

УДК [582.542.11+57.086.83]:[546.48+575.224]

ПІДВИЩЕНА СТІЙКІСТЬ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. ДО МУТАГЕННОЇ ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ

К.В. СПІРІДОНОВА¹, І.О. АНДРЕЄВ¹, О.М. ЗАГРИЧУК², Н.М. ДРОБИК², В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
 Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
 e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
 Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2
 e-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

Мета. Вивчення мутагенної дії різних концентрацій іонів кадмію на антарктичну рослину *D. antarctica* із застосуванням ПЛР-аналізу. **Методи.** Рослини культивували *in vitro* на агаризованому живильному середовищі Гамборга-Евелей (B5) з додаванням CdCl₂. Генетичні зміни досліджували з використанням ПЛР-аналізу з ISSR- та IRAP-праймерами. **Результати.** Мутагенну дію іонів кадмію на *D. antarctica* вивчали із використанням генетично ідентичних рослин, отриманих мікроклональним розмноженням *in vitro*. Досліджували вплив Cd²⁺ у діапазоні концентрацій 0,1–10 мМ. За результатами культивування *D. antarctica* у присутності іонів кадмію впродовж 63 діб було визначено діапазон концентрацій, за яких продовжується ріст рослин *in vitro*, – до 1 мМ. Встановлено також, що концентрації 0,1 та 0,2 мМ не викликають змін спектрів ПЛР-продуктів. За культивування рослин впродовж 17 діб з 0,2–1 мМ CdCl₂ зміни в спектрах ПЛР-продуктів, що свідчать про мутагенний вплив, спостерігали при концентраціях 0,6 мМ і вище; кількість змін зростала залежно від концентрації важкого металу. Після довготривалої (140–265 діб) дії іонів кадмію в порівняно невисоких концентраціях 0,1 мМ та 0,4 мМ змін геному не виявлено. **Висновки.** Рослина-екстремофіл *D. antarctica*, у якій внаслідок адаптації до існування в жорстких умовах Прибережної Антарктики сформувалися механізми стійкості до різноманітних стресових впливів, характеризується підвищеною стійкістю до іонів кадмію порівняно із іншими видами судинних рослин. Пригнічення росту відбувається при концентраціях Cd²⁺ від 0,1 мМ і вище, а припинення росту та загибель рослин – за концентрацій 1 мМ і вище. Мутагенний вплив на *D. antarctica* виявлено при концентраціях Cd²⁺ вище 0,4 мМ. За тривалого вирощування рослини (впродовж 3–8 місяців) в присутності 0,1–0,4 мМ іонів кадмію генетичних змін не знайдено.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), мікроклонально розмножені рослини *in vitro*, іони кадмію, мутагенний ефект, ПЛР-аналіз.

Вступ. Дослідження стійкості рослин до абіотичних стресових чинників і потенційних наслідків їхніх впливів є важливою науковою проблемою, яка, окрім суто академічного інтересу, має безпосереднє відношення до вирішення як практичних завдань у галузі сільськогосподарського виробництва, так і складних питань прогнозування стану екологічних систем в умовах зростання антропогенного навантаження та значних кліматичних змін, що спостерігаються впродовж останніх десятиліть. Одним із перспективних модельних об'єктів для таких досліджень є злак *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) – один із двох видів судинних рослин, поширених в Антарктиці, регіоні з особливо суворими умовами довкілля [1, 2]. Влітку температура повітря в Прибережній Антарктиці лише зрідка піднімається вище +5 °C [3, 4], через тонкий озоновий шар тут підвищений рівень ультрафіолетового опромінення. Рослини *D. antarctica* в цих екстремальних умовах не лише вегетують, але й здатні за сприятливих умов до статевого розмноження [5].

Одним з важливих аспектів стійкості рослин до абіотичних стресових чинників є стійкість до важких металів (ВМ), формування якої в процесі еволюції дозволило окремим групам

© К.В. СПІРІДОНОВА, І.О. АНДРЕЄВ, О.М. ЗАГРИЧУК, Н.М. ДРОБИК, В.А. КУНАХ, 2016

рослин колонізувати території, ґрунти яких містять підвищені концентрації важких металів. Серед ВМ особливо токсичним є кадмій, якому внаслідок високої розчинності у воді притаманні високі темпи нагромадження в біосфері; він не належить до необхідних для рослин елементів, однак інтенсивно поглинається як кореневою системою, так і листками рослин. При низьких концентраціях кадмій не токсичний для рослин. Підвищений вміст кадмію позначається на фенотипі рослин у вигляді хлорозу листків, червоно-бурому кольорі їхніх країв і прожилків, затримки росту і пошкодження кореневої системи. Гранично допустима концентрація кадмію у ґрунті становить 3 мг/кг [6]. Відносно впливу кадмію на генетичний апарат відомо, що він викликає зменшення мітотичного індексу, а також індукує хромосомні аберації, утворення мікроядер у клітинах коренів рослин [7, 8]. У деяких публікаціях повідомляється про пошкодження ядерцевих структур, ДНК і РНК тваринних та рослинних клітин за присутності кадмію [7–9]. Механізми мутагенного впливу кадмію вивчено недостатньо.

Здатність *D. antarctica* до виживання в жорстких умовах довкілля дозволяє припускати існування у цього виду підвищеної стійкості до різноманітних стресових чинників, а також генетичну обумовленість такої адаптивності. Водночас, дослідження стійкості цієї рослини до впливу важких металів і, зокрема кадмію, та її генетичної реакції практично не проводилися.

