VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

**GABIJA KORLAITĖ**

# SUNKIAISIAIS METALAIS UŽTERŠTO DIRVOŽEMIO POVEIKIO TYRIMAS PANAUDOJANT *Tradescantia pallida* IR *Tradescantia* KLONĄ 4430

Genetikos bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU GMC

Biomokslų institute

Botanikos ir genetikos katedroje

Darbo vadovas: Doc. Dr. Raimondas Šiukšta

Konsultantė: Doc. Dr. Tatjana Čėsnienė

Vilnius 2020

**TURINYS**

**SANTRUMPŲ SĄRAŠAS** ..... 4
**ĮVADAS** ..... 5
**1. LITERATŪROS APŽVALGA** ..... 7
1.1 Sunkieji metalai ir jų savybės ..... 7
1.2 Sunkiųjų metalų šaltiniai ..... 8
1.3 Sunkiųjų metalų žalingas poveikis aplinkai ..... 9
1.3.1 Poveikis dirvožemiui, vandeniui ir orui ..... 10
1.3.2 Sunkiųjų metalų poveikis augalams ..... 11
1.3.3 Sunkiųjų metalų poveikis gyvūnams ir žmogui ..... 13
1.4 Tyrimų oksidacinio streso sukeltam poveikiui augalinėse sistemose įvertinti apžvalga ..... 14
1.4.1 Biocheminiai žymenys oksidaciniam stresui įvertinti ..... 15
1.4.2 Molekuliniai žymenys genotoksiškumui įvertinti ..... 17
1.4.3 Cito(geno)toksiniai tyrimai ..... 18
1.5 Augalams sukeliamo oksidacinio streso tyrimai panaudojant *Tradescantia* genties sistemas ..... 19
**2. MEDŽIAGOS IR METODAI** ..... 21
2.1 Medžiagos ..... 21
2.2 Metodai ..... 22
2.2.1 Tyrimo objektas ..... 22
2.2.2 Vandenilio peroksido koncentracijos tyrimas ..... 22
2.2.3 Askorbo rūgšties kiekio tyrimas augaluose ..... 23
2.2.4 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas ..... 24
2.2.5 Prolino kiekio augale tyrimas ..... 24
2.2.6 Lipidų peroksidacijos tyrimas ..... 25
2.2.7 DNR išskyrimas CTAB metodu ..... 26
2.2.8 Genotipavimas naudojant CDDP pradmenis ..... 27
2.2.9 CDDP pradmenų atranka ..... 28
2.2.10 Genotipavimo metu gautų gelių analizė ..... 29
**3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS** ..... 30
3.1 Tiriamų dirvožemių cheminės analizės apžvalga ..... 30

3.2 Lapų storio įvertinimas ..... 31
3.3 Vandenilio peroksido kiekio kitimas užterštuose dirvožemiuose augintuose augaluose ..... 33
3.4 Askorbo rūgšties kiekio kitimo *Tradescantia* augaluose tyrimas ..... 34
3.5 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų kiekio analizė ..... 36
3.6 Laisvo prolino kiekio tyrimas *Tradescantia* augaluose ..... 38
3.7 Lipidų peroksidacijos lygmens nustatymo augalų lapuose rezultatai ..... 40
3.8 Sunkiaisiais metalais užterštų dirvožemių genotoksiškumo tyrimas CDDP žymenų metodu ..... 41
**IŠVADOS** ..... 45
**SANTRAUKA** ..... 46
**SUMMARY** ..... 47
**PADĖKA** ..... 48
**LITERATŪROS SĄRAŠAS** ..... 49
**INTERNETINIAI PUSLAPIAI** ..... 60
**PRIEDAI** ..... 61

**SANTRUMPŲ SĄRAŠAS**

AP-PGR – atsitiktinai inicijuojamas (angl. *arbitrarily primed*) PGR

AR – askorbo rūgštis

CDDP – konservatyvios DNR polimorfizmų aptikimo metodas (angl. *conserved DNA-derived polymorphism*)

Chl a ir b – chlorofilai a ir b

DAF – DNR „pirštų antspaudai“ (angl. *DNA amplification fingerprintin*)

GRD/G – užterštas dirvožemis iš Vilniaus miesto buvusios gražtų gamyklos UAB „Rimeda“ teritorijos

$H_2O_2$ – vandenilio peroksidas

K – kontrolė

Kar – karotenoidai

LPP – lipidų peroksidacijos produktai

MB – mikrobranduoliai

MDA – malondialdehidas

OS – oksidacinis stresas

Pro – laisvas prolinas

RAPD – atsitiktinai amplifikuotos polimorfinės DNR metodas (angl. *random amplified polymorphic DNA*)

ROS – reaktyvios deguonies formos

SM – sunkieji metalai

VERKŠ/VE – užterštas dirvožemis iš Verkščionių žvyro karjero teritorijos

VITE/VI – užterštas dirvožemis iš Klaipėdos Vitės pagrindinės mokyklos teritorijos

## ĮVADAS

Viena iš didžiausių šių dienų ekologinių problemų yra aplinkos tarša. Į biosferą yra išmetama daug įvairių toksiškų medžiagų, kurios gali sukelti trumpalaikį arba ilgalaikį ekosistemų ekologinės pusiausvyros pažeidimą. Vienos iš medžiagų, kurios yra priskiriamos neorganiniams teršalams – sunkieji metalai ir jų junginiai (Rutkovienė, Sabienė, 2008). Sunkieji metalai (SM) – tai elementai, kurių santykinis tankis yra didesnis nei 5 g/cm$^3$ (Tchounwou et al., 2012). Į aplinką SM gali patekti tiek gamtinių, tiek antropogeninių procesų metu (Hassaan et al., 2016). Dažniausiai SM išmetami įvairiose pramoninėse zonose (He et al., 2005). Laikui bėgant, dėl savo savybės akumuliuotis, SM kaupiasi vandenyje ir dirvožemyje. Užsidarius ar bankrutavus šioms pramoninėms gamykloms, vykstant urbanizacijai, šiose teritorijose yra vykdomos įvairios veiklos ir SM iš dirvožemio patenka į mitybos grandinę ir kaupiasi organizmuose. Augaluose intensyvų SM metalų kaupimąsi lemia tai, kad šie metalai yra panašūs į augalams fiziologiškai svarbius junginius (pvz., fermentų kofaktorius), todėl gali juos inaktyvinti. Net ir nedideli SM kiekiai gali stipriai paveikti organizmą: jie gali sukelti apsinuodijimą, turėti kancerogeninį, mutageninį, teratogeninį, embriotoksinį ir hemotoksinį poveikį, sukelti tiek ūminius, tiek lėtinius sveikatos sutrikimus (Mačiūnas et. al., 2005; Rutkovienė, Sabienė, 2008; Šiukšta et. al., 2018).

Vertinant dirvožemių toksiškumą, dažnai yra atliekami SM oksidacinio streso tyrimai. Siekiant praplėsti žinias apie Lietuvoje esančių pramoninių teritorijų dirvožemių užterštumą, buvo pasirinktos trys skirtingos Lietuvos teritorijos: iš Klaipėdos Vitės pagrindinės mokyklos (VITE), Verkšionių žvyro karjero (VERKŠ) ir Vilniaus miesto buvusios grąžtų gamyklos UAB „Rimeda“ (GRD). Taip pat, siekiant patikrinti ar SM sukeliamas poveikis yra vienodas skirtingose augalinėse sistemose, buvo naudojami du Tradescantia genties modeliniai augalai – *Tradescantia pallida* ir *Tradescantia* klonas 4430.

**Šio bakalaurinio darbo tikslas** – įvertinti sunkiaisiais metalais užteršto dirvožemio ilgalaikį poveikį *Tradescantia pallida* ir *Tradescantia* #4430 augalams, naudojant biocheminius ir molekulinius metodus.

**Tikslui pasiekti išsikelti uždaviniai:**

1. Įvertinti tiriamųjų dirvožemių taršos lygį remiantis cheminės analizės rezultatais.
2. Ištirti dirvožemių *T. pallida* ir *Tradescantia* #4430 augalams sukeliamą oksidacinį stresą po 1, 6 ir 12 mėn. auginimo panaudojant $H_2O_2$, askorbo rūgšties, Chl a, b ir karotenoidų, laisvo prolino bei lipidų peroksidacijos biocheminius žymenis.
3. Palyginti *T. pallida* ir *Tradescantia* #4430 biocheminės analizės rezultatus.
4. Įvertinti tiriamųjų dirvožemių genotoksiškumą *T. pallida* ir *Tradescantia* #4430 augalams CDDP žymenų metodu ir palyginti *T. pallida* ir *Tradescantia* #4430 genotipavimo rezultatus.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

Sunkieji metalai (SM) yra toksiški elementai, kurie, lyginant su vandeniu, turi santykinai didelį tankį (Tchounwou et al., 2014). Nors SM randami natūraliai gamtoje, dažniausiai SM akumuliacija dirvožemyje ir vandenyje vyksta kai į aplinką SM išmetami antropogeniniais būdais (He at al., 2005). Galiausiai, šie metalai patenka į mitybos grandines ir pažeidžia organizmų fiziologiją (Bradl, 2002).

## 1.1 Sunkieji metalai ir jų savybės

SM yra metaliniai elementai, kuriems būdingas didelis santykinis atominis svoris – atominis skaičius didesnis už 20 (Raskin et al., 1994) bei jų santykinis tankis yra > 5 g/cm$^3$ (Tchounwou et al., 2012). SM priskiriamos savybės, tokios kaip lankstumas, tamprumas, laidumas, katijono stabilumas ir ligandų specifiškumas. SM natūraliai egzistuoja sulfidų ir oksidų rūdų pavidalu žemės plutoje ir uolienose (Verma, Kaur, 2016). Įprastai jie kaupiasi dirvožemyje, gali būti aptikti ir įvairiuose vandens šaltiniuose. Vieni iš dažniausiai aplinkoje aptinkamų SM yra Pb, Cr, As, Zn, Cd, Cu, Hg ir Ni (Wuana, Okieimen, 2011), kiti SM pavyzdžiai: Zn, Ag, Fe, Pd, Mn, Co (Yadav et al., 2019).

SM dalyvauja įvairiose biocheminėse reakcijose. Esant nedidelėms koncentracijoms, SM gali stimuliuoti bakterijų, kai kurių fermentų ir kofermentų veiklą (Wikandari et al., 2019). Nors kai kurie mikroelementai, pavyzdžiui, Cu, Fe, Mn ar Zn, yra būtini įvairioms augalų ir gyvūnų fiziologinėms funkcijoms, esant didesnėms nei norma koncentracijoms, šie elementai gali būti pavojingi ir sukelti neigiamą poveikį (Oves et al., 2016). Taigi, metalo toksiškos savybės priklauso nuo jo koncentracijos. Metalai, tokie kaip As, Pb, Cd, Ni, Hg, Cr, Co, ir Zn, yra labai toksiški, net ir nedideliais kiekiais (Salomons et al., 1995).

SM yra pavojingi dėl savo savybės kauptis. Pirmiausia, jie kaupiasi dirvožemyje bei vandenyje. Šių metalų, kaip ir daugelio metalų mikrobiologinis ar cheminis skaldymas nevyksta, ir jų koncentracija dirvožemyje išlieka ilgą laiką (Wuana, Okieimen, 2011). Jie taip pat yra linkę bioakumuliuotis, tai yra, bėgant laikui, SM koncentracija organizme didėja, jie kaupiasi greičiau, nei yra metabolizuojami arba pašalinami. Taigi, organizme susikaupus didesnei metalo koncentracijai, gali pasireikšti toksiškas poveikis.

## 1.2 Sunkiųjų metalų šaltiniai

Supratimas apie SM ir metaloidų atsiradimą ir prieinamumą dirvožemyje bei vandenyje yra labai svarbus siekiant gerinti augalininkystės ir gyvulininkystės pramonę, maisto ir vandens kokybę, gyvenamosios aplinkos būklę bei gilinti ekotoksikologijos žinias (Alloway, 2012). Nors SM egzistuoja gamtoje natūraliai, bėgant laikui jie kaupiasi ir galiausiai užteršia dirvožemį bei vandenį. Jie kaupiasi, kai į aplinką yra išskiriamas didelis šių metalų ir metaloidų kiekis. (Wuana, Okieimen, 2011). Didėjantis išmetamų į aplinką SM kiekis jau senai kelia didelį susirūpinimą (Salomons et al., 1995).

SM gali atsirasti tiek gamtinių, tiek antropogeninių procesų metu ir galiausiai patekti į skirtingus aplinkos komponentus (dirvožemį, vandenį, orą). Visi SM šaltiniai gali būti suskirstyti į penkias kategorijas: geocheminiai šaltiniai, žemės ūkio pramonėje naudojamos medžiagos, metalurgijos pramonė, atliekų šalinimas ir kiti šaltiniai (Hassaan et al., 2016).

Daugelis tyrimų dokumentavo skirtingus natūralius SM šaltinius. Metalai į aplinką yra išmetami ugnikalnių išsiveržimų metu, kai vyksta miškų gaisrai, uolienų dūlėjimas, ar biogeninių procesų metu. Taip pat metalai į aplinką gali patekti vykstant žuvusių organizmų irimui. SM galima rasti hidroksidų, oksidų, sulfidų, sulfatų, fosfatų, silikatų ir organinių junginių pavidalu (Herawati et al., 2000). Geologine prasme SM yra priskiriami grupei, vadinamai mikroelementais, ir visi kartu jie sudaro mažiau nei 1 % Žemės plutos uolienų. Nors ir šie metalai egzistuoja dirvožemyje natūraliai ar į jį patenka natūralių procesų metu, jie vis tiek gali sukelti žalingą poveikį gyviems organizmams (Hassaan et al., 2016).

Žemės ūkio pramonėje įvairios naudojamos medžiagos yra vienas iš metalų teršalų šaltinių. Pagrindiniai SM šaltiniai: įvairios trąšų priemaišos, pesticidai, tirpikliai, medienos apsauginės priemonės, atliekos, kurios gaunamos auginant gyvūnus skerdimui, įvairūs kompostai, mėšlas ir nuotekų dumblas. Be to, SM gali patekti į dirvožemį ir vandenį vykstant metalų korozijai, pavyzdžiui, vykstant vielinių tvorų korozijai. Manoma, kad žemės ūkio pramonė yra pagrindinis SM, tokių kaip Pb, Cr, Cu, Zn, Cd ir Ni, šaltinis dirvožemyje. Galiausiai, šie toksiški metalai gali patekti į augalus ir pasiekti maisto grandinę (Alves et al., 2016; Hassaan et al., 2016).

Atsiradus metalurgijai ir plečiantis šiai pramonės šakai, atsirado dar vienas šaltinis. Dažniausiai SM yra išmetami sparčiai besiplečiančiose pramoninėse zonose. Metalai, kurie yra

randami vėjo pustomose dulkėse, daugiausia ir yra iš tokių pramoninių zonų. Esant vis didesnei pramoninių produktų paklausai ir padidėjus šių produktų gamybai, į aplinką yra išmetama vis daugiau įvairių aplinkos teršalų (He et al., 2005). Specialiųjų lydinių ir plieno gamybai yra naudojama daug SM, kaip V, Mn, Pb, W, Mo, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Li, As, Ag. Aplinka yra teršiama vykdant šių lydinių gamybą, jų šalinimą bei perdirbimą (Hassaan et al., 2016).

Dar vienas iš pagrindinių taršos šaltinių yra nuotekos ir atliekos, kurias be tinkamo apdorojimo išpila įvairios gamyklos į aplinką, gėlą vandenį (Salomons et al., 1995). Daugybė metalų, ypač Cu, Cd, Pb, Sn ir Zn, patenka į aplinką iš sąvartynų, kai iš ten yra išplaunamas vanduo. Taip užteršiamas dirvožemis bei gruntinis vanduo. Taip pat į aplinką SM patenka su dūmais, kurie išsiskiria deginant įvairias atliekas krosnyse (Hassaan et al., 2016).

SM į aplinka gali patekti ir išmetant įvairias baterijas, naudojant įvairius pigmentus ir dažus, spausdinimui ir grafikai skirtus dažus. Taip pat SM randama produktų gamyboje naudojamuose katalizatoriuose, polimerų stabilizatoriuose, net medicininės paskirties dantų lydiniuose (Hassaan et al., 2016).

Nors SM yra randami gamtoje ir patenka į dirvožemį ar vandenį vykstant natūraliems procesams, antropogeniniųi procesų metu išskiriamų kai kurių metalų srautas viršija natūraliai išskiriamų metalų srautą (He et al., 2005).

### 1.3 Sunkiųjų metalų žalingas poveikis aplinkai

Tarša SM kelia vis didesni susirūpinimą visame pasaulyje. Esant didėjančiam įvairios produkcijos poreikiui, yra perdirbama ir naudojama vis daugiau lydinių, turinčių SM. SM padidėję kiekiai aplinkoje sukelia neigiamą poveikį hidrosferai, litosferai, biosferai ir atmosferai. Patekę į maisto grandinę, SM gali neigiamai paveikti organizmų funkcijas, sukelti įvairius sveikatos sutrikimus ar net lemti organizmo mirtį (Masindi, Muedi, 2018). SM, kurie kaupiasi dirvožemyje, daro neigiamą įtakaką gruntiam vandeniui, augalams, lemia dirvožemio savybių blogėjimą (Motuzova et al., 2014).

Toksinių savybių turintys metalai gali jungtis prie tam tikrų baltymų ir taip paveikti jų biologines funkcijas. Pavyzdžiui, nustatyta, kad esant padidėjusioms Cu ir Zn koncentracijoms dirvožemyje, yra neigiamai paveikiama mikrobų biomasė ir sutrikdomas jų fermentų aktyvumas (Zannoni et al., 2008). Taip pat, šie metalai gali sąveikauti su tioliais ir disulfidais, ir tokiu būdu

sutrikdyti baltymų, kurie turi jautrias SH grupes, aktyvumą (Foulkes, 1998; Geslin et al., 2001). Vykstant reakcijoms su metalais dažniausiai susidaro reaktyvios deguonies formos (RDF, angl. *reactive oxygen species,* ROS) – natūralūs įprasto metabolizmo šalutiniai produktai. Jautrios tiolio grupės suardymas, kuris įvyksta dėl metalų poveikio, galiausiai gali paveikti baltymo struktūrą, susilankstymą (Samanovic et al., 2012). Kai kurie metalai juos pernešant gali dalyvauti katalizinėse reakcijose, kurios sukelia RDF. Tokios reakcijos ląstelėse gali sukelti oksidacinį stresą ir padidinti ląstelėje esančių RDF kiekį, kurie gali dalyvauti įvairiose biocheminėse reakcijose ir galiausiai pažeisti DNR, lipidus bei baltymus (Borsetti et al., 2007). RDF yra taip pat gaminami ir įprastai organizme vykstančių medžiagų apytakos procesų metu bei sukelia minėtus pažeidimus, tačiau esant didesniems nei įprastai SM kiekiams, ląstelėms daroma papildoma žala (Parker et al., 2011). SM sukeliamas poveikis taip pat labai priklauso nuo metalo tipo, metalų kombinacijos ir nuo jų koncentracijos.

### 1.3.1 Poveikis dirvožemiui, vandeniui ir orui

Dažniausiai iš jau minėtų šaltinių SM pirmiausia patenka į dirvožemį. Daugelis SM nėra skaidomi nei cheminiais būdais, nei mikroorganizmų pagalba, todėl bėgant laikui jų koncentracija dirvožemyje ar vandenyje didėja (Athar, Vohara, 2001; Lepp, 2012). SM gali sutrikdyti ekosistemą, nes iš dirvožemio jie gali patekti į maisto grandinę. Kai šių metalų yra dirvožemyje, įvairūs mikroorganizmai lėčiau skaido organinius teršalus, didėja aplinkos tarša – dirvožemyje kaupiasi ne tik SM, bet ir organiniai teršalai. Esant didesniam užterštumui gali pasikeisti dirvožemio pH, jo derlingumas, kokybė, ar net spalva.

Nors vandens taršos šaltinių yra daug, didžiausią žalą padaro industrializacija ir urbanizacija. Įvairiose pramoninėse gamyklose, miestų teritorijose į aplinką yra išmetamos nuotekos, kuriose daug SM, kurie kaupiasi dirvožemyje ir vandens telkinių nuosėdose (Musilova et al., 2016). Iš vandens SM patenka į gyvus organizmus: augalus, gyvūnus ir vandenyje gyvenančius mikroorganizmus, todėl užterštas vanduo paveikia visus organizmus ir dėl šios priežasties aukščiausiame maisto grandinės lygmenyje esantys organizmai gali patirti sunkius sveikatos sutrikimus (Lee et al., 2002).

Dėl didėjančio gyventojų skaičiaus, industrializacijos ir urbanizacijos, vis didėja ir oro tarša, kuri šiuo metu visame pasaulyje kelia didelį susirūpinimą. Oro taršą didina dulkės ir ore

esančios kietosios dalelės, kurios gali būti išskirtos į orą tiek natūralių, tiek antropogeninių procesų metu (Soleimani et al., 2018). Stebėti kietųjų dalelių koncentraciją yra labai svarbu, nes jos gali sukelti įvairius sveikatos sutrikimus, tokius kaip odos ir akių dirginimas, kvėpavimo takų infekcijos, širdies ir kraujagyslių sistemos sutrikimai. Šios dalelės taip pat gali būti infrastruktūrų prastėjimo, korozijos, rūgščių lietų, eutrofikacijos ir smogo priežastis (Herawati et al., 2000).

### 1.3.2 Sunkiųjų metalų poveikis augalams

SM patekus į augalą, gali būti slopinami citoplazminiai fermentai ir pažeistos įvairios ląstelių struktūros. Kitaip tariant, ląstelėse sukeliamas oksidacinis stresas (OS) (Assche, Clijsters, 1990; Jadia, Fulekar, 2009). OS sukelti pažeidimai dažniausiai yra negrįžtami. Esant netiesioginiam poveikiui, katijonų mainų vietose gali įvykti esminių maisto medžiagų pakeitimas (Taiz, Zeiger, 2002).

