

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему: **«МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ТА
ФІТОРЕМЕДІАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ДЕЯКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ
РОДИНИ *CONVOLVULACEAE*»**

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Іваненко Ірина Віталіївна

Керівники:
Листван К.В., кандидат біологічних наук,
науковий співробітник відділу генетичної
інженерії ІКБГІ НАН України

Пасічник Т.В., кандидат біологічних наук,
ст. викл. кафедри біології НаУКМА

Рецензент:
Банникова М.О., кандидат біологічних
наук, старший науковий співробітник
відділу молекулярної генетики ІКБГІ
НАН України

Кваліфікаційну роботу захищено

з оцінкою _____

Секретар ЕК _____

Пасічник Т.В.

«____» червня 20__ року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Поглинання рослинами важких металів	6
1.1.1. Роль фітогормонів у мінеральному живленні рослин	6
1.1.2. Механізми поглинання рослинами важких металів	8
1.2. Фіторемедіація як спосіб очистки природних систем від важких металів	14
1.2.1. Розповсюдженість та токсичність деяких важких металів	14
1.2.2. Фіторемедіація та її використання	17
1.3. Типи культур <i>in vitro</i> та їх використання	20
1.4. Фіторемедіаційні властивості представників родини <i>Convolvulaceae</i>	21
1.4.1. Загальна характеристика родини <i>Convolvulaceae</i>	21
1.4.2. Поглинання важких металів представниками родини <i>Convolvulaceae</i>	23
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	25
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1. Об'єкт дослідження	25
2.2. Матеріали дослідження	25
2.3. Методи дослідження	26
2.3.1. Введення в асептичну культуру	26
2.3.2. Умови мікроклонального розмноження	26

2.3.3. Умови калусоутворення	27
2.3.4. Умови росту на середовищах з важкими металами	27
2.3.5. Визначення вмісту важких металів у біомасі методом атомно-абсорбційної спектроскопії	28
2.3.6. Статистична обробка даних	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ	29
3.1. Підбір умов для мікроклонального розмноження	29
3.2. Отримання калусних культур	35
3.3. Ріст представників родини <i>Convolvulaceae</i> на середовищах з важкими металами	38
3.4. Накопичення важких металів представниками родини <i>Convolvulaceae</i>	42
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	45
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

Накопичення важких металів в ґрунтах є екологічною проблемою і становить серйозну загрозу для життєдіяльності живих організмів. Потрапляння важких металів в харчовий ланцюг сприяє погіршенню стану здоров'я людей та інших живих істот [1].

Для видалення важких металів з ґрунтів та водного середовища використовують різні методи – як фізичні та хімічні, так і біологічні. Фіторемедіація є ефективним і економічним методом для видалення важких металів з різних середовищ і може бути дієвою заміною фізико-хімічним методам очистки природних екосистем. Фіторемедіація – це використання зелених рослин для очищення забрудненого ґрунту та водних ресурсів. Фіторемедіація включає фітоволатилізацію, фітостабілізацію і фітоекстракцію. Біотехнологічні та генно-інженерні підходи можуть використовуватися у фіторемедіації для оптимізації метаболічних і фізіологічних процесів рослин з метою більш ефективного видалення ними металів [1, 2].

Важливим завданням є вибір видів рослин для фіторемедіації. Зазвичай ті види, які можуть накопичувати високі концентрації важких металів у надземних частинах, вважаються кращими за інші і називаються гіперакумуляторами. За таких умов види повинні добре накопичувати біомасу в присутності іонів металів, тобто, бути толерантними до них. Пошук і відбір таких видів, а також дослідження їх ростових характеристик і здатності до акумуляції іонів різних важких металів є цілком актуальним завданням [1].

Для низки видів рослин з родини *Convolvulaceae* була показана їх здатність до значного накопичення іонів деяких металів. Такою здатністю відзначаються, наприклад, рослини *Convolvulus tricolor*, *Convolvulus arvensis* та *Ipomoea aquatica*, що викликає цікавість до рослин цієї родини і спонукає продовжувати досліджувати їх фіторемедіаційні властивості [3-5].

Метою роботи було дослідження особливостей мікроклонального розмноження деяких видів родини *Convolvulaceae* та їх здатності до поглинання іонів Cr^{6+} та Ni^{2+} .

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

- 1) ввести в асептичну культуру рослини *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum*, *Ipomoeae magnusiana* та *Ipomoeae tricolor* сортів Пурпурна зірка, Мілкі Вей та Скарлет;
- 2) підібрати умови для їх мікроклонального розмноження;
- 3) отримати калусні культури;
- 4) дослідити ріст рослин на середовищах, що містять важкі метали;
- 5) дослідити здатність представників родини *Convolvulaceae* накопичувати важкі метали.

Експериментальну частину виконано в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України у відділі генетичної інженерії згідно вимог.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поглинання рослинами важких металів

1.1.1. Роль фітогормонів у мінеральному живленні рослин. Для оптимального росту і розвитку у рослин, як правило, вміст основних поживних речовин підтримується на постійному рівні. В більшості ґрунтів поживні речовини мають обмежену доступність для рослини, що обумовлено їх низькою концентрацією [6]. Багато поживних речовин мають низьку розчинність або нерівномірний розподіл в ґрунтах. Щоб впоратися зі зниженою доступністю поживних речовин, рослини запускають фізіологічні процеси, спрямовані на збільшення засвоєння поживних речовин, які в багатьох випадках змінюють морфологію і метаболізм всієї рослини [7]. Реакції включають індукований синтез специфічних афінних переносників і накопичення та/або секрецію ферментів і сполук, які сприяють ремобілізації поживних речовин з неорганічних і органічних джерел [6]. Крім того, рослини використовують адаптивні механізми для стимуляції росту органів, які безпосередньо беруть участь в засвоєнні поживних речовин. Адаптації стосуються рослин, які ростуть на ґрунтах з низьким вмістом азоту, сірки або фосфору, що викликає проліферацію бічних коренів, а це, в свою чергу, призводить до збільшення площі поверхні для поглинання поживних речовин [7].

Відомо, що пригнічення розвитку бічних коренів є типовою відповіддю рослин на підвищення концентрації абсцизової кислоти. Рівень абсцизової кислоти збільшується після того, як корені рослин обробляють нітратами, що може свідчити про те, що зміна концентрації абсцизової кислоти безпосередньо діє як сигнал, який контролює реакцію рослин на високі

концентрації нітратів, хоча це може також відображати механізм адаптації до раптової зміни вмісту нітратів [8].

Абсцизова кислота впливає на гомеостаз сірки шляхом підвищення рівня глутатіону, який є посередником в метаболізмі сірки і є критично важливим для підтримки окислювально-відновного стану [9]. Етилен регулює проліферацію бічних коренів, а також визначає роль клітин під час утворення корневих волосків. Етилен індукує первинне подовження кореня у рослин за умов низької концентрації ауксину, тоді як така ж обробка має протилежний ефект у рослин, вирощених в достатніх кількостях ауксину. І навпаки, обробка рослин інгібітором синтезу етилену призводить до зменшення подовження кореня у рослин, позбавлених фітогормонів. За низьких концентрацій калію, індукується експресія генів, що контролюють біосинтез етилену [10].

Цитокініни індуюють проліферацію клітин, є важливими для розвитку пагонів та коренів, дозрівання хлоропластів. Цитокініни регулюють процеси подовження кореня, кількість бічних коренів, утворення бульб і апікального домінування у відповідь на подразники навколишнього середовища. Таким чином, цитокініни є важливими сигнальними молекулами для регулювання росту і розвитку протягом всього життя рослини [11].

Рослини, вирощені за низьких концентрацій нітратів, накопичують більш високі рівні ауксину в коренях. Навпаки, рівень ауксину в пагонах рослин нижчий, ніж у рослин, вирощених за високих концентрацій нітратів у середовищі [12]. За низьких концентрацій сірки відбувається індукція біосинтезу жасмонової кислоти [13]. Аналогічна ситуація спостерігається для калію. Високий вміст калію пригнічує синтез жасмонової кислоти [14].

Брасиностероїди впливають на засвоєння поживних речовин, видовження стовбура, розвиток листків і старіння [15]. Аналогічна роль належить саліциловій кислоті, оскільки цей гормон регулює синтез глутатіону, який захищає рослини від окисного стресу [9].

Важливі процеси розвитку, такі як утворення кореневих волосків, первинний ріст коренів і утворення бічних коренів, особливо чутливі до змін концентрації поживних речовин. Особливості росту і розвитку рослин можуть бути змінені регуляторами росту рослин, такими як ауксини, цитокініни і етилен, абсцизова і жасмонова кислоти, брасиностероїди [7].

1.1.2. Механізми поглинання рослинами важких металів. Важкі метали – це хімічні елементи, які мають високу атомну масу і густину, яка в п'ять разів перевищує густину води [16]. Важкі метали класифікують на дві категорії: 1) метали, які не мають корисного впливу і є токсичними для живих організмів: Ni, Cd, Hg, Pb, Cr і As; 2) метали, які необхідні для рослин і тварин, але можуть стати токсичними, якщо їх концентрації занадто високі: Co, Fe, Cu, Cr, Mn, Zn. Наприклад, концентрація Cu більше 130 мг/кг є небезпечною для живих організмів, для Fe значення більше 50 мг/кг, для Zn – більше 8 мг/кг [17].

Деякі важкі метали беруть участь майже у всіх біологічних процесах, включаючи фотосинтез, стійкість до біотичного і абіотичного стресу або симбіотичну фіксацію азоту. Однак рослини часто ростуть в ґрунтах з обмеженою доступністю поживних речовин. Щоб забезпечити належний рівень металів, рослини розробили складну систему поглинання і розподілу металів (рис. 1.1), яка включає не тільки саму рослину, але і пов'язані з нею мікроорганізми. Такі мікроорганізми можуть лише збільшувати розчинність металів в ґрунтах і робити їх більш доступними для рослини-господаря, а також викликати реакцію дефіциту металу або безпосередньо доставляти перехідні елементи в коркові клітини [18].

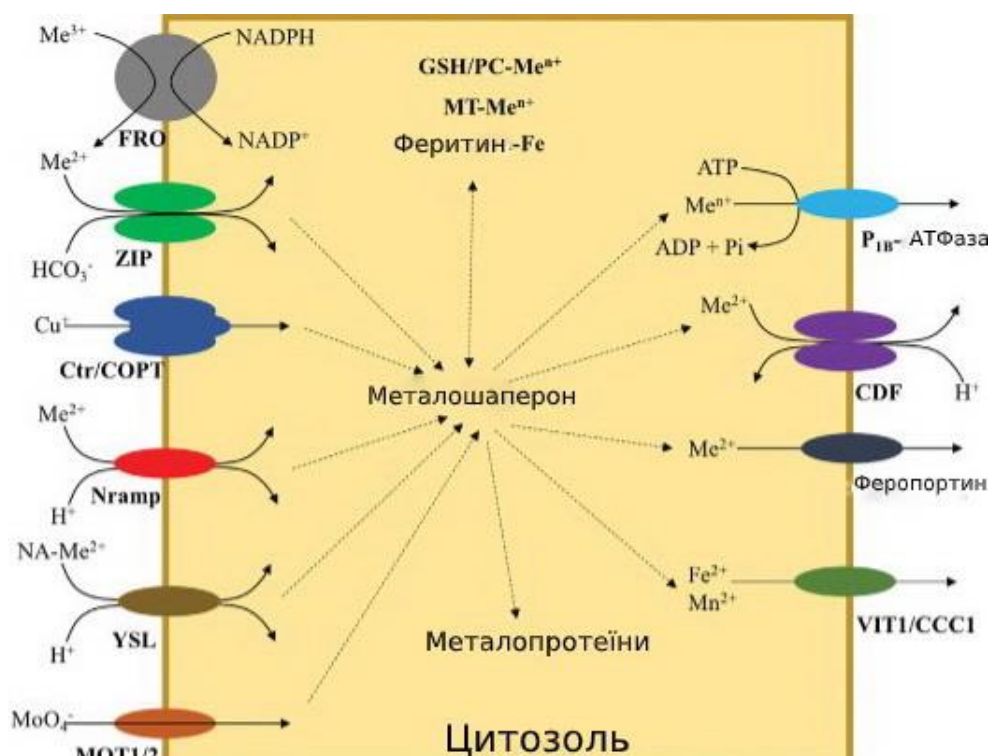


Рис. 1.1. Основні системи транспорту у рослин, які беруть участь в транспорті металів [адаптовано 18].

