

Міністерство освіти і науки України

ВІСНИК

*Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна*

Серія "Біологія"

Випуск 34

Започаткований у 1970 р.

THE JOURNAL

of V. N. Karazin Kharkiv

National University

Series "Biology"

Issue 34

Founded in 1970

Харків-2020

Вісник, серія «Біологія» є збірником наукових праць, який містить результати досліджень та оглядові статті з біології, зокрема з біохімії та генетики, зоології та ботаніки, фізіології тварин і рослин, мікології, мікробіології, ґрунтознавства, кріобіології та ін., а також матеріали про події наукового життя та описання оригінальних методів і приладів у галузі біології.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів, які спеціалізуються у відповідних або суміжних галузях науки.

Вісник включений до Переліку фахових видань України, категорія «Б», за спеціальністю 091 Біологія (Наказ МОН України №1643 від 28.12.2019 р.), індексується у Google Scholar, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat, BASE, Web of Science (Zoological Record) та включений до Clarivate Analytics Master Journal List.

Затверджено до друку рішенням

Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол №9 від 25.05.2020).

Д. А. Шабанов – головний редактор, д.б.н., професор кафедри зоології та екології тварин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В. В. Жмурко – заступник головного редактора, д.б.н., професор кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В. В. Навроцька – відповідальний секретар, к.б.н., доцент кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Члени редакційної колегії:

Л. О. Атраментова – д.б.н., професор кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

С. Ю. Утєвський – д.б.н., професор кафедри зоології та екології тварин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

О. М. Утєвська – д.б.н., професор кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Є. Е. Перський – д.б.н., професор кафедри біохімії, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Т. В. Догадіна – д.б.н., професор кафедри ботаніки та екології рослин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В. Ю. Страшнюк – д.б.н., професор кафедри генетики і цитології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

О. Ю. Акулов – к.б.н., доцент кафедри мікології та фітоімунології, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Н. Ю. Полчанінова – к.б.н., доцент кафедри зоології та екології тварин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

О. О. Авксентьєва – к.б.н., доцент кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В. П. Комариста – к.б.н., доцент кафедри ботаніки та екології рослин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

С. О. Костерін – д.б.н., академік НАНУ, завідувач відділу біохімії м'язів, Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАНУ

Н. О. Сибірна – д.б.н., професор кафедри біохімії, Львівський національний університет імені Івана Франка

Л. О. Білявська – д.б.н., старший науковий співробітник відділу загальної і ґрунтової мікробіології, Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАНУ

О. О. Стасик – д.б.н., член-кореспондент НАНУ, завідувач відділу фізіології та екології фотосинтезу, Інститут фізіології рослин і генетики НАНУ

Gederts Ievinsh – Doctor of Science in Biology, Full Professor, University of Latvia (Латвія)

Gregory F. Oxenkrug – PhD, MD, Professor, Tufts University School of Medicine, Tufts Medical Center (США)

N. I. Ronkina – PhD in Biology, Scientific Researcher, Hannover Medical School (Німеччина)

Адреса редакції:

*біологічний факультет,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,*

майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022

тел. +38 /057/ 707-55-71

<http://seriesbiology.univer.kharkov.ua>

e-mail: seriesbiology@karazin.ua

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію KB №21572–11472P від 20.08.2015

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, оформлення, 2020

... ЗМІСТ ...

Пам'яті Віктора Арсентійовича Токарського.....	5
Пам'яті Юрія Георгійовича Шкорбатова.....	8

... БІОХІМІЯ ...

Зеленюк К.В., Голіченко О.А., Штеменко О.В., Штеменко Н.І. Додаткові докази редокс-активації взаємодій плазміда – комплекси диренію(III).....	11
Нікітченко І.В., Рибальченко Т.П., Бараннік Т.В., Павиченко О.В. Вплив донорів монооксиду нітрогену на показники кадмій-індукованого оксидативного стресу в різних органах щурів.....	18
Охріменко С.М., Гришкова А.Ю. Вплив геміну та глутатіону на деякі показники азотного та вуглеводного метаболізму в щурів.....	28
Полохіна К.В., Бабій С.О., Голіченко О.А., Штеменко Н.І. Комплекс диренію(III) з бета-аланіновим лігандом: протипухлинні, антиоксидантні та ДНК-зв'язуючі властивості.....	35

... БОТАНІКА ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН ...

Баранець М.О., Коршиков І.І. Формування й самопідтримання популяції <i>Hyssopus officinalis</i> L. в умовах залізородного відвалу Криворіжжя.....	43
--	----

... ГЕНЕТИКА ...

Горенська О.В., Рибак Д.В., Н.В.Рибак, Горенський Г.Г., Шкорбатов Ю.Г. Аналіз репродукції та преімагінальної смертності у <i>Drosophila melanogaster</i> при дії мікрохвильового випромінювання.....	52
Ехьяконандех Х., Атраментова Л.О. Прогностичне значення маркерів в асоціативній генетиці	63

... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ...

Алізаде Г.А. Кліщі роду <i>Erythraeus</i> Latreille, 1806 (Acariformes: Actinedida: Erythraeidae) природної області Великого Кавказу (в межах Азербайджану).....	69
Катрушенко С.А. Зовнішньоморфологічні аномалії амфібій Харківської області.....	78
Кіося Є.О., Шуба В.В., Мацко Є.Д. Нові знахідки видів тихоходів роду <i>Macrobiotus</i> групи <i>hufelandi</i> (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) в Україні.....	89
Мансімова І.Ф., Алекперов І.Х. Сезонні зміни спільнот вільноживучих інфузорій різних біотопів озера Агзібір.....	99
Рзаєв Ф.Г., Сеїдбейлі М.І., Магеррамов С.Г., Гасімов Е.К. Форми та ультраструктурні особливості латеральних крил гельмінта <i>Trichostrongylus tenuis</i> Mehlis, 1846 (Nematoda: Trichostrongylidae).....	112

... МІКРОБІОЛОГІЯ ...

Авксентьєва О.О., Віннікова О.І., Жмурко В.В. Особливості колонізації фітосфери проростків пшениці інтродукованими штамми <i>Escherichia coli</i>	120
Звір Г.І., Різун Г.М., Гнатуш С.О. Вплив сполук фосфору на утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій <i>Azotobacter chroococcum</i> ВКМ В-1272	131

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...

Гринцова Н.Б., Романюк А.М., Линдін М.С., Рябенко Т.В. Морфофункціональні перебудови кіркової речовини наднирників статевозрілих щурів за умов експериментального мікроелементозу.....	141
---	------------

... ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ...

Авксентьєва О.О., Батуєва Є.Д. Вплив червоного світла (660 нм) на проліферативну активність та ростові реакції у проростків рослин з контрастною фотоперіодичною реакцією	151
Пухтаєвич П.П., Кукол К.П., Воробей Н.А., Коць С.Я. Реакція самофертильних ліній люцерни на інокуляцію бульбочковими бактеріями.....	163
Скляренко А.В., Бессонова В.П. Вміст водорозчинних фенолів в листках деревних рослин санітарно-захисних зон заводів промислової зони Запоріжжя.....	175
Тимошенко В.Ф., Жмурко В.В. Фотохімічна активність хлоропластів ізогенних за генами <i>E</i> ліній сої (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) за різних термінів опромінення червоним світлом.....	185

... ІНФОРМАЦІЯ ...

Правила для авторів	194
----------------------------------	------------



**Пам'яті Віктора Арсентійовича Токарського
(1955–2020)**

Віктор Арсентійович Токарський прожив цікаве, надзвичайно плідне та насичене життя. Він народився 18 лютого 1955 р. у Карелії. Після служби у лавах Збройних сил вступив на підготовчий факультет Харківського університету, а згодом став студентом біофаку, обравши для спеціалізації кафедру зоології хребетних. Ще студентом він зацікавився однією з груп степових гризунів – бабаками, що в Україні неподільно пов'язані із степом, найбільш вразливим природним комплексом. Інтенсивне освоєння – розорювання, надмірний випас худоби руйнували степ. Це не могло не бентежити молодого дослідника. Республіканські заказники «Бурлуцький» та «Катеринівський» – дві чи не найбільші ділянки первісних степів у Великобурлуцькому районі, місця розташування чималих колоній бабаків були не тільки місцем його наукових, але й природоохоронних інтересів.

Після закінчення біологічного факультету Харківського державного університету імені О.М.Горького за спеціальністю «Біологія» у 1981 р. Віктор Арсентійович працював інженером біологічної станції Університету в с. Гайдари. Фінансування майже не було – всі споруди будувалися «господарчим засобом» – руками співробітників та студентів. Але біостанція потроху поповнювалася

стаціонарними лабораторіями, іншими необхідними будівлями – турботами інженера, а згодом і директора В.А.Токарського.

Ще у середині 90-х років ХХ ст. на біологічній станції почалися роботи з доместикації та реінтродукції бабаків. Тварин випускали в природні умови, розробляючи технології успішного випуску. Набутий досвід згодом застосовували у розселенні бабаків разом із мисливськими організаціями по усій Україні та у сусідніх областях Росії. Перші тварини рили свої нори прямо на території станції. Згодом бабаків було розселено у найближчих ярах, де вони живуть і по сьогодні.

Під керівництвом Віктора Арсентійовича Токарського організовано стаціонари з вивчення та розведення сурків не тільки на біологічній станції у с. Гайдари, але й на мисливській базі «Вершинська» (Камчатська обл. Росії) та у с. Нестерівка Великобурлуцького району Харківської області.

У 1988 р. Віктор Арсентійович захистив дисертацію на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук у НДІ охорони природи і заповідної справи (Москва). З 1990 р. він став науковим співробітником Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. У 1993 р. В.А.Токарський став старшим викладачем кафедри зоології та екології хребетних тварин; викладав дисципліни «Зоологія хребетних», спецкурси «Екологія ссавців», «Систематика ссавців», «Заповідна справа», «Природоохоронна справа», керував навчально-польовою практикою, дипломними та курсовими роботами. Але наукові дослідження, в тому числі і разом із студентами, лишалися для нього в пріоритеті. В 1993 році за цикл робіт з вивчення ссавців Віктор Арсентійович одержав індивідуальний грант фонду Дж.Сороса.

З 1995 року – доцент кафедри зоології та екології тварин. За ці роки він випустив понад 50 дипломників; двоє з його аспірантів успішно закінчили аспірантуру і захистили дисертації. Дипломні роботи, якими керував Віктор Арсентійович, були присвячені різним групам ссавців. Але перш за все – степовому сурку – бабаку та іншим видам сурків, що розповсюджені аж до Камчатки. І навіть якщо студент не був його дипломником, він все одно міг заохотити до колективних (не дуже легких) робіт, наприклад – до розкопування нір бабаків, коли вивчали структуру нори, долучилися багато хлопців – студентів кафедри зоології різних років.

Наприкінці 90-х років, коли фінансування не дозволяло ані закупівлю, ані видання нових підручників, Віктором Арсентійовичем Токарським був написаний та виданий власним коштом підручник «Зоология позвоночных» (згодом, у 2008 році його перевидано українською мовою вже видавництвом Університету).

У 1993–2019 рр. В.А.Токарський був керівником лабораторії біорізноманіття, що виконувала прикладні та фундаментальні дослідницькі роботи, пов'язані із розробкою стратегічних напрямків підтримки біорізноманіття у наземних екосистемах Лівобережної України.

Унікальна здатність – збирати команду та вести її до заданої мети була повною мірою притаманна Віктору Арсентійовичу. Під його керівництвом розроблено пакет документів про створення Регіонального ландшафтного парку «Великобурлуцький степ», який було затверджено в 2000 році. В подальшому професором В.А.Токарським організовано степовий польовий дослідницький стаціонар у с. Нестерівка Великобурлуцького району – для проведення наукових досліджень, навчальної практики та виконання курсових і дипломних робіт.

Дуже багато зусиль було докладено особисто Віктором Арсентійовичем Токарським до розроблення та затвердження пакету документів до створення Національного природного парку «Дворічанський». Зазвичай це робота дуже копітка і може тривати роками. Але завдяки великій підготовчій роботі у районі, що її провів Віктор Арсентійович, створення парку стало можливим вже у 2009 році.

На жаль, однією з невітлених мрій залишилось створення національного природного парку «Східний степ» у Великобурлуцькому та Вовчанському районах Харківської області.

Організатор та учасник численних наукових експедицій територією України, а також Забайкалля, Якутії, Середньої Азії, Камчатки, В.А.Токарський опублікував більш ніж 120 наукових праць, в тому числі 2 наукових монографії у видавництвах України та інших країн.

У 2004 р. разом із Харківським прес-клубом В.А.Токарський започаткував свято «День сурка» на біологічній станції Університету. Покликаний привернути увагу до проблем збереження дикої природи, цей захід перетворився на щорічну зустріч представників мас-медіа та фахівців-біологів, природоохоронців, викладачів та науковців Університету, якого з нетерпінням очікують. Останніми роками – подія всеукраїнського масштабу.

Віктор Арсентійович Токарський, як відомий фахівець, приймав участь та був організатором багатьох науково-практичних конференцій та семінарів, в тому числі і міжнародних («Міжнародний симпозіум про альпійського сурка та інші види сурків», Італія, 1991 р.; IV Міжнародна конференція «Гризуни і суспільство», Польща, 1993 р.; II Міжнародний симпозіум «Сурки світової фауни», Франція, 1994 р.; VI Міжнародна конференція «Гризуни», Ізраїль, 1998 р.; IV Міжнародна конференція по суркам, Швейцарія, 2002 р. тощо). Декілька конференцій (1993 р. – міжнародна) були організовані безпосередньо на біологічній станції Університету, де вже існувала багата жива колекція бабаків, привезених з Камчатки, Якутії, Казахстану тощо.

У березні 2010 р. Віктор Арсентійович успішно захистив дисертацію на здобуття вченого звання доктора біологічних наук за темою «Біологія і екологія європейського бабака *Marmota bobak* (Muller, 1776) та його сучасний стан». Того ж року за визначні досягнення у галузі його нагороджено Почесною грамотою Міністерства освіти і науки України.

У 2013 р. групою фахівців під керівництвом Віктора Арсентійовича Токарського було втілено у життя давню мрію зоологів Харківщини – видано «Червону книгу Харківської області. Тваринний світ». Пробний наклад виходив у досить складних умовах – фінансування затримувалось, люди працювали майже безкоштовно. Більш як 40 фахівців та фотографів надали свої матеріали; автором всіх 20 нарисів про ссавців був власне Віктор Арсентійович. Майже одночасно під керівництвом В.А.Токарського було підготоване до друку ще одне видання – «Природна спадщина Харківської області» – про території природно-заповідного фонду найвищого рангу. Багато ілюстрована книга користується великим попитом у вчителів, керівників юннатських гуртків, аматорів. Пізніше було підготовлено ще одне видання – англійською та українською мовами одночасно. Але воно ще не побачило світу...

У вересні 2017 року за ініціативи і під керівництвом Віктора Арсентійовича Токарського на базі Харківського національного університету було організовано Всеукраїнську зоологічну конференцію – другу після досить великої перерви (2000 р., Кривий Ріг). Розпочавшись великим пленарним засіданням у стінах Університету, вона продовжилась на мальовничих берегах Сіверського Дінця – на біологічній станції та залишила неповторні спогади.

Будучи вже тяжко хворим, Віктор Арсентійович працював над давно запланованими рукописами – у 2016 році вийшов друком підручник «Зоологія позвоночних», трохи згодом – навчальний посібник «Ссавці Сходу України». Остання його праця – мемуари «Камчатка: сурки и я. Записки зоолога» – це, по суті, щоденник польового зоолога, що дає змогу уявити нюанси експедиційного побуту, дуже корисна не тільки для історії науки, але й для молодих науковців, студентів, що тільки обирають свій шлях.

Хроніка останніх п'яти років життя професора Віктора Арсентійовича Токарського – історія безперервної боротьби. І часом він виходив переможцем: відновившись після тяжкої операції, взяв участь у далекій експедиції до Казахстану; влітку 2018 року вивчав бабаків у Стрільцівському степу на Луганщині. У вересні 2019 року на черговій Всеукраїнській зоологічній конференції у Шацьку доповідь Віктора Арсентійовича Токарського «Бабак степовий (*Marmota bobak* Müller, 1776) в Україні» одноостайно була визнана однією з кращих. На жаль, вона стала останньою...

Віктор Арсентійович лишив по собі добру пам'ять у серцях людей, що торкнулися своєю долею до його життя.



**Пам'яті Юрія Георгійовича Шкорбатова
(1955–2020)**

4 января 2020 г. на 65 году жизни скончался Юрий Георгиевич Шкорбатов, доктор биологических наук (2005), заведующий кафедрой микологии и фитопатологии, профессор кафедры молекулярной биологии и биотехнологии Харьковского национального университета, известный специалист в области цитозологии и экологической генетики. Он был последним представителем династии, объединившей четыре поколения двух семей – Страховых и Шкорбатовых. На протяжении последних полутора веков эта династия дала выдающихся деятелей науки, образования и культуры Украины, России и всего мира. Среди них – основатели отечественной фитопатологии (Тимофей Страхов) и гидробиологии (Леонид Шкорбатов), известный эколог (Георгий Шкорбатов), общественные деятели, этнолингвист и издатель международного журнала, известный российский киноартист и т.д.

Научные интересы Юрия были весьма разнообразны, но ключевыми были несколько направлений:

1. Исследование воздействия физических факторов (радиации, микроволн, магнитных полей и лазерного излучения), а также биологически активных веществ на состояние гетерохроматина в ядре клетки, проницаемость клеточных мембран и жизнеспособность клеток.

2. Исследование влияния спортивных тренировок, циркадного ритма и возрастных изменений в организме человека на состояние хроматина в ядрах его клеток.

3. Изучение связи энергии взаимодействия цепей ДНК с генной активностью в кодирующих и некодирующих последовательностях в бактериальных геномах.

В каждом из этих направлений он оставил заметный след в науке, зафиксированный в более чем 250 публикациях.

Равным образом были разнообразны и сферы его профессиональной деятельности в Харьковском национальном университете имени В.Н.Каразина.

Долгое время он был сотрудником и учеником члена-учредителя Всесоюзного общества генетиков и селекционеров имени Николая Вавилова, заведующего кафедрой генетики и цитологии (одной из старейших университетских кафедр соответствующего профиля в Украине), академика АН Высшей школы Украины Валерия Гаевича Шахбазова. После его смерти Ю.Г.Шкорбатов принял руководство отделом генетики Института биологии, который он возглавлял до последнего дня собственной жизни.

Среди всех научных разработок Юрия Шкорбатова наибольшее внимание и мирового научного сообщества, и общественного мнения привлекли исследования последствий воздействий

на организм человека факторов, связанных с внедрением новых технологий так называемого NBIC (нано-, био-, инфо-, когнитивных) технологического комплекса.

Разработанные при его участии методы и технологические схемы экспресс-оценки готовности человека к пиковым и длительным физическим и психологическим нагрузкам, стрессам и подобным факторам имеют широкие перспективы внедрения в спортивной медицине, физиологии труда, военном деле и других отраслях.



Отталкиваясь от идей, предложенных в свое время его учителем В.Г.Шахбазовым, и радикально модернизировав их в соответствии с последними научными данными, Ю.Шкорбатов разработал концепцию, согласно которой структура хроматина нативных клеточных ядер может служить интегральным показателем реакции клетки и организма человека на стрессовые воздействия. Международное признание она получила после опубликования коллективной монографии «New Developments in Chromatin Research» (2012 г.). Глава 6 в ней была подготовлена им и носит название «Состояние хроматина как интегральный показатель клеточного стресса» (The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress). Основной постулат этой концепции опирается на то, что хроматин, являясь комплексом ДНК, существует в двух формах: гетерохроматин (конденсированная форма с низкой функциональной активностью) и эухроматин (диффузная форма, характеризующаяся высокой функциональной активностью). Увеличение доли конденсированной формы хроматина в ядре служит индикатором частичной инактивации системы синтеза РНК и функциональной активности генома. Этот вывод выглядит очевидным, однако на его основе в рамках исследования связей между структурой клеточного ядра и функциональной активностью генома Юрий Шкорбатов и его сотрудники обнаружили влияние на содержание гранул гетерохроматина в ядре многих физических факторов, в частности, лазерного, микроволнового излучения, электрических и магнитных полей. Актуальность этих данных трудно переоценить, учитывая насыщенность техно-экологической среды обитания электромагнитными излучениями в эпоху информационного общества. В перспективе эти исследования могут привести к пересмотру стандартов технологической безопасности.

В настоящее время разнообразные экспериментальные данные, полученные Ю.Г.Шкорбатовым и другими исследователями, уже продемонстрировали существенное значение структурных преобразований хроматина соответственно развитию патологического процесса и/или физиологическому стрессу на клеточном и организменном уровнях. Степень гетерохроматизации увеличивается в ходе неспецифического ответа организма на повреждающие воздействия со стороны внешней и внутренней среды. Кроме того, внимание исследователей неинфекционных (онкология, болезнь Альцгеймера, неврологические нарушения и наследственные заболевания) патологий смещается в сторону изучения связанных с конформацией хроматина аспектов ядерной регуляции развития патологического процесса. В равной степени это относится и к клеточной адаптации и техно-экологии. Например, под воздействием микроволнового излучения повышается содержание гранул гетерохроматина. Также установлено влияние на клеточное ядро изменений в состоянии организма человека, связанных с физическими нагрузками, циркадным ритмом и процессом старения.

Микроволнове излучение даже в малых дозах способно вызывать развитие стрессовых процессов в клетках буккального эпителия человека. Однако быстрая восстанавливаемость «индикаторов стресса» (таких как гетерохроматинизация) и отсутствие синергического эффекта при использовании микроволн и постоянного магнитного поля позволяют говорить об обратимости протекающих процессов, а также о высоком адаптационном потенциале клеток в отношении низкоинтенсивных воздействий коротковолнового радиоизлучения и магнитного поля.

Предложены способы определения влияния электромагнитных полей на клетку, а также количественного определения состояния усталости во время спортивных тренировок.

Предложенные Ю.Г.Шкорбатовым схемы используют параметры структурно-функционального состояния хроматина, легко поддающиеся визуализации и учету с использованием цифровых технологий.

Юрий Шкорбатов, как и другие члены династии Шкорбатовых-Страховых, был типичным воплощением уникального социального явления – интеллигенции. В отличие от западного интеллектуала, отечественный (украинский и российский) интеллигент не просто использует свой разум в качестве инструмента профессиональной деятельности, обеспечивающей ему «кусочек хлеба». Для него интеллект и нравственность, вопреки картезианскому дуализму, являются неотделимыми друг от друга составляющими человеческой природы, своеобразными «сиамскими близнецами», возникшими на пересечении биологической и культурной наследственности.

Биография Юрия Георгиевича – лучшее подтверждение этого тезиса. Он всегда знал и никогда не переступал ту красную черту, которая служит границей простой человеческой порядочности.

Основные научные публикации Ю.Г.Шкорбатова – см. персональный аккаунт https://scholar.google.com/citations?hl=en&user=3-RMwx4AAAAJ&view_op=list_works&sortby=pubdate

В.Ф. Чешко, доктор философских наук, профессор

••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

UDC: 577.113.4:546.719

Further evidence for redox activation of the plasmid – dirhenium(III) complexes interactions

K.V. Zeleniuk, O.A. Golichenko, A.V. Shtemenko, N.I. Shtemenko

The DNA-interactions *in vitro* are still necessary investigations for determination of the possible anticancer properties of the compounds, candidates for application in cancer therapy. The aim of the present work was to realize if the interaction of *cis*-dicarboxylates of dirhenium(III), with pivalato- (I), isobutirato- (II) and adamantyl- (III) ligands cleaves the plasmid in the same manner and what is the influence of the ligands on this process. For experiments we used the prokaryotic plasmid which is good model to analyze DNA-cleaving ability of different substances that exists in supercoiled conformation and turns to nicked and linear forms. It was shown that gradual conversion of the supercoiled Form I to a mixture of supercoiled (Form I) and nicked (Form II) DNA takes place and increasing amounts of Form II are produced with higher concentrations of I–III under increasing of concentration that showed the DNA-cleaving abilities of all investigated dirhenium complexes. This process was taking place with different intensity in the range I > II > III, that demonstrates the influence of the organic radical on the cleaving activity of the dirhenium(III) complexes. Under hydrogen peroxide conditions, I and II showed close results, demonstrating more intensive process of cleaving, including formation of the linear plasmid (Form III) under higher concentration, witnessing about redox-activation of the DNA-cleaving reaction. Cleaving activity of III was approximately the same in all experiments, that was demonstrated only by decreasing of the supercoiled form I and increasing of the nicked form II of the plasmid and by absolutely absence of the linear form III of the plasmid. The electrophoresis mobility shift assays showed that rhenium cluster compounds have nuclease activity and confirmed that natural DNA may be their target in the living cells. The conclusion was made that the mechanism of DNA-cleavage reaction of the dirhenium(III) complexes is multiple in which the electron donating (withdrawing) effects of the ligands and catalytic activity of the metal core should be taken in consideration.

Key words: *dirhenium(III) clusters, plasmid, DNA-cleavage, redox-activation.*

About the authors:

K.V. Zeleniuk – Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, paramonova.kateryna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3333-8406>

O.A. Golichenko – Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, golichenko_alex@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8888-794X>

O.V. Shtemenko – Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, shtemenko@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5588-0901>

N.I. Shtemenko – Dnipro Technical University, Dmytro Yavornytskyi Av., 19, Dnipro, Ukraine, 49005; Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, n.shtemenko@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5152-7270>

Introduction

Earlier using the method of UV-titration we have shown that the rhenium(III) quadruple bonding compounds interacted with supercoiled Calf Thymus DNA (CT DNA) (Paramonova et al., 2016; Polokhina et al., 2016) and that the mechanism of the interaction was redox-activated. Also, bis-dimethylsulfoxide-*cis*-tetrachlorodi- μ -pivalatodirhenium(III) cis - $Re_2((CH_3)_3CCOO)_2Cl_4 \cdot 2DMSO$ (I) was shown to cleave plasmid DNA by electrophoretic mobility shift assay (Shtemenko et al., 2013) in different manner depending from the redox state of the medium. The DNA-interactions *in vitro* are still necessary investigations for determination of the possible anticancer properties of the compounds, candidates for application in cancer therapy (Ismail et al., 2019). It is known, that anticancer properties of the dirhenium(III) dicarboxylates *in vivo* depended on the length of the alkyl ligands (Leus et al., 2012).

Thus, the aim of the present work was to realize if the interaction of other two dicarboxylates of dirhenium(III), with shorter (isobutirato-) and longer, bulkier (adamantyl-) ligands cleave the plasmid in the same manner and what is the influence of the ligands on this process.

Materials and methods

Materials.

Cis- $\text{Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$ bis-dimethylsulfoxide-cis-tetrachlorodi- μ -isobutyratodirhenium(III) (II) and cis- $\text{Re}_2(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$ bis-dimethylsulfoxide-cis-tetrachlorodi- μ -adamantylcarboxylatodirhenium(III) (III) were synthesized according to (Golichenko, Shtemenko, 2006, 2015). Supercoiled plasmid pUC18 and DNA ladder were purchased from Fermentas, Life Science (USA).

Electrophoretic Mobility Shift Assays.

The mobility assays were performed according to (Keck, Lippard, 1992; Mitra et al., 1997) by using aliquots (10 μl) of native supercoiled plasmid pUC18 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and increasing concentrations of complex (0 to 80 μM). Electrophoresis experiments were carried out using 1 % agarose gel and buffer solution (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA, pH 8.2). The applied voltage was 250 V and the gels were run for a period of 20 min. After electrophoresis, the gels were stained with 0.5 mg/L ethidium bromide and imaged under UV light. The efficiency of the DNA cleavage was measured by determining the ability of the complex to form open circular or nicked circular DNA from its supercoiled forms. The same assays were also carried out in the presence of H_2O_2 (experiment b) and 2-mercaptoethanol (experiment c) (25 μM). Gel image analysis was made with the help of free LabImage 1D – Software for 1D Gels and Western Blots (<https://www.kapelanbio.com/products/>).

Results and discussion

To study cleavage ability of metal-containing substances and their cleavage pathway, an assay is widely used, which employs a special type of DNA, a plasmid DNA (Wang et al., 2015; Kettenman et al., 2018; Kadoya et al., 2019). Single strand DNA cleavage (SSC) is the process, in which one scission is introduced in one of the two DNA strands in one cleavage event. Double strand DNA cleavage (DSC) denotes the process, in which two scissions are introduced to each of the strands of the DNA double helix in a single cleavage event. Although both pathways introduce double strand breaks ultimately, it is important to note that these are two inherently different processes. The pathway that is responsible for the induction of strand breaks is of more interest, as the direct double strand cleavage pathway is considered to be responsible for the cytotoxicity of the initiating substances to cancer cells.

Typically, the quaternary structure of plasmids is superhelical, which means that the double stranded DNA forms a compact folded structure. When one of the DNA strands is broken, a swivel, i.e. a free rotation site in the complementary strand opposite to the break, relieves the strain in the twisted molecule. This causes the supercoiled structure to relax into an uncoiled form, which is referred to as nicked DNA. When both strands of the DNA are cleaved opposite to each other, linear DNA is observed. Supercoiled DNA is often referred to as form I, nicked DNA as form II and linear DNA as form III. These forms are good resolved by electrophoresis (Sears et al., 2013; Kadoya et al., 2019).

We used these good described phenomena to investigate cleaving activity of the investigated substances II and III (Fig. 1, 2) and to compare the results with previously obtained data for the substance I.

The intensity of the bands obtained by scanning procedure is presented on the Fig. 3.

As it is clear from obtained results, the gradual conversion of the supercoiled Form I to a mixture of supercoiled (Form I) and nicked (Form II) DNA takes place and increasing amounts of Form II are produced with higher concentrations of I–III under increasing of concentration that showed the DNA-cleaving abilities of all investigated dirhenium complexes (Experiment a). This process was taking place with different intensity in the range $\text{I} > \text{II} > \text{III}$, that demonstrates the influence of the organic radical on the cleaving activity of the dirhenium(III) complexes. This range coincides with the binding constants, obtained from the UV-titration experiments (Paramonova et al., 2016; Polokhina et al., 2016).

Under hydrogen peroxide conditions (Experiment b) I and II showed close results, demonstrating more intensive process of cleaving, including formation of the linear plasmid (Form III) under higher concentration, witnessing about redox-activation of the DNA-cleaving reaction. Cleaving activity of III was approximately the same in Experiments a–c, that was demonstrated only by decreasing of the supercoiled form I and increasing of the nicked form II of the plasmid and by absolutely absence of the linear form III of the plasmid.

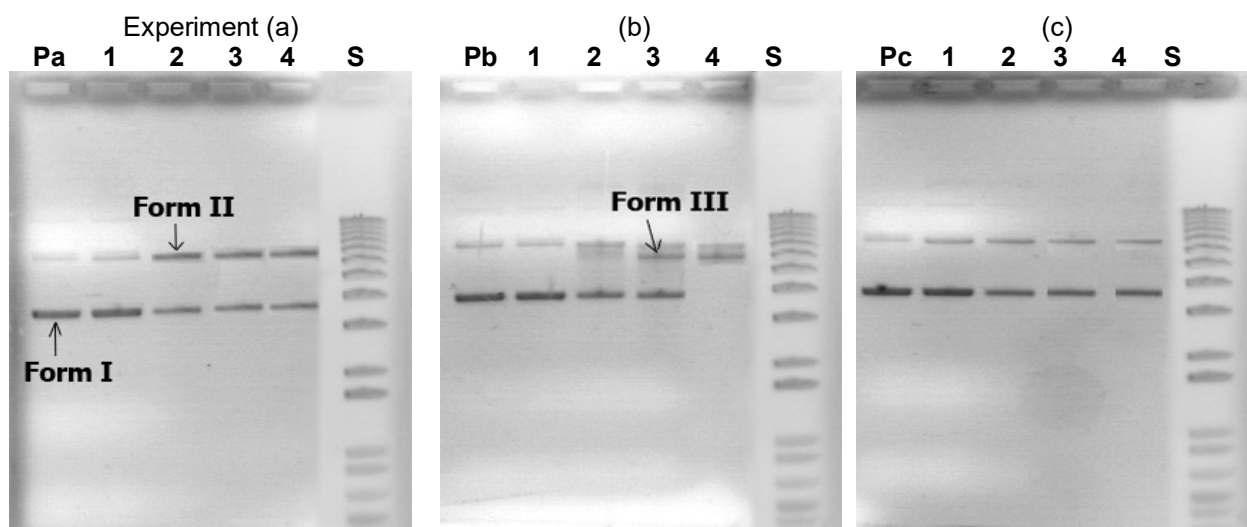


Fig. 1. Ethidium stained agarose gel electrophoresis depicting pUC18 mobility and effects (a) in the presence of increasing concentrations of II; (b) pUC18 with II in the presence of hydrogen peroxide; (c) pUC18 with II in the presence of mercaptoethanol. Lane Pa – untreated plasmid, Pb – plasmid with hydrogen peroxide; Pc – plasmid with mercaptoethanol; lanes 1: 10 μM; 2: 20 μM; 3: 40 μM; 4: 80 μM (concentration of II); S – standard

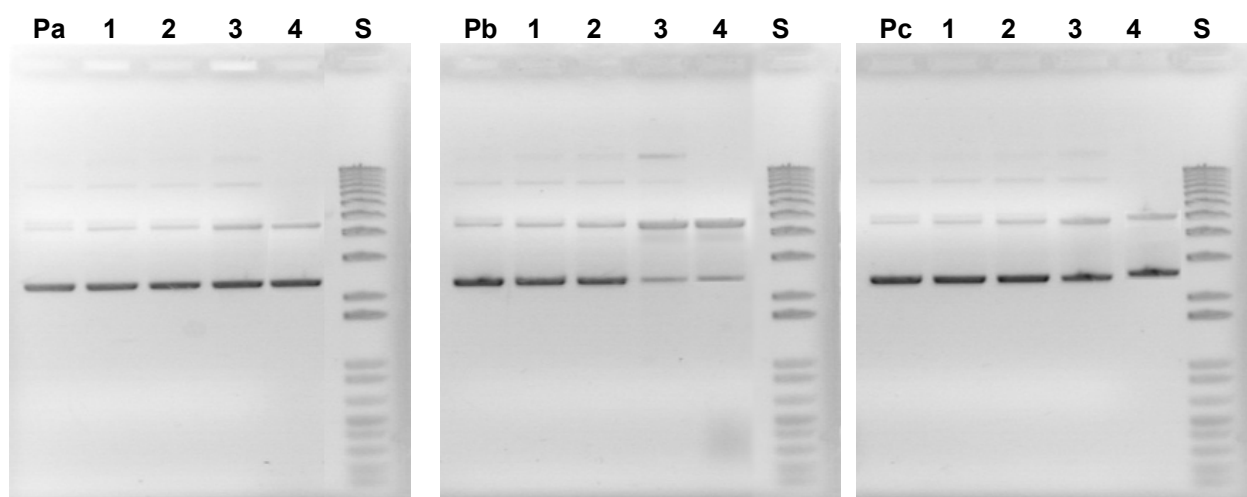


Fig. 2. Ethidium stained agarose gel electrophoresis depicting pUC18 mobility and effects (a) in the presence of increasing concentrations of III; (b) pUC18 with III in the presence of hydrogen peroxide; (c) pUC18 with III in the presence of mercaptoethanol. Lane Pa – untreated plasmid, Pb – plasmid with hydrogen peroxide; Pc – plasmid with mercaptoethanol; lanes 1: 10 μM; 2: 20 μM; 3: 40 μM; 4: 80 μM (concentration of III); S – standard

In the presence of mercaptoethanol (Experiment c), the activation of the cleaving abilities of I–III are also evident but no Form III is observed as compared to the activity of I–III only.

The presence of the slowest moving bands in Fig. 1, 2 (slower than Form II) indicates formation of high molecular weight adducts that may be explained by the ability of unwound plasmids to polymerize (Vilfan et al., 2006) or to form unwound DNA-I intra-strand adducts similar to cisplatin and dirhodium compounds (Dunham et al., 2005).

The mechanism of the SSC and DSC of plasmids was in detail studied for bleomycin (BLM), an iron-containing natural nuclease (Decker et al., 2006). The experimental and computational studies presented here on the reaction coordinate of activated BLM strongly support the low-spin (BLM)Fe^{III}-OOH

complex as the active oxidizing species and a direct hydrogen-atom abstraction as the reaction mechanism for the initial attack on DNA. The mechanism for double-strand cleavage by a single BLM molecule would then involve the Fe^{IV} intermediate generated by the first reaction as the active species for the initial second H-atom abstraction reaction damaging the second DNA strand. A hydroperoxo species of the dicopper(II) was also identified as the active species and spectroscopically identified in the reaction of the complex with plasmids (Kadoya et al., 2019). Analogical investigations for the dirhenium(III) complexes are absent, but acceleration of the nuclease reaction by hydrogen peroxide shown by us makes possible to think that the same hydroperoxo species may play definite role in the investigating processes with rhenium substances.

It is well-known that the microenvironment in the cancer cells is significantly different from that in normal cells (Zhou et al., 2014) and the concentration of reactive oxygen species (ROS) including H_2O_2 is relatively higher in cancer cells than in normal cells (Nogueira, Hay, 2013), that is mainly caused by mitochondrial malfunction (Aykin-Burns et al., 2009). Thus, redox activating of the process of cleavage by H_2O_2 shown by us in the Experiment b, is of great value as could work in cancer cells but not so extensively in normal cells and this phenomena could be used to reduce the side-effects of anticancer drugs.

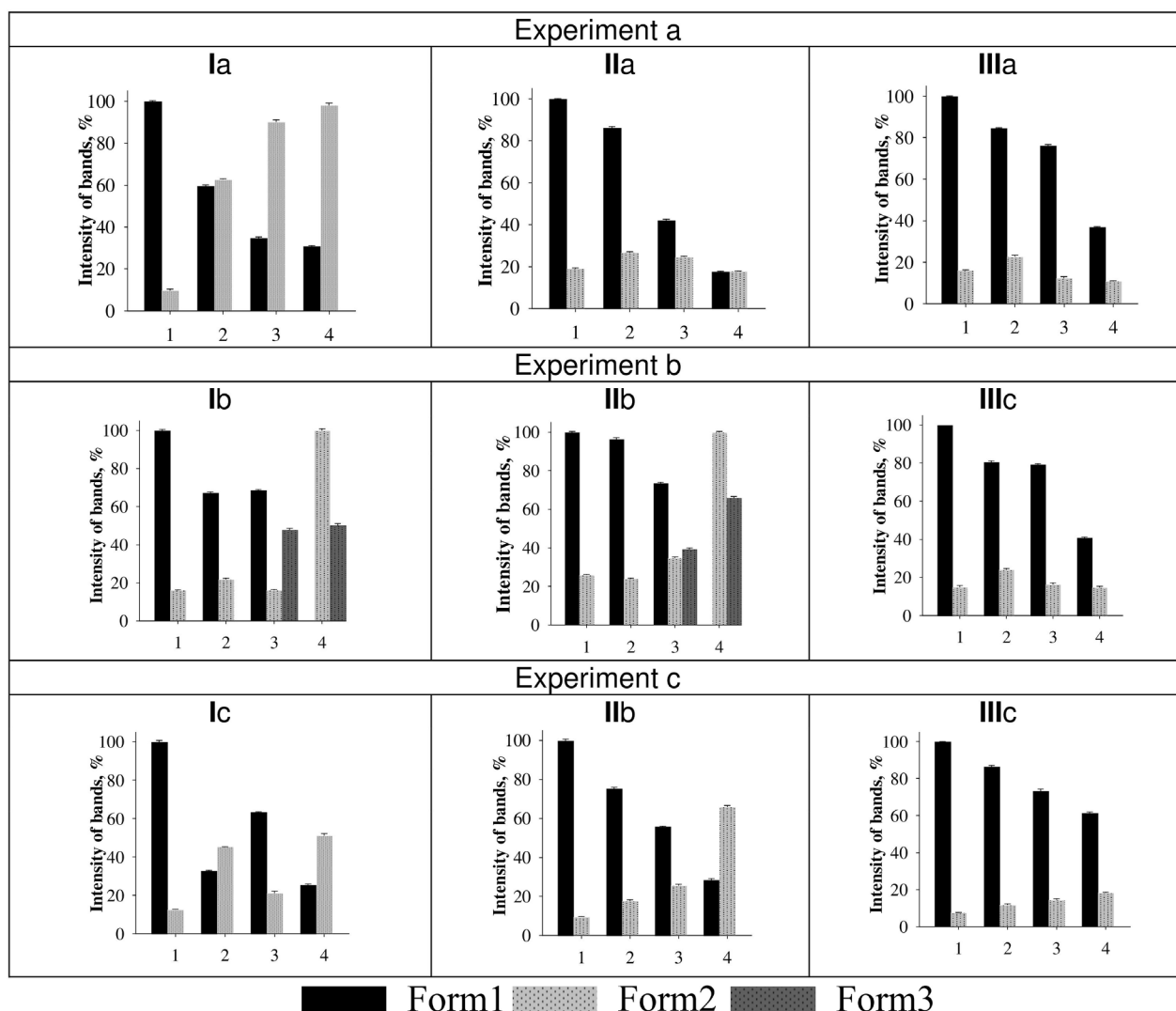


Fig. 3. Intensity of bands of different forms of plasmid pUC 18 under influence of I, III, III in % to intensity of Pa, Pb, Pc accordingly

The influence of ligands surrounding the active center of metal-containing artificial nucleases was investigated on the copper – dipicolamine complexes (Wang et al., 2015). It was shown that replacement of a hydrogen atom of the dipicoyl ligand with a benzyl group enhanced the efficiency both of SSC and DSC cleavage; also introducing an electron donating group resulted in further increase in efficiency, whereas the presence of electron withdrawing group reduced the efficiency; the introducing of different ROS-inhibitors decreased the intensity of cleavage. In our experiments **I** (pivalic derivative) and **II** (isobutyric derivative) are homologues, **I** has two longer alkyl ligands, that we may note that they are more electron donating and thus agree with previously made conclusions about possible formation of the intermediate complex for which electron donation is a stabilization factor. As for **III**: recently we have shown that some dirhenium complexes with diadamantyl ligands had catalase-like activity (Shamelashvili et al., 2016); thus, **III** could act as inhibitor of ROS-formation in the nuclease event. Nuclease activity of the dirhenium(III) clusters to our mind is of great interest and requires additional deep investigations.

Conclusions

The electrophoresis mobility shift assays showed that compounds **I–III** have nuclease activity and confirmed that natural DNA may be their target in the living cells. The redox-activation of DNA cleavage, observed in the electrophoresis experiments, may explain the anticancer activity of dirhenium(III) compounds as well as the positive effects of combined therapy, that includes their simultaneous introduction together with cisplatin. The present study and our other recent reports showed the dependence of the DNA-cleaving activity of dirhenium clusters on the nature of the ligands in the coordination sphere of the Re_2^{6+} clusters. The obtained data showed the multiple mechanism of DNA-cleavage reaction of the dirhenium(III) complexes in which the electron donating (withdrawing) effects of the ligands and catalytic activity of the metal core should be taken in consideration.

Acknowledgements

We wish to thank Prof. Helen Zgurskaya (Oklahoma University, USA) for her help in accomplishment of the work.

References

- Aykin-Burns N., Ahmad I.M., Zhu Y. et al. (2009). Increased levels of superoxide and H_2O_2 mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.*, **418**, 29–37. <https://doi.org/10.1042/BJ20081258>
- Decker A., Chow M.S., Kemsley J.N. et al. (2006). Direct hydrogen-atom abstraction by activated bleomycin: an experimental and computational study. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4719–4733. <https://doi.org/10.1021/ja057378n>
- Dunham S.U., Chifotides H.T., Mikulski S. et al. (2005). Covalent binding and interstrand cross-linking of duplex DNA by dirhodium(II,II) carboxylate compounds. *Biochemistry*, **44**, 996–1003. <https://doi.org/10.1021/bi0486637>
- Golichenko A.A., Shtemenko A.V. (2006). Cluster rhenium(III) complexes with adamantanecarboxylic acids: synthesis and properties. *Rus. J. of Coord. Chem.*, **32**, 242–249. <https://doi.org/10.1134/S1070328406040038>
- Golichenko A.A., Shtemenko A.V. (2015). Crystal structure of di- μ -isobutyrate- $\kappa^4\text{O}':\text{O}'$ -bis[*cis*-dichlorido(dimethylsulfoxide- κS)rhenium(III)]. *Acta Cryst. Section E: Cryst. Com.*, **E71**, 1219–1221. <https://doi.org/10.1107/S2056989015017429>
- Ismail M.B., Booyen I.N., Akerman M.P. (2019). DNA interaction studies of rhenium compounds with Schiff base chelates encompassing biologically relevant moieties. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **38**(12), 950–971. <https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1639058>
- Kadoya Y., Fukui K., Hata M. et al. (2019). Oxidative DNA cleavage, formation of μ -1,1-hydrperoxo species and cytotoxicity of dicopper(II) complex supported by a p-cresol-derived amide-tether ligand. *Inorganic Chemistry*, **58**(21), 14294–14298. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02093>
- Keck M.V., Lippard S.J. (1992). Unwinding of supercoiled DNA by platinum ethidium and related complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3386–3390. <https://doi.org/10.1021/ja00035a033>
- Kettenmann S.D., Louka F.R., Marine E. et al. (2018). Efficient artificial nucleases for mediating DNA cleavage based on tuning the steric effect in the pyridyl derivatives of tripod tetraamine-cobalt(II) complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2018**, 2322–2338. <https://doi.org/10.1002/ejic.201800276>

- Leus I.V., Shamelashvili K.L., Skorik O.D. et al. (2012). Antioxidant and antitumor activity of dirhenium dicarboxylates in animals with Guerin carcinoma. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 84(3), 87–96. (In Ukrainian)
- Mitra K., Kim W., Daniels J.S., Gates K.S. (1997). Oxidative DNA cleavage by the antitumor antibiotic leinamycin and simple 1,2-dithiolan-3-one 1-oxides: evidence for thiol-dependent conversion of molecular oxygen to DNA-cleaving oxygen radicals mediated by polysulfides. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 11691–11692. <https://doi.org/10.1021/ja971359z>
- Nogueira V., Hay N. (2013). Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 19, 4309–4314. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1424>
- Paramonova K., Golichenko A., Babiy S. et al. (2016). The interaction of DNA with cluster rhenium compounds of different structural types. *World of Med. and Biol.*, 56(2), 140–144.
- Polokhina K., Golichenko A., Babiy S. et al. (2016). Investigation of the interaction of cluster compounds of rhenium with biological active ligands with supercoiled DNA by electronic spectroscopy. *Visnyk of Lviv University, Biol. series*, 72, 15–24.
- Sears R.B., Joyce L.E., Ojami M. et al. (2013). Photoinduced ligand exchange and DNA binding of *cis*-[Ru(phpy)(phen)(CH₃CN)₂]⁺ with long wavelength visible light. *J. Inorg. Biochem.*, 121, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.003>
- Shamelashvili K.L., Shtemenko N.I., Leus I.V. et al. (2016). Changes in oxidative stress intensity in blood of tumor-bearing rats following different modes of administration of rhenium-platinum system. *Ukr. Biochem. Journal*, 88(4), 29–39. <https://doi.org/10.15407/ubj88.04.029>
- Shtemenko N.I., Chifotides H.T., Domasevitch K.V. et al. (2013). Synthesis, X-ray structure, interactions with DNA, remarkable *in vivo* tumor growth suppression and nephroprotective activity of *cis*-tetrachloro-dipivalato dirhenium(III). *J. of Inorg. Biochem.*, 129, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.001>
- Vilfan I.D., Conwell C.C., Sarkar T., Hud N.V. (2006). Time study of DNA condensate morphology: implications regarding the nucleation, growth, and equilibrium populations of toroids and rods. *Biochemistry*, 45, 8174–8183. <https://doi.org/10.1021/bi060396c>
- Wang W., Lee Y.A., Kim G. et al. (2015). Oxidative DNA cleavage by Cu(II) complexes: effect of periphery substituent groups. *J. Inorg. Biochem.*, 153, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.07.015>
- Zhou D., Shao L., Spitz D.R. (2014). Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Adv. Cancer Res.*, 122, 1–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3>

Додаткові докази редокс-активації взаємодій плазмід – комплекси диренію(III)

К.В. Зеленюк, О.А. Голіченко, О.В. Штеменко, Н.І. Штеменко

Дослідження взаємодії з ДНК *in vitro* є необхідним для визначення можливих протипухлинних властивостей сполук – кандидатів на застосування у терапії раку. Мета цієї роботи полягала у тому, щоб зрозуміти, чи однаково розщеплюють плазмиду *cis*-дихлоробоксиди диренію(III) з півалатними (I), ізобутіратними (II) та адамантилкарбоксилатними (III) лігандами, і як впливають ліганди на цей процес. Для експериментів ми використовували прокаріотичну плазмиду, яка є придатною моделлю для аналізу здатності розщеплювати ДНК різними речовинами та існує у суперспіралізованій конформації і перетворюється у деспіралізовану і лінійну форми. Було показано, що відбувається поступове перетворення суперспіралізованої форми I у суміш ДНК із суперспіралізованою (форма I) і деспіралізованою (форма II) формами, при більш високих концентраціях комплексних сполук I–III (при підвищенні концентрації) збільшуються кількості форми II, що показує здатність всіх досліджених диренієвих комплексів розщеплювати ДНК. Цей процес відбувався з різною інтенсивністю в ряду I > II > III, що свідчить про вплив органічного радикала на нуклеазну активність комплексів диренію(III). За наявності гідроген пероксиду I і II показали близькі результати, демонструючи більш інтенсивний процес розщеплення, який включає утворення лінійної плазмиди (форма III) при більш високій концентрації, що свідчить про редокс-активацію реакції розщеплення ДНК. Розщеплююча активність III була приблизно однаковою у всіх експериментах, що було продемонстровано зменшенням суперспіралізованої форми I і збільшенням деспіралізованої форми II плазмиди, а також повною відсутністю лінійної форми III плазмиди. Аналіз зсуву рухливості при електрофорезі показав, що кластерні сполуки ренію володіють нуклеазною активністю, і підтвердив, що природна ДНК може бути їх мішенню в живих клітинах. Був зроблений висновок про те, що механізм реакції розщеплення ДНК комплексами диренію(III) є багатограничним, при цьому слід брати до уваги електрондонорні ефекти лігандів і каталітичну активність кластерного диренієвого ядра.

Ключові слова: кластери диренію(III), плазмід, розщеплення ДНК, редокс-активація.

Про авторів:

К.В. Зеленюк – ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, paramonova.kateryna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3333-8406>
О.А. Голіченко – ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, golichenko_alex@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8888-794X>
О.В. Штеменко – ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, shtemenko@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5588-0901>
Н.І. Штеменко – НТУ «Дніпровська політехніка», вул. Д.Яворницького, 19, Дніпро, Україна, 49005; ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, n.shtemenko@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5152-7270>

**Дополнительные доказательства редокс-активации взаимодействия
плазмиды – комплексы дирения(III)**

К.В. Зеленюк, А.А. Голиченко, А.В. Штеменко, Н.И. Штеменко

Изучение взаимодействия с ДНК *in vitro* всё ещё является необходимым исследованием для определения возможных противоопухолевых свойств соединений – кандидатов на применение в терапии рака. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы понять, одинаково ли расщепляют плазмиду цис-дикарбоксилаты дирения(III) с пивалатными (I), изобутиратными (II) и адамантилкарбоксилатными (III) лигандами, и какое влияние оказывают лиганды на этот процесс. Для экспериментов мы использовали прокариотическую плазмиду, которая является хорошей моделью для анализа способности расщеплять ДНК различными веществами, существует в суперспирализованной конформации и превращается в деспирализованные и линейные формы. Было показано, что происходит постепенное превращение суперспирализованной формы I в смесь ДНК со суперспирализованной (форма I) и деспирализованной (форма II) формами, при более высоких концентрациях I–III (при повышении концентрации) увеличивается количество формы II, что показывает способность всех исследованных дирениевых комплексов расщеплять ДНК. Этот процесс происходил с различной интенсивностью в ряду I > II > III, что свидетельствует о влиянии органического радикала на расщепляющую активность комплексов дирения(III). При наличии перекиси водорода I и II показали близкие результаты, демонстрируя более интенсивный процесс расщепления, который включает образование линейной плазмиды (форма III) при более высокой концентрации, что свидетельствует о редокс-активации реакции расщепления ДНК. Расщепляющая активность III была примерно одинаковой во всех экспериментах, что было продемонстрировано уменьшением суперспирализованной формы I и увеличением деспирализованной формы II плазмиды, а также полным отсутствием линейной формы III плазмиды. Анализ сдвига подвижности при электрофорезе показал, что кластерные соединения рения обладают нуклеазной активностью, и подтвердил, что природная ДНК может быть их мишенью в живых клетках. Сделан вывод о том, что механизм реакции расщепления ДНК комплексами дирения(III) является многогранным, при этом следует принимать во внимание электронодонорные эффекты лигандов и каталитическую активность кластерного дирениевого ядра.

Ключевые слова: кластеры дирения(III), плазида, ДНК-расщепление, редокс-активация.

Об авторах:

К.В. Зеленюк – ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, paramonova.kateryna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3333-8406>
А.А. Голиченко – ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, golichenko_alex@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8888-794X>
А.В. Штеменко – ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, shtemenko@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5588-0901>
Н.И. Штеменко – НТУ «Днепропетровская политехника», ул. Д.Яворницького, 19, Днепр, Украина, 49005; ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, n.shtemenko@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5152-7270>

Представлено: О.М.Савчук / Presented by: O.M.Savchuk

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 06.04.2020

УДК: [577.125.8+577.152.1]:[546.48+546.172.6-31]

Вплив донорів монооксиду нітрогену на показники кадмій-індукованого оксидативного стресу в різних органах щурів

І.В. Нікітченко, Т.П. Рибальченко, Т.В. Бараннік, О.В. Павиченко

Основним механізмом токсичної дії іонів кадмію на клітини вважають оксидативний стрес, який кадмій, що не є перехідним металом, викликає опосередковано. Окисні пошкодження клітин за дії іонів кадмію є тканинспецифічними і пов'язані з інгібуванням антиоксидантної системи, накопиченням вільного гему, заміщенням есенціальних металів у металопротеїнах. Монооксид нітрогену (NO) виявляє високу спорідненість до гему та сульфгідрильних груп білків і пептидів, які є основними молекулярними мішенями для іонів кадмію. З огляду на вищенаведене, метою цієї роботи стало дослідження впливу донорів NO-радикалів на прооксидантно-антиоксидантний стан тканин ссавців за умов оксидативного стресу, спричиненого введенням *in vivo* хлориду кадмію. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 160–200 г. CdCl₂ вводили підшкірно у дозі 14 мг/кг маси тіла. Прямий донор NO-радикалу нітропрусид натрію (SNP, 1 мг/кг маси) і субстрат NO-синтазної реакції L-аргінін (600 мг/кг маси) вводили внутрішньочеревинно. Для дослідження корегувального впливу донори NO-радикалу вводили за 0,5 год до ін'єкції солі кадмію. Об'єктами дослідження були плазма крові і гомогенати печінки, нирок і селезінки щурів. Введення хлориду кадмію спричинило низку порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу, більшість з яких відбувались через добу. Накопичення продуктів ліпопероксидації встановлено у сироватці крові, печінці та селезінці щурів. Посилення прооксидантних процесів у цих тканинах може бути результатом надходження до них іонів кадмію та продуктів гемолізу. В антиоксидантній системі суттєві зміни спостерігались під впливом кадмію лише в печінці: збільшення вмісту відновленого глутатіону та СОД активності і зниження активності каталази. Попередник монооксиду нітрогену L-аргінін не змінював базальний рівень прооксидантно-антиоксидантних показників, а також у більшості випадків не впливав на їх динаміку після введення хлориду кадмію в органах, що досліджувались. Прямий донор NO нітропрусид натрію діяв у печінці та селезінці значною мірою як прооксидант. В печінці введення тільки нітропрусиду, так само як і сумісне введення SNP і CdCl₂, призводило до активації вільнорадикальних процесів вже в перші години. У селезінці сумісне введення SNP і солі кадмію також спричинювало більш ранній розвиток оксидативного стресу, про що свідчило збільшення рівню гідропероксидів ліпідів і зниження вмісту відновленого глутатіону. Отже, введення прямого донору NO нітропрусиду натрію та субстрату NO-синтаз L-аргініну в обраних дозах не мало вираженого коригувального впливу на кадмій-індукований оксидативний стрес у печінці, нирках та селезінці. Однак у крові обидва донори NO ефективно запобігали накопиченню продуктів ліпопероксидації за введення CdCl₂, крім того, L-аргінін суттєво зменшував вихід лактатдегідрогенази, що може свідчити про захист клітин крові та судин від пошкоджень за дії іонів кадмію.

Ключові слова: кадмій, оксидативний стрес, монооксид нітрогену, антиоксидантна система.