Метою роботи було вивчення особливостей мутагенного впливу іонів кадмію на антарктичний злак *D. antarctica* із застосуванням ПЛР-аналізу. Зокрема, було досліджено вплив різних концентрацій та тривалості культивування на рівень генетичної мінливості у генетично однорідних рос-

лин, отриманих мікроклональним розмноженням і культивованих *in vitro*.

Матеріали і методи

У роботі використано рослини *D. antarctica*, отримані із насіння, зібраного в 2008 р. в Антарктиці в районі розташування Української антарктичної станції «Академік Вернадський». Отримання асептичних рослин та умови їх культивування детально описано в [10, 11]. Рослини культивували на агаризованому живильному середовищі Гамборга-Евелей (В5) з вмістом CdCl_2 у межах 0,1–10 мМ, що в перерахунку становить 11,2 мг/л – 1,12 г/л. Контрольні рослини вирощували на середовищі В5.

ДНК виділяли із матеріалу, висушеного при температурі 37 °С, за використання цетавлону (СТАВ) як описано в [12].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в суміші об'ємом 20 мкл, яка містила: 30 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Taq-полімерази (Амплі-сенс, Росія), $1 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ буфер (Fermentas, Литва), 1 мкМ праймера. Було застосовано один IRAP-та 7 ISSR-праймерів, нуклеотидні послідовності яких наведено в табл. 1. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії для запобігання випаровуванню. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія) за наступного температурного режиму: 94 °С – 2 хв., 35 × (94 °С – 20 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 90 с), 72 °С – 5 хв.

Фракціонування продуктів ПЛР електрофорезом проводили в 1,5 % агарозному гелі в 1×SB буфері (5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, рН 8.5) з наступною візуалізацією в УФ-світлі після забарвлення бромистим етидієм. Як маркер молекулярних мас використо-

Таблиця 1. Характеристика праймерів та їх продуктів

з/п	Тип праймера	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність	Кількість ПЛР-продуктів
1	ISSR	UBC#03	(AC) ₈ TT	11
2	– " –	UBC#04	(AC) ₈ AG	12
3	– " –	UBC#807	(AG) ₈ T	16
4	– " –	UBC#811	(GA) ₈ C	19
5	– " –	UBC#836	AG) ₈ YA	16
6	– " –	UBC#840	(GA) ₈ YT	15
7	– " –	UBC#844b	(CT) ₈ GC	11
8	IRAP	1681	ATACCTGGAGGCTGCACCTG	11

ували 100bp+1.5Kb+3Kb ДНК маркер (Fermentas, Литва).

Кожну реакцію проводили у двох повторях, враховували лише чіткі і відтворювані амплікони. Результати представляли у вигляді бінарних матриць, у яких наявність або відсутність у спектрі ампліфікації однакових за розміром фрагментів позначали відповідно як стан «1» або «0». Розрахунок генетичних відстаней за Жакардом проводили за використання програми FAMD 1.3 [13].

Результати

Мутагенний вплив іонів кадмію на *D. antarctica* вивчали із використанням генетично ідентичних рослин, отриманих мікротональним розмноженням *in vitro*. Для дослідження було обрано концентрації CdCl₂ у середовищі в діапазоні 0,1–10 мМ. Було також вивчено вплив токсиканта на рівень генетичних перебудов за різної тривалості культивування рослин. Мутагенний вплив оцінювали шляхом порівняння спектрів ПЛР-продуктів, отриманих з ДНК рослин, що росли у присутності Cd²⁺, та контрольних рослин, які вирощували на тому ж середовищі без іонів кадмію. Для кількісного вираження відмінностей у спектрах розраховували ге-

нетичні відстані за Жакардом. Було проведено три варіанти дослідів, які відрізнялися за використаними концентраціями кадмію та тривалістю культивування рослин (табл. 2).

У першому варіанті дослідів, спрямованому на визначення граничних концентрацій іонів кадмію, що призводять до зупинки росту та наступної загибелі рослин, *D. antarctica* вирощували за широкого спектра концентрацій CdCl₂ від 0,1 мМ до 10 мМ впродовж 63 діб. Уже при концентрації 0,1 мМ спостерігали зниження швидкості росту. Рослини, культивовані з 0,1–0,2 мМ CdCl₂ (що становить 11,2–22,4 мг/л Cd²⁺) впродовж 2-х місяців, не відрізнялися за морфологічними ознаками від контрольних. У присутності 2 мМ (224 мг/л Cd²⁺) або вищих концентрацій CdCl₂ спостерігали значне сповільнення росту. На середовищі з 5 і 10 мМ CdCl₂ не спостерігали ознак росту рослин, з часом вони втрачали хлорофіл і, очевидно, гинули, муміфікуючись у стерильних умовах, оскільки ДНК із них виділити не вдалося. Із решти рослин було виділено ДНК і використано її для аналізу генетичної мінливості методом ПЛР.