Найбільш вивченими транспортерами, які вводять метали в цитозоль, є родини білків ZIP, Ctr/COPT, Nramp, YSL і MOT [18]. Транспортери ZIP – родина переносників двовалентних металів: Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} і Mn^{2+} [19]. Вони діють як гомодимер, де кожен мономер має вісім трансмембранних доменів (рис. 1.2). ZIP-транспортери містять консервативну цитозольну, багату гістидином петлю між трансмембранними (ТМ) доменами 3 і 4 у еукаріот, яка, мабуть, відповідальна за специфічність і швидкість транспорту [20]. Членами цієї родини є переносники, відповідальні за поглинання заліза і цинку з ґрунту [21].

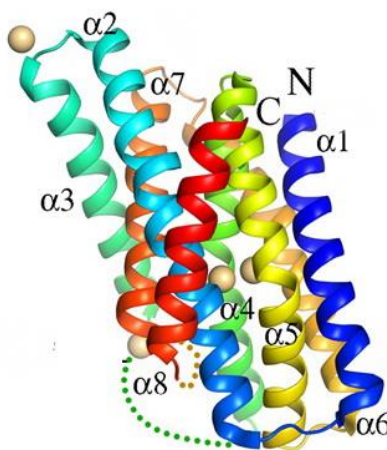


Рис. 1.2. Загальний план будови Zip-білків. $\alpha 1$ - $\alpha 8$ – трансмембранні домени, N-кінець зображено синім кольором, С-кінець – червоним [22].

Транспортери Ctr/COPT (рис. 1.3) – діють як гомо- чи гетеротримери, утворюють канал, відповідальний за специфічний транспорт Cu^+ [23]. Транспортери Nramp (рис. 1.4) – це білок, що містить 11 трансмембранних доменів. Транспортери Nramp відповідають за транспорт Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} і Zn^{2+} [24].

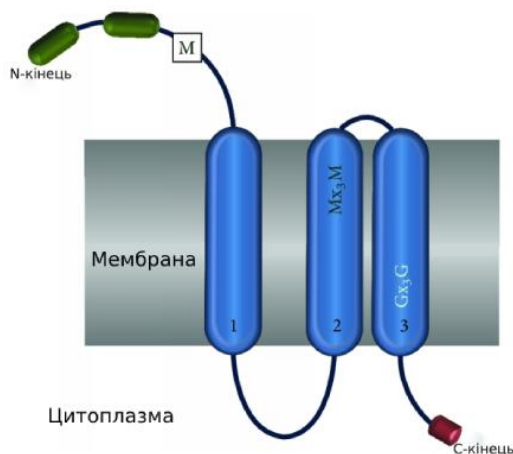


Рис. 1.3. Схематична будова білків родини CTR/COPT. Три трансмембранних домени зображено синім кольором, зеленим – позаклітинні ділянки, збагачені метіоніном/гістидином, червоним – цитоплазматичні ділянки цистеїну/гістидину [адаптовано 25].

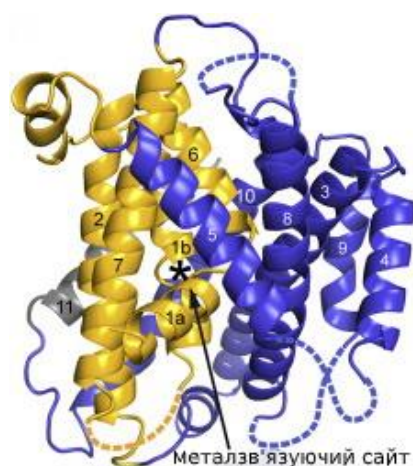


Рис. 1.4. Схематична будова транспортерів Nrap. 1 – 11 – трансмембранні домени [адаптовано 26].

Транспортери YSL – жовті смугоподібні білки. Жовті смуги – фенотип, ідентифікований у кукурудзи, в якому спостерігаються хлоротичні (жовті) зони. Хлороз викликаний недостатнім засвоєнням заліза і є результатом мутації кореневого епідермального транспортера YS1 (рис. 1.5). Транспортери YSL не використовують вільні метали в якості субстрату, а являють собою комплекс металів з нікотинаміном [27]. Транспорт металів YSL-білками активується H^+ -симпортом. Транспортери YSL беруть участь в поглинанні металів з ґрунту у однодольних і розподілі металів на великі відстані як у однодольних, так і у дводольних рослин [28].

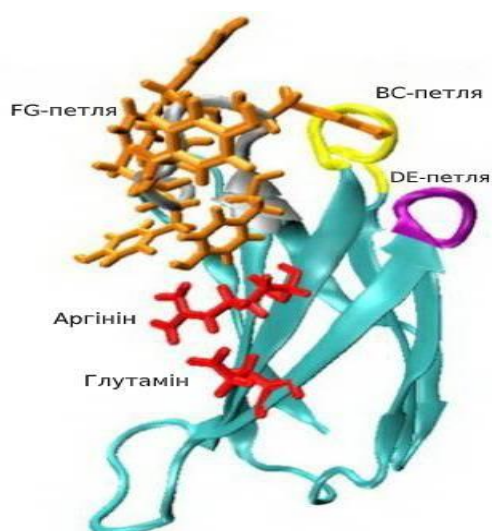


Рис. 1.5. Структура білка YS1 [адаптовано 29].

Важливим переносником важких металів є MOT1 – транспортер молібдату типу 1 (рис. 1.6). Також існує транспортер молібдату типу 2, виявлений у *Chlamydomonas reinhardtii*. На відміну від інших перехідних металів молібден транспортується у вигляді оксоаніонів молібдату. Ці переносники були вперше ідентифіковані паралельно у *Chlamydomonas reinhardtii* і у *Arabidopsis thaliana* [30].

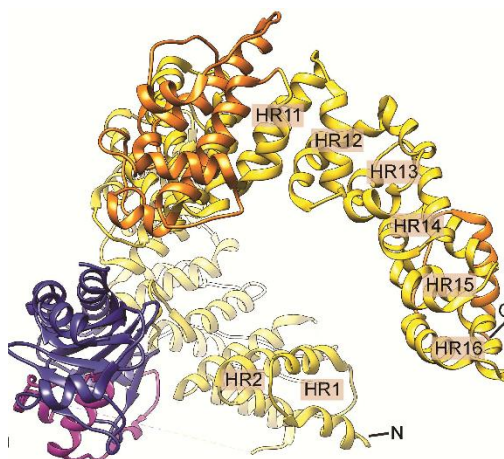


Рис. 1.6. Структура транспортерів MOT1. N- і C-кінці позначені N і C відповідно; Heat-повтори позначені як HR1, HR2 і HR11 – 16 [31].

Транспортери, які виводять метали з цитозолу в апопласт: P1b-АТФази, CDF, феропортини і родина VIT/CCC1 [18]. P1b-АТФази – велика родина транспортерів, знайдених у різних видів рослин (рис. 1.7). Вони залучені в мембранний транспорт цілого ряду мікроелементів, а також потенційно токсичних для рослинної клітини металів. АТФази Р-типу функціонують як насоси, що перекачують важкі метали через клітинні мембрани. Механізм їх дії полягає в утворенні фосфорильованої проміжної сполуки в реакційному циклі [32].

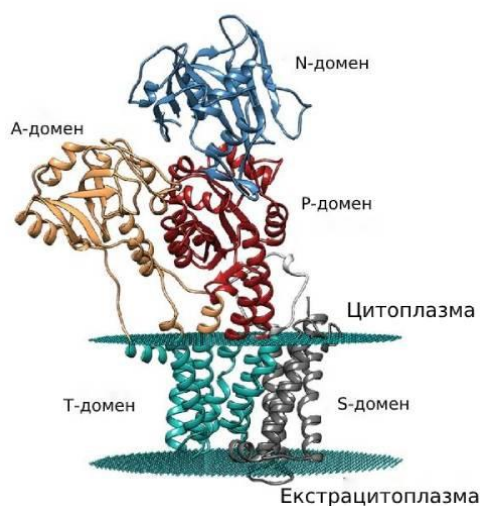


Рис. 1.7. Структурна організація P1b-АТФази [адаптовано 33].

Транспортери CDF – білки, субстратом для яких є двовалентні метали, такі як Fe^{2+} , Zn^{2+} або Mn^{2+} , зв'язані з антипортом H^+ (рис. 1.8). Функціональний транспортер являє собою гомодимер. Мономер має шість трансмембранних доменів з областю, багатою гістидином. У білку є три металзв'язуючих домени: сайт I в трансмембранній області, сайт II на межі мембрана-цитозоль і сайт III в С-термінальному домені [34].

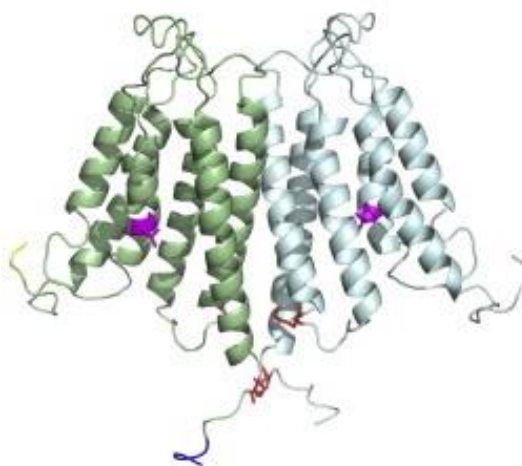


Рис. 1.8. Структура білка CDF3 *Shewanella oneidensis*. N- і С-кінці показані помаранчевим і синім кольором відповідно, залишки, які опосередковують утворення сольових містків зображені червоним, гідрофобні залишки – фіолетовим [34].

Коли концентрація металу в цитоплазмі піднімається вище певного рівня, шаперони і органічні молекули зв'язуються з металом. Рослина має бути захищена від надлишкових рівнів металів, оскільки вони можуть стати токсичними. Металопротеїни – багаті цистеїном білки, які демонструють високу спорідненість до міді, цинку або кадмію і є ефективними для захисту рослини від надлишкових рівнів металу [35].