Про авторів:

І.В. Нікітченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5858-3382>

Т.П. Рибальченко – Харківська державна академія фізичної культури, вул. Клочківська, 99, Харків, Україна, 61022, tanyusic@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0003-3107-0290>

Т.В. Бараннік – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

О.В. Павиченко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, olga.pavichenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1396-790X>

Вступ

Солі кадмію виявляють різнопланові токсичні ефекти на організм ссавців, призводять до виражених змін генної експресії та обміну речовин (Tokimoto et al., 2019). Основним механізмом пошкоджуючої дії іонів кадмію на клітини вважають оксидативний стрес, який кадмій, що не є перехідним металом, викликає опосередковано (Liu et al., 2009). Прооксидантні ефекти кадмію можуть бути наслідком інгібування ферментів антиоксидантної системи та дихального ланцюга (Kukongviriyapan et al., 2016). Крім того, іони кадмію можуть витіснити іони есенціальних металів, в тому числі іони заліза, з активних центрів ферментів, викликати деградацію гемопротеїнів крові та інших тканин з подальшим накопиченням вільного гему та іонів заліза, які є учасниками вільнорадикальних процесів (Chiabrande et al., 2014).

Основним механізмом детоксикації сполук важких металів, зокрема кадмію, вважають їх зв'язування тіол-багатими білками металотіонеїнами (МТ) з подальшим виведенням з організму. Гени МТ регулюються іонами цинку, останні за умов інтоксикації кадмієм активно витісняються з комплексів з МТ (Ejnik et al., 2010).

Встановлено, що за рахунок високої спорідненості до тіолових груп монооксид нітрогену NO також може активно витіснити іони цинку з МТ (Karim, Petering, 2017), що призводить до індукції синтезу МТ *de novo* (Katakai et al., 2001). Дані щодо прямої взаємодії іонів кадмію, металотіонеїнів та монооксиду нітрогену досить суперечливі. В літературі обговорюється як можливість переносу NO с нітрозоглутатіону на МТ з виходом іонів цинку залежно від рівню кисню у середовищі, так і низька здатність NO, але спроможність його метаболітів до прямої взаємодії з іонами цинку або кадмію у складі МТ (Zhu et al., 2010). Окрім впливу на обмін металів, NO виявляє антиоксидантні властивості, а також може знижувати рівень ліпофільного прооксиданта вільного гему шляхом його нітрозилування та активації ферментів його деградації (Bloodsworth et al., 2000). Все це дозволяє розглядати монооксид нітрогену як перспективний засіб корекції розвитку оксидативного стресу за інтоксикації іонами кадмію.

З огляду на вищенаведене, **метою цієї роботи** стало дослідження впливу донорів NO-радикалів на прооксидантно-антиоксидантний стан тканин щурів за умов оксидативного стресу, спричиненого введенням хлориду кадмію.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 160–200 г. Хлорид кадмію вводили підшкірно у дозі 14 мг/кг маси тіла. Нітропруссид натрію (sodium nitroprusside, SNP) вводили внутрішньочеревинно в дозі 1 мг/кг маси тіла за 30 хв до ін'єкції CdCl₂. L-аргінін (Arg, наважку L-аргініну розчиняли в 1 N HCl, нейтралізували розчин амінокислоти 2 N NaOH і доводили до потрібного об'єму 0,9 % NaCl) вводили внутрішньочеревинно в дозі 600 мг/кг маси тіла за 30 хв до ін'єкції CdCl₂. Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм 0,9% NaCl. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 2 год або 24 год після введення хлориду кадмію. Експерименти проводились з дотриманням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986, Директиви ЄЕС №609 від 24.11.1986 і наказ МОЗ України №690 від 23.09.2009).

Об'єктами дослідження були сироватка крові та гомогенати печінки, нирок та селезінки. Органи перфузували 0,9 % NaCl *in situ*. Наважку органу гомогенізували в 4 об'ємах 0,1 M K-Na-фосфатного буфера, рН 7,4. Гомогенат фільтрували і заморожували в рідкому азоті в поліетиленових ампулах по 0,6 мл. Перед експериментом ампули відігрівали у водяній бані при 37°C. Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) визначали спектрофотометрично за різницею поглинання при 535 та 520 нм продукту реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), як описано в роботі (Ohkawa et al., 1979). Вміст ГПЛ виражали в еквівалентних кількостях малонового діальдегіду (МДА), використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Вимірювання швидкості накопичення МДА при спонтанному перекисному окисненні ліпідів (СПОЛ) в гомогенатах органів проводили, як описано в роботі (Владимиров, Арчаков, 1972), і виражали у нмоль МДА/мг білка за 20 хв інкубації. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали спектрофотометрично при 305 нм за кількістю утвореного комплексу з алоксаном (Patterson, Lazarow, 1955) і виражали у мкмоль/г тканини. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) визначали в сироватці крові флуориметрично за швидкістю відновлення NAD⁺ (Иванов и др., 1974) та виражали в нмоль NADH/хв на 1 мл сироватки. Активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали спектрофотометрично (240 нм) за швидкістю зменшення кількості пероксиду водню, як описано (Beavcham, Fridovich, 1971), і виражали в мкмоль H₂O₂/хв на 1 мг білка. Активність Cu,Zn-супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали спектрофотометрично (560 нм) за ступенем інгібування реакції відновлення нітротетразолієвого синього (НТС) супероксидними радикалами, що генеруються у ксантинооксидазній реакції (Beavcham, Fridovich, 1971). За одиницю СОД активності брали 50 % інгібування швидкості відновлення НТС і виражали в ум.од./хв. на 1 мг білка. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959).

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Past (Hammer et al., 2001). Тип розподілу одержаних даних визначали за допомогою *W*-критерію Шапіро–Уїлка. Залежно від типу розподілу проводився розрахунок середніх значень та стандартної помилки або

медіан та квартилей, порівняння показників у різних групах проводили з використанням, відповідно, *t*-критерію Стьюдента або непараметричного *U*-критерію Манна-Уїтні. Розходження вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати і обговорення

У сироватці крові оцінювали показники розвитку оксидативного стресу та пошкодження клітин. Через 2 год після введення хлориду кадмію вміст гідропероксидів ліпідів в сироватці крові не змінювався, а за добу підвищувався в 1,8 рази (табл. 1). Подібна динаміка ТБК-активних продуктів в сироватці крові після введення хлориду кадмію отримана також в роботі (Павиченко, Калиман, 2003). Зростання рівня продуктів ліпопероксидації після ін'єкції CdCl₂ свідчить про активацію вільно-радикальних процесів у кров'яному руслі. Відомо, що оксидативний стрес відіграє важливу роль у токсичних ефектах іонів кадмію в різних клітинах. Більшість даних літератури свідчить про опосередковану участь кадмію, як неперехідного металу, в розвитку оксидативного стресу: через вивільнення іонів заліза, інгібування антиоксидантної системи, накопичення вільного гему в тканинах тощо (Jurczuk et al., 2004; Павиченко, Калиман, 2003; Kaliman et al., 2008).

Таблиця 1.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка) та активність лактатдегідрогенази (нмоль NADH/хв на мл сироватки) в сироватці крові щурів після введення CdCl₂, сумісного введення CdCl₂ і нітропрусиду натрію або L-аргініну ($M \pm m$ або Me (25%;75%), $n=5-6$, * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно CdCl₂ через 24 год)

Показ-ник	Контроль	CdCl ₂	SNP+CdCl ₂	L-Arg+CdCl ₂	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	1,03±0,10	1,05±0,20	1,02±0,19	1,11±0,08	1,54±0,16*	1,18±0,06
ЛДГ	0,38 (0,26÷0,58)	0,48 (0,46÷0,62)	0,52 (0,51÷0,62)	0,57 (0,44÷0,88)	0,51 (0,49÷0,65)	0,48 (0,38÷0,64)
24 год						
ГПЛ	1,03±0,10	1,93±0,31*	1,20±0,17	1,09±0,27	1,18±0,15	0,87±0,17
ЛДГ	0,38 (0,26÷0,58)	3,76* (0,90÷9,6)	1,00* (0,88÷3,41)	0,66*# (0,51÷0,81)	0,45 (0,35÷0,47)	0,43 (0,36÷0,46)

Попереднє введення донорів монооксиду азоту нітропрусиду натрію або L-аргініну запобігало підвищенню вмісту ГПЛ під впливом кадмію. Відомо, що NO виявляє антиоксидантні властивості, обумовлені, по-перше, його здатністю безпосередньо взаємодіяти з алкоксильними і пероксильними радикалами, перериваючи у такий спосіб ланцюги вільнорадикальних реакцій (Chamulitrat, 1998). По-друге, NO утворює нітрозильні комплекси з гемовим залізом, обмежуючи його участь в окисно-відновних процесах (Меньщикова и др., 2006). Введення тільки нітропрусиду натрію призводило до підвищення вмісту ГПЛ в сироватці крові через 2 год після ін'єкції цього донору, що, ймовірно, обумовлено прооксидантними властивостями самого SNP (Nazari et al., 2012). Через добу дії SNP вміст гідропероксидів ліпідів не відрізнявся від контрольних значень. L-аргінін не впливав на базальний рівень ГПЛ в сироватці крові.

Активність ЛДГ в сироватці крові в перші години дії хлориду кадмію не змінилась, а через 24 год зросла майже в 10 разів (табл. 1). Різке підвищення активності цього ферменту у кров'яному руслі може свідчити про пошкодження клітин крові та інших тканин за умов надходження до організму хлориду кадмію. Через добу після сумісного введення L-аргініну і солі кадмію активність ЛДГ складала 170% від контрольного рівня, що значно нижче активності ферменту за дії тільки кадмію. За введення нітропрусиду натрію активність ЛДГ після ін'єкції CdCl₂ залишалась у 2,6 рази вище контролю.

Іони кадмію можуть надходити і накопичуватись у різних органах, але основними мішенями є печінка і нирки (Swiergosz-Kowalewska, 2001). Показано, що за гострої інтоксикації іони кадмію транспортуються переважно до печінки, де утворюють комплекси з металотіонеїнами. Останні

згодом вивільнюються і переносяться кров'ю до нирок, де поглинаються рецептор-опосередкованим ендцитозом в ниркових проксимальних канальцях (Sabolić et al., 2010).

У печінці через 2 год після введення хлориду кадмію не виявлено змін вмісту ГПЛ, однак за добу цей показник збільшився в 2,1 рази (табл. 2). Раніше в нашій роботі (Kaliman et al., 2008) показано, що введення хлориду кадмію у тій самій дозі призводить до накопичення прооксиданту гему в клітинах печінки. Автори роботи (Djukic-Cosic et al., 2008) продемонстрували, що активація вільнорадикальних процесів під впливом іонів кадмію позитивно корелює зі значним підвищенням в клітинах печінки вмісту заліза, яке може залучатись до утворення високореакційного гідроксильного радикалу в реакції Фентона.

Таблиця 2.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка), рівень спонтанного ПОЛ (нмоль МДА/мг білка), вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини), активність СОД (ум.од./мг білка за хв) та каталази (КАТ, мкмоль H₂O₂/мг білка за хв) у печінці щурів після введення CdCl₂ та сумісного введення CdCl₂ і нітропрусида натрію (SNP) або L-аргініну (M±m, n=5-6, * – p<0,05 відносно контролю)

Показ-ник	Контроль	CdCl ₂	SNP+CdCl ₂	L-Arg+CdCl ₂	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	0,39±0,04	0,65±0,13	0,83±0,17*	0,40±0,03	0,91±0,07*	0,51±0,04
СПОЛ	1,49±0,26	1,83±0,22	2,03±0,37	1,27±0,24	1,84±0,22	2,27±0,38
GSH	2,22±0,49	3,34±0,48	2,84±0,69	1,93±0,33	2,38±0,44	3,51±0,70
СОД	2188±69	2136±192	2469±62*	2423±94	2684±110*	2047±228
КАТ	837±79	771±67	728±50	625±100	735±146	543±93*
24 год						
ГПЛ	0,39±0,04	0,98±0,19*	0,47±0,08	0,94±0,20*	1,09±0,16*	0,55±0,09
СПОЛ	1,22±0,14	0,90±0,13	1,54±0,22	1,33±0,17	2,29±0,10*	1,72±0,21
GSH	2,25±0,09	4,95±0,65*	4,18±0,32*	4,66±0,54*	2,16±0,53	2,93±0,68
СОД	2188±69	3012±187*	3092±102*	1893±142	2641±16*	2031±143
КАТ	837±79	571±39*	651±102	519±50*	685±108	709±85

Попереднє введення SNP спричинило більш раннє підвищення вмісту ГПЛ у печінці (у 2,1 рази через 2 год після ін'єкції CdCl₂), а за добу цей показник повертався до контрольного рівня. В печінці (аналогічно як і у сироватці крові) введення тільки SNP призвело до зростання вмісту гідропероксидів ліпідів через 2 год після ін'єкції, яке зберігалось і через добу. Введення L-аргініну не впливало на базальний рівень гідропероксидів ліпідів і не змінювало динаміку вмісту ГПЛ в печінці після ін'єкції CdCl₂.

Інтенсивність спонтанного ПОЛ в печінці не змінювалась в жодний з термінів після введення CdCl₂, в тому числі на фоні донорів NO. За введення L-аргініну базальний рівень цього показника в печінці не відрізнявся від контролю, але підвищувався в 2,2 рази через 24 год за введення SNP.

Відновлений глутатіон є основним низькомолекулярним клітинним антиоксидантом, який бере участь в окисно-відновних процесах, у підтриманні тиол-дисульфідного стану білків. У зв'язку з високою спорідненістю іонів кадмію до сульфгідрильних груп, GSH розглядається як перша лінія захисту від кадмієвої токсичності (Kukongviriyapan et al., 2016). За нашими даними (табл. 2), вміст відновленого глутатіону зберігався на контрольному рівні через 2 год після введення CdCl₂, а через добу підвищився більш ніж у 2 рази, в тому числі за попереднього введення донорів NO. Можна припустити, що зростання вмісту GSH через добу відбулося у результаті активації його синтезу. Відомо, що індукція ферментів синтезу GSH здійснюється через антиоксидантні елементи відповіді ARE і це розглядається як адаптивна реакція клітин на зниження рівню глутатіону (Bell et al., 2011).

Ще однією мішенню іонів кадмію вважаються ферменти антиоксидантної системи. Супероксиддисмутазна активність в печінці не змінювалась в перші години після введення хлориду кадмію, а через добу збільшилась в 1,4 рази у порівнянні з контрольною групою тварин. Це

підвищення активності СОД, ймовірно, обумовлено синтезом ферменту *de novo* в результаті накопичення його субстрату, супероксиданіону (Меньщикова и др., 2006).

Попереднє введення SNP спричинило зростання СОД активності вже через 2 год після ін'єкції CdCl₂, а за добу цей показник перевищував контрольний рівень у 1,4 рази. Подібна динаміка активності СОД спостерігалась і після введення тільки SNP. Аналогічні дані щодо активуючого впливу SNP на базальний рівень СОД активності були отримані нами раніше (Nikitchenko et al., 2005). Введення L-аргініну, навпроти, не впливало на цей показник і запобігало підвищенню СОД активності під впливом CdCl₂. Різні ефекти донорів NO на активність СОД можна пов'язати з появою АФК за введення SNP, під час спонтанного розкладання якого разом з NO утворюються також іони заліза, пероксид водню і супероксид-аніон (Quan et al., 2017).

Каталазна активність не змінювалась у печінці через 2 год після введення хлориду кадмію, а через 24 год знизилась на 32 % у порівнянні з контролем. Донори NO виявили різні ефекти на активність каталази. L-аргінін не впливав на динаміку активності ферменту після ін'єкції CdCl₂, але викликав зниження (на 35 %) базальної активності через 2 год після введення. Нітропрусид, навпроти, запобігав зниженню активності каталази під дією кадмію, але не змінював базальну активність ферменту. Зменшення активності каталази, що є гемопротеїном, може бути обумовлене дефіцитом нативного гему внаслідок зменшення його синтезу *de novo* та/або нітрозилування гему за введення L-аргініну (Меньщикова и др., 2006).

Відомо, що активність СОД і каталази регулюються активними формами кисню: високі концентрації цих метаболітів спричинюють індукцію ферментів, однак ті самі АФК можуть пошкоджувати та інактивувати молекули цих антиоксидантних ферментів (Меньщикова и др., 2006). Зниження активності СОД і каталази в печінці, що також супроводжувалось підвищенням вмісту МДА, показано за умов хронічного надходження іонів кадмію до організму щурів (Jurczuk et al., 2004). Виявлене в нашій роботі підвищення активності СОД на фоні інгібування каталази може підсилювати окисне пошкодження клітин печінки за введення CdCl₂ через накопичення пероксиду водню і активації ліпопероксидації (Меньщикова и др., 2006).

Іони кадмію накопичуються в нирках внаслідок переважного поглинання зв'язаного з металотіонеїном кадмію в ниркових проксимальних каналцях. Інтерналізований комплекс металотіонеїн-Cd розпадається в лізосомах, вивільнюючи іони кадмію у цитозоль, де вони можуть активувати процеси вільно-радикального окиснення (Sabolić et al., 2010).

В наших дослідах не виявлено змін вмісту гідропероксидів ліпідів у нирках після ін'єкції CdCl₂ в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO (табл. 3). Рівень спонтанного ПОЛ не змінювався за введення кадмію та за сумісного введення L-аргініну і хлориду кадмію. Однак попереднє введення нітропрусиду натрію призводило до зростання інтенсивності спонтанного ПОЛ в 1,9 рази через 2 год після ін'єкції CdCl₂ з подальшою нормалізацією цього показника через добу.

Обидва донори NO спричинювали підвищення базального рівня спонтанного ПОЛ вже в перші години дії: за введення L-аргініну інтенсивність ПОЛ зростала в 1,6 рази, а SNP – в 1,5 рази. Підвищення під впливом нітропрусиду натрію цього показника зберігалось і за добу. Відомо, що NO може виявляти не тільки антиоксидантні, але й прооксидантні властивості (Меньщикова и др., 2006). Вважається, що основні прооксидантні ефекти оксиду азоту обумовлені його взаємодією з супероксид-аніоном з утворенням потужного окислювального агенту пероксинітриду (Radi, 2013).

Вміст відновленого глутатіону у нирках не змінювався в жодній з експериментальних груп тварин (табл. 3).

Введення хлориду кадмію не впливало на активність СОД у нирках в перші години дії, але викликало підвищення активності через добу (в 1,5 рази), що аналогічно змінам у печінці. Введення SNP не змінювало динаміку СОД активності за дії CdCl₂, в той час як L-аргінін викликав зростання активності ферменту (в 1,5 рази) у перші години після сумісного введення з CdCl₂, з подальшим поверненням до контрольного рівня за добу. L-аргінін не впливав на базальний рівень СОД. Нітропрусид натрію, навпроти, викликав підвищення активності ферменту за добу після ін'єкції. Останні результати узгоджуються з даними, отриманими нами раніше (Nikitchenko et al., 2005).

Дані літератури щодо впливу іонів кадмію на рівень оксиду азоту суперечливі, показано як підвищення, так і зниження його вмісту (Fouad et al., 2013; Chen et al., 2003). Один із шляхів накопичення оксиду азоту під впливом CdCl₂ в нирках – це індукція ферментів NO-синтаз (Souyrek et al., 2012). Введення субстрату L-аргініну в цих умовах може призводити до різкого підвищення

концентрації NO в клітинах і, як наслідок, до посилення генерації АФК, зокрема супероксид-аніону (Меньщикова и др., 2006).

Таблиця 3.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка), рівень спонтанного ПОЛ (нмоль МДА/мг білка), вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини), активність СОД (ум.од./мг білка за хв) та каталази (КАТ, мкмоль H_2O_2 /мг білка за хв) у нирках щурів після введення $CdCl_2$ та сумісного введення $CdCl_2$ і нітропрусиду натрію (SNP) або L-аргініну ($M \pm m$, $n=5-6$, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю)

Показ-ник	Контроль	$CdCl_2$	SNP+ $CdCl_2$	L-Arg+ $CdCl_2$	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	0,55±0,04	0,56±0,06	0,55±0,05	0,44±0,04	0,62±0,08	0,61±0,08
СПОЛ	1,26±0,21	1,69±0,15	2,33±0,30*	1,79±0,45	1,86±0,14*	2,03±0,22*
ГSH	2,76±0,10	2,67±0,10	2,45±0,30	2,65±0,18	2,68±0,16	2,76±0,25
СОД	1999±191	2141±120	2477±342	3019±135*	2460±198	2348±197
КАТ	296±22	254±26	311±17	285±36	268±33	188±17*
24 год						
ГПЛ	0,55±0,04	0,47±0,05	0,53±0,04	0,59±0,04	0,56±0,05	0,57±0,05
СПОЛ	1,26±0,21	1,15±0,23	1,54±0,12	1,28±0,18	1,84±0,12*	1,68±0,12
ГSH	2,76±0,10	3,12±0,23	2,55±0,13	2,87±0,20	2,73±0,09	2,88±0,34
СОД	1999±191	2979±247*	2861±148*	2024±135	3267±65*	2269±150
КАТ	296±22	285±24	226±74	269±39	289±743	290±32

Каталазна активність в нирках не змінювалась після ін'єкції $CdCl_2$ в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO (табл. 3). Нітропрусид натрію також не впливав на базальну активність ферменту. Динаміка каталазної активності в нирках після введення L-аргініну була подібна до динаміки активності цього ферменту у печінці: зниження каталази на 36 % в перші години дії донору NO і нормалізація активності ферменту за добу.

Таблиця 4.

Вміст ГПЛ (нмоль МДА/мг білка), рівень спонтанного ПОЛ (нмоль МДА/мг білка), вміст відновленого глутатіону (мкмоль/г тканини), активність СОД (ум.од./мг білка за хв) та каталази (КАТ, мкмоль H_2O_2 /мг білка за хв) у селезінці щурів після введення $CdCl_2$ та сумісного введення $CdCl_2$ і нітропрусиду натрію (SNP) або L-аргініну ($M \pm m$, $n=5-6$, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю)

Показ-ник	Контроль	$CdCl_2$	SNP+ $CdCl_2$	L-Arg+ $CdCl_2$	SNP	L-Arg
2 год						
ГПЛ	0,23±0,02	0,34±0,09	0,45±0,06*	0,41±0,04*	0,292±0,060	0,20±0,03
СПОЛ	1,63±0,08	1,31±0,22	1,66±0,58	1,90±0,23	1,54±0,33	2,15±0,37
ГSH	2,74±0,11	2,21±0,21	2,04±0,12*	2,56±0,24	2,37±0,21	2,64±0,28
СОД	817±71	647±63	793±103	898±65	719±61	891±37
Кат	50±10	52±5	46±5	76±6	71±7	69±8
24 год						
ГПЛ	0,23±0,02	0,48±0,08*	0,50±0,06*	0,34±0,05	0,38±0,06*	0,36±0,07
СПОЛ	1,63±0,08	1,66±0,40	2,33±0,38	1,34±0,25	1,68±0,31	1,17±0,12*
ГSH	2,74±0,11	2,35±0,26	2,16±0,15*	2,47±0,33	2,31±0,14	2,72±0,23
СОД	817±71	747±103	881±65	967±17	681±34	739±57
Кат	50±10	56±1	67±7	61±12	84±4*	76±2

У селезінці вміст гідропероксидів ліпідів не відрізнявся від контролю через 2 год після введення хлориду кадмію, але зростав у 2,2 рази за добу (табл. 4). Сумісне введення кадмію з донорами NO вже через 2 год призводило до підвищення рівня ГПЛ (у 2 і 1,8 рази відповідно після ін'єкції SNP і L-аргініну), який зберігався за добу тільки після введення нітропрусида натрію. Слід зазначити, що введення тільки SNP, на відміну від L-аргініну, призводило до збільшення базального рівня ГПЛ у 2,2 рази та підвищення активності каталази за добу. Накопичення ГПЛ у селезінці може свідчити про посилене надходження до селезінки еритроцитів, які мають окисні пошкодження внаслідок дії іонів кадмію та вільного гему (Павиченко, Калиман, 2003).

Інтенсивність спонтанного ПОЛ в селезінці не змінювалась після ін'єкції CdCl₂ в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO. Лише через 24 год після введення L-аргініну спостерігалось зниження інтенсивності ПОЛ на 35 % у порівнянні з контролем (табл. 4).

В селезінці відзначено зниження вмісту відновленого глутатіону через 2 год після введення хлориду кадмію на фоні SNP (на 26 %), яке зберігалось і через добу (табл. 4). У інших експериментальних групах цей показник не відрізнявся від контрольного рівня. Активності СОД і каталази в селезінці не змінювались після ін'єкції хлориду кадмію в жоден із досліджуваних термінів, в тому числі на фоні попереднього введення донорів NO.

Отже, нітропрусид натрію посилював у селезінці розвиток оксидативного стресу під впливом іонів кадмію, про що свідчить більш раннє накопичення ГПЛ і зниження рівню відновленого глутатіону, які зберігались і через добу після дії металу. Аргінін спричинював аналогічне підвищення вмісту ГПЛ у перші години дії кадмію без змін інших показників.

Висновки

Введення хлориду кадмію спричинило низку порушень прооксидантно-антиоксидантного балансу, більшість з яких відбувались через добу. Накопичення продуктів ліпопероксидації встановлено у сироватці крові, печінці та селезінці щурів. Посилення прооксидантних процесів у цих тканинах може бути результатом надходження до них іонів кадмію та продуктів гемолізу. В антиоксидантній системі суттєві зміни спостерігались під впливом кадмію лише в печінці: збільшення вмісту відновленого глутатіону та СОД активності і зниження активності каталази.

Попередник монооксиду нітрогену L-аргінін не змінював базальний рівень прооксидантно-антиоксидантних показників, а також у більшості випадків не впливав на їх динаміку після введення хлориду кадмію в органах, що досліджувались.

Прямий донор NO нітропрусид натрію діяв у печінці та селезінці значною мірою як прооксидант. В печінці введення тільки нітропрусида, так само як і сумісне введення SNP і CdCl₂, призводило до активації вільнорадикальних процесів вже в перші години. У селезінці сумісне введення SNP і солі кадмію також спричинювало більш ранній розвиток оксидативного стресу, про що свідчило збільшення рівню гідропероксидів ліпідів і зниження вмісту відновленого глутатіону.

Отже, введення нітропрусида натрію та L-аргініну в обраних дозах не мало вираженого коригувального впливу на кадмій-індукований оксидативний стрес у печінці, нирках та селезінці. Однак у крові обидва донори NO ефективно запобігали накопиченню продуктів ліпопероксидації за введення CdCl₂, крім того, L-аргінін суттєво зменшував вихід лактатдегідрогенази, що може свідчити про захист клітин крові та судин від пошкоджень за дії іонів кадмію.

Список літератури / References

Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972). Перекисное окисление липидов в биомембранах. М.: Наука. 252 с. [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. (1972). *Lipid peroxidation in biomembranes*. Moscow: Nauka. 252 p.]

Иванов И.И., Коровкин Б.Ф., Маркелов И.М. (1974). Введение в клиническую энзимологию. Л.: Медицина. 350 с. [Ivanov I.I., Korovkin B.F., Markelov I.M. (1974). *Introduction to clinical enzymology*. Leningrad: Medicina. 350 p.]

Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. (2006). Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово». 556 с. [Menshchikova Ye.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al. (2006). *Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants*. Moscow: The company "Slovo". 556 p.]

Павиченко О.В., Калиман П.А. (2003). Влияние хлорида кадмия на развитие оксидативного стресса в легких крыс. *Современные проблемы токсикологии*, 3, 39–42. [Pavychenko O.V., Kaliman P.A.

- (2003). Effect of cadmium chloride on development of oxidative stress in rat lung. *Modern Problems of Toxicology*, 3, 39–42.]
- Beavchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44(1), 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bell K.F., Fowler J.H., Al-Mubarak B. et al. (2011). Activation of Nrf2-regulated glutathione pathway genes by ischemic preconditioning. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2011, 689524. <https://doi.org/10.1155/2011/689524>
- Bloodsworth A., O'Donnell V.B., Freeman B.A. (2000). Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20(7), 1707–1715. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.7.1707>
- Chamulitrat W. (1998). Nitric oxide inhibited peroxy and alkoxy radical formation with concomitant protection against oxidant injury in intestinal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 355(2), 206–214. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0731>
- Chen L., Zhou J., Gao W., Jiang Y.Z. (2003). Action of NO and TNF-alpha release of rats with cadmium loading in malfunction of multiple system organ. *Sheng Li Xue Bao*, 55(5), 535–540.
- Chiabrando D., Vinchi F., Fioritoet V. al. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00061>
- Djukic-Cosic D., Jovanovic M.C., Bulat Z.P. et al. (2008). Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 22(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.024>
- Ejnik J., Shaw C.F.3rd, Petering D.H. (2010). Mechanism of cadmium ion substitution in mammalian zinc metallothionein and metallothionein alpha domain: kinetic and structural studies. *Inorg. Chem.*, 49(14), 6525–6534. <https://doi.org/10.1021/ic1003148>
- Fouad A.A., Al-Mulhim A.S., Gomaa W. (2013). Protective effect of cannabidiol against cadmium hepatotoxicity in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 27(4), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.07.001>
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Jurczuk M., Brzóska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. et al. (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.*, 42(3), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.10.005>
- Kaliman P., Nikitchenko I., Pavychenko O. (2008). Action of cadmium chloride on some parameters of heme metabolism in rats under modulation of NO radicals level. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*, XIX(2), 125–128.
- Karim M.R., Petering D.H. (2017). Detection of Zn²⁺ release in nitric oxide treated cells and proteome: dependence on fluorescent sensor and proteomic sulfhydryl groups. *Metallomics*, 9(4), 391–401. <https://doi.org/10.1039/C6MT00220J>
- Katakai K., Liu J., Nakajima K. et al. (2001). Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicol. Lett.*, 119(2), 103–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(00\)00301-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00301-5)
- Kukongviriyapan U., Apaijit K., Kukongviriyapan V. (2016). Oxidative stress and cardiovascular dysfunction associated with cadmium exposure: beneficial effects of curcumin and tetrahydrocurcumin. *Tohoku J. Exp. Med.*, 239(1), 25–38. <https://doi.org/10.1620/tjem.239.25>
- Liu J., Qu W., Kadiiska M.B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238(3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.029>
- Miller G.L. (1959). Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.*, 31(5), 964–966. <https://doi.org/10.1021/ac60149a611>
- Nazari Q.A., Mizuno K., Kume T. et al. (2012). In vivo brain oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 120(2), 105–111. <https://doi.org/10.1254/jphs.12143FP>
- Nikitchenko I., Strel'chenko K., Inshina N., Kaliman P.A. (2005). Effect of sodium nitroprusside on heme oxygenase activity in some organs of rats. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*, XVIII(2), 105–108.
- Ohkawa H., Ohahi N., Jodi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Patterson J.W., Lazarow A. (1955). Determination of glutathione / In: D.Glick, editor. *Methods of biochemical analysis*, 2, 259–279. <https://doi.org/10.1002/9780470110188.ch9>

- Quan Y.Y., Liu Y.H., Lin C.M. et al. (2017). Peroxynitrite dominates sodium nitroprusside-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 8(18), 29833–29845. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16164>
- Radi R. (2013). Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem.*, 288(37), 26464–26472. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472936>
- Sabolić I., Breljak D., Skarica M., Herak-Kramberger C.M. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23(5), 897–926. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9351-z>
- Soyupek S., Oksay T., Sütçü R. et al. (2012) The effect of cadmium toxicity on renal nitric oxide synthase isoenzymes. *Toxicol. Ind. Health*, 28(7), 624–628. <https://doi.org/10.1177/0748233711420467>
- Swiergosz-Kowalewska R. (2001). Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc. Res. Tech.*, 55(3), 208–222. <https://doi.org/10.1002/jemt.1171>
- Tokumoto M., Lee J.Y., Satoh M. (2019). Transcription factors and downstream genes in cadmium toxicity. *Biol. Pharm. Bull.*, 42(7), 1083–1088. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00204>
- Zhu J., Meeusen J., Krezoski S., Petering D.H. (2010). Reactivity of Zn-, Cd-, and apo-metallothionein with nitric oxide compounds: in vitro and cellular comparison. *Chem. Res. Toxicol.*, 23(2), 422–431. <https://doi.org/10.1021/tx900387k>

The effect of nitrogen monoxide donors on the indexes of cadmium-induced oxidative stress in different rat tissues

I.V. Nikitchenko, T.P. Rybalchenko, T.V. Barannik, O.V. Pavychenko

Oxidative stress is considered to be the main mechanism of cadmium ions toxic effect on the cells and is caused by cadmium, as a non-transition metal, indirectly. Oxidative damage to cells due to the action of cadmium ions is tissue-specific and is associated with the antioxidant system inhibition, free heme accumulation and essential metals substitution in metalloproteins. Nitrogen monoxide (NO) exhibits high affinity for heme and proteins and peptides sulfhydryl groups, known to be the main molecular targets for cadmium ions. Taking all the above-mentioned into account, the aim of this work was to study the effect of NO radicals donors on the prooxidant-antioxidant state of mammalian tissues under oxidative stress caused by cadmium chloride administration *in vivo*. Male Wistar rats weighing 160–200 g were used in the study. CdCl₂ was administered subcutaneously at a dose of 14 mg/kg body weight. The direct donor of the NO radical sodium nitroprusside (SNP, 1 mg/kg mass) and the substrate of the NO synthase reaction L-arginine (600 mg/kg mass) were administered intraperitoneally. In order to study the corrective action, donors of the NO radical were injected 0.5 h before the cadmium salt. The objects of investigation were blood plasma and liver, kidneys and spleen homogenates of rats. The cadmium chloride treatment caused a number of prooxidant-antioxidant balance disorders, most of which were revealed a day after injection. The accumulation of lipid peroxidation products was found in rat serum, liver, and spleen. The enhancement of prooxidant processes in these tissues may originate from cadmium ions and hemolysis products entry. In the antioxidant system, significant changes were observed under cadmium action only in the liver: an increase in the reduced glutathione content and SOD activity and a decrease in catalase activity. The precursor of nitric oxide L-arginine did not change the basal level of prooxidant-antioxidant parameters, and in most cases did not affect their dynamics in the organs studied after cadmium chloride administration. A direct NO donor, sodium nitroprusside, acted in liver and spleen mostly as a prooxidant. In liver, the injection of only nitroprusside, as well as the combined administration of SNP and CdCl₂, led to free radical processes activation just in two hours. In spleen, the combined treatment by SNP and cadmium salt also caused an earlier development of oxidative stress, as witnessed by an increase in lipid hydroperoxides level and a decrease in reduced glutathione content. Therefore, the injection of a direct NO donor, sodium nitroprusside, and a substrate of NO synthase, L-arginine, in selected doses has insignificant corrective action on cadmium-induced oxidative stress in the liver, kidneys and spleen. However, in blood both donors of NO effectively prevented the accumulation of lipid peroxidation products under CdCl₂ treatment; in addition, L-arginine significantly reduced the lactate dehydrogenase release, which may indicate blood cells and blood vessels protection from the damage caused by cadmium ions.

Key words: *cadmium, oxidative stress, nitrogen monoxide, antioxidant system.*

About the authors:

I.V. Nikitchenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5858-3382>

T.P. Rybalchenko – Kharkiv State Academy of Physical Culture, Klochkivska str, 99, Kharkiv, Ukraine, 61022, tanyusic@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0003-3107-0290>

T.V. Barannik – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

O.V. Pavychenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, olga.pavichenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1396-790X>

Влияние доноров монооксида азота на показатели кадмий-индуцированного оксидативного стресса в разных органах крыс

И.В. Никитченко, Т.П. Рыбальченко, Т.В. Баранник, О.В. Павиченко

Основным механизмом токсического действия ионов кадмия на клетки считают оксидативный стресс, который кадмий, не являясь переходным металлом, вызывает опосредованно. Окислительные повреждения клеток при действии ионов кадмия являются тканеспецифическими и связаны с ингибированием антиоксидантной системы, накоплением свободного гема, замещением эссенциальных металлов в металлопротеинах. Монооксид азота (NO) проявляет высокое сродство к гемму и сульфгидрильным группам белков и пептидов, которые являются основными молекулярными мишенями для ионов кадмия. В связи с вышесказанным, целью данной работы было исследование влияния доноров NO-радикалов на прооксидантно-антиоксидантное состояние тканей млекопитающих в условиях оксидативного стресса, вызванного введением *in vivo* хлорида кадмия. Исследования проводились на крысах-самцах линии Вистар массой 160–200 г. CdCl₂ вводили подкожно в дозе 14 мг/кг массы тела. Прямой донор NO-радикала нитропруссид натрия (SNP, 1 мг/кг массы) и субстрат NO-синтазной реакции L-аргинин (600 мг/кг массы) вводили внутривенно. Для исследования корректирующего влияния доноры NO-радикала вводили за 0,5 ч до инъекции соли кадмия. Объектами исследования были плазма крови и гомогенаты печени, почек и селезенки крыс. Введение хлорида кадмия вызвало ряд нарушений прооксидантно-антиоксидантного баланса, большинство из которых происходили через сутки. Накопление продуктов липопероксидации установлено в сыворотке крови, печени и селезенке крыс. Усиление прооксидантных процессов в данных тканях может быть результатом поступления в них ионов кадмия и продуктов гемолиза. В антиоксидантной системе существенные изменения наблюдались под влиянием кадмия только в печени: увеличение содержания восстановленного глутатиона и СОД активности и снижение активности каталазы. Предшественник оксида азота L-аргинин не изменял базальный уровень прооксидантно-антиоксидантных показателей, а также в большинстве случаев не влиял на их динамику после введения хлорида кадмия в органы, которые исследовались. Прямой донор NO нитропруссид натрия действовал в печени и селезенке в значительной степени как прооксидант. В печени введение только нитропрусида, так же, как и совместное введение SNP и CdCl₂, приводило к активации свободнорадикальных процессов уже в первые часы. В селезенке совместное введение SNP и соли кадмия также вызывало более раннее развитие оксидативного стресса, о чем свидетельствовало возрастание уровня гидроперекисей липидов и снижение содержания восстановленного глутатиона. Следовательно, введение прямого донора NO нитропрусида натрия и субстрата NO-синтазы L-аргинина в выбранных дозах не имело выраженного корректирующего воздействия на кадмий-индуцированный оксидативный стресс в печени, почках и селезенке. Однако в крови оба донора NO эффективно предотвращали накопление продуктов липопероксидации при введении CdCl₂, кроме того, L-аргинин существенно уменьшал выход лактатдегидрогеназы, что может свидетельствовать о защите клеток крови и сосудов от повреждений при действии ионов кадмия.

Ключевые слова: кадмий, оксидативный стресс, монооксид азота, антиоксидантная система.

Об авторах:

И.В. Никитченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, irina.v.nikitchenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5858-3382>

Т.П. Рыбальченко – Харьковская государственная академия физической культуры, ул. Клочковская, 99, Харьков, Украина, 61022, tanyusic@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0003-3107-0290>

Т.В. Баранник – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

О.В. Павиченко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, olga.pavichenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1396-790>

Представлено: Н.І.Горбенко / Presented by: N.I.Gorbenko

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 10.04.2020

УДК: 577.112.38-042.3:577.124:599.323.4

Вплив геміну та глутатіону на деякі показники азотного та вуглеводного метаболізму в щурів**С.М. Охріменко, А.Ю. Гришкова**

Накопичення гему в організмі при дії різних гемолітичних чинників може спричинювати розвиток оксидативного стресу з активацією вільнорадикальних процесів, окисним пошкодженням макромолекул і надмолекулярних комплексів клітин та тканин. За цих умов в організмі активується система антиоксидантного захисту, важливою ланкою якої є тіолові сполуки, зокрема глутатіон. Недостатньо дослідженими за таких умов є процеси азотного та вуглеводного метаболізму, які пов'язані з формуванням адаптивних реакцій у відповідь на стрес. Мета цієї роботи – дослідження деяких показників азотного та вуглеводного обміну при введенні в організм геміну та комбінованого введення геміну та глутатіону для з'ясування ролі цього антиоксиданту у можливому коригуванні метаболічних процесів. Об'єкт дослідження – статевозрілі безпородні білі щури-самці, що отримували внутрішньочеревні ін'єкції розчинів геміну (50 мг/кг) та глутатіону (500 мг/кг), який вводили за 0,5 години до введення геміну. Тварин брали у дослід через 2 години після введення геміну. У гомогенатах печінки та нирок досліджували вміст загальних та небілкових SH-груп, активність гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ), у гомогенаті печінки – вміст глікогену та активність тирозинамінотрансферази (ТАТ). Вміст відновлених SH-груп може бути індикатором про-антиоксидантного балансу, активність ГГТ – одним з показників обміну глутатіону, вміст глікогену та активність ТАТ у печінці є гормончутливими показниками. Уведення геміну спричинувало зниження вмісту загальних та небілкових SH-груп, вмісту глікогену та підвищення активності ТАТ у печінці, а також підвищення активності ГГТ у цьому органі. Уведення щурам глутатіону за 30 хвилин до введення геміну запобігало змінам цих показників у печінці, спричинених введенням одного геміну. У нирках виявлено збільшення вмісту загальних SH-груп після сукупного введення глутатіону та геміну порівняно з дією одного геміну. Результати дослідження можуть свідчити про чутливість до дії геміну показників азотного та вуглеводного метаболізму в органах щурів та про коригувальний вплив глутатіону за цих умов, ймовірно, опосередкований через підсилення тіолової ланки системи антиоксидантного захисту.

Ключові слова: гемін, глутатіон, SH-групи, тирозинамінотрансфераза, гамма-глутамілтранспептидаза, глікоген, печінка, нирки.

Про авторів:

С.М. Охріменко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, s.okhriomenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-7844-618X>

А.Ю. Гришкова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, ansygyr0894@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4074-8369>

Вступ

Гем є небілковою складовою гемопротейнів, що відіграють значну роль у транспортуванні кисню, мітохондріальній енергетиці, пероксидному метаболізмі, сигнальній трансдукції – гемоглобіну, цитохромів, каталази та ін. Масове вивільнення гему та його накопичення в крові та тканинах спостерігається при гемолізі та рабдоміолізі, що виникають внаслідок дії хімічних речовин, гіпо- та гіпертермії, тривалої гіпокінезії, компресії, інфекції тощо (Kumar, Bandyopadhyay, 2005; Visweswaran, Guntupalli, 1999; Wu et al., 2019; Chiabrando et al., 2018). Основним шляхом деградації гему є гемоксигеназна реакція з утворенням білівердину, СО та іонів Fe^{2+} (Duvigneau et al., 2019; Lanceta et al., 2015; Chen et al., 2019; Gozzelino et al., 2010). Іони заліза (II) можуть брати участь у реакції Фентона та спричинювати порушення редокс-балансу в клітинах та тканинах (Balla et al., 1993; Jeneu et al., 2002; Gáll et al., 2019). Накопичення активних форм кисню та нітрогену спричинює оксидативний стрес, за якого посилюються окисні процеси, пошкоджуються біомолекули та надмолекулярні комплекси, порушуються клітинні функції. Такі зміни є основою низки патологічних станів (Chiziane et al., 2018; Kumar, Bandyopadhyay, 2005; Alvarado et al., 2015; Chiabrando et al., 2018). Знешкодження молекул з вільнорадикальними властивостями відбувається за участі антиоксидантної системи організму, серед компонентів якої значну роль відіграє глутатіон (Kulinsky, Kolesnichenko, 2009; Adeoye et al., 2018; Aoyama, Nakaki, 2015). При великій кількості досліджень, присвячених обміну глутатіону (Kulinsky, Kolesnichenko, 2009; Kalinina et al., 2014), недостатньо вивченим є вплив екзогенного глутатіону на вміст цього пептиду у тканинах за оксидативного стресу. Недостатньо дослідженими є також процеси загального метаболізму та можлива роль глутатіону в їх регуляції при оксидативному стресі. У зв'язку із зазначеним вище, метою цієї роботи було дослідження впливу геміну на стан системи тіолів та активність γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) у печінці та нирках, вміст глікогену та активність тирозинамінотрансферази (ТАТ) у печінці, а також

вплив глутатіону, що вводився перед геміном, на ці показники. Для з'ясування ролі попередників синтезу глутатіону при дії геміну була поставлена задача дослідити вплив геміну та попередників глутатіону на вміст відновлених SH-груп у ізольованих гепатоцитах.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження були безпородні білі самці-щури масою 170–280 г, які утримувались у стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Тварини були поділені на три групи: 1. Контрольна група – їм вводили фізіологічний розчин з урахуванням маси тіла; 2. Дослідна група №1 – вводили розчин геміну з розрахунку 5мг/100 г ваги; 3. Дослідна група №2 – вводили розчин глутатіону з розрахунку 50мг/100 г маси, через 30 хвилин – розчин геміну. Всі ін'єкції проводили внутрішньочеревинно. Через 2 години після введення геміну тварин брали в дослід, дотримуючись вимог Конвенції поводження з тваринами. Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином, з печінки та нирок готували гомогенати на 0,02 М калій-фосфатному буфері (рН=7,6). Отримані гомогенати використовували для визначення активності тирозинамінотрансферази, γ -глутамілтранспептидази і вмісту SH-груп. Активність ТАТ визначали за накопиченням п-оксифенілпірувату та виражали в нмольх п-ОФП на 1 мг білку за одну хвилину (Schepard, 1969). Активність ГГТ визначали за допомогою стандартних тест-наборів та виражали в мкмоль утвореного глутамінового залишку, який переходить на гліцил-гліцил, на 1 мг білку за одну хвилину (Dimov, Kulhanek, 1967). Визначення кількості білку проводилось за методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). Вміст загальних і небілкових SH-груп у гомогенатах печінки і нирок визначали за допомогою реактиву Еллмана і виражали в мкмоль/г тканини (Ellman, 1959). Також проводилось визначення вмісту глікогену в печінці за методом Кемпа, який виражали в мг/г тканини (Охріменко та ін., 2006). Статистичний аналіз отриманих результатів у рядах з нормальним розподілом проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента у відповідності до загальноприйнятої методики.

Дослід *in vitro*. Гепатоцити виділяли за допомогою неферментативного диспергування печінки. Печінку перфузували, видаляли, заливали охолодженим середовищем RPMI 1640, подрібнювали і продавлювали через нейлоновий фільтр у потоці охолодженого середовища RPMI 1640. Первинну суспензію клітин центрифугували (70 г, 5 хв.) задля відділення гепатоцитів від фрагментів тканини. Потім суспензію клітин центрифугували (150 г, 5 хв.) і осад клітин ресуспендували в культуральному середовищі. Концентрацію клітин та їх життєздатність підраховували на автоматичному цитометрі Invitrogen Countess з використанням вітального барвника трипанового синього. Концентрація клітин в отриманій суспензії становила в середньому $2,4\text{--}4,2 \times 10^6$ клітин/мл. Життєздатність клітин становила 76–84 %. Виділені гепатоцити інкубували при +37°C у культуральному середовищі RPMI 1640 без додавання домішок – контроль або у присутності концентрацій геміну (60 мМ) та попередників глутатіону (5 мМ N-ацетилцистеїну, 1 мМ глутаміну та 1 мМ гліцину) – дослідні групи. При інкубації гепатоцитів в усі зразки, включаючи контрольні, додавали по 5 мМ глюкози. Інкубація контрольних і дослідних проб проводилась протягом однієї години на шейкері з перемішуванням, після чого клітини піддавались центрифугуванню при 2500 об/хв. протягом п'яти хвилин. Отриманий осад ресуспендували з додаванням 3 мл культурального середовища, після чого піддавали лізису за допомогою 1 % розчину Triton X-100. Клітини інкубували протягом 20 хвилин при температурі 4°C та центрифугували при 6000 об/хв. протягом 3 хвилин. В отриманому супернатанті досліджували вміст загальних та небілкових SH-груп, який виражали в мкмоль/10⁶ клітин.

Результати та обговорення

Введення геміну спричинювало зниження рівня як загальних, так і небілкових SH-груп у печінці, в той час як у нирках не було виявлено достовірних змін цих показників, що може відображувати різну динаміку окисних процесів у цих органах (табл. 1). Попереднє введення глутатіону запобігало зниженню вмісту загальних і небілкових SH-груп у печінці, спричиненого введенням геміну, що може свідчити про участь екзогенного глутатіону у поповненні пулу тіолів і обмеженні окисних процесів у тканинах. Про це свідчать і результати дослідження вмісту тіолів у нирках, де введення глутатіону з геміном спричинювало підвищення вмісту загальних SH-груп порівняно з введенням одного геміну (табл. 1). Отримані результати узгоджуються з літературними даними про прооксидантну дію геміну та антиоксидантну – глутатіону (Balla et al., 1993; Jeney et al., 2002; Kalinina et al., 2014; Adeoye et al., 2018). У дослідженні, що проводилось нами раніше, також було встановлено зниження вмісту

тіолів у печінці, нирках та серці щурів при експериментальному рабдоміолізі, спричиненому введенням гліцеролу (Каліман, Охріменко, 2012).

Розвиток оксидативного стресу супроводжується розвитком захисних реакцій, спрямованих на збереження гомеостазу в організмі, що потребує значної кількості енергії. У проведених нами раніше дослідженнях було показано, що при оксидативному стресі, спричиненому надходженням в організм тварин сполук важких металів (HgCl_2 , CoCl_2 , CdCl_2), а також при рабдоміолізі посилюються процеси вуглеводного, азотного та ліпідного метаболізму – глікогеноліз, ліполіз, процеси переамінування як постачальники субстратів для глюконеогенезу (Каліман, Охріменко, 2005; Охріменко і др., 2005; Каліман, Охріменко, 2012). Це може відображувати участь регуляторних систем організму в адаптації до оксидативного стресу, спричиненого різними чинниками. Про наявність гормональної регуляції за оксидативного стресу, спричиненого введенням геміну, можуть свідчити наші дані про вміст глікогену та активність тирозинамінотрансферази в печінці (табл. 2). Зниження вмісту глікогену за введення геміну може відображувати активацію симпато-адреналової системи регуляції з активацією глікогенфосфорилази. В той же час, підвищення активності тирозинамінотрансферази за введення геміну може свідчити про участь гормонів надниркових залоз у регуляції метаболізму за цих умов, оскільки в печінці є форма ТАТ, що індукується глюкокортикоїдами (Mertvetsov et al., 1990). Застосування глутатіону, що вводився перед геміном, запобігало змінам вмісту глікогену та активності ТАТ, що спричинялись введенням геміну. Ці результати можуть свідчити про взаємодію антиоксидантної системи, зокрема її тіолової ланки, з системою нейрогуморальної регуляції організму.

Таблиця 1.

Вміст загальних та небілкових SH-груп у печінці та нирках щурів за введення геміну та глутатіону ($M \pm s$), мкмоль/г тканини

Орган	Контроль	Гемін	Гемін + глутатіон
Печінка	загальні SH-групи		
	13,98±4,91	6,99±4,28*	15,55±5,53#
	небілкові SH-групи		
	6,72±1,98	3,88±1,96*	20,19±11,63#
Нирки	загальні SH-групи		
	10,97±3,13	6,11±0,96	15,21±8,20#
	небілкові SH-групи		
	7,14±3,93	4,48±1,75	7,70±3,63

Примітка: * $p \leq 0,05$ відносно контролю, # $p \leq 0,05$ відносно геміну.

Таблиця 2.

Вміст глікогену та активність ТАТ у печінці щурів за введення геміну та глутатіону ($M \pm s$)

Контроль	Гемін	Гемін + глутатіон
Глікоген, мг/г тканини		
23,21±5,03	14,08±5,45*	17,29±6,85
Активність ТАТ, нмоль п-ОФП/хв на мг білку		
1,92±0,48	6,25±3,26*	2,22±1,0#

Примітка: * $p \leq 0,05$ відносно контролю, # $p \leq 0,05$ відносно геміну.

Роботу γ -глутамільного циклу при оксидативному стресі, спричиненому введенням геміну, вивчали за активністю γ -глутамілтрансферази (табл. 3). Було виявлено значну різницю активності ферменту в органах, що досліджувались: так, активність ГГТ у нирках значно вища, ніж у печінці, що узгоджується з даними літератури (Kulinsky, Kolesnichenko, 2009) і може відображувати важливу роль нирок у перетворенні кон'югатів глутатіону. Введення геміну не впливало на активність ГГТ у нирках і підвищувало її активність у печінці, де базальна активність ферменту, вочевидь, не може

забезпечити потреби у достатній кількості γ -глутамінової кислоти для синтезу глутатіону в цьому органі за оксидативного стресу, і тому, ймовірно, відбувається індукція синтезу ГГТ. Вплив активних форм кисню на експресію гену ГГТ був показаний у роботі (Pandur et al., 2007). Також слід зазначити, що у досліджуваній нами термін дії геміну (2 години) окислювальні пошкодження та формування захисних реакцій у різних органах можуть мати різну динаміку внаслідок різної швидкості надходження геміну з кровотоку. Печінка є першою мішенню, де дія геміну проявляється раніше, ніж у нирках, і свідченням цього може бути як активація ГГТ, так і зміни вмісту тіолів у цьому органі (табл. 1), на відміну від нирок. Застосування глутатіону запобігало підвищенню активності ГГТ у печінці, спричиненому введенням геміну, що може свідчити про обмеження дії геміну в крові екзогенним глутатіоном.

Таблиця 3.

Активність ГГТ у печінці та нирках щурів за введення геміну та глутатіону ($M \pm s$), мкмоль/хв на мг білку

Контроль	Гемін	Гемін + глутатіон
Печінка		
0,13 \pm 0,02	0,41 \pm 0,12*	0,14 \pm 0,10#
Нирки		
25,8 \pm 7,5	30,3 \pm 12,6	27,4 \pm 14,5

Примітка: * $p \leq 0,05$ відносно контролю, # $p \leq 0,05$ відносно геміну.

У дослідженні з ізольованими гепатоцитами було показано, що при їх інкубації з геміном вміст загальних і небілкових SH-груп знижувався вдвічі, що може відображувати посилення окисних процесів у клітинах і виснаження пулу тіолів (табл. 4). Додавання в інкубаційне середовище попередників глутатіону запобігало зниженню рівня тіолів у гепатоцитах, що спричинювалось геміном. Ймовірно, за цих умов відбувався транспорт амінокислот у клітини та їх залучання у синтез глутатіону, оскільки за оксидативного стресу в печінці активно відбувається його утворення (Chen et al., 2007). Підвищення вмісту глутатіону в гепатоцитах насичувало тіолову ланку антиоксидантної системи та нівелювало прооксидантну дію геміну. Таким чином, наочно показана роль амінокислот – попередників глутатіону у обмеженні окисних процесів за оксидативного стресу, спричиненого введенням геміну.

Таблиця 4.

Вміст загальних та небілкових SH-груп у гепатоцитах при інкубації з геміном та попередниками глутатіону ($M \pm s$), мкмоль/10⁶ клітин

Контроль	Гемін	Гемін + попередники глутатіону
Загальні SH-групи		
1,22 \pm 0,19	0,64 \pm 0,22*	1,29 \pm 0,37
Небілкові SH-групи		
0,51 \pm 0,08	0,25 \pm 0,09*	0,41 \pm 0,19

Примітка: * $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Результати проведеного дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Введення в організм геміну спричинює зниження вмісту відновлених тіолів в органах щурів, що може свідчити про посилення окисних процесів і розвиток оксидативного стресу.
2. Введення геміну впливає на показники азотного та вуглеводного метаболізму, що, ймовірно, відбувається через посилення окисних процесів та їх вплив на регуляторні системи організму.

3. Насичення екзогенним глутатіоном тілової ланки системи антиоксидантного захисту може запобігати розвитку окислювальних процесів, спричинених введенням геміну, або знижувати їх інтенсивність.
4. Введення глутатіону має коригувальний вплив на досліджені нами показники азотного та вуглеводного метаболізму, що змінюються за дії геміну. Це може свідчити про наявність редокс-регуляції нейроендокринної системи організму
5. Попередники синтезу глутатіону можуть брати участь в обмеженні окисних процесів, спричинених дією геміну, ймовірно, шляхом синтезу ендogenous глутатіону.