Для ПЛР-аналізу використали сім ISSR та один IRAP праймери (табл. 1), які були підібрані ра-

Таблиця 2. Умови вирощування *D. antarctica* в присутності CdCl₂ у різних варіантах дослідів

з/п	Варіант дослідів	Концентрація CdCl ₂ у живильному середовищі, мМ	Тривалість культивування, діб	
			з CdCl ₂	без CdCl ₂
1	I	0,1	63	–
2		0,2	63	–
3		1	63	–
4		1,5	63	–
5		2	63	–
6		5	63	–
7		10	63	–
8		контроль	–	63
9	II	0,2	17	17
10		0,4	17	17
11		0,6	17	17
12		0,8	17	17
13		1	17	17
14		контроль	–	34
15	III	0,1	265	–
16		0,1	165	100
17		0,4	140	–
18		0,4	96	44
19		контроль	–	265

ніше для популяційно-генетичних досліджень *D. antarctica* з Прибережної Антарктики та характеризувалися достатньо високим рівнем поліморфізму спектрів ПЛР-продуктів. Обрані праймери в ПЛР з ДНК використаних для дослідження рослин утворювали 100 ампліконів в діапазоні довжин від 260 до 3000 п.н.

У рослин, які піддавали токсичному впливу іонів кадмію впродовж 63 діб, було виявлено зміни ПЛР-спектрів усіх використаних праймерів. Вони проявлялись як у зникненні окремих ампліконів, так і у появі нових, а також у зміні їх копійності. У рослин, культивованих при 0,1 або 0,2 мМ CdCl₂, відмінностей у спектрах ПЛР-продуктів від контрольних рослин не спостерігали. При концентрації 1 мМ рівень відмінностей від контрольних рослин становив 15,9 %. Водночас у зразках, які культивували у присутності CdCl₂ в концентраціях вище 1 мМ, спостерігали зменшення інтенсивності спектра ПЛР-продуктів із втратою фрагментів переважно у зоні 700–2000 п.н. (рис. 1). Враховуючи цей факт та неоднозначність можливої інтерпретації таких змін у спектрах ПЛР-продуктів, ми не розглядали їх в подальшому аналізі. За результатами цього експерименту було визначено діапазон концентрацій кадмію, за яких продовжується ріст рослин

in vitro, – до 1 мМ CdCl₂. Ці концентрації було використано в наступних дослідках.

У другому варіанті дослідження для вивчення гострої дії іонів кадмію на генетичний апарат *D. antarctica* рослини культивували 17 діб у присутності хлориду кадмію в діапазоні концентрацій 0,2–1 мМ, після чого переносили на середовище без CdCl₂ і продовжували культивувати ще впродовж 17-ти діб. Така схема експерименту тут і в наступному варіанті дослідження була обрана, виходячи з того, що кадмій пригнічує ростові процеси. Ми припустили, що перенесення рослин після певного періоду впливу токсиканта у контрольні умови для відновлення фізіологічних процесів і більш інтенсивного приросту біомаси має сприяти виявленню мутацій, спричинених генотоксичною дією кадмію.

Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів спостерігали для трьох праймерів: UBC#03, UBC#811, UBC#840. Зміни в спектрах були виявлені лише за культивування рослин у присутності Cd²⁺ в концентраціях вище 0,4 мМ. Вони проявлялися у вигляді зміни копійності фрагментів та у появі нових (додаткових) фрагментів (рис. 2). Так, в одному випадку додаткові фрагменти було виявлено у рослині, культивованій на середовищі із 0,6 мМ (праймер UBC#03), в іншому – із 1 мМ Cd²⁺ (праймери