1.2. Фіторе mediaція як спосіб очистки природних систем від важких металів

1.2.1. Розповсюдженість та токсичність деяких важких металів. В результаті господарської діяльності людини в природні екосистеми потрапляють надлишкові кількості важких металів, котрі спричиняють різко негативний вплив як на життєдіяльність окремих живих організмів, так і на стійкість і життєздатність екосистем в цілому. Хром (Cr) – це хімічний елемент, який міститься в ґрунті, вулканічному пилу і газах. Він має різні ступені окислення від +2 до +6. Найбільш стабільними формами є Cr^{+6} і Cr^{+3} . Шестивалентний хром токсичний для більшості рослин в концентраціях від 5 до 100 мг/кг доступного хрому в ґрунті. Через високий окисний потенціал Cr^{+6} проявляє мутагенну та канцерогенну дію на біологічні системи [36].

Мутагенні ефекти проявляються при концентраціях хрому 10-12 мг/л. Ці ефекти пов'язані зі змінами генетичного матеріалу, метаболічних і фізіологічних реакцій. Cr^{6+} не взаємодіє безпосередньо з ДНК. Його вплив пояснюється внутрішньоклітинним відновленням до Cr^{3+} через утворення проміжних сполук [37].

Хром чинить негативний вплив на розвиток коренів, а саме зменшується їх діаметр, площа поверхні і кількість волосків, відбувається плазмоліз клітин кореня [38]. При надходженні Cr^{6+} до рослини зменшується кількість клітин кореня, відбувається пошкодження ДНК. Хром може також викликати зміни в структурі хлоропластів і некроз в листках рослин. Cr^{6+} є

більш токсичним для рослин, ніж Cr^{3+} , оскільки при високих концентраціях Cr^{6+} (1 ммоль/л) спостерігається повне руйнування мембрани хлоропластів [39, 40].

У нормальних фізіологічних умовах після проходження через мембрану Cr^{6+} реагує з внутрішньоклітинними відновниками (наприклад, аскорбатом і глутатіоном) з утворенням проміжних сполук Cr^{5+} та/або Cr^{4+} , вільних радикалів і кінцевого продукту Cr^{3+} . Катіонні комплекси Cr^{3+} можуть електростатично взаємодіяти з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК, що може впливати на реплікацію, транскрипцію і викликати мутагенез. Cr^{3+} перешкоджає реплікації ДНК, викликає підвищену частоту помилок транскрипції. Cr^{3+} може змінювати структуру і активність ферментів, реагуючи з їх карбоксильними та тіоловими групами [41]. Токсична дія хрому в першу чергу залежить від ступеня окислення, що визначає особливості його поглинання, переміщення і накопичення (рис. 1.9).

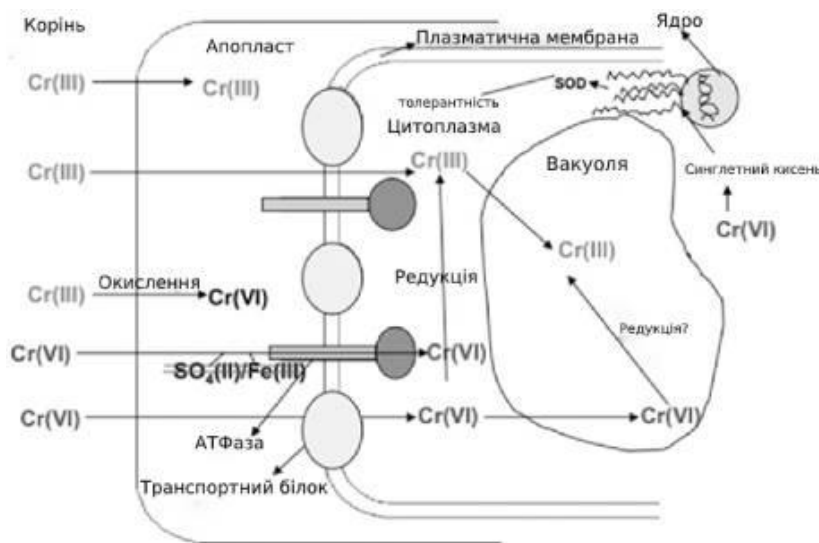


Рис. 1.9. Схема транспорту іонів хрому в коренях рослин [адаптовано 42].

Механізми поглинання і розподілу хрому у вегетативних та генеративних органах рослин до цих пір повністю не вивчені [43, 44]. Хром транспортується і накопичується в рослинах за допомогою іонів-носіїв, таких як сульфат або залізо [45]. Хром переважно накопичується в коренях.

Імобілізація цього металу в вакуолях клітин кореня є основною причиною такої біоаккумуляції [46]. У коренях поглинання Cr^{6+} відбувається активно, а поглинання Cr^{3+} відбувається шляхом осмосу [47].

Нікель (Ni) – зазвичай має два валентних електрони, але також можуть існувати ступені окислення +1, +3 або +4. Деякі солі нікелю, такі як ацетати, хлориди, сульфати та нітрати розчинні у воді, тоді як гідроксиди та карбонати малорозчинні, а дисульфід, сульфід і оксиди практично нерозчинні в воді. Нікель використовують у виробництві нержавіючих сталей, гальванічних, нікель-кадмієвих акумуляторів, монет і електронних виробів. Нікель також потрапляє в навколишнє середовище в результаті різних антропогенних впливів, таких як виплавка, видобуток металів, викиди, видалення побутових, комунальних та промислових відходів, внесення органічних добрив. Концентрація нікелю в підземних водах залежить від ґрунту, рН і глибини відбору проб [48].

Нікель необхідний для рослин, але його концентрація в більшості їх видів дуже низька (0,05-10 мг/кг сухої ваги). Концентрація нікелю в рослинах і його поглинання збільшуються за рахунок збільшення вмісту фосфатів в ґрунті. Токсичні симптоми, викликані впливом нікелю, включають хлороз, який зазвичай супроводжується некрозом. Інші токсичні симптоми включають затримку росту кореня і пагона, деформацію різних частин рослини, незвичайні плями і безліч інших аномалій росту. У крайніх випадках нікель може привести до загибелі всієї рослини [48].

Поглинання нікелю рослинами здійснюється через кореневу систему за допомогою пасивної дифузії і активного транспорту (рис. 1.10) [49].



Рис. 1.10. Схема поглинання та транспорту нікелю рослинами [адаптовано 50].

Інтенсивність поглинання нікелю рослинами залежить від кислотності ґрунту, наявності інших металів і органічних речовин [51]. Нікель накопичується переважно у коренях, ніж у пагонах [52].

1.2.2. Фіторе mediaція та її використання. Фіторе mediaція – метод очищення природних екосистем з використанням зелених рослин. Метод використовують для очищення ґрунтів від важких металів. Основні ідеї фіторе mediaції були запропоновані Чейні у 1983 році [1]. Очищення ґрунтів від важких металів за допомогою зелених рослин є вигідним методом, оскільки витрати на культивування рослин мінімальні у порівнянні з витратами на заміну ґрунтів [2].

Фіторе mediaція має свої недоліки. Насамперед, використання цього методу обмежене кліматичними та геологічними умовами досліджуваної ділянки (температура, висота над рівнем моря, тип ґрунту, доступність для сільськогосподарської діяльності). Фіторе mediaція, з одного боку, практично не чинить руйнівного впливу на навколишнє середовище, але, з іншого, можуть виникнути інші проблеми. Наприклад, токсичні речовини можуть накопичуватися в деревині, яка згодом буде використана в якості палива [53].

Існує кілька видів фітореMediaції: фітостабілізація, фітоволаталізація, фітоекстракція. Фітостабілізація ґрунтується на перетворенні хімічних сполук у неактивну та менш рухливу форму. Фітоекстракція є важливим методом видалення металів із води та забруднених ґрунтів [1]. Фітоволаталізація – метод, який включає в себе перетворення металу в летючу форму і його викид в атмосферу через продиhi [54].

Рослини, відібрані для фітоекстракції, повинні володіти такими властивостями: 1) швидкий ріст, 2) активне виробництво біомаси, 3) гіперакумулятори важких металів, 4) поширені в природі, 5) транспорт металу з коренів у пагони, 6) пристосованість до токсичного впливу важких металів, 7) стійкість до хвороботворних мікроорганізмів і шкідників, 8) пристосованість до кліматичних умов, 9) легка культивуація. Концентрація металів у пагонах і біомаса пагонів в основному визначають види рослин для фітоекстракції. Залежно від цих параметрів існує два різних підходи до фітоекстракції: використання гіперакумуляторів з відносно низьким рівнем виробництва біомаси та використання рослин з відносно вищим рівнем виробництва біомаси, але з меншим накопиченням металів [2].

Традиційні методи фітореMediaції позбавлені великомасштабного використання через низку обмежень. Види рослин, які є гіперакумуляторами, або повільно ростуть, виробляючи низьку кількість надземної біомаси рослин, або погано адаптуються до умов навколишнього середовища [55]. Також такі методи стикаються з певними обмеженнями: 1) вимагають тривалого часу для відновлення забрудненого ґрунту, 2) здатність до фітоекстракції обмежена через низьке виробництво надземної біомаси, 3) невелика частка металів є біодоступною. Доступність варіює в залежності від рН ґрунту, наявності органічної речовини. Зазначені обмеження змусили дослідників змінити традиційні підходи до фітореMediaції, щоб мінімізувати обмеження і забезпечити широкомасштабне застосування цього методу [2].

Вибір видів для фітореMediaції є важливим рішенням. Зазвичай ті види, які можуть накопичувати високі концентрації важких металів у надземних

частинах, вважаються кращими і називаються гіперакумуляторними рослинами. Було запропоновано визначати відношення концентрації металів в пагонах до концентрації цих металів у коренях як критерій для визначення того, чи є рослина гіперакумулятором. Співвідношення вище 1,0 вказує на те, що метал має тенденцію накопичуватися в пагонах більше, ніж в коренях, отже, рослина може бути гіперакумулятором [1].

Рослини, які не є гіперакумуляторами, виробляють більше надземної біомаси. Можливо підвищити їх здатність до фітореMediaції, використовуючи синтетичні або органічні хелатуючі агенти. Синтетичні агенти, включаючи етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), диетилентриамінпентаоцтову кислоту (DTPA) і етиленглікольтетраоцтову кислоту (AGTA) можуть бути використані для підвищення доступності металів, але існує ризик забруднення навколишнього середовища, крім того, такий метод може спричинити загибель рослини [55].

Ґрунтові мікроорганізми можуть впливати на доступність і поглинання важких металів рослинами. Мікоризні гриби є основним компонентом живих організмів в кореневій зоні і живуть в асоціаціях з більшістю вищих рослин в різних формах, таких як ектомікоризи, арбускулярні мікоризи, мікоризи орхідей і ерикулярні мікоризи [56].

Методи генної інженерії є важливими в посиленні фітореMediaційних властивостей рослин. Методи засновані на підвищеній експресії специфічних генів, які грають роль у поглинанні важких металів, їх транслокації та стійкості рослин. Введення специфічних генів може бути досягнуто за допомогою методів переносу генів або трансформації, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens* [57]. Трансгенні рослини розробляють або для посилення іммобілізації, або для підвищення стійкості рослин до важких металів, щоб сприяти більшому їх накопиченню в надземних частинах рослини [1]. Зазначені дослідження в генній інженерії проводять за допомогою отримання культур рослин *in vitro*, які є асептичними, тобто, без видимих ознак зараження патогенними мікроорганізмами.