Pirmiausiai SM pažeidžia augalų šaknų sistemą, nes tai pirmoji vieta, kur augalas kontaktuoja su SM. Tyrimai parodė, kad metalai sąveikauja su ląstelės sienele. Dauguma SM jungiasi prie poligalakturono rūgščių. Buvo parodyta, kad skirtingo amžiaus šaknyse, kaupiasi skirtingi metalai. Taip pat, senesnėse šaknyse metalų buvo susikaupę mažiau, nei jaunesnėse. Manoma, kad taip nutinka dėl besiskiriančio skirtingo amžiaus ląstelių metabolizmo aktyvumo (Yruela et al., 1993; Nebais et al., 2011; Bouzon et al., 2012). Kito *in vitro* tyrimo metu buvo pastebėta, kad paveikus ląsteles Cd, jų sienelė pastorėjo ir buvo sutrikdyta vidinė chloroplastų organizacija (Mehrag, 1993). Kita metalų veikimo vieta – plazminė membrana, prie kurios metalas gali prisirišti, taip sutrikdydamas jos funkcijas (Kaba et al., 2008). Metalui sąveikaujant su membrana, gali būti sukelti tiek kokybiniai, tiek kiekybiniai pokyčiai. SM gali sukelti baltymų tiolių oksidaciją ir jų sąsiuvą, gali slopinti pagrindinių membranos baltymų, tokių kaip ATPazių, veiklą, sutrikdyti membranoje esančių lipidų sudėtį ir takumą (Zaidi et al., 2009). Šalia to, SM sukelia membranų lipidų peroksidaciją, tai yra, padidėjus jų koncentracijai, keičiasi riebalų rūgščių sudėtis ir taip pažeidžiama membrana (Hartley-Whitaker et al., 2001; Gupta, Sinha, 2009). Dar viena augalui svarbi sistema, kuri yra paveikiama SM – fotosintezė. Toksiški metalai gali kauptis lapuose ir šaknyse, sutrikdyti chloroplastų, kurie randami skirtinguose lapo audiniuose, tokiuose kaip stromoje, mezofilyje veiklą, sąveikauti su citozolyje randamais fermentais, molekuliniame lygyje paveikti augimo reakcijas ir fotosintetinį aktyvumą, ypač I ir II

fotosistemas, baltymus nešiklius, fermentai, kurie dalyvauja fotosintezės cikluose, gali būti denatūruojami (Oves et al., 2016). Pavyzdžiui, esant padidėjusiam Cu kiekiui dirvožemyje, yra sutrikdomas fotosintezės pigmentų susidarymas (Sheoran et al., 1990). SM taip pat gali pažeisti ir genetinę medžiagą. Pastebėta, kad jie gali sukelti tiek tiesioginį, tiek netiesioginį genotoksišką poveikį DNR, DNR sintezei bei jos dalinimosi procesui (Garnier et al., 2006) bei lemti įvairias chromosomų aberacijas (Unyayar et al., 2006).

Augalus padidėjusi SM koncentracija dirvožemyje gali paveikti ir netiesiogiai, tai yra, metalams net nekontaktuojant su augalu. Kaip jau minėta, SM paveikia ir mikroorganizmų veiklą. Sumažėjus mikroorganizmų skaičiui ar sulėtėjus jų skaidymo veiklai, įvairios organinės medžiagos yra skaidomos prasčiau, todėl dirvožemyje sumažėja maistinių medžiagų. Atsiradus maistinių medžiagų stygiui augalų augimo procesas suprastėja arba augalas net žūsta (Schaller, Diez, 1991). Vis dėlto, koks bus sukeltas poveikis konkrečiam augalui priklauso nuo jo rūšies, amžiaus, konkretaus metalo ar cheminio junginio, metalo koncentracijos bei jų kombinacijos (1.1 lentelė) (Chibuike, Obiora, 2014).

1.1 lentelė. Įvairių SM poveikis augalams (pagal Chibuike, Obiora, 2014)

| Metalas | Augalas | Toksiškas efektas augalams |
|---|---|---|
| As | Ryžiai (*Oryza sativa*) | Sėklų daigumo sumažėjimas, sėjinukų aukščio sumažėjimas, lapų ploto ir sausosios medžiagos gamybos sumažėjimas. |
| | Pomidoras (*Lycopersicon esculentum*) | Sumažėjęs vaisių derlius, lapų šviežio svorio sumažėjimas. |
| | Rapsai (*Brassica napus*) | Sumažėjęs augimas, chlorozė, vytimas |
| Co | Pomidoras (*Lycopersicon esculentum*) | Augalų maistinių medžiagų kiekio sumažėjimas. |
| | Spindulinė pupuolė (*Vigna radiata*) | Antioksidantų fermentų aktyvumo mažinimas, augalų cukraus, krakmolo, amino-rūgščių ir baltymų kiekio sumažėjimas. |
| Zn | Kampuotoji pupenė (*Cyamopsis tetragonoloba*) | Daigumo sumažėjimas, sumažėjęs augalų aukštis, biomasė, chlorofilų, karotenoidų, cukraus, krakmolo ir amino-rūgščių kiekiai. |
| | Žirnis (*Pisum sativum*) | Chlorofilo kiekio sumažėjimas, chloroplasto struktūros pokyčiai, fotosistemos II aktyvumo mažinimas, augalų augimo sumažėjimas. |
| | Daugiametė svidrė (*Lolium perenne*) | Zn kaupimasis augalų lapuose, augimo slopinimas, augalų maistinių medžiagų kiekio sumažėjimas, sumažintas fotosintezės energijos konversijos efektyvumas. |

1.1 lentelės tęsinys

| Metalas | Augalas | Toksiškas efektas augalams |
|---|---|---|
| Cr | Kviečiai (*Triticum* sp.)<br>Pomidoras (*Lycopersicon esculentum*)<br>Svogūnas (*Allium cepa*) | Sumažėjęs ūglio ir šaknų augimas.<br>Augalų maistinių medžiagų sumažėjimas.<br>Daigumo slopinimas, augalų biomasės sumažėjimas. |
| Cu | Pupelė (*Phaseolus vulgaris*)<br>Vijoklinis pelėvirkštis (*Polygonum convolvulus*)<br>Abisininė plinkšė (*Chloris gayana*) | Cu kaupimasis augalų šaknyse, šaknų sumažėjimas ir defektai.<br>Sumažėjęs augalų išgyvenamumas, sumažėjusi biomasė ir sėklų gamyba.<br>Šaknų augimo sumažėjimas. |
| Hg | Ryžiai (*Oryza sativa*)<br>Pomidoras (*Lycopersicon esculentum*) | Augalų aukščio sumažėjimas, sumažėjęs atžalų formavimasis, derliaus sumažėjimas, Hg bioakumuliacija ūgliuose ir sodinukuose.<br>Daigumo sumažėjimas, sumažėjęs augalų aukštis, žydėjimo ir vaisių svorio slopinimas, chlorozė. |
| Mn | Pupa (*Vicia faba*)<br>Žirnis (*Pisum sativum*) | Mn kaupimasis šaknyse ir ūgliuose, jų ilgio sumažėjimas, chlorozė.<br>Chlorofilo a ir b kiekio sumažėjimas, santykinio augimo greičio sumažėjimas, sumažėjęs fotosintezės $O_2$ evoliucijos aktyvumas ir fotosistemos II aktyvumas. |
| Ni | Tikrasis kajanas (*Cajanus cajan*)<br>Kviečiai (*Triticum* sp.)<br>Ryžiai (*Oryza sativa*) | Chlorofilo kiekio ir žiotelių laidumo sumažėjimas, sumažėjęs, Kalvino ciklo ir $CO_2$ fiksacijos fermentų aktyvumas.<br>Augalų maistinių medžiagų kiekio sumažėjimas.<br>Šaknų augimo slopinimas. |
| Pb | Kukurūzas (*Zea mays*)<br>Stambialapis kamšis (*Thespesia populnea*)<br>Aviža (*Avena sativa*) | Daigumo sumažėjimas, slopinamas augimas, sumažėjusi augalų biomasė, augalo baltymų kiekio sumažėjimas.<br>Lapų skaičiaus ir ploto sumažėjimas, sumažėjęs augalų aukštis ir biomasė.<br>Fermento RuBisCO slopinimas. |
| Cd | Kviečiai (*Triticum* sp.)<br>Česnakas (*Allium sativum*)<br>Kukurūzai (*Zea mays*) | Sėklų daigumo sumažėjimas, augalų maistinių medžiagų kiekio sumažėjimas, sumažėjęs ūglio ir šaknų ilgis.<br>Sumažėjęs ūglio augimas, Cd kaupimasis.<br>Sumažėjęs ūglio augimas, šaknų augimo slopinimas. |

### 1.3.3 Sunkiųjų metalų poveikis gyvūnams ir žmogui

SM taip pat gali tiesiogiai ir netiesiogiai paveikti gyvūnus ir žmogų. SM įprastas kelias: įvairios pramoninės įmonės išmeta metalus į atmosferą, iš jos jie patenka į dirvožemį ir vandenį, tada į maistą ir galiausia kaupiasi gyvūnų ar žmogaus organizme (Krishna, Mohan, 2016). Taigi,

įprastai metalai patenka per virškinimo sistemą su maistu. Kai kurie metalai į organizmą gali patekti ir iš oro juos įkvepiant, o, pavyzdžiui, Pb gali į kūną patekti per odą. Dauguma SM kūne pasiskirsto ir patenka į audinius per kraujo sistemą (Florea, Busselberg, 2006).

Moksliniai tyrimai parodė, kad SM tarša užterštų teritorijų paviršiniame vandenyje gali pakenkti vandens organizmams ląstelės lygmenyje bei paveikti ekologinę pusiausvyrą. Šie toksinai gali paveikti skirtingus žuvų audinius ir organus, tokius kaip odą, inkstus ir smegenis. Pavyzdžiui, tilapijos žuvų odoje vyksta taurinių ląstelių hiperaktyvacija, atsiranda odos melanozė bei granuloma, o užterštuose karpių inkstuose, turinčiuose hialino likučių, gali atsirasti intersticinis nefritas, antinksčių nekrozė ir vykti mononuklearinių ląstelių infiltracija. Smegenyse atsiranda granulomos, meningito ir gliozės simptomai (Zeitoun, Mehana, 2014).

Žmogui specifiniu lėtiniu poveikiu pasižymi Hg, Cd, Be, Pb, V, Zr, Ti ir kiti. Kai žmogaus organizme yra susikaupusios didelės metalų koncentracijos, dažniausiai pasireiškia ūminiai sutrikimai, o esant mažoms koncentracijoms vyksta lėtinis nespecifinis veikimas (Kvederytė, 2008). Kaip ir augalų ląstelėse, SM pagalba susidaro laisvieji radikalai, kurie ląstelėje sukelia OS ir pažeidžia ląstelės membraną, sutrikdo metabolizmą bei pažeidžia genetinę medžiagą (Valko, Morris, 2005). Yra žinoma, kad kai kurie metalai turi kancerogeninį poveikį. Jie gali pažeisti signalinius baltymus, reguliacinius baltymus, kurie dalyvauja apoptozėje, ląstelės ciklo reguliavime, DNR pažaidų taisyme, DNR metilinime, ląstelių augime ir diferenciacijoje (Kim et al., 2015). Kai kurie metalai, pavyzdžiui, Pb ir Mn, gali paveikti centrinę nervinę sistemą ir sukelti neurologinių pažeidimų (Neal, Guilarte, 2012).

Taigi, žmonėms ir gyvūnams pažeidžiama centrinė ir periferinė nervų sistema, sutrinka kraujodaros organų bei vidaus sekrecijos liaukų veikla, sutrikdoma lytinės sistemos funkcija. SM perteklius organizme pagreitina aterosklerozę, piktybinių navikų atsiradimą. Svarbu tai, kad daugelis metalų organizme kaupiasi, o simptomai pasireiškia tik po kurio laiko (Kvederytė, 2008).

### 1.4 Tyrimų oksidacinio streso sukeltam poveikiui augalinėse sistemose įvertinti apžvalga

Antropogeninės kilmės SM yra labai toksiški ir dirvožemyje išlieka labai ilgai. Jie gali lengvai iš aplinkos patekti į mitybos grandinę, neigiamai paveikti augalams svarbias gyvybines funkcijas bei sukelti įvairius sveikatos sutrikimus gyvūnų ir žmogaus organizmuose (Fryzova et

al., 2018; Šiukšta et al., 2018). Dirvožemio tarša SM vyksta nuo senų laikų, tačiau ji drastiškai išaugo prasidėjus industrializacijai ir Žaliajai revoliucijai. Net jei pašalinamas metalų taršos šaltinis, pavyzdžiui, sustabdoma metalurgija užsiimančios įmonės veikla, dirvožemis lieka užterštas ilgam laikui (Ma et al., 1996; Čėsnienė et al., 2017), ir net atlikus nuosėdų valymą, neorganinių teršalų efektyviai pašalinti iš aplinkos nepavyksta (Khosrovyan et al., 2014). Toliau, SM iš dirvožemio gali patekti į augalo organizmą ir sutrikdyti fiziologinių ir biocheminių procesų veiklą (Anjum et al., 2015). Per pastarąjį dešimtmetį atliekant intensyvius tyrimus buvo pastebėta, kad didžiausią žalingą poveikį augalams daro SM sąlygotas OS (Shahid et al., 2014; Uzilday et al., 2015). OS metu susidaro RDF, kurie pažeidžia ląstelių membranas, chloroplastų pigmentus, įvairius fermentus, nukleorūgštis (Gupta et al., 2013). Daugelis tyrimų parodė, kad jie paveikia genetinę augalų medžiagą: susidaro mikrobranduoliai (MB), sutrūksta DNR grandinė, susidaro tarpgrandininės sąsiuvos, vyksta bazių delecijos ar modifikacijos bei kiti DNR ir chromatino pažeidimai (Shahid et al., 2014). Vis dėlto, tyrimų, kuriuose bandoma išsiaiškinti SM poveikį ekotoksikologiniame kontekste, yra nedaug (Avalyan et al., 2017). Dirbtinai pritaikytas vieno ar poros metalų mišinys, neparodo gamtoje egzistuojančių sudėtingų SM tarpusavio ryšių. Pavyzdžiui, dirvožemyje, kuris užterštas keliais elementais, gali susidaryti tiek antagonistiniai, tiek sinergetiniai SM ryšiai, pakeičiantys kiekvieno metalo toksiškumą ir bendrą poveikį augalams, jų biochemijai ir fiziologijai. Todėl svarbu skirti daugiau dėmesio šiai sričiai ir gilinti žinias apie gamtoje egzistuojančių metalų mišinių poveikį. Be to, patartina derinti kelis metodus, nes naudojant skirtingus metodus galima gauti išsamesnius ir labiau patikimus rezultatus. Dažniausiai SM toksiško poveikio įvertinimui yra atliekama biocheminių žymenų analizė, molekulinių žymenų tyrimai, ir įvertinamas metalų cito/genotoksiškumas (Cenkci et al., 2009; Čėsnienė et al., 2017; Šiukšta et al., 2018). Tiriant konkrečios medžiagos poveikį, dažniau atliekama analizė *in vitro*, genotoksikologinėje srityje stengiamasi skirti daugiau dėmesio ir *in vivo* tyrimams, nes jie atskleidžia, kaip toksinai veikia natūralioje aplinkoje (Hayashi, 2016), kas ir buvo atliekama šio bakalaurinio tyrimo metu.

### 1.4.1 Biocheminiai žymenys oksidaciniam stresui įvertinti

Kaip jau buvo minėta, SM patekę į organizmą ląstelėje gali sutrikdyti įvairius biocheminius procesus. Patekus metalui ar metalų mišiniui į ląstelę, kaip atsakas į sukeltą stresą,

padidėja RDF kiekis, kuris gali sukelti lipidų peroksidaciją, pažeisti baltymų funkcijas, chlorofilus bei kai kuriuos metabolizmo kelius, pavyzdžiui, elektronų pernešimo grandinę ar ATP gamybą (Arora et al., 2002; Ruley et al., 2004; Semane et al., 2010). Vis dėlto, augalai turi antioksidacinės gynybos sistemą, kurios pagalba yra stengiamasi išlaikyti pusiausvyrą tarp susidariusių toksiškų deguonies formų. Tai sudėtingi RDF šalinimo mechanizmai, kurie veikia tiek molekuliniame, tiek ląsteliniame lygyje. Šie mechanizmai slopina arba sulėtina biomolekulių oksidacijos procesą, sumažina ląstelių oksidacinius pažeidimus ir didina atsparumą SM (Michalak, 2006; Rastgoo, Alemzadeh, 2011). Augalo antioksidantinėje gynybos sistemoje dalyvauja fermentai, tokie kaip superoksido dismutazė (SOD), peroksidazė (POX), katalazė (CAT), glutationo reduktazė (GR), monodehidroaskorbato reduktazės (MDHAR), dehidroaskorbato reduktazės (DHAR), ir mažos molekulinės masės nefermentiniai antioksidantai, kaip cisteinas, askorbo rūgštis, tioliai, laisvas prolinas (Singh, Sinha,2005), karotenoidai, glutationai, fenoliai bei azoto junginiai (Michalak, 2006). Taigi, siekiant įvertinti metalų toksiškumą bei koks yra augalo atsakas į sukeltą metalo stresą, yra atliekami šių biocheminių žymenų tyrimai. Vertinant užteršto dirvožemio sukeltą OS augalui, dažnai yra įvertinami askorbo rūgšties, karotenoidų, vandenilio peroksido, laisvo prolino kiekiai, chlorofilų a ir b santykis (Šiukšta et al., 2018). Pavyzdžiui, remiantis Abraham ir kolegų (2010) duomenimis, laisvo prolino lygio nustatymas yra naudinga analizė, siekiant stebėti fiziologinius pokyčius ir vertinti aukštesniųjų augalų toleranciją sukeltam stresui. Laisvo prolino gali padidėti augaluose, kurie yra paveikiami šalčiu, esant sausrai, aplinkoje padidėjus druskingumui, dirvožemyje atsiradus SM ar kai augalas paveikiamas konkrečių patogenų. Biocheminiams žymenims įvertinti gali būti naudojami įvairūs metodai. Pavyzdžiui, laisvo prolino kiekis gali būti įvertintas atliekant izatino popieriaus analizę – paprastai naudojama esant dideliems mėginių kiekiams, atliekant kolorimetrinius matavimus – kiekybinė ir patikima analizė bei HPLC (angl. *high-performance liquid chromatography*) paremta amino rūgščių analizė – taikoma, kai lyginamos visų amino rūgščių koncentracijos (Abraham et al., 2010). Šio bakalaurinio darbo tyrimų metu buvo naudoti metodai, kurie remiasi kolorimetriniais matavimais.

### 1.4.2 Molekuliniai žymenys genotoksiškumui įvertinti

1993 m. Dr. Kary Mullis už išrastą polimerazės grandininę reakciją (PGR) buvo apdovanotas Nobelio premija (Atiezar, Jha, 2006). Ši technologija molekulinės biologijos srityje sukėlė perversmą. Ji naudojama įvairiose tyrimų srityse: evoliucijoje, klinikinėje medicinoje, kriminalistikoje, patogenų identifikavime. Bėgant laikui buvo sukurti nauji PGR pagrįsti metodai. Pirmiausia buvo sukurtas atsitiktinai amplifikuotos polimorfinės DNR metodas (RAPD, angl. *random amplified polymorphic DNA*) (Welsh, McClelland, 1990; Williams et al., 1990), ir atsitiktinai inicijuojamas (angl. *arbitrarily primed*) PGR (AP-PGR). Taip pat buvo sukurtos ir kitos metodikos, kaip DNR „pirštų antspaudai“ (DAF, angl. *DNA amplification fingerprinting*) (Caetano-Anolles et al., 1991). RAPD, AP-PGR ir DAF yra pusiau kiekybiniai metodai, kuriuos iš pradžių naudojo genetiniame kartografavime, taksonomijoje ir filogenezėje (Welsh, McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Welsh et al., 1991; Bassam et al., 1992). Pavyzdžiui, RAPD metodas buvo naudojamas aptikti polimorfizmams, nustatyti organizmo kilmei, sudaryti genetinius žemėlapius, identifikuoti veisles, atpažinti parazitų atsparumo genams, ir kaip lyties žymekliai. Taip pat RAPD ir kiti su juo susiję metodai naudojami genotoksiškumo ir kancerogenezės tyrimuose (Atiezar, Jha, 2006). Visi trys metodai yra pagrįsti selektyviu genominių sekų, prie kurių atsitiktinai prisijungia atitinkamai parinktas pradmuo, amplifikacija. Jei dvi genomo DNR sekos yra skirtingos, PGR produktai rodo skirtingus amplikonų spektrus. Taip aptikti polimorfizmai gali būti naudojami kaip taksonominiai žymenys organizmų populiacijų tyrimuose (Welsh et al., 1992). Nors ir RAPD, AP-PGR ir DAF metodai panašūs, yra ir keletas techninių skirtumų. Praktiniu požiūriu RAPD metodas yra geriausias, nes jam atlikti nereikia naudoti radionuklidų ar atlikti elektroforezės akrilamido gelyje bei yra lengva vizualizuoti PGR produktus. Dėl to, lyginant su kitais metodais, RAPD įvairiuose eko(geno)toksikologiniuose tyrimuose yra taikomas kur kas dažniau (Atiezar, Jha, 2006).

