,25 ±0,32	5,25±0,82	4,36±0,39	1,05±0,28
МС/2 + лимонна кислота	4,18±0,28	6,86±0,47	5,52±0,46	1,33±0,93
МС/2	3,87±0,64	7,65±0,50	6,07±0,84	1,57±0,75

Отже, незначні відмінності показників фотосинтетичних пігментів між дослідними варіантами та контролем свідчать про відсутність істотного негативного впливу досліджуваної концентрації Cu^{2+} (0,1 мМ) на функціональний стан фотосинтетичного апарату рослин. Збереження відносно стабільного вмісту хлорофілів і каротиноїдів може вказувати на достатню толерантність рослин до даного рівня металевого навантаження та ефективне функціонування адаптаційно-захисних механізмів. Отримані результати дають підстави припустити, що суттєве пригнічення функціонування фотосинтетичного апарату може проявлятися за дії вищих концентрацій купруму.

ВИСНОВКИ

Вивчено біотехнологічні аспекти впливу важких металів на ранні етапи росту та розвитку *Carlina onopordifolia* Besser ex Szafer, Kulcz. et Pawł. в умовах *in vitro*, а також підібрано технології пом'якшення негативного впливу на проростання та розвиток проростків з використанням лимонної кислоти.

1. Виявлено виражений дозозалежний інгібуючий вплив іонів кадмію (Cd^{2+}) на процес проростання насіння *C. onopordifolia*. З підвищенням концентрації Cd^{2+} від 1 мМ до 10 мМ спостерігалось суттєве зниження кінцевого відсотка проростання (FGP), середньодобового проростання (MDG) та індексу проростання (GI), а також збільшення середнього часу проростання (MGT).

2. Найменш токсичною для насіння *C. onopordifolia* була концентрація 0,1–1 мМ Cd^{2+} , за якої рослини зберігали відносно високу життєздатність і демонстрували певний рівень толерантності, що проявлялося у незначній відмінності морфометричних показників від контролю.

3. Концентрації 5 мМ та 10 мМ Cd^{2+} спричиняли сильне пригнічення ростових процесів, відсутність коренеутворення, розвиток хлорозу та некротичних уражень листків, що свідчить про критичну межу толерантності виду до кадмієвого стресу.

4. Іони купруму (Cu^{2+}) проявляли вищу фітотоксичність, порівняно з кадмієм. Уже за концентрації 0,1 мМ Cu^{2+} спостерігалось статистично значуще зниження кінцевого відсотка проростання та індексу проростання.

5. Характерною особливістю дії купруму на *C. onopordifolia* є повна відсутність формування кореневої системи в усіх досліджених концентраціях (0,1–5 мМ), що супроводжувалося хлорозом, некрозом листків та затримкою проростання.

6. *C. onopordifolia* демонструє відносну стійкість до низьких концентрацій кадмію, але виявляє підвищену чутливість до іонів купруму, особливо на рівні розвитку кореневої системи.

7. Дослідження продемонструвало, що додавання лимонної кислоти (750 мг/л) у середовище МС/2 ефективно послаблює негативний вплив купрумового стресу на рослини *C. onopordifolia* в умовах *in vitro*. Покращуються ростові параметри: довжина кореня зросла на 48,84 %, довжина листків – на 24,04 %, а інтенсивність утворення нових листкових пластинок збільшилася в 1,7 раза, порівняно з контролем.