1.3. Типи культур *in vitro* та їх використання

Культура клітин, тканин та органів рослин є асептичною культурою, яка росте в контрольованих умовах середовища. Часто такі культури використовують для отримання клонів рослин. Контрольовані умови забезпечують культуру середовищем, що сприяє її росту і розмноженню. Умови включають правильне надходження поживних речовин, сталий рівень рН, сприятливу температуру [58].

Середовище для культивування тканин *in vitro* містить всі поживні речовини, необхідні для нормального росту і розвитку рослин. В основному воно складається з макро-, мікроелементів, вітамінів, регуляторів росту рослин, джерел вуглецю. Середовище Мурасіге – Скуга (МС) найбільш широко використовується для вегетативного розмноження багатьох видів рослин *in vitro*. Значення рН середовища впливає як на ріст рослин, так і на активність регуляторів росту. Значення рН знаходиться в діапазоні від 5,4 до 5,8 [59].

Ауксини і цитокініни є найбільш поширеними регуляторами росту рослин. Висока концентрація ауксинів зазвичай сприяє утворенню коренів, тоді як висока концентрація цитокінінів сприяє регенерації пагонів. Цитокініни сприяють клітинному діленню і викликають утворення пагонів. Високе співвідношення цитокінінів до ауксинів сприяє проліферації пагонів, а високе співвідношення ауксинів до цитокінінів призводить до утворення коренів. Гібереліни використовують для прискорення росту і стимулювання подовження клітин [60].

Є різні типи культур *in vitro* і всі вони мають своє застосування. Соматичний ембріогенез – метод утворення калусних тканин або культури зародків *in vitro*. Процес, за допомогою якого соматичні клітини або тканини розвиваються в диференційовані ембріоїди. Зародки можуть розвиватися в цілі рослини без статевого запліднення, як це роблять зиготичні зародки. Органогенез – утворення органів рослин: коренів, пагонів і листків, які

можуть виникати безпосередньо з меристеми або з недиференційованих клітинних мас (калус) [59].

Культури клітинної суспензії використовують для масштабного культивування рослинних клітин, з яких можуть бути вилучені вторинні метаболіти. Культура суспензії розвивається шляхом перенесення пухкої частини калуса в рідке середовище і підтримується у відповідних умовах аерації, світла, температури та інших фізичних параметрів [61]. Основною перевагою клітинних культур є синтез біоактивних вторинних метаболітів, які продукуються в контрольованому середовищі, незалежно від клімату і умов ґрунту [62].

Система бородатих коренів *hairy roots* заснована на інокуляції *Agrobacterium rhizogenes*, стала популярною в останні два десятиліття як метод отримання вторинних метаболітів, синтезованих в корінні рослин [59], проте вона може використовуватись також і для очистки водних середовищ від іонів важких металів та низки органічних забруднювачів.

1.4. Фіторе mediaційні властивості представників родини *Convolvulaceae*

1.4.1. Загальна характеристика родини *Convolvulaceae*. Родина *Convolvulaceae* налічує близько 59 родів і 1600 видів. Рослини широко поширені як в тропічних, так і в помірних районах, переважно декоративні. Найчисельніші роди – іпомея *Ipomoea* (близько 500 видів), березка *Convolvulus* (100 видів) і евольвулюс *Evolvulus* (100 видів) – включають в себе ліани, трави, дерева. Великий паразитичний рід *Cuscuta* нараховує близько 145 видів. Деякі види вважаються інвазивними [63].

Види березки *Convolvulus* найбільш різноманітні в районах із середземноморським кліматом і в напівпустельних районах (рис. 1.11). Березки живуть в сухих, кам'янистих і піщаних місцях на висотах до 3000 м над рівнем моря. У тропіках майже повністю відсутні, за винятком гір

(Африканський Ріг). В Австралії, на півдні Африки і в Південній Америці, існують центри різноманітності в'юнків. У північній півкулі рід слабо представлений у Північній Америці, практично відсутній у Східній Азії. Найбільше рід представлений в регіонах Центральної Азії, причому найбільша кількість видів зустрічається в Ірані. Близький Схід є головним центром різноманітності *Convolvulus*. *Convolvulus tricolor* і *Convolvulus sneorum* застосовують як декоративні рослини через привабливий зовнішній вигляд їх квіток. Обидва види є джерелом ароматичної олії, яку отримують шляхом перегонки з коренів і стебел. Більшість американських і південноафриканських видів були відомі до середини XIX століття, згодом в цих областях було виявлено лише кілька нових видів, останнім з яких був *Convolvulus ensifolius* в Південній Америці і *Convolvulus carrii* у Північній Америці [64, 65].



Рис. 1.11. Представники родини *Convolvulaceae* (1 – 3 види березки *Convolvulus*, 4 – 7 – роду *Ipomoea*). 1 – *Convolvulus farinosus* (фото: Denis Payet), 2 – *Convolvulus sneorum* (фото: Philip Bird), 3 – *Convolvulus tricolor* (фото: judywhite), 4 – *Ipomoea magnusiana* (фото: Bart Wursten), *Ipomoea tricolor* сортів: 5 – Пурпурна зірка (фото: fotosen), 6 – Мілкі Вей (фото: Gennytzin De Zaropan), 7 – Скарлет (фото: Brett Ruby).

У *Convolvulus scammonia* коріння продукують блідо-коричневу речовину, яку використовують як проносне. Не всі види родини *Convolvulaceae* є декоративними. Так, *Convolvulus arvensis* є широко поширеним бур'яном, який важко викоринити. Як бур'яни також відомі рослини *Convolvulus pilosellifolius*. Деякі види важливі для випасу худоби в пустельних умовах, в тому числі *Convolvulus oxyphyllus* і *Convolvulus pilosellifolius* в Аравії, *Convolvulus hamadae*, *Convolvulus eremophilus*, *Convolvulus divaricatus* і *Convolvulus dorycnium subsp. subhirsutus* в Середній Азії [64].

Ipomoea – рід, який налічує близько 500 видів в основному дерева, чагарники, трави, що ростуть в тропічному кліматі. *Ipomoea batatas* (батат) використовують в харчовій промисловості. В насінні *Ipomoea violacea* містяться алкалоїди D-лізергінової та D-ізолізергінової кислот (аналогічно ЛСД). Насіння традиційно використовується в церемоніальних і лікувальних цілях. *Ipomoea purga* родом з тропічної Мексики. Коріння у формі ріпи розміром з яблуко використовують як проносне. *Ipomoea purpurea* – є проблемним бур'яном в деяких регіонах південно-східної частини Північної Америки. *Ipomoea leptophylla* родом з центральної частини Північної Америки є декоративною рослиною [66].

1.4.2. Поглинання важких металів представниками родини *Convolvulaceae*. Рослина *Convolvulus tricolor* є гіперакумулятором. Поглинають високі концентрації важких металів і накопичують їх в коренях, стеблах або листках (Pb^{2+}). Іонів нікелю накопичується в листках значно більше, ніж іонів свинцю. Вміст поглинених іонів свинцю вищий в надземних органах рослини, ніж в коренях. Корінь рослини поглинає метали з навколишнього середовища і відбувається їх транспорт в надземні органи рослини. Після росту рослин на середовищах зі свинцем надземні органи видаляють, таким чином відбувається стабільне видалення металів з навколишнього середовища. *Convolvulus tricolor* накопичує різні кількості металів в різних органах. Схема накопичення металів в органах рослини

(корені, стебла і листя) виглядає наступним чином для іонів Pb^{2+} : листки>стебла>корені, а для іонів Ni^{2+} : корені> стебла> листки [3].

Convolvulus arvensis накопичують більше важких металів в коренях, ніж у надземних органах рослин. *Convolvulus arvensis* можна розглядати як потенційний гіперакумулятор хрому. Кількість металу, виявленого в стеблах складає 1750 мг Cr, 750 мг Cd і 200 мг Cu на 1 кг сухої маси рослин. Що стосується концентрації металу в листках, концентрації Cr, Cd і Cu становили 2150, 750 і 300 мг/кг сухої тканини відповідно [4].

Поглинання Cr^{6+} рослинами *Ipomoea carnea* вище при збільшенні рН розчину від 1 до 5. Максимальний вміст Cr становить 13,6 мг/г сухої тканини при рН 5 [67]. Здатність *Ipomoea aquatica* очищати стічні води від алюмінію вивчали протягом 10 днів. Вміст Al в стічних водах на 0, 2, 4, 6, 8 і 10 день становив 0,30; 0,13; 0,12; 0,10; 0,08 і 0,04 мг/л відповідно. В останній день обробки концентрація важких металів в стічних водах знизилася на 87%. Зниження вмісту Al на 57% було зареєстровано на другий день експерименту. Вміст Fe в стічних водах на 0, 2, 4, 6, 8 і 10 день становив 1,09; 0,87; 0,86; 0,80; 0,81 і 0,68 мг/л відповідно. Концентрація важких металів знизилася на 38% в останній день дослідження. На другий день експерименту було зареєстровано зниження вмісту Fe на 20%. Середній вміст Al, накопиченого рослинами *Ipomoea aquatica*, становив 1054 мг/кг сухої тканини, тоді як середній вміст Fe становив 972 мг/кг сухої тканини. Вміст Al в стеблах становив в середньому 4447 мг/кг сухої тканини, в коренях – 4524 мг/кг сухої тканини, відсоток Al в листках був найнижчим, що становило 0,08% від загальної кількості важких металів. Вміст Fe в листках становив в середньому 821 мг/кг сухої тканини, в стеблах – 1767 мг/кг сухої тканини, в коренях – 5084 мг/кг сухої тканини. *Ipomoea aquatica* накопичують Al та Fe переважно в коренях [68]. *Ipomoea aquatica* накопичують в середньому такі кількості Cr^{6+} : в коренях – 513 мг/кг сухої тканини, в пагонах – 33 мг/кг [5]. Вміст Cd в коренях і пагонах *Ipomoea aquatica* становив 1100 мг/кг і 138 мг/кг сухої тканини відповідно [69].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктами дослідження фіторемедіаційних властивостей були такі види та сорти представників родини *Convolvulaceae*: *Convolvulus farinosus* (73 шт.), *Convolvulus sneorum* (90 шт.), *Convolvulus tricolor* (10 шт.), *Ipomoea magnusiana* (10 шт.), *Ipomoea tricolor* сортів Пурпурна зірка (16 шт.), Мілкі Вей (15 шт.) та Скарлет (15 шт.).

Насіння всіх трьох сортів іпомеї *Ipomoea tricolor* були придбані у торгівельній мережі, так само, як і насіння *Convolvulus tricolor*. Насіння *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum* та *Ipomoea magnusiana* були надані ботанічними садами: *Convolvulus farinosus* – ботанічним садом Гогенгеймського університету (Штутгарт, Німеччина), *Convolvulus sneorum* – ботанічним садом Генуезського університету (Італія), *Ipomoea magnusiana* – ботанічним садом Потсдамського університету (Потсдам, Німеччина).