Ekotoksikologijos srityje naudojant RAPD metodą yra aprašomi tokie pokyčiai: juostos intensyvumo skirtumai, juostų atsiradimas ar dingimas. Paprastai toks juostelių pokyčių atsiradimas naudojamas įvertinti tiriamų organizmų panašumams ir jų įvairovei. Vėliau RAPD juostos yra įvertinamos skaitmeniniame lygmenyje: jei juostelė yra matoma, tada vertinama „1“, o jei nėra – „0“. Taip pat yra sukurti statistiniai įrankiai, kurie leidžia įvertinti RAPD pagrįstą įvairovę ir panašumo rodiklius (t.y. fenetinė skaitinė analizė) bei toksinais paveiktų populiacijų

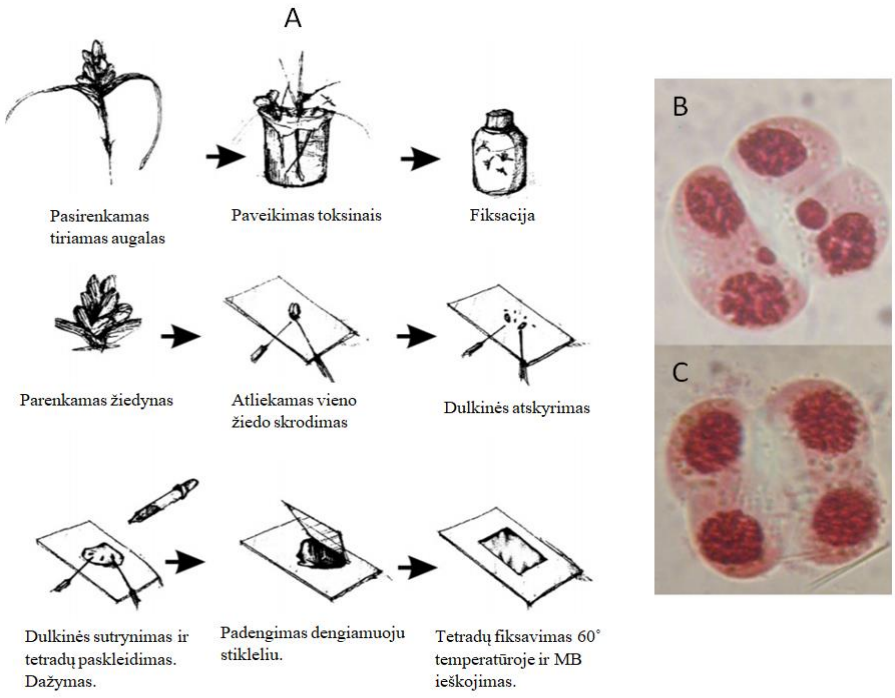
genetinę struktūrą (t.y. genetinė skaitinė analizė) (Atiezar, Jha, 2006). Šis metodas yra techniškai paprastas, naudojami nedideli DNR kiekiai ir gali būti atliktas daugelyje laboratorijų, todėl jis labai plačiai naudojamas. Vis dėlto, šis metodas turi ir trūkumų: prastas žymenų atkuriamumas ir įprastai žymenys nėra genų regionuose (Jones et al., 1997; Collard, Mackill, 2009). Siekiant pašalinti šiuos trūkumus, buvo sukurtas kitas metodas – koncervatyvus DNR išvestas polimorfizmas (CDDP, angl. *conserved DNA-derived polymorphism*). Šiam metodui naudojami ilgesni pradmenys ir aukštesnė prilydimo temperatūra, taip pagerinant DNR dauginimą. Be to, šio metodo metu naudojami pradmenys yra nukreipti į koduojančias sritis (Andersen, Lubberstedt, 2003, Collard, Mackill, 2009). Būtent dėl šio metodo paprastumo, plataus naudojimo ir tikslingumo, šio bakalaurinio darbo tyrimui jis buvo pasirinktas įvertinti polimorfizmus, kuriuos lemia padidėjusi SM koncentracija dirvožemyje.

### 1.4.3 Cito(geno)toksiniai tyrimai

Citogenetika tai tyrimų sritis, kurioje nagrinėjamos įvairios chromosomų ir su jomis susijusios anomalijos. Šios anomalijos gali atsirasti natūraliai, bet dažnai yra sukeliamos ir įvairių toksinų. Atliekant genotoksinius tyrimus yra naudojami įvairūs metodai, tačiau siekiant patikimai įvertinti genotoksiškumą beveik visada yra atliekama mikrobranduolių analizė. Mikrobranduoliai (MB) buvo atrasti XIX a. pabaigoje, kai buvo pastebėti maži intarpai kraujo, kuris buvo paimtas iš kačių ir žiurkių, ląstelėse. 1959 m. Evans su kolegomis MB pastebėjo ir kiekybiškai įvertino chromosomų aberacijas naudojant raudonųjų pupelių šaknų ląsteles (Evans et al., 1959; Hayashi, 2016). Tai buvo pirmoji ataskaita, skirta įvertinti chromosomų aberacijas. Dabar, MB tyrimai su ankstyvomis žiedadulkių tetradinėmis ląstelėmis, yra dažniausiai naudojami biologiniai tyrimai su augalais, siekiant įvertinti aplinkoje esančių genotoksinų poveikį. Yra įrodyta, kad naudojant šį metodą galima lengvai aptikti aplinkoje esančius toksinus, tokius kaip SM, radionuklidai, pesticidai. Taip pat, palyginus mitotinių (šaknies viršūnės) ir mejozinių ląstelių MB rezultatus (1.4.3.1 pav., B), buvo parodyta, kad mejozinės ląstelės yra jautresnės toksinams (Mišik et al., 2011).

Įprastai atliekant MB analizę, pirmiausia augalai yra paveikiami tiriamais toksinais, pavyzdžiui, pasodinami į SM užterštą dirvožemį ar laistomi užterštu vandeniu. Priklausomai nuo to ar tai ilgalaikio, ar trumpalaikio poveikio tyrimas, atitinkamu laiku yra surenkami ir

užfiksuojami dar neprasiskleidę žiedynai. Galiausiai, žiedadulkės yra dažomos ant objektinio stiklelio ir stebimos mikroskopu (1.2 pav., A) (Mišik et al., 2011).



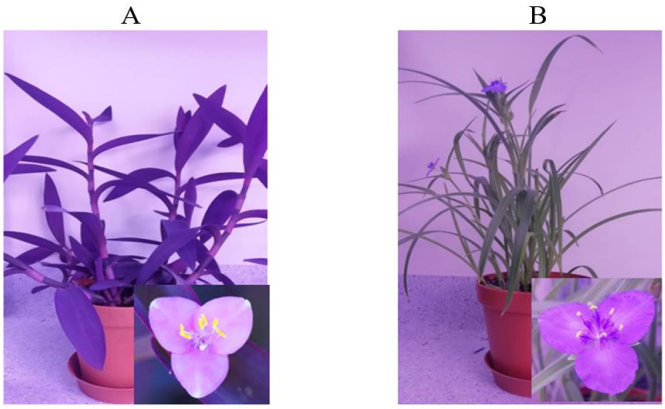

1.2 pav. Objektinio stiklelio paruošimo žingsniai (A) ir ankstyvosios *Tradescantia* žiedadulkių tetrados su MB (B) ir be MB (C) (Mišik et al., 2011)

## 1.5 Augalams sukeliamo oksidacinio streso tyrimai panaudojant *Tradescantia* genties sistemas

*Tradescantia* augalai yra vieni iš dažniausiai naudojamų augalų įvairių toksinų poveikiui tirti (Mišik et al., 2011). Jie gali būti naudojami vertinant tiek ilgalaikį, tiek trumpalaikį poveikį. Šie augalai gali būti lengvai kultivuojami tiek laboratorijoje, tiek lauko sąlygomis. Kadangi tai yra daugiamečių augalų grupė, *Tradescantia* yra tinkama tirti genetinių mutacijų dinamiką ekosistemoje. Šis modelinis organizmas gali būti panaudotas oro, vandens ir dirvožemio taršos tyrimuose. Genotoksiškumui tirti gali būti naudojamos tiek somatinės, tiek mitotinės, tiek generatyvinės ląstelės.

Dažniausiai aplinkos taršos tyrimams naudojamas *Tradescantia* #4430 (1.3 pav., B), kuris yra sterilus dviejų *Tradescantia* rūšių hibridas (*T. hirsutiflora ir T. subacaulis*). Šis klonas yra sterilus ir dauginamas tik vegetatyviniu būdu, taip užtikrinant bandomosios medžiagos genetinį

vienodumą (Bloom, Serres, 1995). *Tradescantia* #4430 yra plačiai naudojamas įvairių cheminių junginių, skirtingos taršos oro, vandens, dirvožemio genotoksiniuose tyrimuose. Taip pat svarbu, kad šis augalas yra tinkamas tiesioginiam ilgalaikiui ir trumpalaikiui poveikiui tirti. *Tradescantia* klonas yra ypač jautrus genotoksinams ir jo sistemos, kurios naudojamos stebėti toksinų poveikiui, yra gerai ištirtos (Čėsnienė et al., 2014). Dėl savo savybių, šis klonas buvo naudojamas stebėti radiacijos lygio kitimui aplink branduolines elektrines Japonijoje, ir išmatuoti spinduliuotės genotoksinį poveikį Černobylio branduolinės elektrinės teritorijoje (Bloom, Serres, 1995). Vis dėlto, *Tradescantia* klonas yra netinkamas tyrimams esant atogrąžų klimatui – dažnai atsiranda augimo ir žydėjimo sutrikimų. Taip pat šį augalą puola parazitai ir vabzdžiai, todėl jo naudojimas lauko tyrimuose yra ribotas (Suyama et al., 2002).




1.3 pav. *Tradescantia pallida* (A) ir *Tradescantia* # 4430 (B)

Kitas toksinams tirti naudojamas augalas – *Tradescantia pallida* (1.3 pav., A). Ispanijoje jis yra plačiai paplitęs dekoratyvinis augalas, kuris auginamas soduose ir palei gatves (Suyama et. al., 2002). *T. pallida* yra neaukšta, sultinga višžalė daugiametė žolė. Lapai yra pailgos ir smailios formos, žalios ir tamsiai violetinės spalvos. Žiedai yra maži, baltos, rožinės arba raudonos spalvos, prasiskleidžia ryte. Šis augalas yra pakankamai atsparus aplinkos poveikiui (Suyama et. al., 2002). Atlikti tyrimai parodė, kad *T. pallida* augale kaupiasi SM, ir kad jis jautrus aplinkos genotoksinams, todėl šis augalas gali būti naudojamas kaip bioindikatorius aplinkos taršai tirti (Hunt, 1975). Kai kurie autoriai teigia, jog *T. pallida* yra toks pat jautrus kaip #4430 ir kiti klonai (Suyama et al., 2002; Mielli et al., 2009), tačiau, kad būtų galima daryti tokias išvadas, dabartinėse duomenų bazėse apie tai yra per mažai informacijos ir sistemingų išsamių tyrimų (Mišik et al., 2011).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

2.1 lentelė. Tyrime naudotos medžiagos

| **Cheminė medžiaga** | **Gamintojas** |
|---|---|
| 10 × DreamTaq Green buferinis tirpalas | Thermo Scientific (Lietuva) |
| Etanolis (96 %) | AB „Vilniaus degtinė“ (Lietuva) |
| Ledinė acto rūgštis | MERK (Vokietija) |
| Aliuminio chloridas | AppliChem (Vokietija) |
| Askorbo rūgštis | Sigma (Jungtinė Karalystė) |
| EDTA 0,5 M | Sigma (Vokietija) |
| Fosforo rūgštis | Alfa Aesar (Vokietija) |
| Kalio fosfatas | Sigma (JAV) |
| Kalio jodidas | Sigma (JAV) |
| L-prolinas | Roth (Vokietija) |
| Metafosforo rūgštis | Roth (Vokietija) |
| Metanolis | Fluka (Vokietija) |
| N,N-dimetilformamidas | Fluka (Vokietija) |
| $Na_2HPO_4$ | Roth (Vokietija) |
| Natrio acetatas | Sigma-Aldrich (Vokietija) |
| Natrio chloridas | Fluka (Vokietija) |
| Natrio molibdatas | Roth (Vokietija) |
| Ninhidrinas | Alfa Aesar (Vokietija) |
| Ortofosforo rūgštis | Alfa Aesar (Vokietija) |
| PVP-40 | Roth (Vokietija) |
| Salicilo rūgštis | Sigma (Vokietija) |
| Sieros rūgštis | Fluka (Vokietija) |
| Sterilus dejonizuotas vanduo | Thermo Scientific (JAV) |
| Sulfosalicilo rūgštis | Alfa Aesar (Vokietija) |
| Toluenas | Alfa Aesar (Vokietija) |
| Trichloracto rūgštis (TCA) | Merk (Vokietija) |
| Triobarbitūro rūgštis (TBA) | Sigma (JAV) |
| TRIS (1 M) | Applishem (Vokietija) |
| Vandenilio peroksidas (35 %) | Roth (Vokietija) |
| β-merkaptoetanolis | Sigma-Aldrich (Vokietija) |
| Agarozė | Thermo Scientific (JAV) |
| Boro rūgštis | Sigma (Vokietija) |
| CDDP pramenys (10 ρmol/μL) | Metabion (Olandija) |
| CTAB (10%) | Sigma (JAV) |
| DNR dydžio standartas: GeneRuler Ladder Mix | Thermo Scientific (Lietuva) |

2.1 lentelės tęsinys

| | |
|---|---|
| dNTP mišinys (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (po 2mM kiekvieno) | Thermo Scientific (Lietuva) |
| DreamTaq polimerazė (5U/ µL) | Thermo Scientific (Lietuva) |
| Etidžio bromidas (10mg/mL) | Sigma-Aldrich (JAV) |

## 2.2 Metodai

### 2.2.1 Tyrimo objektas

Tyrimui naudoti du modeliniai augalai: *Tradescantia pallida* ir *Tradescantia* #4430. Abiejų genčių *Tradescantia* modeliniai augalai padauginti vegetatyviniu būdu. Tokiu būdu padaugintų augalų genotipai yra suvienodinti, siekiant atmesti genotipo poveikį rezultatams.

Kiekviena augalų rūšis pasodinta į keturis skirtingus dirvožemius: kontrolinį, iš Vitės pagrindinės mokyklos Klaipėdoje (VITE), iš Verkšionių žvyro karjero teritorijos (VERKŠ) ir iš Vilniaus miesto buvusios grąžtų gamyklos UAB „Rimeda“ (GRD) teritorijų. Šių dirvožemių cheminę analizę atliko Dr. R. Taraškevičius (Gamtos tyrimų centras).

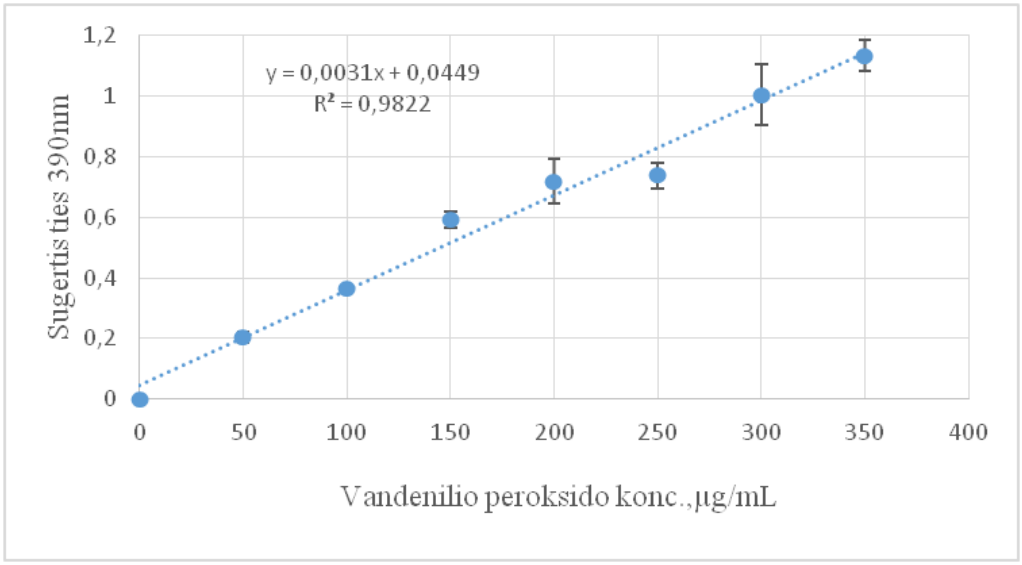
Fiksuotos augimo sąlygos: 16 h diena, 8 h naktis, 20 – 22 °C temperatūra. Visų mėginių biocheminė analizė atlikta praėjus 1 mėn., 6 mėn. ir 12 mėn. po augalų pasodinimo į dirvožemius. DNR išskirta praėjus 3 mėn. po pasodinimo. Augalai buvo auginami VU GMC Botanikos ir genetikos katedros šiltnamyje.

*T. pallida* augalai išgyveno visus 12 mėn., *Tradescantia* #4430 augalai po 6 mėn. išgyveno tik GRD ir VERKŠ dirvožemiuose, o praėjus 12 mėn. užterštuose dirvožemiuose visi augalai išmirė.

### 2.2.2 Vandenilio peroksido koncentracijos tyrimas

Vandenilio peroksido kiekiui nustatyti naudotas Velikovos ir Loreto protokolas (2005). 50 mg lapo homogenizuota su 0,5 mL 0,1 % (w/v) atšaldyta trichloracto rūgštimi (TCA) ir nucentrifuguota 13500 rpm 15 minučių. Tada, 250 µL tirpalo sumaišyta su tokio paties tūrio 10 mM fosfato buferinio tirpalo (pH = 7) ir dviem tūriais 1 M KI. Mėginiai laikomi ant ledo, šaltai. Kontrolei kaip supernatantas naudota 0,1 % TCA. Absorbcija stebima 390 nm bangos ilgiu.

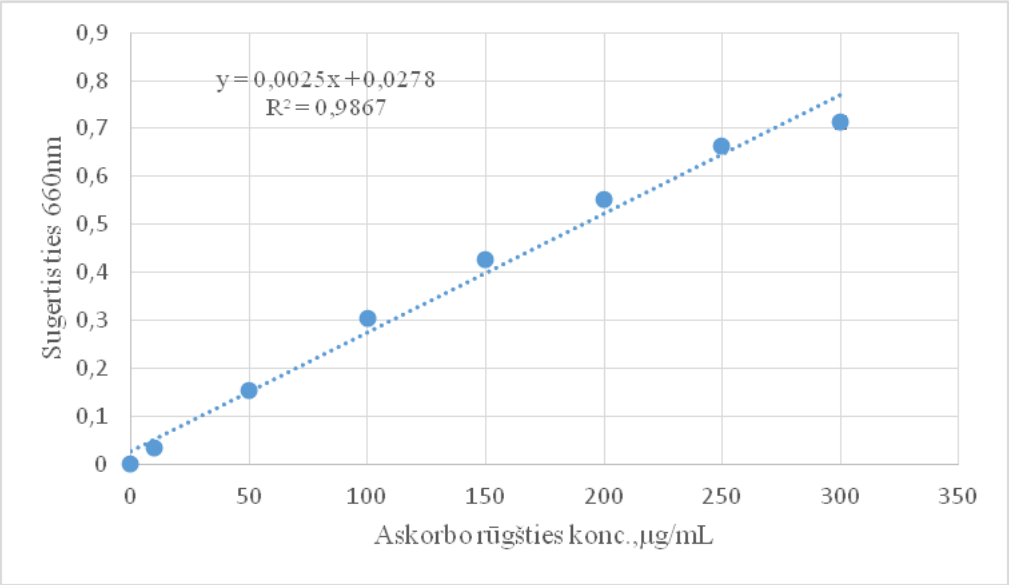
Vandenilio peroksido kiekis įvertintas sudarant kalibracinę kreivę (2.1 pav.). Gautos vandenilio peroksido koncentracijos µM/L perskaičiuotos į µM/g šviežios masės.




2.1 pav. Vandenilio peroksido kalibracinė kreivė

### 2.2.3 Askorbo rūgšties kiekio tyrimas augaluose

Askorbo rūgšties kiekiui nustatyti naudotas modifikuotas Mitsui ir Ohta protokolas (1961). 60 mg lapo homogenizuota su 1 mL 5 % metafosforo rūgšties ir nucentrifuguota 13500 rmp 10 minučių. Tada, atšaldytas tirpalas, kuris susideda iš 500 µL 2 % natrio molibdato ir 500 µL 0,15 N sieros rūgšties, sumaišomas su 250 µL 1,5 mM $Na_2HPO_4$ ir 250 µL tirpalo su augalu. Gautas tirpalas inkubuotas 60 °C 40 minučių. Mėginiai su tirpalu staigiai atšaldyti ledo vonioje. Kontrolei kaip supernatantas naudota 5 % metafosforo rūgštis. Absorbcija matuota 660 nm bangos ilgiu. Askorbo rūgšties kiekis įvertintas sudarant kalibracinę kreivę (2.2 pav.). Gautos askorbo rūgšties koncentracijos µg/mL perskaičiuotos į µg/g šviežios masės.



2.2 pav. Askorbo rūgšties kalibracinė kreivė.

### 2.2.4 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas

Fotosintezės procese yra ypač svarbūs chlorofilai a ir b bei karotenoidai. Atsižvelgiant į jų kiekius augale, galima spręsti apie fotosintezės efektyvumą. Jų kiekis matuotas naudojantis Minocha ir kolegų (2009) pasiūlytu protokolu. Du lapo diskeliai (6 mm skersmens) pasverti ir panardinti į 2 mL N,N-dimetilformamidą. Mėginiai laikomi tamsoje 4 °C ne trumpiau nei 48 valandas. Tirpiklio kontrolei naudotas N,N-dimetilformamidas. Absorbcija matuota 664 nm, 647 nm (chlorofilai a ir b) ir 480 nm (visi karotenoidai) bangos ilgiais.