Список літератури / References

- Калиман П.А., Охрименко С.М. (2012). Стан вуглеводного та азотистого метаболізму в тканинах щурів за експериментального рабдоміолізу. *Укр. біохім. журн.*, 84(1), 79–85. [Kaliman P.A., Okhrimenko S.M. (2012). Carbohydrate and nitrogenous metabolism condition in the rat tissue under experimental rhabdomyolysis. *Ukr. Biochem. J.*, 84(1), 79–85.]
- Калиман П.А., Охрименко С.М. (2005). Цикл глюкоза–жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта. *Укр. біохім. журн.*, 77(2), 154–158. [Kaliman P.A., Okhrimenko S.M. (2005). The glucose–fatty acid cycle under oxidative stress caused by cobalt chloride, in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 77(2), 154–158.]
- Охрименко С.М., Буланкіна Н.І., Ганусова Г.В. (2006). Методи дослідження вуглеводного та ліпідного обміну. Методичні вказівки. Харків: ХНУ ім. В.Н.Каразіна. 32 с. [Okhrimenko S.M., Bulankina N.I., Hanusova H.V. (2006). *Experimental techniques for studying carbohydrate and lipid metabolism. Methodology guidelines*. Kharkiv: V.N.Karazin Kharkiv National University. 32 p.]
- Охрименко С.М., Гурьева Н.Ю., Калиман П.А. (2005). Адаптация ферментов липидного и азотистого обмена у крыс при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта и ртути. *Вісник Харківського університету. Серія: Біологія*, 1–2, 56–60. [Okhrimenko S.M., Gur'eva N.Y., Kaliman P.A. (2005). The adaptation of enzymes of lipid and nitrogenous metabolisms in rat under oxidative stress caused by cobalt and mercury salts. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: Biology*, 1–2, 56–60.]
- Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A. et al. (2018) Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist. Reprod.*, 22(1), 61–66. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180003>
- Alvarado G., Jeney V., Tóth A. et al. (2015). Heme-induced contractile dysfunction in human cardiomyocytes caused by oxidant damage to thick filament proteins. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 89, 248–262. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.158>
- Aoyama K., Nakaki T. (2015). Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules*, 20(5), 8742–8758. <https://doi.org/10.3390/molecules20058742>
- Balla J., Jacob H., Balla G. et al. (1993). Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (20), 9285–9289. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9285>
- Chen Y., Yang Y., Miller M.L. (2007). Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology*, 45(5), 1118–1128. <https://doi.org/10.1002/hep.21635>
- Chen S., Wang X., Nisar M. et al. (2019). Heme oxygenases: cellular multifunctional and protective molecules against UV-induced oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 5416728. <https://doi.org/10.1155/2019/5416728>
- Chiabrando D., Fiorito V., Petrillo S. et al. (2018). Unraveling the role of heme in neurodegeneration. *Front. Neurosci.*, 12, 7–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00712>
- Chiziane E., Telemann H., Krueger M. et al. (2018). Free heme and amyloid- β : a fatal liaison in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 61(3), 963–984. <https://doi.org/10.3233/JAD-170711>
- Dimov D.M., Kulhanek V. (1967). Comparison of four methods for the estimation of gamma-glutamyl transpeptidase activity in biological fluids. *Clin. Chim. Acta*, 16(2), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90192-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90192-1)
- Duvigneau J., Esterbauer H., Kozlov A. (2019). Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways. *Antioxidants (Basel)*, 8(10), 4–75. <https://doi.org/10.3390/antiox8100475>
- Ellman G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

- Gáll T., Balla G., Balla J. (2019). Heme, heme oxygenase, and endoplasmic reticulum stress – a new insight into the pathophysiology of vascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(15), 36–75. <https://doi.org/10.3390/ijms20153675>
- Gozzelino R., Jeney V., Soares M. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50, 323–354. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600>
- Jeney V., Balla J., Yachie A. et al. (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, 100(3), 879–887. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.3.879>
- Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
- Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. (2009). The glutathione system. II. Other enzymes, thiol-disulfide metabolism, inflammation and immunity, functions. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series Biomedical Chemistry*, 3(3), 211–220. <https://doi.org/10.1134/S1990750809030019>
- Kumar S., Bandyopadhyay U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.*, 157(3), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.004>
- Lanceta L., Mattingly J., Li C. et al. (2015). How heme oxygenase-1 prevents heme-induced cell death. *PLoS One*, 10(8), 134–144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134144>
- Mertvetsov N.P., Zelenin S.M., Morozov I.V. et al. (1990). The structure and hormonal regulation of the expression of tyrosine aminotransferase genes in mammals. *Probl. Endokrinol. (Mosk)*, 36(4), 42–51.
- Miller G.L. (1959). Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.*, 31(5), 964–966. <https://doi.org/10.1021/ac60149a611>
- Pandur S., Pankiv S., Johannessen M. et al. (2007). Gamma-glutamyltransferase is up-regulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radical Research*, 41, 1376–1384. <https://doi.org/10.1080/10715760701739488>
- Schepard B. (1969). New method for assay of tyrosine transaminase. *Anal. Biochem.*, 30, 443–448. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90139-0)
- Visweswaran P., Guntupalli J. (1999). Rhabdomyolysis. *Crit. Care. Clin.*, 15(2), 415–428. [https://doi.org/10.1016/s0749-0704\(05\)70061-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0704(05)70061-0)
- Wu B., Wu Y., Tang W. (2019). Heme catabolic pathway in inflammation and immune disorders. *Front. Pharmacol.*, 10(1), 8–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00825>

Effect of hemin and glutathione on some indicators of nitrogen and carbohydrate metabolism in rats

S.M. Okhrimenko, A.Yu. Grishkova

The accumulation of heme in the organism under the influence of various hemolytic factors can cause the development of oxidative stress with the activation of free radical processes, oxidative damage to macromolecules and supramolecular complexes of cells and tissues. Under these conditions, the antioxidant defense system is activated in the organism, an important link of which is thiol compounds, particularly glutathione. Under such conditions, the processes of nitrogen and carbohydrate metabolism associated with the formation of adaptive reactions in response to stress have been investigated insufficiently. The aim of this work is to study some indicators of nitrogen and carbohydrate metabolism during the administration of hemin and the combined administration of hemin and glutathione to clarify the role of this antioxidant in the possible correction of metabolic processes. The subjects of the study were mature outbred albino male rats that received intraperitoneal injections of hemin (50 mg/kg) and glutathione (500 mg/kg) solutions, which was administered 0.5 hours before the introduction of hemin. The animals were tested 2 hours after hemin administration. The content of total and non-protein -SH groups, and the activity of gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in liver and kidney homogenates, glycogen content and tyrosinaminotransferase (TAT) activity in liver homogenate were studied. The content of reduced -SH groups can be an indicator of pro-antioxidant balance, GGT activity is one of the indicators of glutathione metabolism, and glycogen content and TAT activity in liver are hormone-sensitive indicators. The introduction of hemin caused a decrease in the content of total and non-protein -SH groups, glycogen content and an increase in TAT activity in liver, as well as an increase in the activity of GGT in this organ. Administration of glutathione to rats 30 minutes before the administration of hemin prevented shifts in these parameters in liver caused by the administration of hemin alone. In kidneys, an increase in the content of total -SH groups was found after the combined administration of glutathione and hemin compared with the effect of hemin alone. The results of this study may indicate a sensitivity of nitrogen and carbohydrate metabolism in rat organs to the effect of hemin and the corrective effect of glutathione under these conditions, probably mediated through an increase in the thiol component of the antioxidant defense system.

Key words: *hemin, glutathione, -SH groups, tyrosine aminotransferase, gamma glutamyltransferase, glycogen, liver, kidney.*

About the authors:

S.M. Okhrimenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, s.okhrimenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-7844-618X>

A.Yu. Grishkova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, ansygyr0894@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4074-8369>

Влияние гемина и глутатиона на некоторые показатели азотистого и углеводного метаболизма у крыс
С.М. Охрименко, А.Ю. Гришкова

Накопление гема в организме при действии различных гемолитических факторов может вызывать развитие оксидативного стресса с активацией свободнорадикальных процессов, окислительным повреждением макромолекул и надмолекулярных комплексов клеток и тканей. В этих условиях в организме активизируется система антиоксидантной защиты, важным звеном которой являются тиоловые соединения, в частности глутатион. Недостаточно исследованными в этих условиях являются процессы азотистого и углеводного метаболизма, которые связаны с формированием адаптивных реакций в ответ на стресс. Цель работы – исследование некоторых показателей азотистого и углеводного обмена при введении в организм гемина и комбинированного введения гемина и глутатиона для выяснения роли этого антиоксиданта в возможной коррекции метаболических процессов. Объект исследования – половозрелые беспородные белые крысы-самцы, получавшие внутривентриально инъекции растворов гемина (50 мг/кг) и глутатиона (500 мг/кг), который вводили за 0,5 часа до введения гемина. Животных брали в опыт через 2 часа после введения гемина. В гомогенатах печени и почек определяли содержание общих и небелковых SH-групп, активность гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), в гомогенате печени – содержание гликогена и активность тирозинаминотрансферазы (ТАТ). Содержание восстановленных SH-групп может служить индикатором про-антиоксидантного баланса, активность ГГТ – одним из показателей обмена глутатиона, содержание гликогена и активность ТАТ в печени являются гормончувствительными показателями. Введение гемина вызывало снижение содержания общих и небелковых SH-групп, содержания гликогена и повышение активности ТАТ в печени, а также повышение активности ГГТ в этом органе. Введение крысам глутатиона за 30 минут до введения гемина предотвращало изменения этих показателей в печени, вызванные введением одного гемина. В почках выявлено увеличение содержания общих SH-групп после совместного введения глутатиона и гемина по сравнению с действием одного гемина. Результаты исследования могут свидетельствовать о чувствительности к действию гемина показателей азотистого и углеводного метаболизма в органах крыс и о корректирующем действии глутатиона в этих условиях, возможно, опосредованном через усиление тиолового звена системы антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: *гемин, глутатион, SH-группы, тирозинаминотрансфераза, гамма-глутамилтрансфераза, гликоген, печень, почки.*

Об авторах:

С.М. Охрименко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, s.okhrimenko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-7844-618X>

А.Ю. Гришкова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, ansygyr0894@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4074-8369>

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: O.P.Bilozorov

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 10.04.2020

UDC: 577.113.4:546.719

Dirhenium(III) complex with beta-alanine ligand: anticancer, antioxidant and DNA-binding properties

K.V. Polokhina, S.O. Babiy, O.A. Golichenko, N.I. Shtemenko

Earlier we have shown that dirhenium(III) dicarboxylate complex with γ -aminobutyric acid possessed higher antitumor activity, than those of the previously investigated alkylcarboxylates, also may act as a modulator of cisplatin mechanism of action and as a stabilizer of red blood cells in tumor-bearing organisms. Thus, the task of the work was to investigate anticancer activity of the complex *cis*-[Re₂(β -Ala)₂Cl₆] (I) in the model of tumor growth *in vivo* and to realize if the amino acid residue influences the DNA-binding activity of the amino acid derivatives of the cluster rhenium(III) compounds. Antitumor properties of the complex I were studied in the model of tumor growth with the use of Wistar rats inoculated by tumor carcinoma Guerink cells. The introduction of the compound alone in free and liposomal forms inhibited the tumor growth by 36 % and 45 % correspondingly, that is more than for dirhenium(III) clusters with alkyl ligands. The combined introduction of I and cisplatin had a significant impact on the tumor growth and showed the disappearance of the tumors in most of the animals. No considerable differences were found between introduction of liposomal and free form of I. The electronic absorption spectra of Calf Thymus DNA (CT-DNA) exhibit hyperchromism in the presence of increasing amounts of I. The DNA band at ~ 260 nm arises from the π - π^* transitions of the nucleic acid bases and changes in the intensity and slight wavelength shifts of this characteristic band reflect the corresponding structural modifications of the DNA, which include changes in stacking, disruption of the hydrogen bonds between complementary strands, covalent binding of the DNA bases, intercalation of aromatic rings and others. The binding constant $K_b(I) = 2.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ to CT-DNA was obtained that was lower than the values reported for the classical DNA intercalators and compares well with the magnitude of the binding constants for other complexes of dirhenium(III); titration of CT-DNA with cisPt and hydrogen peroxide also leads to a hypochromic effect, weak at low concentrations and more significant at high concentrations of I; the DNA binding constants increased in several times when using H₂O₂ or cisplatin that confirms a mechanism for redox activation of interaction of I with DNA in a cancer cell. The obtained results demonstrate the possibility of application of the amino acid derivatives of dirhenium(III) clusters in antitumor therapy.

Key words: *dirhenium(III) cluster with amino acid ligand, cisplatin, model of tumor growth, Calf Thymus DNA, binding constants.*

About the authors:

K.V. Polokhina – Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, contra89me@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2173-5327>

S.O. Babiy – Dnipro Technical University, Dmytro Yavornytskyi Av., 19, Dnipro, Ukraine, 49005, babiy.sveta@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2304-9144>

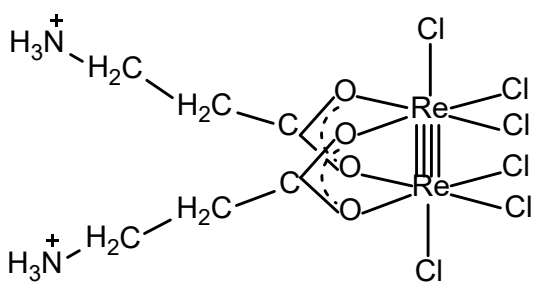
O.A. Golichenko – Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, golichenko_alex@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8888-794X>

N.I. Shtemenko – Dnipro Technical University, Dmytro Yavornytskyi Av., 19, Dnipro, Ukraine, 49005; Ukrainian State University of Chemical Technology, Gagarin Avenue, 8, Dnipro, Ukraine, 49005, n.shtemenko@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5152-7270>

Introduction

Binuclear clusters of rhenium(III) are the classical complexes with an unique quadruple metal-metal bond (Cotton, Walton, 2005; Golichenko, Shtemenko, 2006; Shtemenko et al., 2013; Shtemenko, Shtemenko, 2017). In our previous work (Shtemenko et al., 2009) it was shown that dirhenium(III) dicarboxylate complex with γ -aminobutyric acid possessed higher antitumor activity, than those of the previously investigated alkylcarboxylates (Shtemenko et al., 2007), also may act as a modulator of cisplatin mechanism of action and as a stabilizer of red blood cells in tumor-bearing organisms. Such results were promising for the using of amino acid complexes of dirhenium(III) as effective antitumor agents. Previously (Golichenko et al., 2015) we have developed methods of synthesis and proved the structure of the complex compound of dirhenium(III) with β -alanine.

Titled compound I almost unlimitedly dissolves in water as well as similar GABA dirhenium(III) complex compound. High solubility of such substances in water, in contrast to alkylcarboxylates, greatly facilitates their use in physiological conditions. Also, I was shown to have cytotoxic and proapoptotic activity against Jurkat cells (Polokhina et al., 2020). The task of the work was to investigate anticancer activity of I in the model of tumor growth *in vivo* and to realize if the amino acid residue influences the DNA-binding activity of the amino acid derivatives of the cluster rhenium(III) compounds.

Structure of *cis*-[Re₂(β-Ala)₂Cl₆] (I)

Objects and methods of research

Materials

Cisplatin (cisPt) and I were synthesized at Ukrainian State University of Chemical Technology at the Department of Inorganic Chemistry (Golichenko et al., 2015).

Cells of Guerin's carcinoma (T8) were received from the R.E.Kavetskiy Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiology, National Academy of Science of Ukraine (Kiev, Ukraine). Calf thymus DNA (CT-DNA) with molecular weight 328 Da, $\epsilon_{260}=0.6600 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ was purchased from Serva (FRG). All chemical reagents were of analytical grade.

Animal model studies

The animal model was described previously (Shtemenko et al., 2007, 2009; Li et al., 2015). Tumor transplantation was performed by subcutaneous injection of 20 % Guerin's carcinoma (T8) cell suspension in the thigh area. Control group of tumor-bearing animals was not subjected to any treatment.

A single intraperitoneal administration of cisPt at a dose of 8 mg/kg was made on the ninth day after tumor inoculation and intraperitoneal administration of preparations in liposome forms in dose of 7 $\mu\text{M}/\text{kg}$ of the rhenium compound I or rhenium-platinum (4:1) systems started on the third day after inoculation of tumor cells and was repeated every 2 days until the day 21: group [I]lip+cisPt.

Introduction of co-encapsulated drugs started on the third day after inoculation of tumor cells and was repeated every 2 days until day 21: group [I+cisPt]lip. The number of animals in each group was 8. All manipulations with animals have been carried out under narcosis in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and Permission of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

On day 21, the animals were sacrificed under chloroform narcosis according to the rules of the Ethics Committee and the tumor cells were isolated and weighed. Wilcoxon nonparametric tests were used to compare the parameters obtained from the group without treatment and each group of treatment, or between two treated groups.

CT-DNA binding constant measurements

Absorption measurements were performed on a Hewlett-Packard diode array spectrophotometer (HP 8453) according to (Shtemenko et al., 2013) with some modifications: the buffered calf thymus CT-DNA solutions that were used exhibited a ratio of 1.8 : 1 for the absorptions at 260 and 280 nm, indicating that the DNA was sufficiently free from proteins. Binding titration experiments were performed using a fixed concentration of CT-DNA (0.12 μM) with increasing concentrations of metal complex (0 to 200 μM) in 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and 20 mM NaCl. Complex-DNA solutions were incubated for 5 min before the absorption spectra were recorded. The DNA binding constant, K_b (M^{-1}), was obtained by fitting the titration data according to the equation (1).

$$1/(A-A_0) = 1/A_0 + 1/[K_b \times A_0 \times C_{(\text{complex})}] \quad (1)$$

After plotting $1/(A-A_0)$ vs $1/C_{(\text{complex})}$ and recording the slope and intercept of the resulting curve, where A_0 and A are the absorption values before and after adding the complex, respectively and C (complex, mol/L) is the concentration of the added complex.

Results and discussion

Animal studies

Anticancer activity of I and I+cisPt in vivo

The I exhibits average activity against tumor cell growth, being introduced as in free, as in liposomal forms (Fig. 1).

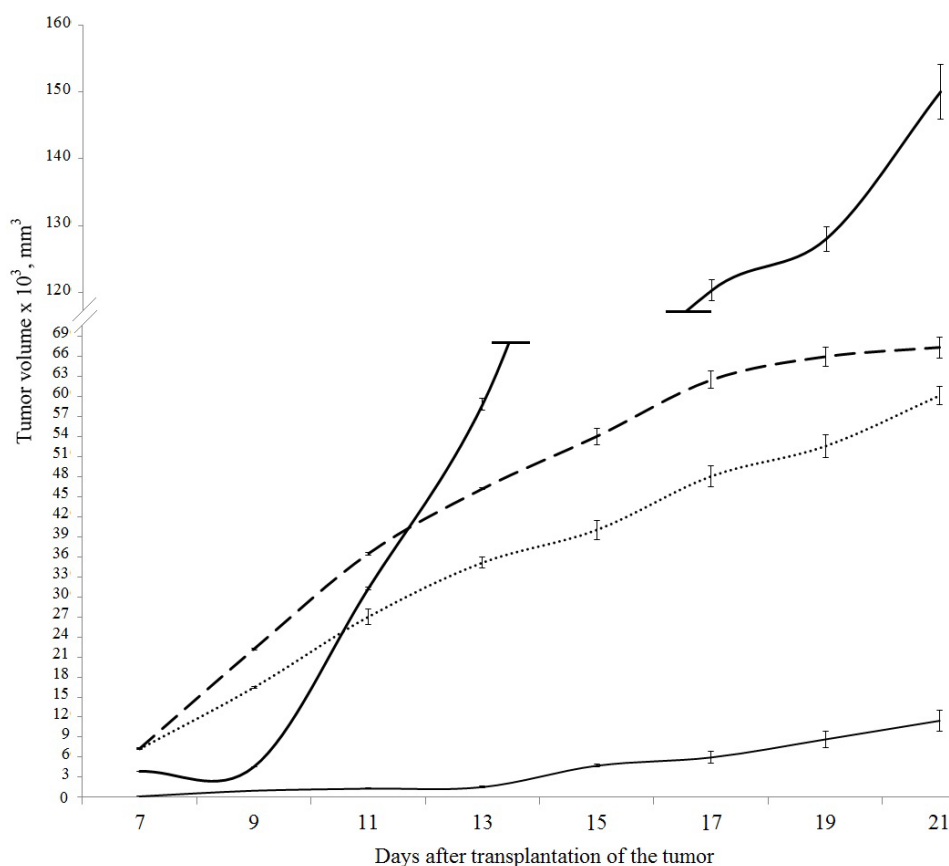


Fig. 1. Dynamics of the control tumor growth (— T8) and under influence of introductions of cisplatin (— T8+cisPt); I in nanoliposomes (···· T8+[I]nl); and in water solutions (--- T8+[I]sl)

Introduction of the encapsulated dirhenium compound I alone led to reduction of the tumor weights by 45 % and of free I – by 36 % correspondingly, that is much lower in comparison to cisPt (Table 1).

Table 1. Weights of the residual tumors and values of the reduction of the tumor ($M \pm m$, $n=6$)

Groups	Weight of tumors, g	Reduction of tumor, %
T8	63.27 ± 15.19	-
T8+cisPt	10.40 ± 1.26 #	83.56 ± 1.991
T8+[I]sl	40.31 ± 10.34###	36.29 ± 16.343
T8+[I]nl	34.35 ± 5.21##	45.71 ± 8.285
T8+cisPt+[I]sl	13.87 ± 0.69	78.08 ± 1.091
T8+cisPt+[I]nl	2.72 ± 0.14 ##	95.70 ± 0.221

$p < 0.05$ versus T8; ### $p < 0.05$ versus T8+cisPt

The antitumor effect of free I is close to the effect of encapsulated form of I that is unusual for the dirhenium(III) clusters due to their instability in water and appropriate requirements of the liposomal technology application. It is a very valuable result giving possibility to use stable in water dirhenium compounds in anticancer trials.

It is interesting to note, that the substance (*cis*-Re₂(CH₃CH₂CCOO)₂Cl₄) – a propionate derivative, which differs from I only by absence of amino groups, had very low activity in the same model, being introduced as in free, as in liposomal (16.61 %) forms (Leus et al., 2012).

If to compare influence of the liposomal forms introductions of other different dirhenium(III) clusters on the tumor growth, it is clear that the effect of I is greater than the effect found for dirhenium(III) compounds with alkyl ligands, such as dirhenium(III) complexes with pivalic (*cis*-Re₂((CH₃)₃CCOO)₂Cl₄), isobutyric (Re₂(*i*-C₃H₇COO)₄Cl₂) or adamantylcarbonic (*cis*-[Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄]) ligands, that had reached 28–30 % (Leus et al., 2012) but lower than the effect of the homologues substance [Re₂(GABA)₂Cl₅(H₂O)]Cl·2H₂O (by 60 %) in the same model (Shtemenko et al., 2009). These results once more confirm our previous conclusions about growth of antitumour activity in the range of dirhenium(III) substances with the increase of the ligand chain and about positive influence of the introduction of the amino acid moiety to the ligand arrangement.

Our earlier studies have shown that combination therapy using *cis*Pt and dirhenium(III) clusters in reduction of tumors in tumor-bearing animals was very effective (Shtemenko et al., 2009, 2013, 2015; Shtemenko, Shtemenko, 2017). Thus, it was not a surprising thing, that a substation effect was observed in groups T8+[I]sl and T8+[I]nl+*cis*Pt, where *cis*platin and I were introduced together (Fig. 2, Table 1).

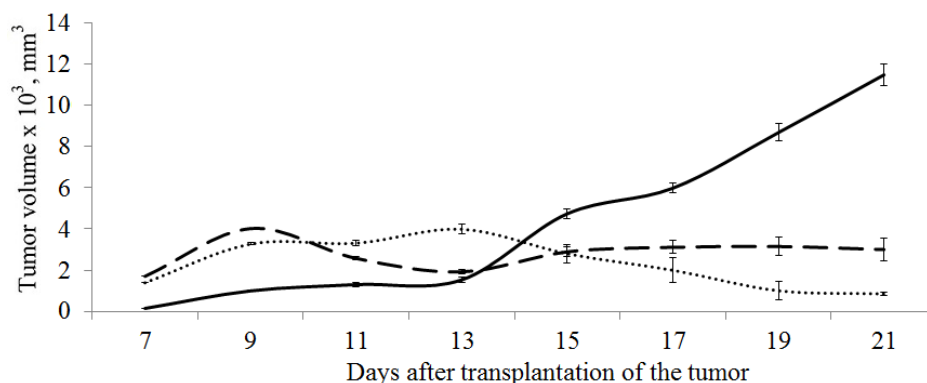


Fig. 2. Dynamics of the tumor growth under influence of introduction of *cis*Pt (— T8+*cis*Pt); (..... T8+*cis*Pt+[I]nl); (- - - T8+[I]sl)

The reduction of the tumor growth was more effective than that in T8+*cis*Pt group and the most of the experimental animals had no tumors at all. Practically no considerable differences were found between introduction of liposomal and free form of I, once more demonstrating the possibility of application of the amino acid derivatives of dirhenium(III) clusters in antitumor therapy.

DNA-binding activity

Investigation of DNA-binding activity is one of the most important procedure for the choice of a potentially anticancer drug (Martinez-Lillo et al., 2011; Majer et al., 2015; Ismail et al., 2019). To probe the binding of DNA to I, the electronic absorption spectra, obtained by titrating CT-DNA with solutions of I, were performed according to reported procedures (Shtemenko et al., 2013; Polokhina et al., 2016; Paramonova et al., 2016) and are depicted in Fig. 3.

The electronic absorption spectra CT-DNA exhibit hyperchromism in the presence of increasing amounts of I. The DNA band at ~ 260 nm arises from the π - π^* transitions of the nucleic acid bases and changes in the intensity and slight wavelength shifts of this characteristic band reflect the corresponding structural modifications of the DNA, which include changes in stacking, disruption of the hydrogen bonds between complementary strands, covalent binding of the DNA bases, intercalation of aromatic rings and others.

By plotting $1/(A-A_0)$ vs $1/C$ according to eq. 1, the value $K_b I = 2.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for the binding constant of the DNA complex to I was obtained. The determined K_b value for I is lower than the values reported for the classical DNA intercalators; this K_b value ($2.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) indicates that I binds to DNA with a lower affinity than the classical intercalators but it compares well with the magnitude of the binding constants for other non-intercalating complexes of dirhenium(III) (Polokhina et al., 2016; Paramonova et al., 2016), which is in the range $3.4 \times 10^2 - 2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

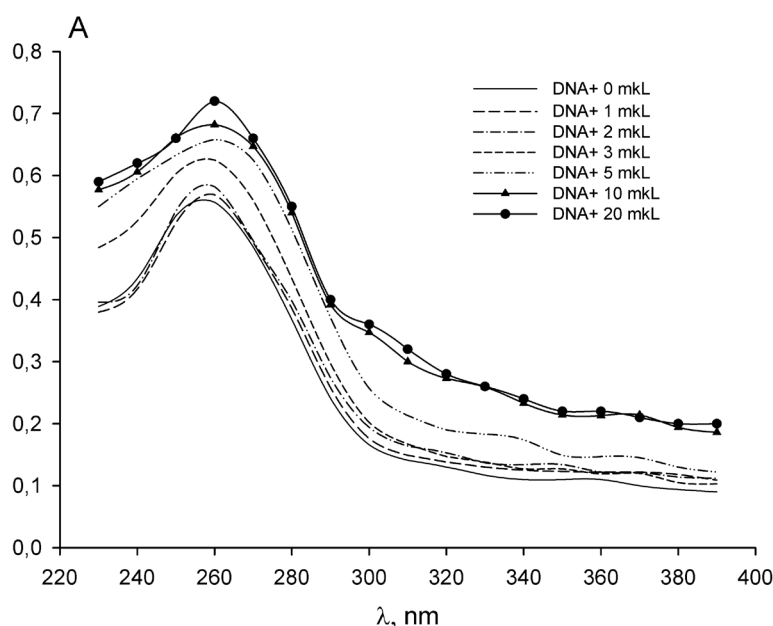


Fig. 3. Electronic absorption spectra of CT-DNA upon addition of I

Titration of CT-DNA with cisPt and hydrogen peroxide also leads to a hypochromic effect, weak at low concentrations and more significant at high concentrations of substance (Fig. 4).

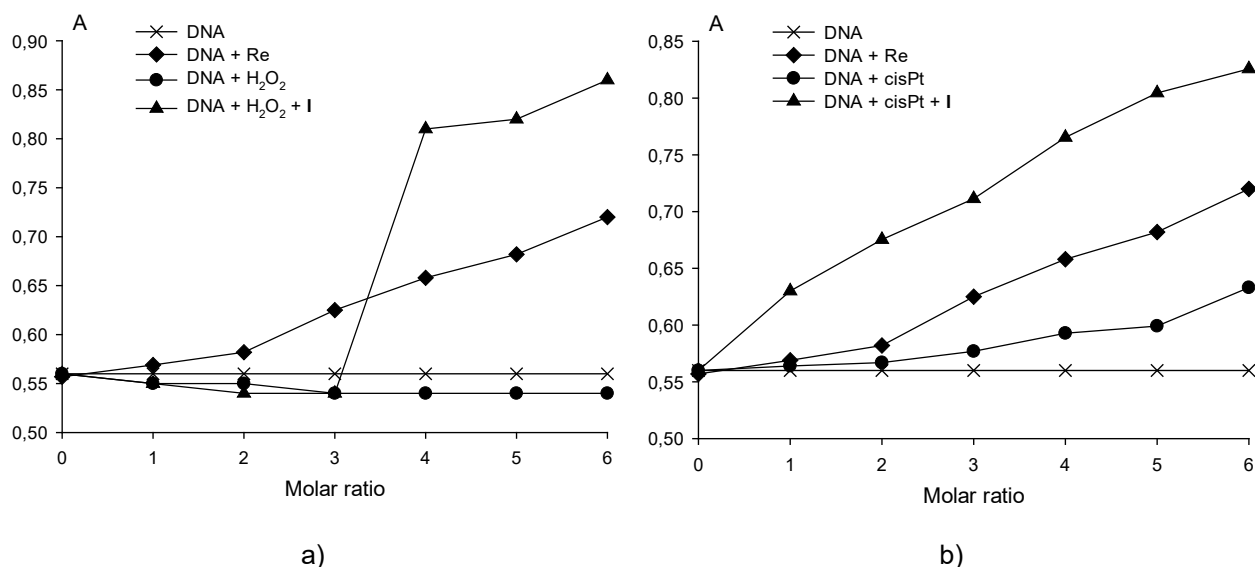


Fig. 4. The intensity of absorption (A) at 260 nm. The molar ratio of DNA-hydrogen peroxide (a) or cis-Pt (b) and DNA-I: 1 – 1 : 84; 2 – 1 : 168; 3 – 1 : 252; 4 – 1 : 420; 5 – 1 : 840; 6 – 1 : 1680

This suggests for another mechanism of the interaction of cisPt, H₂O₂ in comparison to I, which leads to significant chemical modification of the DNA helix and may be the explanation of the efficacy of the combinational therapy.

As it was shown previously, titration of CT-DNA by I after hydrogen peroxide and cisPt addition leads to a sharp increase in absorption spectra in the area of absorption of nucleic bases. Binding constant $K_b(\text{cis-Pt}) = 1.080 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_b(\text{H}_2\text{O}_2) = 0$, $K_b(\text{H}_2\text{O}_2 + \text{I}) = 24.423 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_b(\text{cis-Pt} + \text{I}) = 7.783 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

The DNA binding constants increases in several times when using H₂O₂ (Fig. 4a) or cis-Pt (Fig. 4b). The obtained data confirm a mechanism for redox activation of interaction of antitumor Rhenium compounds with DNA in a living cell so-called «prodrug strategy» (Zhang, Sadler, 2017), which explains the activity of some drugs, such as I, which become active only in a cancer cells, where the redox state is much different from the redox state of the normal cells. Interestingly, that difference between redox-activated I and non-redox-activated I on the Fig. 4 and differences between K_bI vis K_b(H₂O₂+I) and K_b(cis-Pt+I) is much more greater than the same for other investigated (non-amino acid derivatives) that reaffirms perceptiveness of use of such substances in medicine and defines directions of synthesis of the biologically active compounds.

Acknowledgements

The work was supported by Ministry of Education and Science of Ukraine (grants 0117U001159 and 0117U006416), Fulbright and DAAD grants. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflicts with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

- Cotton F.A., Walton R.A. (2005). Multiple bonds between metal atoms. 3rd ed. Springer Science and Business Media. 818 p. <https://doi.org/10.1021/ja0697267>
- Golichenko A.A., Shtemenko A.V. (2006). Cluster rhenium(III) complexes with adamantanecarboxylic acids: synthesis and properties. *Rus. J. of Coord. Chem.*, 32, 242–249. <https://doi.org/10.1134/S1070328406040038>
- Golichenko A.A., Domasevitch K.V., Kytova D.E., Shtemenko A.V. (2015). Crystal structure of cis-bis(μ - β -alanine- κ^2 O:O')bis[trichloridorhenium(III)](Re–Re) sesquihydrate. *Acta Cryst.*, E71, 45–47. <https://doi.org/10.1107/s2056989014026620>
- Ismail M.B., Booysen I.N., Akerman M.P. (2019). DNA interaction studies of rhenium compounds with Schiff base chelates encompassing biologically relevant moieties. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 38(12), 950–971. <https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1639058>
- Leus I.V., Shamelashvili K.L., Skorik O.D. et al. (2012). Antioxidant and antitumor activity of dirhenium dicarboxylates in animals with Guerin carcinoma. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 84(3), 87–96. (In Ukrainian)
- Li Z., Shtemenko N., Yegorova D. et al. (2015). Liposomes loaded with a dirhenium compound and cisplatin: preparation, properties and improved *in vivo* anticancer activity. *J. of Liposome Res.*, 25(1), 78–87. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.954127>
- Martinez-Lillo J., Mastropietro T.F., Lappano R. et al. (2011). Rhenium(IV) compounds inducing apoptosis in cancer cells. *Chem. Comm.*, 47, 5283–5285. <https://doi.org/10.1039/C1CC11038A>
- Majer Z., Bosze S., Szabo I. et al. (2015). Study of dinuclear Rh(II) complexes of phenylalanine derivatives as potential anticancer agents by using X-ray fluorescence and X-ray absorption. *Microchemical Journal*, 120, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.01.002>
- Paramonova K., Golichenko A., Babiy S. et al. (2016). The interaction of DNA with cluster rhenium compounds of different structural types. *World of Med. and Biol.*, 56(2), 140–144.
- Polokhina K., Golichenko A., Babiy S. et al. (2016). Investigation of the interaction of cluster compounds of rhenium with biological active ligands with supercoiled DNA by electronic spectroscopy. *Visnyk of Lviv University, Biol. series*, 72, 15–24.
- Polokhina K.V., Kytova D.E., Shtemenko A.V., Shtemenko N.I. (2020). Antiproliferative activity of the cluster rhenium compound with β -alanine ligands. *Ukr. Biochem. J.*, 92(1), 120–126. <https://doi.org/10.15407/ubj92.01.120>
- Shtemenko N., Collery P., Shtemenko A. (2007). Dichlorotetra- μ -isobutyratodirhenium(III): enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties. *Anticancer Res.*, 27(4B), 2487–2492.
- Shtemenko A.V., Collery P., Shtemenko N.I. et al. (2009). Synthesis, characterization, *in vivo* antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 26, 5132–5136. <https://doi.org/10.1039/b821041a>
- Shtemenko N.I., Chifotides H.T., Domasevitch K.V. et al. (2013). Synthesis, X-ray structure, interactions with DNA, remarkable *in vivo* tumor growth suppression and nephroprotective activity of cis-tetrachlorodipivalato dirhenium(III). *J. of Inorg. Biochem.*, 129, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.001>

Shtemenko A.V., Chifotides H.T., Yegorova D.E. et al. (2015). Synthesis and X-ray crystal structure of the dirhenium complex $\text{Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{CO}_2)_4\text{Cl}_2$ and its interactions with the DNA purine nucleobases. *J. of Inorg. Biochem.*, 153, 114–120. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.06.012

Shtemenko A.V., Shtemenko N.I. (2017). Rhenium–platinum antitumor systems. *Ukr. Biochem. J.*, 89(2), 5–30. <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.005>

Zhang P., Sadler P.J. (2017). Redox-active metal complexes for anticancer therapy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017(12), 1541–1548. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600908>

Комплекс диренію(III) з бета-аланіновим лігандом: протипухлинні, антиоксидантні та ДНК-зв'язуючі властивості К.В. Полохіна, С.О. Бабій, О.А. Голіченко, Н.І. Штеменко

Раніше нами було показано, що дикарбоксилатна комплексна сполука диренію(III) з γ -аміномасляною кислотою має більш високу протипухлинну активність, ніж для раніше досліджених алкілкарбоксилатів, а також може діяти як модулятор механізму дії цисплатину і як стабілізатор еритроцитів в організмах-пухлиноносій. Таким чином, завдання роботи полягало у тому, щоб дослідити протипухлинну активність комплексу $\text{cis-}[\text{Re}_2(\beta\text{-Ala})_2\text{Cl}_6]$ (I) в моделі росту пухлини *in vivo* і зрозуміти, чи впливає амінокислотний залишок на ДНК-зв'язуючу активність амінокислотних похідних кластерних сполук ренію(III). Протипухлинні властивості комплексу I вивчали на моделі росту пухлини з використанням щурів лінії Вістар, інокульованих клітинами пухлини карциноми Герена. Введення тільки однієї сполуки у вільній та ліпосомальній формах інгібувало ріст пухлини на 36 % і 45 % відповідно, що більше, ніж для кластерів диренію(III) з алкільними лігандами. Комбіноване введення I і цисплатину значно впливає на розмір пухлини та призводить до зникнення пухлин у більшості тварин. Не було виявлено суттєвих відмінностей між введенням ліпосомальної і вільної форми речовини I. У електронних спектрах поглинання ДНК тимусу теляти (СТ-ДНК) спостерігається гіперхромізм у присутності зростаючої кількості I. Смуга ДНК при ~ 260 нм відповідає π - π^* переходам основ нуклеїнових кислот. Зміни в інтенсивності і незначний зсув цієї характеристичної смуги відображають відповідні структурні модифікації ДНК, які включають зміни в укладанні, розрив водневих зв'язків між комплементарними ланцюгами, ковалентне зв'язування основ ДНК, інтеркаляцію ароматичних кілець та ін. Була отримана константа зв'язування $K_b(I) = 2.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для СТ-ДНК, значення якої нижче, ніж для класичних інтеркаляторів ДНК, і порівнянне з величинами констант зв'язування для інших комплексів диренію(III); титрування СТ-ДНК цисплатином і перекисом водню також призводить до гіпохромного ефекту, слабкого при низьких концентраціях і більш значного при високих концентраціях I; константи зв'язування ДНК збільшувались у кілька разів при використанні H_2O_2 або цисплатину, що підтверджує механізм окисно-відновної активації взаємодії I з ДНК у раковій клітині. Отримані результати демонструють можливість застосування амінокислотних похідних кластерів диренію(III) в протипухлинній терапії.

Ключові слова: кластери диренію(III) з амінокислотними лігандами, цисплатин, модель росту пухлини, ДНК тимусу теляти, константи зв'язування.

Про авторів:

К.В. Полохіна – ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, contra89me@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2173-5327>

С.О. Бабій – НТУ «Дніпровська політехніка», вул. Д.Яворницького, 19, Дніпро, Україна, 49005, babiy.sveta@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2304-9144>

О.А. Голіченко – ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, golichenko_alex@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8888-794X>

Н.І. Штеменко – НТУ «Дніпровська політехніка», вул. Д.Яворницького, 19, Дніпро, Україна, 49005; ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», пр. Гагаріна, 8, Дніпро, Україна, 49005, n.shtemenko@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5152-7270>

Комплекс дирения(III) с бета-аланиновым лигандом: противоопухолевые, антиоксидантные и ДНК-связывающие свойства К.В. Полохина, С.О. Бабий, А.А. Голиченко, Н.И. Штеменко

Ранее нами было показано, что дикарбоксилатное комплексное соединение дирения(III) с γ -аминомасляной кислотой обладает более высокой противоопухолевой активностью, чем у ранее исследованных алкілкарбоксилатов, а также может действовать как модулятор механизма действия цисплатина и как стабилизатор эритроцитов в организмах – носителях опухоли. Таким образом, задача работы состояла в том, чтобы исследовать противоопухолевую активность комплекса $\text{cis-}[\text{Re}_2(\beta\text{-Ala})_2\text{Cl}_6]$ (I) в модели роста опухоли *in*

vivo и понять, влияет ли аминокислотный остаток на ДНК-связывающую активность аминокислотных производных кластерных соединений рения(III). Противоопухолевые свойства комплекса I изучали на модели роста опухоли с использованием крыс линии Вистар, инокулированных клетками опухоли карциномы Герена. Введение только одного соединения в свободной и липосомальной формах ингибировало рост опухоли на 36 % и 45 % соответственно, что больше, чем для кластеров дирения(III) с алкильными лигандами. Комбинированное введение I и цисплатина оказало значительное влияние на размер опухоли и приводило к исчезновению опухоли у большинства животных. Не было обнаружено существенных различий между введением липосомальной и свободной формы I. В электронных спектрах поглощения ДНК тимуса телёнка (СТ-ДНК) наблюдается гиперхромизм в присутствии увеличивающихся количеств I. Полоса ДНК при ~ 260 нм соответствует π-π* переходам оснований нуклеиновых кислот. Изменения в интенсивности и незначительные сдвиги длин волн этой характеристической полосы отражают соответствующие структурные модификации ДНК, которые включают изменения в укладке, разрыв водородных связей между комплементарными цепями, ковалентное связывание оснований ДНК, интеркаляцию ароматических колец и др. Была получена константа связывания $K_b(I) = 2.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для СТ-ДНК, значение которой ниже, чем значения для классических интеркаляторов ДНК, и сравнимо с величинами констант связывания для других комплексов дирения(III); титрование СТ-ДНК цисплатином и перекисью водорода также приводит к гипохромному эффекту, слабому при низких концентрациях и более значительному при высоких концентрациях I; константы связывания ДНК увеличивались в несколько раз при использовании H_2O_2 или цисплатина, что подтверждает механизм окислительно-восстановительной активации взаимодействия I с ДНК в раковой клетке. Полученные результаты демонстрируют возможность применения аминокислотных производных кластеров дирения (III) в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: кластеры дирения(III) с аминокислотными лигандами, цисплатин, модель роста опухоли, ДНК тимуса телёнка, константы связывания.

Об авторах:

К.В. Полохина – ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, contra89me@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2173-5327>

С.О. Бабий – НТУ «Днепровская политехника», ул. Д.Яворницкого, 19, Днепр, Украина, 49005, babiy.sveta@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2304-9144>

А.А. Голиченко – ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, golichenko_alex@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-8888-794X>

Н.И. Штеменко – НТУ «Днепровская политехника», ул. Д.Яворницкого, 19, Днепр, Украина, 49005; ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», пр. Гагарина, 8, Днепр, Украина, 49005, n.shtemenko@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5152-7270>

Представлено: Г.С.Маслак / Presented by: G.S.Maslak

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 02.03.2020

••• БОТАНІКА ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН •••
••• BOTANY AND PLANT ECOLOGY •••

УДК: 582.949.27+581.522.4:581.524.34(477.63)

Формування й самопідтримання популяції *Hyssopus officinalis* L. в умовах залізорудного відвалу Криворіжжя
М.О. Баранець, І.І. Коршиков

Установлено особливості формування самовідновлення й самопідтримання локальної популяції середземноморського інтродуцента *Hyssopus officinalis* L. у несприятливих еколого-едафічних умовах залізорудного відвалу Криворіжжя, де насіння було висіяне на площі 1 га понад 30 років тому. Досліджена його життєвість. Виявлено, що цей вид, після досягнення репродуктивної фази розвитку, щорічно розмножувався насіннєвим шляхом, зайняв площу відвалу понад 3 га й фактично сформував на ньому ізольовану популяцію. Розповсюджується вид на ті ділянки відвалу, де практично відсутній рослинний покрив, виконуючи, фактично, піонерну функцію. На ділянці, де було проведено первинний висів насіння *H. officinalis*, зараз відбувається процес формування фітоценозу, який за флористичним складом наближається до природних степових, але при цьому інтродукований вид поступово витісняється. В спонтанно зайнятих видом оселищах, сукцесійні процеси знаходяться на початковій стадії. У межах окремих популяційних локусів *H. officinalis* на 100 м² трапляється до 513 дорослих особин із кількістю генеративних пагонів від 20 до 70 шт. на рослину. На цих пагонах утворюється в середньому від 160,2 до 181,6 квіток. Середня насіннєва продуктивність становить 60 % від потенційної, а насіння від материнської особини розповсюджується на відстань 1–5 м. У компактних місцях зростання *H. officinalis* присутні рослини всіх вікових груп – від проростків до субсенільних. *H. officinalis* натуралізувався в умовах залізорудного відвалу, а його локальна популяція є стійкою, повночленною, поповнюється новими особинами щорічно й розповсюджується на території, де інші види взагалі не ростуть. Рослини генеративного віку (g2, g3) досить добре розвинені, заввишки більше 90 см і мають задовільний життєвий стан. Вид на відвалі проявляє піонерні риси, не є агресивним, може витіснитись зональною рослинністю, не становить інвазійної загрози. *H. officinalis* можна рекомендувати для озеленення залізорудних відвалів або їх великих ділянок, які виведені з експлуатації, без технічної попередньої підготовки прямим висівом насіння в породу, тобто штучно сприяти його розповсюдженню.

Ключові слова: *Hyssopus officinalis*, відновлення, насіннєва продуктивність, життєвий стан, популяційна структура, рекультивація, залізорудний відвал Криворіжжя.

Про авторів:

М.О. Баранець – Криворізький ботанічний сад НАН України, вул. Маршака, 50, Кривий Ріг, Україна, 50089, kbsnanu@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1720-4785>

І.І. Коршиков – Криворізький ботанічний сад НАН України, вул. Маршака, 50, Кривий Ріг, Україна, 50089, ivivkor@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1471-398X>

Вступ

Багаторічний видобуток залізної руди на Криворіжжі призводить до докорінного масштабного порушення земель (понад 8,5 тис. га) та формування техногенних новоутворень – відвалів розкритих порід, які фактично не мають природних аналогів у зоні Степу. Принципова різниця промислових відвалів від кам'янистих відслонень у степовій зоні полягає в тому, що породи, які залягали на значній (до 500 м) глибині, за короткий час були вилучені, різною мірою подрібнені, перемішані та складовані у великі за площею (до 800 га) відвали заввишки понад 150 м. Залізорудні відвали відсипаються переважно з суміші кварцитів і сланців та перемежовані суглинками, які мають певну кількість розчинних та слабкорозчинних мінералів, що під впливом опадів, контакту з повітрям та перепадів температур можуть вивільнятися тривалий період часу. Повільний перебіг гіпергенезу порід на поверхні відвалів призводить, з часом, до утворення в локальних місцях гетерогенних за фізико-механічним і хімічним складом субстратів, більш придатних для спонтанного заселення рослинами, а також для створення штучного рослинного покриву. Як показала п'ятдесятирічна практика озеленення залізорудних відвалів Криворіжжя, найскладнішим завданням є підбір стійких видів, які здатні рости на їх поверхні та відігравати важливу роль в активізації ґрунтоутворних процесів. Існуючий досвід свідчить, що для рекультивації

відвалів без затратного технічного етапу (виположування схилів, нанесення шару ґрунту 30–50 см завтовшки) можуть застосовуватись два підходи: а) суцільна посадка стійких видів, які успішно ростуть на цих територіях; б) дифузна висадка таких видів, які самовідновлюються й розповсюджуються по поверхні відвалу (Коршиков, Красноштан, 2012).

Багаторічні види, які здатні не лише рости на місці їх культивування на відвалах, але й за відсутності конкуренції стихійно розповсюджуватися й захоплювати нові ділянки, є більш корисні з практичної точки зору. Такі види створюють передумови для подальшого розвитку сукцесійних процесів на відвалах. Вони цікаві з позиції популяційної біології, а саме: як в екстремальних умовах докорінно техногенно змінених екоотопів, едафічні умови яких вкрай несприятливі для життєздатності рослин, окремі багаторічні види можуть формувати стійкі популяційні структури. Серед них можуть бути й інтродуценти. До вкрай обмеженої частки видів, які здатні рости і розповсюджуватись на поверхні виведених з експлуатації відвалів, належить *Hyssopus officinalis* L. У наш час на великому відвалі Першотравневого рудоуправління (ПРУ) цей вид росте на значно більшій площі, ніж рекультивована з його використанням початкова ділянка. *H. officinalis* – середземноморський вид, представник родини губоцвіті (Lamiaceae Lindl.), завдяки пряно-ароматичним, ефіроолійним і лікарським властивостям давно поширений у культурі в Західній Європі, а також в Україні (Котюк, Рахметов, 2012). У здичавілому стані трапляється в Криму, кам'янистих екоотопах басейну Дніпра, на виходах материкових порід Донеччини (Бойко и др., 2012). На залізорудних відвалах *H. officinalis* активно відновлюється й спонтанно розповсюджується за рахунок власного насіння на ділянках, утворених субстратами, малоприсадними для самозаростання іншими видами місцевої флори. У цьому полягає його перевага над іншими видами, що використовуються в практиці біологічної рекультивації відвалів, де його почали висаджувати більше 30 років тому (Плугіна та ін., 1981).

Популяційна біологія багаторічних рослин у природних умовах зростання – досить розвинена галузь ботаніки в Україні (Жилияев, 2005; Злобин, 1989; Царик, 2007). Однак, питання формування популяцій рослин-інтродуцентів на техногенних новоутвореннях практично не досліджувалось. Очевидно, що за вкрай несприятливих умов техногенних екоотопів, придатних для існування лише обмеженої кількості видів, вони реалізують свої життєві стратегії, які не завжди виражені в оптимальних умовах природних екоотопів. У багаторічників вони можуть проявлятися у специфіці онтоморфогенезу, трансформації розповсюджених у природі життєвих форм, вікової та віталітетної структури популяції, пов'язані зі змінами або перерозподілом біомаси в різних за віком особинах, обмеженням енергетичних витрат на ріст і розвиток, змінами репродуктивних спроможностей рослин. Різка строкатість екологічних умов техногенних екоотопів відвалів дозволяє максимально реалізувати всю сукупність біологічних потенцій виду, які генетично закріплені в його індивідах.

Мета роботи – з'ясувати особливості формування й самопідтримання популяції середземноморського виду *Hyssopus officinalis* L. в умовах залізорудного відвалу Криворіжжя.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження проводились на ділянках зростання *H. officinalis* на Першотравневому залізорудному відвалі (ПРУ), де насіння було висіяне понад 30 років тому. Висів насіння на площі близько 1 га було здійснено на субстраті, складеному сумішшю сланців та кварцитів, фрагментарно з бурими засоленими суглинками (частина верхньої берми відвалу автомобільної відсипки). Більше 30 років вид зростав на ділянках висіву. Однак на 2016 рік, у зв'язку з сукцесійними змінами, від первинної площі висіву залишилось менше 0,3 га. Із півдня, заходу та північного заходу ділянка обмежена схилом, де була проведена рекультивація деревними рослинами. Спорадичні спостереження за насіннєвим відновленням *H. officinalis* на ділянці ПРУ проводились з 2002 року. В дослідженнях особливу увагу приділяли експансії виду за межі ділянки первинного висіву. Площа компактного масового спонтанного природного розповсюдження виду на території відвалу на 2016 р. становила понад 3 га. Тут ростуть рослини різних вікових груп, хоча спорадично окремі екземпляри *H. officinalis* трапляються на відстані 2–3 км від вихідної ділянки. Проведено облік чисельності рослин *H. officinalis* на типових ділянках розміром 100 м², які підібрані в трьох найбільших популяційних локусах. Вікові групи виділені на основі описів онтогенезу виду (Котюк, 2015) та за власними спостереженнями: *p* – преювенільна фаза (проросткова); *j* – ювенільна фаза; *v* – віргінійська фаза; *g1–g3* – 1–3 стадії генеративної фази; *s* – старі рослини. Кількість проростків врахована на момент дослідження. Оскільки дві вікові групи: імагурних особин та тих, що досягли

вегетативної фази, у польових умовах не мають чіткої диференціації, ми їх враховували як вегетативні. Дослідження популяційної структури проводили по трансекті пунктирно на 30 облікових ділянках розміром 1 м² у межах тих самих популяційних локусів (Полевая геоботаника, 1976). Життєздатність окремих локусів популяції *H. officinalis* визначали за площею розповсюдження виду, щільністю особин, віковою структурою, біометричними характеристиками рослин, їхнім життєвим станом, насінневою продуктивністю дорослих генеративних особин.

Виділення одиниць рослинності та виконання геоботанічних описів здійснювали за принципами еколого-фітоценотичної (домінантної) класифікації (Афанасьев та ін., 1956). Насінневу продуктивність вивчали в генеративних особин, вибір котрих носив випадковий характер, за трансектою, закладеною вздовж осі природного розповсюдження виду в межах обстежених раніше популяційних локусів. На кожній ділянці збір насіння проводили з нижніх, середніх та центральних пагонів 30 рослин. Здійснювали підрахунок квіткових чашечок та зрілого насіння. Проведено дисперсійний аналіз отриманих даних (Любищев, 1986) в програмі MO Excel 2007.

Результати

На 2016 рік площа первинної ділянки *H. officinalis* на залізорудному відвалі впродовж 30 років скоротилась приблизно втричі – з 1 га до 0,3 га. Тривалий час вид самовідновлювався та відіграв роль піонерного на цій території, однак, з часом був витіснений іншими видами, що розповсюдились спонтанно з навколишніх оселищ. На таких ділянках формуються фітоценози, де сукцесійні процеси розвиваються в напрямку степових, у яких досліджуваний вид зрідка трапляється, але ніде не домінує. Загальне проективне покриття в таких фітоценозах сягає 70 %. У їх формуванні бере участь понад 20 видів, серед яких значна частка степових видів, зокрема, з'являється чимало бобових, за частотою трапляння: *Securigera varia* (L.) Lassen., *Lotus ucrainicus* Klokov, *Melilotus officinalis* (L.) Pall. тощо, які в свою чергу теж позитивно впливають на трофність субстрату. Домінантами є: *Stipa ucrainica* P. Smirn., *Securigera varia*, *Elytrigia repens* (L.), *Lathyrus tuberosus* L., та ін. (Мазур та ін., 2015). На таких ділянках відбувається активне поселення деревно-чагарникових рослин. Локалітети з різкими змінами мікрорельєфу або покриті більш трофними субстратами, колонізовані деревними видами з переважанням *Pinus pallasiana* D. Don., *Populus nigra* L., *Cerasus mahaleb* (L.) Mill., *Armeniaca vulgaris* Lam.

Життєва активність *H. officinalis* на відвалі після появи на місці висіву перших генеративних особин постійно реалізувалась шляхом захоплення нових територій, у першу чергу тих, де немає конкуренції з боку інших видів рослин, за рахунок насінневого розповсюдження. Здебільшого це субстрати, на момент поселення *H. officinalis* мало придатні до заростання іншими видами рослин (щербенисті фракції, складені сумішшю кварцитів та гіпергенізованих сланців, суглинків засолених). Фактично, *H. officinalis* проявив себе як піонерний вид. На таких ділянках спонтанно формуються невеликі, площею до 1 га, монодомінантні популяційні локуси *H. officinalis*. Те, що вид недостатньо активно колонізує едафотопи відвалу, пов'язано з його біологічними особливостями. За способом розповсюдження насіння вид є анемобалістом – насіння в осінньо-зимовий період під впливом вітру розкидається на невелику відстань завдяки коливанням пагонів або ж висипається безпосередньо біля материнської особини, скочується по схилу. За репродуктивну фазу розвитку кожна рослина, за рахунок насінневого відновлення, в умовах відвалу може колонізувати територію в радіусі 1–5 м. Значно менше в стихійному розповсюдженні насіння беруть участь тварини, птахи, люди, техніка. Крім того, *H. officinalis* як напівчагарничок без спеціалізованих підземних пагонів є вегетативно малорухливим видом. Біологічні особливості виду обмежують його можливості щодо швидкої колонізації едафотопів на відвалах.

Популяція *H. officinalis* на відвалі складається з декількох, різних за площею локусів. Перший великий популяційний локус, де відбувалось найбільш раннє спонтанне розселення *H. officinalis*, знаходиться на верхній бермі відвалу, де переважають субстрати із суміші сланців і кварцитів із незначними домішками суглинку. У фітоценозах цього локусу спостерігається поява 15–25 трав'яних та деревних видів, а проективне покриття *H. officinalis* складає 15–35 %, сумарне проективне покриття інших видів рослин сягає 10–25 %. Серед них, за частотою трапляння: *Securigera varia*, *Seseli campestre* Besser, *Reseda lutea* L., відмічається поява (до 10–15 % проективного покриття) злаків: *Koeleria cristata* L., *Stipa lesingiana* Trin. et Rupr., *Stipa ucrainica* тощо. На характерній для цього локусу дослідній ділянці площею 100 м² налічується 364 генеративні особини *H. officinalis*, загальна кількість різновікових особин складає 16,3 на 1 м², вона є

найнижчою серед досліджуваних великих популяційних локусів. Так, зокрема, частка проростків складає всього $2,4 \pm 0,5$ на 1 м^2 , генеративних загалом – $4,3 \pm 0,3$, серед яких переважають середньо-зрілі – $1,9 \pm 0,2$ особини (табл. 1). Натомість, біометричні показники окремих рослин на цій ділянці сягають максимальних значень, що свідчить про кращі умови для їх росту

Найчисельніше *H. officinalis* представлений у другому популяційному локусі, де крім нього росте ще 16 видів рослин, з проективним покриттям кожного виду не більше 2 %. Найчастіше трапляються *Securigera varia*, *Seseli campestre*, *Chondrilla juncea* L., *Hieracium umbellatum* L., *Centaurea diffusa* Lam. На цій ділянці на 100 м^2 налічується 513 генеративних особин досліджуваного виду.