2.2. Матеріали дослідження

Для виконання експериментальної частини кваліфікаційної роботи було використано наступні реактиви та матеріали: NH_4NO_3 (х.ч.), KNO_3 (х.ч.), KH_2PO_4 (х.ч.), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), H_3BO_3 (х.ч.), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), KI (х.ч.), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), тіамін HCl (х.ч.), піридоксин HCl (х.ч.), $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ (х.ч.), $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (х.ч.), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), Na_2EDTA (х.ч.), 90%-ий розчин KOH (тех.), 70%-ий розчин етилового спирту (тех.), бензиламінопурин (х.ч.), 2,4-дихлорфеноксицтова

кислота (х.ч.), 30%-ий розчин H_2O_2 (х.ч.), нафтилоцтова кислота (х.ч.), кінетин (х.ч.), $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (х.ч.), інозитол (х.ч.), сахароза (х.ч.), агар-агар (х.ч.).

Обладнання: автоматичні піпеточні дозатори (100мкл, 1000 мкл, 5000 мкл), стерилізатор кульковий, мішалка магнітна ММ-5, атомно-абсорбційний спектрофотометр СЕМІ С-115М.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Введення в асептичну культуру. Рослинні культури для дослідження є асептичними, тобто, без видимих ознак зараження бактеріями. Для отримання асептичних рослин обов'язковою була поверхнева стерилізація насіння досліджуваних видів рослин. Стерилізація складалася з декількох етапів:

1) Перший етап – промивання 70%-им розчином етилового спирту протягом 30 секунд. Етап забезпечує позбавлення насіння від деяких видів захисних покриттів, наприклад, воскової плівки, чим покращує доступ стерилізуючого агента до поверхні насінини.

2) Другий етап – обробка основною стерилізуючою речовиною. В якості такої використовували 25-30%-ий розчин комерційного препарату «Білизна». Засіб є розчином гіпохлориту натрію, який застосовують для дезінфекції, відбілювання та видалення плям. Тривалість етапу 15-20 хвилин. Після стерилізації проводили промивку насіння стерильною дистильованою водою; три рази по 5 хвилин кожен.

2.3.2. Умови мікроклонального розмноження. З метою ефективного розмноження, через два тижні пересаджували *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum* на середовища з різною концентрацією фітогормону цитокініну – бензиламінопурину (1 мг/л ВАР та 0,5 мг/л ВАР). Середовища з двома різними концентраціями цитокініну є необхідними для з'ясування їх впливу на розвиток кількох пагонів.

Для покращення коренеутворення пересаджували *Convolvulus sneorum* на середовище 1/2MS1N. Середовище містить нафтилоцтову кислоту, яка покращує коренеутворення рослин.

Через місяць розраховували коефіцієнт мікроклонального розмноження шляхом підрахунку кількості пагонів, які сформувалися з однієї бруньки на середовищах з різним вмістом ВАР. Культивували рослини в термальній кімнаті за таких умов: $t=24\pm1^{\circ}\text{C}$, при світловому періоді 16 годин світла та 8 годин темряви.

2.3.3. Умови калусоутворення. Середовища для калусоутворення містили два варіанти комбінацій фітогормонів: 1) 1мг/л бензиламінопурину, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, 2) 0,2 мг/л кінетину, 2 мг/л 2,4-D (дихлорфеноксиоцтової кислоти), 1 мг/л NAA (нафтилоцтової кислоти). Розрізали листки (*Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum*, *Convolvulus tricolor*, *Ipomoea magnusiana*, *Ipomoea tricolor* сортів Пурпурна зірка, Мілкі Вей, Скарлет приблизно на 10 частин та вміщували на чашки Петрі, також для утворення калусних культур використовували корені (*Convolvulus farinosus*, *Ipomoea tricolor* сортів Пурпурна зірка, Мілкі Вей, Скарлет) та гіпокотилі (*Convolvulus tricolor*).

2.3.4. Умови росту на середовищах з важкими металами. Після формування кореневої системи на середовищі Мурасіге-Скуга, *Ipomoea tricolor* сортів Пурпурна зірка, Мілкі Вей, Скарлет, *Convolvulus farinosus*, *Ipomoea magnusiana* пересаджували на рідкі середовища, що містять солі важких металів: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Метали мають в цих солях такі ступені окислення: Cr^{+6} , Ni^{+2} .

Кінцева концентрація іонів хрому та нікелю в середовищі була 20 мг/л. При посадці у рідке живильне середовище занурювали лише кореневу систему рослин. Контрольну групу рослин поміщали на середовище Мурасіге-Скуга, що не містить іонів важких металів. Щоб з'ясувати здатність росту досліджуваних видів рослин на середовищах, що містять іони важких

металів, зважували підземну та надземну частини після вміщення рослин на середовища з іонами важких металів.

2.3.5. Визначення вмісту важких металів у біомасі методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Атомно-абсорбційна спектроскопія дає змогу виміряти кількість атомів металу. Для цього методу використовують змінні лампи, які випромінюють певну довжину хвилі, яку поглинають відповідні метали. Атомно-абсорбційну спектроскопію проводили у Житомирському державному університеті імені Івана Франка, за допомогою кандидата хімічних наук Листвана В.В.

Перед проведенням атомно-абсорбційної спектроскопії досліджувані рослини висушували. Тверді зразки розчиняли у нітратній кислоті (HNO_3) шляхом кип'ятіння протягом 1 години. Після охолодження розчини розбавляли дистильованою водою до об'єму 25, 50 або 100 мл. Для визначення концентрації використовувався атомно-абсорбційний спектрофотометр СЕМІ С-115М. Значення довжин хвиль та інших спектрофотометричних параметрів: при визначенні хрому – 357.9 нм при ширині щілини 1 нм; полум'я: повітряно-ацетиленове, відновлювальне (збагачене, червоне), при визначенні нікелю – катодний струм: 7 мА; довжина хвилі: 232.0 нм; щілина: 0.4 нм; полум'я: повітряно-ацетиленове, окисне.

2.3.6. Статистична обробка даних. Для дослідження впливу різних концентрацій бензиламінопурину на формування одного, двох та трьох пагонів з одного вузла у *Convolvulus cneorum* та *Convolvulus farinosus* спочатку перевірили розподіли на нормальність за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Для дослідження впливу важких металів на ріст підземної та надземної частин та їх накопичення в коренях та пагонах *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка перевірили розподіли на нормальність за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Оскільки розподіли не є нормальними, встановили, чи є статистично значуща різниця між групами за допомогою критерію Краскела-Уолліса, виконали попарне порівняння груп за допомогою критерію Тьюки. Для опису даних використали медіану.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Підбір умов для мікроклонального розмноження

На першому етапі роботи досліджувані види було введено в асептичну культуру. Для цього насіння рослин стерилізували та вміщували на безгормональне середовище. Отримані таким чином проростки були асептичними і в подальшому культивувались в стерильних умовах на чашках Петрі. Отримані асептичні рослини представників родини *Convolvulaceae* зображено на рис. 3.1.



Рис. 3.1. Асептичні рослини *Convolvulus sneorum* (зліва), *Convolvulus farinosus* (справа) та *Ipomoea tricolor* сорту Мілкі Вей (внизу) на безгормональному середовищі 1/2MS₁₅.

Для швидкого та ефективного розмноження і отримання декількох пагонів з одного вузла зазвичай застосовуються фітогормони цитокініни: бензиламінопурин (ВАР), зеатин або синтетичний цитокінін тідіазурон. В нашому дослідженні використовували бензиламінопурин (ВАР). Вміщували вузли асептичних рослин *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum* на живильні середовища з різною концентрацією бензиламінопурину – 1 мг/л ВАР та 0,5 мг/л ВАР. Після періоду культивування підраховували кількість пагонів, котрі розвивались з одного вузла (табл. 3.1 для *Convolvulus sneorum* і табл. 3.2 для *Convolvulus farinosus*).

Табл. 3.1

Кількість пагонів, що утворились з одного вузла *Convolvulus sneorum* на середовищах з різною концентрацією ВАР (мг/л)

		0 ВАР			0,5 ВАР			1 ВАР		
		Кількість пагонів								
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Кількість рослин на чашку Петрі	2	10	-	-	5	2	3	4	1	
	2	5	-	2	5	2	1	3	2	
	-	3	-	2	1	-	-	3	1	
	1	3	-	4	-	-	2	2	-	
	1	3	-	-	-	-	-	4	-	
	4	-	-	-	-	-	2	1	-	
	1	3	-	-	-	-	-	-	-	
Медіана кількості пагонів	2			2			2			
Разом рослин	90									
D _{фак.}	0,32									
H _{фак.}	0,602									

Примітки:

1. рівень значущості 0,05;
2. критерій Колмогорова-Смірнова (D_{теор.}) 1,36;
3. критерій Краскела-Уолліса (H_{теор.}) 5,991.

Табл. 3.2

Кількість пагонів, що утворились з одного вузла *Convolvulus farinosus*
на середовищах з різною концентрацією ВАР (мг/л)

	0 ВАР			0,5 ВАР			1 ВАР		
	Кількість пагонів								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Кількість рослин на чашку Петрі	2	2	-	3	1	-	-	2	1
	2	4	-	3	1	1	-	4	-
	-	3	-	2	2	-	3	1	-
	-	3	-	2	2	-	-	3	1
	-	2	-	3	-	-	2	2	-
	-	-	-	2	2	-	3	2	-
	2	1	-	3	1	-	-	-	-
Медіана кількості пагонів	2			1			2		
Разом рослин	73								
D _{фак.}	0,34								
H _{фак.}	5,329								

Примітки:

1. рівень значущості 0,05;
2. критерій Колмогорова-Смірнова ($D_{\text{теор.}}$) 1,36;
3. критерій Краскела-Уолліса ($H_{\text{теор.}}$) – 5,991.

Для *Convolvulus sneorum* та *Convolvulus farinosus* перевірили розподіли на нормальність за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Табличне значення критерію Колмогорова-Смірнова для рівня значущості 0,05 – 1,36. Отримали такі значення критерію Колмогорова-Смірнова: 0,32 для *Convolvulus sneorum* та 0,34 для *Convolvulus farinosus*, що менше табличного, отже, розподіли не є нормальними.

Оскільки розподіли не є нормальними, порівнювати за середнім значенням та похибкою середнього отримані результати не можемо, тож

скористалися непараметричним аналогом дисперсійного аналізу. Для з'ясування чи існує статистично значуща різниця між групами провели статистичну обробку за допомогою критерію Краскела-Уолліса.

В результаті для *Convolvulus sneorum* отримали таке значення критерію Краскела-Уолліса: 0,602. Табличне значення критерію Краскела-Уолліса для рівня значущості 0,05 (кількість ступенів свободи: 2) – 5,991. Отже, нульову гіпотезу приймаємо, різниці між групами нема. Попарне порівняння для досліджуваних груп рослин за допомогою критерію Тьюки підтвердило, що наявність та концентрація бензиламінопурину в середовищі не впливає на формування одного, двох або трьох пагонів з одного вузла (табл. 3.3). Отримали такі значення медіани кількості пагонів для *Convolvulus sneorum*: 0 ВАР – 2, 0,5 ВАР – 2, 1 ВАР – 2. Отже, незалежно від наявності та концентрації бензиламінопурину у середовищі у більшості рослин розвивалося 2 пагони з одного вузла.

Для *Convolvulus farinosus* отримали таке значення критерію Краскела-Уолліса: 5,329. Табличне значення критерію Краскела-Уолліса для рівня значущості 0,05 (кількість ступенів свободи: 2) – 5,991. Фактичне значення менше теоретичного, отже, нульову гіпотезу приймаємо, різниці між групами нема. Попарне порівняння для досліджуваних груп рослин за допомогою критерію Тьюки підтвердило, що наявність та концентрація бензиламінопурину в живильному середовищі не впливає на формування одного, двох або трьох пагонів з одного вузла (табл. 3.4). Медіани кількості пагонів з одного вузла: 0 ВАР – 2, 0,5 ВАР – 1, 1 ВАР – 2. Отже, на середовищах з 1 мг/л ВАР та 0 ВАР у більшості рослин розвивалося 2 пагони з одного вузла, на 0,5 мг/л ВАР – 1 пагін.