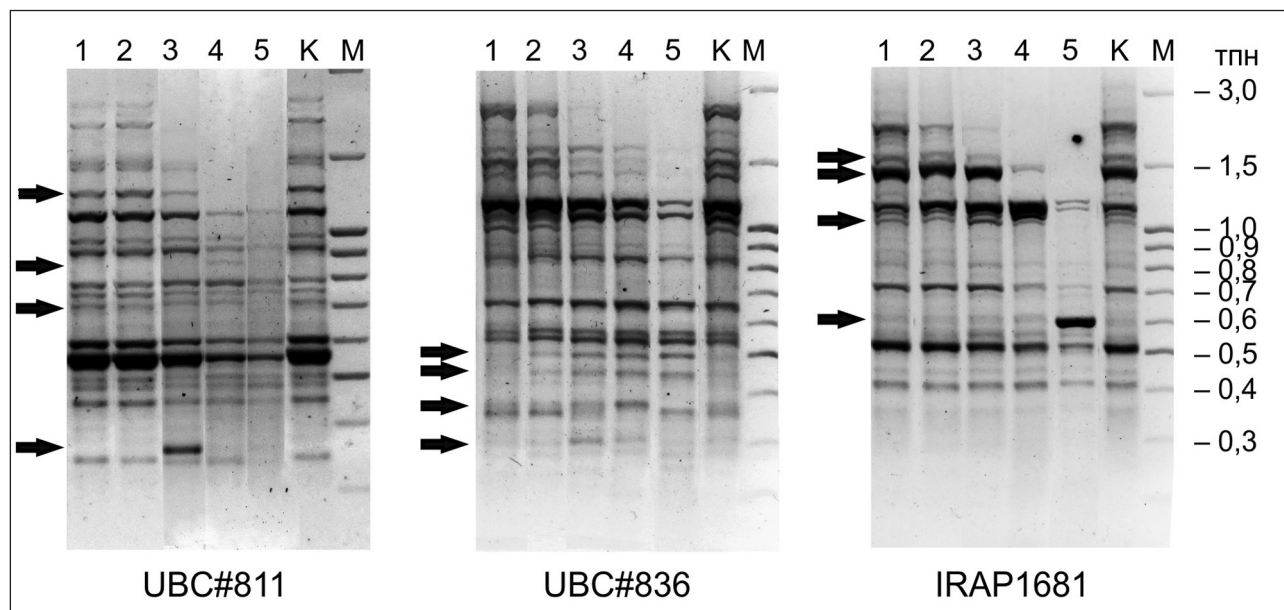


Рис. 1. Зміни електрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів рослин *D. antarctica*, культивованих у присутності CdCl₂ впродовж 63 діб: 1 – 0,1 мМ, 2 – 0,2 мМ, 3 – 1 мМ, 4 – 1,5 мМ, 5 – 2 мМ. К – контрольні рослини, М – молекулярний маркер. Стрілками позначено перебувані фрагменти; назви використаних праймерів наведено під зображеннями фракціонованої ДНК

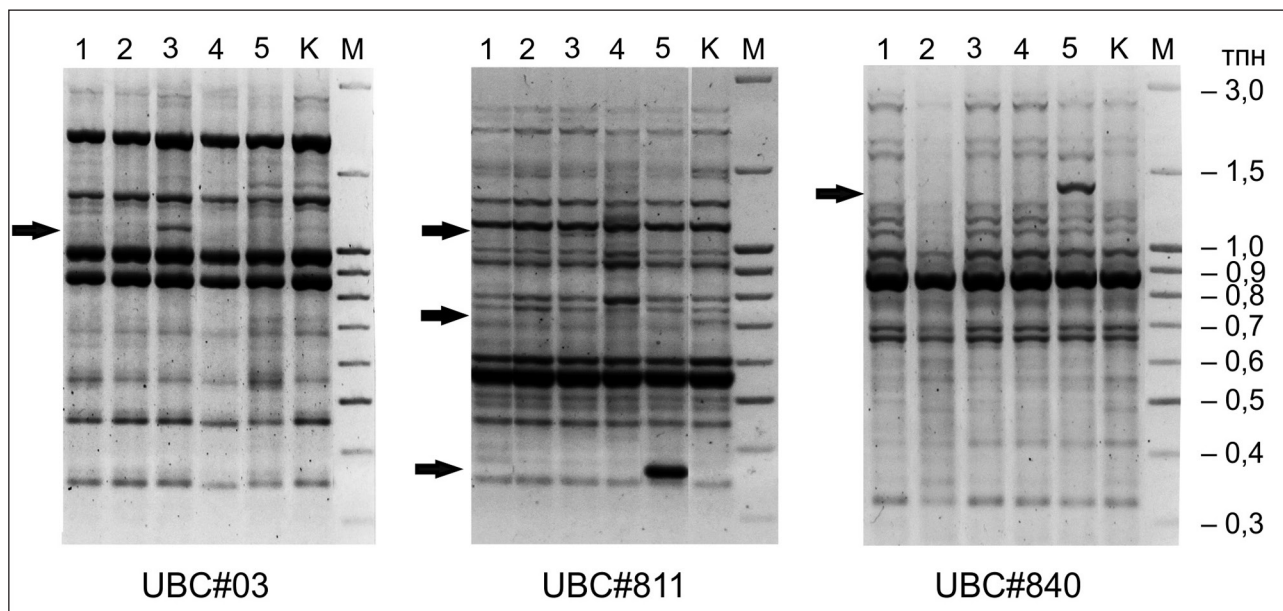


Рис. 2. Зміни електрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів рослин *D. antarctica*, культивованих у присутності $CdCl_2$ упродовж 17діб: 1 – 0,2 мМ, 2 – 0,4 мМ, 3 – 0,6 мМ, 4 – 0,8 мМ, 5 – 1 мМ. К – контрольні рослини, М – молекулярний маркер. Стрілками позначено перебудовані фрагменти; назви використаних праймерів наведено під зображеннями фракціонованої ДНК

UBC#840 та UBC#811). При концентрації іонів кадмію в концентрації 0,2 мМ і 0,4 мМ змін в ПЛР-спектрах не спостерігали.

За результатами ПЛР-аналізу було розраховано генетичні відстані за Жакардом між рослинами *D. antarctica*, культивованими впродовж 17 діб на живильних середовищах з різними концентраціями $CdCl_2$. Значення генетичних дистанцій між рослинами, що культивували із ВМ та контрольними рослинами знаходилися в межах 3,5–11,4 % і зростали залежно від концентрації іонів кадмію в живильному середовищі (рис. 3).

Третій варіант дослідження був спрямований на вивчення хронічної дії іонів кадмію на геном *D. antarctica*. Відомо, що іони кадмію на перших етапах культивування (вирощування) накопичуються в коренях рослин, викликаючи, залежно від дози, фізіологічні та генетичні порушення. Відтак починається накопичення токсиканта в інших органах, що також може провокувати в них дегенеративні процеси. Дослід передбачав тривале культивування рослин при двох порівняно невисоких концентраціях хлориду кадмію, а саме 0,1 мМ та 0,4 мМ (табл. 2). Рослину, яка формувала дернину, культивували впродовж певного часу на середовищі з важким металом, після чого в стерильних

умовах відбирали її частину для генетичного аналізу, а решту дернини продовжували вирощувати на контрольному живильному середовищі. Тривалість культивування з 0,1 мМ становила 265 діб; у варіанті з наступним вирощуванням на кон-