Таблиця 1.

Вікова структура *H. officinalis* в популяційних локусах на відвалі Рудоуправління Першотравневе м. Кривий Ріг

Номер популяційного локусу	Кількість рослин у віковій групі на 1 м^2 , шт.							Всього на 1 м^2 , шт.
	<i>p</i>	<i>j</i>	<i>v</i>	<i>g1</i>	<i>g2</i>	<i>g3</i>	<i>s</i>	
1	$2,4 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,7$	$15,5 \pm 1,6$	$1,0 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$24 \pm 1,4$
2	$3,4 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,7$	$31 \pm 3,2$	$1,3 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1$	$35,8 \pm 2$
3	$5,6 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,5$	$46,5 \pm 4,8$	$1,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$30 \pm 1,1$
$\text{HIP}_{0,05}$	2,0	2,1	12,0	0,7	0,7	0,9	0,7	5,3

У цьому локусі популяційна щільність досліджуваного виду найвища майже за всіма віковими групами, крім проростків та старих субсенільних рослин. Кількість ювенільних рослин складала $8,1 \pm 0,7$, віргінільних – $31 \pm 3,2$ та загалом генеративних – $5,7 \pm 0,3$ особини на 1 м^2 (див. табл. 1). Серед генеративних рослин здебільшого трапляються особини середнього генеративного віку (*g2*), які за габітусом та життєвим станом посідають друге місце (табл. 2).

Залежно від сукупності екологічних чинників у різних популяційних локусах рослини мають різний габітус, середню кількість пагонів на одній рослині, як загальну, так і генеративних зокрема, а також кількість квіток на них (табл. 2).

Таблиця 2.

Середні біометричні показники генеративних особин (*g1–g3*) в популяційних локусах *H. officinalis* на відвалі Першотравневого РУ

№ популяційного локусу	Біометричні показники рослин		Середня кількість пагонів на одній рослині, шт.		Кількість квіток на пагоні, шт.
	Висота куща, см	Діаметр куща, см	Загальна	Генеративних	
1	$60,2 \pm 1,7$	$61 \pm 2,6$	$71,2 \pm 2,3$	$46,5 \pm 2,8$	$181,6 \pm 9,1$
2	$54,1 \pm 2,3$	$54,2 \pm 1,8$	$85,6 \pm 4,5$	$45,2 \pm 3,6$	$160,2 \pm 9,8$
3	$49,7 \pm 1,8$	$36,8 \pm 1,3$	$41,3 \pm 2,7$	$29,8 \pm 2,5$	$181,3 \pm 9,5$
$\text{HIP}_{0,05}$	6,9	6,8	11,5	10,5	32,8

Третій локус формується на ділянці відвалу, де практично відсутній рослинний покрив. Фактично, це повночленна мініпопуляція, в якій наявні всі вікові групи рослин середньої життєвості, з сумарним проективним покриттям 20–35 %. Незважаючи на те, що за часом заселення цей локус є наймолодшим, кількість генеративних особин – $5,5 \pm 0,3$ близька до чисельності таких рослин в інших локусах. Більш екстремальні едафічні умови (про що свідчить кількість та стан найпоширеніших на відвалі інших видів, які ростуть і на цій ділянці) призводять до скорочення життєвого циклу рослин. Зокрема, старіючих особин найбільше саме в цьому локусі – $1,9 \pm 0,3$.

Серед виявлених тут 15 видів рослин поодинокі трапляються *Ambrosia artemisiifolia* L., *Crambe pontica* Steven ex Rupr., *Pisosella echioides* (Lumn.) F. Shultsz et Sch. Bip., інші види, здебільшого, представлені окремими особинами у вкрай пригніченому стані. У цьому локусі також відмічається спонтанна поява деревних видів – це молоді поодинокі особини *Pinus pallasiana*, які насіннєвим шляхом розселяються з навколишніх штучних насаджень, *Populus nigra* L., *Cerasus mahaleb*, *Ulmus pumila* L. – занесені з природи. Аналогічні ділянки на цьому ж відвалі без трансформуючого впливу *H. officinalis* залишаються не опанованими рослинами (сумарне проективне покриття не перевищує 1–3 %).

Три найбільші досліджені популяційні локуси *H. officinalis* на відвалі є повночленними з лівостороннім спектром. Такий розподіл особин за фазами онтогенезу свідчить про те, що на цій території вид досить активно розмножується насіннєвим шляхом. Однак, проростки і молоді рослини, які не сформували потужну кореневу систему, все ще залишаються недостатньо стійкими до різких кліматичних коливань. Рослини, які досягли генеративного віку, можуть перебувати в цьому стані тривалий час, іноді десятиліттями. У першому популяційному локусі, найстарішому за часом заселення, *H. officinalis* поступово починає витіснятися іншими видами, які формують угруповання, наближені за структурою до зональних.

Вид досягає максимальних біометричних характеристик у найстарішому популяційному локусі (№1), де середня висота генеративних особин становить понад 60 см та 70–80 см в діаметрі (див. табл. 2). Екземпляри, що ростуть у місцях із більш різномірним субстратом, або в пристінках схилів, де краще зберігається волога, сягають висоти 73 см, проте, трапляються тут зрідка. *H. officinalis* доводиться конкурувати за оселище з іншими видами рослин. Досить низька кількість генеративних пагонів у дорослих особин, що ростуть на третій ділянці, може бути пов'язана як з їх віком (пізнішим часом заселення), так і критичними едафічними умовами, що призводять до скорочення життєвого циклу.

Загалом, біометричні показники рослин популяції *H. officinalis* на залізородному відвалі, хоч і поступаються аналогічним у культурі цього виду при вирощуванні, наприклад, в умовах ботанічного саду Житомирського національного агроекологічного університету із застосуванням усіх необхідних агротехнічних заходів (Котюк, 2015), проте, ця різниця є незначною з огляду на відмінні умови зростання. Так, середня висота рослин у культурі коливалась в межах 60–90 см, а діаметр кущів становив 100–150 см.

Важливим показником життєздатності популяції *H. officinalis* в умовах залізородного відвалу є її репродуктивна здатність. Період квітання виду тут досить тривалий – із середини червня до середини вересня. Кількість генеративних пагонів на одній рослині з першого локусу коливається в межах від 20 до 70 шт. Середня кількість квіток на пагоні в рослин різних локусів не особливо відрізнялась: №1 – 181,6±9,1; №2 – 160,2±9,8; №3 – 181,3±9,5.

У рослин на відвалі формується частіше по одній, рідше по дві насінини в чашечках нижньої та середньої частини суцвіття. У верхній частині суцвіття, якщо насіння й зав'язується, проте до закінчення вегетаційного періоду повністю сформуватись і визріти не встигає. Мінімальна середня кількість виповнених насінин на одному пагоні – 51 шт. (локус 2), максимальна – 128 (локус 1), середнє значення на всіх ділянках становило 93,1±16,6. Кількість насінин, що зав'язується на одному пагоні *H. officinalis* в умовах залізородних відвалів, є величиною, малозалежною від комплексу едафічних умов. Це дозволяє рослині, що зазнає екстремального впливу середовища, економити життєві ресурси, максимально вкладаючись у насіннєве самовідновлення.

Середня кількість квіток на один пагін – 163,2 шт., тобто майже 60 % квіток зав'язує по одній насінині. Розрахункова врожайність *H. officinalis* в умовах відвалу – до 4000 насінин на 1 м². У досліджуваній популяції маса 1000 насінин становить 0,8 г, яка дещо менша, порівняно з літературними даними. Так, зокрема для культиварів з Передгір'я Криму, цей показник становить 0,93 г, або 0,89–0,90 г в умовах північно-західної Росії (Воронина і др., 2001; Шибко, 2011).

Масове квітання рослин, досить висока насіннєва продуктивність, незначний розмір насіння – є ключовими елементами життєздатності виду, що дозволяють йому опановувати ці вкрай екстремальні техногенні екотопи. Виражена топоспорія *H. officinalis*, тобто розподіл і акумуляція насіння в безпосередній близькості від материнських особин (Малиновский і др., 1988), зменшує інтенсивність розповсюдження виду на відвалі. Існуюча щільність популяції *H. officinalis* на відвалі достатня для перешкоджання видуванню пилу та водній ерозії і є джерелом гумусонакопичення, а, отже, створює передумови для підселення більш вибагливих до едафічних

умов видів. Життєвість рослин кожного популяційного локусу за 11 показниками, які досліджувались, свідчить, що вона висока і не має суттєвих відмінностей.

Таким чином, на залізорудному відвалі впродовж більше 30 років відбувається формування популяції *H. officinalis* на територіях, недоступних для масового поселення інших видів. Завдяки довготривалим процесам фізико-хімічного вивітрювання поверхневого шару породи відвалів, за участю піонерного виду *H. officinalis* формуються більш сприятливі едафічні умови для проникнення видів місцевої флори. У наступні періоди розвитку фітоценозу цей інтродуцент вже не витримує конкуренції з місцевими видами і поступово витісняється з нього. На таких ділянках із часом наступають сукцесійні стадії формування стабільних степових фітоценозів. Факт щорічного насінневого відновлення *H. officinalis* на відвалі та довготривале життя генеративних особин свідчать, що, незважаючи на ізоляцію, локальна популяція зберігає свою життєздатність і саморозвивається.

Обговорення

У світовій науковій літературі багато публікацій стосовно впливу різних чинників антропогенного походження на популяції рослин і, навпаки, мало робіт, пов'язаних з формуванням і самопідтриманням популяцій на техногенно порушених ландшафтах. На непорушених природних територіях процеси відновлення популяцій дещо відрізняються від порушених, які підпадають під різний за походженням і інтенсивністю вплив антропогенних чинників.

Стабільність і стійкість популяцій забезпечується за рахунок самовідновлення та самопідтримання. Здатність до збереження функціональної цілісності в конкретних умовах існування – обов'язкова умова самовідновлення популяції. Оскільки еколого-едафічні умови зростання рослин на залізорудних відвалах екстремальні, то для багаторічних рослин, популяції яких тут формуються, важливою є здатність до самовідтворення або зберігання своїх демографічних властивостей. Популяція *H. officinalis* на залізорудному відвалі стабільно самовідновлюється близько 30 років. Однак, цей термін не зовсім адекватний для популяцій рослин на промислових відвалах, де природна флора від самого початку їх утворення була відсутня. Правильно буде розглядати формування і саморозвиток популяцій в цих нових екстремальних еколого-едафічних умовах, штучно створених людиною, де рослинний покрив був взагалі відсутній.

Колонізація *H. officinalis* ділянок відвалу з голою породою, де взагалі немає рослинності, свідчить, що цей вид має еволюційно вироблений механізм стійкості до екстремальних еколого-едафічних факторів, які не мають такого рівня у багатьох інших видів. Тобто умови існування на відвалі не є критичними для цього виду, а тому його популяція може існувати протягом тривалого часу зі зміною кількох поколінь. Процеси самовідновлення й самопідтримання популяції *H. officinalis* забезпечуються здатністю генеративних рослин утворювати життєздатне насіння з досить високою його врожайністю у конкретних особин. *H. officinalis* утворює більш-менш суцільне фітогенне поле у другому і третьому локусах, а в найстарішому відбувається активна експансія інших видів на ці території й витіснення первинного. Очевидно, що це вже дія внутрішніх факторів рослинного фітоценозу, а точніше сукцесійні процеси. Невисокі темпи колонізації нових відвальних територій пов'язані з біологічними особливостями виду – низькою спроможністю до поширення насіння на значну відстань. Розробка способів посіву насіння *H. officinalis* на залізорудних відвалах – реально можливий шлях для використання цього виду в біологічній рекультивативній без будь-якої попередньої технічної трансформації їх поверхні та покриття ґрунтом. Незважаючи на вкрай несприятливі умови зростання, популяція *H. officinalis* відзначається досить високою життєвістю навіть на тих ділянках відвалу, де крім цього виду інші квіткові рослини відсутні. Тому, цілком можна стверджувати, що цей вид середземноморського походження фактично натуралізувався в специфічних умовах промислового відвалу Криворіжжя.

Висновки

Штучний висів насіння *H. officinalis* на залізорудному відвалі призвів за 30 років до росту й розвитку рослин генеративного віку з наступним насінневим відновленням і з часом – до формування стійкої, повночленної популяції на площі, що утричі більша порівняно з вихідною.

Життєздатність популяції *H. officinalis* забезпечується високим щорічним стабільним насінневим поповненням, однак, через специфіку розповсюдження насіння – з помірною експансією

на нові території відвалу. Вид є піонерним, проникає на території, де відсутня рослинність, хоча з часом легко витісняється місцевими видами у випадках створення для їх розвитку сприятливих едафічних умов. Інтродуцент не є агресивним, не становить інвазійної загрози для природних екосистем, прилеглих до відвалу територій.

H. officinalis в умовах відвалів проявляє більшу толерантність, ніж багато інших видів зональної природної рослинності, зокрема до трюфності субстрату, його зволоження, сольового режиму. За габітусом та іншими біометричними показниками рослини *H. officinalis* навіть в найекстремальніших умовах відвалу лише помірно поступається культиварам, які вирощуються в сприятливіших для його розвитку кліматичних та едафічних умовах. Тривале зростання цього виду на території відвалу, де інші види практично відсутні, сприяє трансформації поверхневого шару породи та накопиченню поживних речовин, що створює умови для заселення їх типовими зональними видами.

Список літератури / References

- Афанасьев Д.Я., Білик Г.І., Брадїс Є.М., Гринь Ф.О. (1956). Класифікація рослинності Української РСР. *Український ботанічний журнал*, 13(4), 82–83. [Afanasyev D.Ya., Bilyk G.I., Bradis Ye.M., Gryn F.O. (1956). Classification of vegetation of the Ukrainian Soviet Socialist Republic. *Ukrainian Botanical Journal*, 13(4), 82–83.]
- Бойко А.В., Остапко В.М., Приходько С.А., Муленкова Е.Г. (2012). Флористические находки на Юго-Востоке Украины. *Промышленная ботаника*, 12, 107–110. [Boyko A.V., Ostapko V.M., Prikhodko S.A., Mulyenkova Ye.G. (2012). Floristic finds in South-East of Ukraine. *Industrial Botany*, 12, 107–110.]
- Воронина Е.П., Годунов Ю.Н., Годунова Е.О. (2001). Новые ароматические растения для Нечорноземья. М.: Наука. 173 с. [Voronina Ye.P., Godunov Yu.N., Godunova Ye.O. (2001). *New aromatic plants for Nechozemya*. Moscow: Nauka. 173 p.]
- Жиляев Г.Г. (2005). Жизнеспособность популяций растений. Львов, Вид.: ЛДПМ НАНУ. 304 с. [Zhilyaev G.G. *Viability of plant populations*. Lviv, Publishing House of LDPM NASU, 2005. 304 p.]
- Злобин Ю.А. (1989). Принципы и методы изучения ценоотических популяций растений. Казань: Изд-во Казанского государственного университета. 146 с. [Zlobin Yu.A. (1989). *Principles and methods of studying coenotic plant populations*. Kazan: Publishing House of Kazan State University. 146 p.]
- Коршиков І.І., Красноштан О.В. (2012). Жизнеспособность древесных растений на железорудных отвалах Криворожья. Донецьк: Цифрова типографія. 280 с. [Korshikov I.I., Krasnoshtan O.V. (2012). *Viability of woody plants on the Krivoy Rog iron dumps*. Donetsk: Digital Printing House. 280 p.]
- Котюк Л.А., Рахметов Д.Б. (2012). Інтродукція *Hyssopus officinalis* L. у ботанічному саду Житомирського національного агроєкологічного університету. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Сер.: Лісівництво та декоративне садівництво*, 171(1), 101–105. [Kotyuk L.A., Rakhmetov D.B. (2012). Introduction of *Hyssopus officinalis* L. in the botanical garden of Zhytomyr National Agroecological University. *Scientific Bulletin of the National University of bioresources and nature management of Ukraine. Ser.: Forestry and Ornamental Horticulture*, 171(1), 101–105.]
- Котюк Л.А. (2015). Онтоморфогенез *Hyssopus officinalis* L. за умов інтродукції в ботанічному саду ЖНАЕУ. *Modern Phytomorphology*, 7, 135–146. <https://doi.org/10.5281/zenodo.160381> [Kotyuk L.A. (2015). Ontomorphogenesis of *Hyssopus officinalis* L. in conditions of introduction in the botanical garden of ZNIAU. *Modern Phytomorphology*, 7, 135–146. <https://doi.org/10.5281/zenodo.160381>]
- Любищев А.А. (1986). Дисперсионный анализ в биологии. Москва: Изд-во Моск. ун-та. 199 с. [Lyubishchev A.A. (1986). *Variance Analysis in Biology*. Moscow: MGU. 199 p.]
- Мазур А.Ю., Кучеревський В.В., Шоль Г.Н. та ін. (2015). Біотехнологія рекультивації залізорудних відвалів шляхом створення стійких трав'янистих рослинних угруповань. *Наука та інновації*, 11(4), 41–52. <https://doi.org/10.15407/scin11.04.041> [Mazur A.Yu., Kucherevsky V.V., Shol G.N. et al. (2015). Biotechnology of recultivation in the iron-ore waste by creation of stable herbaceous plant communities. *Science and Innovation*, 11(4), 41–52. <https://doi.org/10.15407/scin11.04.041>]
- Малиновский К.А., Царик И.В., Жиляев Г.Г. (1988). О границах природных популяций растений. *Журнал общей биологии*, 49(1), 5–12. [Malinovsky K.A., Tsarik I.V., Zhilyaev G.G. (1988). About the boundaries of natural plant populations. *Journal of General Biology*, 49(1), 5–12.]

- Плугіна Т.В., Чайка В.Є., Чуприна Т.Т. (1981). Природне та штучне заростання відвалів Кривбасу. *Український ботанічний журнал*, 38(4), 76–77. [Plugina T.V., Chayka V.Ye., Chuprina T.T. (1981). Natural and artificial overgrown dumps of Kryvbas. *Ukrainian Botanical Journal*, 38(4), 76–77.]
- Полевая геоботаника (1976). / Под ред. Е.М.Лавренко. М.; Л.: Наука, 1976. Т.5. 320 с. / *Field Geobotany* (1976). / Ed. E.M.Lavrenko. Moscow, Leningrad: Nauka. Vol.5. 320 p.]
- Царик Й.В. (2007). Проблема життєздатності популяцій. *Біол. студії*, 1(1), 65–72. [Tsaryk J.V. (2007). The problem of viability of populations. *Biological Studios*, 1(1), 65–72.]
- Шибко А.Н. (2011). Биоморфологические особенности семян *Hyssopus officinalis* L. при возделывании в условиях Предгорного Крыма. *Ученые записки ТНУ им. В.И.Вернадского. Сер. Биология, химия*, 24/63(4), 371–377. [Shibko A.N. (2011). Biomorphological features of *Hyssopus officinalis* L. seeds cultivated in the conditions of Piedmont Crimea. *Scientific Notes of TNU of V.I.Vernadsky. Ser. Biology, Chemistry*, 24/63(4), 371–377.]

Formation and self-maintenance of the population *Hyssopus officinalis* L. in conditions of the iron ore dump of Kryvyi Rih area M.O. Baranets, I.I. Korshykov

We ascertained the features of formation of self-renewing and self-sustaining of the local population of the Mediterranean introducer *Hyssopus officinalis* L. in the extremal ecologic and edaphic conditions of an iron ore dump in Kryvyi Rih Area, seeds of which have been sown on the area of 1 ha about 30 years ago. It was found that the species, during this period after reaching the reproductive phase of development, has taken the area of the dump of about 3 ha and, in fact, it formed the isolated population. This species annually multiplied by seed, and spread on the areas of ore dump, where almost no vegetation cover, in fact, performing a pioneer function. At the site, where the initial sowing of *H. officinalis* seeds was carried out, the phytocoenosis forms now; this phytocoenosis, according to its floristic composition, approaches the natural steppe, but the introduced species are gradually ousted. In habitats occupied by the species due to its spontaneous distribution, successional processes are at an initial stage. Within some of the population loci of *H. officinalis*, we have found up to 513 adult individuals with the number of generative sprouts from 20 to 70 per a plant. Flowers are formed on these sprouts in average from 160.2 to 181.6. Average seed productivity is 60 % of theoretically possible rate, and the seeds from the parent species extend to a distance of 1–5 m. In a compact areas where *H. officinalis* grows, there are plants of all the age groups – from the seedlings to the subsenile. *H. officinalis* has naturalized in the dump conditions, and its local population is a resistant, full-grouped; it develops under the conditions where other species are not competitive. Generatively developed plants are higher than 90 cm and have good vital state. The species on the dump shows pioneering features; it is not aggressive and can be displaced by zonal vegetation; thus, it does not pose invasion risk. *H. officinalis* can be recommended for the revegetation of iron ore dumps, or their large decommissioned areas, without technical preconditioning, only by direct sowing of the seeds into the dump rocks, to promote its spread artificially.

Key words: *Hyssopus officinalis*, restoration, seed productivity, vital state, population structure, recultivation, iron ore dump of Kryvyi Rih area.

About the authors:

M.O. Baranets – Kryvyi Rih Botanical Garden of NAS of Ukraine, Marshak str., 50, Kryvyi Rih, Ukraine, 50089, kbsnau@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1720-4785>

I.I. Korshykov – Kryvyi Rih Botanical Garden of NAS of Ukraine, Marshak str., 50, Kryvyi Rih, Ukraine, 50089, ivivkor@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1471-398X>

Формирование и самоподдержание популяции *Hyssopus officinalis* L. в условиях железорудного отвала Криворожья Н.А. Баранец, И.И. Коршиков

Установлены особенности формирования самовосстановления и самоподдержания локальной популяции средиземноморского интродуцента *Hyssopus officinalis* L. в неблагоприятных эколого-эдафических условиях железорудного отвала Криворожья, семена которого были высеяны на площади 1 га более 30 лет назад. Исследована жизнеспособность *Hyssopus officinalis* L. Обнаружено, что вид, после достижения репродуктивной фазы развития, ежегодно размножался семенным путем, занял площадь отвала более 3 га и фактически сформировал на нем изолированную популяцию. Распространяется вид на тех участках отвала, где практически отсутствует растительный покров, выполняя, фактически, пионерную функцию. На участке, где был проведен первичный посев семян *H. officinalis*, сейчас происходит процесс формирования фитоценоза, который по флористическому составу приближается к естественным степным, но при этом

интродуцированный вид постепенно вытесняется. В спонтанно заселенных видов поселениях сукцессионные процессы находятся на начальной стадии. В пределах отдельных популяционных локусов *H. officinalis* на 100 м² встречается до 513 взрослых особей с количеством генеративных побегов от 20 до 70 шт. на растение. На этих побегах образуется в среднем от 160,2 до 181,6 цветков. Средняя семенная продуктивность составляет 60 % от потенциальной, а семена от материнской особи распространяются на расстояние 1–5 м. В компактных местах произрастания *H. officinalis* присутствуют растения всех возрастных групп – от проростков до субсенильных. *H. officinalis* натурализовался в условиях железорудного отвала, а его локальная популяция является устойчивой, полночленной, пополняется новыми особями ежегодно и распространяется на территории, где другие виды вообще не растут. Растения генеративного возраста (g2, g3) достаточно хорошо развиты, высотой более 90 см, а также имеют удовлетворительное жизненное состояние. Вид на отвале проявляет пионерные черты, не является агрессивным, может вытесняться зональной растительностью, не представляет инвазионной угрозы. *H. officinalis* можно рекомендовать для озеленения железорудных отвалов или их больших участков, которые выведены из эксплуатации, без технической предварительной подготовки прямым посевом семян в породу, то есть искусственно способствовать его распространению

Ключевые слова: *Hyssopus officinalis*, возобновление, семенная продуктивность, жизненное состояние, популяционная структура, рекультивация, железорудный отвал Криворожья.

Об авторах:

Н.А. Баранец – Криворожский ботанический сад НАН Украины, ул. Маршака, 50, Кривой Рог, Украина, 50089, kbsnanu@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1720-4785>

И.И. Коршиков – Криворожский ботанический сад НАН Украины, ул. Маршака, 50, Кривой Рог, Украина, 50089, ivivkor@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1471-398X>

Представлено: І.С.Косенко / Presented by: I.S.Kosenko

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 05.07.2019

... ГЕНЕТИКА ... GENETICS ...

УДК: 575.21:57.042

Анализ репродукции и преімагінальної смертності у *Drosophila melanogaster* при действии микроволнового излучения

О.В. Горенская, Д.В. Рыбак, Н.В. Рыбак, Г.Г. Горенский, Ю.Г. Шкорбатов

Новый вид антропогенного влияния – низкоинтенсивное электромагнитное излучение демонстрирует многообразие генетических эффектов. Особый интерес представляют вопросы формирования адаптивного ответа организмов при кратковременном воздействии крайневисокочастотного излучения в зависимости от генотипа особей. Целью данной работы был анализ плодовитости и преімагінальної смертності *Drosophila melanogaster* в зависимости от возраста родителей при действии микроволнового излучения. Использовали линии дрозофилы, несущие мутацию *white^{apicot}*, но различающиеся генетическим фоном, на котором находится эта мутация: $w^a(C-S)$, $w^a(Or)$ и w^a . В работе облучали виргинных имаго, параметры внешнего воздействия – мощность $W=10$ мкВт/см², частота $F=65$ ГГц, экспозиция $t=5$ минут. Анализировали стадии гибели эмбрионов, количество потомков имаго и гибель особей на стадии куколки. Результаты исследования показали, что действие электромагнитного облучения на виргинных имаго дрозофил с нарушенным метаболизмом триптофана модифицирует выживаемость потомства на преімагінальных этапах онтогенеза. В потомстве молодых особей (3–8-суточных имаго) снижается частота эмбриональной смертности в период 0–5,5 часов (начальные стадии дробления и образования бластодермы) и 5,5–17 часов (стадия гаструляции и сегментации эмбриона, гистогенез). Общее количество потомков имаго не отличается от контрольных значений, уровень смертности на стадии куколки также не меняется в потомстве молодых родителей после действия ЭМИ КВЧ. Увеличение возраста родительских пар, которые подверглись кратковременному воздействию ЭМИ КВЧ в первые сутки после выхода имаго (20–25 суток), приводит к снижению частоты эмбриональной смертности потомков в период от 17 до 22 часов эмбриогенеза (стадия органогенеза и выход личинки из хориона). Суммарная частота эмбриональной смертности определяется исключительно возрастом родителей. Сила влияния этого фактора для линий составляет, соответственно, $h^2_{w^a}=69,7\%$, $h^2_{w^a(C-S)}=52,2\%$ и $h^2_{w^a(Or)}=64,9\%$. Действие ЭМИ КВЧ влияет на частоту эмбриональной смертности только у линии $w^a(Or)$ ($h^2_{ЭМИ\ КВЧ}=18,3\%$). Внешнее воздействие не приводит к изменению количества потомков имаго у особей в возрасте 0–5 суток, а в потомстве 20–25-суточных особей у линии $w^a(C-S)$ показатель увеличился в 1,2 раза. Показано снижение количества погибших особей на стадии куколки в потомстве 20–25-суточных родителей после действия ЭМИ КВЧ в среднем в три раза.

Ключевые слова: КВЧ, дрозофила, преімагінальная смертность, количество потомков имаго, возраст имаго.

Об авторах:

О.В. Горенская – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, olgavg2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522>

Д.В. Рыбак – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, dasharyback@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7107-5937>

Н.В. Рыбак – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, liya.miller.31@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5088-6020>

Г.Г. Горенский – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, gorenskiyg@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0002-0035-2239>

Ю.Г. Шкорбатов – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, yuriy.shckorbatov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3315-0932>

Введение

В начале 20-го века появился новый тип антропогенного излучения – электромагнитное, используемое, в основном, для передачи информации (телевидение, мобильная связь, Wi-Fi и т.п.). Это излучение не может напрямую разрушать химические связи, как ионизирующее, но является, как показывают недавние исследования, причинами возникновения тяжелых иммунных заболеваний (Johansson, 2009), а также лейкемии у детей (Blackman et al., 2007). Говорить о безопасности даже низкоинтенсивного электромагнитного излучения уже нельзя. Поэтому очень актуальны на сегодня вопросы, касающиеся механизмов адаптации организмов к этому внешнему воздействию и особенностей проявлений пролонгированных эффектов. Не выясненными остаются

вопросы, связанные с формированием комплекса адаптивно важных признаков при действии нового стрессового фактора в зависимости от генотипа особей.

Адаптацию к условиям существования связывают, в первую очередь, со способностью особей оставить жизнеспособное потомство. Многочисленными исследованиями в экспериментах на дрозофиле показано, что действие микроволнового излучения приводит к изменению репродуктивной способности имаго, но полученные результаты существенно отличаются, в зависимости от диапазона длин волн, стадии онтогенеза дрозофилы, которая подвергалась внешнему воздействию, мощности и продолжительности облучения, а также других условий эксперимента. Так, в работе (Atli, Ünlü, 2007) у линии дикого типа *Oregon* показано снижение средней плодовитости и увеличение длительности предимагинального развития по сравнению с контролем при облучении самок с частотой 10 ГГц в течение четырёх и пяти часов. Частота рецессивных летальных мутаций у потомков мух после облучения не отличалась от контроля (Memmi, Ünlü, 2007). В нашей работе было показано увеличение плодовитости имаго дрозофилы с нарушенным синтезом бета-аланина, которые развивались из яиц, облученных микроволнами с частотой 37,7 ГГц и плотностью потока энергии 10 мкВт/см² и 100 мкВт/см² (Горенская и др., 2010). Кратковременное воздействие микроволнового излучения на виргинных имаго этих же линий увеличивает продолжительность предимагинального развития и снижает устойчивость имаго к голоданию (Горенская и др., 2016).

Анализ механизма действия электромагнитных полей показал множество генетических эффектов. Так, может нарушаться скорость репликации ДНК (Harvey, French, 2000); могут возникать изменения в конформации гетерохроматина в лимфоцитах здоровых людей (Markova et al., 2005). Показано ингибирование процессов репарации ДНК при действии микроволнового излучения на лимфоциты (Markova et al., 2005). В экспериментах на дрозофиле обнаружен эффект гормезиса по частоте доминантных летальных мутаций в первом поколении при действии плотности мощности 1 Вт/м² (Дика та ін., 2016). Установлено снижение уровня транскрипционной активности генов, который авторы оценивали по степени пуфирования политенных хромосом (Shakina et al., 2011). Использование в качестве источника облучения телевизионных станций и сетей Wi-Fi, даже при очень низких уровнях интенсивности, приводило к снижению плодовитости и индукции апоптоза клеток фолликулов дрозофилы (Margaritis et al., 2014; Sagioglou et al., 2016). Наиболее чувствительными к внешнему воздействию стадиями развития организма являются гаметогенез и эмбриогенез. Некоторые авторы (Margaritis et al., 2014) полагают, что оогенез дрозофилы можно использовать как биомаркёр при изучении биологического действия ЭМП.

Таким образом, работы многих авторов демонстрируют многообразие генетических эффектов низкоинтенсивного электромагнитного излучения, зачастую противоречивых, что недостаточно для понимания механизмов процесса. И особый интерес представляют вопросы формирования адаптивного ответа организмов при кратковременном воздействии крайневисокочастотного излучения (ЭМИ КВЧ) в зависимости от генотипа особей. Так, установлено участие метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана в ответах на стресс у дрозофилы (иммобилизационный стресс, тепловой шок) (Журавлев и др., 2020). Но открытым остается вопрос о механизмах приспособленности особей с нарушением метаболизма триптофана при действии микроволнового излучения.

Целью данной работы был анализ плодовитости и предимагинальной смертности особей *Drosophila melanogaster*, несущих мутацию *white^{apricot}*, в зависимости от возраста родителей при действии микроволнового излучения.

Объекты и методы исследования

В работе использовались линии *Drosophila melanogaster* Meig., несущие мутацию *white^{apricot}*. Линии отличались генетическим фоном, на котором находилась данная мутация: *w^a(C-S)*, *w^a(Or)* и *w^a*, соответственно, мутация *white^{apricot}* была перенесена на генетический фон линий дикого типа *Canton-S (C-S)* и *Oregon-R (Or)*. Мухи взяты из коллекции линий *Drosophila* кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина, которая является Национальным достоянием Украины.

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре 22°C. Виргинных имаго разделяли по полу и содержали отдельно на протяжении трёх и двадцати суток, пересаживая на новую среду каждые трое суток. Внешнему воздействию в опыте подвергались суточные имаго. Облучение проводили с использованием оборудования, входящего в состав вторичного военного

образца единиц мощности электромагнитных колебаний в волноводных трактах в диапазоне частот 37,5–78,33 ГГц (ВВЕТУ 09-04-01-08). Эталон находится в метрологическом центре военных стандартов Вооруженных Сил Украины. Облучение суточных виргинных имаго проводилось в пробирках с временной средой через вату. Определялся коэффициент поглощения ваты, значение мощности облучения устанавливалось с учетом этого значения. Параметры итогового влияния – мощность $W=10$ мкВт/см², частота $F=65$ ГГц, экспозиция $t=5$ минут.

В работе анализировали выживаемость особей на разных этапах онтогенеза при действии микроволнового излучения в зависимости от возраста родителей. Для определения частоты эмбриональной смертности (ЭС) получали синхронизированные кладки от 3- и 20-суточных самок в чашках Петри с временной средой. Для оценки изменений, возникающих в гаметах имаго, анализировали неразвившиеся яйца по методу (Hill, 1945). Учитывали эмбрионов *D. melanogaster*, остановившихся в развитии 0–5,5 часов (стадия I – начальные стадии дробления и образования бластодермы), 5,5–17 часов (стадия II – стадия гастрюляции и сегментации эмбриона, гистогенез) и 17–22 часов (стадия III – стадия органогенеза и выход личинки из хориона). Всего в эксперименте было проанализированы яйцекладки от 700 самок дрозофил (контроль) и около 800 самок в опытной группе.

Для анализа репродукции определяли количество потомков имаго от двух пар родительских особей в возрасте 3–8 суток и 20–25 суток. Параллельно учитывали количество особей, погибших на стадии куколки. Проанализировано потомство от около 250 пар родительских особей.

Для каждого варианта эксперимента при изучении репродукции рассчитывали среднее арифметическое значение и ошибку среднего. Результаты анализа показателей гибели особей на стадии куколки и эмбриональной смертности представлены в виде долей со статистическими ошибками. Статистическую значимость отличий контрольных и опытных значений оценивали при помощи *F*-критерия. Для оценки силы влияния контролируемых в работе факторов на изучаемые показатели применяли дисперсионный анализ качественных признаков, силу влияния факторов (h_x^2) оценивали по методу М.Снедекора (Атраментова, Утевська, 2007). Проверку нулевых гипотез проводили на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты работы по изучению суммарной частоты ЭС у линий дрозофилы, несущих мутацию w^a , в зависимости от влияния ЭМИ КВЧ и возраста родителей показаны на рис. 1.

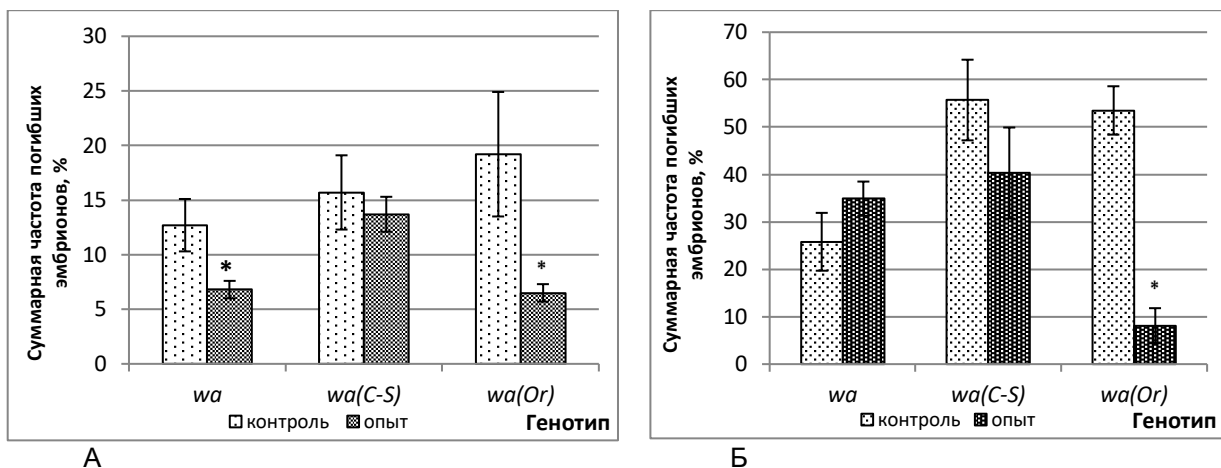


Рис. 1. Суммарная частота эмбриональной смертности у линий дрозофилы с нарушенным метаболизмом триптофана, в зависимости от действия ЭМИ КВЧ: А – потомство от 3-суточных имаго; Б – потомство от 20-суточных имаго

* – значимость отличий от контроля $p < 0,05$.

Результаты проведенной работы показали, что в контроле, с увеличением возраста родителей, частота эмбриональной смертности повышается в среднем в 2,5 раза у линий дрозофилы, которые использовались в эксперименте. Эта закономерность подтверждается и

данными литературы (Некрасова и др., 2000; Костенко и др., 2015). В нашей работе частота ЭС определяется возрастом родителей $F=29,2$ и генотипом $F=7,64$. Сила влияния факторов составляет соответственно $h^2_{возр.родит}=33,9\%$, $h^2_{генотип}=12,0\%$. Сочетанное действие факторов, которые контролировались в работе, – генотип и возраст родителей – не влияет на частоту ЭС.

Действие ЭМИ КВЧ сопровождается снижением частоты ЭС у 3-суточных имаго в 1,9 раз в линии w^a и в 2,9 раза в линии $w^a(Or)$. У линии $w^a(C-S)$ обнаружена только тенденция к снижению данного показателя у молодых родителей (рис. 1, А). С увеличением возраста родителей (рис. 1, Б) эта закономерность сохраняется у линии $w^a(Or)$, где частота ЭС уменьшилась практически в шесть раз. Показано, что частота ЭС (результаты двухфакторного дисперсионного анализа) определяется возрастом родителей. Сила влияния этого фактора для линий составляет, соответственно, $h^2_{w^a}=69,7\%$, $h^2_{w^a(C-S)}=52,2\%$ и $h^2_{w^a(Or)}=64,9\%$. Действие ЭМИ КВЧ влияет на частоту ЭС только у линии $w^a(Or)$ ($h^2_{ЭМИ\ КВЧ}=18,3\%$). Сочетанное действие факторов, которые контролировались в работе, – внешнее воздействие и возраст родителей – не влияет на частоту эмбриональной смертности.

Результаты анализа стадий развития эмбрионов дрозофилы, на которых произошла остановка развития, в потомстве 3-суточных родителей при действии микроволнового излучения показан на рис. 2.

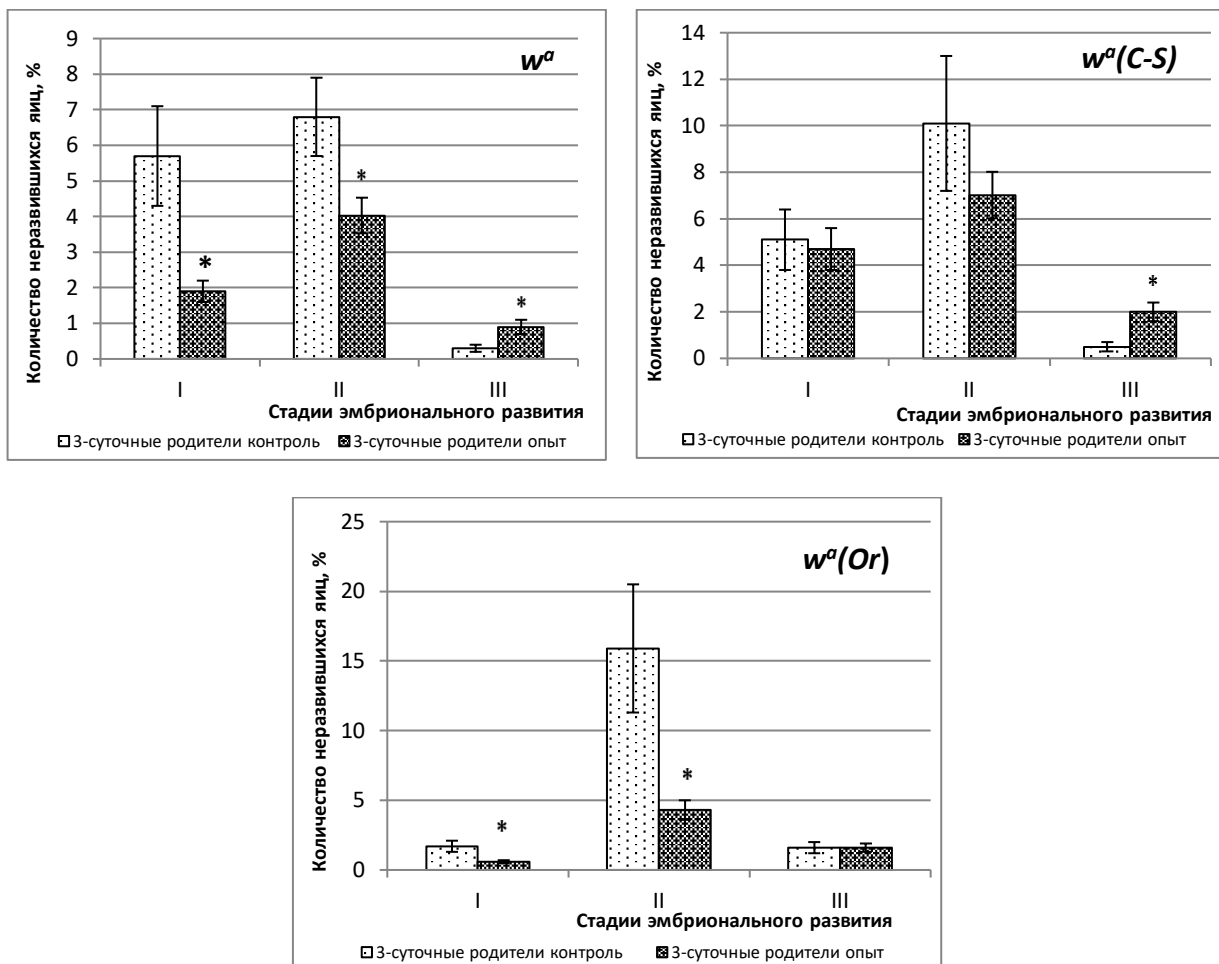


Рис. 2. Эмбриональная гибель потомства у 3-суточных имаго дрозофилы с нарушенным метаболизмом триптофана при действии ЭМИ КВЧ. I – начальные стадии дробления и образования бластодермы, II – стадия гастрюляции и сегментации эмбриона, III – стадия органогенеза.

* – значимость отличий от контроля $p < 0,05$.

Результати експериментів показали, що в потомстві молодих родителів (трёхсуточних имаго) в лініях w^a і $w^a(Or)$ після зовнішнього впливу зменшується кількість ембріонів, погивших на ранніх стадіях розвитку (в віці 0–17 годин розвитку), і збільшується кількість ембріонів, погивших на пізніх стадіях розвитку (17–22 год) (лінії w^a і $w^a(C-S)$). Так, для лінії w^a зменшення сумарної частоти ЕС визначається зменшенням смертності на 66,7 % і 40,7 % для стадій I і II відповідно і збільшенням смертності в 3 рази на стадії III після дії ЕМІ КВЧ. У лінії $w^a(Or)$ зменшення сумарної частоти ЕС визначається зменшенням кількості погивших ембріонів на 64,7 % і 72,9 % на стадіях I і II відповідно після дії ЕМІ КВЧ.

Результати аналізу ембріональної смертності в потомстві 20-суточних имаго дрозофіли після дії мікрохвильового випромінювання показані на рис. 3.

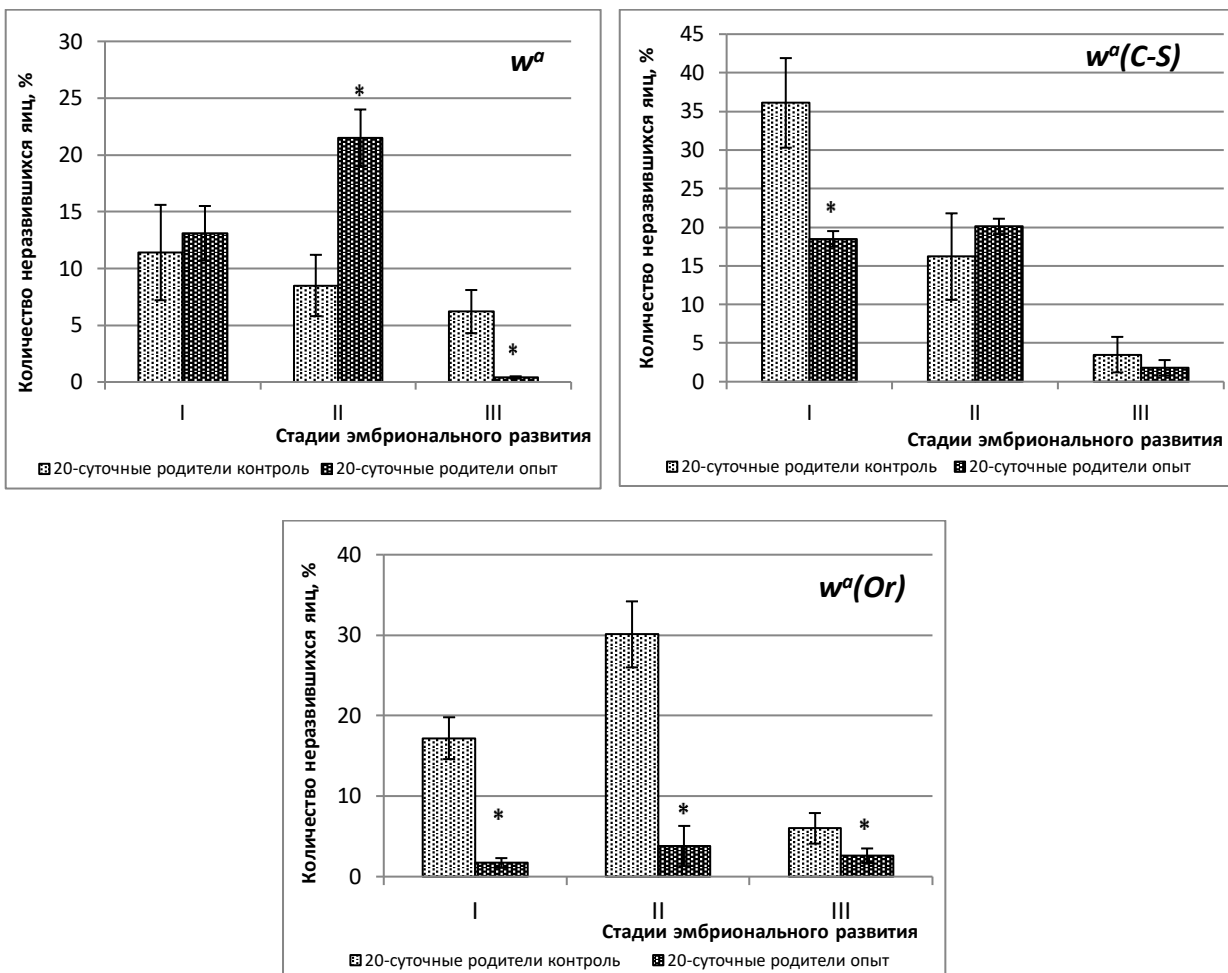


Рис. 3. Ембріональна гибель потомства у 20-суточних имаго дрозофіли с нарушенным метаболизмом триптофана при действии ЭМИ КВЧ. I – начальные стадии дробления и образования бластодермы, II – стадия гаструляции и сегментации эмбриона, III – стадия органогенеза.

* – значимость отличий от контроля $p < 0,05$.

Увеличение частоты ЕС с возрастом родителей, которое показано на рис. 1, происходит за счет возрастания количества остановившихся в развитии эмбрионов на всех этапах онтогенеза. При этом на стадии III (17–22 часа развития) эмбриональная смертность возрастает в среднем в 10,4 раза. На более ранних стадиях наиболее выражены изменения у линий с замещенным генотипом. Количество эмбрионов, погивших в течение первых пяти с половиной часов развития, повысилась

в 7,1 и 10,1 раз (соответственно для линий $w^a(C-S)$ и $w^a(Or)$), количество эмбрионов, которые остановились в развитии в последующие 5,5–17 часов развития, – в 1,6 и 1,9 раза (соответственно для линий $w^a(C-S)$ и $w^a(Or)$).

В потомстве 20-суточных имаго дрозофилы после внешнего воздействия снижается количество погибших эмбрионов на поздних стадиях развития (в возрасте 17–22 часов) примерно в 2 раза в линии $w^a(Or)$ и в 14 раз в линии w^a . Что касается ранних стадий эмбриогенеза, то изменения их вклада в общую эмбриональную смертность после воздействия ЭМИ КВЧ разнонаправленные, в зависимости от генотипа особей.

Результаты эксперимента показали, что количество потомков имаго от 3–8-суточных мух не изменяется после воздействия ЭМИ КВЧ на родительских особей (рис. 4, А).

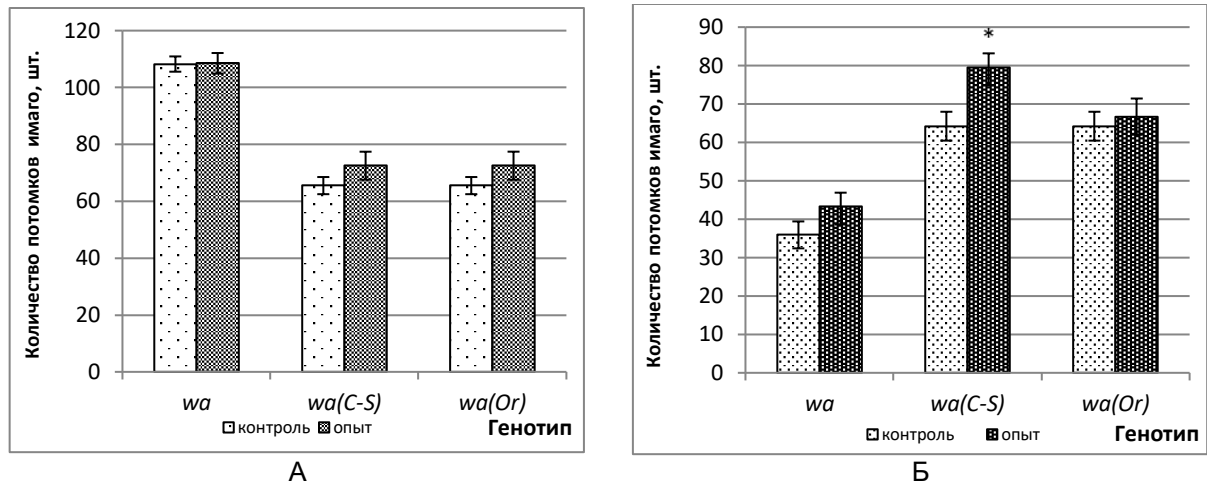


Рис. 4. Количество имаго от 3–8-суточных (А) и 20–25-суточных (Б) особей дрозофилы при действии ЭМИ КВЧ

* – значимость отличий от контроля $p < 0,05$.

Для имаго линии $w^a(C-S)$ в возрасте 20–25 суток количество имаго в потомстве повышается при действии ЭМИ КВЧ на виргинных особей приблизительно в 1,2 раза (рис. 4, Б). На этот показатель влияет генотип ($F=39,6$) и возраст родительских особей ($F=26,5$).

Количество особей, погибших на стадии куколки, не изменяется по сравнению с контролем в потомстве имаго в возрасте 3–8 суток после действия облучения на виргинных мух (рис. 5, А).

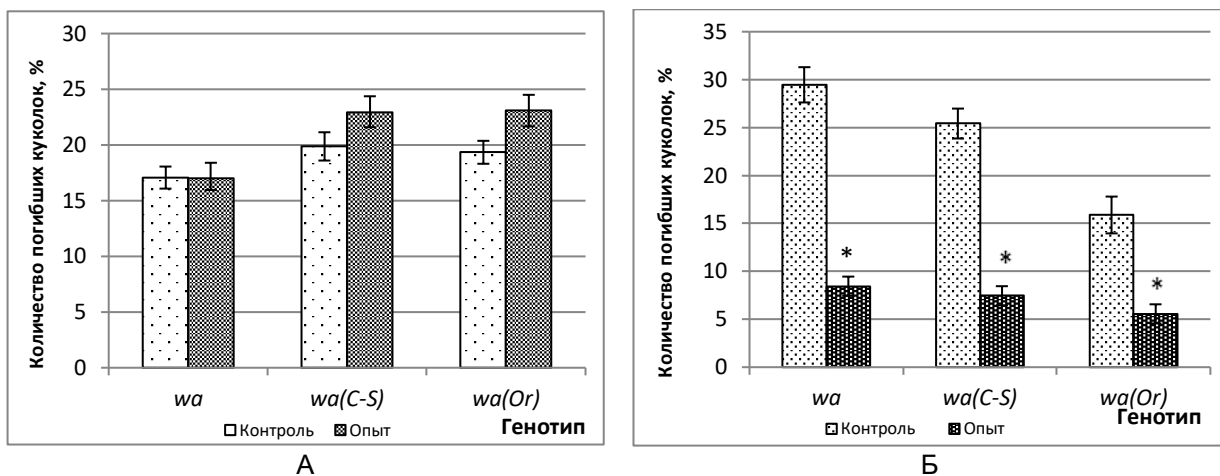


Рис. 5. Количество погибших куколок в потомстве 3–8-суточных (А) и 20–25-суточных (Б) имаго дрозофилы при действии ЭМИ КВЧ

* – значимость отличий от контроля $p < 0,05$.

Однако в потомстве особей в возрасте 20–25 суток после действия ЭМИ КВЧ наблюдается протекторный эффект – количество особей, погибших на стадии куколки, снижается приблизительно в три раза у всех линий, которые использовались в работе (рис. 5, Б).

Таким образом, действие электромагнитного облучения на виргинных имаго дрозофил с нарушенным метаболизмом триптофана модифицирует выживаемость потомства на предимагинальных стадиях онтогенеза. В потомстве молодых особей (возраст имаго 3–8 суток) снижается частота эмбриональной смертности в период 0–5,5 часов (начальные стадии дробления и образования бластодермы) и 5,5–17 часов (стадия гастрюляции и сегментации эмбриона, гистогенез) эмбриогенеза. При этом общее количество потомков имаго не отличается от контрольных значений, уровень смертности на стадии куколки также не меняется.

Увеличение возраста родительских пар, которые подверглись кратковременному воздействию ЭМИ КВЧ в первые сутки выхода имаго, до 20–25 суток приводит к снижению частоты эмбриональной смертности потомков в период от 17 до 22 часов эмбриогенеза (стадия органогенеза и выход личинки из хориона). Количество потомков имаго не изменяется у особей в возрасте 0–5 суток, подвергшихся воздействию; в потомстве особей в возрасте 20–25 суток у линии $w^a(C-S)$ показатель увеличился в 1,2 раза. Показано снижение количества погибших особей на стадии куколки в потомстве 20–25-суточных родителей после действия ЭМИ КВЧ в среднем в три раза.

Гаметогенез и эмбриогенез являются самыми чувствительными к внешнему воздействию стадиями развития организма. Стрессовые факторы различной природы могут вызвать изменения в гаметях или нарушать процесс гаметогенеза. При этом эффект от действия внешних факторов определяется стадией развития половых клеток, которые подверглись воздействию. Так, хорошо известно, что у млекопитающих ранние эмбриональные стадии развития более чувствительны к ионизирующей радиации, чем последующие (Panagopoulos, 2012). Аналогично оогонии и сперматогонии более чувствительны к ионизирующему излучению, чем ооциты и зрелые сперматозоиды на поздних стадиях гаметогенеза. Показано, что повреждение половых клеток-предшественников может привести к стерильности животного. Таким образом, репродуктивные клетки, из которых будет развиваться будущий организм, более чувствительны к внешним воздействиям, чем другие типы клеток. Это связано, как предполагается, с тем, что репродуктивные клетки претерпевают множественные биологические процессы, такие как митотические и мейотические деления, синтезируют все виды биомолекул и т.д. Соответственно, внешнее воздействие может изменить репродуктивную способность организмов, если оно нарушает (или модифицирует) протекание гаметогенеза.