Табл. 3.3

Порівняння розвитку одного, двох або трьох пагонів з одного вузла для

Convolvulus sneorum

Значення критерію Тьюки, $Q_{\text{фак.}}$	Середовища	$Q_{\text{теор.}}$ (рівень значущості 0,05)	Наявність або відсутність різниці між групами
0,918	0 ВАР і 0,5 ВАР	3,385	$Q_{\text{фак.}} < Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу приймаємо, різниці між групами немає
0,222	0,5 ВАР і 1 ВАР		
1,052	0 ВАР і 1 ВАР		

Табл. 3.4

Порівняння розвитку одного, двох або трьох пагонів з одного вузла для

Convolvulus farinosus

Значення критерію Тьюки, $Q_{\text{фак.}}$	Середовище	$Q_{\text{теор.}}$ (рівень значущості 0,05)	Наявність або відсутність різниці між групами
0,638	0 ВАР і 0,5 ВАР	3,385	$Q_{\text{фак.}} < Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу приймаємо, різниці між групами немає
0,819	0,5 ВАР і 1 ВАР		
0,075	0 ВАР і 1 ВАР		

Крім умов пагоноутворення, важливо також визначити умови коренеутворення у рослин, котрі отримуються шляхом мікроклонального розмноження. Встановлено, що майже всі експериментальні рослини були

здатні розвивати корені на безгормональному середовищі, без додаткових фітогормонів. Один з видів – *Convolvulus sneorum* – не утворював коренів в асептичних умовах (рис. 3.2). При цьому пагони розвивались без помітних проблем.



Рис. 3.2. Відмінності розвитку кореневої системи у двох видів березки – *Convolvulus farinosus* (зліва) та *Convolvulus sneorum* (справа).

Для того, щоб викликати коренеутворення у пагонів цього виду, культивували рослини на середовищі з додаванням 1 мг/л нафтилоцтової кислоти. Зазначений фітогормон належить до класу ауксинів, використовується в біотехнології рослин для індукції утворення коренів. Проте, спостереження показали, що навіть застосування цього фітогормону протягом приблизно місяця культивування не викликало появи коренів у *Convolvulus sneorum*. Причини такої поведінки пагонів наразі невідомі.

3.2. Отримання калусних культур

Калусні культури – це культури недиференційованих клітин, що являють собою неорганізовану масу. Такі культури використовують досить широко в біотехнології рослин. Наприклад, їх використовують для отримання цінних вторинних метаболітів. В роботах, що стосуються фітореMediaції отримання калусної культури є необхідним з'ясування ролі клітин кореня в накопиченні рослиною важких металів. Тому вивчення умов, в котрих калусні культури можна отримати, є важливим.

Для калусоутворення нами було використано середовище, в котре додавали 1мг/л бензиламінопурину та 1мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти. Таке середовище часто використовують для отримання калусу в інших рослин. На середовищі з 1мг/л бензиламінопурину та 1мг/л 2,4-D (дихлорфеноксиоцтової кислоти) було отримано калусні культури *Iromoea magnusiana* (рис. 3.3), *Convolvulus farinosus* (рис. 3.4), *Convolvulus speorum* (рис. 3.5). Після отримання калусних культур було виконано їх опис (табл. 3.5).

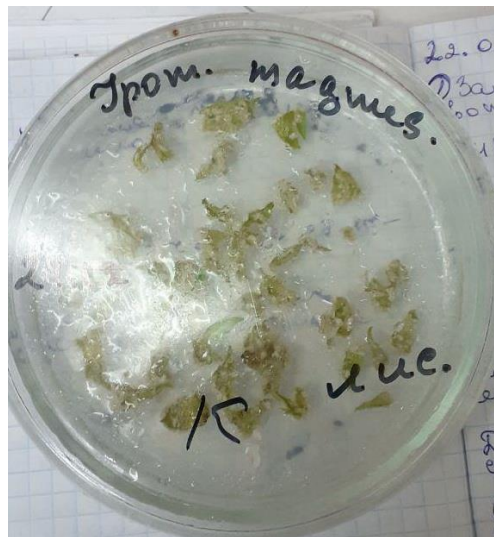


Рис. 3.3. Калусна культура *Iromoea magnusiana*, отримана за листкової пластинки.



Рис. 3.4. Калусні культури *Convolvulus farinosus* (зліва – культура, отримана з коренів, справа – з листової пластинки).



Рис. 3.5. Калусна культура *Convolvulus speorut*, отримана з листової пластинки.

Табл. 3.5

Опис отриманих калусних культур

Рослина	Орган, з якого отримано калус	Опис
<i>Ipomoea magnusiana</i>	Листкова пластинка	Світло-зелені калуси, рихлуваті, мають білі вкраплення
<i>Convolvulus farinosus</i>	Корені	Світло-бежеві, зеленого пігменту нема, рихлуваті
	Листкова пластинка	Коричневі, мають білі вкраплення, рихлуваті
<i>Convolvulus cneorum</i>	Листкова пластинка	Зеленого кольору, мають білі вкраплення, рихлуваті

Помітно, що калусні культури різних видів березки значно відрізняються між собою за зовнішнім виглядом, дещо відрізняється і калус одного й того ж виду (*Convolvulus farinosus*), котрий був отриманий з різних експлантів (листкової пластинки та коренів). На відміну від згаданих видів *Convolvulus* і виду *Ipomoea*, на середовищі, про яке йшлося вище, *Ipomoea tricolor* трьох сортів (Пурпурна зірка, Мілкі Вей, Скарлет) та *Convolvulus tricolor* не формували калуси. Тому було використано нове середовище для калусоутворення, яке містило інші фітогормони у різних концентраціях, відмінних від тих, що були використані раніше – 0,2 мг/л кінетину, 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, 1 мг/л нафтилоцтової кислоти (NAA). Проте і на цьому середовищі калусів зазначених видів отримати не вдалось.

3.3. Ріст представників родини *Convolvulaceae* на середовищах з важкими металами

Для визначення здатності рослин до фітореMediaції першим етапом має бути вивчення їх стійкості до підвищених концентрацій важких металів в середовищі. Експеримент було проведено з одним із видів родини *Convolvulaceae* – іпомеєю триколірною сорту Пурпурна зірка. Рослини *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка культивували на рідких середовищах, що містять Cr^{+6} та Ni^{2+} (рис. 3.6) у концентрації 20 мг/л протягом 8 діб.



Рис. 3.6. Розвиток рослин *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка на середовищі, що не містило іонів важких металів.

На середовища вміщували рослини приблизно однакової ваги, з достатньо розвиненою кореневою системою. Після культивування, збору та висушування рослин вимірювали масу підземної та надземної частини рослин (табл. 3.6).

Табл. 3.6

Суша вага підземної та надземної частин *Ipotomea tricolor* сорту

Пурпурна зірка після культивування на середовищах з важкими

металами, мг

	Суша вага, мг					
	Корені			Пагони		
	Контроль, n=6	Хром, n=6	Нікель, n=4	Контроль, n=6	Хром, n=6	Нікель, n=4
	4,9	2	7	6,2	11	30,5
	5,4	2,7	5,3	16,8	12,3	18,5
	3,7	2,7	10	10	27	19,9
	4,8	4,9	5,4	17,5	17,6	21,7
	6,2	5,5		24,3	12,5	
	16	8,5		9,2	18,8	
Медіана	5,15	3,8	6,2	13,4	15,05	20,08
Критерій Шاپіро-Уїлка, ($W_{\text{фак.}}$)	0,024			0,279		
Критерій Краскела- Уолліса ($H_{\text{фак.}}$)	2,828			5,077		

Примітки:

1. рівень значущості 0,05;
2. критерій Шاپіро-Уїлка ($W_{\text{теор.}}$) 0,887;
3. критерій Краскела-Уолліса ($H_{\text{теор.}}$) 5,991.

Для дослідження було взято 6 контрольних зразків, 6 зразків, що росли на середовищі з хромом та 4 – на середовищі з нікелем. За допомогою критерію Шاپіро-Уїлка з'ясували, що розподіли не є нормальними. Порівняли розподіли за критерієм Краскела-Уолліса, щоб з'ясувати чи є між

ними різниця. Для коренів *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка отримали таке значення критерію Краскела-Уолліса: 2,828. Табличне значення критерію Краскела-Уолліса для рівня значущості 0,05 (кількість ступенів свободи: 2) – 5,991. Фактичне значення менше, ніж теоретичне, отже, різниці між групами нема. Виконали попарне порівняння для досліджуваних груп рослин за допомогою критерію Тьюки і з'ясували, що різниця є між контрольною групою та рослинами, що росли на середовищі з Cr^{6+} , а також між групами, що росли на середовищах з Cr^{6+} та Ni^{2+} (табл. 3.7). Медіана маси коренів, що росли на середовищі з хромом – 3,8 мг, з нікелем – 6,2 мг, контрольних зразків – 5,15 мг.

Для пагонів *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка отримали таке значення критерію Краскела-Уолліса: 5,077. Табличне значення критерію Краскела-Уолліса для рівня значущості 0,05 (кількість ступенів свободи: 2) – 5,991. Фактичне значення менше, ніж теоретичне, отже, різниці між групами нема. Виконали попарне порівняння для досліджуваних груп рослин за допомогою критерію Тьюки і з'ясували, що різниця є між контрольною групою та рослинами, що росли на середовищі з Ni^{2+} , а також між групами, що росли на середовищах з Cr^{6+} та Ni^{2+} (табл. 3.7). Медіана маси пагонів, що росли на середовищі з хромом – 15,05 мг, з нікелем – 20,8 мг, контрольних зразків – 13,4 мг.

Табл. 3.7

Порівняння розвитку коренів та пагонів *Ipotoea tricolor* сорту
Пурпурна зірка на середовищах, що містять іони важких металів

Значення критерію Тьюки, $Q_{\text{фак.}}$	Середовище	$Q_{\text{теор.}}$ (рівень значущості 0,05)	Наявність або відсутність різниці між групами
Корені			
3,569	Контроль і Cr^{6+}	3,385	$Q_{\text{фак}} > Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу відхиляємо, різниця є
3,702	Cr^{6+} і Ni^{2+}		
0,109	Контроль і Ni^{2+}		$Q_{\text{фак}} < Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу приймаємо, різниці немає
Пагони			
2,754	Контроль і Cr^{6+}	3,385	$Q_{\text{фак}} < Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу приймаємо, різниці немає
6,649	Cr^{6+} і Ni^{2+}		$Q_{\text{фак}} > Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу відхиляємо, різниця є
7,677	Кон. і Ni^{2+}		

Отже, на середовищах, які містять хром (VI), маса коренів експериментальних рослин дещо менша, ніж маса коренів у контрольних, маса пагонів більша. У рослин, що культивували на середовищах, які містили нікель (II), маса коренів дещо більша, ніж у контрольних зразків, як і маса пагонів. Маса коренів та пагонів у рослин, що росли на середовищі з нікелем більша, ніж у рослин на середовищі з хромом.