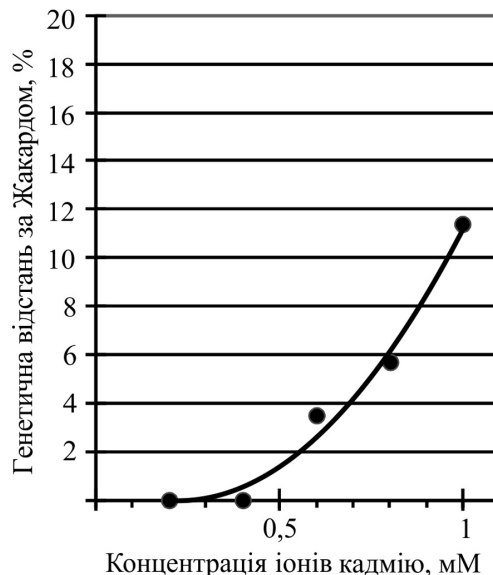


Рис. 3. Рівень відмінностей від вихідного генотипу рослин *D. antarctica*, які культивували на середовищі з різним вмістом іонів кадмію впродовж 17 діб

трольному середовищі рослини піддавали впливу 0,1 мМ Cd²⁺ 165 діб і ще 100 діб культивували без важкого металу. При вищій концентрації (0,4 мМ) тривалість культивування на середовищі з CdCl₂ складала 140 діб, а у варіанті із дорощуванням в контрольних умовах – 96 діб у присутності іонів кадмію і 44 доби – на контрольному середовищі.

ПЛР-аналіз ДНК рослин, що зазнали тривалого впливу порівняно невисоких концентрацій солей кадмію (0,1 та 0,4 мМ), не виявив відмінностей від контрольних рослин. Слід зазначити, що у рослин, які після культивування на середовищі з кадмієм упродовж тривалого часу росли на живильному середовищі без важкого металу, також не виявлено відмінностей від контролю та рослин, взятих до аналізу безпосередньо після культивування на середовищі з CdCl₂ (через 165 діб – 0,1 мМ Cd²⁺ та 96 діб – 0,4 мМ Cd²⁺).

Обговорення

Важкі метали дуже токсичні для живих організмів. У рослин вони інгібують клітинний поділ, викликають хромосомні аберації пригнічують ріст коренів. Одним із розповсюджених важких металів, що виявляє значну шкідливість для живих істот, є кадмій. Генотоксичність солей кадмію показано для представників різних видів рослин – *Solanum tuberosum* L. [14], *Nicotiana tabacum* [15], *Allium sativum* [16], *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vicia faba* та *Zea mays* [17–20]. Накопичення Cd²⁺ викликає в рослин пригнічення фотосинтезу, зменшує проникнення води і поживних речовин, а також призводить до видимих пошкоджень, таких як хлороз та інгібування росту [21]. У клітинах коренів Cd²⁺ спричинює зменшення показника мітотичного індексу, викликає хромосомні аберації, утворення мікроядер [18, 19, 22]. Водночас відомо про існування рослин, що мають підвищену стійкість до ВМ. У цій роботі ми провели дослідження мутагенного впливу кадмію на унікальну рослину-екстремофіл *D. antarctica*, у якої внаслідок адаптації до існування в жорстких умовах Прибережної Антарктики сформувались механізми стійкості до різноманітних екстремальних впливів.

Дослідження проводили із використанням рослин одного генотипу, отриманих мікроклональним розмноженням, які культивували на штучних жи-

вильних середовищах *in vitro*. Це дозволило проводити досліди в стандартизованих контрольованих умовах, а також виключити можливий вплив на результати внутривидового поліморфізму або потенційних відмінностей різних генотипів за чутливістю до кадмію. Для оцінки мутагенного впливу кадмію використали метод ПЛР-аналізу, який надзвичайно ефективний при дослідженні геному і широко використовується для виявлення пошкоджень ДНК і мутацій. Зокрема, за допомогою RAPD-ПЛР було показано індуковані іонами кадмію зміни геному *Arabidopsis thaliana* [23], *Urtica dioica* – кропиви дводомної [24], *Hydrilla verticillata* і *Ceratophyllum demersum* (водяні рослини) [25], ячменю (*Hordeum vulgare*) [19]; ISSR маркери виявили мутагенний вплив трьох важких металів Zn, Pb і Cd на *Eruca sativa* [26]. У своїй роботі ми застосували метод ISSR-аналізу, який дозволяє виявити поліморфізм ділянок геному, фланкованих мікросателітними повторами, і, на відміну від RAPD-ПЛР, має вищу відтворюваність та надійність результату [27].

Культивування рослин *D. antarctica* з кадмієм в концентраціях від 0,1 до 10 мМ упродовж 63 діб показало, що морфологічні зміни у рослин спостерігаються на середовищах із вмістом важкого металу 1 мМ або вище. При вищих концентраціях виявлено припинення росту і хлороз. Поряд із морфологічними змінами, починаючи з концентрації 1 мМ, спостерігали також зміни в спектрах ПЛР-продуктів. При вирощуванні рослин на середовищах з Cd²⁺ в діапазоні концентрацій 0,2–1 мМ упродовж 17 діб з наступним культивуванням на контрольному середовищі протягом такого ж терміну, зміни спектрів ПЛР-продуктів спостерігали лише за концентрацій вище 0,4 мМ, а їх рівень зростав залежно від вмісту Cd²⁺ в середовищі. За культивування при концентраціях Cd²⁺ 0,1 та 0,4 мМ упродовж тривалішого періоду (265 та 140 діб, відповідно) генетичних змін у рослинах виявлено не було.