Chlorofilo a kiekis apskaičiuotas pagal formulę: $(12 \times A_{664}) – (3{,}11 \times A_{647})$

Chlorofilo b kiekis apskaičiuotas pagal formulę: $(20{,}78 \times A_{647}) – (4{,}88 \times A_{664})$

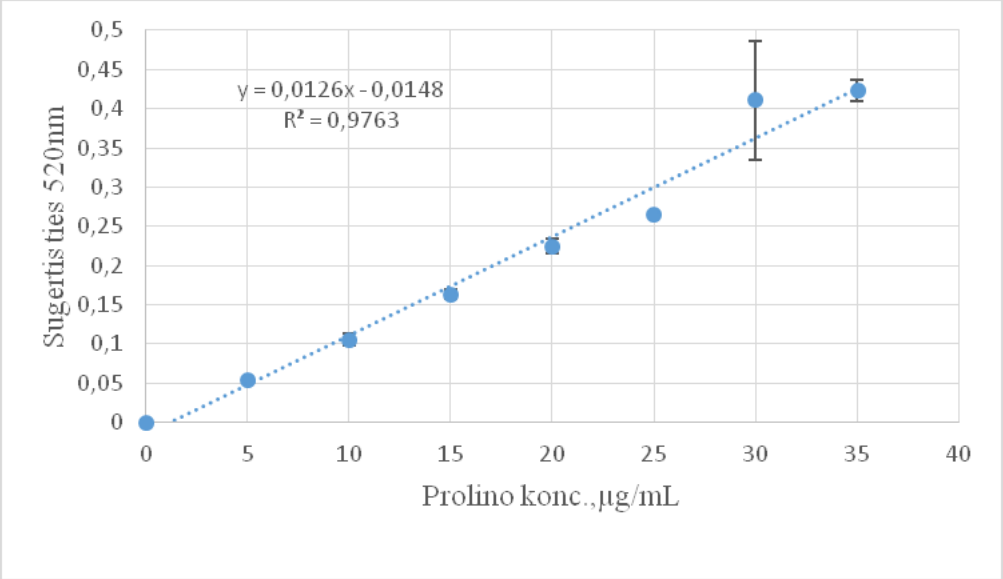
Karotenoidų kiekis apskaičiuotas pagal formulę: $(1000 \times A_{480} – 1{,}12Ca^* – 34{,}07Cb^*) / 245$

* Čia Ca – chlorofilo a kiekis, o Cb – chlorofilo b kiekis.

### 2.2.5 Prolino kiekio augale tyrimas

Laisvo prolino kiekiui augaluose nustatymui naudotas Abraham ir jo kolegų (2010) protokolas. 100 mg augalo audinio sutrinama su 500 µL 3 % sulfosalicilo rūgštimi. Homogenizuotas tirpalas 5 minutes nucentrifuguotas kambario temperatūroje 13500 rpm

(maksimaliu greičiu). Atskiruose mėgintuvėliuose paruošiamas tirpalas: 150 µL 3 % sulfosalicilo rūgšties, 300 µL ledinės acto rūgšties, 300 µL ninhidrino rūgšties. Ninhidrino rūgšties paruošimas (25-iems mL): 0,625g ninhidrino, 15 mL ledinės acto rūgšties, 10 mL 6 M ortofosforo rūgšties. Į mėgintuvėlius su paruoštu tirpalu įpilta 100 µL tirpalo su augalo ekstraktu ir viskas gerai išmaišyta. Tirpalai inkubuojami 96 °C 60 minučių. Po inkubacijos mėgintuvėliai su tirpalu staigiai atšaldyti ledo vonelėje. Atšaldyti mėginiai ekstraktuojami toluenu: į reakcijos mišinį pridėta 1,5 mL tolueno, suvorteksuota 60 sekundžių ir palikta nusistovėti 5 minutes. Surenkamas tolueno (viršutinis) sluoksnis. Absorbcija matuojama ties 520 nm. Kontrolei kaip supernatantas naudojamas toluenas. Laisvo prolino kiekis įvertintas sudarant kalibracinę kreivę (2.3 pav). Gautos prolino koncentracios µg/mL perskaičiuotos į µg/g šviežios masės.




2.3 pav. Prolino kalibracinė kreivė.

### 2.2.6 Lipidų peroksidacijos tyrimas

Lipidų peroksidacijos produkto – malondialdehido (MDA), kiekio augalo lapuose nustatymui naudotas Daud ir jo kolegų (2014) protokolas. 100 mg audinio homogenizuota su 2 mL 0,25 % tiobarbitūro rūgštimi (TBA) ir tada, ištirpinta 10 % trichloracto rūgštyje (TCA). Tirpalas pakaitinamas 95 °C 30 minučių ir staigiai atšaldomas ledo vonelėje. Mėginiai nucentrifuguojami 5000 rpm 10 minučių. Absorbcija matuojama 532 nm ir 600 nm ilgio bangomis. Gauti rezultatai nM/mL perskaičiuoti nM/g šviežios masės.

Lipidų koncentracija apskaičiuota pagal Hodges ir kolegų išvestą formulę (1999):

$MDA = (((A_{532} – A_{600}) – ((A_{440} – A_{600}) \times 0{,}0571))/ 157000) \times 10^6$

### 2.2.7 DNR išskyrimas CTAB metodu

DNR išskyrimui CTAB metodu naudotas modifikuotas Doyle ir Doyle (1990) protokolas. Apie 100 mg augalinės medžiagos homogenizuota su 0,8 mL ekstrakcijos buferiniu tirpalu (2.2 lentelė).

2.2 lentelė. Ekstrakcijos buferinio tirpalo sudėtis (50-čiai pavyzdžių). Buferinis tirpalas gamintas pagal eiliškumą

| **Eiliškumas** | **Medžiaga** | **Medžiagos kiekis** |
|---|---|---|
| 1. | EDTA (0,5 M) | 2 mL |
| 2. | TRIS (1 M) | 5 mL |
| 3. | NaCl (5 M) | 13,75 mL |
| 4. | PVP-40 | 500 mg |
| 5. | CTAB (10 %) | 10 mL |
| 6. | β-merkaptoetanolis | 100 µL |
| 7. | Dejonizuotas $H_2O$ | Iki 50 mL |

Mėginiai inkubuoti termostate 25 min. + 60 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai atvėsinti iki kambario temperatūros ir į kiekvieną įpilta 1 mL cloroformo, sumaišyti pavartant ir nucentrifuguoti mikrocentrifugoje 3 minutes 13500 rpm. Nucentrifuguotų mėginių viršutinė fazė, kurioje yra DNR, nusiurbiama (iki 500 µL) į naujus mėgintuvėlius. Į juos įpilta po 250 µL 5 M NaCl ir gerai sumaišyta. Tada, įpilta po 1 mL 95 % etanolio. Mėginiai sumaišyti vartant ir laikyti 30 minučių – 20 °C temperatūroje. Atšaldyti mėginiai su nusėdusia DNR centrifuguoti 5 minutes 13500 rpm ir atsargiai pašalintas supernatantas. DNR praplauta 200 µL 70 % etilo alkoholiu ir centrifuguota 5 minutes 13500 rpm bei atsargiai nupiltas supernatantas. Etilo alkoholio likučiai atsargiai surinkti pipete ir DNR palikta išdžiūti steriliame bokse. Išdžiuvusi DNR ištirpdyta 50 µL steriliame dejonizuotame (18,3 MΩ) vandenyje. DNR koncentracija ir jos kokybė buvo matuojama su NanoDrop 2000 (JAV), ir atskiesta steriliu dejonizuotu vandeniu iki 5 ng/µL. Gauti 54 mėginiai laikyti -20 °C.

### 2.2.8 Genotipavimas naudojant CDDP pradmenis

Pirmiausia, atliekant genotipavimą CDDP (angl. *conserved DNA-derived polymorphism*) pradmenimis buvo sumaišyti PGR reakcijos mišiniai (2.3 lentelė.). Mišiniai skyrėsi naudotais pradmenimis ir DNR.

2.3 lentelė. PGR reakcijos mišinio sudėtis

| **Komponentas** | **Kiekis 1 mėginiui (µL)** | **Kiekis 50 mėginių (µL)** |
|---|---|---|
| Sterilus dejonizuotas $H_2O$ | 8,31 | 415,5 |
| Dream Taq polimerazė (5U/µL) | 0,09 | 4,5 |
| DNR (5 ng/µL) | 3 | 150 |
| CDDP pradmuo (10 ρmol/µL) | 0,6 | 30 |
| 10× Dream Taq Green buferinis tirpalas | 1,5 | 75 |
| dNTP mix (po 2 mM kiekvieno) | 1,5 | 75 |
| Iš viso: | 15 | 750 |

Toliau, atliktas DNR pagausinimas PGR metodu. Visiems pakartojimams buvo naudojamos tos pačios sąlygos (2.4 lentelė.). Atitinkamiems pradmenims parinkta jiems tinkama prilydimo temperatūra (2.6 lentelė.).

2.4 lentelė. Gausinimo CDDP PGR metodu vykdymo sąlygos

| **Ciklų kiekis** | **Etapas** | **Temperatūra ˚C** | **Trukmė (min.)** |
|---|---|---|---|
| 1 | Pirminė denatūracija | 94 | 3 |
| 35 | Denatūracija | 94 | 1 |
| | Pradmenų prijungimas | 54 – 63* | 1 |
| | Komplementarios grandinės sintezė | 72 | 2 |
| 1 | Galutinė sintezė | 72 | 5 |
| 1 | Reakcijų pabaiga | 10 | ∞ |

* Pradmenų prilydimo temperatūra parinkta pagal naudojamą pradmenį, ir sumažinta 5˚C.

PGR reakcijos metu gauti genotipavimo produktai buvo išskirstyti naudojant 1,5 % agarozės gelį (2.5 lentelė). Kaip DNR dydžio standartas naudotas „GeneRuler DNA Ladder Mix“ (Thermo Scientific). DNR į gelį suleista naudojant 70 V įtampą, kuri vėliau padidinta iki 105 V.

2.5 lentelė. Agarozės gelio sudėtis

| **Komponentas** | **1,5 % agarozės gelis (250 mL)** |
|---|---|
| Agarozė | 3,25 g |
| 5× TBE buferinis tirpalas* | 50 mL |
| Etidžio bromidas (10 mg/mL) | 18,75 µL |
| Dejonizuotas $H_2O$ | Iki 250 mL |

* 5× TBE buferinio tirpalo sudėtis (500 mL): TRIS bazė 27 g, boro rūgštis 13,75 g, EDTA 0,19 g, dejonizuotas vanduo iki 500 mL.

### 2.2.9 CDDP pradmenų atranka

Pradmenų atranka buvo atliekama iš 21 pradmens, nukreiptų į 6 genų šeimas (2.6 lentelė). *WRKY* genų šeimą sudaro svarbūs transkripcijos veiksniai, kurie atsakingi už augalų fiziologinius pokyčius ir atsaką į biotinį ir abiotinį stresą (Song et al., 2018). *Myb* genai sudaro vieną didžiausių augalų transkripcijos veiksnių šeimą, daugelis jų dalyvauja augalų vystymesi bei manoma, kad dalyvauja ląstelių ciklo reguliavime (Citerne et al., 2010). *ERF* genų šeimos transkripcijos veiksniai atsakingi už augalų vystymąsi ir augimą, atsaką į biotinį ir abiotinį stresą (Liu et al., 2019). *KNOX* genai koduoja homeodomenus turinčius transkripcijos veiksnius, kurie reikalingi meristemos palaikymui ir tinkamam organų iniciacijos modeliavimui (Hay, Tsiantis, 2010). *MADS* genai dalyvauja vegetatyviniame augime ir dauginimosi procesuose, yra būtini žiedynų ir vaisių vystymuisi (Sheng et al., 2019). *ABP1* genas koduoja auksiną prisirišantį baltymą, kuris dalyvauja daugelyje gyvybinių procesų kaip greitai reaguojanti signalinė molekulė plazminėje membranoje (Dahlke et al., 2010). Kiekvienai šių genų šeimai buvo pasirinkta po vieną pradmenį. Siekiant geresnių rezultatų pasirinkti pradmenys, su kuriais gauta daugiausia amplikonų naudojant *Tradescantia* #4430 ir *T. pallida*. Pasirinkti pradmenys: WRKY-R3B, Myb1, ERF2, KNOX-3, MADS-4, ABP1-3.

2.6 lentelė. Šešioms genų šeimoms atstovaujantys CDDP pradmenys, naudojami genotipavime

| Nr. | Oligo pavad. | Nukleotidų seka | Pradmenų prijungimo temperatūra (˚C) | Atrinkti pradmenys |
|---|---|---|---|---|
| 1 | WRKY-F1 | TGG CGS AAG TAC GGC CAG | 61 | WRKY-R3B |
| 2 | WRKY-R1 | GTG GTT GTG CTT GCC | 49 | |
| 3 | WRKY-R2 | GCC CTC GTA SGT SGT | 52 | |
| 4 | WRKY-R3 | GCA SGT GTG CTC GCC | 54 | |
| 5 | WRKY-R2B | TGS TGS ATG CTC CCG | 52 | |
| 6 | WRKY-R3B | CCG CTC GTG TGS ACG | 54 | |
| 7 | Myb1 | GGC AAG GGC TGC CGC | 57 | Myb1 |
| 8 | Myb2 | GGC AAG GGC TGC CGG | 57 | |
| 9 | ERF1 | CAC TAC CGC GGS CTS CG | 62 | ERF2 |
| 10 | ERF2 | GCS GAG ATC CGS GAC CC | 62 | |
| 11 | ERF3 | TGG CTS GGC ACS TTC GA | 57 | |
| 12 | KNOX-1 | AAG GGS AAG CTS CCS AAG | 58 | KNOX-3 |
| 13 | KNOX-2 | CAC TGG TGG GAG CTS CAC | 61 | |
| 14 | KNOX-3 | AAG CGS CAC TGG AAG CC | 57 | |
| 15 | MADS-1 | ATG GGC CGS GGC AAG GTG C | 66 | MADS-4 |
| 16 | MADS-2 | ATG GGC CGS GGC AAG GTG G | 66 | |
| 17 | MADS-3 | CTS TGC GAC CGS GAG GTC | 63 | |
| 18 | MADS-4 | CTS TGC GAC CGS GAG GTG | 63 | |
| 19 | ABP1-1 | ACS CCS ATC CAC CGC | 54 | ABP1-3 |
| 20 | ABP1-2 | ACS CCS ATC CAC CGG | 54 | |
| 21 | ABP1-3 | CAC GAG GAC CTS CAG G | 56 | |

Nukleotidų sekoje S reiškia, kad šioje vietoje gali būti tiek G (guaninas), tiek C (citozinas).

### 2.2.10 Genotipavimo metu gautų gelių analizė

Genotipavimo metu su kiekvienu pradmeniu buvo atlikti 2 pakartojimai. Agarozės gelyje išfrakcionuoti amplikonai fiksuoti ir vizualizuoti naudojant UV transliuminatorių „BioDocAnalyse“. Amplikonai, kuriuose rasta pasikartojančių pakitimų, buvo suvesti į binarinę matricą. Jeigu amplikonas yra, tada matricoje rašomas 1, o jei nėra – 0. Filogenetinis medis buvo braižytas naudojant programą „TreeCon“, nustačius *Bootstrap* reikšmę su 1000 iteracijų.

## 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 3.1 Tiriamų dirvožemių cheminės analizės apžvalga

Dirvožemių analizė rodo, kad pagal 2015 metų nustatytas pavojingųjų cheminių medžiagų ribinės vertės dirvožemyje higienos normas Lietuvoje, didžiausios leistinos koncentracijos (DLK) kontroliniame dirvožemyje neviršija nei vienas metalas. Tirtuose užterštuose dirvožemiuose DLK viršijo Cr, Cu, Cd, Mo, Hg, Zn ir Pb. Siekiant objektyviai įvertinti dirvožemių toksiškumą, buvo pasirinkta apskaičiuoti kiekvieno dirvožemio bendrą rizikos indeksą (IR) (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. SM, viršijantys DLK ir tiriamų dirvožemių bendras rizikos indeksas

| **Dirvožemio paėmimo vieta** | **Dirvožemio pavadinimo sutrumpinimas** | **DLK* viršijantys metalai** | **Metalų koncentracija dirvožemyje (mg/kg)** | **Kiek kartų viršija DLK*** | **Bendras dirvožemio rizikos indeksas (IR)**** |
|---|---|---|---|---|---|
| Klaipėdos Vitės pagrindinė mokykla | VITE | Cr | 3855 | 48,19 | 96,38 |
| Verkšionių žvyro karjeras | VERKŠ | Cr | 211 | 2,64 | 194,97*** |
| | | Cu | 154 | 2,05 | |
| | | Cd | 2,9 | 1,93 | |
| | | Mo | 9,56 | 1,91 | |
| | | Hg | 1,5 | 3 | |
| | | Zn | 429 | 1,43 | |
| Vilniaus miesto buvusi grąžtų gamykla UAB „Rimeda“ | GRD | Cr | 89 | 1,11 | 58,02*** |
| | | Pb | 98 | 1,23 | |
| | | Mo | 23 | 4,6 | |
| | | Zn | 501 | 1,67 | |
| | | Cd | 2,4 | 1,6 | |

* SM didžiausia leistina koncentracija, remiantis 2015 metų nustatyta higienos norma.

** Bendras ekologinis dirvožemio rizikos indeksas (IR) sudaromas iš visų toksiškų elementų potencialios ekologinės rizikos indeksų sumos, kuri apskaičiuojama naudojant formulę: $RI=\Sigma E^i_r$. $E^i_r$ – individualaus elemento potencialus ekologinės rizikos indeksas, kuris apskaičiuojamas pagal formulę: $E^i_r = \Sigma T^i_r \times C_n / SGV$, $T^i_r$ – elemento toksiškumo indeksas, kuris išreiškia elemento toksiškumo lygį, $C_n$ – duoto elemento koncentracija (mg/kg) tiriamame mėginyje, SGV (angl. *Soil guideline value*) – dirvožemyje leistina elemento koncentracija (mg/kg) (Hakanson, 1980; Stapulionytė et al., 2019).

*** Į bendrą rizikos indeksą neįtrauktas Mo, nes šis metalas nelaikomas toksišku ir nėra dažnai sutinkamas aplinkoje bei jo toksiškumo indeksas nėra apskaičiuotas.

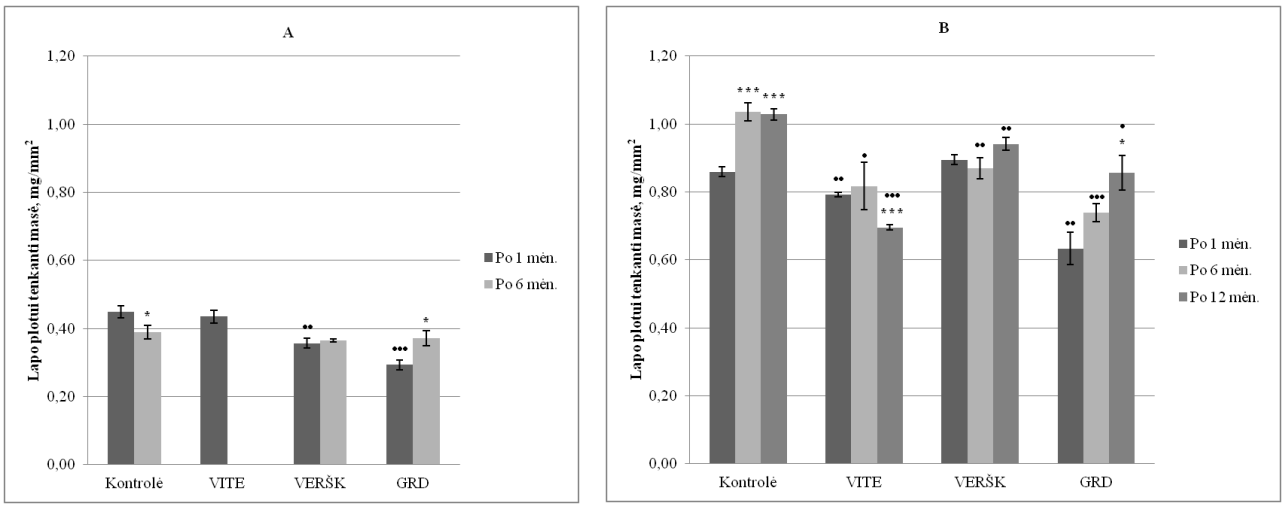
Vertinant IR yra atsižvelgiama į kiekvieno metalo toksiškumo laipsnį ir koncentraciją dirvožemyje, todėl IR yra plačiai naudojamas įvertinti SM, kurie susikaupę dirvožemyje, ekologinės rizikos laipsnį (Zhu et al., 2012; Stapulionytė et al., 2019). Jei IR < 40 – rizikos laipsnis mažas, 40 ≤ RI < 80 – vidutinis, 80 ≤ RI < 160 – didelis, 160 ≤ RI < 320 – labai didelis, ir RI ≥ 320 – nepaprastai didelis (Jiang et al., 2014). Remiantis gautais duomenimis GRD dirvožemio IR yra vidutinis, VITE – didelis, o VERKŠ – labai didelis, taigi, galima manyti, jog GRD bus mažiausiai kenksmingas tiriamiesiems augalams, o VERKŠ labiausiai. Tačiau, svarbu ir tai, kad Zn, Cd, Cu ir Pb augaluose kaupiasi kur kas intensyviau nei Cr. Taip yra dėlto, jog šių metalų savybės yra panašios į augalams fiziologiškai svarbių junginių savybes, todėl šie metalai gali tokius junginius išaktyvinti. Tuo tarpu Cr kaupimasis augaluose yra silpnas (Mačiūnas et. al., 2005; Rutkovienė, Sabienė, 2008). Šiuo požiūriu galima būtų manyti, kad VITE dirvožemis mažiausiai kenksmingas. Taigi, remiantis skirtingomis prielaidomis apie tą patį dirvožemį, galima padaryti priešingas išankstines išvadas, todėl tenkintis vien cheminės analizės rezultatais nepakanka, reikalinga analizė *in vivo*.

### 3.2 Lapų storio įvertinimas

Siekiant įvertinti tirtų augalų lapų storį ir kaip jis kinta augaluose, kurie auginami SM užterštuose dirvožemiuose, buvo apskaičiuotas plotui tenkantis masės kiekis mg/mm$^2$ (3.2.1 pav.).