8. Показано незначні відмінності показників фотосинтетичних пігментів між дослідними варіантами та контролем, що свідчить про відсутність істотного негативного впливу досліджуваної концентрації Cu^{2+} (0,1 мМ) на функціональний стан фотосинтетичного апарату рослин *C. onopordifolia*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Агроекологічна оцінка ґрунтів. Режим доступу: <http://www.ecoleague.net/diialnist/vydannia-vel/ekolohichnikarty/ahroekolohichna-otsinka-hruntiv> (дата звернення: 1.06.2026).
2. Денчиля-Сакаль Г. М., Ніколайчук В. І., Колесник А. В., Вакерич М. М., Ткач О. П. Особливості акумуляції важких металів в рослинах *Trifolium pratense* L. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія*. 2012. Вип. 33. С. 189–191.
3. Забруднення ґрунтів важкими металами та пестицидами. Режим доступу: <https://kegt.rshu.edu.ua/images/dustan/ORZR4.pdf> (дата доступу: 05.06.2026).
4. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 1595 від 14.07.2020 «Про затвердження гігієнічних регламентів щодо вмісту хімічних речовин у ґрунтах».
5. Ding Y. Z., Song Z. G., Feng R. W., Guo J. K. Interaction of organic acids and pH on multi-heavy metal extraction from alkaline and acid mine soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2014. Vol. 11. P. 33–42. DOI: 10.1007/s13762-013-0433-7.
6. Abusriwil L. M. N., Hamuda H. E. A. F. B., Elfoughi A. A. Seed germination, growth and metal uptake of *Medicago sativa* L. grown in heavy metal contaminated clay loam brown forest soil. *Journal of Landscape Ecology*. 2011. Vol. 9. P. 111–125. DOI: 10.56617/tl.3901.
7. Acila S., Derouiche S., Allioui N. Embryo growth alteration and oxidative stress responses in germinating Cucurbita pepo seeds exposed to cadmium and copper toxicity. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14. Article 8608. DOI: 10.1038/s41598-024-58635-1.
8. Almaghrabi O. A., Abdelmoneim T. S., Albishri H., Moussa T. A. A. Enhancement of maize growth using some plant growth promoting rhizobacteria

(PGPR) under laboratory conditions. *Life Science Journal*. 2014. Vol. 11, No. 11. P. 764–772.

9. Amamou F., Nemmiche S., Meziane R. K., Didi A., Yazit S. A., Chabane-Sari D. Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2015. Vol. 78. P. 177–184. DOI: 10.1016/j.fct.2015.01.001.

10. Bezini E., Abdelguerfi A., Nadjimi B., Touati M., Adli B., Yabrir B. Effect of some heavy metals on seed germination of *Medicago arborea* L. (Fabaceae). *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2019. Vol. 84, No. 4. P. 357–364.

11. Dresler S., Hawrylak-Nowak B., Strzemski M., Wójciak-Kosior M., Sowa I., Hanaka A., Gołoś I., Skalska-Kamińska A., Cieślak M., Kováčik J. Metabolic changes induced by silver ions in *Carlina acaulis*. *Plants*. 2019. Vol. 8, No. 11. <https://doi.org/10.3390/plants8110517>.

12. Gautam S., Anjani K., Srivastava N. *In vitro* evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2016. Vol. 22, No. 1. P. 121–129. DOI: 10.1007/s12298-016-0339-1.

13. Genchi G., Sinicropi M. S., Lauria G., Carocci A., Catalano A. The effects of Cd toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020. Vol. 17, No. 11. Art. 3782. DOI: 10.3390/ijerph17113782.

14. Gratão P. L., Polle A., Lea P. J., Azevedo R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 2005. Vol. 32. P. 481–494. DOI: 10.1071/FP05016.

15. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 2002. Vol. 53. P. 1–11.

16. Hrynenko U. V., Zhuravel I. O. Vyznachennia vmistu khlorofiliv ta karotynoidiv v lysti shpynatu horodnoho (*Spinacia oleracea* L.). *Zbirnyk naukovykh prats spivrobitnykiv NMAPO imeni P. L. Shupyka*. 2017. Vol. 28. P. 29–33.

17. Ibrahim E. A. Effect of citric acid on phytoextraction potential of *Cucurbita pepo*, *Lagenaria siceraria*, and *Raphanus sativus* plants exposed to multi-

metal stress. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13. Art. 13070. DOI: 10.1038/s41598-023-40233-2.