Аналіз літературних даних показав, що токсичний вплив іонів кадмію на більшість рослин проявляється при його концентраціях 10–200 мкМ. Так, у трьох видів рослин, які відрізнялися за здатністю акумулювати в своїх тканинах кадмій, *Thlaspi caerulescens* J.Presl & C.Presl, *Thlaspi arvense* L. та *Lactuca sativa* L., явні морфологічні ознаки токсичного впливу спостерігали після культивування з 10 і

100 мкМ Cd²⁺ упродовж 28 діб [22]. Іони кадмію викликали пожовтіння і деформацію листків та пригнічували ріст коренів картоплі *Solanum tuberosum* L. при концентрації 7,5 мкМ упродовж 1 тижня, а при концентрації 5 мкМ – упродовж 2 тижнів культивування [14]. У томата *Lycopersicon esculentum* 10–12 діб вирощування в присутності 10 мкМ важкого металу викликали симптоми хлорозу, а 100 мкМ – некротичні плями на листі, при обох концентраціях спостерігали побуріння коренів [28].

Генотоксичний вплив за обробки кадмієм, а саме пошкодження ДНК, які виявляли цитогенетичними методами, спостерігали при подібних концентраціях. Наприклад, зниження мітотичного індексу і утворення мікроядер у проростках *Allium sativum* і *Vicia faba* викликала обробка 10 мкМ Cd²⁺ упродовж 48 годин, а за концентрацій 100 і 200 мкМ ці показники зазнавали дуже істотних змін [29], у *Vigna unguiculata* – такі зміни спостерігали після 15 діб вирощування рослин, отриманих з насіння, одноразово обробленого 2–10 мМ Cd²⁺ [30]. У коренях рослин *L. sativa*, на відміну від рослин-аккумуляторів кадмію *T. caerulea* та *T. arvense*, пошкодження ДНК методом проточної цитометрії виявили після культивування впродовж 28 діб у присутності 100 мкМ Cd²⁺ [22]. У водяних рослин *Hydrilla verticillata* і *Ceratophyllum demersum*, які обробляли 10 мкМ Cd²⁺ упродовж 96 годин, спостерігали зміни в спектрах продуктів RAPD-ПЛР [25]. У *Solanum tuberosum* L. пошкодження ДНК, детектовані за допомогою кометного фореузу, спостерігали при культивуванні з 5 мкМ Cd²⁺ після двох тижнів, з 7,5 мкМ – після одного тижня, а з 20 мкМ – вже після двох годин [14]. Обробка нітратом кадмію в концентраціях 0,4–2 мМ впродовж 2 годин призводила до значних пошкоджень ДНК, які значно зростали після наступного культивування рослин без токсиканта протягом 24 годин [14]. У проростках пшениці *Triticum aestivum* L. зміну RAPD-спектрів відмічали при вирощуванні в присутності 5 мг/мл (~25 мкМ) хлориду кадмію впродовж 9 діб [31]. Мутагенну дію кадмію на *Phaseolus vulgaris* L. спостерігали при культивуванні проростків у присутності Cd(NO₃)₂ в концентрації 150 мг/мл (0,61 мМ) впродовж 7 діб [32].

Таким чином, отримані нами результати свідчать про підвищену стійкість *D. antarctica* до іонів кадмію, порівняно із іншими судинними рослина-

ми, дані відносно яких представлені в науковій літературі. Можна припустити дві причини підвищеної стійкості *D. antarctica* до кадмію. У цієї рослини внаслідок адаптації до існування в жорстоких умовах Антарктики сформувались комплексні механізми стійкості до різних екстремальних впливів, таких як холод, посуха, засолення, УФ-опромінення, які можуть забезпечувати також і неспецифічну толерантність до шкідливого впливу важких металів. Водночас, з літературних даних відомо, що в окремих ділянках островів Західної Антарктики ґрунти можуть мати підвищений вміст важких металів [33, 34], і це також могло вплинути на формування у *D. antarctica* стійкості до цього абіотичного фактора.

Висновки

Рослина-екстремофіл *D. antarctica*, у якої внаслідок адаптації до існування в жорстких умовах Прибережної Антарктики сформувались механізми стійкості до різноманітних стресових впливів, характеризується підвищеною стійкістю до іонів кадмію порівняно із іншими видами судинних рослин. Пригнічення росту відбувається при концентраціях Cd²⁺ від 0,1 мМ і вище, а припинення росту та загибель рослин – за концентрацій 1 мМ і вище. Мутагенний вплив на *D. antarctica* виявлено при концентраціях Cd²⁺ вище 0,4 мМ. За тривалого вирощування рослини (впродовж 3–8 місяців) в присутності 0,1–0,4 мМ іонів кадмію генетичних змін не знайдено.