Известно, что с возрастом снижается общая устойчивость организмов к действию как физических, так и химических факторов внешней среды. В экспериментах на дрозофиле показано, что с увеличением возраста родителей повышается частота доминантных летальных мутаций (Некрасова и др., 2000; Костенко и др., 2015). Но с возрастом у организмов развивается и способность противостоять факторам внешней среды. В основе этого процесса лежит процесс, который позволяет сделать выбор альтернативных путей метаболизма. Один из механизмов старения у дрозофилы, как и других существ, например млекопитающих, базируется на процессах, которые приводят к регуляторным эпигенетическим изменениям, влияющим на экспрессию генов (повреждение промоторов генов, деметилирование ДНК и гистонов, компенсаторный ферментативный стресс-ответ). В целом эти эпигенетические процессы предшествуют возрастным проявлениям, связанным с нарушениями функций организма (Adler et al., 2013; Averous et al., 2003). В нашей работе показано стимулирующее действие ЭМИ КВЧ, которое выражается в снижении эмбриональной смертности у дрозофилы. Эффект выражен сильнее в потомстве молодых родителей. Как показано в работе (Дика та ін., 2016), влияние микроволнового излучения на самцов имаго с частотой 36,64 ГГц и плотностью мощности 0,01; 0,1 и 1 Вт/м² оставляет яйцепродукцию самок на уровне контроля. В работах (Panagopoulos, Margaritis, 2003; Panagopoulos et al., 2004) показано, что у самок *Drosophila melanogaster*, которых подвергали воздействию электромагнитного поля с частотой 50 Гц на протяжении нескольких часов в периоды раннего и среднего гаметогенеза, происходит элиминация большинства половых клеток и, как следствие, снижается плодовитость имаго.

Снижение репродуктивной способности – один из фенотипов старения. У дрозофилы в одном из экспериментов по изучению возрастной динамики транскрипционной активности выявлено 43 гена, активность которых с возрастом увеличивается, и 89 генов, экспрессия которых снижается. Показано снижение с возрастом уровня РНК нескольких генов репродукции, среди которых 2 гена

акцессорных белков семейства Аср. Белки Аср самца облегчают сохранение спермы в семяприемниках самки и стимулируют отложение яиц, уменьшая продолжительность ее жизни. С увеличением возраста имаго дрозофил снижается экспрессия так называемых генов гаметогебеза, например, показано снижение количества белка из семейства септин, который участвует в сперматогенезе. Эти изменения могут способствовать эмбриональной гибели, а также уменьшать количество жизнеспособных личинок и куколок в постэмбриональном периоде (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001; Vermeulen, Loeschke, 2007). Экспериментально показано, что облучение яиц, личинок и куколок по одному часу в течение 10 дней приводит к активации генов теплового шока, как неспецифического ответа на стрессовый фактор. При этом, как оказалась, клетки проявляют большую чувствительность к ЭМИ КВЧ, чем к тепловому воздействию (Weisbrot et al., 2003). Можно предположить, что белки теплового шока, которые синтезируются в ответ на внешнее воздействие, также могут обуславливать проявление полученных эффектов.

Все линии, использованные в работе, несли мутацию w^a , которая возникла в результате встраивания мобильного элемента *copia* (подкласс LTR-ретротранспозоны) в локус гена *white* . Эта вставка приводит к нарушению функции гена. Ген *white* ⁺ кодирует трансмембранный АВС-транспортёр, который осуществляет захват и перенос гуанина и триптофана. Поскольку гуанин требуется для синтеза дофамина и серотонина, а триптофан является предшественником серотонина, у мутантов изменены уровни и распределение этих нейромедиаторов. Кинуренины обладают широким спектром нейротропных эффектов у позвоночных и беспозвоночных животных (Журавлев и др., 2020). У линий дрозофилы с мутациями, нарушающими кинурениновый путь обмена триптофана, наблюдается ряд физиологических и поведенческих изменений. В целом, метаболиты кинуренинового пути обмена триптофана оказывают активирующее действие на ЦНС и поведенческие процессы (Журавлев и др., 2020).

Ранее нами было показано, что у линий дрозофилы с разным аллельным состоянием локуса *white* количество потомков на стадии куколки и имаго возрастает по сравнению с линией дикого типа в среднем на 30 %, увеличивается длительность предимагинального развития, снижается устойчивость к голоданию (Горенская и др., 2015). Средняя продолжительность жизни самок дрозофилы с мутантными аллелями гена *white* не отличается от самок линии дикого типа, у самцов линий $w(C-S)$ и $w^a(C-S)$ показатель увеличивается (Горенская, Навроцкая, 2019). Суммарная частота доминантных летальных мутаций у линий с разным аллельным состоянием локуса *white* не отличается от значений у линии дикого типа (Горенская и др., 2015).

Установлено также участие метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана в ответах на стресс у дрозофилы (иммобилизационный стресс, тепловой шок) (Журавлев и др., 2020). Очевидно, механизм процесса связан с нарушением уровня и распределения серотонина и дофамина – гормонов, участвующих в стресс-реакции дрозофилы, у мутантных особей. Полученные в работе эффекты от действия ЭМИ НВЧ определяются, в том числе, и особенностями метаболизма у линий дрозофилы, несущих мутацию w^a .

Таким образом, в работе показано, что кратковременное действие электромагнитного излучения КВЧ диапазона на виргинных имаго линий дрозофилы, несущих мутацию w^a , модифицирует репродукцию и предимагинальную смертность особей, вызывая снижение частоты эмбриональной смертности и уменьшая количество особей, погибших на стадии куколки. Количество потомков имаго после облучения родителей, как правило, не отличается от контрольных значений, а в потомстве особей линии $w^a(C-S)$ в возрасте 20–25 суток возрастает. Сила выраженности эффекта микроволнового облучения зависит от возраста родительских особей и генетического фона линий *Drosophila melanogaster* , несущих мутацию w^a .

Список литературы / References

- Атраментова Л.О., Утевська О.М. (2007). Статистичні методи в біології. Х.: ХНУ імені В.Н.Каразіна. 288 с. [Atramentova L.O., Utevska O.M. (2007). *Statistical methods in biology*. Kharkiv: V.N.Karazin KhNU. 288 p.]
- Горенская О.В., Гаврилов А.Б., Шкорбатов Ю.Г., Катрич В.А. (2010). Влияние генотипа на приспособленность дрозофилы при воздействии малых доз сверхвысокочастотного электромагнитного излучения. *Вісник проблем біології і медицини*, 1, 52–56. [Gorenskaya O.V., Gavrilov A.B., Shkorbatov Yu.G., Katrich V.A. (2010). Influence of genotype on viability of *drosophila* under small doses of microwave radiation. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*, 1, 52–56.]

- Горенская О.В., Костенко В.В., Воробьева Л.И., Таглина О.В. (2015). Влияние аллельного состояния локуса *white* на некоторые показатели приспособленности у *Drosophila melanogaster*. *Вісник проблем біології і медицини*, 1, 74–79. [Gorenskaya O.V., Kostenko V.V., Vorobyova L.I., Taglina O.V. (2015). The influence of allelic state of locus *white* on some parameters of fitness in *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*, 1, 74–79.]
- Горенская О.В., Навроцкая В.В. (2019). Анализ роли триптофан-кинуренинового метаболизма в контроле длительности жизни *Drosophila melanogaster*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 25, 32–38. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1135> [Gorenskaya O.V., Navrotskaya V.V. (2019). Analysis of the role of tryptophan-kynurenine pathway in the life span control in *Drosophila melanogaster*. *Factors of Experimental Evolution of Organisms*, 25, 32–38. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1135>]
- Горенская О.В., Шкорбатов Ю.Г., Гаврилов А.Б. (2016). Особенности адаптивного ответа на кратковременное воздействие крайневых частотного облучения линий *Drosophila melanogaster*, несущих мутацию *black*. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*, 26, 108–116. [Gorenskaya O.V., Shkorbatov Y.G., Gavrilo A.B. (2016). Features of the adaptive response to the short-term influence of microwave radiation in *Drosophila melanogaster* stocks with *black* mutation. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 26, 108–116.]
- Дика Л.Д., Страшнюк В.Ю., Шкорбатов Ю.Г. (2016). Компоненти пристосованості у *Drosophila melanogaster* за впливу мікрохвильового опроміювання. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*, 26, 65–73. [Dyka L.D., Strashnyuk V.Yu., Shkorbatov Yu.G. Fitness components in *Drosophila melanogaster* after the exposure to microwave radiation. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 26, 65–73.]
- Журавлев А.В., Никитина Е.А., Савватеева-Попова Е.В. (2020). Роль кинуренинов в регуляции поведения и процессов памяти у дрозофилы. *Интегративная физиология*, 1(1), 40–50. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-40-50> [Zhuravlev A.V., Nikitina E.A., Savvateeva-Popova E.V. (2020). Role of kynurenines in regulation of behavior and memory processes in *Drosophila*. *Integrative Physiology*, 1(1), 40–50. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-40-50>]
- Костенко В.В., Колот Н.В., Воробьева Л.И. (2015). Изучение стадий эмбриональной гибели *Drosophila melanogaster* в зависимости от возраста и голодания имаго. *Онтогенез*, 46(6), 1–9. <https://doi.org/10.1134/S1062360415060065> [Kostenko V.V., Kolot N.V., Vorobyova L.I. (2015). Research of embryonic mortality stages of *Drosophila melanogaster* depending on age and starvation of an imago. *Russ. J. Dev. Biol.*, 46, 381–388. <https://doi.org/10.1134/S1062360415060065>]
- Некрасова А.В., Золотых И.В., Лаврик А.А. (2000). Генетический контроль спонтанного мутирования при старении у *Drosophila melanogaster*. *Известия Харьковского энтомологического общества*, VIII(1), 175–178. [Nekrasova A.V., Zolotykh I.V., Lavrik A.A. (2000). Genetic control of spontaneous mutation during aging in *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of the Kharkov Entomological Society*, VIII(1), 175–178.]
- Adler M.I., Cassidy E.J., Fricke C., Bonduriansky R. (2013). The lifespan-reproduction trade off under dietary restriction is sex-specific and context-dependent. *Exp. Gerontol.*, 48, 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.03.007>
- Atli E., Unlü H. (2007). The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the fecundity of *Drosophila melanogaster*. *Turk. J. Biol.*, 31, 1–5.
- Averous J., Bruhat A., Mordier S., Fafournoux P. (2003). Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression. *J. Nutr.*, 133(6), 2040S–2045S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.2040S>
- Blackman C.F., Blank M., Kundi M. et al. (2007). The bioinitiative report – a rationale for a biologically-based public exposure standard for electromagnetic fields (ELF and RF). <http://www.bioinitiative.org>
- Drummond-Barbosa D., Spradling A.C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.*, 231, 265–278. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0135>
- Harvey C., French P.W. (2000). Effects on protein kinase C and gene expression in a human mast cell line, HMC-1, following microwave exposure. *Cell. Biol. Int.*, 23, 739–748. <https://doi.org/10.1006/cbir.1999.0436>
- Hill D.L. (1945). Chemical removal of the chorion from *Drosophila* eggs. *Drosophila Information Service*, 19, 62.
- Johansson O. (2009). Disturbance of the immune system by electromagnetic fields – a potentially underlying cause for cellular damage and tissue repair reduction which could lead to disease and impairment. *Pathophysiology*, 16, 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.03.004>
- Margaritis L.H., Manta A.K., Kokkaliaris K.D. et al. (2014). *Drosophila* oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources. *Electromagn. Biol. Med.*, 33(3), 165–189. <https://doi.org/10.3109/15368378.2013.800102>

- Markova E., Hillert L., Malmgren L. et al. (2005). Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and gamma-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Environ. Health Perspect*, 113(9), 1172–1177. <https://doi.org/10.1289/ehp.7561>
- Memmi B.K., Ünlü H. (2007). The effects of short duration microwave exposure on the life span and the induction of sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 35(3), 173–179.
- Panagopoulos D.J. (2012). Gametogenesis, embryonic and post-embryonic development of *Drosophila melanogaster*, as a model system for the assessment of radiation and environmental genotoxicity / In: *Drosophila melanogaster: Life Cycle, Genetics*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 1–38.
- Panagopoulos D.J., Karabarounis A., Margaritis L.H. (2004). Effect of GSM 900-MHz mobile phone radiation on the reproductive capacity of *Drosophila melanogaster*. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 23(1), 29–43. <https://doi.org/10.1081/JBC-120039350>
- Panagopoulos D.J., Margaritis L.H. (2003). Effects of electromagnetic fields on the Reproductive Capacity of *Drosophila melanogaster* / In: P.Stavroulakis (Ed.), “*Biological Effects of Electromagnetic Fields*”. Springer, pp. 545–578.
- Sagioglou N.E., Manta A.K., Giannarakis I.K. et al. (2016). Apoptotic cell death during *Drosophila* oogenesis is differentially increased by electromagnetic radiation depending on modulation, intensity and duration of exposure. *Electromagn. Biol. Med.*, 35(1), 40–53. <https://doi.org/10.3109/15368378.2014.971959>
- Shakina L.A., Pasiuga V.N., Dumin O.M., Shkorbatov Y.G. (2011). Effects of microwaves on the puffing pattern of *D. melanogaster*. *Central European Journal of Biology*, 6(4), 524–530. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0032-x>
- Vermeulen C.J., Loeschcke V. (2007). Longevity and the stress response in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.*, 42(3), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.09.014>
- Weisbrot D., Lin H., Ye L. et al. (2003). Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biochem.*, 89(1), 48–55. <https://doi.org/10.1002/jcb.10480>

Аналіз репродукції та преімагінальної смертності у *Drosophila melanogaster* при дії мікрохвильового випромінювання

О.В. Горенська, Д.В. Рибак, Н.В. Рибак, Г.Г. Горенський, Ю.Г. Шкорбатов

Новий вид антропогенного впливу – низькоінтенсивне надвисокочастотне (НВЧ) електромагнітне випромінювання (ЕМВ) демонструє різноманіття генетичних ефектів. Особливий інтерес представляють питання формування адаптивної відповіді організмів в умовах короткочасного впливу НВЧ випромінювання в залежності від генотипу особин. Метою даної роботи був аналіз плодючості та преімагінальної загибелі особин *Drosophila melanogaster* в залежності від віку батьків при дії мікрохвильового випромінювання. Використовували лінії дрозофіли, що несуть мутацію *white^{apricot}*, але різняться генетичним фоном, на якому знаходиться ця мутація: $w^a(C-S)$, $w^a(Or)$ і w^a . В роботі опромінювали віргінних імаго, параметри зовнішнього впливу – потужність $W=10$ мкВт/см², частота $F=65$ ГГц, експозиція $t=5$ хвилин. Аналізували стадії загибелі ембріонів, загибель особин на стадії лялечки та кількість нащадків на стадії імаго. Результати дослідження показали, що дія електромагнітного опромінення на віргінних імаго дрозофіл з порушенням метаболізму триптофану модифікує виживання потомства на преімагінальних етапах онтогенезу. В потомстві молодих особин (3–8 добових імаго) знижується частота ембріональної загибелі в період 0–5,5 годин (початкові стадії дроблення і утворення бластодерми) і 5,5–17 годин (стадія гастрюляції і сегментації ембріона, гістогенез). Загальна кількість нащадків на стадії імаго не відрізняється від контрольних значень, рівень смертності на стадії лялечки також не змінюється в потомстві молодих батьків після дії ЕМВ НВЧ. Збільшення віку батьківських пар, які зазнали короткочасного впливу ЕМВ НВЧ в першу добу після виходу імаго, до 20–25 діб, призводить до зниження частоти ембріональної смертності нащадків в період від 17 до 22 годин ембріогенезу (стадія органогенезу і вихід личинки з хоріона). Сумарна частота ембріональної загибелі визначається віком батьків. Сила впливу цього фактора для ліній становить, відповідно, $h^2_{w^a}=69,7\%$, $h^2_{w^a(C-S)}=52,2\%$ і $h^2_{w^a(Or)}=64,9\%$. Дія ЕМВ НВЧ впливає на частоту ембріональної загибелі тільки у лінії $w^a(Or)$ ($h^2_{ЕМВ\ НВЧ}=18,3\%$). Зовнішній вплив не призводить до зміни кількості нащадків імаго у особин у віці 0–5 діб; в потомстві особин у віці 20–25 діб у лінії $w^a(C-S)$ показник збільшився в 1,2 рази. Показано зниження кількості загиблих особин на стадії лялечки в потомстві 20–25-добових батьків після дії ЕМВ НВЧ в середньому в три рази.

Ключові слова: НВЧ, дрозофіла, преімагінальна загибель, кількість нащадків імаго, вік імаго.

Про авторів:

О.В. Горенська – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, olgavg2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522>

Д.В. Рибак – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, dasharyback@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7107-5937>
 Н.В. Рибак – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, liya.miller.31@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5088-6020>
 Г.Г. Горенський – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, gorenskiyg@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0002-0035-2239>
 Ю.Г. Шкорбатов – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, yuriy.shckorbatov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3315-0932>

Analysis of *Drosophila melanogaster* reproduction and preadult mortality after the influence of microwave radiation

O.V. Gorenskaya, D.V. Rybak, N.V. Rybak, H.H. Horenskiy, **Yu.G. Shckorbatov**

A new type of anthropogenic impact – low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequencies (EHF EMR) demonstrates various genetic effects. The questions of the organism adaptive response formation to short-term exposure of EMR that depends on the individual's genotype are of particular interest. The objective of this study was to analyze the reproductive ability and preadult mortality in *Drosophila melanogaster* with *white^{ap¹icot}* mutation after the influence of microwave radiation. We used *D. melanogaster* stocks that carry *white^{ap¹icot}* mutation, but differ in the genetic background on which this mutation is located: *w^a(C-S)*, *w^a(Or)* and *w^a*. Virgin flies were irradiated. The parameters of the external influence were power flux density $W=10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, frequency $F=65 \text{ GHz}$, exposure time $t=5$ minutes. The stages of embryo death, number of adult offspring, and mortality rate at the pupal stage were analyzed. The results of the study showed that the effect of electromagnetic radiation on virgin imagoes of *Drosophila* with an impaired tryptophan metabolism modifies the survival rate of the offspring at the preimaginal stages of ontogenesis. In the offspring of young flies (at the age of 3–8 days) the frequency of embryonic mortality decreases during the 0–5.5 hours period (initial stages of cleavage and blastoderm formation) and 5.5–17 hours period (stage of gastrulation and embryo segmentation, histogenesis) of embryogenesis. The total number of offspring at the adult stage does not differ from the control values; the mortality rate at the pupal stage also does not change in the offspring of young parents after exposure to EMR. An increase in the age of parental couples that were exposed to short-term EMR on the first day after eclosion from pupae (20–25 days aged) leads to a decrease in the embryonic mortality rate of offspring during the 17–22 hours of embryogenesis (organogenesis stage and larval exit from chorion). The total embryonic mortality rate is determined solely by the age of the parents. The strength of this factor for the stocks is $h^2_{w^a}=69.7 \%$, $h^2_{w^a(C-S)}=52.2 \%$ and $h^2_{w^a(Or)}=64.9 \%$ respectively. The impact of EMR affects the embryonic mortality rate only for the *w^a(Or)* ($h^2_{EMR}=18.3 \%$). External exposure does not change the number of imago offspring in individuals aged 0–5 days; the number of adult offspring increased by 1,2 times in individuals aged 20–25 days in the stock *w^a(C-S)*. A decrease in the number of dead individuals at the pupal stage in the descendants of 20–25-day-old parents after exposure to EMR EHF on average by three times was shown.

Key words: EHF EMR, *drosophila*, preadult mortality, number of adult offspring, adult age.

About the authors:

O.V. Gorenskaya – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, olgavg2014@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0028-2522>
 D.V. Rybak – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, dasharyback@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7107-5937>
 N.V. Rybak – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, liya.miller.31@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5088-6020>
 H.H. Horenskiy – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, gorenskiyg@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0002-0035-2239>
 Yu.G. Shckorbatov – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, yuriy.shckorbatov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3315-0932>

Представлено: Т.О.Єлецька / Presented by: T.O.Yeletska

Рецензент: В.Ю.Страшнюк / Reviewer: V.Yu.Strashnyuk

Подано до редакції / Received: 10.04.2020

UDC: 575.17+61

Prognostic value of markers in associative genetics H. Ehyakonandeh, L.A. Atramentova

The article presents an algorithm for genetic-statistical analysis of a rare chronic disease with a hereditary predisposition. The results of genotyping obtained by one of the authors by the method of associative genetics were used. Multiple sclerosis is a disease with a hereditary predisposition. At present, the association of multiple sclerosis and a large number of genes has already been discovered, but the genetic control is not completely clear. An important step in combating the disease can be preventive measures among groups of people with hereditary predisposition. In this article, using the example of the *C677T* genetic polymorphism of the *MTHFR* gene, we show how to determine the effectiveness of identifying individuals at increased risk. Multiple sclerotic patients ($n=180$) and healthy ($n=231$) residents of southern Iran were examined by one of the authors previously. Based on these data, population-genetic indicators and statistical characteristics of the test were calculated. The distribution of genotypes in healthy people: *CC* – 65 %, *CT* – 29 %, *TT* – 6 %, in patients with multiple sclerosis *CC* – 35 %, *CT* – 46 %, *TT* – 19 %. The major allele in the population of southern Iran is *C* ($p_C = 0.797$; $q_T = 0.203$). The frequency of the minor *T* allele is doubled in the group of patients compared with healthy ones ($q_T = 0.419$). The *T* allele is considered to be provocative; the allele *C* is protective. The *CC* genotype reduces the likelihood of multiple sclerosis by almost half compared with the empirical risk. In heterozygotes of *CT*, the risk is increased by more than one and half times, in homozygotes of *TT* more than three times. 95 % *CI* confidence intervals for the *OR* odds ratio indicator are: *CC* (0.19–0.44), *CT* (1.36–3.10), *TT* (1.99–7.61), *CT* + *TT* (2.29–5.21). The statistical characteristics of the test indicate its low power when used in screening programs. The sensitivity when testing carriers of the *T* allele (*CT* + *TT* genotypes) is 65 %. The very low prognostic value of a positive test makes it inappropriate to use for screening, but this test may be useful in individual genetic counselling for patients with multiple sclerosis, as well as their relatives. The analysis scheme can be used in other studies of traits with a genetic component.

Key words: *genetic polymorphism, associative genetics, statistical characteristics of the test.*

About the authors:

H. Ehyakonandeh – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, hesam.ehyakonandeh@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-2964-901X>
L.A. Atramentova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, lubov.atramentova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7143-9411>

Introduction

Multiple sclerosis is a complex neurological disease that affects the central nervous system resulting in debilitating neuropathology. Pathogenesis is primarily defined by inflammation and demyelination of nerve axons. Although multiple sclerosis was first described in patients over 150 years ago, the exact etiology and pathogenesis of the disease remain unclear. There are certainly immunological factors, which are involved in the disease pathogenesis. However, epidemiological studies suggest that still unknown genetic factors also can contribute to the etiology of this disease. The precise etiology of multiple sclerosis remains elusive with a complex interplay between environmental factors, genetic susceptibility, and age-dependant exposure to viral infection (Levin et al., 2005).

Genetic predisposition has long been suspected in the etiology of this disease. At present, its associations with a large number of genes have already been discovered, but the genetic control is not completely clear. An important step in combating the disease can be preventive measures among groups of people with hereditary predisposition. The association between *MTHFR* polymorphisms and multiple sclerosis has been investigated in different ethnic groups (Alatab et al., 2011; De Marco et al., 2002; Jonasdottir et al., 2003; Fekih Mrissa et al., 2013; Klotz et al., 2010). The association between *MTHFR* *C677T* variants and multiple sclerosis has been revealed in the southern Iranian population (Naghbalhossaini et al., 2015). We used these results to continue the analysis in terms of population genetics and examined whether this polymorphism can be used in a screening programs and in the genetic counseling.

Materials and methods

The distributions of genotypes in the groups of patients and healthy people were compared using the criterion χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{N^2}{n_1 n_2} \left(\sum_{i=1}^k \frac{f_i^2}{f_1 + f_2} - \frac{n_1^2}{N} \right); \quad df = k - 1$$

n_1 and n_2 – the number of observations in the compared groups ($N = n_1 + n_2$), f_1 and f_2 – the number of genotypes in the compared groups, df – the degree of freedom, k – the number of classes.

The coefficient of association r between allele and disease was calculated as:

$$r = \frac{ad - bc}{\sqrt{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}}; \quad \chi^2 = r^2 n; \quad df = 1$$

a – the number of T alleles in the group of patients, b – the number of C alleles in the group of patients, c – the number of T alleles in the group of healthy people, d – the number of C alleles in the group of healthy people, n – the total number of alleles in two groups, df – the degree of freedom.

Allele frequencies p_C and q_T were calculated as:

$$p_C = \frac{2n_{CC} + n_{CT}}{2(n_{CC} + n_{CT} + n_{TT})}; \quad q_T = \frac{2n_{TT} + n_{CT}}{2(n_{CC} + n_{CT} + n_{TT})}$$

n – the number of the genotype.

The odds ratio (OR) was calculated:

$$OR = \frac{ad}{bc}$$

a – the number of patients with the predisposition genotype, b – the number of patients without the predisposition genotype, c – the number of healthy people with the predisposition genotype, d – the number of healthy people without the predisposition genotype.

The confidence interval (CI) of OR was carried out in the logarithmic scale.

$$CI: \ln OR \pm t_{S_{\ln OR}}$$

t – the Student coefficient (for 95 % CI $t = 1.96$), $S_{\ln OR}$ – the statistical error for $\ln OR$.

The statistical error $\ln OR$ was calculated as:

$$S_{\ln OR} = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

The $S_{\ln OR}$ was used to obtain the 95 % confidence interval of $\ln OR$. The limit values of the confidence interval $\ln OR$ were converted to the boundary values of the confidence interval OR by a back procedure: $\exp \ln OR$ (Armitage, Berry, 1994).

The index of sensitivity (Sen) and specificity (Spe) of the tests was calculated using the formulas:

$$Sen = \frac{a}{a+c}, \quad Spe = \frac{d}{b+d}$$

The prevalence of multiple sclerosis obtained from (Izadi et al., 2015) is used for the calculations of the follow statistical characteristics. The calculation of the prognostic value of the positive result (PVP) and

the prognostic value of the negative result (*PVN*) was carried out according to the formulas (Atramentova, 2015):

$$PVP = \frac{a}{a+b^*}; \quad PVN = \frac{d^*}{c+d^*};$$

$$b^* = \frac{b}{b+d}(N^* - a - c); \quad N^* = \frac{a+c}{\pi}; \quad d^* = N^*(1 - \pi) - b^*$$

a – the number of patients with the test genotype, *b* – the number of healthy people with the test genotype, *c* – the number of patients without the test genotype, *d* – the number of healthy people without the test genotype.

Results and discussion

The group of healthy people due to the negligible prevalence of multiple sclerosis (Izadi et al., 2015) can be considered as a sample from the whole population. In the group of patients, the proportion of *CC* genotype is almost two times less than in the group of healthy people. The number of patients with *CT* genotype is one and a half times more than in the control group, the number of people with *TT* genotype is three times more than in control group, so the presence of the *T* allele in the genotype is considered as an indicator of increased risk for multiple sclerosis in the population of southern Iran.

The major allele in the Iranian population is *C* ($p_C = 0.797$). The frequency of the minor allele *T* in patients ($q_T = 0.419$) is two times higher than in the group of healthy people ($q_T = 0.203$; table 1). The distribution of genotypes in this group corresponds to the Hardy – Weinberg equilibrium.

Table 1.

The distribution of genotypes in the groups of healthy people and patients

Group	Index	Total*	Genotypes			Allele frequencies	
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>
Control	<i>n</i> (%)	231 (100)	150 (65.0)	68 (29.4)	13 (5.6)	0.797	0.203
Patients	<i>n</i> (%)	180 (100)	63 (35.0)	83 (46.1)	34 (18.9)	0.581	0.419
Relative risk			0,54	1,57	3,38	$r_A=0.23$	
Statistics			$\chi^2_{0,001(2)}=13,8; \chi^2=40,6; p<0,001$			$\chi^2_{0,001(1)}=10.8$ $\chi^2=45.1; p<0,001$	

*Naghbalhossaini et al., 2015.

The prevalence of multiple sclerosis can be considered as an empirical risk for this disease if there is no other information. The risk changes if new information appears. *CC* genotype reduces the likelihood of the disease in comparison with the empirical risk almost twice (0.54, table 1). *TT* genotype increases the likelihood 3.38 times compared with empirical risk. In heterozygotes (*CT*) the probability of the disease is increased by 1.56 times. Thus, the *T* allele is considered to be provocative for multiple sclerosis, and the *C* allele is protective.

Table 2.

Odds ratio for different genotypes

Test genotype	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>OR</i>	<i>lnOR</i>	<i>s_{lnOR}</i>	95% <i>CI lnOR</i>	95% <i>CI OR</i>
<i>CC</i>	63	150	117	81	0.29	-1.24	0.21	-1.65 – -0.83	0.19 – 0.44
<i>CT</i>	83	68	97	163	2.05	0.72	0.21	0.31 – 1.13	1.36 – 3.10
<i>TT</i>	34	13	146	218	3.91	1.36	0.34	0.69 – 2.03	1.99 – 7.61
<i>CT+TT</i>	117	81	63	150	3.44	1.24	0.21	0.83 – 1.65	2.29 – 5.21

a – the number of patients with the test genotype, *b* – the number of healthy people with the test genotype, *c* – the number of patients without the test genotype, *d* – the number of healthy people without the test genotype, *OR* – the odds ratio, *s_{lnOR}* – the statistical error of *lnOR*, *CI* – the confidence interval.

Given that the probability of disease in heterozygotes *CT* is half that the probability of homozygotes *TT* it can be argued that the interaction of these alleles exhibits a half-dominant effect or incomplete dominance with regard to multiple sclerosis. Since the presence in the genotype *T* allele increases the risk of multiple sclerosis, we combined these two genotypes (*CT* + *TT*) and designated this common group as a group of increased risk for multiple sclerosis. The individuals with the *CC* genotype are designated as the anti-risk group.

Confidence intervals of OR do not include 1 (table 2), so all indices are statistically significant ($p < 0.05$). Therefore, *MTHFR C677T* polymorphism can be used as a marker of genetic predisposition to multiple sclerosis. The statistical characteristics of the test were calculated in order to estimate the predictive value of this polymorphism. The prevalence of multiple sclerosis in this population ($\pi = 0.000721$, Izadi et al., 2015) was used for further calculation.

The sensitivity of this test is rather low. The test for homozygote genotype *TT* reveals only 19 % individuals, which have the hereditary predispositions to multiple sclerosis, and the test for heterozygosity reveals 46 %. The *T*-allele in whole without taking into account the genotype identifies 65 % of potential patients (table 3).

Table 3.

Statistic characteristics of tests

Characteristics	Genotype		
	<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>TT + CT</i>
$\pi = 0.000721^*$			
Index of sensitivity, %	18.9	46.1	65.0
Index of specificity, %	93.2	70.6	64.9
Prognostic value of positive result, %	0.24	0.11	0.13
Prognostic value of negative result, %	99.9	99.9	99.9

π – prevalence of multiple sclerosis in southern Iran, * – Izadi et al., 2015.

The prognostic value of the positive result is negligible (less than 1 %) and is of no practical value. High prognostic value of the negative result (> 99.9 %) is of no practical significance as well (table 3). Thus, the using of this polymorphism for screening has no practical value. Nevertheless, this polymorphism can be useful in the individual genetic counseling of the multiple sclerotic patients and their relatives. The analysis algorithm described in the article can be used to study a variety of traits with a genetic component and diseases with a hereditary predisposition.

References

- Alatab S., Hossein-nezhad A., Mirzaei K. et al. (2011). Inflammatory profile, age of onset, and the *MTHFR* polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J. Mol. Neurosci.*, 44(1), 6–11. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9486-y>
- Armitage P., Berry G. (1994). *Statistical methods in medical research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 620 p.
- Atramentova L.A. (2015). *Design and statistics of biological research*. Kharkiv: NTMT, 269 p. (in Russian)
- De Marco P., Calevo M.G., Moroni A. et al. (2002). Study of *MTHFR* and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J. Hum. Genet.*, 47(6), 319–324. <https://doi.org/10.1007/s100380200043>
- Fekih Mrissa N., Mrad M., Klai S. et al. (2013). Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 115(9), 1657–1660. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.02.025>
- Izadi S., Nikseresht A.R., Poursadeghfard M. et al. (2015). Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Fars Province, Southern Iran. *Iran J. Med. Sci.*, 40(5), 390–395.
- Jonasdottir A., Thorlacius T., Fossdal R. et al. (2003). A whole genome association study in Icelandic multiple sclerosis patients with 4804 markers. *J. Neuroimmunol.*, 143(1–2), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.08.018>

- Klotz L., Farkas M., Bian N. et al. (2010). The variant methylenetetrahydrofolate reductase c.1298A>A(p.E429A) is associated with multiple sclerosis in German case-control study. *Neuroscience Lett.*, 468, 183–185. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.057>
- Levin L.I., Munger K.L., Ruberstone M.V. et al. (2005). Temporal relationship between elevation of Epstein–Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA*, 293(20). – P. 2496–2500. <https://doi.org/10.1001/jama.293.20.2496>
- Naghbalhossaini F., Ehyakonandeh H., Nikseresht A., Kamali E. (2015). Association between *MTHFR* genetic variants and multiple sclerosis in a Southern Iranian Population. *Int. J. Mol. Cell Med.*, 4(2), 87–93.

Прогностичне значення маркерів в асоціативній генетиці

Х. Ехьяконандех, Л.О. Атраментова

В статті представлено алгоритм генетико-статистичного аналізу рідкісного хронічного захворювання із спадковою схильністю. Використані результати генотипування, одержані одним з авторів методом асоціативної генетики. Досліджені хворі на розсіяний склероз та здорові мешканці південного Ірану. Розсіяний склероз – захворювання із спадковою схильністю. До теперішнього часу вже визначені його асоціації з великою кількістю генів, однак генетичний контроль остаточно ще не з'ясовано. Важливим етапом протидії захворюванню з генетичною схильністю можуть бути профілактичні заходи серед осіб підвищеного ризику. У даній статті на прикладі генетичного поліморфізму *S677T* гена *MTHFR* показано, як з'ясувати ефективність виявлення осіб з підвищеним ризиком до захворювання, використовуючи знайдені асоціації захворювання з генетичним маркером. Були використані результати генотипування 180 хворих на розсіяний склероз і 231 здорового індивіда. За цими даними розраховані популяційно-генетичні показники і статистичні характеристики тесту. Розподіл генотипів у здорових людей: *CC* – 65 %, *CT* – 29 %, *TT* – 6 %, у хворих на розсіяний склероз *CC* – 35 %, *CT* – 46 %, *TT* – 19 %. Мажорним алелем в популяції південного Ірану є *C* ($p_c = 0,797$; $q_T = 0,203$). Частота мінорного алеля *T* підвищена в групі хворих у порівнянні зі здоровими в два рази ($q_T = 0,419$). Алель *T* розглядається як провокативний, алель *C* є протективним. Генотип *CC* знижує ймовірність розсіяного склерозу майже в два рази в порівнянні з емпіричним ризиком. У гетерозигот *CT* ризик збільшений у півтора рази, у гомозигот *TT* – в три рази. Довірчі інтервали 95 % *CI* для показника відношення шансів *OR* складають: *CC* (0,19–0,44), *CT* (1,36–3,10), *TT* (1,99–7,61), *CT* + *TT* (2,29–5,21). Чутливість при тестуванні на наявність алеля *T* в генотипі (*CT* + *TT*) становить 65 %. Дуже низьке прогностичне значення позитивного тесту (менше 1 %) робить недоцільним його використання для масового скринінгу, але цей тест може бути корисним при індивідуальному генетичному консультуванні пацієнтів з розсіяним склерозом, а також їхніх родичів. Схема аналізу може бути використана в інших дослідженнях ознак з генетичною компонентою.

Ключові слова: генетичний поліморфізм, асоціативна генетика, статистичні характеристики тесту.

Про авторів:

Х. Ехьяконандех – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, hesam.ehyakonandeh@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-2964-901X>

Л.О. Атраментова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, lubov.atramentova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7143-9411>

Прогностическое значение маркёров в ассоциативной генетике

Х. Эхьяконандех, Л.А. Атраментова

В статье представлен алгоритм генетико-статистического анализа редкого хронического заболевания с наследственной предрасположенностью. Используются результаты генотипирования, полученные одним из авторов методом ассоциативной генетики. Исследованы больные рассеянным склерозом и здоровые жители южного Ирана. Рассеянный склероз – заболевание с наследственной предрасположенностью. В настоящее время уже обнаружены его ассоциации с большим количеством генов, однако генетический контроль окончательно ещё не выяснен. Важным этапом противодействия таким заболеваниям могут быть профилактические мероприятия среди лиц повышенного риска. В данной статье на примере генетического полиморфизма *S677T* гена *MTHFR* показано, как выяснить эффективность выявления группы повышенного риска. Анализ выполнен на данных о генотипах 180 больных рассеянным склерозом и 231 здоровом индивиде из населения южного Ирана. Рассчитаны популяционно-генетические показатели и статистические характеристики теста. Распределение генотипов у здоровых людей: *CC* – 65 %, *CT* – 29 %, *TT* – 6 %, у больных рассеянным склерозом *CC* – 35 %, *CT* – 46 %, *TT* – 19 %. Мажорным аллелем в популяции южного Ирана является *C* ($p_c = 0,797$; $q_T = 0,203$). Частота минорного аллеля *T* повышена в группе больных по сравнению со здоровыми в два раза ($q_T = 0,419$). Аллель *T* рассматривается как провокативный, аллель *C* является протективным. Генотип *CC* снижает вероятность рассеянного склероза почти в два раза по сравнению с

емпіричним ризиком. У гетерозигот *СТ* ризик збільшений в півтора рази, у гомозигот *ТТ* в три рази. Доверительные інтервали 95 % *CI* для показателя отношение шансов *OR* складають: *СС* (0,19–0,44), *СТ* (1,36–3,10), *ТТ* (1,99–7,61), *СТ+ТТ* (2,29–5,21). Чувствительность при тестировании на присутствие в генотипе аллеля *T* (*СТ+ТТ*) складає 65 %. Очень низкое прогностическое значение положительного теста (менее 1 %) делает нецелесообразным его использование для скрининга, но этот тест может быть полезным при индивидуальном генетическом консультировании пациентов с рассеянным склерозом, а также их родственников. Схема анализа может быть использована в других исследованиях признаков с генетическим компонентом.

Ключевые слова: *генетический полиморфизм, ассоциативная генетика, генетико-статистические характеристики теста.*

Об авторах:

Х. Эхьяконандех – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, hesam.ehyakonandeh@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0002-2964-901X>

Л.О. Атраментова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, lubov.atramentova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7143-9411>

Представлено: О.В.Філіпцова / Presented by: O.V.Filipstova

Рецензент: Д.А.Шабанов / Reviewer: D.A.Shabanov

Подано до редакції / Received: 13.04.2020

... ЗООЛОГИЯ ТА ЭКОЛОГИЯ ... ZOOLOGY AND ECOLOGY ...

УДК : 595.42

Клещи рода *Erythraeus* Latreille, 1806 (Acariformes: Actinedida: Erythraeidae) природной области Большого Кавказа (в пределах Азербайджана)

Г.А. Ализаде

Клещи семейства Erythraeidae Robineau-Desvoidy, 1828 распространены всемирно и известны как регуляторы численности сосущих вредителей. Имаго и дейтонимфы являются хищниками, многие личинки относятся к эктопаразитам членистоногих. Они могут наносить вред пчеловодству. Кроме того, некоторые виды вызывают дерматиты у человека. Erythraeidae Кавказа очень слабо изучены. Данная статья является первым сообщением о клещах рода *Erythraeus* Latreille, 1806 семейства Erythraeidae, обитающих на территории Азербайджана. Приводится аннотированный список пяти видов клещей этого рода, собранных в природной области Большого Кавказа: *Erythraeus phalangoides* (De Geer, 1778), *E. regalis* (C.L.Koch, 1837), *E. gorcensis* Gabrys, 2016, *E. opilionoides* (C.L.Koch, 1837), *E. adpendiculatus* (Schrank, 1781). Все они указываются для Азербайджана впервые. Дан определитель видов рода *Erythraeus* по имаго. Для уточнения определения сделаны оригинальные фотографии имаго. Клещи были собраны в трех ландшафтных поясах: полупустынном (4 вида), горно-степном (2 вида) и горно-лесном (2 вида). Лучшее всего изучен Абшеронский полуостров (пояс полупустынь), где обнаружено четыре вида *Erythraeus*. Больше всего видов найдено в искусственных лесных массивах с преобладанием сосны эльдарской (4 вида, 12 особей). В остальных биотопах клещи рода *Erythraeus* редки: в широколиственных лесах низкогорья обнаружено 2 вида (3 особи), в разнотравной степи – 1 вид (1 особь), в аридном редколесье из груши иволистной – 1 вид (1 особь), в приусадебном саду – 1 вид (1 особь). На растениях отмечены только четыре особи *E. regalis*, остальные клещи собраны под камнями, что позволяет отнести их к герпетобионтам, а *E. regalis* – к герпето-хортобионтам. Из 18 найденных особей 17 были половозрелыми, а одна личинка *E. regalis* снята с пенницы на ежевике. Самым распространенным родом эритрид на Большом Кавказе является *Abrolophus* Berlese, 1891 (собрано 39 особей, относящихся к восьми видам). Это единственный род сем. Erythraeidae, найденный в четырех ландшафтных поясах, от полупустынного до субальпийского. Род *Erythraeus* в субальпийском поясе не обнаружен.

Ключевые слова: *Acariformes*, *Actinedida*, *Erythraeidae*, Большой Кавказ, фауна, определительный ключ.

Об авторе:

Г.А. Ализаде – Азербайджанский государственный педагогический университет, ул. У.Гаджибекова, 41, Баку, Азербайджан, AZ 1000, gulnar.alizade1993@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1117-5140>

Введение

Семейство Erythraeidae относится к подотряду Parasitengona отряда Actinedida. Эритреиды распространены всемирно, известно 823 вида, относящихся к 60 родам 7 подсемейств. Имаго и дейтонимфы эритреид – хищники, большинство личинок – эктопаразиты членистоногих, однако они могут встречаться и на позвоночных животных. Хищничество наблюдается у личинок родов *Abrolophus* и *Balaustium*. У клещей р. *Balaustium* и, вероятно, большинства других Balaustiinae, все активные стадии – хищники или поедатели пыльцы. Среди эритреид наблюдается каннибализм (Bartsch et al., 2006; Munoz-Cardenas et al., 2015).

Эритреиды имеют большое практическое значение как регуляторы численности сосущих вредителей. Так, в Азербайджане эффективность рода *Abrolophus* в биологическом контроле была доказана на примере низкогорных дубовых лесов, люцерновых полей и приусадебных виноградников (Асланов, 2008).

С другой стороны, личинки эритреид переносят возбудителей различных болезней членистоногих. К эктопаразитам медоносной пчелы в Азербайджане относится *Leptus* sp., который может наносить определенный вред пчеловодству (Асланов и др., 2015). В Гватемале к таким вредителям относится *L. ariel* Southcott, 1989 (Southcott, 1989).

Клещ *Balaustium murorum* (Hermann, 1804) и некоторые другие виды этого рода вызывают у человека дерматиты, а *B. medicagoense* Meyer et Ryke, 1959 вредит растениям в Австралии (Ido et al., 2003; Muñoz-Cárdenas et al., 2015).

На Кавказе клещи сем. Erythraeidae практически не изучены. Целью нашей работы было обработать коллекционный материал и составить аннотированный список клещей р. *Erythraeus* природной области Большого Кавказа (в пределах Азербайджана).

Материалы и методы

Исследования проводились в 2018–2019 годах в природной области Большого Кавказа (в пределах Азербайджана), в четырех ландшафтно-географических поясах: полупустынном, горно-степном, горно-лесном и субальпийском. Была также использована коллекция клещей лаборатории наземных беспозвоночных Института зоологии НАН Азербайджана. Координаты точек сборов приведены в табл. 1. С растений клещи собирались методом отряхивания. При этом наклеенный на картон лист белой бумаги подводили под ветку дерева, кустарника, папоротника или под наклоненное травянистое растение, затем несколько раз резко ударяли по ним деревянной колотушкой. Опавшие клещи хорошо видны на белом листе, откуда их собирали мягкой кисточкой, препаровальной иглой, стеблевой колючкой гледичии или иглой дикобраза, смоченными фиксирующей жидкостью.

Таблица 1.

Координаты точек сбора клещей

Районы исследования	Места сбора материала	Координаты
Абшеронский полуостров	г. Баку Байыловский лесной массив	40°21'0"N//49°50'0"E
	г. Баку (Институт зоологии НАН Азербайджана)	40°20'22"N//49°48'14"E
Гобустанский район	с. Сюндю	40°19'22"N//49°02'46"E
Шамахи	с. Гызмейдан	40°46'11"N//48°44'52"E
Исмаиллы	с. Галаджыг	40°57'33"N//48°3'9"E
Гах	с. Гум	41°27'26"N//46°54'35"E

С насекомых клещи легко снимаются препаровальной иглой, смоченной в жидкости Фора или в глицерине. Для извлечения эритреид из почвы, подстилки, листового опада, мхов, лишайников, древесной трухи, подстилки птичьих гнезд и муравейников используется эклектор, представляющий собой металлическую воронку с вкладываемым в нее ситом (диаметр ячеек – 1–2 мм), а также сифтор или аппарат Винклера.

Из-под камней и с поверхности почвы, со стволов деревьев и кустарников, стен домов мы собирали эритреид мягкой тонкой кисточкой, смоченной фиксирующей жидкостью. При сборе клещей использовалась 7×–10× ручная лупа.

Собранные различными методами клещи помещались во флакончики из-под нитроглицерина или стеклянные пробирки с фиксирующей жидкостью (70–75 % этиловый спирт). Каждая пробирка снабжается этикеткой, на которой указываются место сбора, микробиотоп и дата сбора, фамилия сборщика. Пробирки со сборами хранятся в широкогорлых полиэтиленовых банках с 70 % этиловым спиртом.

Препараты из собранных клещей изготавливались под бинокляром (МБС-1) по общепринятой методике: на чистое предметное стекло наносится капля жидкости Фора (гуммиарабик – 30 г, хлоралгидрат – 200 г, глицерин – 20 г, вода – 50 г), в эту каплю помещаются по 10 и более клещей сем. Erythraeidae с таким расчетом, чтобы часть из них лежала спиной вверх, а другие – вниз или боком (Вайнштейн, 1960; Асланов, 1997).

Для изготовления микропрепаратов из клещей используются также лактофенол и модифицированная жидкость Гойера (дистиллированная вода – 50 мл, гуммиарабик – 50 г,

хлоралгидрат – 125 г, глицерин – 30 мл). Изготовленные препараты выдерживали в термостате 14–20 дней при 55°C, где клещи просветляются и их придатки расправляются. После этого препараты готовы для просмотра под микроскопом. В дальнейшем препараты хранили на лотках в горизонтальном положении до полного высушивания (5–6 месяцев).

Определение клещей проводилось под микроскопами МБИ-3, Olympus CX-41, МБИ-15У42 с применением фазового контраста и масляной иммерсии (Gabrys, 2016). Клещи были определены старшим научным сотрудником лаборатории наземных беспозвоночных Института зоологии НАН Азербайджана О.Аслановым.

Клещи измерялись с помощью окуляр-микрометра, фотографии под микроскопом сделаны с помощью цифровой фотокамеры Sony Cyber-Shot 7.2 MP к.б.н. Б.Ахмедовым при увеличении 400×. Определительная таблица видов р. *Erythraeus* была составлена на основе определительного ключа Г.Габриса (Gabrys, 2016), из которого были выбраны виды, отмеченные в Азербайджане.

Результаты

Клещи р. *Erythraeus* были собраны в природной области Большого Кавказа (в пределах Азербайджана) в трех ландшафтных зонах: полупустынном (4 вида), горно-степном (2 вида) и горно-лесном (2 вида). Всего собрано 18 особей, относящихся к пяти видам. Больше всего видов найдено в искусственных лесных массивах с преобладанием сосны эльдарской (*Pinus eldarica* Medwedew) (4 вида). В остальных биотопах клещи р. *Erythraeus* редки. Под камнями собрано 14 клещей, с растений – четыре клеща.

Байыловский лесной массив г. Баку, в котором проводились сборы в 1980-х годах, в настоящее время фактически уничтожен. Повторные исследования не проводились, поэтому современное существование клещей в этой точке остается под вопросом.

Аннотированный список видов

Отряд Actinedida van der Hammen, 1968
Подотряд Parasitengona Oudemans, 1909
Надсемейство Erythraeoidea Robineau-Desvoidy, 1828
Семейство Erythraeidae Robineau-Desvoidy, 1828
Подсемейство Erythraeinae Robineau-Desvoidy, 1828
Род Erythraeus Latreille, 1806
Подрод Erythraeus Latreille, 1806

1. *Erythraeus phalangoides* (De Geer, 1778) (рис. 1–3).

Описание см. (Stålstedt et al., 2016).

Материал: Азербайджан, Абшеронский п-ов, г. Баку, искусственный лесной массив с преобладанием сосны эльдарской, под камнями, 2 половозрелые особи, 15.10.1984 (сб. О.Асланов).

Распространение: Южный Кавказ: Азербайджан; Европа, Азия: Курильские острова; о. Гренландия (Berg, 2008).

Личинки являются паразитами тлей. Дейтонимфы и имаго питаются взрослыми муравьями. Половозрелые особи также поедают мелких жуков. Эвривалентный вид.

2. *E. regalis* (C.L. Koch, 1837) (рис. 4–7).

Описание см. (Stålstedt et al., 2016).

Материал: Азербайджан, Абшеронский п-ов, г. Баку, искусственный лесной массив, с преобладанием сосны эльдарской, под камнями, 3 половозрелые особи, 20.06.1984 (сб. О.Асланов); Баку, ЗИН, сад, ежевика, пенница, 1 личинка, 18.05.1988 (сб. О.Асланов); Гобустанский район, Сяндюньское плато, с. Сяндю, разнотравная степь, растения, 1 самка, 15.06.2018 (сб. Г.Ализаде); Гахский район, с. Гум, каштановый лес, растения, 2 половозрелые особи, 29.07.2018 (сб. Г.Ализаде).

Распространение: Южный Кавказ: Азербайджан; Европа; Северо-западная Африка: Алжир; Северная Азия: Восточная Сибирь (Красноярский край) (Berg, 2008).

Личинки паразитируют на тлях и пенницах. Иногда наблюдается форезия дейтонимф на европейской рыжей полевке (*Myodes glareolus* (Schreber, 1780)). Половозрелые особи активны в мае–июле.



Рис. 1. *E. phalangodes* – имаго, лапка, голень и колено педипальпы

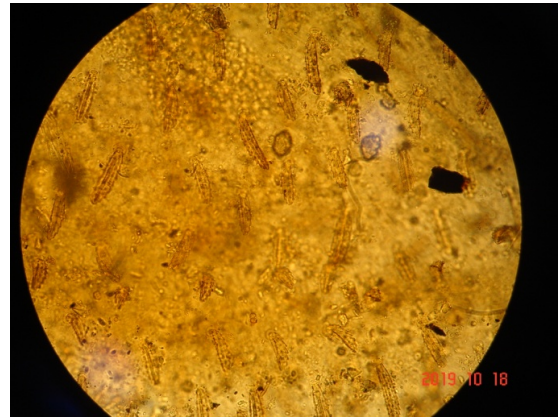


Рис. 2. *E. phalangoides* – имаго, дорсальные опистомальные щетинки

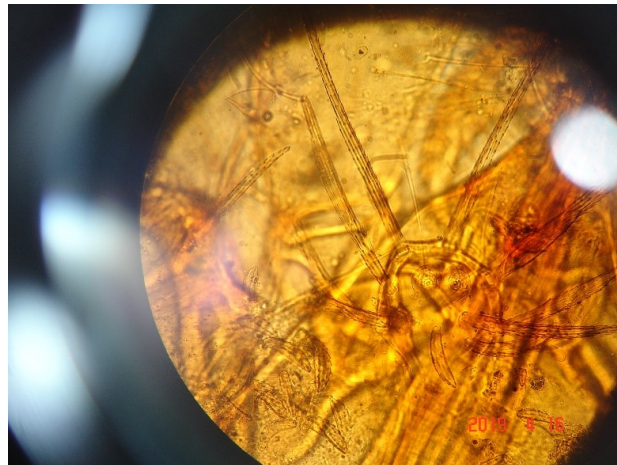


Рис. 3. *E. phalangoides* – имаго, передняя сенсиллярная площадка

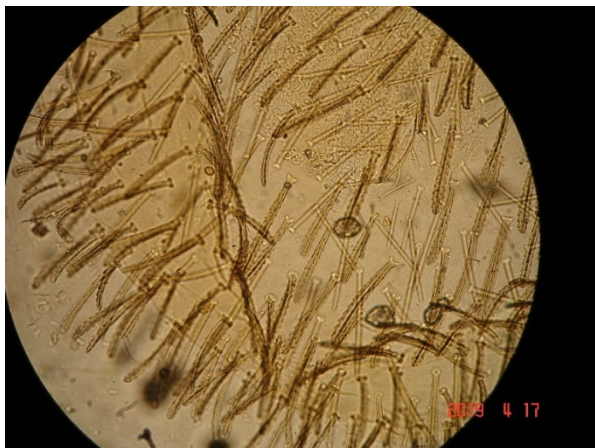


Рис. 4. *E. regalis* – имаго, дорсальные опистомальные щетинки



Рис. 5. *E. regalis* – имаго, лапка, голень и колено педипальпы



Рис. 6. *E. regalis* – имаго, передняя сенсиллярная площадка



Рис. 7. *E. regalis* – личинка, гнатосома и проподосома

3. *E. gorcensis* Gabrys, 2016 (рис. 8).

Описание см. (Gabrys, Roland, 2016).

Материал: Азербайджан, Абшеронский п-ов, г. Баку, искусственный лесной массив с преобладанием сосны эльдарской, под камнями, 1 половозрелая особь, 20.06.1984 (сб. О.Асланов); Лерикский район, с. Госмалян, сад, под камнями, 1 ♀, 28.05.1985 (сб. Х.Алиев).

Дейтонимфа и личинка не известны.

Горный вид.

Распространение: Южный Кавказ: Азербайджан; Центральная Европа: Польша, Венгрия, Швейцария (Gabrys, Roland, 2016).



Рис. 8. *E. gorcensis* – имаго, дорсальные опистомальные щетинки

4. *E. adpendiculatus* (Schrank, 1781) (рис. 9–12).

Описание см. (Gabrys, Roland, 2016).

Материал: Азербайджан, Абшеронский п-ов, г. Баку, искусственный лесной массив, с преобладанием сосны эльдарской, под камнями, 1 половозрелая особь, 12.06.1984 (сб. О.Асланов); там же, 5 половозрелых особей, 20.06.1984 (сб. О.Асланов).

Дейтонимфы и личинка неизвестны.

По-видимому, теплолюбивый вид.

Распространение: Южный Кавказ: Азербайджан; Европа (Gabrys, Roland, 2016).

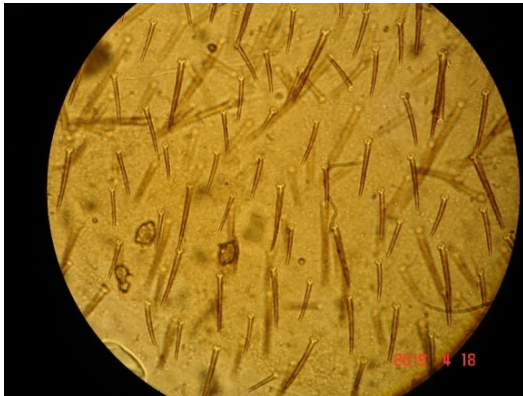


Рис. 9. *E. adpendiculatus* – имаго, дорсальные опистомальные щетинки



Рис. 10. *E. adpendiculatus* – имаго, лапка, голень ноги I



Рис. 11. *E. adpendiculatus* – имаго, лапка, голень и колено ног III и IV



Рис. 12. *E. adpendiculatus* – имаго, педипальпа



Рис. 13. *E. opilionoides* – имаго, дорсальные опистомальные щетинки

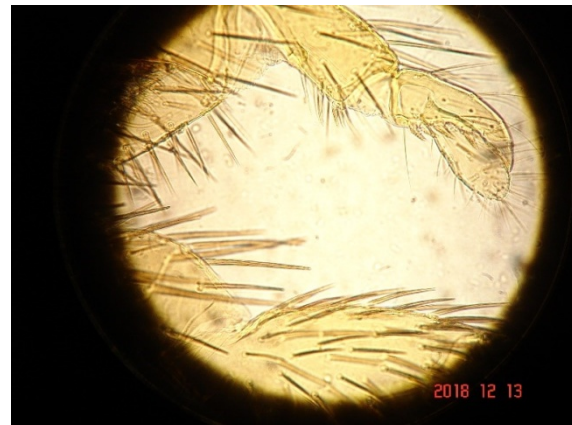


Рис. 14. *E. opilionoides* – имаго, педипальпа

5. *E. opilionoides* (C.L.Koch, 1837) (рис. 13–15).

Описание см. (Gabrys, Roland, 2016).