18. Jan S., Alyemeni N., Wijaya L., Alam P., Siddique K. H., Ahmad P. Interactive effect of 24-epibrassinolide and silicon alleviates Cd stress via the modulation of antioxidant defence and glyoxalase systems and macronutrient content in *Pisum sativum* L. seedlings. *BMC Plant Biology*. 2018. Vol. 18. Art. 146. DOI: 10.1186/s12870-018-1359-5.

19. Kolisnyk Kh. M., Prokopiak M. Z., Hrytsak L. R., Drobyk N. M. Khorolohiia ta bioekolohichni osoblyvosti vydiv rodu *Carlina* L. flory Ukrainy. *Naukovi zapysky Ternopilskoho natsionalnoho pedahohichnoho universytetu imeni Volodymyra Hnatiuka. Serii: Biolohiia*. 2023. Vol. 83, No. 3–4. P. 48–57. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.23.3-4.6>.

20. Li W., Khan M. A., Yamaguchi S. et al. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*. 2005. Vol. 46. P. 45–50. DOI: 10.1007/s10725-005-6324-2.

21. Majeed A., Muhammad Z., Siyar S. Assessment of heavy metal induced stress responses in pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Ecologica Sinica*. 2019. Vol. 39, No. 4. P. 284–288. DOI: 10.1016/j.chnaes.2018.12.002.

22. Matsouka I., Beri D., Chinou I., Haralampidis K., Spyropoulos C. G. Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedlings: A potential detoxification mechanism. *Plant and Soil*. 2011. Vol. 343, No. 1–2. P. 235–245. DOI: 10.1007/s11104-010-0714-6.

23. Mesić Kiš I., Karaica B., Medunić G., Romić M., Šabarić J., Balen D., Šoštarko K. Soil, bark and leaf trace metal loads related to the war legacy (The Prašnik rainforest, Croatia). *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*. 2016. Vol. 31, No. 2. P. 13–28. <https://doi.org/10.17794/rgn.2016.2.2>.

24. Minkina T. M. et al. Heavy metals in soils and plants: a review. *Journal of Soils and Sediments*. 2021. Vol. 21. P. 1–25.

25. Molecular mechanism of plant response to copper stress: A review Wang Y., Zhang H., Liu X. et al. Molecular mechanism of plant response to copper stress: A

review. *Environmental and Experimental Botany*. 2024. Vol. 218. Article 105590. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2023.105590.

26. Muccifora S., Bellani L. M. Effects of copper on germination and reserve mobilization in *Vicia sativa* L. seeds. *Environmental Pollution*. 2013. Vol. 179. P. 68–74. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.03.061.

27. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, No. 13. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

28. Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Responses to Copper Stress Li H., Yang X., Zhang Y. et al. Physiological and molecular mechanisms of plant responses to copper stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, № 21. Article 12950. DOI: 10.3390/ijms232112950.

29. Rahimzadeh M. R., Kazemi S., Moghadamnia A. A. Cadmium toxicity and treatment: an update. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2017. Vol. 8, No. 3. P. 135–145. <https://doi.org/10.22088/cjim.8.3.135>.

30. Rajkumar M. et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 2012. Vol. 30. P. 1562–1574.

31. Rasafi T. E. et al. Cd stress in plants: a critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2021. Vol. 52. P. 1–52. DOI: 10.1080/10643389.2020.1835435.

32. Rascio N., Navari-Izzo F. Heavy metal hyperaccumulating plants. *Plant Science*. 2011. Vol. 180. P. 169–181.

33. Riyazuddin R, Nisha N, Ejaz B, Khan MIR, Kumar M, Ramteke PW, Gupta R. A Comprehensive Review on the Heavy Metal Toxicity and Sequestration in Plants. *Biomolecules*. 2021. 28, 12 (1). P. 43. DOI: 10.3390/biom12010043.