Перелік літератури

1. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation // Am. J. Plant Sci. – 2011. – No. 2. – P. 381–395.
2. Ozheredova I.P., Parnikoza I.Yu., Poronnik O.O., Kozeretska I.A., Demidov S.V., Kunakh V.A. Mechanisms of Antarctic vascular plant adaptation to abiotic environmental factors // Cytology and Genetics. – 2015. – Vol. 49, No. 2. – P. 139–145.
3. Alberdi M., Bravo L.A., Gutiérrez A., Gidekel M., Corcuera L.J. Ecophysiology of Antarctic vascular plants // Physiol. Plant. – 2002. – Vol. 115. – P. 479–486.
4. Мартазинова В.Ф., Тимофеев В.Е., Иванова Е.К. Современный региональный климат Антарктического полуострова и станции академик Вернадский // Укр. антаркт. журн. – 2010. – № 9. – С. 231–248.
5. Convey P. Reproduction of Antarctic flowering plants // Antarct. Sci. – 1996. – No. 8. – P. 127–134.
6. Керівний нормативний документ. Екологічно-агрохімічна паспортизація полів та земельних ділянок / за ред. О.О. Созінова. – К.: Аграрна наука, 1996. – С. 16–20.

7. Misra R.R., Smith G.T., Waalkes M.P. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines // *Toxicol.* – 1998. – Vol. 126. – P. 103–114.
8. Hartwig A., Schwerdtle T. Interaction by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications // *Toxicol. Lett.* – 2002. – Vol. 127. – P. 47–54.
9. Jonak C., Nakagami H., Hirt H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 3276–3283.
10. Загричук O.M., Дробик H.M., Козерецька I.A. та ін. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia Antarctica* Desv. (Роасеае) з двох районів Прибережної Антарктики // *Укр. антаркт. журн.* – 2011–2012. – № 10–11. – С. 289–295.
11. Загричук O. M., Герц A. I., Дробик H. M., Кунах B. A. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Роасеае) у культурі *in vitro* // *Biotechnologia Acta.* – 2013. – Т. 6, № 6. – С. 77–85.
12. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
13. Schluter P. M., Harris S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – Vol. 6, No. 2. – P. 569–572.
14. Gichner T., Patkova Z., Szakova J. et al. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and gamma-rays // *Environ. Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 62. – P. 113–119.
15. Fojtova M., Kovarik A. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells // *Plant Cell Environ.* – 2000. – Vol. 23. – P. 531–537.
16. Yi H., Meng Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba* // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 537. – P. 109–114.
17. Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C. et al. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassay // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1998. – Vol. 31. – P. 183–191.
18. Angelis K.J., McGuffie M., Menke M., Schubert I. Adaption to alkylation damage in DNA measured by the comet assay // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2000. – Vol. 36. – P. 146–150.
19. Liu W., Li P. J., Qi X. M. et al. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis // *Chemosphere.* – 2005. – Vol. 61. – P. 158–167.
20. Kumar Rai P., Kumar G. The genotoxic potential of two heavy metals in inbred lines of maize (*Zea mays* L.) // *Turk. J. Bot.* – 2010. – Vol. 34 – P. 39–46.
21. Drazkiewicz M., Tukendorf A., Baszynski T. Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation // *J. Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 160. – P. 247–254.
22. Monteiro M.S., Rodriguez E., Loureiro J. et al. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2010. – Vol. 73, No. 6. – P. 1231–1237.
23. Liu W., Sun L., Zhong M. et al. Cadmium-induced DNA damage and mutations in *Arabidopsis* plantlet shoots identified by DNA fingerprinting // *Chemosphere.* – 2012. – Vol. 89. – P. 1048–1055.
24. Gjorgieva D., Kadifkova-Panovska T., Ruskovska T. et al. Influence of heavy metal stress on antioxidant status and DNA damage in *Urtica dioica* // *BioMed Res. Intern.* – 2013. – Vol. 2013. – ID 276417. – 6 p.
25. Gupta M., Sarin N. B. Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker // *J. Environ. Sci.* – 2009. – Vol. 21. – P. 686–690.
26. Al-Qurainy F. Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.) // *Afr. J. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 9, No. 4. – P. 467–474.
27. Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding // *Euphytica.* – 2002. – Vol. 128, No. 1. – P. 9–17.
28. López-Millán A.-F., Sagardoy R., Solanas M. et al. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics // *Environ. Exp. Bot.* – 2009. – Vol. 65. – P. 376–385.
29. Unyayar S., Celik A., Ozlem F. et al. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba* // *Mutagenesis.* – 2006. – P. 1 – 5.
30. Amirthalingam T., Velusamy G., Pandian R. Cadmium-induced changes in mitotic index and genotoxicity on *Vigna unguiculata* (Linn.) // *J. Env. Chem. Ecotoxicol.* – 2013. – Vol. 5, No. 3. – P. 57–62.
31. Azimi A., Shahriari F., Fotovat A. et al. Investigation of DNA changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by cadmium using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis // *Afr. J. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 12, No. 16. – P. 1921–1929.
32. Gjorgieva D., Kadifkova-Panovska T., Mitrev S. et al. Assessment of the genotoxicity of heavy metals in *Phaseolus vulgaris* L. as a model plant system by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis // *J. Environ. Sci. Health, Part A: Tox. / Hazard Subst. Environ. Eng.* – 2012. – Vol. 47, No. 3. – P. 366–373.
33. Корсун С.Г. Оцінка вмісту біогенних елементів та важких металів у верхньому шарі ґрунту островів поблизу західного узбережжя Антарктичного півострова // *Укр. антаркт. журн.* – 2005. – № 3. – С. 151–154.
34. Lu Z., Cai M., Wang J. et al. Baseline values for metals in soils on Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica: the extent of anthropogenic pollution // *Inviron. Monit. Assess.* – 2012. – Vol. 184, No. 11. – P. 7013–702.