Материал: Азербайджан, Лерикский район, с. Госмалян, сад, под камнями, 1 ♀, 28.05.1985 (сб. Х.Алиев); Исмайллынский р-н, с. Галаджик, широколиственный лес, под камнями, 1 половозрелая особь, 22.07.2014 (сб. О.Асланов); Шамахынский р-н, Гызмейданское плато, окрестности с. Гызмейдан, аридное редколесье из груши иволистной (*Pyrus salicifolia* Pallas), под камнями, 1 половозрелая особь, 11.08.2019 (сб. Г.Ализаде).

Прижизненная окраска имаго свинцово-синяя.

Личинка не известна.

Убиквист с тенденцией к термофилии.

Распространение: Южный Кавказ: Азербайджан; Европа (Gabrys, Roland, 2016).



Рис. 15. *E. opilionoides* – имаго, передняя сенсиллярная площадка и глаза

Определитель видов р. *Erythraeus* Latreille 1806 Азербайджана по имаго (по Gabrys, 2016)

- 1 (2) Дорсальные опистосомальные щетинки очень длинные (имаго до 370 мкм, дейтонимфы до 220 мкм), щетинковидные; серратале очень крепкие и хорошо развитые *Erythraeus opilionoides*
- 2 (1) Дорсальные опистосомальные щетинки короче, никогда не превышают 180 мкм (имаго) и 160 мкм (дейтонимфы) 3
- 3 (6) По крайней мере часть дорсальных опистосомальных щетинок очень короткие (40–50 мкм) и шишковидные; серратале тонкие 4
- 4 (5) Все дорсальные опистосомальные щетинки одинаковой формы, очень короткие (25–50 мкм), шишковидные; лобный киль с отчетливым щитом *E. phalangoides*
- 5 (4) Постдорсальные щетинки намного длиннее (до 150 мкм) чем среднедорсальные щетинки; среднедорсальные щетинки короткие (40–80 мкм) и шишковидные; щит отсутствует *E. gorcensis*
- 6 (3) Очень короткие (40–50 мкм) и шишковидные дорсальные опистосомальные щетинки отсутствуют 7
- 7 (8) На колене педипальпы 4–7 конале; дорсальные опистосомальные щетинки игловидные; серратале на ногах I и II отсутствуют *E. adpendiculatus*
- 8 (7) На колене педипальпы 1–3 конале; дорсальные опистосомальные щетинки щетинковидные; серратале хорошо развиты на всех ногах *E. regalis*.

Заключение

Род *Erythraeus* является новым для фауны Кавказа. В природной области Большого Кавказа (в пределах Азербайджана) на настоящее время зарегистрировано пять видов этого рода: *Erythraeus phalangoides*, *E. regalis*, *E. gorcensis*, *E. adpendiculatus*, *E. opilionoides*; четыре из них отмечены на Абшеронском полуострове.

Список літератури / References

- Асланов О.Х. (1997). Фауна и ландшафтно-биотопическое распределение хищных клещей Prostigmata (Acariformes: Trombidiformes) Большого Кавказа (в пределах Азербайджана). Баку. 146 с. [Aslanov O.Kh. (1997). *Fauna and landscape-biotopic distributium of predatory Prostigmata mites (Acariformes: Trombidiformes) of Great Caucasus (in border of Azerbaijan)*. Baku. 146 p.]
- Асланов О.Х. (2008). К изучению хищных актинедидных клещей (Acariformes: Actinedida) виноградников Азербайджана. *Azərbaycan Zooloqlar Cəmiyyətinin əsərləri*, 1, 210–216. [Aslanov O.Kh. (2008). To the study of predatory actinedid mites (Acariformes: Actinedida) of Azerbaijan Vineyards. *Proceedings of the Azerbaijan society of Zoologists*, 1, 210–216.]
- Асланов О.Х., Рубцова Л.Е., Ханбекова Е.М. (2015). Клещи, ассоциированные с медоносной пчелой *Apis mellifera* саус. Gorb. в Азербайджане. *Azərbaycan Zooloqlar Cəmiyyətinin əsərləri*, 7(2), 119–126. [Aslanov O.Kh., Rubtsova L.Ye., Khanbekova Ye.M. (2015). Mites, associated with honeybees (*Apis mellifera* Caucasicca Gorb.) in Azerbaijan. *Proceedings of the Azerbaijan society of Zoologists*, 7(2), 119–126.]
- Вайнштейн Б.А. (1960). Тетраниховые клещи Казахстана (с ревизией семейства). Алма-Ата: Казахское Государственное издательство, с. 17–26. [Vainstein B.A. (1960). *Tetranychid mites of Kazakhstan (with revision of family)*. Alma-Ata: Kazakh State Publishing House, pp. 17–26.]
- Bartsch I., Davids K., Deichsel R. et al. (2006). Süßwasserfauna von Mitteleuropa / In: *Chelicerata Araneae, Acari*. Springer Spectrum. Vol.7, pp. 69–73.
- Beron P. (2008). *Acarorum Catalogus I Acariformes: Calyptostomatoidea (Calyptostomatidae), Erythraeoidea (Smarididae, Erythraeidae)*. Sofia: Pensoft and Nat. Mus. Natur. Hirst. 271 p.
- Gabrys G. (2016). A key to postlarval Erythraeidae (Acari: Actinotrichida) of Poland. *Rocznik museum gornoslaskiego w Bytomiu*, 22, 1–22.
- Gabrys G., Roland E. (2016). A redescription of *Erythraeus acis* (Berlese, 1882) Non Schweizer, 1951 (Acari: Actinotrichida: Erythraeidae) with notes on some related species from the Palaearctic Region. *Annales Zoologici*, 66(3), 417–430. <https://doi.org/10.3161/00034541ANZ2016.66.3.008>
- Ido T., Kumakiri M., Lao L.M. et al. (2003). Dermatitis caused by *Balaustium murorum*. *Acta Derm. Venereol.*, 84, 80–81.
- Muñoz-Cárdenas K., Fuentes-Quintero L.S., Rueda-Ramirez D. et al. (2015). The Erythraeoidea (Trombidiformes: Prostigmata) as biological control agents, with special reference to the genus *Balaustium* / In: D.Carrillo, G.de Moraes, J.Peña (eds.) *Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms*. Progress in Biological Control. Springer, Cham. Vol.19.
- Southcott R.V. (1989). A larval mite (Acarina: Erythraeidae) parasitizing the European honey bee in Guatemala. *Acarologia*, 30(2), 123–129.
- Stålstedt J., Wohltmann A., Bergsten J., Makol J. (2016). Towards resolving the double classification in *Erythraeus* (Actinotrichida: Erythraeidae): matching larvae with adults using 28S sequence data and experimental rearing. *Org. Divers. and Evol.*, 16, 761–790. <https://doi.org/10.1007/s13127-016-0283-5>

Кліщі роду *Erythraeus* Latreille, 1806 (Acariformes: Actinedida: Erythraeidae) природної області Великого Кавказу (в межах Азербайджану)

Г.А. Алізаде

Кліщі сімейства Erythraeidae Robineau-Desvoidy, 1828 поширені всесвітньо і відомі як регулятори чисельності сисних шкідників. Імаго і дейтонімфи є хижаками, багато личинок належать до ектопаразитів членистоногих. Вони можуть завдавати шкоди бджільництву. Крім того, деякі види викликають дерматити у людини. Erythraeidae Кавказу дуже слабо вивчені. Дана стаття є першим повідомленням про кліщів роду *Erythraeus* Latreille, 1806 сімейства Erythraeidae, що мешкають на території Азербайджану. Наводиться анотований список п'яти видів кліщів цього роду, зібраних у природній області Великого Кавказу: *Erythraeus phalangoides* (De Geer, 1778), *E. regalis* (C.L.Koch, 1837), *E. gorcensis* Gabrys, 2016, *E. opilionoides* (C.L.Koch, 1837), *E. adpendiculatus* (Schrank, 1781). Усі вони вказуються для Азербайджану вперше. Представлено визначник видів роду *Erythraeus* за імаго. Для уточнення визначення зроблені оригінальні фотографії імаго. Кліщі були зібрані у трьох ландшафтних поясах: напівпустельному (4 види), гірничо-степовому (2 види) і гірничо-лісовому (2 види). Найкраще вивчений Абшеронський півострів (пояс напівпустель), де виявлено чотири види *Erythraeus*. Найбільше видів знайдено у штучних лісових масивах з переважанням сосни ельдарської (4 види, 12 особин). В інших біотопах кліщі роду *Erythraeus* рідкісні: в широколистяних лісах низькогір'я виявлено 2 види (3 особини), в різнотравному степу – 1 вид (1 особина), в аридному рідколіссі з груші іволистої – 1 вид (1 особина), у присадибному саду – 1 вид (1 особина). На рослинах відзначені тільки чотири особини *E. regalis*, інші кліщі

зібрані під камінням, що дозволять віднести їх до герпетобіонтів, а *E. regalis* – до герпето-хортобіонтів. З 18 знайдених особин 17 були статевозрілими, а одна личинка *E. regalis* знята з пінниці на ожині. Найпоширенішим родом еритрид на Великому Кавказі є *Abrolophus* Berlese, 1891 (зібрано 39 особин, які належать до восьми видів). Це єдиний рід сем. Erythraeidae, знайдений в чотирьох ландшафтних поясах, від напівпустельних до субальпійського. Рід *Erythraeus* у субальпійському поясі не виявлений.

Ключові слова: *Acariformes*, *Actinedida*, *Erythraeidae*, Великий Кавказ, фауна, ключ для визначення видів.

Про автора:

Г.А. Алізаде – Азербайджанський державний педагогічний університет, вул. У.Гаджибекова, 41, Баку, Азербайджан, AZ 1000, gulnar.alizade1993@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1117-5140>

Mites of the genus *Erythraeus* Latreille, 1806 (Acariformes: Actinedida: Erythraeidae) in the Greater Caucasus (within Azerbaijan)
G.A. Alizade

Mites of the family Erythraeidae Robineau-Desvoidy, 1828 are distributed worldwide and have been reported as natural enemies of sucking pests. Adults and deutonymphs are predators; larvae of most species are ectoparasites of different arthropods. They can be harmful to beekeeping. Some species cause dermatitis in humans. Erythraeidae of the Caucasus are poorly studied. This article is the first report on mites of the genus *Erythraeus* Latreille, 1806 of the family Erythraeidae living in Azerbaijan. An annotated list of five species of mites of this genus collected in the Greater Caucasus is provided: *Erythraeus phalangoides* (De Geer, 1778), *E. regalis* (C.L.Koch, 1837), *E. gorcensis* Gabrys, 2016, *E. opilionoides* (C.L.Koch, 1837), *E. adpendiculatus* (Schrank, 1781). All of them are recorded from Azerbaijan for the first time. An identification key to imago of the *Erythraeus* species is given. The original photographs of imago were taken to clarify the determination. Mites were collected in three landscape zones: semi-desert (4 species), mountain-steppe (2 species) and mountain-forest (2 species). The Absheron Peninsula (semi-desert) is studied best; four *Erythraeus* species were found there. Most of the species were collected in artificial forests with a predominance of Eldar pine (4 species, 12 individuals). In other biotopes, mites of the genus *Erythraeus* are rare: 2 species (3 individuals) were found in broad-leaved forests of the low mountains, 1 species (1 individual) in a forb steppe, 1 species (1 individual) in an arid open woodland consisted of weeping pear trees, 1 species (1 individual) in a garden. Only four individuals of *E. regalis* were recorded on plants. The other mites were collected under stones, which will make it possible to attribute them to herpetobionts, and *E. regalis* to herpeto-hortobionts. Out of 18 individuals found, 17 were adult, and one larva of *E. regalis* was removed from spittlebug on a blackberry. The most common Erythraeidae genus in the Greater Caucasus is *Abrolophus* Berlese, 1891 (39 individuals belonging to eight species were collected). This is the only genus of the family Erythraeidae, found in four landscape zones, from semi-desert to subalpine. The genus *Erythraeus* was not found in the subalpine zone.

Key words: *Acariformes*, *Actinedida*, *Erythraeidae*, Greater Caucasus, fauna, identification key.

About the author:

G.A. Alizade – Azerbaijan State Pedagogical University, U.Hajibeyov Str., 41, Baku, Azerbaijan, AZ 1000, gulnar.alizade1993@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1117-5140>

Представлено: Х.А.Алієв / Presented by: Kh.A.Aliyev
Рецензент: Н.Ю.Полчанінова / Reviewer: N.Yu.Polchaninova
Подано до редакції / Received: 25.11.2019

УДК: 597.851 (477.54)

Зовнішньоморфологічні аномалії амфібій Харківської області

С.А. Катрушенко

В Україні аномалії амфібій вивчені недостатньо. Найбільш вивченими регіонами є Київська область та степова зона України. У Харківській області дослідження зовнішніх аномалій амфібій раніше не проводились. З 2016 року нами розпочаті дослідження цієї проблеми. Мета даної роботи – дослідити різноманітність зовнішніх аномалій амфібій Харківської області. Матеріалом послуговували вибірки амфібій з фондових колекцій Музею природи Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна та вибірки живих амфібій з різних локалітетів Харківської області, досліджені в період з 2016 по 2018 роки. Аномалії визначали візуально, за класифікаціями В.Л.Вершиніна та О.Д.Некрасової. Для кожного виду амфібій визначали зустрічальність особин з аномаліями P_{as} (частка аномальних особин від усіх особин у вибірці) і парціальну зустрічальність аномалій A_p (частка особин у вибірці, що мають дану аномалію). В ході дослідження виявлено 17 варіантів морфологічних аномалій: брахідактилія, олігодактилія, ектромелія, поліфалангія, потовщення пальця, повернена фаланга, синдактилія, шизодактилія, ектродактилія, шкірний виріст на пальці і виріст на стопі, таумелія, гемімелія, відсутність плавальної перетинки, а також анофтальмія, брахіцефалія, порушення фону і малюнка тіла. Найбільш масовою аномалією, яка зустрічається у обстежених амфібій, є брахідактилія (становить майже половину зареєстрованих випадків морфологічних відхилень). Дана аномалія кінцівок є найменш шкідливою, тому особини з такими відхиленнями зазвичай досить життєздатні. Аномалії амфібій розподілені серед вибірок нерівномірно: найбільш висока зустрічальність особин з аномаліями зареєстрована у *Lissotriton vulgaris*, в інших вибірках безхвостих амфібій (крім *Bufo viridis* і *Bombina orientalis*) зустрічальність особин з аномаліями не перевищувала п'яти відсотків, що говорить про їх фонову зустрічальність в природі. Також виявлено та описано новий тип аномалії забарвлення тіла у цюголітків *Bufo viridis*.

Ключові слова: амфібії, зовнішньоморфологічні аномалії, Харківська область, зустрічальність аномалій.

Про автора:

С.А. Катрушенко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, svetlanakatrusenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9709-7563>

Вступ

Аномалії амфібій відзначаються дослідниками протягом тривалого періоду часу. Перші згадки відносяться до XVIII ст., коли Vallisneri (1733) в Італії описав особину з п'ятьма кінцівками. В СРСР перший випадок масових аномалій (полімелії та ін.) був виявлений в 1947 р. у *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) в околицях Алма-Ати, Казахстан (Войткевич, 1948). В Україні аномалії амфібій вивчені недостатньо. О.Д.Некрасова та ін. вперше для України описують випадок масової полімелії, виявленої у цюголітків *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) з ізольованої популяції м. Києва (Некрасова і др., 2007). Г.І.Микитинець досліджувала закономірності географічного розподілу аномалій безхвостих амфібій в різних регіонах степної зони України (Микитинець, 2014). Продовжують активно вивчати аномалії амфібій О.Д.Некрасова та О.Ю.Марущак (Інститут зоології імені І.І.Шмальгаузена НАН України). У Харківській області дослідження аномалій амфібій раніше не проводились. З 2016 року нами розпочаті дослідження цієї проблеми. Нами вивчені аномалії амфібій на основі матеріалу фондових колекцій Музею природи ХНУ ім. В.Н.Каразіна, а також прижиттєвого дослідження вибірок амфібій з різних локалітетів Харківської області. Інших спеціальних досліджень аномалій земноводних в Харківській області не проводили.

Однією з проблем при вивченні аномалій є виявлення основного фактора, що викликає аномалії. На даний час не існує єдиної точки зору з приводу причин виникнення морфологічних аномалій у амфібій (Спирина, 2009). До природних факторів, що викликають відхилення, відносять: мутації і взаємодію генів (внутрішні фактори), вплив слизу риб, хижаків, а також пошкодження метацеркаріями трематод, що викликають аномальні регенерації кінцівок і порушення морфогенезу хребта (Гурвич, 2014; Файзулін, 2014; Спирина, 2009). Також до факторів, що викликають аномальні відхилення у амфібій, відносять хімічне забруднення – пестицидами, нафтою, стічними водами (в тому числі діючими на ендокринну систему амфібій), зміну клімату, збільшення кислотних опадів, хвороби, біотопічну ізоляцію (Вершинин, 1997; Некрасова, 2008). Багато авторів (Замалетдинов, 2003; Замалетдинов і др., 2008; Седалищев, 2005; Неустроева, 2012; Байтимилова, Вершинин, 2014; Берзин, 2014; Вершинин, 2014; Файзулін, 2014) відзначали чутливість амфібій до антропогенних змін середовища та виникнення внаслідок цього аномалій, адже всі етапи розвитку

земноводних протікають поза організмом самки, яйце амфібій не має зародкових оболонок, тому амфібії є найбільш чутливими до забруднень серед хребетних тварин.

За характером прояву аномалії поділяються на *фонові* (постійно проявляються у невеликій частки особин, за поріг фонові зустрічальності приймається частка аномальних особин в 5 %) і *масові* (зустрічаються у більшості особин) (Закс, 2008).

Аномалії амфібій, як і інших тварин, підрозділяються на *зовнішні* (можна виявити при зовнішньому огляді тварини) та *внутрішні* (наприклад, скелетні або гістологічні, які виявляються при використанні спеціальних гістологічних методів).

Мета даної роботи – дослідити різноманітність зовнішніх аномалій амфібій Харківської області.

Методика

Матеріалом для даної роботи послуговували вибірки амфібій з фондкових колекцій Музею природи Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна:

- 46 особин *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1761);
- 17 особин *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768);
- 61 особина *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761);
- 121 особина *Pelobates vespertinus* (Pallas, 1771);
- 41 особина *Hyla orientalis* (Bedriaga, 1890);
- 443 особини *Bufo viridis* (Laurenti, 1768);
- 248 особин зелених жаб (представники *Pelophylax esculentus* complex);
- 108 особин *Rana arvalis* (Nilsson, 1842).

Матеріали фондкових колекцій музею були зібрані на території Харківської обл., в основному в період з 2003 по 2007 роки. Дані вибірки є об'єднаними, тому що особини зібрані з різних локалітетів.

В ході проведення польових досліджень прижиттєво вивчені вибірки:

- 427 особин *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758), зібрані під час нересту 3.04.2016 в Іськовому ставі (с. Гайдари Зміївського р-ну, Харківська обл.);
- 5 особин *Pelophylax ridibundus* і 20 особин *Pelophylax esculentus* (Харківська обл., Зміївський р-н, околиці с. Велика Гомольша, став Добрік), а також 6 особин *Pelophylax esculentus* (Харківська обл., Зміївський р-н, околиці с. Гайдари, Іськів став), зібрані під час нересту 24.05.2016;
- 38 особин *Pelophylax ridibundus* і 22 особини *Pelophylax esculentus*, зібрані 5.07.2016 на березі та в руслі р. Сіверський Донець (околиці с. Гайдари, Зміївський р-н, Харківська обл.);
- 29 цьоголітків *Pelophylax ridibundus*, зібрані 15.07.2016 в озері на кордоні бору і солончакової тераси (Харківська обл., Дворічанський р-н, с. Лиман 2);
- 148 цьоголітків *Bufo viridis*, зібрані 16.07.2016 в тимчасовій водоймі в балці на крейдяному схилі (НПП Дворічанський, околиці с. Червоне, Дворічанський р-н, Харківська обл.);
- 127 особин *Bufo bufo*, зібрані 25.03.2017 в Іськовому ставі (с. Гайдари Зміївського р-ну, Харківська обл.);
- 148 цьоголітків *Pelobates vespertinus*, зібраних 15.07.2017 на території НПП Дворічанський (заплава р. Оскіл);
- 51 особина *Pelophylax esculentus* (21 ad., 30 juv.) і 8 особин *Pelophylax ridibundus* (4 ad., 4 juv.) зібрані 19.09.2017 в м. Мерефа, Харківський р-н;
- 25 особин *Pelophylax ridibundus* і 17 особин *Pelophylax esculentus* (м. Харків, р. Уди, Жовтневе вдсх., 02.06.2018);
- 78 особин *Pelobates vespertinus*, зібрані 13.08.2018 на земельній ділянці в с. Лиман, Вовчанський р-н.

Всього опрацьовано 2234 амфібії, зібрані в різний час на території Харківської області (як вибірки живих амфібій, так і матеріали фондкових колекцій Музею природи).

Аномалії амфібій визначалися візуально, відповідно до класифікації В.Л.Вершиніна (Вершинин, 2015) і О.Д.Некрасової (Некрасова, 2008, 2014). За основу взята класифікація О.Д.Некрасової. Вона доповнена деякими аномаліями, які виділяв у своїх роботах В.Л.Вершинін.

Для оцінки зустрічальності аномалій амфібій в природі були підраховані наступні показники.

1. Зустрічальність особин з аномаліями (P_{as}).

Її слід оцінювати як частку аномальних особин (N_{as}) від усіх особин у вибірці (N), тобто $P_{as} = N_{as}/N$. Даний показник часто використовується в польових дослідженнях, в тому числі в

порівняльних цілях, наприклад, для зіставлення різних видів, популяцій або вікових груп в межах одного виду (Боркин и др., 2012).

2. Зустрічальність конкретних аномалій (A).

Нерідко в популяції виявляється не одна, а кілька різних категорій аномалій. У таких випадках можна оцінити зустрічальність кожної з них окремо. *Парціальна зустрічальність аномалії* (A_p , %). Цей показник вказує на частку особин у вибірці, що мають дану аномалію. Її слід обчислювати як кількість особин з даною аномалією у відсотках від усіх особин у вибірці, N (тобто нормальних і аномальних) (Боркин и др., 2012).

3. Спектр (різноманітність) аномалій (S_a).

Різноманітність аномалій сама по собі вже становить певний інтерес, особливо в порівняльному аспекті (порівняння різних популяцій одного і того ж виду, порівняння різних видів, зіставлення вікових і статевих угруповань). Найпростіший спосіб – це підрахунок числа різних варіантів аномалій (Боркин и др., 2012).

Результати та обговорення

В ході виконання роботи у вибірках амфібій було виявлено 17 варіантів морфологічних аномалій: брахідактилія, олігодактилія, ектромелія, поліфалангія, потовщення пальця, повернена фаланга, синдактилія, шизодактилія, ектродактилія, шкірний виріст на пальці і виріст на стопі, таумелія, гемімелія, відсутність плавальної перетинки, а також анофтальмія, брахіцефалія, порушення фону і малюнка тіла. Всі виявлені відхилення (крім анофтальмії, брахіцефалії та порушення пігментації) – це аномалії кінцівок, які є найменш шкідливими, тому особини з такими відхиленнями зазвичай життєздатні.

Для кожного виду підрахована зустрічальність особин з аномаліями (P_{as}). Для всіх аномалій підрахована парціальна зустрічальність аномалій (A_p) (табл.).

Брахідактилія, або короткі пальці (зменшення кількості фаланг) – найбільш масова аномалія, яка зустрічається у обстежених амфібій. Становить майже половину зареєстрованих випадків морфологічних відхилень. Виявлена у представників *Pelophylax esculentus* complex, *B. bufo*, *B. viridis*, *P. vespertinus*, *B. bombina*, *L. vulgaris*, *T. cristatus* (рис. 1).

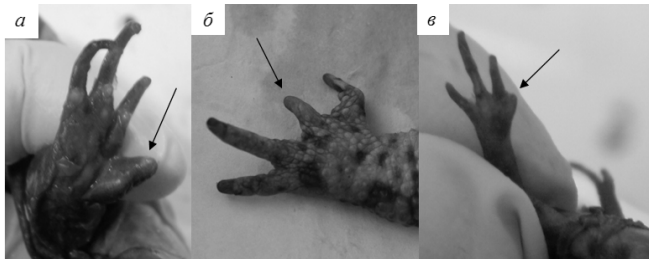


Рис. 1. Брахідактилія у *P. ridibundus* (а), *B. bufo* (б), *L. vulgaris* (в)

Олігодактилія – відсутність цілих пальців. Ця аномалія за масовістю посідає друге місце. Виявлено у представників всіх досліджуваних видів, крім *T. cristatus* (рис. 2).

Шизодактилія – розгалуження пальців. Відзначено у двох особин *P. ridibundus* (у дорослого самця і цьоголітка) з однієї популяції (рис. 3) та у інших амфібій. У жаб розгалуження пальців симетричне, що говорить про генетичне походження аномалії (Вершинин, 1997).

Повернений сегмент кінцівки. Дана аномалія представлена повернутою фалангою 7 пальця (у 3-х особин *B. bufo*) (рис. 4а) і поверненим зап'ястям у *B. viridis*.

Поліфалангія (часткове дублювання фаланг пальців) виявлена у одного екземпляра *L. vulgaris* (рис. 4б). Екземпляр зібраний у 2006 р. у Коряковому Яру (околиці с. Гайдари).

Синдактилія (зрослені пальці) виявлена у самця *B. bufo* з популяції на Іському ставі (зрослися V і VI пальці передньої кінцівки), а також у цьоголітка *B. viridis* (зрослися усі пальці на задній лівій кінцівці) – рис. 4в.

Таблиця.

Дані зустрічальності аномалій амфібій Харківської області

Вид	Кількість обстежених особин, N	Кількість особин з аномаліями, N_{as}	Зустрічальність особин з аномаліями P_{as} , %	Типи аномалій	Парціальна зустрічальність аномалій A_p , %
<i>Pelophylax esculentus</i> complex	469	16	3,4	Брахідактилія	1,7
				Олігодактилія	0,6
				Шизодактилія	0,6
				Ектродактилія	0,2
				Шкірний виріст на пальці	0,2
				Виріст на стопі	0,2
				Таумелія	0,4
<i>Rana arvalis</i>	108	1	0,9	Олігодактилія	0,9
<i>Bufo bufo</i>	554	18	3,2	Брахідактилія	1,6
				Олігодактилія	0,9
				Потовщення пальця	0,2
				Повернута фаланга	0,5
				Синдактилія	0,2
				Шизодактилія	0,2
<i>Bufo viridis</i>	591	49	8,3	Брахідактилія	1,3
				Олігодактилія	0,3
				Ектромелія	0,2
				Синдактилія	0,2
				Повернутий сегмент кінцівки	0,2
				Гемімелія	1,3
				Порушення пігментації шкіри	4,9
<i>Pelobates vespertinus</i>	347	9	2,6	Брахідактилія	0,6
				Олігодактилія	0,3
				Шизодактилія	0,3
				Гемімелія	0,8
				Таумелія	0,3
				Анофтальмія	0,3
<i>Bombina bombina</i>	61	4	6,5	Брахідактилія	1,6
				Олігодактилія	3,3
				Ектродактилія	1,6
				Відсутність плавальної перетинки	1,6
<i>Hyla orientalis</i>	41	1	2,4	Олігодактилія	2,4
<i>Lissotriton vulgaris</i>	46	21	45,6	Брахідактилія	23,9
				Олігодактилія	15,2
				Ектромелія	2,1
				Поліфалангія	2,1
				Анофтальмія	2,1
<i>Triturus cristatus</i>	17	2	11,7	Брахідактилія	5,8
				Шизодактилія	5,8

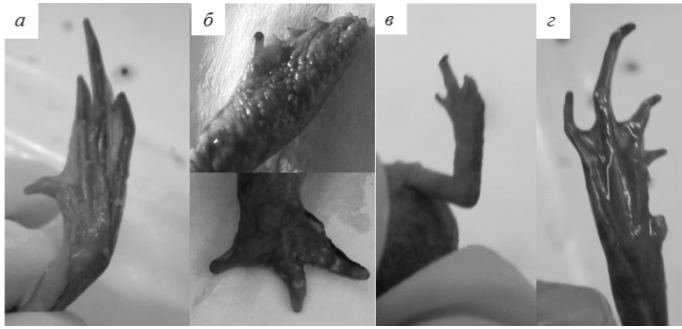


Рис. 2. Олігодактилія у *P. ridibundus* (а), *B. bufo* (б), *L. vulgaris* (в) та *R. arvalis* (г)

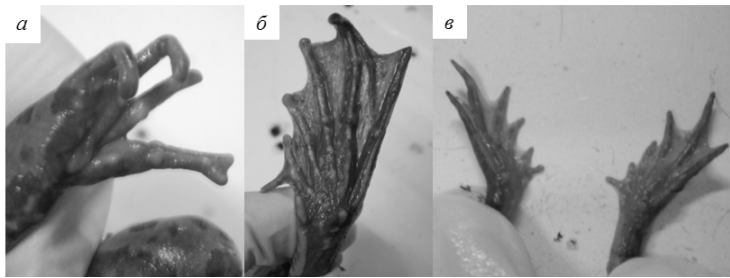


Рис. 3. Шизодактилія: у дорослої особини *P. ridibundus* – на передніх (а) та задніх (б) кінцівках; у цьоголітка *P. ridibundus* (в)

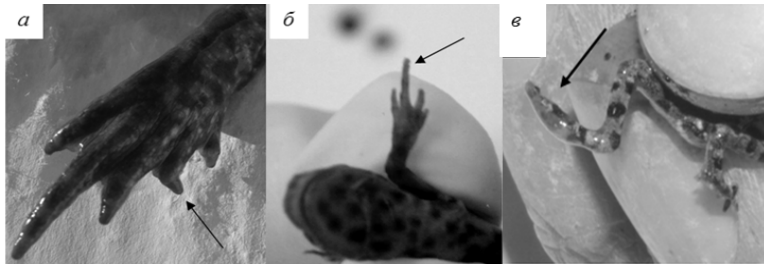


Рис. 4: а – повернута фаланга у *B. bufo*; б – поліфалангія II пальця у *L. vulgaris*; в – синдактилія у *B. viridis*

Ектродактилія – відсутність цілих пальців, аномалії у вигляді клешні. Це відхилення зазначено у одного самця *P. esculentus*: на задній кінцівці присутній тільки один палець у вигляді гака (рис. 5а). Екземпляр зібраний у 2005 р. в околицях м. Мерефи. Також аномалія виявлена у *B. bombina*.

Шкірний виріст на пальці (рис. 5б) та **виріст на стопі** (рис. 5в) зареєстровані в однієї зеленої жаби на задній кінцівці.

Таумелія – сильне порушення плану будови кінцівки. Аномалія знайдена у самки *P. esculentus* (став Добрик, с. Велика Гомільша, нерест 24 травня 2016 р.) (рис. 6а) та у однієї особини *P. vespertinus*.

Ектромелія – відсутність (вкорочення) будь-якої частини кінцівки. Виявлено у одного екземпляра *L. vulgaris* (у тритона вкорочена права передня кінцівка), а також у цьоголітка *B. viridis* (укорочена задня ліва кінцівка) – рис. 6б. Можливо, кінцівка втрачена внаслідок травми або впливу хижаків.

Анофтальмія – відсутність ока. Одна анофтальмічна особина *P. vespertinus* була знайдена у с. Лиман Вовчанського району (рис. 6в). Також одна анофтальмічна особина звичайного тритона була виявлена після метаморфозу при розведенні в лабораторії тритонів, пійманих в урочищі Добра балка (Харківський р-н).

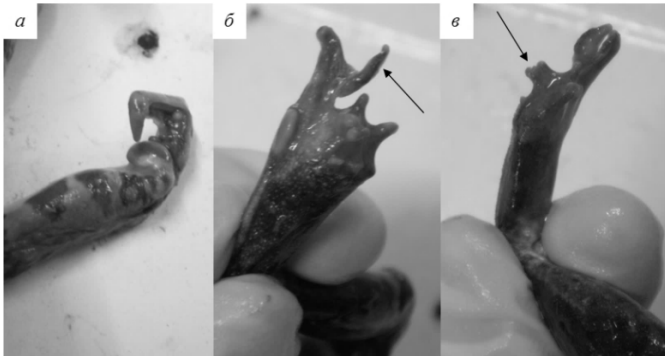


Рис. 5. Ектродактилія (а), шкірний виріст на пальці (б) і виріст на стопі (в) у зелених жаб

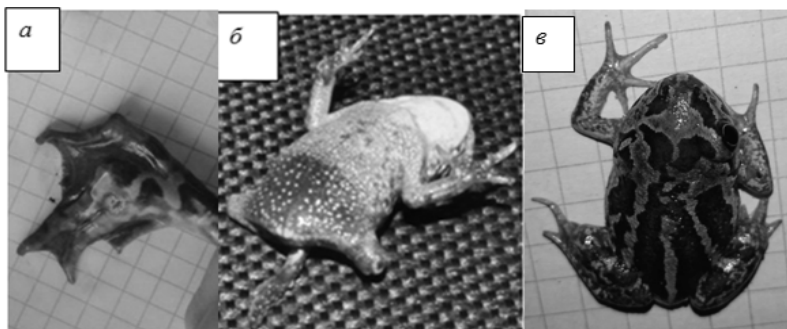


Рис. 6: а – таумелія у *P. esculentus*; б – ектромелія задньої кінцівки у *B. viridis*; в – анофтальмія у *P. vespertinus*

Потовщення 4 пальця на лівій кінцівці відзначено у однієї самки *B. bufo*. Відсутність плавальної перетинки між 1 і 2 пальцями задньої кінцівки виявлено у *B. bombina*.

Геміmelія – відсутність або редукція дистальної частини кінцівки. Масово виявлена у вибірці *B. viridis* (8 особин з 39), зібраної у ставі серед полів в с. Каплунівка (Краснокутський р-н, нерест 2001 р.). У ропух відсутня плюсна (іноді разом з предплюсною) на одній або обох задніх кінцівках. Також виявлена у 3 особин *P. vespertinus*, зібраних на присадибній ділянці (рис. 7).

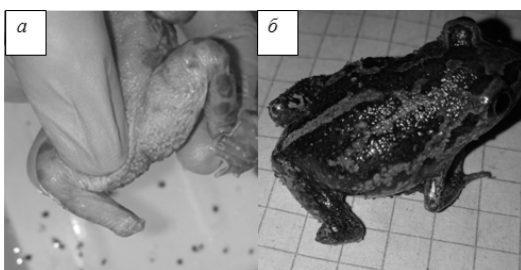


Рис. 7. Геміmelія у *B. viridis* (а) та *P. vespertinus* (б)

У 29 цьоголітків (з 148) *Bufo viridis* (19,6 %), з вибірки, зібраної у тимчасовій водоймі у балці на крейдяному схилі (НПП Дворічанський) спостерігалися темні плями на різних частинах тіла: на череві, боках, спині, грудях, голові, задніх кінцівках (рис. 8). 6 цьоголітків з такими плямами були вилучені з популяції і вирощені в лабораторії. У міру зростання особини плями світлішали. На їх місці фон ставав темніше, а малюнок тіла світліше, що свідчить про наявність масової аномалії, пов'язаної з порушенням пігментації шкіри. Таким чином, нами виявлено й описано новий тип аномалії забарвлення тіла.

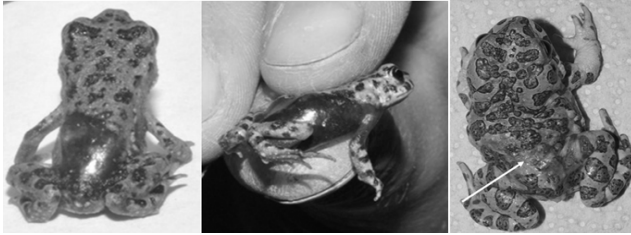


Рис. 8. Темні плями на тілі цюголітків *B. viridis* та порушення пігментації у дорослої особини

Також слід відмітити, що при вирощуванні нами в лабораторних умовах пуголовків *Rana arvalis*, при проходженні ними метаморфозу були помічені цюголітки з тупомордістю ($N=21$, що склало приблизно 27 % від особин, які пройшли метаморфоз). Дані особини мали скошені та укорочені голови (рис. 9), а також меншу масу та довжину тіла, ніж цюголітки з нормальною головою (аномальні особини значуще (застосований критерій Стьюдента) відрізняються за масою та довжиною тіла). За класифікацією В.Л.Вершиніна (Вершинин, 2015) і О.Д.Некрасової (Некрасова, 2008; 2014), ймовірно, це брахіцефалія. Але це питання потребує подальших досліджень, адже ми не спостерігали за даними особинами при їх подальшому рості і розвитку.



Рис. 9. Брахіцефалія у *Rana arvalis*

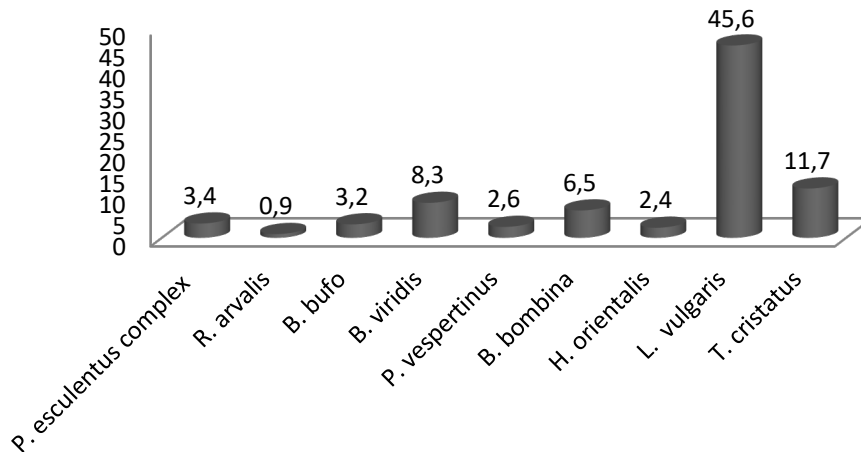


Рис. 10. Зустрічальність особин з аномаліями P_{as} , %

За допомогою χ^2 Пірсона порівнювалися представники різних видів амфібій за кількістю зареєстрованих у них аномалій. Зв'язок між видом амфібій і кількістю аномалій значущий ($p < 0,05$). Серед досліджених амфібій найбільший відсоток аномалій виявлено у *L. vulgaris* (рис. 10). Майже половина оглянутих екземплярів мала морфологічні відхилення (див. табл.). Але потрібно враховувати малий розмір вибірки звичайних тритонів. Можливо, якщо вибірку збільшити, то частка аномальних особин стане меншою.

Вибірка гребінчастих тритонів теж не репрезентативна – 17 особин, з яких аномальні тільки 2, але це становить 11,7 %. Тому, хоч частка аномальних особин в цій вибірці і перевищує 5 %, ми не можемо сказати, що у гребінчастих тритонів аномалії масові.

У зелених ропух частка аномальних особин становить 8,3 % при $N = 591$.

У зелених жаб, сірих ропух, землянок, райок і гостромордих жаб зустрічальність особин з аномаліями низька – $P_{as} < 5\%$ (див. табл.). Аномалії небагатьох особин можна віднести до їх звичайної або фонові зустрічальності в природі. Фонові аномалії проявляються при нормальному розвитку популяції у невеликої її частини (аномалії на фоні норми).

Найменший відсоток особин з аномаліями відзначений у *R. arvalis* ($P_{as} = 0,9\%$). При роботі з матеріалами музейних колекцій виявлена тільки одна жаба з олігодактилією. Можливо, це пов'язано з тим, що *R. arvalis* – наземні жаби. На відміну від них, зелені жаби та червоночеревні джерелянки (для них частка аномальних особин становить 3,8 % і 6,5 % відповідно) постійно взаємодіють з водним середовищем, в якому розчиняються різні забруднюючі речовини. Тому у них зустрічальність аномалій вища.

Висновки

У амфібій Харківської області виявлено 17 варіантів морфологічних аномалій: брахідактилія, олігодактилія, ектромелія, поліфалангія, потовщення пальця, повернена фаланга, синдактилія, шизодактилія, ектродактилія, шкірний виріст на пальці і виріст на стопі, таумелія, геміmelія, відсутність плавальної перетинки, а також анофтальмія, брахіцефалія, порушення фону і малюнка тіла.

Виявлено та описано новий тип аномалії забарвлення тіла у цьоголітків *B. viridis*.

Аномалії амфібій Харківської області розподілені серед вибірок нерівномірно: найбільш висока зустрічальність особин з аномаліями зареєстрована у *L. vulgaris*: $P_{as} = 44,4\%$.

У всіх вибірках безхвостих амфібій (крім *B. viridis* і *B. bombina*) зареєстрована фонові зустрічальність особин з аномаліями, яка не перевищує 5 %.

Список літератури / References

- Байтиминова Е.А., Вершинин В.Л. (2014). Оценка оплодотворяющей способности сперматозоидов и случай гермафродитизма у озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*, Pallas, 1771) в условиях антропогенно-измененных ландшафтов / Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды. Мат. межд. школы-конф. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, с. 6–12. [Baytimirova Ye.A., Vershinin V.L. (2014). Evaluation of the fertilizing ability of spermatozoa and the case of hermaphroditism in a lake frog (*Pelophylax ridibundus*, Pallas, 1771) in conditions of anthropogenically altered landscapes. *Anomalies and pathologies of amphibians and reptiles: methodology, evolutionary significance, the ability to assess environmental health*. Mat. Int. Conf. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University, pp. 6–12.]
- Берзин Д.Л. (2014). Аномалии у сеголеток обыкновенного тритона (*Lissotriton vulgaris* L., 1758) на урбанизированных территориях / Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды. Мат. межд. школы-конф. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, с. 19–24. [Berzin D.L. (2014). Anomalies in fingerlings of the common newt (*Lissotriton vulgaris* L., 1758) in urban areas. *Anomalies and pathologies of amphibians and reptiles: methodology, evolutionary significance, the ability to assess environmental health*. Mat. Int. Conf. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University, pp. 19–24.]
- Боркин Л.Я., Безман-Мосейко О.С., Литвинчук С.Н. (2012). Оценка встречаемости морфологических аномалий в природных популяциях (на примере амфибий). *Труды Зоологического института РАН*, 316(4), 324–343. [Borkin L.Ya., Bezman-Moseyko O.S., Litvinchuk S.N. (2012). Estimation of the occurrence of morphological anomalies in natural populations (by the example of amphibians). *Proceedings of Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences*, 316(4), 324–343.]
- Вершинин В.Л. (2015). Основы методологии и методы исследования аномалий и патологий амфибий. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2015. 80 с. [Vershinin V.L. (2015). *The basics of methodology and research methods of anomalies and pathologies of amphibians*. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University. 80 p.]
- Вершинин В.Л. (1997). Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург. 48 с. [Vershinin V.L. (1997). *Ecological*

- features of the amphibian populations of urbanized territories. Abstract of the thesis for the Degree of the Doctor of Biological Sciences. Yekaterinburg. 48 p.]
- Вершинин В.Л. (2014). Функциональные особенности популяций амфибий в градиенте урбанизации. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 16(5), 344–348. [Vershinin V.L. (2014). Functional features of amphibian populations in urbanization gradient. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 16, (5), 344–348.]
- Войткевич А.А. (1948). Феномен наследственного извращения реализации формообразовательной потенции. Докл. АН СССР, 60(2), 305. [Voytkevich A.A. (1948). The phenomenon of hereditary distortion of the realization of formative potency. *Doklady of the Academy of Sciences of USSR*, 60(2), 305.]
- Гурвич А.Н. (2014). Изменчивость скелета и аномалии сеголеток сибирской лягушки (*Rana amurensis*) / Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды. Мат. междунар. школы-конф. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, с. 75–80. [Gurvich A.N. (2014). Variability of the skeleton and anomalies of Siberian frog yearlings (*Rana amurensis*). *Anomalies and pathologies of amphibians and reptiles: methodology, evolutionary significance, the ability to assess environmental health*. Mat. Int. Conf. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University, pp. 75–80.]
- Закс М.М. (2008). О морфологических аномалиях зеленых лягушек (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*) г. Пензы. *Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г.Белинского*, 10(14), 63–65. [Zaks M.M. (2008). On the morphological anomalies of green frogs (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*) in Penza. *Bulletin of the V.G.Belinsky Penza State Pedagogical University*, 10(14), 63–65.]
- Замалетдинов Р.И. (2003). Морфологические аномалии в городских популяциях бесхвостых амфибий (на примере г. Казани). *Современная герпетология*, 2, 148–153. [Zamaletdinov R.I. (2003). Morphological anomalies in urban populations of tailless amphibians (on the example of Kazan). *Current Studies in Herpetology*, 2, 148–153.]
- Замалетдинов Р.И., Файзулин А.И., Чихляев И.В. (2008). Результаты и перспективы исследования земноводных, обитающих на урбанизированных территориях Среднего Поволжья / Вопросы герпетологии. Материалы III съезда Герпетологического общества им. А.М.Никольского. СПб, с. 130–135. [Zamaletdinov R.I., Fayzulin A.I., Chihlyayev I.V. (2008). Results and prospects for the study of amphibians living in urban areas of the Middle Volga. *Issues of herpetology*. Materials of the III Congress of the A.M.Nikolsky Herpetological Society. St. Petersburg, pp. 130–135.]
- Микитинец Г.И. (2014). География встречаемости морфологических аномалий в популяциях бесхвостых амфибий степной зоны Украины / Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды. Мат. междунар. школы-конф. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, с. 136–144. [Mikitinets G.I. (2014). Geography of occurrence of morphological anomalies in populations of tailless amphibians of the steppe zone of Ukraine. *Anomalies and pathologies of amphibians and reptiles: methodology, evolutionary significance, the ability to assess environmental health*. Mat. Int. Conf. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University, pp. 136–144.]
- Некрасова О.Д., Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю. (2007). Случай массовой полимелии у озерных лягушек (*Rana ridibunda* Pall., 1771) Киева. *Науковий вісник Ужгородського університету. Сер. біол.*, 21, 92–95. [Nekrasova O.D., Mezherin S.V., Morozov-Leonov S.Yu. The case of mass polymelia in lake frogs (*Rana ridibunda* Pall., 1771) in Kiev. *The Science Bulletin of Uzhgorod University. Ser. Biol.*, 21, 92–95.]
- Некрасова О.Д. (2008). Классификация аномалий бесхвостых амфибий. *Праці Українського герпетологічного товариства*, 1, 55–58. [Nekrasova O.D. (2008). Classification of anomalies of tailless amphibians. *Proceedings of Ukrainian Herpetological Society*, 1, 55–58.]
- Некрасова О.Д. (2014). Некоторые аспекты аномальных проявлений в окраске у амфибий / Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды. Мат. междунар. школы-конф. Екатеринбург: изд-во Урал. ун-та, с. 144–149. [Nekrasova O.D. (2014). Some aspects of abnormal manifestations in amphibian coloration. *Anomalies and pathologies of amphibians and reptiles: methodology, evolutionary significance, the ability to assess environmental health*. Mat. Int. Conf. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University, pp. 144–149.]
- Неустроева Н.С. (2012). Морфологическая изменчивость скелета представителей рода *Rana* в условиях антропогенной дестабилизации среды. Дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург. – 127 с.

(<http://www.dissercat.com/content/morfologicheskaya-izmenchivost-skeleta-predstavitelei-roda-rana-v-usloviyakh-antropogennoi-d/>) [Neustroyeva N.S. (2012). *Morphological variability of the skeleton of representatives of the genus Rana under conditions of anthropogenic destabilization of the environment*. Thesis for the Degree of the Candidate of Biological Sciences. Yekaterinburg, 2012. 127 p.]
Седалищев В.Т. (2005). Сибирская лягушка (*Rana amurensis*) как индикатор антропогенных воздействий // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных. Материалы Межд. научн. конф. Саранск, с. 209–211. [Sedalishchev V.T. (2005). Siberian frog (*Rana amurensis*) as an indicator of anthropogenic influences. *Actual problems of environmental physiology, biochemistry and animal genetics*. Materials Int. scientific conf. Saransk, pp. 209–211.]
Спирина Е.В. (2009). Морфологические аномалии *Rana ridibunda* Pall. как индикаторы качества окружающей среды. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*, 1(21), 228–230. [Spirina Ye.V. (2009). Morphological abnormalities of *Rana ridibunda* Pall. as indicators of environmental quality. *Bulletin of the Orenburg State Agrarian University*, 1(21), 228–230.]
Файзулин А.И. (2014). Анализ морфологических аномалий в условиях антропогенной трансформации местообитаний бесхвостых земноводных / Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды. Мат. междунар. школы-конф. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, с. 171–178. [Fayzulin A.I. (2014). Analysis of morphological anomalies under the conditions of anthropogenic transformation of the habitats of tailless amphibians. *Anomalies and pathologies of amphibians and reptiles: methodology, evolutionary significance, the ability to assess environmental health*. Mat. Int. Conf. Yekaterinburg: Publishing house of Ural University, pp. 171–178.]
Vallisneri A. (1733). *Opere fisico-mediche*. Venezia (Venice). 551 p.

External morphological anomalies of the amphibians of the Kharkiv region

S.A. Katrushenko

In Ukraine, amphibian anomalies have not been sufficiently studied. The most studied regions are Kyiv region and the steppe zone of Ukraine. In the Kharkiv region, studies of external anomalies of amphibians have not been conducted before. In 2016 we have begun to study this problem. The purpose of this study is to examine the variety of external anomalies of amphibians in the Kharkiv region. The material is sampling amphibians from the stock collections of the Museum of Nature of V.N.Karazin Kharkiv National University and sampling live amphibians from different localities of the Kharkiv region, explored in the period from 2016 to 2018. Anomalies were determined visually, according to the classification of V.L.Vershinin and O.D.Nekrasova. For each the amphibian species frequency of malformed animals P_{as} (the proportion of abnormal individuals from all individuals in the sample) and partial frequency of abnormalities A_p (the proportion of individuals in the sample having this anomaly) were determined. As a result 17 variants of morphological abnormalities were identified: brachydactyly, oligodactyly, ectromelia, polyphalangy, finger thickening, rotation, syndactyly, shizodactyly, ectrodactyly, skin web and growth on the foot, thaumelia, hemimelia, lack of a swimming membrane, anophthalmia, brachycephaly and pattern abnormal. The most widespread anomaly encountered in the surveyed amphibians is brachydactyly (accounting for almost half of the reported cases of morphological abnormalities). This limb anomaly is the least harmful, so individuals with such abnormalities are usually quite viable. Amphibian anomalies are evenly distributed among samples: the highest occurrence of individuals with anomalies was recorded in *Lissotriton vulgaris*, in other samplings of frog (except *Bufo viridis* and *Bombina orientalis*), the occurrence of individuals with anomalies did not exceed five percent. A new type of body color anomaly in this year's *Bufo viridis* was also identified and described.

Key words: amphibians, external morphological anomalies, Kharkiv region, frequency of abnormalities.

About the author:

S.A. Katrushenko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, svetlanakatrusenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9709-7563>

Внешнеморфологические аномалии амфибий Харьковской области

С.А. Катрушенко

В Украине аномалии амфибий изучены недостаточно. Наиболее изученными регионами являются Киевская область и степная зона Украины. В Харьковской области исследования внешних аномалий амфибий ранее не проводились. С 2016 года нами начаты исследования этой проблемы. Цель данной работы – исследовать разнообразие внешних аномалий амфибий Харьковской области. Материалом послужили выборки амфибий из

фондовых коллекций Музея природы Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина и выборки живых амфибий из разных локалитетов Харьковской области, исследованные в период с 2016 по 2018 годы. Аномалии определяли визуально, по классификации В.Л.Вершинина и А.Д.Некрасовой. Для каждого вида амфибий определяли встречаемость особей с аномалиями P_{as} (доля аномальных особей от всех особей в выборке) и парциальную встречаемость аномалий A_p (доля особей в выборке, имеющих данную аномалию). В ходе исследования обнаружено 17 вариантов морфологических аномалий: брахидактилия, олигодактилия, эктромалия, полифалангия, утолщение пальца, повернутая фаланга, синдактилия, шизодактилия, эктродактилия, кожный вырост на пальце и вырост на стопе, таумелия, гемимелия, отсутствие плавательной перепонки, анофтальмия, брахицефалия, нарушение фона и рисунка тела. Наиболее массовой аномалией, которая встречается у обследованных амфибий, является брахидактилия (составляет почти половину зарегистрированных случаев морфологических отклонений). Данная аномалия конечностей является наименее губительной, поэтому особи с такими отклонениями обычно достаточно жизнеспособны. Аномалии амфибий распределены среди выборок неравномерно: наиболее высокая встречаемость особей с аномалиями зарегистрирована у *Lissotriton vulgaris*, в других выборках бесхвостых амфибий (кроме *Bufo viridis* и *Bombina orientalis*) встречаемость особей с аномалиями не превышала пяти процентов, что говорит об их фоновой встречаемости в природе. Также обнаружено и описано новый тип аномалии окраски тела сеголетков *Bufo viridis*.

Ключевые слова: амфибии, внешнеморфологические аномалии, Харьковская область, встречаемость аномалий.

Об авторе:

С.А. Катрушенко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, svetlanakatrusenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9709-7563>

Представлено: Н.А.Смірнов / Presented by: N.A.Smirnov

Рецензент: О.В.Коршунов / Reviewer: A.V.Korshunov

Подано до редакції / Received: 10.09.2019

UDC: 595.412:591.9

New records of tardigrade species of the *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) from Ukraine

Ye.O. Kiosya, V.V. Shuba, Ye.D. Matsko

Species of the *Macrobiotus hufelandi* group are among the most well known and commonly found tardigrades. They are reported in almost every study of Tardigrada diversity in terrestrial habitats. In spite of this, zoogeographical data on this group remain ambiguous and insufficient. Since most species of the *M. hufelandi* group have been described in the last three decades, many older records need to be confirmed or revised. In this study we aimed to investigate, which species may be present in Ukraine, since most Ukrainian records of this group are outdated. We studied samples of mosses and lichens collected from different regions of Ukraine (mainly in the East and South of the country) in 2007–2019. Tardigrades were extracted from samples and mounted on permanent slides in Faure's medium. After primary identification of genera and species groups we focused on 13 samples containing local populations of the *M. hufelandi* group. Details of animal and egg morphology were studied under high magnifications of phase contrast light microscopy. Species were identified based on morphology of the oral cavity armature, egg shell morphology, animal cuticle granulation, as well as some morphometric characters of claws and bucco-pharyngeal apparatus. This research revealed the presence of at least six different species in Ukraine: *M. glebkai* Biserov, 1990; *M. hufelandi* C.A.S. Schultze, 1834; *M. macrocalix* Bertolani & Rebecchi, 1993; *M. polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk & Lisi, 2003; *M. sottilei* Pilato, Kiosya, Lisi & Sabella, 2012; *M. vladimiri* Bertolani, Biserov, Rebecchi & Cesari, 2011. Three of them: *M. macrocalix*, *M. sottilei*, and *M. vladimiri* are reported in this study from Ukraine for the first time. Adding three more species recorded in earlier studies: *M. diversus* Biserov, 1990; *M. persimilis* Binda & Pilato, 1972, and *M. sapiens* Binda & Pilato, 1984 – gives the total count of at least 9 species of the group in Ukraine. However, according to the recent studies on species complexes the real species diversity is very likely to be higher. Nevertheless, more sampling and obtaining molecular data from different Ukrainian populations of the *M. hufelandi* group from Ukraine are required.

Key words: water bears, zoogeography, fauna, biodiversity.

About the authors:

Ye.O. Kiosya – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, yevgenkiosya@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-6432-9089>

V.V. Shuba – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, shubavladislav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4261-5228>

Ye.D. Matsko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, elizabeth.matsko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8168-7841>

Introduction

Macrobiotus hufelandi C.A.S. Schultze, 1834 was the first species of tardigrades formally described in a scientific paper. The name refers to Christoph Wilhelm von Hufeland, an adept of naturopathic medicine who promoted so called "macrobiotics" – the art of prolonging human life by special diet and healthy lifestyle (Bertolani et al., 2011b). Due to priority of description this species later became the type species (the nominal species) of the genus *Macrobiotus* which in turn became the type genus of the family Macrobiotidae.

Since then a lot of tardigrade species were described within the genus *Macrobiotus* – making it one of the most speciose genera of tardigrades. Most of these species were later found to be not so similar and not so closely related to *M. hufelandi* and transferred to the other newly erected genera: *Minibiotus* R.O. Schuster, 1980; *Paramacrobiotus* Guidetti, Schill, Bertolani, Dandekar & Wolf, 2009 – former "*Macrobiotus richtersi-areolatus* group"; *Tenuibiotus* Pilato & Lisi, 2011 – former "*Macrobiotus tenuis* group"; *Mesobiotus* Vecchi, Cesari, Bertolani, Jönsson, Rebecchi & Guidetti, 2016 – former "*Macrobiotus harmsworthi* group", and some other. Nevertheless, even revised *Macrobiotus* remains quite a large genus listing more than 100 species (Degma et al., 2019).