Lyginant su kontrole, abiejų genotipų augaluose, kurie augo užterštuose dirvožemiuose, daugeliu atvejų matyti lapo plotui tenkančios masės sumažėjimas. Praėjus 1 mėn. po augalų persodinimo į tiriamuosius dirvožemius, matyti, kad *Tradescantia* #4430 augalų lapo plotui tenkanti masė yra mažesnė lyginant su kontrole, tačiau praėjus 6 mėn. tarp dirvožemių reikšmingų pokyčių nerasta (3.1 pav., A). Matyti tokia klono lapo plotui tenkančios masės mažėjimo tendencija: kontrolė > VITE > VERKŠ > GRD. Lyginant rezultatus po 6 mėn. su 1 mėn., kontrolėje matyti masės reikšmingas sumažėjimas, o GRD – padidėjimas. Lyginant SM užterštuose dirvožemiuose augusios *T. pallida* rezultatus su kontrole, irgi matyti bendras masės sumažėjimas (3.1 pav., B). *T. pallida* lapo plotui tenkančios masės mažėjimo tendencija tokia: kontrolė > VERKŠ > VITE > GRD. Vertinant ilgalaikį poveikį, kontroliniame dirvožemyje lapo masė reikšmingai didesnė tiek po 6 mėn., tiek po 12 mėn, VITE – po 12 mėn reikšmingai

mažesnė, VERKŠ –nepakito, o GRD – po 12 mėn. buvo reikšmingai didesnė. Kontroliniame dirvožemyje tokį padidėjimą galėjo lemti augalo senėjimas (Meinzer at al., 2011; Bielczynski et al., 2017).



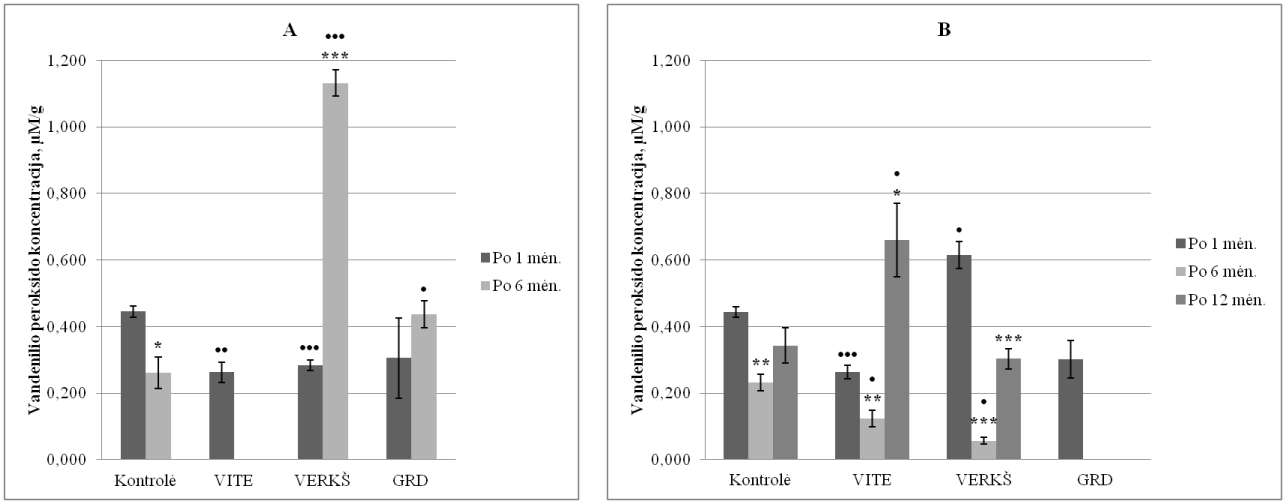

3.1 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) lapo plotui tenkančios vidutinės masės (mg/mm$^2$) įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

*T. pallida* lapo plotui tenkanti masė visuose dirvožemiuose yra maždaug 2 kartus didesnė (p < 0,05) už klono. Taigi, *T. pallida* lapai visuose dirvožemiuose yra maždaug 2 kartus storesni. Abiejų genotipų augalų lapo plotui tenkanti mažiausia masė buvo GRD dirvožemyje. Vertinant ilgalaikį poveikį, mažiausia masė SM užterštuose dirvožemiuose yra po 6 mėn.

Keletas tyrimų su kitais augalais parodė, kad paveikus augalą SM yra matomi reikšmingi skirtumai augalų lapų morfologijoje. Paveikus augalą SM yra pastebimas reikšmingas lapo storio sumažėjimas. Pastebėta, kad esant didesniam SM kiekiui lape esančių ląstelių dydis ir tarpląsteliniai tarpai sumažėja. Lapas suplonėja, nes sumažėja mezofilio storis (Bini et al., 2012; Saadi et al., 2013, Roychoudhury, Tripathi, 2019).

### 3.3 Vandenilio peroksido kiekio kitimas užterštuose dirvožemiuose augintuose augaluose

Atlikus vandenilio peroksido ($H_2O_2$) kiekio nustatymą, buvo apskaičiuota $H_2O_2$ koncentracija (µM/g) (3.2 pav.).




3.2 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) vandenilio peroksido ($H_2O_2$) koncentracijos įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

Po 1 mėn. *Tradescantia* #4430 lapuose $H_2O_2$ koncentracija užterštuose dirvožemiuose reikšmingai sumažėjo, o praėjus 6 mėn. koncentracija reikšmingai padidėjo (3.2 pav., A). Ypač $H_2O_2$ koncentracija išaugo VERKŠ dirvožemyje augusiuose augaluose – padidėjo beveik 5 kartus, palyginti su kontrole. Lyginant 1 mėn. ir 6 mėn. rezultatus matyti, kad kontroliniame dirvožemyje augusių augalų $H_2O_2$ koncentracija laikui bėgant sumažėjo, o užterštuose dirvožemiuose padidėjo, VERKŠ dirvožemyje padidėjo beveik 5 kartus.

*T. pallida* lapuose po 1 mėn. auginimo VITE dirvožemyje $H_2O_2$ koncentracija, lyginant su kontrole, buvo reikšmingai mažesnė (3.2 pav., B), o VERKŠ dirvožemyje didesnė, po 6 mėn. VITE ir VERKŠ dirvožemiuose $H_2O_2$ reikšmingai mažesnė, o po 12 mėn. VITE dirvožemyje didesnė. Didžiausios koncentracijos, lyginant su kontrole, matomos augaluose, kurie augo VITE dirvožemyje po 12 mėn. ir VERKŠ dirvožemyje po 1 mėn. ($p < 0,05$). Vertinant ilgalaikį poveikį, *T. pallida* $H_2O_2$ koncentracija kontroliniame, VITE ir VERKŠ dirvožemiuose po 6 mėn.

sumažėjo, o po 12 mėn. auginimo išaugo. GRD dirvožemyje augusių augalų gautos neigiamos duomenų reikšmės, todėl tolimesniuose $H_2O_2$ koncentracijos vertinimuose šie duomenys nebuvo naudojami.

Lyginant abi augalų rūšis, po 1 mėn. $H_2O_2$ koncentracija VERKŠ *T. pallida* augale buvo reikšmingai didesnė, o kituose dirvožemiuose panašios. Po 6 mėn. kontroliniame dirvožemyje abiejų augalų $H_2O_2$ koncentracija reikšmingai sumažėjo, o VERKŠ dirvožemyje klono lapuose $H_2O_2$ koncentracija buvo apie 16 kartų didesnė nei *T. pallida*. Toks $H_2O_2$ koncentracijos padidėjimas gali indikuoti, kad *Tradescantia* #4430 į sukeltą stresą reaguoja jautriau.

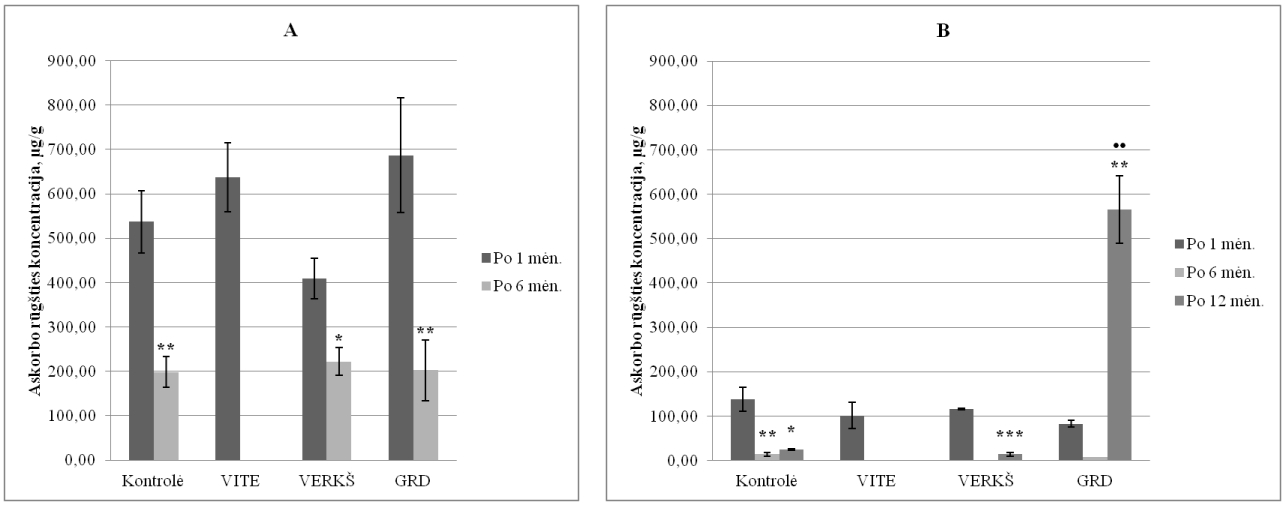
Abiotinio streso sukelta $H_2O_2$ akumuliacija augaluose yra vertinama dviprasmiškai. $H_2O_2$ yra pagrindinis REDOX (redukcijos – oksidacijos reakcijos) metabolitas, todėl esant didelei $H_2O_2$ koncentracijai yra pažeidžiamos įvairios biomolekulės ir sukeliama ląstelės mirtis (Quan et al., 2008; Černy et al., 2018). Nors $H_2O_2$ yra toksiška medžiaga, ji yra svarbi signalinė molekulė, kuri dalyvauja augalų vystymosi procese ir tuo pačiu metu sustiprina atsaką į abiotini stresą (Quan et al., 2008; Niu, Liao, 2016). $H_2O_2$ koncentracijos padidėjimas *Tradescantia* augaluose, kurie tirti esant ilgalaikiam užteršto dirvožemio poveikiui, gali rodyti abiotinio streso tolerancijos padidėjimą (Hossain et al., 2015). $H_2O_2$ Tokia padidėjusią $H_2O_2$ koncentraciją galima matyti visuose SM užterštuose dirvožemiuose augusiuose augaluose, kas indikuoja patiriamą stresą.

### 3.4 Askorbo rūgšties kiekio kitimo *Tradescantia* augaluose tyrimas

Askorbo rūgšties (AR) kiekio, esant ilgalaikiui SM poveikiui, rezultatai pavaizduoti diagramose (3.3 pav.). Lyginant su kontrole *Tradescantia* #4430 lapuose AR koncentracijos reikšmingų skirtumų nerasta: po 1 mėn. VITE ir GRD dirvožemiuose buvo šiek tiek didesnė, o VERKŠ šiek tiek mažesnė, o po 6 mėn. visuose dirvožemiuose AR koncentracija beveik nesiskyrė (3.4.1 pav., A). Lyginant koncentracijas po 1 mėn. ir 6 mėn., visų *Tradescantia* #4430 augalų lapuose matyti reikšmingas AR sumažėjimas.

*T. pallida* lapų AR koncentracija po 1 mėn. visuose dirvožemiuose beveik nesiskyrė, o po 12 mėn. GRD dirvožemyje augusių augalų AR koncentracija buvo 23 kartus didesnė nei kontrolėje (3.3 pav., B). Laikui bėgant augalų, kurie augo kontroliniame ir VERKŠ dirvožemiuose, lapuose matyti AR koncentracijos reikšmingas sumažėjimas, o GRD –

reikšmingas padidėjimas. VITE po 6 mėn. ir 12 mėn, bei VERKŠ ir GRD po 6 mėn. buvo gautos neigiamos reikšmės, todėl duomenys nebuvo įtraukti į rezultatus.




3.3 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) askorbo rūgšties (vit. C) koncentracijos įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

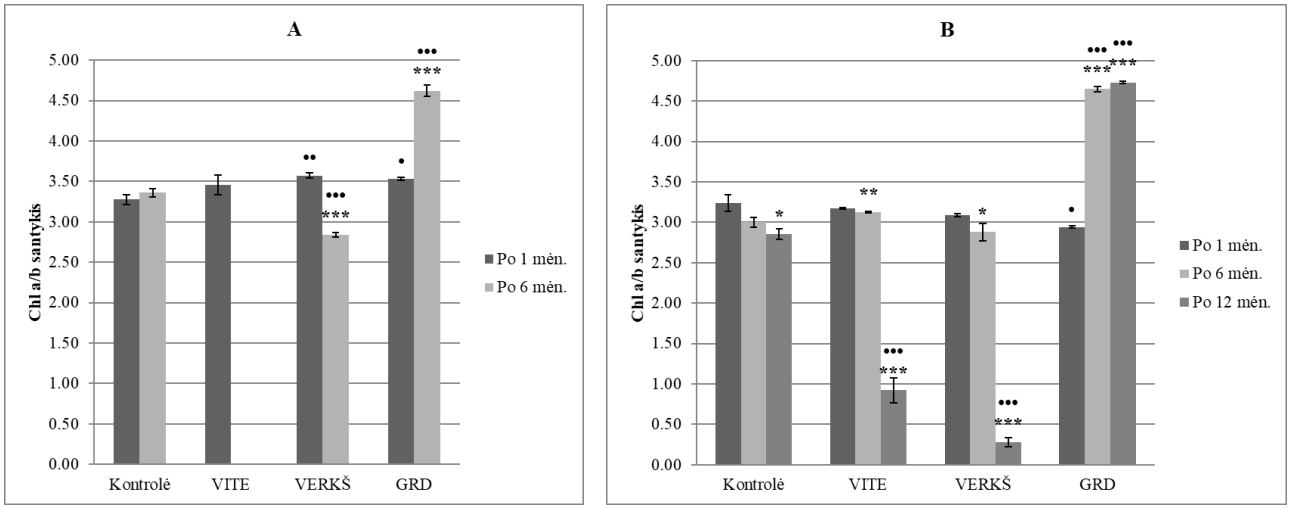
*T. pallida* lapuose AR koncentracija buvo apie 4 – 6 kartus mažesnė už *Tradescantia* #4430. Laikui bėgant abiejų augalų, augusių kontroliniame ir VERKŠ dirvožemiuose, AR mažėja, GRD – klono AR mažėja, o *T. pallida* didėja.

AR yra antioksidantinė molekulė ir svarbus substratas ROS detoksikacijai (Smirnoff, 2000; Foyer, Noctor, 2011; Qian et al., 2014). Žinoma, kad AR sustiprina antioksidacinių baltymų (pvz., superoksido dismutazės, katalazės, peroksidazės) veiklą. Daugelis tyrimų parodė, jog AR koncentracija paprastai didėja dėl didėjančio OS (Michalec et al., 2015; Akram et al., 2017, Bilska et al., 2019). Toks koncentracijos padidėjimas matyti *T. pallida,* augusios GRD dirvožemyje, lapuose praėjus 12 mėn. Laikui bėgant koncentracijos sumažėjimas, kuris matyti augaluose, kurie augo kituose dirvožemiuose, gali indikuoti augalo prisitaikymą po patirto streso. Vis dėlto, yra atlikta tyrimų, kuriuose parodyta, kad veikiant kai kuriais SM, AR koncentracija gali sumažėti (Wu et al., 2004; Chao et al., 2010), ar AR koncentracijos

padidėjimas/sumažėjimas to paties genotipo augaluose gali priklausyti nuo SM koncentracijos dirvožemyje (Sahu et al., 2012).

### 3.5 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų kiekio analizė

Nustačius chlorofilų (Chl) a, b ir karotenoidų (Kar) koncentracijas, pirmiausia apskaičiuotas chlorofilų a ir b santykis (Chl a/b) (3.4 pav.), kuris atspindi augalo fotocheminio pajėgumo pokyčius ir naudojamas kaip netiesioginis augalų fiziologinės būklės rodiklis (Šiukšta et al., 2018).




3.4 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) chlorofilo a santykio su chlorofilu b įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

Iš gautų Chl a/b santykių matyti, kad po 1 mėn. *Tradescantia* #4430 Chl a/b santykis užterštuose dirvožemiuose reikšmingai didesnis (3.4 pav., A). Po 6 mėn. VERKŠ dirvožemyje augusių klonų Chl a/b santykis mažesnis, o GRD – didesnis (p < 0,001). Lyginant 1 mėn. ir 6 mėn. rezultatus matyti, kad kontroliniame dirvožemyje augusių augalų Chl a/b santykyje pokyčių nėra, VERKŠ – santykis reikšmingai sumažėjo, o GRD – padidėjo.

*T. pallida* Chl a/b santykis po 1 mėn. GRD dirvožemyje reikšmingai mažesnis, o po 6 mėn. GRD reikšmingai didesnis (3.4 pav., B). Po 12 mėn. VITE ir VERKŠ dirvožemiuose augusiuose augaluose matyti žymiai mažesnis Chl a/b santykis, o GRD – didesnis. Vertinant

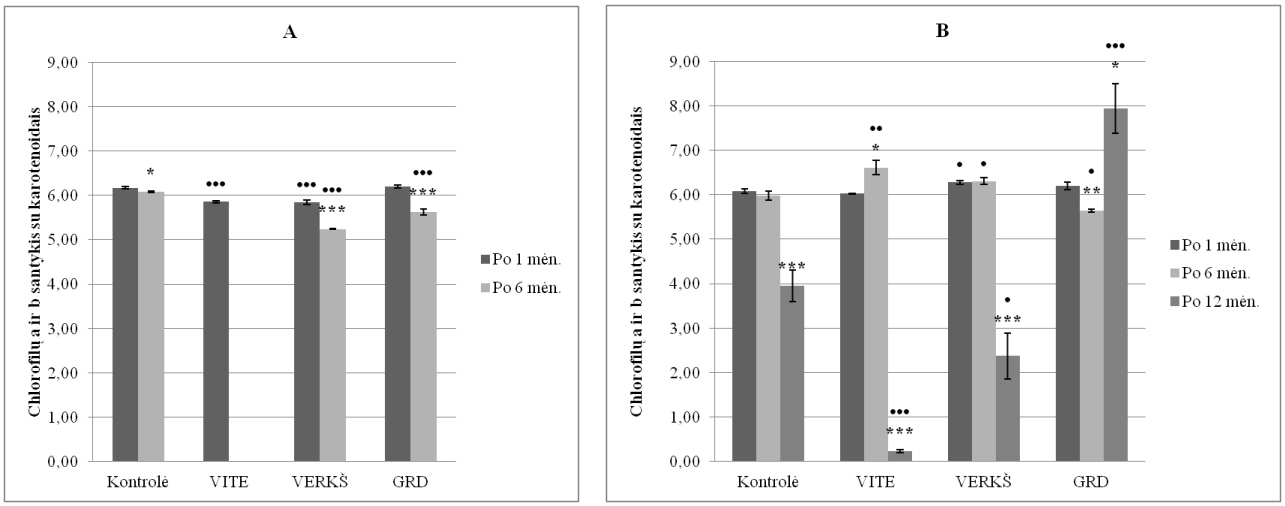
ilgailaikį poveikį kontroliniame dirvožemyje matyti nedidelis augalų Chl a/b santykio sumažėjimas, VITE ir VERKŠ dirvožemiuose po 12 mėn. santykis žymiai sumažėjo, o GRD reikšmingai padidėjo.

Abiejų *Tradescantia* rūšių Chl a/b santykiai visuose dirvožemiuose panašūs. VERKŠ dirvožemiuose abiejuose augaluose matyti ilgalaikis reikšmingas santykio sumažėjimas, o GRD dirvožemyje šis santykis padidėjęs virš 4,5. Taigi, abu augalai į dirvožemių sukeltą stresą atsako panašiai.

Neseniai buvo parodyta, jog Chl a/b santykio sumažėjimas gali būti naudojamas kaip sukelto OS rodiklis (Kasajima, 2017), ir toks santykio pokytis matyti VITE ir VERKŠ dirvožemiuose. Tuo tarpu, GRD dirvožemyje yra matyti santykio padidėjimas, kuris paprastai apibūdinamas kaip adaptyvus atsakas į sustiprintą apšvietimą (Kitajima, Hogan, 2003), tačiau daugelis tyrimų parodė, kad Chl a/b santykis augaluose didėja ir juos paveikus įvairiais SM (Zengin, Munzuroglu, 2005).

Taip pat buvo apskaičiuotas Chl (a + b) ir Kar santykis (3.5 pav.), kuris buvo pasiūlytas kaip streso indikatorius augaluose (Netto et al., 2005). Po 1 mėn. *Tradescantia* #4430 Chl (a + b) / Kar santykis VITE ir VERKŠ dirvožemiuose buvo reikšmingai mažesnis nei kontrolėje, o GRD – didesnis (3.5 pav., A). Po 6 mėn. VERKŠ ir GRD dirvožemiuose augalų Chl santykis reikšmingai mažesnis. Vertinant ilgalaikį poveikį, matyti, kad visuose dirvožemiuose santykis laikui bėgant reikšmingai sumažėjo, t. y. didėja patiriamas OS (Zhang et al., 2008).

*T. pallida* matyti kitokie santykio pokyčiai (3.5 pav., B). Po 1 mėn. reikšmingai didesnis Chl (a + b) / Kar santykis buvo tik VERKŠ dirvožemyje augusiuose augaluose. Po 6 mėn VITE ir VERKŠ dirvožemyje augusių augalų Chl (a + b) / Kar santykis reikšmingai didesnis, o GRD – mažesnis, ir po 12 mėn VITE ir VERKŠ – mažesnis, o GRD – didesnis. Kontroliniame ir VERKŠ dirvožemiuose augusiuose augaluose po 12 mėn. matyti žymus Chl (a + b) / Kar santykio sumažėjimas. VITE po 6 mėn. santykis padidėjo, o po 12 mėn. stipriai nukrito, tuo tarpu GRD dirvožemyje po 6 mėn. augalų Chl (a + b) / Kar santykis reikšmingai sumažėjo, o po 12 mėn. – padidėjo.