Представлено O.В. Дубровною
Надійшла 01.03.2016

ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. К МУТАГЕННУМУ ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ КАДМИЯ

Е.В. Спиридонова¹, И.О. Андреев¹, O.M. Загричук², H.M. Дробик², B.A. Кунах¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, г. Київ, ул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
Україна, 46027, г. Тернопіль, ул. М. Кривоноса, 2
e-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

Цель. Изучение мутагенного действия различных концентраций ионов кадмия на антарктическое растение *D. antarctica* с использованием ПЦР-анализа. **Методы.** Растения культивировали *in vitro* на агаризованной питательной среде Гамборга-Эвелей (B5) с добавлением CdCl₂. Генетические изменения выявляли с помощью ПЦР-анализа с ISSR и IRAP-маркерами. **Результаты.** Мутагенное влияние ионов кадмия на *D. antarctica* изучали с использованием генетически идентичных растений, полученных

микрклональним розмноженням *in vitro*. Исследовали влияние Cd^{2+} в диапазоне концентраций 0,1–10 мМ. По результатам культивирования *D. antarctica* в присутствии ионов кадмия в течение 63 дней был определен диапазон концентраций, при которых продолжается рост растений *in vitro*, – до 1 мМ. Установлено также, что концентрации 0,1 и 0,2 мМ не вызывают изменений спектров продуктов ПЦР. При выращивании растений в течение 17 дней с 0,2–1 мМ $CdCl_2$ изменения спектров ПЦР-продуктов, свидетельствующие о мутагенном воздействии, наблюдали при концентрациях 0,6 мМ и выше; количество изменений возросло в зависимости от концентрации тяжелого металла. После продолжительного (140–265 дней) воздействия ионов кадмия в сравнительно низких концентрациях 0,1 мМ и 0,4 мМ изменений в геноме не обнаружено. **Выводы.** Растение-экстремофил *D. antarctica*, которое в результате адаптации к существованию в суровых условиях Прибрежной Антарктики выработало механизмы устойчивости к разнообразным стрессовым воздействиям, обладает повышенной устойчивостью к ионам кадмия по сравнению с другими видами сосудистых растений. Угнетение роста происходит при концентрациях Cd^{2+} от 0,1 мМ и выше, а прекращение роста и гибель растений при концентрации 1 мМ и выше. Мутагенное влияние Cd^{2+} на *D. antarctica* выявлено при концентрациях выше 0,4 мМ. При продолжительном выращивании растений (3–8 месяцев) в присутствии 0,1–0,4 мМ ионов кадмия генетических изменений не обнаружено.

Ключевые слова: *Deschampsia antarctica* Desv., микрклонально размноженные растения *in vitro*, ионы кадмия, мутагенный эффект, ПЦР-анализ.

ENHANCED TOLERANCE OF *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. TO THE MUTAGENIC EFFECT OF CADMIUM IONS

K. V. Spiridonova¹, I. O. Andreev¹, O. M. Zahrychuk², N. M. Drobyk², V. A. Kunakh¹

¹ Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 150 e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2 e-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

Aim. To study the potential effects of different concentrations of cadmium ions on antarctic plant *D. antarctica* using PCR analysis. **Methods.** Plants were grown *in vitro* on B5 Gamborg and Eveleigh agar medium supplemented with $CdCl_2$. Genetic rearrangements were studied by PCR-analysis using ISSR- and IRAP-primers. **Results.** Genetically identical plants of *D. antarctica* obtained by microclonal propagation *in vitro* were used for the study of mutagenic effect of cadmium ions. The influence of Cd^{2+} was investigated within the concentration ranging from 0.1 to 10 мМ. The results of cultivation of *D. antarctica* plants in the presence of cadmium ions for 63 days allow to determine the concentration range that does not inhibit the growth of the plants *in vitro*, and it was up to 1 мМ. It was found that toxicant concentrations of 0.1 and 0.2 мМ did not cause changes in the profiles of PCR products. After growing the plants with 0.2–1 мМ $CdCl_2$ for 17 days, the changes in the profiles of PCR products, indicating the mutagenic impact, were observed at concentrations of 0.6 мМ or above; moreover, the number of changes increased in dependence on the concentration of heavy metal. Prolonged influence (140–265 days) of cadmium ions in relatively low concentrations (0.1 мМ and 0.4 мМ) did not cause detectable mutations. **Conclusions.** *D. antarctica*, a plant extremophile, which has evolved mechanisms of resistance to a variety of extreme conditions as a result of adaptation to the existence in the harsh conditions of Antarctica, shows enhanced resistance to cadmium ions in comparison with other species of vascular plants. Inhibition of growth occurs at Cd^{2+} concentrations of 0.1 мМ or above, whereas concentrations of 1 мМ or above cause cessation of growth and death of plants. Mutagenic effect on *D. antarctica* was observed at Cd^{2+} concentrations of above 0.4 мМ. After prolonged growth of plants (for 3–8 months) at cadmium ions concentrations of 0.1–0.4 мМ, genetic changes was not found.

Keywords: *Deschampsia antarctica* Desv., plants *in vitro* obtained by microclonal propagation, cadmium ions, mutagenic effect, PCR-analysis.