Among the species left within *Macrobiotus* nearly a half are attributed to the "*Macrobiotus hufelandi* group". Originally this group used to include only the species closely resembling *M. hufelandi* in details of egg morphology: eggs with processes in the shape of truncated cones usually terminated with a disc, commonly referred as "inverted-goblets" shape (Fig. 1 C), but later the criteria of inclusion were modified shifting the weight to animal morphology characters and molecular data (see the definition of the group in

Guidetti et al., 2013; the review of the included species in Kaczmarek & Michalczyk, 2017; the updated phylogenies in Stec et al., 2018a,b; Coughlan & Stec, 2019; Kayastha et al., 2020).

Species of the *M. hufelandi* group are among the most commonly found tardigrades, reported in almost every study of Tardigrada diversity in terrestrial habitats. However, zoogeographical data on this group remain ambiguous and insufficient. Most of the records from all over the world are of the nominal species (*M. hufelandi*), while many of the other species are only known from their type localities. Since the great majority of species of the *M. hufelandi* group are quite similar and hard to distinguish, many records (especially the old ones) need to be confirmed or revised and more sampling is required.

In this study we aimed to investigate, which species of *M. hufelandi* group are present in Ukraine, since most Ukrainian records of this group are rather old and outdated (see the review in Pilato et al., 2011).

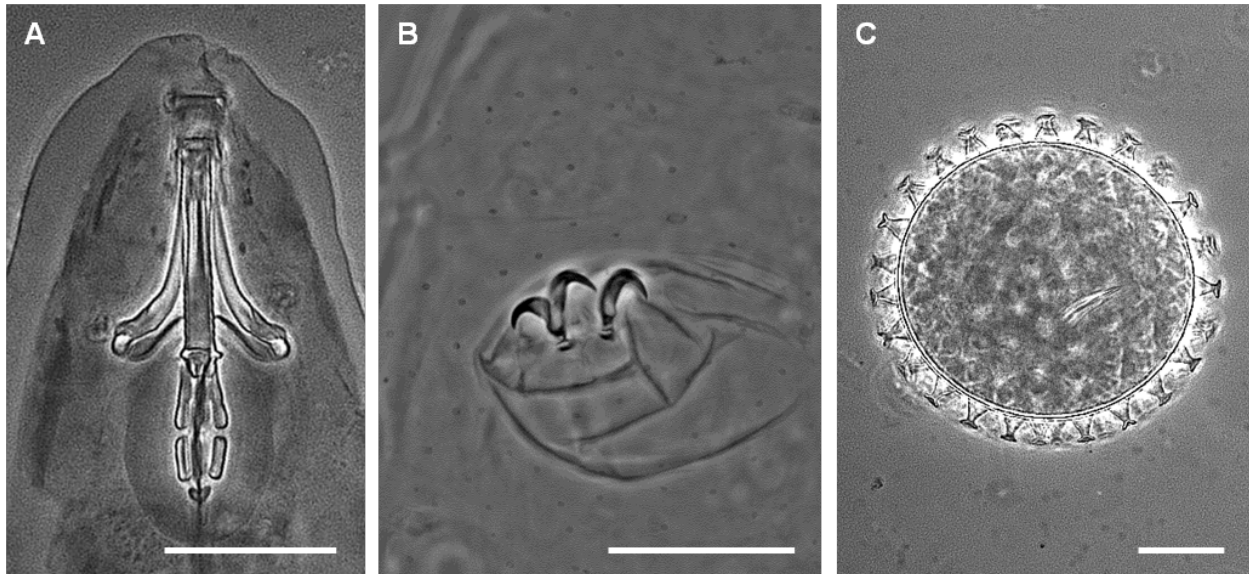


Fig. 1. Typical morphological characters of tardigrades of the *M. hufelandi* group, phase contrast, $\times 400$ (scale bars – 25 μm): A – bucco-pharyngeal apparatus with two macroplacoids and a closely positioned microplacoid, B – "V-shaped" double claws on legs and pores (pearls) in the cuticle, C – ornamented egg with "inverted goblet"-shaped processes

Methodology

Tardigrades were extracted from samples which had been collected in 2007–2019 from different regions of Ukraine. Several hundreds of small pieces of mosses and lichens were taken from soil, tree trunks, branches, rocks and other substrates, then air-dried, labeled and stored in the lab in paper envelopes at room temperature.

To process a sample, a part of it (about 1 g of dry weight) was soaked in distilled water for 1–2 hours, then shaken and squeezed. The water was drained from a sample into a Petri dish and examined under a stereomicroscope ($\times 40$ magnification, dark field). Tardigrades and their eggs were collected from water and put on the glass slides with a very fine microspatula. If tardigrades were still alive and active, they were fixed with 40 % chloral hydrate solution in acetic acid. Animals and eggs were then mounted in the Faure's medium and covered with a coverslip. After several weeks of air-drying coverslips were sealed with nail polish – to prevent excessive drying and oxidation.

We used $\times 400$ magnification of a light microscope (phase contrast) for primary identification of tardigrades found. This was sufficient to discriminate species of the *M. hufelandi* group from other eutardigrades based on their common morphological features (Fig. 1). Using the results of this primary identification, we have chosen several "referent samples" containing at least a dozen of animals and eggs of the *M. hufelandi* group species for a more detailed investigation (Table 1). We focused on these samples, because it had been shown, that studying series of many tardigrades from the same population allows more reliable measurements and identification, than studying individual specimens (Stec et al., 2016).

Fine morphology of animals and eggs from the referent samples was studied with the use of $\times 1000$ magnification of a light microscope (phase contrast, oil immersion). Species were identified based on the diagnostic key by Kaczmarek & Michalczyk (2017), and further compared with the original species descriptions. The list of characters used for identification included, but was not limited to: morphology of oral cavity armature, egg shell morphology, animal cuticle granulation, as well as some morphometric characters of claws and bucco-pharyngeal apparatus. Measurements and photomicrographs were taken at the Łukasz Michalczyk's Lab in Jagiellonian University (Kraków, Poland) and Łukasz Kaczmarek's Lab in Adam Mickiewicz University (Poznań, Poland). Permanent slides with animals and eggs from the referent samples are stored in Kiosya's collection in the V.N.Karazin Kharkiv National University.

Table 1.

List of referent samples investigated

Region	No.	Sampling locality	Sample type	Date, collector	Original sample code
Crimea AR	1	44.4229N, 33.8539E, 600 m a.s.l., Crimean Mountains: forest nearby Shaytan-Merdven mountain pass	Moss from a stone	15.08.2009, N. Khudaeva (N. Kantsedal)	БКГ-13
Donetsk Oblast	2	47.0492N, 38.1314E, 2 m a.s.l., Meotyda national nature park, Kryva spit	Lichen from a tree trunk	30.06.2009, N. Khudaeva (N. Kantsedal)	ДМБ-11-1
Kharkiv Oblast	3	49.1017N, 37.4542E, 80 m a.s.l., pine forest in the vicinity of Studenok village	Lichens from bush branches	15.07.2007, Ye. Kiosya	ИЗ-38
	4	49.6863N, 36.4657E, 85 m a.s.l., lake Chernychne shore	Moss from a branch protruding from water	04.11.2018, Ye. Kiosya	ZMS-33
Kherson Oblast	5	46.4625N, 33.8777E, 25 m a.s.l., arboretum of Askania-Nova biosphere reserve	Moss from a stone	20.06.2012, Ye. Kiosya	ASK-14
	6	47.2162N, 33.8536E, 60 m a.s.l., vicinity of Havrylivka village	Moss from a tree trunk	09.08.2019, O. Nahimova	KHG-1B
Lviv Oblast	7	48.9722N, 23.4745E, 500 m a.s.l., vicinity of Hrebeniv village	Moss from soil	05.08.2016, Ye. Kiosya	SKGR-1
Poltava Oblast	8	49.9974N, 34.0237E, 90 m a.s.l., floodplain in the vicinity of Maly Pereviz village	Lichen from tree trunk	10.07.2011, Ye. Kiosya	HT-A-62
	9	50.0294N, 34.0616E, 125 m a.s.l., pine forest in the vicinity of Kovalivka village	Moss from soil	11.07.2011, Ye. Kiosya	HT-B-76
			Moss from soil	11.07.2011, Ye. Kiosya	HT-B-95
	11	49.9976N, 34.0429E, 120 m a.s.l., oak forest in the vicinity of Maly Pereviz village	Moss from tree trunk	13.07.2011, Ye. Kiosya	HT-C-118
	12		Moss from soil	13.07.2011, Ye. Kiosya	HT-C-127
Zaporizhzhia Oblast	13	47.7715N, 35.1785E, 20 m a.s.l., Zaporizhzhia, vicinity of a rowing canal	Moss from tree trunk	26.04.2009, Ye. Kiosya	Z-31

Results and discussion

This study revealed the presence of at least six different species in Ukraine: *M. glebkai* Biserov, 1990; *M. hufelandi* C.A.S. Schultze, 1834 (diagnosis in Bertolani, Rebecchi, 1993); *M. macrocalix* Bertolani & Rebecchi, 1993; *M. polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk & Lisi, 2003; *M. sottilei* Pilato, Kiosya, Lisi & Sabella, 2012; *M. vladimiri* Bertolani, Biserov, Rebecchi & Cesari, 2011. Three of them: *M. macrocalix*,

M. sottilei, and *M. vladimiri* are reported here from Ukraine for the first time. Most of these species had typical "hufelandi-like eggs" and could only be differentiated based on small details of animal and egg morphology. The only species strikingly dissimilar in egg morphology was *M. glebkai*. In this species the processes of the egg chorion are quite large (around 20 µm in height) and have elongated tips rather than terminal discs (Fig. 2). Adding three more species recorded in earlier studies: *M. diversus* Biserov, 1990; *M. persimilis* Binda & Pilato, 1972 and *M. sapiens* Binda & Pilato, 1984 – gives the total count of 9 species of the group in Ukraine (see the list in Table 2, the map of the records in Fig. 3).

Table 2.

List of species of the *Macrobiotus hufelandi* group recorded in Ukraine

Species	Type locality	Ukrainian localities*	References	Specimens found in this study**
<i>M. diversus</i>	Russia: Bashkortostan	Crimea AR: Karasivka	Pilato et al., 2011	-
<i>M. glebkai</i>	Russia: Dimitrovgrad	Crimea AR: unsp. localities	Pilato et al., 2011	-
		Kharkiv Obl.: Studenok	Pilato et al., 2011	-
		Kherson Obl.: sample 6	This study	30A + 6E
		Poltava Obl.: sample 8	This study	40A + 6E
		Zaporizhzhia Obl.: sample 13	This study	28A + 6E
<i>M. hufelandi</i>	Germany: Freiburg	Poltava Obl.: sample 9	This study	26A + 8E
<i>M. macrocalix</i>	Italy: Gaianello	Lviv Obl.: sample 7	This study	43A + 26E
		Poltava Obl.: sample 11	This study	15A + 7E
<i>M. persimilis</i>	Italy: Sicily	Crimea AR: unsp. localities	Pilato et al., 2011	-
<i>M. polonicus</i>	Poland: Poznań	Crimea AR: sample 1	This study	45A + 30E
		Crimea AR: Mtn. Opuk	Pilato et al., 2011	-
		Donetsk Obl.: sample 2	This study	13A + 12E
		Kherson Obl.: sample 5	This study	14A + 4E
<i>M. sapiens</i>	Italy: Sicily	Crimea AR: unsp. localities	Pilato et al., 2011	-
		Kyiv Obl.: Chernobyl	Pilato et al., 2011	-
<i>M. sottilei</i>	Belarus: Zhodino	Kharkiv Oblast: sample 3	This study	32A + 3E
		Poltava Oblast: sample 12	This study	30A + 17E
<i>M. vladimiri</i>	Italy: Andalo	Kharkiv Oblast: sample 4	This study	54A + 7E
		Poltava Oblast: sample 10	This study	40E + 6E

Notes:

* Referent sample numbers are given according to Table 1.

** A – number of animals (adult or juvenile tardigrades) found, E – number of eggs found.

All the species recorded in Ukraine had been described from other European localities. Here we present a brief overview of their known distribution outside Ukraine.

M. diversus was described from Bashkortostan, Russia (Biserov, 1990b) and later reported only from Poznań, Poland (Rost-Roszkowska et al., 2018).

M. glebkai is currently known outside Ukraine only from its type locality in Ulyanovsk Oblast, Russia (Biserov, 1990a).

M. hufelandi was reported from nearly all parts of the world, but after the redescription in 1993 only the records from neotype locality in Germany (Bertolani, Rebecchi, 1993) and Pomerania Province, Poland (Kaczmarek et al., 2018) can be treated as reliable, as they were based on the DNA barcoding and/or detailed morphological investigation with phase contrast microscopy and scanning electron microscopy. The rest of the reports of *M. hufelandi* or *M. cf. hufelandi* are ambiguous and should be reevaluated.

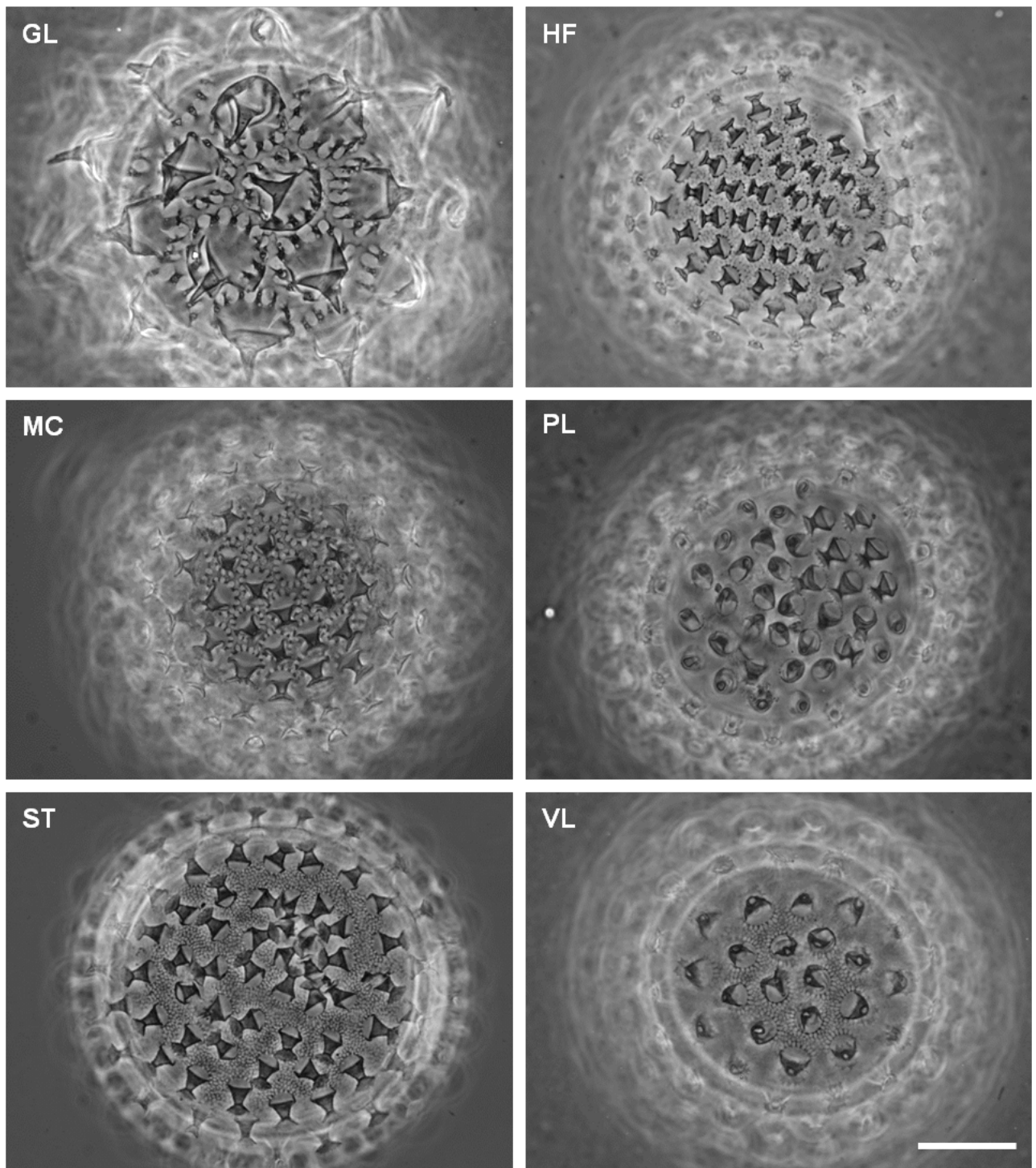


Fig. 2. Egg shell morphology of six newly found species of the *M. hufelandi* group, phase contrast, x1000, oil immersion (scale bar – 25 μ m, all photos are in the same scale): GL – *M. glebkai* (8), HF – *M. hufelandi* (9), MC – *M. macrocalix* (7), PL – *M. polonicus* (1), ST – *M. sottilei* (3), VL – *M. vladimiri* (4). Note the differences in shape and size of the processes and the details of egg shell surface between the processes

Note: numbers given in brackets after species names are referent samples from Table 1.

M. macrocalix was identified with a molecular approach in Italy (Cesari et al., 2009), Sweden (same ref.), Poland (Stec et al., 2018b) and Portugal (Vicente et al., 2013), while specimens identified based exclusively on morphology were also reported from Austria (Michalczyk, Kaczmarek, 2003), Albania (Vargha, 2011), Spain (Guil, 2008), and Seychelles Islands (Pilato et al., 2002).

M. polonicus was earlier reported only from its type locality in Wielkopolska Province in Poland (Pilato et al., 2003) and Pomerania Province (Kaczmarek et al., 2018), also in Poland.



Fig. 3. Records of species of the *M. hufelandi* group in Ukraine (corresponds with Table 2): DV – *M. diversus*, GL – *M. glebkai*, HF – *M. hufelandi*, MC – *M. macrocalix*, PL – *M. polonicus*, PR – *M. persimilis*, SP – *M. sapiens*, ST – *M. sottilei*, VL – *M. vladimiri*. Old records of *M. hufelandi* and records of *M. cf. hufelandi* are not included

Note: aggregation of overlapping symbols in Poltava Oblast and Kharkiv Oblast represent species found in the same locality or very close localities, while the aggregation of overlapping symbols in Crimea represent species found in several distant localities in Crimean Mountains.

M. sottilei described from Zhodino, Belarus (Pilato et al., 2012) was later reported from Pomerania Province, Poland (Kaczmarek et al., 2018) and also Trento and Olbia-Tempio Provinces, Italy (Roszkowska, 2019).

M. vladimiri described from Andalo, Italy (Bertolani et al., 2011a) was also reported from several other localities in Italy (Roszkowska et al., 2019), Germany (Bertolani et al., 2011b), and Poland (Nowak, Stec, 2017; Kaczmarek et al., 2018).

As for *M. persimilis* and *M. sapiens* described from Sicily, Italy (Binda, Pilato, 1972, 1984), the situation is complicated. Although they were repeatedly recorded not only in Europe outside their *locus typicus*, but also in Asia (Biserov, 1999), Africa (McInnes et al., 2017) and even America (Kaczmarek et al., 2014, 2016), these records have to be treated with special caution, as the original descriptions (especially

the one of *M. sapiens*) lack some vital taxonomic information (Kaczmarek, Michalczyk, 2017). If these two species are redescribed in future, the records of them in Ukraine will also need confirmation.

To summarize, this study extends the known distribution range of *M. macrocalix*, *M. polonicus*, *M. sottilei*, and *M. vladimiri* to the East. Although as we shown at least nine *M. hufelandi* species can be found in Ukraine, the real species diversity in the country is very likely to be higher. More sampling in different regions and ecosystems is needed to evaluate the species richness and patterns of the species distribution properly. Noteworthy, it is not just about poor knowledge of tardigrades in Ukraine; similar situation was already reported for Poland (Kaczmarek et al., 2018), Belarus (Pilato et al., 2012), Romania (Ciobanu et al., 2014), Bulgaria (Yankova et al., 2016) and some other neighboring countries. The distribution ranges of many tardigrade species are not quite clear even in the regions where intense research had been performed in the past. As more and more species are being described and redescribed, it gets necessary to reevaluate the older records. In this study we show, that some species can be morphologically recognized – even on the slides which are more than 10 years old. However, tardigrades have many species complexes which are almost cryptic or pseudocryptic, so implementation of molecular tools would be crucial for proper assessment of species boundaries and their distribution ranges (e.g. Guidetti et al., 2019; Stec et al., 2020).

Conclusion

The diversity of tardigrades of *M. hufelandi* group in Eastern Europe is poorly understood. There are a lot of reports of *Macrobiotus hufelandi* or *Macrobiotus* cf. *hufelandi* from many different localities, but in fact most of them may represent some other species of the group. This study confirmed the presence of the nominal species in Ukraine, but also revealed several similar species. The total count of species of the group recorded in Ukraine is now elevated to 9. It is very likely that the total number of species of the *M. hufelandi* group is much higher, however, more sampling and studies that use integrative taxonomy approach are needed to elucidate the true species diversity of the *M. hufelandi* group in our country.

Acknowledgements

Most measurements and photomicrographs needed for species identification were taken at the Łukasz Michalczyk's Lab, Jagiellonian University, Kraków, Poland with equipment purchased from the Sonata Bis programme of the Polish National Science Centre (grant no. 2016/22/E/NZ8/00417). We thank Prof. Łukasz Michalczyk for his kind support during this project.

We are highly indebted to Prof. Łukasz Kaczmarek from Adam Mickiewicz University in Poznań and Daniel Stec from Jagiellonian University in Kraków who invested a lot of time and effort to teach us how to identify tardigrades of the *M. hufelandi* group.

Amphibians population ecology group of KhNU kindly assisted YK in using the equipment of the collective usage center of KhNU for some preliminary studies.

We acknowledge the help of Prof. Roberto Bertolani and his team at the University of Modena and Reggio Emilia who supported the first research of *M. glebkai* by YK in Ukraine back in 2010.

Last, but not least, authors are grateful to people who helped to collect or process particular samples: Natalia Kantsedal, Olena Nahimova, Ilya Parinov, Roman Beketov, Anastasiia Polishchuk and Dmitry Frolov.

References

- Bertolani R., Rebecchi L. (1993). A revision of the *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada, Macrobiotidae), with some observations on the taxonomic characters of eutardigrades. *Zoologica Scripta*, 22, 127–152. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.1993.tb00347.x>
- Bertolani R., Biserov V., Rebecchi L., Cesari M. (2011a). Taxonomy and biogeography of tardigrades using an integrated approach: new results on species of the *Macrobiotus hufelandi* group. *Invertebrate Zoology*, 8(1), 23–36. <https://doi.org/10.15298/invertzool.08.1.05>
- Bertolani R., Rebecchi L., Giovannini I., Cesari M. (2011b). DNA barcoding and integrative taxonomy of *Macrobiotus hufelandi* C.A.S. Schultze 1834, the first tardigrade species to be described, and some related species. *Zootaxa*, 2997, 19–36. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2997.1.2>
- Binda M.G., Pilato G. (1972). Tardigradi muscioli di Sicilia (IV Nota). *Bollettino delle sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania, Series 4, 11*, 47–60.

- Binda M.G., Pilato G. (1984). *Macrobiotus sapiens*, nuova specie di Eutardigrado di Sicilia. *Animalia*, 11, 85–90.
- Biserov V.I. (1990a). New species of tardigrades in USSR fauna. *Zoological Journal*, 69(5), 17–25. (in Russian)
- Biserov V.I. (1990b). On the revision of the genus *Macrobiotus*. The subgenus *Macrobiotus* s. str.: a new systematic status of the group *hufelandi* (Tardigrada, Macrobiotidae). Communication 1. *Zoologicheskii Zhurnal*, 69(12), 157–167.
- Biserov V.I. (1999). Tardigrada of Turkmenistan with description of three new species. *Zoologischer Anzeiger*, 238, 19–36.
- Cesari M., Bertolani R., Rebecchi L., Guidetti R. (2009). DNA barcoding in Tardigrada: the first case study on *Macrobiotus macrocalix* Bertolani & Rebecchi 1993 (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Molecular Ecology Research*, 9(3), 699–706. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02538.x>
- Ciobanu D.A., Moglan I., Zawierucha K., Kaczmarek Ł. (2014). New records of terrestrial tardigrades (Tardigrada) from Ceahlău National Park with zoogeographical and taxonomical remarks on Romanian water bears. *North-Western Journal of Zoology*, 10 (Suppl.1), S5–S21.
- Coughlan K., Stec D. (2019). Two new species of the *Macrobiotus hufelandi* complex (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) from Australia and India, with notes on their phylogenetic position. *European Journal of Taxonomy*, 573, 1–38. <https://doi.org/10.5852/ejt.2019.573>
- Degma P., Bertolani R., Guidetti R. *Actual checklist of Tardigrada species* (2009–2019, 35th Edition: 31-07-2019). Online resource: <http://www.tardigrada.modena.unimo.it/miscellanea/Actual%20checklist%20of%20Tardigrada.pdf>. Accessed 20.03.2020.
- Guidetti R., Peluffo J.R., Rocha A.M. et al. (2013). The morphological and molecular analyses of a new South American urban tardigrade offer new insights on the biological meaning of the *Macrobiotus hufelandi* group of species (Tardigrada: Macrobiotidae). *Journal of Natural History*, 47(37–38), 2409–2426. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.800610>
- Guidetti R., Cesari M., Bertolani R. et al. (2019). High diversity in species, reproductive modes and distribution within the *Paramacrobiotus richtersi* complex (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zoological letters*, 5(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0113-z>
- Guil N. (2008). New records and within-species variability of Iberian tardigrades (Tardigrada), with comments on the species from the *Echiniscus blumi-canadensis* series. *Zootaxa*, 1757(1), 1–30. <https://doi.org/10.5281/zenodo.181845>
- Kaczmarek Ł., Michalczyk Ł., McInnes S.J. (2014). Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part I: Central America. *Zootaxa*, 3763(1), 1–62. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3763.1.1>
- Kaczmarek Ł., Michalczyk Ł., McInnes S.J. (2016). Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part III: North America and Greenland. *Zootaxa*, 4203(1), 1–249. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4203.1.1>
- Kaczmarek Ł., Michalczyk Ł. (2017). The *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited. *Zootaxa*, 4363(1), 101–123. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4363.1.4>
- Kaczmarek Ł., Kosicki J.Z., Roszkowska M. (2018). Tardigrada of Bory Tucholskie National Park, Zaborski Landscape Park, and their surroundings (Pomerania Province, Poland). *Turkish Journal of Zoology*, 42, 6–17. <https://doi.org/10.3906/zoo-1705-44>
- Kayastha P., Berdi D., Mioduchowska M. et al. (2020). Some tardigrades from Nepal (Asia) with integrative description of *Macrobiotus wandae* sp. nov. (Macrobiotidae: *hufelandi* group). *Annales Zoologici*, 70(1), 121–142. <https://doi.org/10.3161/00034541ANZ2020.70.1.007>
- Michalczyk Ł., Kaczmarek Ł. (2003). Water bears (Tardigrada) of the Bieszczady mountains (Poland, West Carpathians). *Zootaxa*, 242(1), 1–24. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.242.1.1>
- McInnes S.J., Kaczmarek Ł., Michalczyk Ł. (2017). Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part IV: Africa. *Zootaxa*, 4284(1), 1–7. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4284.1.1>
- Nowak B., Stec D. (2017). The first record of *Macrobiotus vladimiri* Bertolani, Biserov, Rebecchi and Cesari, 2011 (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: *hufelandi* group) from Poland. *Turkish Journal of Zoology*, 41, 558–567. <https://doi.org/10.3906/zoo-1609-22>
- Pilato G., Binda M.G., Lisi O. (2002). Notes on tardigrades of the Seychelles with the description of two new species. *Bollettino delle sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania*, 35, 503–517.
- Pilato G., Kaczmarek Ł., Michalczyk Ł., Lisi O. (2003). *Macrobiotus polonicus*, a new species of Tardigrada from Poland (Eutardigrada: Macrobiotidae, "*hufelandi* group"). *Zootaxa*, 258(1), 1–8. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.258.1.1>

- Pilato G., Kiosya Ye., Lisi O. et al. (2011). Annotated list of Tardigrada records from Ukraine with the description of three new species. *Zootaxa*, 3123, 1–31. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3123.1.1>
- Pilato G., Kiosya Ye., Lisi O., Sabella G. (2012). New records of Eutardigrada from Belarus with the description of three new species. *Zootaxa*, 3179, 39–60. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3179.1.2>
- Rost-Roszkowska M.M., Janelt K., Poprawa I. (2018). The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). *Zoomorphology*, 137(4), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00435-018-0407-x>
- Roszkowska M., Ostrowska M., Grobys D. et al. (2019). Some tardigrades from Italy, with an updated checklist of limno-terrestrial species from the country. *Acta Zoologica Bulgarica*, 71(2), 167–174.
- Stec D., Gasiorek P., Morek W. et al. (2016). Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178, 776–784. <https://doi.org/10.1111/zoj.12404>
- Stec D., Arakawa K., Michalczyk Ł. (2018a). An integrative description of *Macrobiotus shonaicus* sp. nov. (Tardigrada: Macrobiotidae) from Japan with notes on its phylogenetic position within the *hufelandi* group. *PLoS ONE*, 13(2), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192210>
- Stec D., Krzywański Ł., Michalczyk Ł. (2018b). Integrative description of *Macrobiotus canaricus* sp. nov. with notes on *M. recens* (Eutardigrada: Macrobiotidae). *European Journal of Taxonomy*, 452, 1–36. <https://doi.org/10.5852/ejt.2018.452>
- Stec D., Krzywański Ł., Arakawa K. et al. (2020). A new redescription of *Richtersius coronifer*, supported by transcriptome, provides resources for describing concealed species diversity within the monotypic genus *Richtersius* (Eutardigrada). *Zoological Letters*, 6, 1–25. <https://doi.org/10.1186/s40851-020-0154-y>
- Vargha B. (2011). Data to the Tardigrada fauna of Albania. *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis*, 35, 9–14.
- Vicente F., Cesari M., Serrano A., Bertolani R. (2013). The impact of fire on terrestrial tardigrade biodiversity: a first case-study from Portugal. *Journal of Limnology*, 72, 152–159. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e19>
- Yankova M., Morek W., Georgiev D. (2016). Current knowledge of tardigrades (Tardigrada: Heterotardigrada and Eutardigrada) from Bulgaria: checklist and distribution data. *Acta Zoologica Bulgarica*, 68(3), 299–304.

Нові знахідки видів тихоходів роду *Macrobiotus* групи *hufelandi* (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) в Україні Є.О. Кіося, В.В. Шуба, Є.Д. Мацко

Тихоходи роду *Macrobiotus* групи *hufelandi* – одні з найбільш відомих та поширених тихоходів. Їх знаходять майже в кожному дослідженні різноманіття тихоходів у наземних оселищах. Незважаючи на це, зоогеографічні дані щодо цієї групи лишаються сумнівними та неповними. Оскільки більшість видів групи *M. hufelandi* описані в останні декілька десятиліть та їх важко розрізнати, багато старих знахідок потребують підтвердження або перегляду. У цьому дослідженні ми взяли за мету вивчити, які види групи *M. hufelandi* можна знайти в Україні, оскільки більшість даних щодо поширення тихоходів цієї групи в Україні є застарілими. Досліджували проби мохів та лишайників, зібраних у різних регіонах України (головним чином – на сході та півдні країни) у 2007–2019 роках. Тихоходів добували з проб та виготовляли з них постійні мікропрепарати з використанням рідини Фора. Після попереднього визначення родів та груп видів ми сфокусувалися на 13 пробах, які містили тихоходів якихось видів групи *M. hufelandi* у достатній кількості. Деталі морфології тихоходів та їх яєць вивчали методом світлової мікроскопії великого збільшення з використанням фазового контрасту. Види визначали за морфологічними ознаками ротової арматури, морфологією хоріона яєць, характером грануляції кутикули, а також на підставі певних морфометричних характеристик кігтиків та ротоглоткового апарату. Дослідження виявило наявність в Україні щонайменше шести різних видів: *M. glebkai* Biserov, 1990; *M. hufelandi* C.A.S. Schultze, 1834; *M. macrocalix* Bertolani & Rebecchi, 1993; *M. polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk & Lisi, 2003; *M. sottilei* Pilato, Kiosya, Lisi & Sabella, 2012 і *M. vladimiri* Bertolani, Biserov, Rebecchi & Cesari, 2011. Три з них: *M. macrocalix*, *M. sottilei* й *M. vladimiri* було вперше знайдено в Україні. З урахуванням ще трьох видів, вказаних у більш ранніх дослідженнях: *M. diversus* Biserov, 1990; *M. persimilis* Binda & Pilato, 1972 і *M. sapiens* Binda & Pilato, 1984, – загальна кількість видів, відомих в Україні, складає щонайменше дев'ять. Реальна кількість видів в Україні, ймовірно, є вищою. Потрібні подальші збори проб та отримання молекулярно-генетичних даних від різних видів тихоходів групи *M. hufelandi* з України.

Ключові слова: тихоходи, зоогеографія, фауна, біорізноманіття.

Про авторіє:

Є.О. Кіюся – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, yevgenkiosya@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-6432-9089>

В.В. Шуба – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, shubavladislav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4261-5228>

Є.Д. Мацко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, elizabeth.matsko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8168-7841>

**Новые находки видов тихоходок рода *Macrobiotus* группы *hufelandi* (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) в Украине
Е.А. Кіюся, В.В. Шуба, Е.Д. Мацко**

Тихоходки рода *Macrobiotus* группы *hufelandi* – одни из наиболее известных и распространенных тихоходок. Их находят практически в каждом исследовании разнообразия тихоходок в наземных местообитаниях. Несмотря на это, зоогеографические данные по этой группе остаются сомнительными и неполными. Поскольку большинство видов группы *M. hufelandi* описаны в последние десятилетия и их тяжело различать, многие старые находки нуждаются в подтверждении или пересмотре. В этом исследовании мы поставили цель выяснить, какие виды группы *M. hufelandi* можно найти в Украине, поскольку большинство данных по распространению тихоходок этой группы в Украине устарели. Исследовали пробы мхов и лишайников, собранных в разных регионах Украины (главным образом – на востоке и юге страны) в 2007–2019 годах. Тихоходок извлекали из проб и изготавливали из них постоянные микропрепараты на основе жидкости Фора. После предварительного определения родов и групп видов мы сфокусировались на 13 пробах, с достаточно высокой численностью тихоходок какого-либо вида группы *M. hufelandi*. Детали морфологии тихоходок и их яиц изучали методом световой микроскопии большого увеличения с использованием фазового контраста. Виды определяли по морфологическим признакам ротовой аппаратуры и хориона яиц, характеру грануляции кутикулы, а также по определённым морфометрическим характеристикам коготков и ротоглоточного аппарата. Наше исследование выявило присутствие в Украине не менее шести разных видов: *M. glebkai* Biserov, 1990; *M. hufelandi* C.A.S. Schultze, 1834; *M. macrocalix* Bertolani & Rebecchi, 1993; *M. polonicus* Pilato, Kaczmarek, Michalczyk & Lisi, 2003; *M. sottilei* Pilato, Kiosya, Lisi & Sabella, 2012 и *M. vladimiri* Bertolani, Biserov, Rebecchi & Cesari, 2011. Три из них: *M. macrocalix*, *M. sottilei* и *M. vladimiri* были впервые найдены в Украине. С учетом ещё трёх видов, указываемых в более ранних исследованиях: *M. diversus* Biserov, 1990; *M. persimilis* Binda & Pilato, 1972 и *M. sapiens* Binda & Pilato, 1984, – общее число видов, известных в Украине, составляет, как минимум, девять. Реальное число видов в Украине, вероятно, выше. Нужны дальнейшие сборы проб и получение молекулярно-генетических данных от разных видов тихоходок группы *M. hufelandi* из Украины.

Ключевые слова: тихоходки, зоогеография, фауна, биоразнообразие.

Об авторах:

Е.А. Кіюся – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, yevgenkiosya@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-6432-9089>

В.В. Шуба – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, shubavladislav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4261-5228>

Е.Д. Мацко – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, elizabeth.matsko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8168-7841>

Представлено: Д.Стець / Presented by: D.Stec

Рецензент: Д.А.Шабанов / Reviewer: D.A.Shabanov

Подано до редакції / Received: 10.04.2020

UDC: 593.17

Seasonal changes of free-living ciliate communities in different biotopes of the Agzibir Lake

I.F. Mansimova, I.Kh. Alakbarov

The Agzibir Lake is optimal in terms of hydrochemical and hydrobiological factors for formation of higher biodiversity of free-living ciliates. This is facilitated with continuous entering biogenic elements as a result of metabolism of large bird colonies and decaying organic residues of plant and animal origin. The Agzibir Lake having a link with the Caspian Sea in spring and fall is a place of spawning and the subsequent development of larvae of many commercially valuable fishes of the Caspian Sea, for which ciliates are a valuable starting food source in early stages of ontogenesis. During 2014–2019, totally 169 species of free-living ciliates were found by us, and 34 of them were observed for the first time for the Caspian fauna. The minimum species diversity was observed in plankton, where 46 species were recorded. In benthos of the sandy biotope, 58 species were found, whereas in the silty sand one, 80 species. At the silt soil in the biotope of gray silt, we found 72 species, the maximum species diversity (84 species) was observed in the silt biotope with plant residues, while at the black silt with sapropel communities 66 species of free-living ciliates were found. In the periphyton biotope, we observed 71 species, while in coastal thickets of algae (phytociliocenosis) 79 species of free-living ciliates were found. As with the sandy biotope, the black silt biotope, sometimes with small communities of sapropel silt, is much smaller in area than the rest of benthic biotopes of the Agzibir Lake. Yet, free-living ciliate communities of black silt are specific and include several species that are tolerant to low oxygen and hydrogen sulfide in water. The seasonal variations of total quantity of free-living ciliates of benthic biotopes have three maxima (in spring, summer and autumn). As for the rest of biotopes of plankton, periphyton and phytociliocenosis, only two maxima (in spring and autumn) were revealed. The greatest similarity of species diversity was observed within benthic communities. But lowest similarity was observed between sapropel silt and the rest. As was already mentioned, this is due to specific ecological conditions of sapropel silt biotope.

Key words: *Agzibir Lake, Azerbaijan, plankton, benthos, periphyton, biotope, ciliates, seasonal changes.*

About the authors:

I.F. Mansimova – Institute of Zoology, Azerbaijan NAS, A.Abbas-zadeh Str., passage 1128, block 504, Baku, Azerbaijan, AZ1073, ilaxa_mansimova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3496-4214>

I.Kh. Alakbarov – Institute of Zoology, Azerbaijan NAS, A.Abbas-zadeh Str., passage 1128, block 504, Baku, Azerbaijan, AZ1073, i_alekperov@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0003-0070-3286>

Introduction

The Agzibir Lake is located in 120 km to the north of Baku, on the western coast of the Middle Caspian (46°16' – 41°19' N, 49°03' – 49°07' E). It is quite large (area 3600 ha) and shallow; the greatest depth is 3 m, salinity is 3.5 ‰ (brackish), pH is 7.2–8.3, i.e. weakly alkaline (Abdullayev et al., 2014).

Currently, the Agzibir Lake is fed by atmospheric precipitation, groundwater and the waters of three rivers – the Shabbranchay, the Devechichay and the Takhtakorpuchay. Accordingly, the maximum water level in the Agzibir is observed in spring, with the increase in the flow of river waters. Due to a canal connecting it with the sea, this water body has a connection with the Caspian Sea in spring. The biological and practical importance of the Agzibir Lake is great, since it and the canal connecting it with the sea include valuable commercial fish spawning sites (Kasimov, 1972) and this habitat provides proper conditions for further development of fish and their growth from the larval stage to the adult.

It is known that free-living ciliates periodically developing to very high values of the quantity and biomass are of great importance for production and destruction processes of organic matter in water bodies (Alekperov, 2012; Alekperov, Mansimova, 2017). Being bacteriophages and algophages, on the one hand, free-living ciliates are active participants in the bio-purification process in the water body, and on the other hand, in case of their mass development with optimum temperature and abundance of food organisms, free-living ciliates themselves are food objects for small size groups of multicellular organisms (Rotifera and Copepoda), as well as larvae of many fishes during the early stages of their ontogenesis (Witzani, Nowacki, 2016).

Based on the above mentioned, the study of species diversity and numbers of the free-living ciliates of the Agzibir Lake was carried out for all the seasons of the year.

Material and methods

Sampling was carried out in various parts of the Agzibir Lake in 2014–2019 (Fig. 1). Totally, 120 samples of plankton, benthos and coastal aquatic plants were collected for the determination of ciliate

species diversity. In addition, 115 samples were collected, which were delivered and processed in the laboratory within the shortest possible time for the quantitative analysis. During the study, we also determined hydrochemical parameters of water at different points of sampling by a Horiba U-52 Multiparameter Meter, measuring a number of water parameters, including temperature, oxygen regime, pH etc.

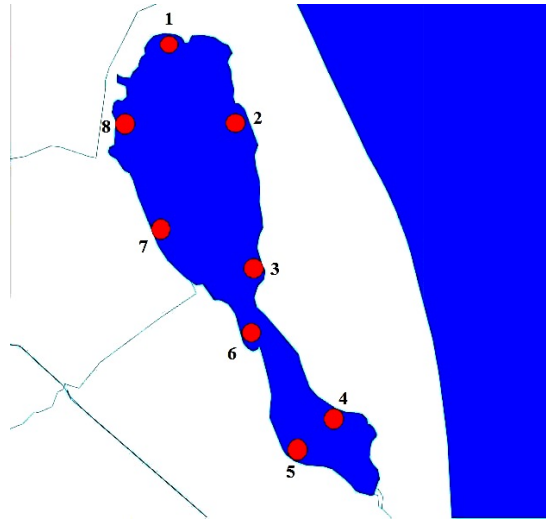


Fig. 1. Sampling points in different biotopes of the Agzibir Lake

A part of the samples was examined on the site, and the bulk of the collected material was processed in the Laboratory of Protozoology at the Institute of Zoology of the National Academy of Sciences of Azerbaijan. Ciliates were caught by microcapillaries, then studied *in vivo*. The impregnation methods of silver nitrate (Chatton, Lwoff, 1930) and protargol (Alekperov, 1992) were used for detailed taxonomic processing. The determination of species composition was carried out by comparing with our previous impregnated preparations and with a number of recent publications and classic monographs, the authors of which used these methods that are mandatory in modern research (Dragesco, Dragesco-Kerneis, 1986; Foissner et al., 1991; Alekperov, 2005).

Quantitative accounting was carried out by means of the modern cytometer "FlowCam" (USA) and in some cases by counting live ciliates in Bogorov's chamber in 5 ml of each sample, followed by recalculation into 1 liter of water or 1 dm² of the bottom surface.

The comparison of the species diversity community was carried out by the Bray-Curtis cluster analysis method and according to Chekanovsky-Sørensen (Sørensen, 1948). These analyzes were carried out using the "Biodiversity Professional v.2" computer program.

Results and discussion

Totally, 169 species of free-living ciliates were found during the investigation, of which 34 species were observed for the first time for the Caucasus fauna. Ciliates species composition and distribution are presented in Table 1.

As it is seen from the table, the ciliate species diversity of the Agzibir Lake is represented by 169 species belonging to 42 families. Thirty four species were observed for the first time for the Caucasus fauna.

The analysis of the obtained data showed that the greatest species richness was observed in benthos in gray silt (72 species) and in silt with plant residues (84 species). A bit lower species richness was observed among the thickets of aquatic plants (*Chara* sp.) denoted by the term "phytociliocenosis", where 79 species were observed. Eighty species were observed in the biotope of silty sand, 58 species in the sand, and the minimum species richness was observed in plankton (46 species) and periphyton (71 species).

Table 1.

Ciliates species composition and distribution in the biotopes of Agzibir Lake

Species	Sampling points							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Phylum Ciliophora Doflein, 1901								
Classis Kariorelictea Corliss, 1974								
Fam. Loxodidae Butschli, 1889								
1. <i>Loxodes striatus</i> (Engelmann, 1862)		+	+	+	+			
2. <i>L. kahli</i> Dragesco et Njine, 1971*		+	+	+	+			
Fam. Blepharismidae Jankowski in Small et Lynn, 1985								
3. <i>Blepharisma steini</i> Kahl, 1932	+	+	+	+				
4. <i>B. tardum</i> Kahl, 1928		+	+					
5. <i>B. undulans</i> Stein, 1868	+	+		+				
Fam. Spirostomatidae Stein, 1867								
6. <i>Spirostomum teres</i> Clap. et Lach., 1859	+	+	+	+	+			
7. <i>S. loxodes</i> Stokes, 1885*	+		+	+	+			
Fam. Condyllostomatidae Kahl in Dofflein et Reichenov, 1927								
8. <i>Condyllostoma fieldi</i> Hartwig, 1973*		+	+	+				
9. <i>C. granulosum</i> Bullington, 1940	+	+		+				
10. <i>C. magnum</i> Spiegel, 1926				+				
11. <i>C. arenarium</i> Siegel, 1926		+	+	+				
12. <i>Linostomatella vorticella</i> (Ehrenberg, 1833)						+		+
Fam. Amphisiellidae Jankowski, 1979								
13. <i>A. quadrinucleata</i> Berger et Foissner, 1989		+	+	+	+			
14. <i>A. vitiphila</i> (Foissner, 1987)		+		+	+			
15. <i>A. marioni</i> Wicklow, 1982			+	+				
Fam. Oxytrichidae Ehrenberg, 1838								
16. <i>Stylonychia bifaria</i> (Stokes, 1887)			+	+	+			
17. <i>S. vorax</i> Stokes, 1885		+	+	+				
18. <i>S. putrina</i> Stokes, 1885	+				+	+	+	
19. <i>S. quadrinucleata</i> Alekperov et Musaev, 1988		+	+		+			
20. <i>Histiculus muscorum</i> Kahl, 1932		+	+	+	+			
Fam. Keronidae Dujardin, 1841								
21. <i>Keronopsis arenivorus</i> Dragesco, 1954	+	+		+				
22. <i>K. gracilis</i> Dragesco, 1954	+	+	+	+				
Fam. Urostylidae Bütschli, 1889								
23. <i>Urostyla marina</i> Kahl, 1932		+	+	+				
24. <i>U. grandis</i> Ehrenberg, 1838	+	+			+			
25. <i>Pseudoamphisiella alveolata</i> (Kahl, 1932)*		+	+	+				
26. <i>Holosticha pullaster</i> (Müller, 1773)*	+	+	+	+				
27. <i>H. foissneri</i> Petz et al., 1995	+	+			+			
Fam. Kiitrichidae Nozawa, 1941								
28. <i>Musajevella minima</i> Alekperov, 1984			+	+				+

Table 1, continuation

	Fam. Euplotidae Ehrenberg, 1838								
29.	<i>Euplotes pseudoraikovi</i> Alekperov, 2005	+	+	+	+	+	+		+
30.	<i>E. alatus</i> Kahl, 1932		+	+				+	
31.	<i>E. focardii</i> Valbonesi et Luporini, 1990*		+		+				+
	Fam. Aspidiscidae Ehrenberg, 1838								
32.	<i>Aspidisca turrita</i> (Ehrenberg, 1838)	+	+		+			+	
33.	<i>A. binucleata</i> Kahl, 1932			+				+	
34.	<i>A. steini</i> Buddendrock, 1920			+					+
	Fam. Halteriidae Claparede et Lachmann, 1858								
35.	<i>Halteria grandinella</i> (Müller, 1786)			+		+	+		+
36.	<i>H. maxima</i> Szabo, 1934*		+	+			+		
37.	<i>Pelagohalteria viridis</i> (Fromentel, 1876)						+		+
38.	<i>P. cirrifera</i> (Kahl, 1932)		+				+		+
	Fam. Strombidiidae F.-F., 1970								
39.	<i>Heterostrombidium calkinsi</i> Fauré-Fremiet, 1932*						+	+	+
40.	<i>H. faurési</i> (Dragesco, 1960)			+			+		+
41.	<i>H. clavellinae</i> (Buddenbrock, 1922)*								+
42.	<i>Limnostrombidium viride</i> (Stein, 1867)	+	+	+	+	+	+	+	+
43.	<i>Novistrombidium testaceum</i> (A., 1914)						+	+	+
44.	<i>Spirostrombidium coronatum</i> (Sauerbrey, 1928)				+		+		+
45.	<i>Strombidium apsheronicum</i> Alekperov et Asadullayeva, 1997						+	+	+
46.	<i>S. oculatum</i> Gruber, 1888						+		
47.	<i>S. obliquum</i> Kahl, 1932						+	+	+
48.	<i>S. elatum</i> Alekperov, 1985						+		+
	Fam. Metopidae Kahl, 1927								
49.	<i>Metopus acidiferus</i> Kahl, 1935*					+			
50.	<i>M. caucasicus</i> Alekperov, 1984		+	+	+	+			+
51.	<i>M. fuscoides</i> Alekperov, 1984				+	+			
52.	<i>M. major</i> Kahl, 1932				+				
53.	<i>M. turbo</i> Dragesco et Dr.-Kerneis, 1986			+	+	+			
54.	<i>M. vestitus</i> Kahl, 1935*				+				
	Fam. Caenomorphida Poche, 1913								
55.	<i>Caenomorpha lata</i> (Kahl, 1927)				+	+			
56.	<i>C. medusula</i> Perty, 1832		+	+		+			
	Fam. Epalxellidae Corliss, 1960								
57.	<i>Pelodinium rotundum</i> Kahl, 1926*		+	+	+	+			
58.	<i>Epalxella antiquorum</i> (Penard, 1922)				+	+			
59.	<i>E. triangula</i> (Kahl, 1932)*				+	+			
60.	<i>Saprodinium halophilum</i> Kahl, 1932				+	+			
61.	<i>S. dentatum</i> Lauterborn, 1901		+	+		+			
62.	<i>S. mimeticum</i> (Penard, 1922)*	+				+			
63.	<i>S. spinigerum</i> Kahl, 1932*		+		+	+			

Table 1, continuation

	Fam. Enchelyidae Ehrenberg, 1838								
64.	<i>Enchelys marina</i> (Meunier, 1910)							+	+
65.	<i>E. gasterosteus</i> Kahl, 1926								+
	Fam. Lacrymariidae Fromental, 1876								
66.	<i>Lacrymaria olor</i> (Müller, 1786)	+	+	+	+				+
67.	<i>L. marina</i> Kahl, 1933	+	+						
68.	<i>L. acuta</i> Kahl, 1933*				+		+	+	+
69.	<i>L. minuta</i> Dragesco, 1963	+		+					
70.	<i>L. bulbosa</i> Alekperov, 1984				+				
	Fam. Spathidiidae Kahl, 1929								
71.	<i>Spathidium moniliforme</i> Bhatia, 1920				+			+	+
72.	<i>Perispira ovum</i> Stein, 1859				+	+			
73.	<i>P. oligospira</i> Gelei, 1954			+		+		+	
	Fam. Didiniidae Poche, 1913								
74.	<i>Monodinium balbianii</i> Fabre-Dom., 1888							+	+
75.	<i>M. perrieri</i> Delphy, 1925							+	+
76.	<i>M. alveolatum</i> Kahl, 1930			+	+	+	+	+	+
77.	<i>M. chlorelligerum</i> Krainer, 1995							+	+
78.	<i>Didinium nasutum</i> (Müller, 1773)	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fam. Trachelidae Ehrenberg, 1838								
79.	<i>Paraspathidium obliquum</i> Dragesco, 1963		+			+		+	+
80.	<i>P. fuscum</i> Kahl, 1928	+	+	+	+	+		+	
81.	<i>P. longinucleatum</i> Czapik et Jordan, 1976*	+	+			+			+
	Fam. Mesodiniidae Jankowski, 1980								
82.	<i>Askenasia mobilis</i> Alekperov, 1984							+	+
83.	<i>A. confunis</i> Alekperov, 1984							+	+
84.	<i>Mesodinium apsheronicum</i> Alekperov et Asadullayeva, 1996							+	+
85.	<i>M. cinctum</i> Kahl, 1930							+	+
	Fam. Amphileptidae Butschli, 1889								
86.	<i>Litonotus triqueter</i> Penard, 1922	+			+				
87.	<i>L. obtusus</i> Maupas, 1888*		+			+			
88.	<i>L. crystallinus</i> (Vuxanovici, 1960)*				+			+	
89.	<i>L. undulatum</i> Sauerbrey, 1928			+				+	
90.	<i>L. semilunare</i> Vuxanovichi, 1960*	+							+
91.	<i>L. hyalinum</i> Vacelet, 1961		+			+		+	
	Fam. Chlamyodontidae Stein, 1859								
92.	<i>Chlamydonon mnemosyne</i> Ehrenberg, 1835	+	+		+	+		+	+
93.	<i>C. obliquus</i> Kahl, 1931		+	+	+	+		+	
94.	<i>C. erythrorhynchus</i> (Perejaslawzewa, 1885)	+	+	+	+	+	+	+	+
95.	<i>C. major</i> (Kahl, 1931)			+	+			+	+
	Fam. Dysteriidae Claparede et Lach., 1858								
96.	<i>Dysteria procera</i> Kahl, 1931		+	+	+			+	+

Table 1, continuation

97.	<i>D. monostyla</i> (Ehrenberg, 1838)								+
98.	<i>D. pectinate</i> (Nowlin, 1910)	+				+			+
	Fam. Orthodonellidae Jankowski, 1968								
99.	<i>Zosterodasys debilis</i> Alekperov, 1984	+			+				+
100.	<i>Z. cantabrica</i> Fern.-Leb. et Alekperov, 1995		+		+	+			+
	Fam. Microthoracidae Wrzesn. 1870								
101.	<i>Microthorax glaber</i> Kahl, 1926*	+	+	+		+			
102.	<i>M. transversus</i> Foissner, 1985		+		+				
103.	<i>M. tridentatus</i> Kahl, 1931*	+	+	+	+				
	Fam. Platyophryidae Puytorac, Perez-Paniagua et Perez-Silva, 1979								
104.	<i>Platyophrya vorax</i> Kahl, 1926	+	+						
105.	<i>P. spumacola</i> Kahl, 1927			+	+	+			+
106.	<i>P. sphagni</i> (Penard, 1922)*	+			+				+
	Fam. Colepidae Nitzsch, 1827								
107.	<i>Coleps trichotus</i> Savi, 1913	+	+	+	+	+	+	+	+
108.	<i>C. spiralis</i> Noland, 1937	+		+	+				+
109.	<i>C. arenicolus</i> Dragesco, 1965		+						+
110.	<i>C. spinosus</i> Vacelet, 1961	+	+						+
111.	<i>C. elongatus</i> Ehrenberg, 1833	+	+				+		+
112.	<i>C. amphacanthus</i> Ehrenberg, 1833	+	+	+	+	+			+
	Fam. Holophryidae Perty, 1852								
113.	<i>Holophrya vorax</i> Dragesco, 1960		+	+	+	+			+
114.	<i>H. salinarum</i> Foissner, Agata et Berger, 2002						+	+	+
115.	Fam. Placidae Small et linn, 1985								
116.	<i>Placus longinucleatus</i> Song et Wilbert, 1989	+	+		+				
	Fam. Plagiopylidae Schew. 1896								
117.	<i>Sonderia macrochilus</i> Kahl, 1931*			+	+	+			
118.	<i>S. megalabiata</i> Alekperov et Asadullayeva, 1996			+	+	+			
119.	<i>S. parabiata</i> Small et Lynn, 1985*			+	+				
120.	<i>S. sinuate</i> Kahl, 1931*				+				
121.	<i>Plagiopyla ovata</i> Kahl, 1930			+	+	+			
122.	<i>P. nasuta</i> Stein, 1860	+	+	+	+	+			
123.	Fam. Frontoniidae Kahl, 1926								
124.	<i>Frontonia leucas</i> Ehrenberg, 1838	+	+			+			
125.	<i>F. marina</i> Fabre-Domerque, 1891		+				+		+
126.	Fam. Urotrichidae Small et Lynn, 1985								
127.	<i>Urotricha atipica</i> Alekperov, 1993	+	+						
128.	<i>U. turanica</i> Alekperov, 1997	+			+		+	+	
129.	<i>U. macrostoma</i> Foissner, 1983					+		+	+
130.	<i>Longifragma gracilis</i> Alekperov et Musaev, 1988	+		+			+		
	Fam. Parameciidae Dujardin, 1840								
131.	<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg, 1832	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 1, continuation

132.	<i>P. multimicronucleatum</i> Pow. et Mitchell, 1910			+	+	+			+
	Fam. Lembadionidae Jankowski in Corliss, 1977								
134.	<i>Lembadion bullinum</i> (Muller, 1786)	+		+				+	
135.	<i>L. lucens</i> (Maskell, 1987)	+	+					+	+
	Fam. Turaniellidae Didier, 1971								
133.	<i>Colpidium colpoda</i> (Losana, 1829)		+	+	+	+			
	Fam. Glaucomidae Corliss, 1971								
134.	<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrenberg, 1830		+	+	+	+		+	+
135.	<i>G. chattoni</i> Corliss, 1959		+		+				
	Fam. Ophryoglenidae Kent, 1881								
136.	<i>Ophryoglena atra</i> Ehrenberg, 1838	+	+	+	+	+	+	+	+
137.	<i>O. catenula</i> Savoie, 1965*		+	+	+	+			+
138.	<i>O. flava</i> (Ehrenberg, 1838)	+		+				+	
	Fam. Loxocephalidae Jankowski, 1964								
139.	<i>Dexiotricha simplex</i> Penard, 1922		+	+	+	+			+
140.	<i>D. campilla</i> (Stokes, 1886)	+	+						+
141.	<i>D. kahli</i> (Tucolesco, 1962)*		+	+	+	+			
	Fam. Cyclidiidae Ehrenberg, 1838								
142.	<i>Cristigera vestita</i> Kahl, 1928		+					+	+
143.	<i>C. fusiformis</i> Penard, 1922*	+	+					+	+
144.	<i>C. media</i> Kahl, 1928	+					+	+	+
145.	<i>Caspionella bergeri</i> (Agamaliyev, 1972)	+	+	+	+	+	+	+	+
146.	<i>Cyclidium citrullus</i> Cohn, 1865	+	+	+	+	+	+	+	+
147.	<i>C. glaucoma</i> Muller, 1786	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fam. Uronematidae Thompson, 1964								
148.	<i>Uronema marinum</i> Dujardin, 1841	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fam. Epistylidae Kahl, 1933								
149.	<i>Epistylis rotatorium</i> Kahl, 1935			+				+	+
150.	<i>E. anastatica</i> (Linne, 1767)							+	+
151.	<i>E. dafniae</i> Fauré-Fremiet, 1905*						+		+
	Fam. Vorticellidae Ehrenberg, 1838								
152.	<i>Vorticella microstoma</i> Ehrenberg, 1830		+	+				+	+
153.	<i>V. similis</i> Stokes, 1887							+	+
154.	<i>V. spuripicta</i> Song et Wilbert, 1889*		+						+
155.	<i>V. alba</i> Fromentel, 1874						+	+	+
156.	<i>Carchesium prechti</i> Banina, 1977*	+						+	+
157.	<i>C. umbilicatum</i> Stiller, 1941	+		+		+	+	+	
	Fam. Zoothamniidae Sommer, 1951								
158.	<i>Zoothamnium kenti</i> Leidy, 1874						+	+	+
159.	<i>Z. adamsi</i> Stokes, 1885							+	
160.	<i>Z. haplocaulis</i> Stiller, 1953*							+	+
161.	<i>Z. marinum</i> Mereschekowski, 1877							+	

Table 1, continuation

162.	<i>Z. carcini</i> Kent, 1881							+	+
163.	<i>Z. triophilum</i> Stiller, 1946*						+	+	
164.	<i>Z. cupiferum</i> Stiller, 1986*							+	
165.	<i>Z. vermicola</i> Precht, 1935							+	
166.	<i>Z. haplocaulis</i> Stiller, 1953							+	
167.	<i>Z. balticum</i> Biernacka, 1963							+	+
	Fam. Telotrochidiidae Foissner, 1978								
168.	<i>Telotrochidium crateriforme</i> (Muller, 1773)	+					+	+	+
169.	<i>T. cylindricum</i> Foissner, 1978*						+	+	
	Total	58	80	72	84	66	46	71	79

Notes: 1 – sand; 2 – silty sand; 3 – gray silt; 4 – silt with plants residues; 5 – black silt; 6 – plankton; 7 – periphyton; 8 – thickets of aquatic plants (phytociliocenosis); *species observed for the first time of the Caucasus fauna.