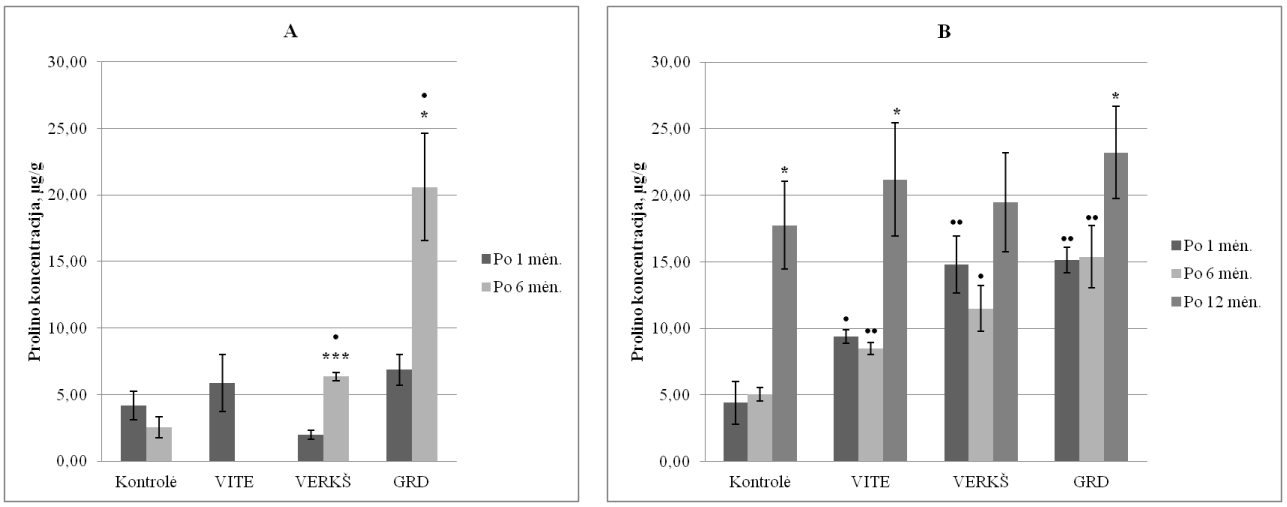

3.5 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) chlorofilo a ir b santykio su karotenoidais įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

Abiejų modelinių augalų gauti rezultatai po 1 mėn. ir 6 mėn. yra panašūs. Kontroliniame dirvožemyje abiejų *Tradescantia* augalų Chl (a + b)/Kar santykis yra beveik vienodas. GRD dirvožemyje abiejuose augaluose po 6 mėn. matyti santykio sumažėjimas. Skirtumas matyti VITE ir VERKŠ dirvožemiuose: *T. pallida* po 1 mėn. ir 6 mėn. Chl (a + b) / Kar santykis reikšmingai didesnis nei klono tuose pačiuose dirvožemiuose (p < 0,05).

Remiantis kitais tyrimais, Chl (a + b) / Kar santykis mažėja augalams augant vis labiau užterštame dirvožemyje (Mishra, Gopal, 2005; Zhang X et al., 2008; Šiukšta et al., 2018). Toks santykio mažėjimas matyti visuose užterštuose dirvožemiuose, ypač didelis santykio sumažėjimas matyti *T. pallida* VITE ir VERKŠ dirvožemiuose po 12 mėn.

### 3.6 Laisvo prolino kiekio tyrimas *Tradescantia* augaluose

Atlikus ilgalaikį laisvo prolino (Pro) kiekio nustatymo tyrimą, gauti rezultatai pavaizduoti diagramose (3.6 pav.).




3.6 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) laisvo prolino (Pro) koncentracijos įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

Užterštuose dirvožemiuose augusiuose *Tradescantia* #4430 laisvo Pro kiekis po 1 mėn. reikšmingai nepakito, vis dėlto, VITE ir GRD atveju matyti nedidelis koncentracijos padidėjimas, o VERKŠ – sumažėjimas (3.6 pav., A). Tuo tarpu, po 6 mėn. VERKŠ ir GRD dirvožemiuose augusiuose augaluose matyti reikšmingas laisvo Pro kiekio padidėjimas. Lyginant rezultatus po 1 mėn. ir po 6 mėn., matyti, kad VERKŠ ir GRD dirvožemiuose augusiuose augaluose yra reikšmingas laisvo Pro koncentracijos padidėjimas.

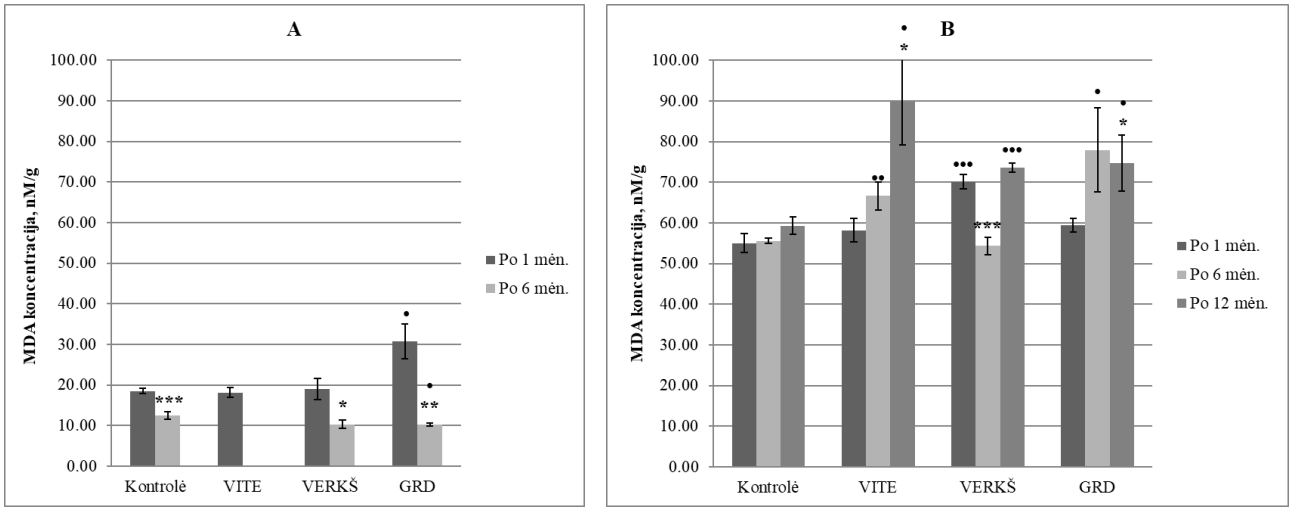
Po 1 mėn. ir 6 mėn. *T. pallida* užterštuose dirvožemiuose Pro koncentracija reikšmingai didėjo tokiu eiliškumu: kontrolė < VITE < VERKŠ < GRD (3.6 pav., B). Po 12 mėn visuose dirvožemiuose reikšmingų skirtumų nėra. Vis dėlto, lyginant su 1 mėn ir 6 mėn. koncentracija, po 12 mėn. matyti reikšmingas Pro padidėjimas visuose augaluose.

Bendrai paėmus, tiek *Tradescantia* #4430, tiek *T. pallida* laisvo prolino koncentracija dirvožemiuose didėja tokia tvarka: kontrolė < VITE < VERKŠ < GRD. Po 1 mėn. ir 6 mėn. kontroliniame dirvožemyje Pro kiekis abiejuose modeliniuose augaluose panašus, tačiau SM užterštuose dirvožemiuose *T. pallida* Pro kiekis reikšmingai didesnis, išskyrus po 6 mėn. GRD dirvožemyje, todėl galima manyti, jog *T. pallida* atsakas į sukeltą stresą dalyvaujant Pro yra jautresnis.

Laisvasis Pro ląstelėje gali veikti kaip signalinė molekulė, moduliuoti mitochondrijų funkcijas, dalyvauti genų, kurie atsakingį už atsaką esant stresinėms sąlygoms, ekspresijos aktyvinime, dalyvauti programuotos ląstelės mirties procese ir paveikti ląstelių proliferaciją (Szabados, Savoure, 2010), todėl jau seniai yra žinoma, kad patiriant stresą augalo laisvo Pro koncentracija didėja, ir ribiniais atvejais gali padidėti net iki 100 kartų (Handa et al., 1983; Matysik et al., 2002; Verbruggen, Herman, 2008). Taigi, galima teigti, kad augalai auginti VITE, VERKŠ ir GRD dirvožemiuose patiria stresą, nes jų laisvo Pro kiekis reikšmingai padidėjęs.

### 3.7 Lipidų peroksidacijos lygmens nustatymo augalų lapuose rezultatai

Tiriant ilgalaikį SM poveikį augalams, nustatytas lipidų peroksidacijos lygmuo pateiktas diagramose (3.7 pav.), kuriose lipidų peroksidacijos produktų (LPP) koncentracija yra išreikšta malondialdehido (MDA) ekvivalentais.




3.7 pav. *Tradescantia* #4430 (A) ir *T. pallida* (B) lipidų peroksidacijos produktų (LPP) koncentracijos, kuri išreikšta malondialdehido (MDA) ekvivalentais, įvertinimas po ilgalaikio auginimo užterštuose dirvožemiuose. SM užteršti dirvožemiai: VITE, VERKŠ ir GRD. Patikimumo lygmuo lyginant poveikį po 6 ir 12 mėn. su 1 mėn.: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ir užterštą dirvožemį su kontroliniu dirvožemiu po vienodos auginimo trukmės: •p < 0,05, ••p < 0,01, •••p < 0,001

*Tradescantia* #4430 atveju, po 1 mėn. ir po 6 mėn., lyginant su kontrole, VITE ir VERKŠ dirvožemiuose augusiuose augaluose nėra jokių reikšmingų skirtumų, bet GRD dirvožemyje

augusių augalų lapų po 1 mėn. LPP koncentracija didesnė, o po 6 mėn. – mažesnė ($p < 0,05$) (3.7 pav., A). Lyginant ilgalaikį poveikį, kontroliniame, VERKŠ ir GRD dirvožemiuose augusiuose augaluose matyti LPP reikšmingas sumažėjimas.

*T. pallida* LPP po 1 mėn. reikšmingai padidėjo tik VERKŠ dirvožemyje augusiuose augaluose, o po 6 mėn. reikšmingai padidėjo VITE ir GRD augusiuose augaluose (3.7 pav., B). Po 12 mėn. LPP koncentracija reikšmingai didesnė buvo visuose augaluose, kurie augo SM užterštuose dirvožemiuose. Kontroliniame dirvožemyje *T. pallida* LPP koncentracija po visų trijų tikrintų laikotarpių buvo labai panaši. Laikui bėgant VITE ir GRD dirvožemyje augusių augalų LPP koncentracija išaugo ($P < 0,05$), o VERKŠ – po 6 mėn. reikšmingai nukrito ir po 12 mėn. pakilo.

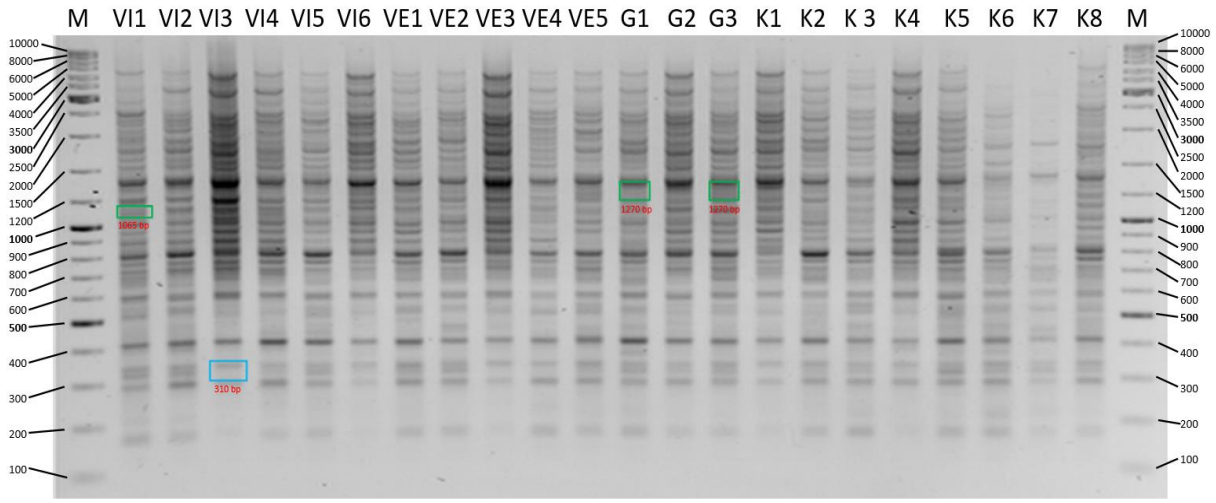
Lyginant abiejų genotipų augalus matyti, kad *T. pallida* atveju LPP koncentracija visuose augaluose yra 3 – 4 kartus didesnė nei klono. Taip pat *T. pallida* augaluose laikui bėgant LPP koncentracija didėja, o klono mažėja. Po 1 mėn. SM užterštuose dirvožemiuose augusių abiejų genotipų augalų LPP koncentracija padidėjusi.

Lipidų peroksidacija – tai procesas, kurio metu oksidatoriai, tokie kaip laisvieji radikalai, paveikia dvigubus ryšius, esančius lipiduose, ypač polinesočiosiose riebalų rūgštyse (Ayala et al., 2014). Kai įvairūs toksinai sutrikdo augalo ląstelių fiziologinius procesus ir sukelia OS, lipidų peroksidacija biologinėse membranose padidėja (Chaoui et al., 1997; Singh et al., 2007; Labudda, 2013). Toks lipidų peroksidacijos reikšmingas padidėjimas mūsų tyrime matyti visuose SM užterštuose dirvožemiuose.

### 3.8 Sunkiaisiais metalais užterštų dirvožemių genotoksiškumo tyrimas CDDP žymenų metodu

Atlikus genotipavimą CDDP žymenimis, buvo ieškoma pasikartojančių polimorfinių pokyčių, t. y. fiksuojami atsiradę arba išnykę amplikonai. Pasikartojantys polimorfiniai pokyčiai buvo užfiksuoti naudojant WRKY-R3B, ERF2, KNOX-3 ir MADS-4 pradmenis. Naudojant Myb1 ir ABP1-3 pradmenis, polimorfizmų nebuvo aptikta. Augaluose, kurie augo užterštuose dirvožemiuose, naudojant šiuos pradmenis iš viso buvo aptikta 12 polimorfizmų: 6 – VITE dirvožemyje, 3 – VERKŠ, 3 – GRD. Daugiausia SM indukuotų CDDP polimorfizmų buvo rasta *Tradescantia* #4430 naudojant WRKY-R3B pradmenį (3.8 pav.). VITE dirvožemiuose

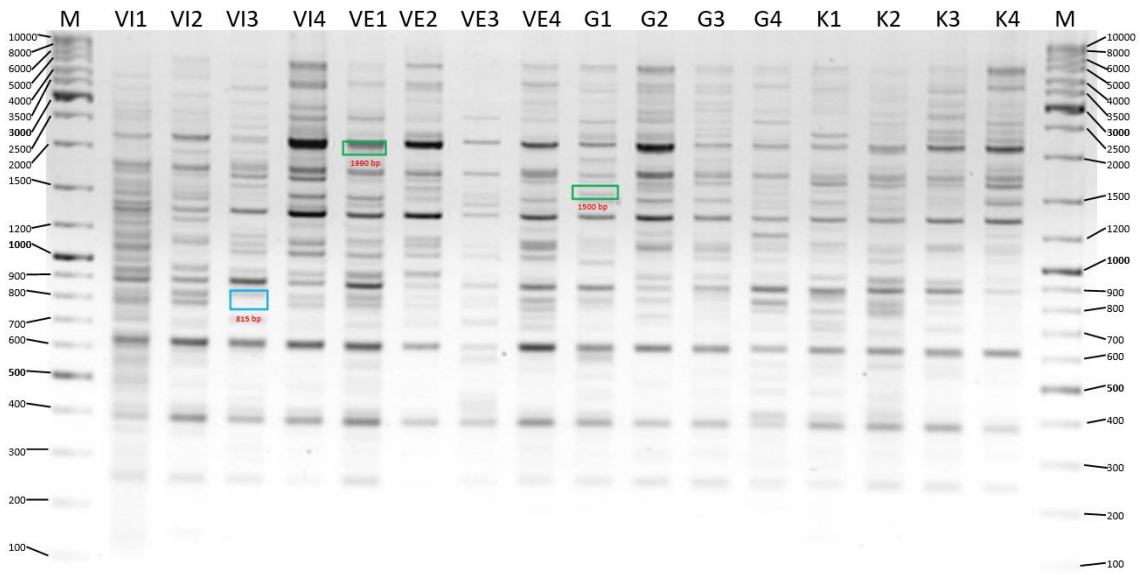
augusiuose augaluose nustatyti vienas atsiradęs ir vienas dingęs amplikonas, o GRD – du atsiradę.




3.8 pav. *Tradescantia* #4430 CDDP profilių polimorfizmai, nustatyti naudojant WRKY-R3B pradmenis. SM užterštuose dirvožemiuose augę augalai: VI – VITE, VE – VERKŠ, G – GRD. K – kontrolė. M – DNR dydžio standartas Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). — – atsiradęs amplikonas, — – dingęs amplikonas. Raudonai parašyti atsiradusių/dingusių amplikonų ilgiai bazių poromis

Taip pat polimorfizmų rasta *T. pallida* genotipavus su MADS-4 pradmeniu (3.9 pav.). Augaluose augusiuose VITE dirvožemyje nustatytas vienas dingęs amplikonas, o VERKŠ ir GRD po vieną atsiradusį. Su kitais pradmenimis buvo nustatyta po 1 – 2 polimorfizmus (1 priedas, 2 priedas).

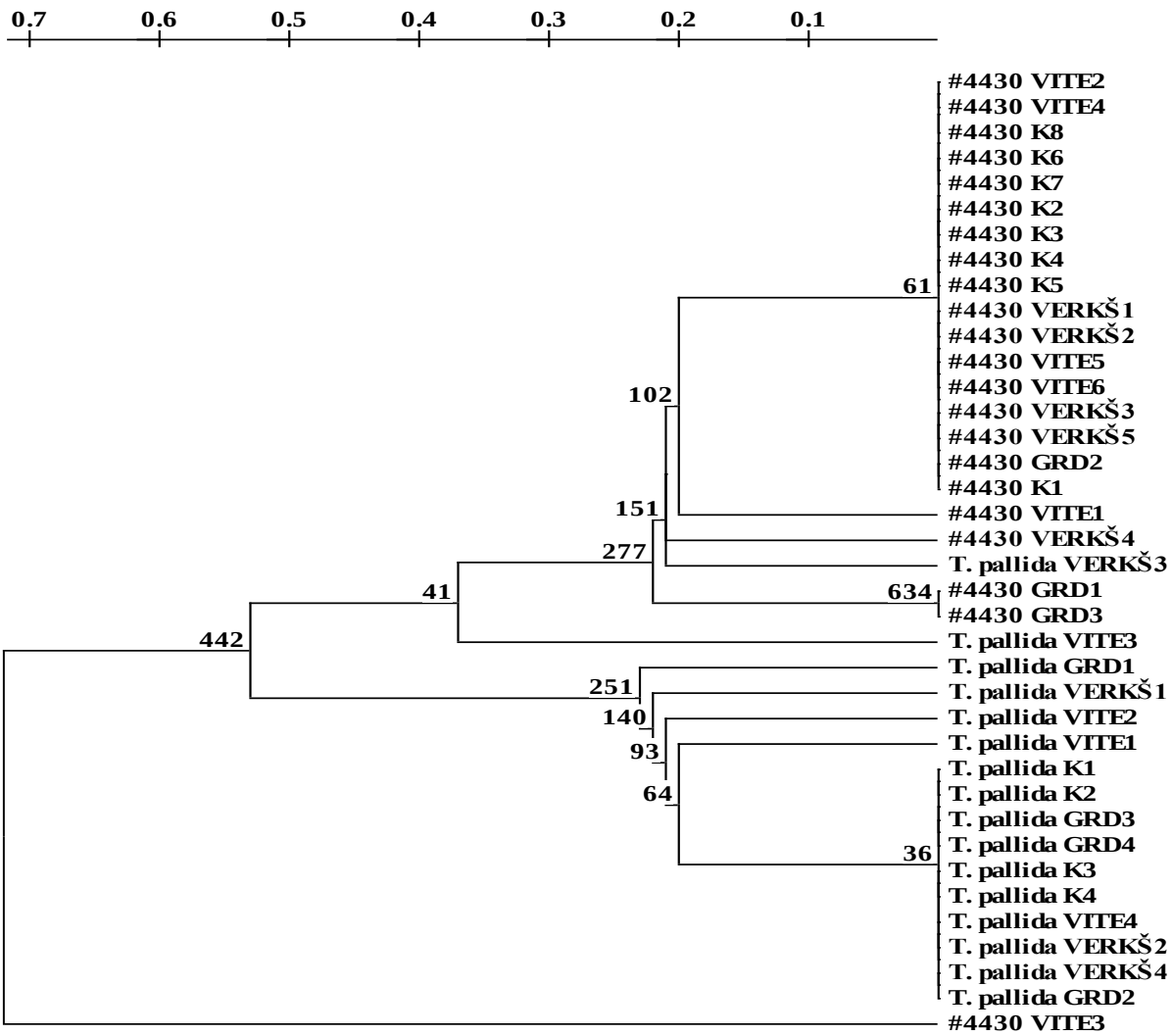
Amplikono dingimas gali būti siejamas su taškinėmis mutacijomis, DNR pertvarkymais, dėl ko pasikeičia buvusi pradmens prisijungimo vietos seka, arba kai įvyksta DNR grandinės trūkiai, ar prie pradmens prisijungimo vietos prisijungia aduktas, kuris blokuoja DNR grandinės sintezės procesą. Naujo amplikono atsiradimas gali įvykti dėl taškinės mutacijos ar DNR persitvarkymų, kurių metu atsiranda nauja pradmens prisijungimo vieta. Parodyta, kad didesnė tikimybė yra amplikonui atsirasti, nei dingti (Antienzar, Jha, 2006). Tai matyti ir mūsų tyrime: atsirado 10 amplikonų, o dingo 2.