34. Satarug S. Dietary cadmium intake and its effects on kidneys. *Toxics*. 2018. Vol. 6, No. 1. Art. 15. <https://doi.org/10.3390/toxics6010015>.

35. Sethy S. K., Ghosh S. Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2013. Vol. 4, No. 2. P. 272–275. DOI: 10.4103/0976-9668.116964.

36. Shebanina O., Kormyshkin I., Bondar A., Bulba I., Ualkhanov B. Ukrainian soil pollution before and after the Russian invasion. *International Journal of Environmental Studies*. 2023. Vol. 81, No. 1. P. 208–215. <https://doi.org/10.1080/00207233.2023.2245288>.
37. Sirot V., Samieri C., Volatier L., Leblanc C. Cadmium dietary intake and biomarker data in French high seafood consumers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2008. Vol. 18. P. 400–409.
38. Solokha M., Demyanyuk O., Symochko L., Mazur S., Vynokurova N., Sementsova K., Mariychuk R. Soil degradation and contamination due to armed conflict in Ukraine. *Land*. 2024. Vol. 13. Art. 1614. <https://doi.org/10.3390/land13101614>.
39. Splodytel A., Holubtsov O., Chumachenko S., Sorokina L. eds. Vplyv viiny rosii proty Ukrainy na stan ukrainskykh gruntiv. Rezultaty analizu. Kyiv : Tsentr ekologichnykh initsiatyv “Ekodiia”, 2023. 155 p.
40. Srivashtav V., Verma D., Kansara R., Jha S., Singh A. Effect of cadmium toxicity on growth, physiochemical parameters and antioxidant system of castor seedlings. *Heliyon*. 2024. Vol. 10, No. 16. Art. e36536. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e36536.
41. Tahjib-Ul-Arif M. et al. Citric Acid-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Art. 7235. DOI: 10.3390/ijms22137235.
42. Throwing Copper Around: How Plants Control Uptake, Distribution, and Accumulation of Copper Printz B., Lutts S., Hausman J.-F., Sergeant K. Throwing Copper Around: How Plants Control Uptake, Distribution, and Accumulation of Copper. *Agronomy*. 2022. Vol. 12, № 5. Article 994. DOI: 10.3390/agronomy12050994.
43. Xue Z. C., Gao H. Y., Zhang L. T. Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. *Biologia Plantarum*. 2013. Vol. 57. P. 587–590. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0318-0>.

44. Zayneb C., Bassem K., Zeineb K., Grubb C. D., Nouredine D., Hafedh M., Amine E. Physiological responses of fenugreek seedlings and plants treated with cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. Vol. 22, No. 14. P. 10679–10689. DOI: 10.1007/s11356-015-4270-8.
45. Zhang H. J., Gao Y. T., Xiong H. B. Removal of heavy metals from polluted soil using the citric acid fermentation broth: A promising washing agent. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24. P. 9506–9514. DOI: 10.1007/s11356-017-8660-y.
46. Zhu T., Li L., Duan Q., Liu X., Chen M. Progress in our understanding of plant responses to the stress of heavy metal cadmium. *Plant Signaling & Behavior*. 2021. Vol. 16, No. 1. Art. e1836884. DOI: 10.1080/15592324.2020.1836884.
47. Adriano D. C. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. 2nd ed. New York: Springer, 2001. 867 p.
48. Datsko O., Zakharchenko E., Butenko Y., Melnyk O., Kovalenko I., Onychko V., Ilchenko V., Solokha M. Ecological assessment of heavy metal content in Ukrainian soils. *Journal of Ecological Engineering*. 2024. Vol. 25, No. 11. P. 100–108. DOI: 10.12911/22998993/192669.
49. Kumar S. et al. *In vitro* techniques for heavy metal tolerance in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2019. Vol. 137. P. 1–15.
50. Ehsan S. et al. Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2014. Vol. 106. P. 164–172. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.007.
51. Afshan S. et al. Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. Vol. 22. P. 11679–11689. DOI: 10.1007/s11356-015-4396-8.