Зовнішній вигляд рослин іпомеї після 8-денного культивування на середовищах з додаванням солей хрому і нікелю, не відрізнявся від такого у контрольних рослин. Отже, солі нікелю і хрому у концентрації 20 мг/л при невеликому терміні культивування негативно не впливають на ріст та розвиток підземної та надземної частин іпомеї триколірної сорту Пурпурна зірка.

3.4. Накопичення важких металів представниками родини *Convolvulaceae*

Для визначення вмісту важких металів у підземній та надземній частинах представників родини *Convolvulaceae* рослини *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка культивували на рідких середовищах, що містять Cr^{6+} та Ni^{2+} у концентрації 20 мг/л протягом 8 діб. Для висушених зразків було проведено атомно-абсорбційну спектроскопію (табл. 3.8).

Табл. 3.8

Вміст Ni^{2+} та Cr^{6+} в підземній та надземній частинах *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка, мкг

	Суха вага, мкг					
	Корені			Пагони		
	Контроль, n = 6	Хром, n = 6	Нікель, n = 4	Контроль, n = 6	Хром, n = 6	Нікель, n = 4
	0	20,4	10,64	0	7,5	36,5
	0	23,8	8,89	0	22,7	12,3
	0	10,5	15,26	0	74,6	22,7
	0	26,6	3,75	0	16,9	21,2
	0	13,16		0	33,3	
	0	23,3		0	34,1	
Медіана	0	21,85	9,77	0	28	21,95
$W_{\text{фак.}}$	0,179			0,236		
$H_{\text{фак.}}$	12,077			10,629		

Примітки:

1. рівень значущості 0,05;
2. критерій Шапіро-Уїлка, ($W_{\text{теор.}}$) 0,887;
3. критерій Краскела-Уолліса ($H_{\text{теор.}}$) 5,991.

За допомогою критерію Шапіро-Уїлка з'ясували, що розподіли не є

нормальними. Порівняли розподіли за критерієм Краскела-Уолліса, щоб з'ясувати чи є різниця між досліджуваними групами рослин. Для рослин *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка, які накопичували хром та нікель в коренях отримали таке значення критерію Краскела-Уолліса: 12,077. Табличне значення критерію Краскела-Уолліса для рівня значущості 0,05 (кількість ступенів свободи: 2) – 5,991. Фактичне значення більше, ніж теоретичне, отже, різниця між групами є. Попарне порівняння для досліджуваних груп рослин за допомогою критерію Тьюки підтвердило наявність різниці між групами (табл. 3.9). Медіана вмісту хрому в коренях – 21,85 мкг, нікелю – 9,77 мкг, контрольних зразків – 0.

Для рослин *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка, які накопичували хром та нікель в пагонах отримали таке значення критерію Краскела-Уолліса: 10,629. Табличне значення критерію Краскела-Уолліса для рівня значущості 0,05 (кількість ступенів свободи: 2) – 5,991. Фактичне значення більше, ніж теоретичне – різниця між групами є. Попарне порівняння для досліджуваних груп рослин за допомогою критерію Тьюки підтвердило наявність різниці між групами (табл. 3.9). Медіана вмісту хрому в пагонах – 28 мкг, нікелю – 21,95 мкг, контрольних зразків – 0.

Табл. 3.9

Порівняння накопичення металів рослинами *Ipotoea tricolor* сорту
Пурпурна зірка

Значення критерію Тьюки, $Q_{\text{фак.}}$	Середовище	$Q_{\text{теор.}}$ (рівень значущості 0,05)	Наявність або відсутність різниці між групами
Корені			
13,833	Контроль і Cr^{6+}	3,385	$Q_{\text{фак}} > Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу відхиляємо, різниця є
7,043	Cr^{6+} і Ni^{2+}		
5,545	Контроль і Ni^{2+}		
Пагони			
23,679	Контроль і Cr^{6+}	3,385	$Q_{\text{фак}} > Q_{\text{табл.}}$ – нульову гіпотезу відхиляємо, різниця є
6,267	Cr^{6+} і Ni^{2+}		
14,217	Кон. і Ni^{2+}		

З отриманих статистичних даних видно, що в більших кількостях *Ipotoea tricolor* сорту Пурпурна зірка накопичують хром, ніж нікель. Гіперакумуляторами вважаються рослини, котрі накопичують певні рівні важких металів в їх листках. Для іонів хрому таким рівнем вважається 300 мкг/г сухої ваги, для нікелю – 1000 мкг/г [4, 54]. Ми отримали значення накопичення хрому: в коренях – 4658,730 мкг/г сухої тканини, в пагонах – 1829,679 мкг/г сухої тканини. Вміст нікелю становив: в коренях – 1523 мкг/г сухої тканини, в пагонах – 1058,831 мкг/г сухої тканини. Іпомею триколірну сорту Пурпурна зірка можна вважати гіперакумулятором хрому та нікелю.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень було досліджено здатність *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка накопичувати важкі метали в підземній та надземній частинах рослини, отримали: асептичні культури *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum*, *Ipomoea magnusiana* та *Ipomoea tricolor* сортів Пурпурна зірка, Мілкі Вей та Скарлет за допомогою попередньої поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів рослин; калусні культури *Ipomoea magnusiana*, *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum* та виконали їх опис.

В науковій літературі є повідомлення про отримання калусних культур для інших, ніж у нас, видів іпомеї. Можна порівняти фітогормональний склад середовищ, котрі використовувались для цього. Наприклад, отримували калуси *Ipomoea aquatica* на середовищі Мурасіге-Скуга з різними концентраціями та комбінаціями ауксинів: від 0,5 до 2,5 мг/л 2,4-D (дихлорфеноксиоцтової кислоти), 0,5-2,5 мг/л індол-3-оцтової кислоти, від 1 до 2,5 мг/л нафтилоцтової кислоти, 0,5-2,5 мг/л індол-3-масляної кислоти, від 0,5 до 2,5 мг/л цитокініну кінетину. Більша частина експлантів у цьому дослідженні (80%) активно утворювала калуси на середовищах з вмістом 1,5 мг/л нафтилоцтової кислоти і 0,5 мг/л кінетину. Калуси були коричневі і рихлуваті [70].

В іншому дослідженні отримували калусні культури *Ipomoea obscura*. Середовище Мурасіге-Скуга містило різні комбінації ауксинів (2,4-D – дихлорфеноксиоцтову кислоту, нафтилоцтову кислоту) з цитокінінами (кінетин, бензиламінопурин) в різних концентраціях. Активне утворення калусів було на середовищі, яке містило 0,8 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти і 0,8 мг/л кінетину, що подібно до середовища, використаного нами. В результаті були отримані білі калуси. На середовищі з нафтилоцтовою кислотою та 0,2 мг/л бензиламінопурину формувалися зелені рихлуваті калуси [71]. Калуси *Ipomoea cairica* вирощували на середовищі з додаванням

5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти та 0,1 мг/л бензиламінопурину [72].

У нашому дослідженні ми отримали калусні культури *Convolvulus farinosus* (рис. 3.4), *Convolvulus cneorum* (рис. 3.5), на середовищі MS, що містило 1мг/л бензиламінопурину та 1мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти. Інші автори також отримували калуси березок, проте інших, ніж використовуваних нами, видів. Подані у літературі комбінації та концентрації використовуваних фітогормонів помітно відрізнялись від наших. Так, калуси *Convolvulus alsinoides* отримували на середовищі MS з додаванням від 0,5 до 3,0 мг/л індол-3-оцтової кислоти, 0,5-3,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, 0,5-3,0 мг/л бензиламінопурину, 0,5-3 мг/л кінетину окремо або в комбінаціях. Калуси були коричневато-білими та рихлуватими [73]. Калусні культури *Convolvulus persicus* отримували на середовищі, яке містило 2,5 мг/л бензиламінопурину, 0,5 мг /л кінетину і 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти [74].

Відомо, що й інший вид іпомеї здатен накопичувати іони хрому (VI) в значних кількостях. Так, поглинання Cr^{6+} рослинами *Ipomoea carnea* досить значне – максимальний вміст Cr становить 13,6 мг/г сухої тканини при рН 5 [67]. Це значно більше за наш показник (4,658 мг/г сухої тканини для коренів та 1,829 мг/г сухої тканини для пагонів), проте і в нашому випадку кількість поглинутого хрому перевищує ліміт, встановлений для визнання рослини гіперакумулятором.

Відомо також про накопичення іонів хрому іпомеєю водяною. Рослини *Ipomoea aquatica* накопичують в середньому такі кількості Cr^{6+} : в коренях – 513 мг/кг сухої тканини, в пагонах – 33 мг/кг сухої тканини [5]. Це значно нижчий показник, ніж отриманий нами для іпомеї триколірної.

Інші види рослин родини *Convolvulaceae* також можуть накопичувати значні кількості важких металів. Для порівняння – *Convolvulus arvensis* накопичують більше 30000 мг Cr^{6+} та 3000 мг Cd^{2+} або Cu^{2+} в коренях на 1 кг сухої маси рослин (30 мг/г Cr^{6+} та 3мг/г Cd^{2+} або Cu^{2+}). Здатність *Convolvulus arvensis* концентрувати хром в коренях порівняно з іншими

видами рослин надзвичайна. Отже, *Convolvulus arvensis* можна вважати гіперакумулятором хрому [4].

Концентрація хрому в пагонах рослин, які зазнали впливу Cr^{3+} , становила приблизно 1500 мг/кг (1,5 мг/г) сухої маси, а концентрація Cr в пагонах рослин, які зазнали впливу Cr^{6+} , становила приблизно 2000 мг/кг (2мг/г) сухої маси. Транслокація у рослин, які зазнали впливу Cr^{6+} , становить 29% від коренів до стебел і 4,1% від стебел до листя. Дослідження показали, що Cr^{3+} накопичується в коренях, уникаючи транслокації [67].

Отже, *Iromoea tricolor* сорту Пурпурна зірка можна вважати гіперакумулятором Cr^{6+} .

ВИСНОВКИ

1. Отримано асептичні культури *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum*, *Ipomoea magnusiana* та *Ipomoea tricolor* сортів Пурпурна зірка, Мілкі Вей та Скарлет за допомогою попередньої поверхневої стерилізації насіння досліджуваних видів рослин.
2. Використання бензиламінопурина (1 мг/л ВАР та 0,5 мг/л ВАР) не впливає на ефективність мікроклонального розмноження у *Convolvulus farinosus*, *Convolvulus sneorum*.
3. Солі нікелю і хрому у концентрації 20 мг/л при недовготривалому терміні культивування негативно не впливають на ріст рослин іпомеї триколірної сорту Пурпурна зірка.
4. Рослини *Ipomoea tricolor* сорту Пурпурна зірка можна використовувати як гіперакумулятори, оскільки накопичують хрому в коренях – 4658,730 мкг/г, в пагонах – 1829,679 мкг/г, нікелю в коренях – 1523 мкг/г, в пагонах – 1058,831 мкг/г, що є більше встановлених 300 мкг/г для хрому та 1000 мкг/г для нікелю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sarwar N, Imran M, Shahee MR, Ishaq W, Kamran A, Matloob A, et al. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. Elsevier Ltd. 2016: 1-12.
2. Ali H, Khan E, and Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. Chemosphere. 2013; 91: 869–881.
3. Valizadeh R, and Mahdavian L. Phytoremediation and Absorption Isotherms of Heavy Metal Ions by *Convolvulus Tricolor* (CTC). Ludus vitalis. 2015; 11(1): 15-20.
4. Gardea-Torresdey JL, Peralta-Videa JR, Montes M, and De la Rosa G. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. Bioresource Technology. 2004; 92: 229–235.
5. Ton SS, Lee MW, Yang YH, Hoi SK, Cheng WC, Kai-Sung et al. Effects of Reductants on Phytoextraction of Chromium (VI) by *Ipomoea aquatica*. International Journal of Phytoremediation. 2015; 17: 429–436.
6. Schachtman DP, Shin R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. Annu. Rev. Plant Biol. 2007; 58:47–69.
7. Lo'pez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, and Herrera-Estrella L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. Curr. Opin. Plant Biol. 2003; 6:280–287.
8. De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH, and Zhang H. An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. Plant J. 2003; 33:543–555.
9. Shao HB, Chu LY, Lu ZH, and Kang CM. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. Int. J. Biol. Sci. 2007; 4:8–14.
10. Ma Z, Baskin TI, Brown KM, and Lynch JP. Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness.