3.9 pav. *Tradescantia pallida* CDDP profilių polimorfizmai, nustatyti naudojant MADS-4 pradmenis. SM užterštuose dirvožemiuose augę augalai: VI – VITE, VE – VERKŠ, G – GRD. K – kontrolė. M – DNR dydžio standartas Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). — – atsiradęs amplikonas, — – dingęs aplikonas. Raudonai parašyti atsiradusių/dingusių amplikonų ilgiai bazių poromis

Siekiant apibendrinti genotoksinį SM užterštų dirvožemių poveikį augalams, nubraižytas filogenetinis medis (3.10 pav.). Šiame medyje aiškiai išsiskiria dvi didesnės šakos: viena *T. pallida* ir kita *Tradescantia* #4430 augalų, kuriuose jokių polimorfinių pakitimų nėra. #4430 VITE3 augalas, augęs VITE dirvožemyje, atsiskiria į atskirą šaką – šiame dirvožemyje augusiame *Tradescantia* #4430 augale rasti du polimorfizmai. Žiūrint į likusias *Tradescantia* klono šakas, matyti, kad *Tradescantia* klono augalai VITE1 ir VERK4, kurie augo VITE ir VERKŠ dirvožemiuose, atsiskiria į kitas dvi šakas, o GRD1 ir GRD3 patenka į trečią atsiskyrusią šaką. Į atskiras šakas nuo *T. pallida*, kuriose nerasta pakitimų, pasiskirstė *T. pallida* VITE1, VITE2, VITE3, VERK1, VERK3 ir GRD1.

Bendrai paėmus, abiejų genotipų augalų VITE dirvožemiuose augę individai yra labiausiai nutolę nuo kontroliniuose dirvožemiuose augusių augalų, ypač #4430 VITE3.




3.10 pav. *Tradescantia* #4430 ir *T. pallida*, augusių skirtingo užterštumo dirvožemiuose, dendrograma, gauta panaudojant CDDP genetinius žymenis. Naudota „TreeCon“ programa, nustačius *Bootstrap* reikšmę su 1000 iteracijų. SM užteršti dirvožemiai: VERK, VITE, GRD. Kontrolė: K. Užterštuose dirvožemiuose augę augalai sunumeruoti nuo 1 iki 8 (priklausomai nuo konkrečiame dirvožemyje augintų augalų skaičiaus)

## IŠVADOS

1. Įvertinus bendrą ekologinį dirvožemio rizikos indeksą (RI), vidutinis rizikos laipsnis nustatytas Vilniaus miesto buvusios grąžtų gamyklos UAB „Rimeda“ (GRD) dirvožemiui, didelis – Klaipėdos Vitės pagrindinės mokyklos (VITE) dirvožemiui, labai didelis – Verkšionių žvyro karjero (VERKŠ) dirvožemiui.
2. $H_2O_2$, Chl a ir b bei karotenoidų, laisvo prolino, askorbo rūgšties, ir lipidų peroksidacijos biocheminių žymenų analizė rodo, kad VITE, VERKŠ ir GRD dirvožemiai sukelia oksidacinį stresą *Tradescantia* augaluose, tačiau šių žymenų kitimas laike yra nedėsningas ir nuo dirvožemių rizikos laipsnio nepriklauso.
3. *Tradescantia* # 4430 ir *T. pallida* biocheminės analizės rezultatai rodo, jog askorbo rūgšties koncentracija ir lipidų peroksidacijos lygmuo visuose tirtuose dirvožemiuose augusiuose *T. pallida* augaluose yra reikšmingai mažesni nei *Tradescantia* #4430 ($p < 0,01$).
4. Didžiausias CDDP polimorfizmų dažnis nustatytas didžiausio rizikos laipsnio dirvožemyje (VITE) augusiuose *Tradescantia* augaluose.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

GABIJA KORLAITĖ

**Sunkiaisiais metalais užteršto dirvožemio poveikio tyrimas panaudojant *Tradescantia pallida* ir *Tradescantia* kloną 4430**

Genetikos bakalauro studijų baigiamasis darbas

## SANTRAUKA

Sunkieji metalai yra vieni iš pagrindinių neorganinių dirvožemio teršalų, kuriuos į aplinką išmeta sparčiai besiplečiančios pramoninės zonos. Šie metalai patenka į mitybos grandines ir organizmuose sukelia įvairius fiziologinius sutrikimus. Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti ilgalaikį sunkiaisiais metalais užterštų dirvožemių poveikį *T. pallida* ir *Tradescantia* klono 4430 augaluose, naudojant $H_2O_2$, askorbo rūgšties, Chl a, b ir karotenoidų, laisvo prolino bei lipidų peroksidacijos biocheminius žymenis bei įvertinti dirvožemių genotoksiškumą CDDP žymenimis. Tyrime naudoti sunkiaisiais metalais užteršti dirvožemiai iš Vitės pagrindinės mokyklos (Klaipėda), Verkšionių žvyro karjero, ir grąžtų gamyklos UAB „Rimeda“ teritorijų. Visi tirti dirvožemiai sukėlė oksidacinį stresą *Tradescantia* augaluose, tačiau biocheminių žymenų koncentracijų kitimas buvo nedėsningas ir nuo dirvožemių rizikos laipsnio nepriklausė. Nustatyta, kadaskorbo rūgšties koncentracija ir lipidų peroksidacijos lygmuo visuose tirtuose dirvožemiuose augusiuose *T. pallida* augaluose yra reikšmingai mažesni nei *Tradescantia* #4430 ($p < 0,01$). Didžiausias CDDP polimorfizmų dažnis nustatytas didžiausios ekologinės rizikos dirvožemyje (VITE) augusiuose *Tradescantia* augaluose.

VILNIUS UNIVERSITY
Life Sciences Center
Institute of Biosciences

GABIJA KORLAITĖ

**Investigation of Heavy Metal-Contaminated Soil Effect Using *Tradescantia pallida* and *Tradescantia* Clone 4430**

Bachelor Thesis

## SUMMARY

Heavy metals are among the main inorganic soil pollutants emitted into the environment by rapidly expanding industrial zones. These metals enter the food chains and cause the variety of physiological issues in organism. The aim of this study was to evaluate the long-term effects of heavy metal-contaminated soils in *Tradescantia pallida* and *Tradescantia* clone 4430 plants using biochemical markers of $H_2O_2$, ascorbic acid, Chl a, b, and carotenoids, free proline and lipid peroxidation and to assess soil genotoxicity using CDDP markers. Soils contaminated with heavy metals from Vitė Primary School (Klaipėda), Verkšionys gravel quarry, and drill factory UAB “Rimeda” (Vilnius) were used in the study. All studied soils caused oxidative stress in *Tradescantia* plants, but the variation in biochemical markers concentrations was inconsistent and did not depend on the soils risk index. Ascorbic acid and lipid peroxidation levels were found to be significantly lower than *Tradescantia* #4430 in all *T. pallida* plants grown in the studied soils ($p < 0,01$). The highest frequency of CDDP polymorphisms was found in *Tradescantia* plants grown in the highest ecological risk soil (VITE).

**PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui Dr. Raimondui Šiukštai už suteiktą galimybę atlikti bakalaurinį darbą, apmokymus, suteiktas naujas žinias ir įgūdžius, už suteiktą pagalbą praktinių darbų metu ir pagalbą juos aprašant, skirtą laiką bei sukurtą gerą atmosferą.

Dėkoju konsultantei Dr. Tatjanai Čėsnienei už visada suteiktą pagalbą praktinių darbų metu, apmokymus, naujas žinias ir pozityvumą.

Už suteiktą gerą nuotaiką, atmosferą ir visapusišką pagalbą dėkoju visam Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS


1. Abraham E, Hourton-Cabasas C, Erdei L, Szabados L, Methods for Determination of Proline in Plants, Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology, Volume 639, 2010.
2. Akram NA, Shafiq F, Ashraf M, Ascorbic Acid – a Potential Oxidant Scavenger and it's Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance, Front Plant Science, 2017.
3. Alves LR, Reis AR, Gratao PL, Heavy Metals in Agricultural Soils: From Plant to Our Daily Life (a Review), Cientifica, Volume 44, Number 3, pp. 346-361, 2016.
4. Andersen JR, Lubberstedt T, Functional Markers in Plants, Trends Plant Sci, Volume 8, pp. 550-554, 2003.
5. Anjum NA, Singh HP, Khan MIR, Masood A, Per TS, Negi A, Batish DR, Khan NA, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I, Too Much is Bad – an Appraisal of Phytotoxicity of Elevated Plant-Beneficial Heavy Metal Ions, Environ Sci Pollut Res, Volume 22, pp. 3361-3382, 2015.
6. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC, Oxidative Stress and Antioxidative System in Plants, Curr Sci, Volume 82, pp. 1227-1238, 2002.
7. Athar M, Vohora SB, Heavy Metals and Environment, 2001.
8. Atienzar FA, Jha AN, the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay And Related Techniques Applied to Genotoxicity and Carcinogenesis Studies: a Critical Review, Mutation Reasearch, Volume 613, pp. 76-102, 2006.
9. Avalyan RE, Aghajanyan EA, Khosrovyan A et al., Assessment of Mutagenicity of Water from Lake Sevan, Armenia with Application of *Tradescantia*, Mutat Res, 2017.
10. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S, Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2014, pp 1-31, 2014.
11. Bassam J, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM, DNA Amplification Fingerprinting of Bacteria, Appl Microbiol Biotechnol, Volume 38, pp. 70–76, 1992.
12. Bielczynski L, Lacki MK, Hoefnagels I, Gambin A, Croce R, Leaf and Plant Age Affects Photosynthetic Performance and Photoprotective Capacity, Plant Physiology, Volume 175, pp. 1634-1648, 2017.

13. Bilska K, Wojciechowska N, Alipour S, Kalemba EM, Ascorbic Acid – the Little-Known Antioxidant in Woody Plants, Antioxidants, Volume 8, 2019
14. Bini C, Wahsha M, Fontana S, Maleci L, Effects of Metals on Morphological Characteristics of *Taraxacum officinales* Web Growing on Mine Soils in NE Italy, Journal of Geochemical Exploration, Volume 123, pp. 101-108, 2012.
15. Bloom AD, Serres F, Ecotoxicity and Human Health: A Biological Approeach to Environmental Remedation, CRC Press, pp 146-147, 1995.
16. Borsetti F, Francia F, Turner RJ, Zannoni D, the Thiol: disulfide Oxidoreductase DsbB Mediates the Oxidizing Effects of the Toxic Metalloid Tellurite (TeO32-) on the Plasma Membrane Redox System of the Facultative Phototroph Rhodobacter Capsulatus, Bacteriol, Volume 189, pp. 851-859, 2007.
17. Bouzon ZL, Ferreira EC, dos Santos R, Scherner F, Horta PA, et al., Influences of Cadmium on Fine Structure and Metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) Cultivated *in Vitro*, Protoplasma, Volume 249, pp. 637-650, 2012.
18. Bradl H, Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation, Volume 6, London: Academic press, 2002.
19. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM, DNA Ampli-Fication Fingerprinting Using very Short Arbitrary Oligonucleo-Tide Primers, Biotechnology, Volume 9, pp. 553–557, 1991.
20. Cenkci S, Yildiz M, Cigerci IH, Konuk M, Bozdag A, Toxic Chemicals-Induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) Seedlings, Chemosphere, Volume 76, pp. 900-906, 2009.
21. Černy M, Habanova H, Berka M, Luklova M, Brzobohaty B, Hydrogen Peroxide: its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks, Molecular Sciences, 2018.
22. Čėsnienė T, Kleizaitė V, Bondzinskaitė S, Taraškevičius R, Žvingila D, Šiukšta R, Rančelis V, Metal Bioaccumulation and Mutagenesis in a *Tradescantia* Clone Following Long-Term Exposure to Soils from Urban Industrial Areas and Closed Landfills, Mutat Res, Volume 823, pp. 65-72, 2017.
23. Čėsnienė T, Kleizaitė V, Rančelis V, Žvingila D, Švabauskas K, Taraškevičius R, Use of Tradescantia Clone 4430 for Direct Long-Term Soil Mutagenicity Studies, Mutation Research, Volume 768, pp. 23-32, 2014.

24. Chao YY, Hong CY, Kao CH, the Decline in Ascorbic Acid Content is Assosiated with Cadmium Toxicity of Rice Seedlings, Plant Physiology and Biochemistry, Volume 48, Issue 5, pp. 374-381, 2010.
25. Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, Ferjani EE, Cadmium and Zinc Induction of Lipid Peroxidation and Effects on Antioxidant Enzyme Activities in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Plant Science, Volume 127, pp. 139-147, 1997.
26. Chibuike GU, Obiora SC, Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremedation Methods, Applied and Environmental Soil Science, 2014.
27. Citerne H, Jabbour F, Nadot S, Damerval C, the Evolution of Floral Symmetry, Advances in Botanical Research, Volume 54, pp. 85-137, 2010.
28. Collard BCY, Mackill DJ, Conserved DNA-Derived Polymorfism (CDDP): a Simple and Novel Method for Generating DNA markers in Plants, Plant Molecular Biology Reporter, Volume 27, 2009.
29. Dahlke RI, Luethen H, Steffens B, ABP1: an Auxin Receptor for Fast Responses at the Plasma Membrane, Plant Signal Behav, pp. 1-3, 2010.
30. Daud MK, Mei L, Najeeb U, Khan MA, Deeba F, Raza I, Batool A, Zhu SJ, *In Vitro* Cadmium-Induced Alterations in Growth and Oxidative Metabolism of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), the Scientific World Journal, 2014.
31. Doyle JJ, Doyle JL, Brown AHD, Chloroplast DNA Polymorphism and Phylogeny in the B Genome og Glycine Subgenus Glycine (Leguminosae), American Journal of Botany, Volume 77, Issue 6, 1990.
32. Engwa GA, Ferdinand PU, Nwalo FN, Unachukwu MN, Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans, IntechOpen, 2018.
33. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS, The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-Rays on *Vicia faba* Roots and the Effect of Oxygen: Part II. Chromosome Damage: the Production of Micronuclei, Int J Rad Biol, Volume 3, pp. 216-29, 1959.
34. Florea AM, Busselberg D, Occurrence, Use and Potential Toxic Effects of Metals and Metal Compounds, Biometals, Volume 19, pp. 419-427, 2006.
35. Foulkes EC, Biological Membranes in Toxicology, Taylor and Francis, Philadelphia, 1998.

36. Foyer CH, Noctor G, Ascorbate and Glutathione: the Heart of the Redox Hub, Plant Physiology, Volume 155, pp. 2-18, 2011.
37. Fryzova R, Pohanka M, Martinkova P, Cihlarova H, Brtnicky M, Hladky J, Kynicky J, Oxidative Stress and Heavy Metals in Plants, Rev Environ Contam Toxicol, Volume 245, pp. 129-156, 2018.
38. Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, et al., Cadmium Affects Tobacco Cells by a Series of Three Waves of Reactive Oxygen Species that Contribute to Cytotoxicity, Plant Cell Environ, Volume 29, pp. 1956-1969, 2006.
39. Geslin C, Llanos J, Prieur D, Jeanthon C, the Manganese and Iron Superoxide Dismutases Protect *Escherichia Coli* from Heavy Metal Toxicity, Res Microbiol, Volume 152, pp. 901-905, 2001.
40. Gupta AK, Sinha S, Antioxidant Response in Sesame Plants Grown on Industrially Contaminated Soil: Effect on Oil Yield and Tolerance to Lipid Peroxidation, Bioresour Technol, Volume 100, pp. 179-185, 2009.
41. Gupta DK, Corpas FJ, Palma JM, Heavy Metal Stress in Plants, Spinger-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
42. Hakanson L, an Ecological Risk Index for Aquatic Pollution Control. A Sedimentological Approach, Water Research, Volume 14, pp. 975-1001, 1980.
43. Handa S, Bressan RA, Handa AK, Carpita NC, Hasegawa PM, Solutes Contributing to Osmotic Adjustment in Cultured Plant Cells Adapted to Water Stress, Plant Physiology, Volume 73, pp. 834-43, 1983.
44. Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Ten Bookum W, Schat H, et al., Phytochelatins are Involved in Differential Arsenate Tolerance in *Holcus lanatus*, Plant Physiol, Volume 126, pp. 299-306, 2001.
45. Hassaan MA, Nemr AE, Madkour FF, Environmental Assessment of Heavy Metal Pollution and Human Health Risk, Science Publishing Group, Volume 2, Issue 3, pp. 14-19, 2016.
46. Hay A, Tsiantis M, KNOX Genes: Versatile Regulators of Plant Development and Diversity, Development, Volume 137, pp. 3153-3165, 2010.
47. Hayashi M, The Micronucleus Test – Most Widely Used *in vivo* Genotoxicity Test, Genes and Environment, Volume 38, 2016.

48. He ZL, Yang XE, Stoffella PJ, Trace Elements in Agroecosystems and Impact on the Environment, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Volume 19, Issue 2-3, pp. 125-140, 2005.
49. Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK, Improving the Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances Assay for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing Anthocyanin and Other Interfering Compounds, Planta, Volume 207, pp. 604-611, 1999.
50. Hossain MA, Bhattacharjee S, Armin SM, Qian P, Xin W, Li HY, Burritt DJ, Fujita M, Tran LS, Hydrogen Peroxide Priming Modulates Abiotic Oxidative Stress Tolerance: Insights from ROS Detoxification and Scavenging, Front Plant Science, 2015.
51. Hunt DR, Tradescantia pallida (Rose), The International Plant Names Index, Kew Bulletin, Volume 30, No 3, 1975.
52. Jiang X, Lu WX, Zhao HQ, Yang QC, Yang ZP, Potential Ecological Risk Assessment and Prediction of Soil Heavy-Metal Pollution Around Coal Gangue Dump, Natural Hazards and Earth System Sciences, Volume 14, pp. 1599-1610, 2014.
53. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A, Reproducibility Testing of RAPD, AFLP and SSR Markers in Plants by a Network of European Laboratories, Mol Breed, Volume 3, pp. 381-390, 1997.
54. Kaba, Janicka-Russak M, Burzski M, Obus G, Comparison of Heavy Mmetal Effect on the Proton Pumps of Plasma Membrane and Tonoplast in Cucumber Root Cells, Plant Physiol, Volume 165, pp. 278-288, 2008.
55. Kasajima I, Difference in Oxidative Stress Tolerance Between Rice Cultivars Estimated with Chlorophyll Fluorescence Analysis, BioMed Central, 2017.
56. Khosrovyan A, DelValls TA, Riba I, Effects of Simulated $CO_2$ Escape from Sediments on the Development of Midge *Chironomus riparius*, Aquat Toxicol, Volume 156, pp. 230-239, 2014.
57. Kim HS, Kim YJ, Seo YR, an Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention, Journal of Cancer Prevention, Volume 20, pp. 232-240, 2015.

58. Krishna AK, Mohan KR, Distribution, Correlation, Ecological and Health Risk Assessment of Heavy Metal Contamination in Surface Soil Around an Industrial Area, Hyderabad, India, Environment and Earth Science, Volume 75, 2016.
59. Kvederytė K, Maisto Produktuose Esančių Sunkiųjų Metalų ir Radionuklidų Analizė, Magistrinis darbas, Kaunas, 2008.
60. Labudda M, Lipid Peroxidation as a Biochemical Marker for Oxidative Stress During Drought. An Effective Tool for Plant Breeding, 2013.
61. Lee G, Bigham JM, Faure G, Removal of Trace Metals by Coprecipitation with Fe, Al and Mn from Natural Waters Contaminated with Acid Mine Drainage in the Ducktown Mining District, Applied Geochemistry, Vollume 17, Issue 5, pp. 569-581, 2002.
62. Lepp NW, Effect of Heavy Metal Pollution on Plants, Metals in the Environment, Pollution Monitoring Series, Applied Science Publishers, 2012.
63. Liu M, Sun W, Ma Z, Zheng T, Huang L, Wu Q, Zhao G, Tang Z, Bu T, Li C, Chen H, Genome-wide Investigation of the AP2/ERF Gene Family in Tartary Buckwheat (*Fagopyum tataricum*), BMC Plant Biol 19, Article number 84, 2019.
64. Ma TH, Xu C, Liao S et al., In Situ Monitoring with the *Tradescantia* Bioassays on the Genotoxicity of Gaseous Emissions from a Closed Landfill Site and an Incinerator, Mutat Res, Volume 359, pp. 39-52, 1996.
65. Mačiūnas E, Mačiūnienė R, Majus S, Juozulynas A, Aplinkos Sveikata. Nuodingos Medžiagos: Monografija, 172 p., 2005.
66. Masindi V, Muedi KL, Environmental Contamination by Heavy Metals, IntechOpen, 2018.
67. Matysik J, Alia, Bhalu B, Mohanty P, Molecular Mechanisms of Quenching of Reactive Oxygen Species by Proline Under Stress in Plants, Current Science, Volume 82, No. 5, pp 525-532, 2002.
68. Mehrag AA, The Role of Plasmalemma in Metal Tolerance in Angiosperms, Physiol Plant, Volume 88, pp. 191-198, 1993.
69. Meinzer FC, Lachenbruch B, Dawson TE, Size- and Age-Related Changes in Tree Structure and Function, Springer, 2011.
70. Michalak A, Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity in Plants Growing Under Heavy Metal Stress, Pol J Environ Stud, Volume 15, pp. 523-530, 2006.

71. Michalec K, Barszcz A, Wasik R, Influence of Industrial Pollution on the Content of Essential Oils and Vitamin C in Twig and Needles of Scots Pine, Sylvan, Volume 159, pp. 516-522, 2015.
72. Mielli AC, Matta ME, Nersesyan A, Saldiva PH, Umbuzeiro GA, Evaluation of the Genotoxicity of Treated Urban Sludge in the *Tradescantia* Micronucleus Assay, Mutat Res, Volume 672, pp. 51–54, 2009.
73. Minocha R, Martinez G, Lyons B, Long S, Development of Standardized methodology for Quantifying Total Chlorophyll and Carotenoids from Foliage af Hardwood and Conifer Tree Species, NRC Research Press, Volume 39, pp. 849-861, 2009.
74. Mishra KB, Gopal R, Study of Laser-induced Fluorescence Signatures from Leaves of Wheat Seedlings Growing Under Cadmium Stress, General and Applied Plant Physiology, Volume 31, pp. 181-196, 2005.
75. Mišık M, Ma1 TH, Nersesyan A, Monarca S, Kim JK, Knasmueller S, Micronucleus Assays with *Tradescantia* Pollen Tetrads: an Update, Mutagenesis, Volume 26, No 1, pp. 215-221, 2011.
76. Mitsui A, Ohta T, Photooxidative Consumption and Photoreductive Formation of Ascorbic Acid in Green Leaves, Plant and Cell Physiology, Volume 2, Issue 1, pp. 31-44, 1961.
77. Musilova J, Arvay J, Vollmannova A, Toth T, Tomas J, Environmental Contamination by Heavy Metals in Region with Previous Mining Activity, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 97, pp. 569-575, 2016.
78. Nabais C, Labuto G, Gonçalves S, Buscardo E, Semensatto D, et al., Effect of Rroot Age on the Allocation of Metals, Amino Acids and Sugars in Different Cell Fractions of the Perennial Grass *Paspalum notatum* (Bahiagrass), Plant Physiol Biochem, Volume 49, pp. 1442-1447, 2011.
79. Neal AP, Guilarte TR, Mechanisms af Heavy Metal Neurotoxicity: Lead an Manganese, Journal of Drug Metabolism and Toxicoology, 2012.
80. Niu L, Liao W, Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium, Front Plant Science, 2016.
81. Oves M, Saghir KM, Huda Qa, Nadeen FM, Almeelbi T, Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies, Bioremediation and Biodegradation, 2016.

82. Parker DL, Borer P, Bernier-Latmani R, The Response of Shewanella Oneidensis MR-1 to Cr(III) Toxicity Differs from that to Cr(VI), Front Microbiol, 2011.
83. Qian HF, Peng XF, Han X, Ren J, Zhan KY, Zhu M, the Stress Factor, Exogenous Ascorbic Acid, Affects Plant Growth and the Antioxidant System in *Arabidopsis thaliana*, Plant Physiology, Volume 61, pp. 467-475, 2014.
84. Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY, Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network, Integrative Plant Biology, Volume 50, pp. 2-18, 2008.
85. Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt DE, Bioconcentration of Heavy Metals by Plants, Current Opinion in Biotechnology, Volume 5, no. 3, pp. 285-290, 1994.
86. Rastgool L, Alemzadeh A, Biochemical Responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to Heavy Metals Stress, Australian Journal of Crop Science, 2011.
87. Roychoudhury A, Tripathi DK, Molecular Plant Abiotic Stress, Biology and Biotechnology, John Wiley and Sons, 2019.
88. Ruley AT, Sharma NC, Sahi SV, Antioxidant Defense in a Lead Accumulating Plant, *Sesbania drummondii*, Plant Physiol Biochem, Volume 42, pp. 899-906, 2004.
89. Rutkovienė VM, Sabienė N, Aplinkos Tarša: Mokomoji Knyga, Akademija, 2008.
90. Rutkovienė VM, Sabienė N, Aplinkos Tarša: Mokomoji Knyga, Akademija, 204 p., 2008.
91. Saadi SAAM, Asaadi WM, Waheeb ANH, the Effect of Some Heavy Metals Accumulation on Physiological and Anatomical Characteristic of Some Potamogeton L. Plant, Journal of Ecology and Environmentas Sciences, Volume 4, Issue 1, pp. 100-108, 2013.
92. Sahu GK, Upadhyay S, Sahoo BB, Mercury Induced Phytotoxicity and Oxidative Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Plants, Physiology and Molecular Biology of Plants, Volume 18, Issue 1, pp. 21-31, 2012.
93. Salomons W, Forstner U, Mader P, Heavy Metals: Problems and Solutions, Environmental Science, 1995.
94. Samanovic MI, Ding C, Thiele DJ, Darwin KH, Copper in Microbial Pathogenesis: Meddling with the Metal, Cell Host Microbe, Volume 11, pp. 106-115, 2012.
95. Semane B, Dupae J, Cuypers A, Noben JP, Tuomainen M, Tervahauta A, Kärenlampi S, Belleghem FV, Smeets K, Vangronsveld J, Leaf Proteome Responses of *Arabidopsis*

*thaliana* Exposed to Mild Cadmium Stress, Plant Physiol, Volume 167, pp. 247-254, 2010.

96. Shahid M, Pourrut B, Dumat C et al., Heavy-Metal-Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity and Physicochemical Changes in Plants. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 232, Springer, Cham, pp. 1-44, 2014.
97. Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S, Chromium Toxicity in Plants, Environ Int, Volume 31, pp. 739-753, 2005.
98. Sheng XG, Zhao ZQ, Wang JS, Yu HF, Shen YS, Zeng XY, Gu HH, Genome Wide Analysis of MADS-box Gene Family in *Brassica oleracea* Reveals Conservation and Variation in Flower Development, BMC Plant Biol 19, Article number 106, 2019.
99. Sheoran IS, Singal HR, Singh R, Effect of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and the Enzymes of the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in *Pigeonpea* (*Cajanus cajan L.*), Photosynth Res, Volume 23, pp. 345-351, 1990.
100. Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K, Arsenic-Induced Root Growth Inhibition in Mung Bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to Oxidative Stress Resulting from Enhanced Lipid Peroxidation, Plant Growth Regulation, Volume 53, pp. 65-73, 2007.
101. Singh S, Sinha S, Accumulation of Metals and its Effects in *Brassica juncea* (*L.*) *Czern* (cv. *Rohini*) Grown on Various Amendments of Tannery Waste, Ecotoxicol Environ Saf, Volume 62, pp. 118-127, 2005.
102. Šiukšta R, Bondzinskaitė S, Kleizaitė V, Taraškevičius R, Mockeliūnas L, Stapulionytė A, Mak K, Čėsnienė T, Response of *Tradescantia* Plants to Oxidative Stress Induced by Heavy Metal Pollution of Soils from Industrial Areas, Environmental Science and Pollution Research, 2018.
103. Smirnoff N, Ascorbic Acid: Metabolism and Functions of a Multi-Facetted Molecule, Current Opinion in Plant Biology, Volume 3, pp. 229-235, 2000.
104. Soleimani M, Amini N, Sadeghian B, Wang D, Fang L, Heavy Metals and Their Source Identification in particulate Matter ($PM_{2.5}$) in Isfahan City, Iran, Journal of Environmental Sciences, 2018.
105. Song H, Sun W, Yang G, Sun J, WRKY Transcription Factor in Legumes, BMC Plant Biol 18, Article number 243, 2018.

106. Stapulionyte A, Kleizaitė V, Šiukšta R, Žvingila D, Taraškevičius R, Čėsnienė T, Cyto/genotoxicological Evaluation of Hot Spots of Soil Pollution Using Allium Bioassays in Relation to Geochemistry, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 842, pp. 102-110, 2019.
107. Suyama F, Guimaraes ET, Lobo DJ, Rodrigues GS, Domingos M, Alves ES, Carvalho HA, Saldiva PH, Pollen Mother Cells of *Tradescantia* Clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are Equally Sensitive to the Clastogenic Effects of X-rays, Braz J Med Biol Res, Volume 35, pp. 127–129, 2002.
108. Szabados L, Savoure A, Proline: a Multifunctional Amino Acid, Trens in Plant Science, Volume 15, Issue 2, pp 89-97, 2010.
109. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ, Heavy Metals Toxicity and the Environment, Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Volume 101, pp. 133-164, 2012.
110. Unyayar S, Celik A, Cekiç FO, Gozel A, Cadmium-induced Genotoxicity, Cytotoxicity and Lipid Peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*, Mutagenesis, Volume 21, pp. 77-81, 2006.
111. Uzilday B, Ozgur R, Sekmen AH, Turkan I, Redox Regulation and Antioxidant Defence During Abiotic Stress: what have we Learned from Arabidopsis and its Relatives? In: Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress, Springer, Cham, pp. 83-113, 2015
112. Valko M, MorrisH, MTDC, Metals, Toxicity and Oxidative Stress, Current Medicinal Chemistry, Volume 12, pp. 1161-1208, 2005.
113. Verbruggen N, Hermans C, Proline Accumulation in Plants: a Review, Amino Acids, Volume 35, pp. 753-9, 2008.
114. Verma N, Kaur G, Trends on Biosensing Systems for Heavy Metal Detection, Comprehensive Analytical Chemistry, Chapter 2, Volume 74, pp. 33-71, 2016.
115. Welsh J, McClelland M, Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers, Nucleic Acids Res, Volume 18, pp. 7213–7218, 1990.
116. Welsh J, Petersen C, McClelland M, Polymorphisms Gener-Ated by Arbitrarily Primed PCR in the Mouse: Application Tostrain Identification and Genetic Mapping, Nucleic Acids Res, Volume 19, pp. 303–306, 1991.

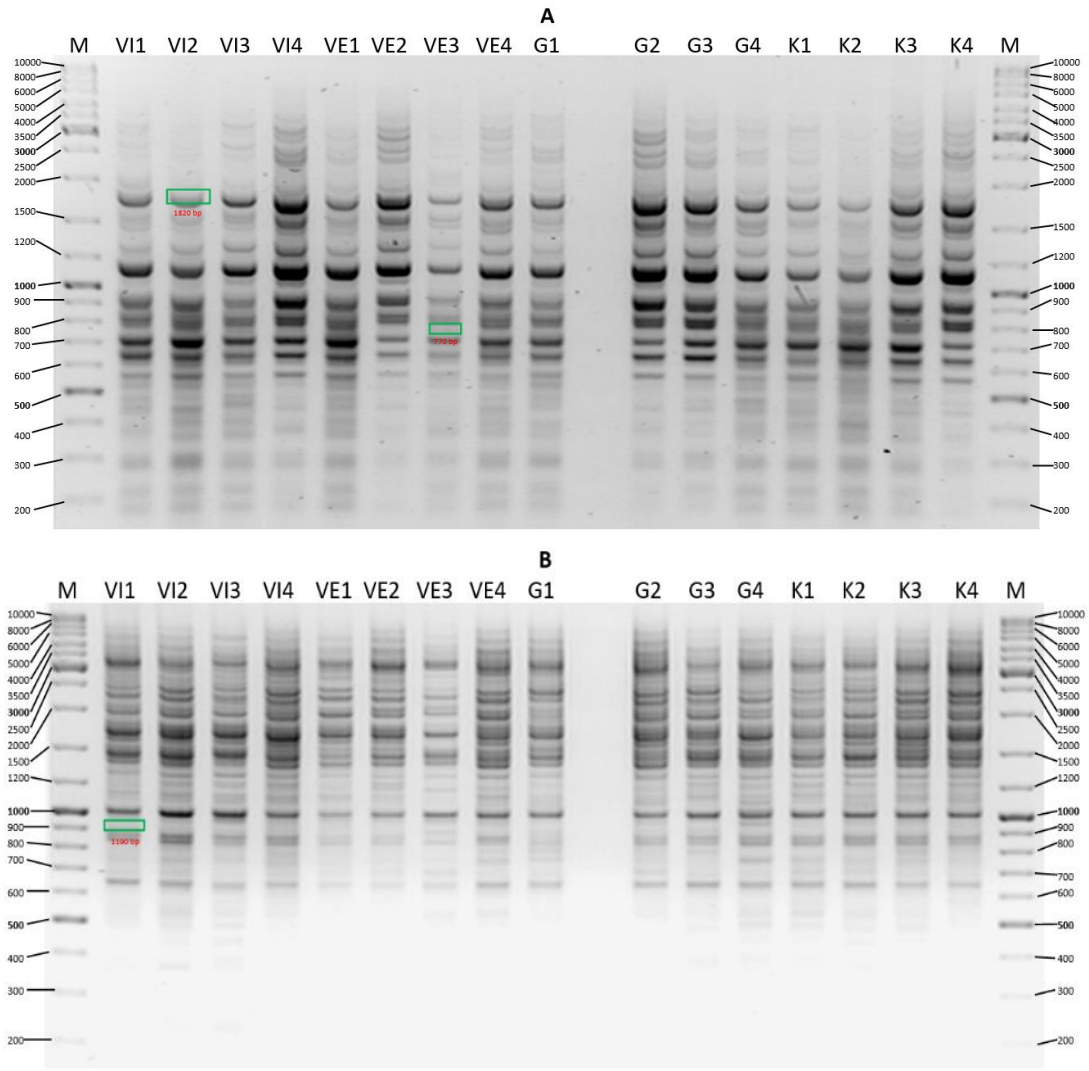
117. Welsh J, Pretzman C, Postic D, Saintgirons I, Baranton G, McClelland M, Genomic Fingerprinting by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction Resolves *Borrelia burgdorferi* into Three Distinct Phyletic Groups, Int J Syst Bacteriol, Volume 42, pp. 370–377, 1992.
118. Wikandari R, Sanjaya AP, Millati R, Karimi K, Taherzadeh MJ, Fermentation Inhibitors ir Ethanol and Biogas Processes and Strategies to Counteract Their Effects, Chapter 20, Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition), pp. 461-499, 2019.
119. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primersare Useful as Genetic Markers, Nucleic Acids Res, Volume 18, pp. 6531–6535, 1990.
120. Wu FB, Chen F, Wei K, Zhang GP, Effect of Cadmium on Free Amino Acid, Glutathione and Ascorbic Acid Concentrations in Two Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* L.) Differing in Cadmium Ttolerance, Chemosphere, Volume 57, Issue 6, pp. 447-454, 2004.
121. Wuana1 A, Okieimen FE, Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation, International Scholarly Research Notices, 2011.
122. Yadav M, Gupta R, Sharma RK, Green and Sustainable Pathways for Wastewater Purification, Chapter 14, Advances in Water Purification Techniques, pp 355-383, 2019.
123. Yruela I, Alfonso M, Ortiz de Zarate I, Montoya G, Picorel R, Precise Location of the Cu(II)-inhibitory Binding Site in Higher Plant and Bacterial Photosynthetic Reaction Centers as Probed by Light-induced Absorption Changes, Biol Chem, Volume 268, pp. 1684-1689, 1993.
124. Zaidi A, Fernandes D, Bean JL, Michaelis ML, Effects of Paraquat-induced Oxidative Stress on the Neuronal Plasma Mmembrane Ca(2+)-ATPase, Free Radic Biol Med, Volume 47, pp. 1507-1514, 2009.
125. Zannoni D, Borsetti F, Harrison JJ, Turner RJ, the Bacterial Response to the Chalcogen Metalloids Se and Te, Adv Microb Physiol, Volume 53, pp. 1-72, 2008.
126. Zeitoun M, Mehana EE, Impact of Water Pollution with Heavy Metals on Fish Health: Overview and Updates, Global Veterinaria, Volume 12, Issue 2, pp. 219-231, 2014.

127. Zengin FK, Munzuroglu O, Effects of Some Heavy Metals on Content of Chlorophyll, Proline and Some Antioxidant Chemicals in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings, Acta Biologica Cracoviensa Series Botanica, Volume 47, pp. 157-164, 2005.
128. Zhang X, Wollenweber B, Jiang D, Liu F, Zhao J, Water Deficits and Heat Shock Effects on Photosynthesis of a Transgenic *Arabidopsis thaliana* Constitutively Expressing ABP9, a bZIP Transcription Factor, Experimental Botany, Volume 59, No. 4, pp. 839-848, 2008.
129. Zhu H, Yuan X, Zeng G, Jiang M, Liang J, Zhang C, Yin J, Huang H, Liu Z, Jiang H, Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in Sediments of Xiawan Port Based on Modified Potential Ecological Risk Index, Transactions of Nonferrous Metals Society of China, Volume 22, pp. 1470-1477, 2012.

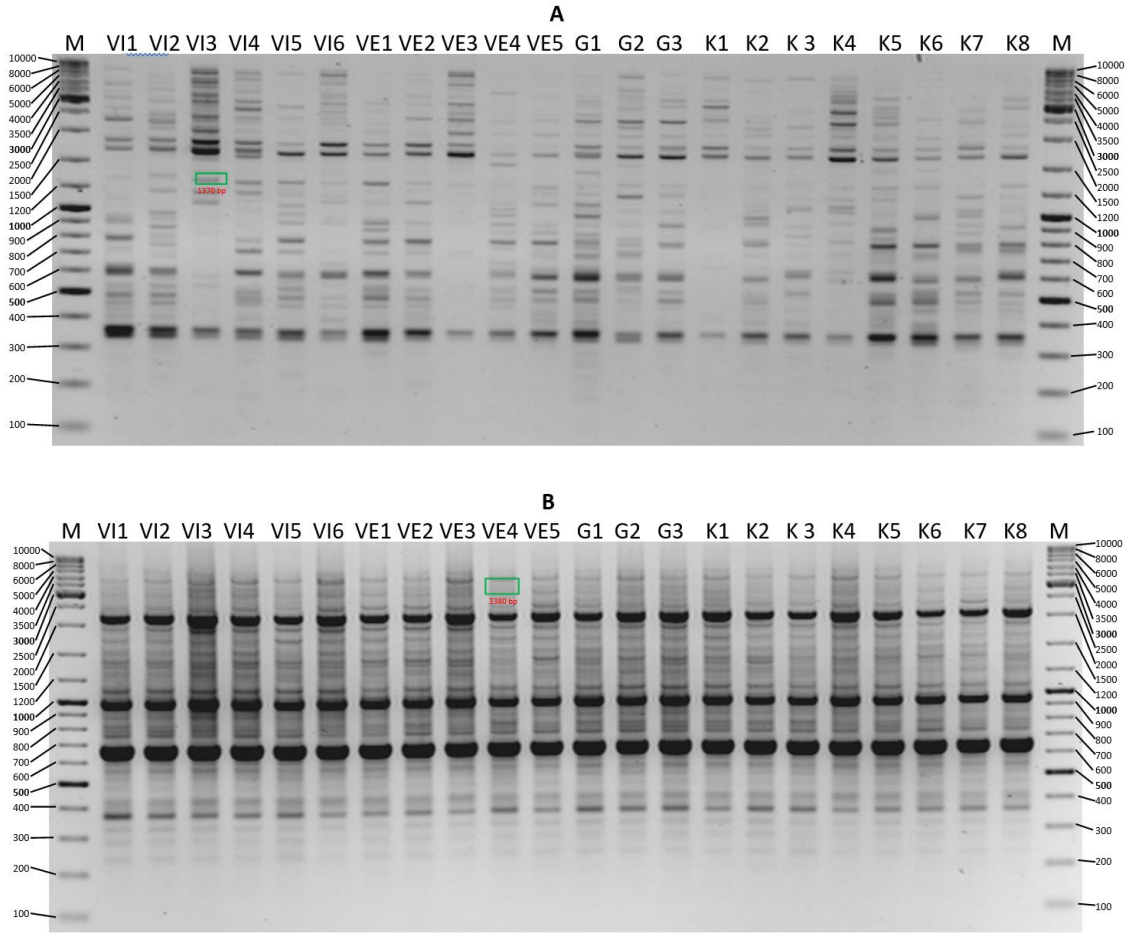
**INTERNETINIAI PUSLAPIAI**

1. Lenntech Water treatment & purification [internetinė svetainė]. Water Treatment Solutions. Adresas: https://www.lenntech.com/processes/heavy/heavy-metals/heavy-metals.htm.
2. Pasveik.lt [internetinė svetainė]. Oksidacinis stresas. Adresas: https://www.pasveik.lt/lt/sveikatos-ir-medicinos-naujienos/oksidacinis-stresas/74208/.
3. Purple heart, *Tradescantia pallida*, PURPLE QUEEN / Herbal Medicine / Philippine Alternative Meeicine / StuartXchange [internetinė svetainė]. Adresas: http://www.stuartxchange.org/PurpleHeart.html.
4. V-114 Dėl Lietuvos higienos normos HN 60:2004 "Pavojingų cheminių medžiagų didžiausios leidžiamos koncentracijos" [internetinė svetainė]. Sukurta 2004. Adresas: https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.228693/EffUOaxQaa .
5. Vilniaus aplinka [internetinė svetainė]. Adresas: https://aplinka.vilnius.lt/aplinkos-kokybe/uzterstos-teritorijos/dirvozemio-tarsa/#11.

**PRIEDAI**




1 priedas. *Tradescantia* #4430 ir *T. pallida* CDDP profilių polimorfizmai, nustatyti naudojant MADS-4, ERF2 (A) ir KNOX-3 (B) pradmenis. SM užterštuose dirvožemiuose augę augalai: VI – VITE, VE – VERKŠ, G – GRD. K – kontrolė. M – DNR dydžio standartas Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). ▬ – atsiradęs amplikonas, ▬ – dingęs aplikonas. Raudonai parašyti atsiradusių/dingusių amplikonų ilgiai bazių poromis




2 priedas. *Tradescantia* #4430 CDDP profilių polimorfizmai, nustatyti naudojant MADS-4 (A) ir KNOX-3 (B) pradmenis. SM užterštuose dirvožemiuose augę augalai: VI – VITE, VE – VERKŠ, G – GRD. K – kontrolė. M – DNR dydžio standartas Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). ▬ – atsiradęs amplikonas, ▬ – dingęs aplikonas. Raudonai parašyti atsiradusių/dingusių amplikonų ilgiai bazių poromis