Plant Physiol. 2003; 131:1381–1390.

11. Osugi A, and Sakakibara H. How do plants respond to cytokinins and what is their importance? BMC Biology. 2015; 13(102): 1-10.

12. Walch-Liu P, Ivanov II, Filleur S, Gan Y, Remans T, and Forde BG. Nitrogen regulation of root branching. Ann. Bot. (Lond.). 2006; 97: 875–881.

13. Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, and Saito K. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-l-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. Plant J. 2003; 33:651–663.

14. He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, and Gan S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. Plant Physiol. 2002; 128:876–884.

15. Haubrick LL, and Assmann SM. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. Plant Cell Environ. 2006; 29: 446–457.

16. Tchounwou PB., Yedjou CG, Patlolla AK, and Sutton DJ. Heavy Metals Toxicity and the Environment. In Molecular, Clinical and Environmental Toxicity. 2012; 101: 133–164.

17. Rai S, Gupta S, and Mittal PC. Dietary Intakes and Health Risk of Toxic and Essential Heavy Metals through the Food Chain in Agricultural, Industrial, and Coal Mining Areas of Northern India. Hum. Ecol. Risk Assess. 2015; 21: 913–933.

18. González-Guerrero M, Escudero V, Saéz A, and Tejada-Jiménez M. Transition Metal Transport in Plants and Associated Endosymbionts: Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia. Front. Plant Sci. 2016.

19. Mizuno T, Usui K, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, and Obata H. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. Plant Physiol. Biochem. 2005; 43, 793–801.

20. Antala S, Ovchinnikov S, Kamisetty H, Baker D, and Dempski RE. Computation and functional studies provide a model for the structure of the zinc

transporter hZIP4. *J.Biol.Chem.* 2015; 290: 17796–17805.

21. Lin YF, Liang HM, Yang SY, Boch A, Clemens S, Chen CC, et al. *Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytol.* 2009; 182: 392–404.

22. Zhang T, Liu J, Fellner M, Zhang C, Sui D, and Hu J. Crystal structures of a ZIP zinc transporter reveal a binuclear metal center in the transport pathway. *Science Advances.* 2017; 3(8).

23. Sinani D, Adle DJ, Kim H, and Lee J. Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *J.Biol.Chem.* 2007; 282: 26775–26785.

24. Nevo Y, and Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1763: 609–620.

25. Puig S. Function and Regulation of the Plant COPT Family of High-Affinity Copper Transport Proteins. *Advances in Botany.* 2014; 1 – 9.

26. Aaron TB, Lukas BB, Wilhelm AW, Singharoy A, Eduardo RG, Hidde LP et al. Crystal Structure and Conformational Change Mechanism of a Bacterial Nramp-Family Divalent Metal Transporter. *Science Direct.* 2016; 24(12): 2102-2114.

27. Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le JM, et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* 2008; 103: 1–11.

28. Conte SS, and Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol. Plant.* 2011; 4: 464–476.

29. Siu-Lun L, Cheung, Daniel J, Shea NN, Date A, Ostermeier M, and Konstantopoulos K. Characterization of Monobody Scaffold Interactions with Ligand via Force Spectroscopy and Steered Molecular Dynamics. *Scientific Reports.* 2015; 5(8247).

30. Tejada-Jiménez M, Galván A, and Fernández E. Algae and humans share a molybdate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 6420–6425.

31. Butryn A, Woike S, Shetty S, Auble D, and Hopfner KP. Crystal

structure of the full Swi2/Snf2 remodeler Mot1 in the resting state. Structural biology and molecular biophysics. 2018.

32. Argüello JM, Eren E, and González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P-1B-ATPases. *Biometals*. 2007; 20: 233–248.

33. Novoa-Aponte L, and Carlos YS. *Mycobacterium tuberculosis* P-Type ATPases: Possible Targets for Drug or Vaccine Development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2014: 1 – 9.

34. Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, and Soulimane T. Cation diffusion facilitator family: structure and function. *FEBS Lett*. 2015; 589: 1283–1295.

35. Maret W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem*. 2011; 16: 1079–1086.

36. Garg SK, Tripathi M, and Srinath T. Strategies for chromium bioremediation from tannery effluent. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2012; 217: 75- 140.

37. Tripathi M, Sudhir K, Upadhyay KM, and Kaur K. Toxicity Concerns of Hexavalent Chromium from Tannery Waste. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 2018; 2(2): 40-44.

38. Ali S, Zeng F, Qiu L, and Zhang G. The effect of chromium and aluminum on growth, root morphology, photosynthetic parameters and transpiration of the two barley cultivars. *Biol. Plant*. 2011; 55: 291–296.

39. Chidambaram A, Sundaramoorthy P, Murugan A, Sankar K, and Ganesh L. Chromium induced cytotoxicity in blackgram (*Vigna mungo L.*). *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng*. 2009; 6: 17–22.

40. Choudhury S, and Panda SK. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, air, Soil Pollut*. 2005; 167: 73–90.

41. Cervantes C, Campos-Garica J, Gutierrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzman JC, and Moreno-Sanchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*. 2001; 25: 335-347.

42. Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, and Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 2005; 31: 739–753.
43. Hayat S, Khalique G, Wani AS, and Irfan M. Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma.* 2012; 249: 599–611.
44. Gomes MA, Hauser-Davis RA, Suzukia MS, and Vitóriaa AP. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2017; 140: 55 – 64.
45. Singh HP, Mahajan P, Kaur S, and Batish D. Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environ. Chem. Lett.* 2013; 11; 229–254.
46. Oliveira H. Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. *J. Bot.* 2012: 1–8.
47. Barros MASD, Zola AS, Arroyo PA, Tavares CRG, and Sousa-Aguiar EF. Chromium uptake from tricomponent solution in zeolite fixed bed. *Adsorption.* 2006; 12: 239–248.
48. Rathor G, Chopra N, and Adhikari T. Nickel as a Pollutant and its Management. *International Research Journal of Environment Sciences.* 2014; 3(10): 94-98.
49. Seregin IV, and Kozhevnikova AD. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol.* 2006; 53:257–277.
50. Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat, S. and Ahmad A. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 2010; 86(1): 1–17.
51. Chen C., Huang D. and Liu J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean* 2009; 37:304–313.
52. Baccouch S., Chaoui A. and El Ferjani E. Nickel toxicity induces oxidative damage in Zea mays roots. *J Plant Nutr.* 2001; 24:1085–1097.
53. Schmoger ME, Oven M, and Grill E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology.* 2000; 122: 793–801.

54. Ghosh M, and Singh SP. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. Asian J. Energy Environ. 2005; 6: 214 – 231.
55. Saifullah Meers E, Qadir M, De–Caritat P, Tack FMG, Laing GD, and Zia MH. EDTA-assisted Pb Phytoextraction. Chemosphere. 2009; 74: 1279 – 1291.
56. Sheng XF, and Xia JJ. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium–resistant bacteria. Chemosphere. 2006; 64: 1036–1042.
57. Seth CS. A review on mechanisms of plant tolerance and role of transgenic plants in environmental clean–up. Bot. Rev. 2012; 78: 32–62.
58. Thorpe T. History of plant tissue culture. J. Mol. Microbial Biotechnol. 2007; 37: 169-180.
59. Hussain A, Ahmed I, Nazir H, and Ullah I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Recent Advances in Plant in vitro Culture. 2012.
60. Rout GR. Effect of cytokinins and auxin on micropropagation of *Clitoria ternatea* L. Biol. Lett. 2004; 41(1): 21-26.
61. Chattopadhyay S, Farkya S, Srivastava AK, and Bisaria VS. Bioprocess Considerations for Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Suspension Cultures. Biotechnol. Bioprocess Eng. 2007; 7: 138-149.
62. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. J. Med. Plant Res. 2009; 3(13): 1222- 1239.
63. Kalsang T, Bhutia WL, Lotha HG, Petruzzello M, and Tikkanen A. Encyclopaedia Britannica. 2019.
64. John RI, Bethany RM, Thomas C, Mitchell MA, David J, Harris, and Robert W. Scotland. A foundation monograph of *Convolvulus* L. (*Convolvulaceae*). PhytoKeys. 2015; (51): 1–282.
65. Ferreira PA, Simão-Bianchini R, and Miotto TS. Three new species of *Convolvulaceae* Juss. from South America. Phytotaxa. 2013; 135(1): 27–34.

66. Chauhan Y, Hosch W, and Petruzzello M. Encyclopaedia Britannica. 2019.
67. Krishnaveni S, and Thirumurugan V. A Study on Removal of Heavy Metal Chromium from Aqueous Chromium Solution Using *Ipomoea carnea* Root as Biosorbent. Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2019; 9(4-A): 409-414.
68. Mohd Hanafiah M, Zainuddin MF, Umairah N, Nizam M, Abdul A, and Rasool A. Phytoremediation of Aluminum and Iron from Industrial Wastewater Using *Ipomoea aquatica* and *Centella asiatica*. Appl. Sci. 2020; 10: 3064.
69. Wang KS, Huang LC, Lee HS, Chen PY, and Chang SH. Phytoextraction of cadmium by *Ipomoea aquatica* (water spinach) in hydroponic solution: Effects of cadmium speciation. Chemosphere. 2008; 72: 666–672.
70. Nagendra Prasad K, Siva Prasad M, Shivamurthy GR, and Aradhya SM. Callus induction from *Ipomoea aquatica* Forsk. leaf and its antioxidant activity. Indian Journal of Biotechnology. 2006; 15: 107-111.
71. Mungole A, Awati R, Dey S, Chaturvedi A, and Zanwar P. *In vitro* callus induction and shoot regeneration in *Ipomoea obscura* (L.): potent Indian medicinal plant. Indian Journal of Science and Technology. 2009; 2(8).
72. Paskaa C, Innocenti G, Kunvari M, Laszlo M, and Szilagy L. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. Phytochemistry. 1999; 52: 879-883.
73. Kaladhar DSVGK. An *in vitro* callus induction and isolation, identification, virtual screening and docking of drug from *Convolvulus alsinoides* L. against aging diseases. Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. 2012; 1(3).
74. Holobiuc I, Voichita C, and Catana R. *In vitro* conservation of the critically endangered taxon *Convolvulus persicus* L. and regenerants evaluation. Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. 2015; 31(2).