Thus, species diversity was dominated by benthic biotopes, with the exception of the black silt biotope (33 species), where due to specific conditions, including low oxygen content, and at times the presence of hydrogen sulfide, the species diversity of the ciliates was significantly lower and represented by a characteristic of sapropel species community.

A pairwise comparison of the species richness of communities of free-living ciliates of different biotopes of the Agzibir Lake was carried out. The obtained results showed the greatest similarity of the species richness of benthic biotopes of sand with silty sand (62 %) and silty sand with biotopes of gray silt and silt with plant residues, the similarity with which reached 44 %. The similarity of the species richness of the community of the gray silt biotope and plant residues was also great (56 %).

Consequently, the obtained results indicate a great similarity of the species richness of free-living ciliates between different benthic biotopes. The only exception was the black silt biotope, the similarity of which with the species richness of ciliate communities of other benthic biotopes was 28 % to 34 %. This is due to the specific environmental conditions of the black silt biotope, mainly low oxygen content, and at times the presence of hydrogen sulfide. Obviously, such a gas regime is favorable only for the so-called "Sapropelbiotic" aciliate group such as *Caenomorpha* and *Metopus* species, as well as some eurybiontic representatives of *Loxodes*, *Spirostomum*, *Euplotes* species etc.

Comparison of the species richness of various benthos biotopes with plankton showed its minimum similarity with the black silt biotope (6 %) and silty sand (7 %). A bit higher similarity of plankton was with the biotope of silt with plant residues (10 %) and gray silt (13 %).

The similarity of the species richness of the ciliates plankton community with the biotopes of periphyton and phytociliocenosis is much higher and reaches 23 % and 39 % respectively.

Comparison of the ciliate species richness of periphyton with various benthic biotopes showed their similarity in the range from 24 % to 31 %. Higher ones were the ciliates species richness of periphyton with the phytociliocenosis, reaching 38 %.

In order to reveal relationships between different habitats, a cluster analysis of the species richness similarity of free-living ciliates of all studied biotopes was carried out. As it is seen from Fig. 2, the greatest similarity was observed in the cluster that combines benthic biotopes and slightly less similarity was with the black silt biotope, which, as already mentioned, is due to its specific conditions.

The next cluster unites the biotopes of plankton, periphyton and phytociliocenosis, although the ciliates species richness of these three biotopes is lower.

The seasonal dynamics of the development of various biotopes communities of free-living ciliates in Agzibir Lake differs noticeably depending on the species of the biotope (plankton, periphyton, phytociliocenosis, benthos), Fig 3. In addition, the features of this water body (shallow water and connection with the Caspian Sea in spring) also influence the seasonal succession of species composition, changes in the structure of communities, and seasonal changes in total quantity in free-living ciliate communities of different biotopes. Generally, planktonic ciliates of the Agzibir Lake have two

maxima of development recorded in spring, with increase in water temperature to +10–13°C and in autumn. Usually, the spring peak is observed in a few days after the spring increase in the water flow of the rivers. The spring water is a source of biogenic elements which together with a number of other factors are impetus to the rapid development of unicellular algae and bacteria, forming the food basis for the organisms that are the first consumers, including ciliates.

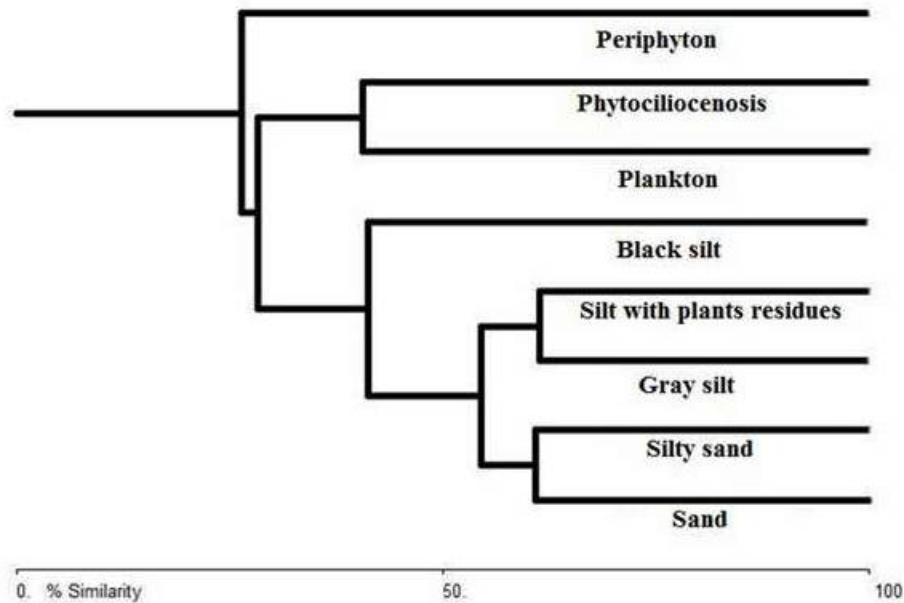


Fig. 2. The similarity of ciliate species richness of different biotopes of the Agzibir Lake

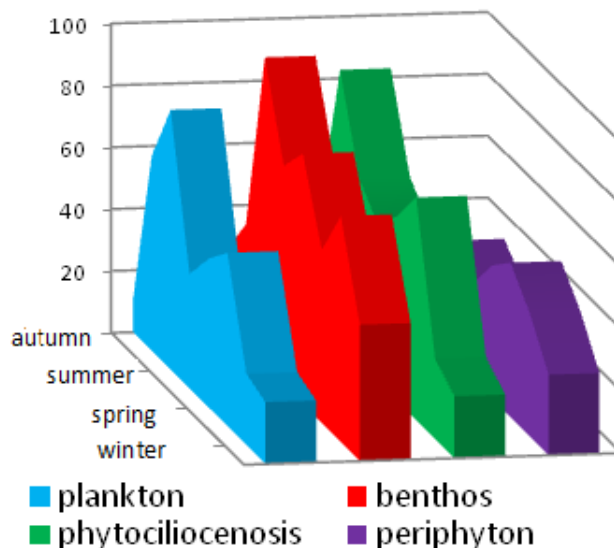


Fig. 3. Seasonal dynamics of the total number (in specimen/liter) of ciliates in various biotopes of the Agzibir Lake (average 2014–2019)

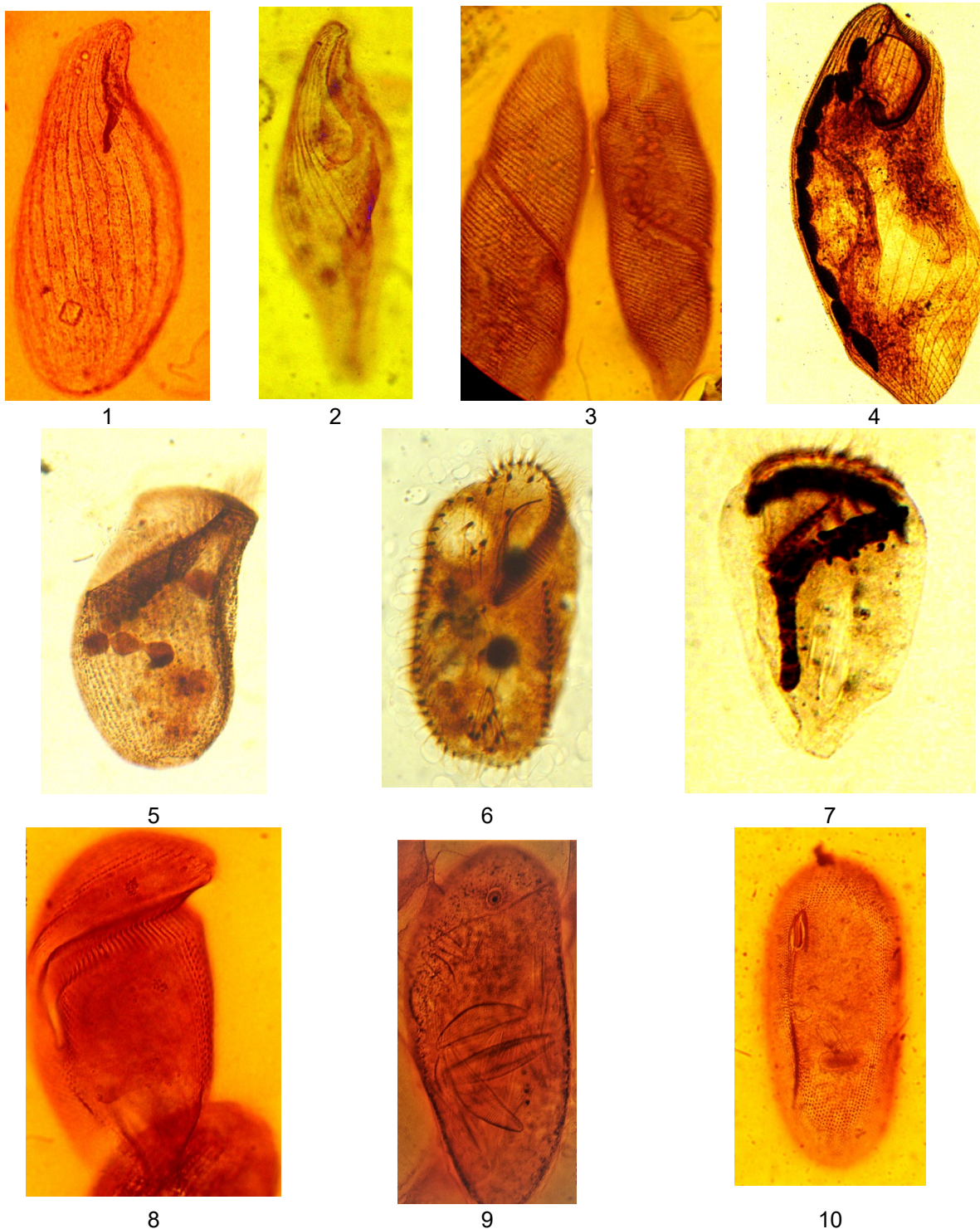


Fig. 4. Some most characteristic ciliates species of the Agzybir lake

1 – *Loxodes striatus*; 2 – *Blepharisma steini*; 3 – *Spirostomum loxodes*; 4 – *Condylostoma magnum*; 5 – *Linostomatella vorticella*; 6 – *Histriculus muscorum*; 7 – *Strombidium apsheronicum*; 8 – *Metopus fuscoides*; 9 – *Zosterodasy s cantabrica*; 10 – *Frontonia leucas* (1, 2, 3, 8, 9, 10 – silver nitrate impregnation; 4, 5, 6 – protargol impregnation)

At this time, almost complete replacement of the dominant species occurs in the plankton of the Agzibir Lake usually represented by small species of ciliates as *Halteria*, *Arcostrombidium*, *Strombidiopsis*, *Coleps* and *Holophrya*. Generally, these ciliates are dominant in plankton communities in early spring. Since the end of April, the dominants number has been increasing not only due to true planktonic species, but also due to the mixing of water masses by winds through which many optional species that usually inhabit other biotopes appear in plankton. Among them, the large *Linostomella vorticella*, *Stentor roeselii*, some *Paraamphisiella*, *Kahliella* etc. can be noted.

In summer, because of the massive development of unicellular algae, with the increase in temperature to 25–29°C, the water transparency decreases (up to 15–26 cm) and the content of dissolved oxygen reduces. This leads to impoverishment of the species richness of plankton communities of free-living ciliates throughout the Agzibir Lake. At this time, from true plankton species only specimens of *Halteria bifurcata* and *H. cirrifera*, *Limnostrombidium viride* and *Pelagostrombidium mirabile*, as well as temporary (facultative) species from benthos such as *Zosterodasys mirabilis* and species of *Cristigera* can be found.

In plankton communities, the autumn maximum firstly is due to the development of phytophages and histophages, among which the representatives of *Coleps* are especially prominent.

Unlike planktonic ones, the benthic communities of free-living ciliates in the Agzibir Lake have 3 peaks of development. The first one was observed in spring usually in May, following the development of plankton communities. The change in species composition occurs following the summer increase in water temperature. The basis of the spring benthic ciliates community is formed by such background species as representatives of *Loxodes*, *Blepharisma*, *Paragastrostyla*, *Euplotes*, *Enchelys*, *Lacrymaria* etc. In summer, as water temperature rises to 21°C and above, destruction processes of organic matter begin to predominate on some benthic biotopes caused by the decrease in the content of oxygen dissolved in water and extinction of aquatic vegetation. This is especially noticeable in the biotopes of the silt with plant residues and black silt. In the latter case, the presence of hydrogen sulfide was recorded at times. During this period, active replacement of dominant species takes place in free-living ciliates community of the both biotopes.

In summer, the first dominants were representatives of "sapropel-bionts" group, among which are species of *Metopus* and *Caenomorpha*. In addition to them, such eurybionts as representatives of *Uronema*, *Cyclidium* and *Urocentrumas* as well as some ciliates of *Frontonia* became dominant. All of these ciliates form the core of the summer benthic community and are the cause of a slight summer increase in total numbers. In autumn, many of the summer benthic ciliate species either completely disappear from the communities or their numbers greatly reduce. At this time, another replacement in species composition takes place and the benthic communities are dominated by the representatives of *Condylostoma*, *Stentor*, *Aspidisca*, *Euplotes*, *Spathidium*, *Trithigmostoma* and others.

The analysis of the seasonal change results in the ciliate species composition of the phytociliocenosis biotope showed that in this case these changes are similar to those in the plankton. Two maxima development were observed in spring and autumn with the spring peak usually is in advance of the peak in plankton for 8–12 days. Apparently, this is explained by the large and faster heating of water in the thickets of shallow aquatic plants. Moreover, the ciliate species richness of the phytociliocenosis is higher than in plankton and periphyton and this is due to large part of numerous benthic species presence willingly inhabiting this biotope. On the other hand, many rare plankton species such as *Frontonia obtusa*, *Lembadionlucens*, *Lacrymaria acuta*, *Amphisiella milnei* etc. also occur in the phytociliocenosis.

Fig. 4 shows microphotographs of some of the most characteristic species of the free-living ciliates of Agzybir Lake, made with total preparations, impregnated with silver nitrate and protargol.

Conclusion

Summarizing all the above mentioned data, certain conclusions can be drawn. The ciliate species diversity of the Agzybir Lake turned out to be quite rich and was represented by 161 species of 42 families. Thirty four species observed for the first time for the Caucasus fauna on the one hand indicate that the survey of free-living ciliates insufficient in our region, and on the other hand, generally favorable conditions for the development of this group of protozoans are present in the Agzibir Lake.

On the grounds prevailing in the lake, the absolute majority of the discovered species (sand, silty sand, gray oily silt with plant residues and black silt) with the largest species diversity was observed in the ciliate benthic community of the gray silt biotope (72 species) and the biotope of silt with plant residues (84 species). This is explained by the gas regime unfavorable for most ciliates species – low oxygen content and the presence of hydrogen sulfide at times, usually in summer, whose presence is able to be tolerated by sapropel ciliates, as well as some other species of eurybionts.

The minimum ciliates species diversity was observed in the plankton and periphyton, 28 and 24 species respectively. One more specific biotope of thickets of aquatic vegetation was identified, for which the term "phytociliocenosis" was proposed, having similarity of species richness to the planktonic and periphyton ciliates communities, 23 % and 39 % respectively.

In quantitative terms, two maxima (in spring and autumn) and minima (winter and summer) were observed in the seasonal dynamics of total quantity of plankton ciliates, and the benthic ciliate communities were characterized by three-peak development, with an additional third summer maximum. In all the studied biotopes of the Agzibir Lake, sequential seasonal succession of species diversity was observed depending on the season and a constant change of some species. In our opinion, this is primarily explained by the trophic factor – the presence of food objects for a particular species, as well as by more general causes such as the temperature factor and gas regime.

The obtained data testifies the important role of free-living ciliates in the production and destruction processes of water bodies, which must be taken into account in general hydrobiological investigations.

Acknowledgment

Our thanks go to the reviewer of our article for the great work on proofreading and editing the English text.

References

- Abdullayev A.I., Nadirov S.N., Akhundov M.M. (2014). Evaluating the role of Devechinsky estuary in the reproduction of commercial semipermeable carp fish species stocks / In: *Current state of bio-resources of inland waters*. Moscow: Polygraph-plus, pp. 11–16. (In Russian)
- Alekperov I.Kh. (1992). The new modification of impregnation ciliates kinetome with silver proteinate. *Zool. J.*, 2, 130–133. (in Russian)
- Alekperov I.Kh. (2005). *An atlas of the freeliving ciliates (Classes Kinetofragminophora, Colpodea, Oligohymenophorea, Polyhymenophora)*. Baku: Publishing house Borchali. 310 p. (In Russian)
- Alekperov I.Kh. (2012). *Free-living infusoria of Azerbaijan (ecology, zoogeography, practical importance)*. Baku: Elm Publishing House. 520 p. (In Russian)
- Alekperov I.Kh., Mansimova I.F. (2017). The ratio of trophic groups of free-living ciliates on the seasons of the year in the Agzibir Lake. *Journal of Entomology and Zoology studies*, 5(1), 395–399.
- Chatton E., Lwoff A. (1930). Imprégnation, par diffusion argentine, de l'infraciliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans desiccation. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 104, 834–836.
- Dragesco J., Dragesco-Kerneis A. (1986). *Ciliés libres de l'Afrique intertropicale: introduction à la connaissance et à l'étude des Ciliés*. Paris: ORSTOM. 562 p. (*Faune Tropicale*, 26).
- Foissner W., Blatterer H., Berger H., Kohmann F. (1991). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems. Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea*. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, 1/91. 478 p.
- Kasimov A.G. (1972). *Freshwater fauna of the Caucasus*. Baku: "Elm". 286 p. (In Russian)
- Sørensen T. (1948). A method of establishing groups of equal magnitude in plant sociology. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab. Biologiske Skrifter*, 5(4), 1–34.
- Witzani G., Nowacki M. (eds.). (2016). *Biocommunication of Ciliates*. Springer. 372 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32211-7>

Сезонні зміни спільнот вільноживучих інфузорій різних біотопів озера Агзібір

І.Ф. Мансімова, І.Х. Алекперов

Озеро Агзібір є за рядом гідрохімічних і гідробіологічних чинників оптимальним для формування високого біорізноманіття вільноживучих інфузорій. Цьому сприяє і постійне надходження біогенних елементів в результаті метаболізму великих колоній птахів та гниючих органічних залишків рослинного і тваринного походження. Озеро Агзібір, що має зв'язок з Каспійським морем навесні і восени, є місцем нересту і подальшого розвитку личинок багатьох цінних риб Каспійського моря, для яких інфузорії є вихідним кормом на ранніх етапах онтогенезу. Всього в період 2014–2019 рр. нами були знайдені 169 видів вільноживучих інфузорій, з яких 34 нами відзначені вперше для фауни Каспійського моря. Найменше видове різноманіття спостерігалось в планктоні, де було зареєстровано 46 видів. У бентосі на піщаному біотопі були відзначені 58 видів, а на замуленому піску – 80 видів. На мулових ґрунтах у біотопі сірого мулу нами відзначено 72 види, у біотопі мулу з рослинними залишками спостерігалось максимальне видове різноманіття – 84 види, а на

чорному мулі з ділянками сапропелю було знайдено 66 видів вільноживучих інфузорій. У біотопі перифітону нами був відзначений 71 вид, а в прибережних заростях водоростей (фітоцільоценозах) всього знайдено 79 видів вільноживучих інфузорій. Так само, як і біотоп піску, біотоп чорного мулу, іноді з невеликими ділянками сапропелевого мулу, за площею сильно поступається іншим бентичним біотопам озера Агзібир. Спільнота вільноживучих інфузорій чорного мулу досить специфічна і містить багато видів, стійких до низьких величин розчиненого у воді кисню і вмісту в воді сірководню. Сезонні зміни загальної чисельності вільноживучих інфузорій бентичних біотопів мають три максимуми, що припадають на весну, літо і осінь. В інших біотопах планктону, перифітону і фітоцільоценозів були відзначені тільки два максимуми, які припадають на весну та осінь. Найбільша подібність видового різноманіття спостерігалася у бентичних спільнотах. Найнижча схожість спостерігалася між сапропелевим мулом та іншими. Як уже згадувалося, це пов'язано із специфічними екологічними умовами біотопу сапропелевого мулу.

Ключові слова: озеро Агзібир, Азербайджан, планктон, бентос, перифітон, біотоп, інфузорії, сезонні зміни.

Про авторів:

І.Ф. Мансімова – Інститут зоології НАН Азербайджану, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, ilaxa_mansimova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3496-4214>

І.Х. Алекперов – Інститут зоології НАН Азербайджану, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, i_alekperov@yahoo.com. <https://orcid.org/0000-0003-0070-3286>

Сезонные изменения сообществ свободноживущих инфузорий различных биотопов озера Агзыбир
И.Ф. Мансимова, И.Х. Алекперов

Озеро Агзыбир является по ряду гидрохимических и гидробиологических факторов оптимальным для формирования высокого биоразнообразия свободноживущих инфузорий. Этому способствует и постоянное поступление биогенных элементов в результате метаболизма больших колоний птиц и гниющих органических остатков растительного и животного происхождения. Озеро Агзыбир, имеющее связь с Каспийским морем весной и осенью, является местом нереста и последующего развития личинок многих ценных рыб Каспийского моря, для которых инфузории являются исходным кормом на ранних этапах онтогенеза. Всего в период 2014–2019 гг. нами были найдены 169 видов свободноживущих инфузорий, из которых 34 нами отмечены впервые для фауны Каспийского моря. Наименьшее видовое разнообразие наблюдалось в планктоне, где было зарегистрировано 46 видов. В бентосе на песчаном биотопе были отмечены 58 видов, а на заиленном песке – 80 видов. На иловых грунтах в биотопе серого ила нами отмечено 72 вида, в биотопе ила с растительными остатками наблюдалось максимальное видовое разнообразие – 84 вида, а на черном иле с участками сапропеля было найдено 66 видов свободноживущих инфузорий. В биотопе перифитона нами был отмечен 71 вид, а в прибрежных зарослях водорослей (фитоцелиоценозах) всего найдено 79 видов свободноживущих инфузорий. Так же, как и биотоп песка, биотоп черного ила, иногда с небольшими участками сапропелевого ила, по площади сильно уступает остальным бентическим биотопам озера Агзыбир. Сообщество свободноживущих инфузорий черного ила достаточно специфично и включает многие виды, устойчивые к низким величинам растворенного в воде кислорода и содержанию в воде сероводорода. Сезонные изменения общей численности свободноживущих инфузорий бентических биотопов имеют три максимума, приходящиеся на весну, лето и осень. В остальных биотопах планктона, перифитона и фитоцелиоценозов были отмечены только два максимума, приходившиеся на весну и осень. Наибольшее сходство видового разнообразия наблюдалось в бентических сообществах. Самое низкое сходство наблюдалось между сапропелевым илом и остальными. Как уже упоминалось, это связано со специфическими экологическими условиями биотопа сапропелевого ила.

Ключевые слова: озеро Агзыбир, Азербайджан, планктон, бентос, перифитон, биотоп, инфузории, сезонные изменения.

Об авторах:

И.Ф. Мансимова – Институт зоологии НАН Азербайджана, ул. А.Аббасзаде, проезд 1128, квартал 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, ilaxa_mansimova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3496-4214>

И.Х. Алекперов – Институт зоологии НАН Азербайджана, ул. А.Аббасзаде, проезд 1128, квартал 504, Баку, Азербайджан, AZ1073, i_alekperov@yahoo.com. <https://orcid.org/0000-0003-0070-3286>

Представлено: М.Г.Алієва / Presented by: M.G.Aliyeva

Рецензент: С.Ю.Утевський / Reviewer: S.Yu.Utevsky

Подано до редакції / Received: 21.02.2020

УДК: 576.895.132.2.99

Формы и ультраструктурные особенности латеральных крыльев гельминта *Trichostrongylus tenuis* Mehlis, 1846 (Nematoda: Trichostrongylidae)

Ф.Г. Рзаев, М.И. Сеидбейли, С.Г. Магеррамов, Э.К. Гасымов

С целью изучения ультраструктурных особенностей строения нематоды *Trichostrongylus tenuis* в 2015–2018 гг. в Нахчыванской АР были проведены гельминтологические исследования, и методом полного паразитологического вскрытия был собран материал от домашних водоплавающих птиц. Наряду с тем, что этот гельминт является специфическим паразитом домашних водоплавающих птиц, он доминирует среди всех отмеченных нами видов гельминтов и является причиной серьезных изменений в организме хозяина. Изучение ультраструктуры нематоды *T. tenuis* играет важную роль в выявлении паразито-хозяйинных отношений, уточнения систематического положения паразитов и в подготовке мер борьбы с этими паразитами. Помимо этого, большое разнообразие морфологических особенностей латеральных крыльев позволяет использовать их как один из основных признаков для идентификации гельминтов. В статье впервые приводятся данные об ультраструктурных особенностях латеральных крыльев нематоды *T. tenuis*. В результате исследований было установлено, что, несмотря на то, что у некоторых паразитических нематод семейства Trichostrongylidae морфологическое строение латеральных крыльев кутикулы одинаково по всей поверхности тела, у нематоды *T. tenuis*, относящейся к тому же семейству, при ультраструктурных исследованиях выявлено 4 формы, особенности которых представлены на схемах и электронограммах. Латеральные крылья состоят из кортикального, гомогенного и фибриллярного слоев, различающихся по размеру, толщине и другим признакам. На участке тела нематоды *T. tenuis* от передней части (ротовой) до начала кишечника кутикула гладкая, на участке тела от тонкого кишечника и далее начинают проследиваться латеральные крылья, которые по форме напоминают «гребень». По мере приближения к заднему концу тела латеральные крылья приобретают форму «крючьев». На хвостовом отделе латеральные крылья, еще более усложняясь, приобретают форму «шипов». На латеральных крыльях в форме «шипов» дополнительно наблюдаются относительно мелкие выросты. Эти признаки могут использоваться для уточнения таксономического положения видов гельминтов.

Ключевые слова: нематода *Trichostrongylus tenuis*, латеральные крылья, ультраструктура, трансмиссионный электронный микроскоп.

Об авторах:

Ф.Г. Рзаев – Институт зоологии НАН Азербайджана, ул. А.Аббасаде, проезд 1128, квартал 504, Баку, Азербайджан, AZ1073; Азербайджанский медицинский университет, ул. С.Вургун, 163, Баку, Азербайджан, AZ1078, f.rzayev@zoology.science.az, <https://orcid.org/0000-0002-8128-1101>

М.И. Сеидбейли – Нахчыванский государственный университет, Университетский городок, Нахчыван, Азербайджан, AZ7012, m.seyidbeyli@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3458-5222>

С.Г. Магеррамов – Нахчыванский государственный университет, Университетский городок, Нахчыван, Азербайджан, AZ7012, salehmaharramov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0576-6561>

Э.К. Гасымов – Азербайджанский медицинский университет, ул. С.Вургун, 163, Баку, Азербайджан, AZ1078, eldar.gasimov@amu.edu.az, <https://orcid.org/0000-0002-5104-4260>

Введение

Нематоды семейства Trichostrongylidae широко распространены во всех зонах земного шара, паразитируют в различных органах амфибий, рептилий, птиц, млекопитающих, а также человека (Hoberg, Lichtenfels, 1994; Roberts et al., 2009; McAllister et al., 2010; Yildirimhan et al., 2011; Phosuk et al., 2013; Seyidbeyli, Rzayev, 2018a). Нематода *Trichostrongylus tenuis* является специфическим паразитом домашних водоплавающих птиц (Seyidbeyli et al., 2019a). При высокой интенсивности она вызывает серьезные изменения в организме хозяина, снижая производительность и ухудшая качественные показатели мяса (Rzayev, 2013; Seyidbeyli, Rzayev, 2018b; Seyidbeyli et al., 2019b). Исследование ультраструктуры паразита необходимо для выяснения его систематического положения, выявления паразито-хозяйинных отношений для последующего планирования мер борьбы с этими паразитами.

Большое разнообразие морфологических особенностей латеральных крыльев позволяет использовать их как один из основных признаков для идентификации гельминтов. Латеральные крылья были изучены лишь у некоторых видов из семейства Trichostrongylidae (Beveridge, Durette-Desset, 1994). Данные об ультраструктуре нематод из рода *Trichostrongylus* имеются только для вида *T. colubriformis* (Kenneth, Eric, 1972; Wharton, 1986). Некоторые морфологические параметры

(общая длина и ширина паразита, спикулы и рулек) нематод этого рода тоже были описаны (Shahbazi et al., 2012; Ghasemikhah et al., 2011). Литературные данные об ультраструктуре нематоды *T. tenuis* нами не обнаружены. Поэтому целью данной работы было изучение ультраструктурных особенностей латеральных выростов кутикулы *T. tenuis*, которые считаются одним из основных систематических признаков.

Материал и методика

T. tenuis были собраны и исследованы методом полного паразитологического вскрытия (Скрябин, 1928; Дубинина, 1971) в рамках научно-исследовательской работы, проводимой с целью изучения ультраструктуры основных патогенных гельминтов домашних водоплавающих птиц, на территории Нахчыванской АР. Гельминты были окрашены (кармин), обезвожены и из них были приготовлены препараты в канадском бальзаме. Препараты просмотрены с помощью бинокля МБС-9 и светового микроскопа Primo Star (Zeiss, Germany). Фотографии сделаны с помощью фотоаппарата EOS D650 (Canon, Chine). Определение вида паразита производилось по определителю К.М. Рыжикова (1967).

Для изучения ультраструктуры уже определенных *T. tenuis* они были зафиксированы в смеси 2 % раствора глутаральдегида, 2 % раствора параформальдегида и 0,1 % раствора пикриновой кислоты на 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,4). После того как образцы в течение суток находились в фиксаторе, проводилась постфиксация в 1 % растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере (pH=7,4) в течение 2 часов. Из материала были приготовлены Аралдит-Эпон блоки в соответствии с общим протоколом, принятым в электронной микроскопии (Kuo, 2007). Полученные с помощью ультрамикротомы EM UC7 (Leica, Germany) полутонкие срезы (1–2 мкм) окрашивались метиленовым синим, азур-II и фуксином (D'Amico, 2005). Срезы изучали под световым микроскопом Primo Star (Zeiss, Germany), необходимые участки были сфотографированы цифровой фотокамерой EOS D650 (Canon, Chine). Ультратонкие срезы (50–70 нм), полученные с тех же блоков, сначала окрашивались 2 % насыщенным водным раствором уранилацетата, затем 0,6 % раствором чистого цитрата свинца на 0,1 М растворе NaOH. Описание и фотографирование ультратонких срезов производилось на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (JOEL, Japan) при ускоряющем напряжении 80–120 кВ.

Результаты и обсуждение

Идентификация нематоды *T. tenuis*, относящейся к семейству Trichostrongylidae, вызывает некоторые сложности, так как виды этого семейства очень схожи по морфологическому строению. Определить вид становится возможным лишь при условии уточнения нескольких таксономических признаков (спикула, рулек, кутикула, латеральные крылья). Поэтому возникает необходимость более глубокого изучения морфологического строения видов для выявления новых таксономических признаков. У гельминтов (нематод) одним из основных признаков считаются латеральные крылья. Строение латеральных крыльев у некоторых видов из семейства Trichostrongylidae (*Austrostrongylus victoriensis*, *Patricialina birdi*, *Woolleya monodelphis*, *Paraustrostrongylus ratti*, *Nippostrongylus magnus*, *Odilia bainaе*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus spathiger* и *Camelostongylus mentulatus*) изучено методами световой и электронной микроскопии, и по каждому виду были даны схемы и электронограммы (Beveridge, Durette-Desset, 1994, 1992; Hoberg et al., 1993; Lee, 1965; Lichtenfels, 1977; Martin, Lee, 1983). Установлены отличительные черты и морфологические различия латеральных крыльев у 9 видов нематод из семейства Trichostrongylidae, выявлено, что они состоят из кортикального, гомогенного и фибриллярного слоев, различающихся по размеру, толщине и другим признакам.

Нами при анализе литературных и собственных данных выявлены значительные отличия латеральных выростов кутикулы у нематоды *T. tenuis* по сравнению с другими представителями данного семейства. Кроме этого, ранее всеми авторами отмечалось, что латеральные крылья у нематод имеют одинаковую морфологическую структуру на всей поверхности тела (Beveridge, Durette-Desset, 1994). Нами же у нематоды *T. tenuis*, относящейся к тому же семейству, с помощью световой и электронной микроскопии, было установлено, что латеральные крылья на передней части тела сглажены, а ближе к задней части тела они становятся крупнее и изменяются с морфологической точки зрения. В результате исследований нами было установлено, что

латеральные крылья, развивающиеся на соединительной ткани и являющиеся утолщением кутикулы по всей длине тела, у нематоды *T. tenuis* представлены 4 формами (рис. 1. А–Д и 2. А–З).

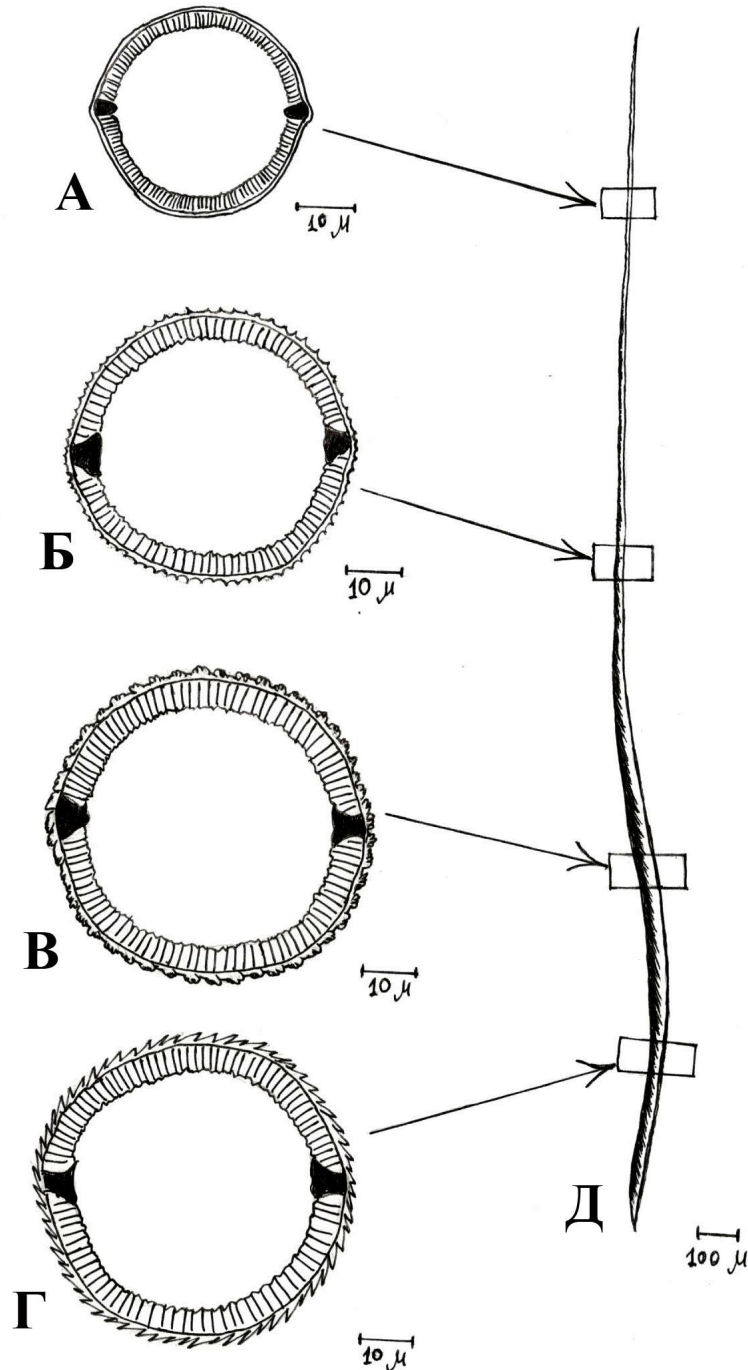


Рис. 1. Схематический рисунок поперечного среза кожно-мускульного мешка и кутикулы вдоль всего тела нематоды *T. tenuis*. А – ровная кутикула без латеральных крыльев (передняя часть тела), Б – латеральные крылья в форме гребня, В – латеральные крылья в форме крючьев, Г – латеральные крылья в форме шипа, Д – общий вид паразита. Объяснения даны в тексте

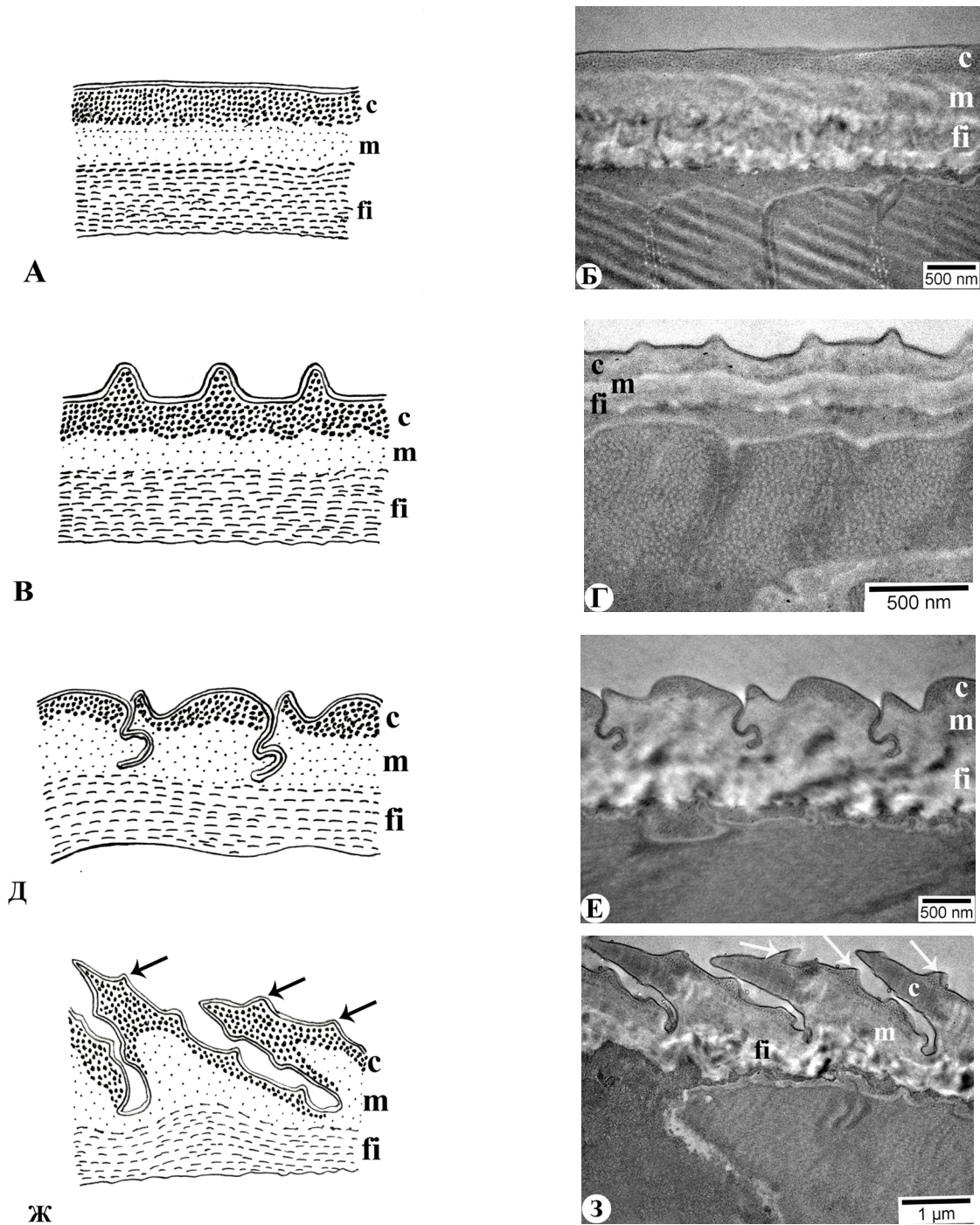


Рис. 2. Ультраструктура кутикулы и латеральных крыльев нематоды *T. tenuis*. А, В, Д, Ж – схематические рисунки; Б, Г, Е, З – электронограммы; А, Б – форма кутикулы без латеральных крыльев; В, Г – крылья в форме «гребня»; Д, Е – крылья в форме «крючков»; Ж, З – крылья в форме «шипа»; *c* – кортикальный слой; *m* – гомогенный или средний слой; *fi* – фибриллярный или волокнистый слой. Объяснения даны в тексте

Как видно на рис. 1, на участке тела гельминта *T. tenuis* от передней части (ротовой) до начала кишечника кутикула лишена латеральных крыльев (рис. 1. А и 2. А–Б). На участке тела нематоды, начиная от тонкого кишечника, начинают прослеживаться латеральные выросты кутикулы, которые по форме напоминают «гребень» (рис. 1. Б и 2. В–Г). По мере приближения к заднему концу тела латеральные крылья, изменяя свою структуру, приобретают форму «крючьев» (рис. 1. В и 2. Д–Е). На хвостовом отделе латеральные крылья, еще более усложняясь, приобретают форму «шипов» (рис. 1. Г и 2. Ж–З). Также следует отметить, что на латеральных крыльях, имеющих форму «шипов», дополнительно наблюдаются относительно мелкие выросты (рис. 2. Ж–З, указано белыми стрелками).

На рис. 1 дан общий вид гельминта и стрелками указаны участки с различными формами латеральных крыльев. Анализ имеющихся электронограмм и литературных данных об ультраструктурных особенностях видов того же семейства (Beveridge, Durette-Desset, 1994; Kenneth, Eric, 1972; Богоявлинский, 1973; Wilfrida et al., 2003) показал, что кутикула нематоды *T. tenuis* состоит из коркового слоя (он в свою очередь подразделяется на эпикутикулу, внешний и внутренний корковый слой), гомогенного слоя (также называется средним слоем), фибриллярного, или волокнистого слоя (он в свою очередь подразделяется на внешний, средний и внутренний фибриллярный слой), и базальной мембраны (Рис. 2. А–З). Таким образом, впервые исследовав кутикулу нематоды *T. tenuis* методами световой и электронной микроскопии, мы установили, что она состоит из 8 слоев. Также показано, что все 4 морфологически различные формы латеральных крыльев, образовавшихся из соединительной ткани, на протяжении всего тела этой нематоды состоят из кортикального, гомогенного, или среднего и фибриллярного слоев (внешний и внутренний) (Рис. 2. А–З). Фибриллярный, или волокнистый слой в составе всех 4 форм латеральных крыльев толще по сравнению с остальными слоями. Также на латеральных крыльях в форме крючьев и шипов гомогенный слой толще по сравнению с кортикальным.

У нематод, относящихся к трихостонгилидам, наличие различных форм латеральных крыльев и их резкие отличия находятся в прямой зависимости от места их локализации. Например, в отличие от исследованных другими авторами трихостонгилид, локализирующихся в полости пищеварительных органов хозяина, нематода *T. tenuis* локализуется в слизистой оболочке стенок слепых отростков кишечника. Поэтому при наличии сложных латеральных крыльев на задней части тела нематоды на передней они отсутствуют. Мы можем предположить, что видоизменение этих латеральных крыльев и принятие ими различных форм («гребень», «крючья», «шипы») является адаптацией паразита для возможности зафиксироваться в толще слизистых оболочек слепых отростков кишечника.

Выводы

Выявлены значительные отличия латеральных выростов кутикулы у нематоды *Trichostrongylus tenuis* по сравнению с другими представителями семейства Trichostrongylidae. Установлено, что латеральные крылья на передней части тела сглажены, а ближе к задней части тела они становятся крупнее и изменяются морфологически. У данного вида выявлено 4 формы латеральных крыльев, особенности которых представлены на схемах и электронограммах. Эти признаки могут использоваться в уточнении таксономического положения видов гельминтов.

Список літератури / References

- Богоявлинский Ю.К. (1973). Структура и функции покровных тканей паразитических нематод. Москва: Наука, 1973. 205 с. [Bogoyavlinsky Yu.K. (1973). *The structure and functions of integumentary tissues of parasitic nematodes*. Moscow: Nauka. 205 p.]
- Дубинина М.Н. (1971). Паразитологическое исследование птиц. Ленинград: Наука. 140 с. [Dubinina M.N. *Parasitological study of birds*. Leningrad: Nauka. 140 p.]
- Рыжиков К.М. (1967). Определитель гельминтов домашних водоплавающих птиц. Москва: Наука. 262 с. [Ryzhikov K.M. (1967). *Key to helminths of domestic waterfowl*. Moscow: Nauka. 262 p.]
- Скрябин К.И. (1928). Метод полевых гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. Москва: Моск. гос. универ. 46 с. [Scryabin K.I. (1928). *The method of field helminthological autopsies of vertebrates, including humans*. Moscow: Moscow State University. 46 p.]

- Beveridge I., Durette-Desset M.C. (1992). A new species of trichostrongyloid nematode, *Odilia binae*, from a native rodent, *Rattus fuscipes* (Waterhouse). *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 116, 123–128.
- Beveridge I., Durette-Desset M. (1994). Comparative ultrastructure of the cuticle of trichostrongyle nematodes. *International Journal for Parasitology*, 24, 887–898. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90015-9)
- D'Amico F. (2005). A polychromatic staining method for epoxy embedded tissue: a new combination of methylene blue and basic fuchsin for light microscopy. *Biotech. Histochem.*, 80(5–6), 207–210. <https://doi.org/10.1080/10520290600560897>
- Ghasemikhah R., Mirhendi H., Kia E.B. et al. (2011). Morphological and morphometrical description of *Trichostrongylus* species isolated from domestic ruminants in Khuzestan Province, Southwest Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 6, 82–88.
- Hoberg E.P., Lichtenfels J.R., Piling P.A. (1993). Synopse of *Cooperia neitzi* (Trichostrongylidae: Cooperiinae) with comments on vulval inflations and hypertrophy of cuticular ridges among the trichostrongylids. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 60, 153–161.
- Hoberg E.P., Lichtenfels J.R. (1994). Phylogenetic systematic analysis of the Trichostrongylidae (Nematoda), with an initial assessment of coevolution and biogeography. *The Journal of Parasitology*, 80(6), 976–996.
- Kenneth S., Eric H. (1972). The ultrastructure of the adult stage of *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus placei*. *Parasitology*, 64, 173–179. <https://doi.org/10.1017/S0031182000029590>
- Kuo J. (2007). *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa: Humana Press. 625 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-294-6>
- Lee D.L. (1965). The cuticle of adult *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology*, 55, 173–181. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068463>
- Lichtenfels J.R. (1977). Differences in cuticular ridges among *Cooperia* spp. of North American ruminants with an illustrated key to species. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 44, 111–119.
- Martin J., Lee D.L. (1983). *Nematodirus battus*: structure of the body wall of the adult. *Parasitology*, 86, 481–488. <https://doi.org/10.1017/s0031182000050678>
- McAllister C.T., Burse C.R., Freed P.S. (2010). Helminth parasites of amphibians and reptiles from the Ucayali Region, Peru. *J. Parasitol.*, 96(2), 444–447. <https://doi.org/10.1645/ge-2206.1>
- Phosuk I., Intapan P.M., Sanpool O. et al. (2013). Molecular evidence of *Trichostrongylus colubriformis* and *Trichostrongylus axei* infections in humans from Thailand and Lao PDR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 89, 376–379. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0113>
- Roberts L.S., Schmidt G.D., Janovy J. (2009). *Foundations of Parasitology*. 8th ed. Boston, USA: McGraw-Hill Higher Education. 428 p.
- Rzayev F.H. (2013). The comparative analysis of mixed invasions of the domestic waterfowl in different ecological areas of Azerbaijan. *Proceedings of the Azerbaijan Institute of Zoology*, 31(2), 136–144.
- Seyidbeyli M.I., Maharramov S.H., Rzayev F.H. (2019a). Causes of similarity of helminth fauna of domestic waterfowls and wild birds in Nakhchivan AR, parasites specificity. *The Journal of Agrarian Science*, 1, 58–63.
- Seyidbeyli M.I., Maharramov S.H., Rzayev F.H. (2019b). Comparative analysis of mixed invasions in domestic waterfowls in Nakhchivan AR. *Scientific publications of Nakhchivan State University, Series of Natural and Medical Sciences*, 3, 209–212.
- Seyidbeyli M.I., Rzayev F.H. (2018a). Helminth fauna of waterfowl poultry in the territory of Babək region of Nakhchivan AR. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 1668–1671.
- Seyidbeyli M.I., Rzayev F.H. (2018b). To the study of helminth fauna of geese (*Anser anser* dom.) and ducks (*Anas platyrhynchos* dom.) in Azerbaijan. *Collected materials of the scientific articles of International conference dedicated to 85 years of Prof. R.A.Asgerov*. Baku: Tebib, pp. 127–128.
- Shahbazi A., Fallah E., Koshki M.H.K. et al. (2012). Morphological characterization of the *Trichostrongylus* species isolated from sheep in Tabriz, Iran. *Res. J. Vet. Sci.*, 2(5), 309–312.
- Wharton D. (1986). The structure of the cuticle and sheath of the infective juvenile of *Trichostrongylus colubriformis*. *Z. Parasitenkd.*, 72, 779–787. <https://doi.org/10.1007/BF00925098>

Wilfrida D., Eirini K., Derek B., Thierry B. (2003). Review of the ultrastructure of the nematode body cuticle and its phylogenetic interpretation. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 78(3), 465–510. <https://doi.org/10.1017/s1464793102006115>

Yildirimhan H.S., Burseley C.R., Altunel F.N. (2011). Helminth parasites of the Balkan green lizard, *Lacerta trilineata* Bedriaga 1886, from Bursa, Turkey. *Turk. J. Zool.*, 35(4), 519–535. <https://doi.org/10.3906/zoo-0910-1>

Форми та ультраструктурні особливості латеральних крил гельмінта *Trichostrongylus tenuis* Mehlis, 1846 (Nematoda: Trichostrongylidae)

Ф.Г. Рзаєв, М.І. Сейдбейлі, С.Г. Магеррамов, Е.К. Гасімов

З метою вивчення ультраструктурних особливостей будови нематоди *Trichostrongylus tenuis* у 2015–2018 рр. у Нахчіванській АР були проведені гельмінтологічні дослідження, і методом повного паразитологічного розтину був зібраний матеріал від домашніх водоплавних птахів. Поряд з тим, що цей гельмінт є специфічним паразитом домашніх водоплавних птахів, він домінує серед усіх зазначених нами видів гельмінтів і є причиною серйозних змін в організмі господаря. Вивчення ультраструктури нематоди *T. tenuis* має важливу роль у виявленні паразито-хазяїнних відносин, уточненні систематичного положення паразитів і в підготовці заходів боротьби з цими паразитами. Крім цього, велика різноманітність морфологічних особливостей латеральних крил дозволяє використовувати їх як одну з основних ознак для ідентифікації гельмінтів. У статті вперше наводяться дані про ультраструктурні особливості латеральних крил нематоди *T. tenuis*. У результаті досліджень було встановлено, що, незважаючи на те, що у деяких паразитичних нематод родини Trichostrongylidae морфологічна будова латеральних крил кутикули є однаковою по всій поверхні тіла, у нематоди *T. tenuis*, що належить до тієї ж родини, при ультраструктурних дослідженнях виявлено 4 форми, особливості яких представлені на схемах і електроннограмах. Латеральні крила складаються з кортикального, гомогенного і фібрилярного шарів, що розрізняються за розміром, товщиною та іншими ознаками. На ділянці тіла нематоди *T. tenuis* від передньої частини (ротової) до початку кишечника кутикула гладенька, на ділянці тіла від тонкого кишечника і далі починають простежуватися латеральні крила, які за формою нагадують «гребінь». У міру наближення до заднього кінця тіла латеральні крила набувають форму «гаків». На хвостовому відділі латеральні крила, ще більш ускладнюючись, набувають форми «шпильок». На латеральних крилах у формі «шипів» додатково спостерігаються відносно дрібні вирости. Ці ознаки можуть використовуватися для уточнення таксономічного положення видів гельмінтів.

Ключові слова: нематода *Trichostrongylus tenuis*, латеральні крила, ультраструктура, трансмісійний електронний мікроскоп.

Про авторів:

Ф.Г. Рзаєв – Інститут зоології НАН Азербайджану, вул. А.Аббасзаде, проїзд 1128, квартал 504, Баку, Азербайджан, AZ1073; Азербайджанський медичний університет, вул. С.Вургун, 163, Баку, Азербайджан, AZ1078, f.rzayev@zoology.science.az, <https://orcid.org/0000-0002-8128-1101>

М.І. Сейдбейлі – Нахчіванський державний університет, Університетське містечко, Нахчіван, Азербайджан, AZ7012, m.seyidbeyli@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3458-5222>

С.Г. Магеррамов – Нахчіванський державний університет, Університетське містечко, Нахчіван, Азербайджан, AZ7012, salehmaharramov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0576-6561>

Е.К. Гасімов – Азербайджанський медичний університет, вул. С.Вургун, 163, Баку, Азербайджан, AZ1078, eldar.gasimov@amu.edu.az, <https://orcid.org/0000-0002-5104-4260>

Forms and ultrastructural features of the lateral alae of the helminth *Trichostrongylus tenuis* Mehlis, 1846 (Nematoda: Trichostrongylidae)

F.H. Rzayev, M.I. Seyidbeyli, S.H. Maharramov, E.K. Gasimov

Ultrastructural features of the nematode *Trichostrongylus tenuis* were studied. Helminthological studies were carried out in the Nakhchivan Autonomous Republic in 2015–2018. The material from domestic waterfowl was collected by the method of complete parasitological dissection. Along with the fact that this helminth is a specific parasite of domestic waterfowl, it dominates among all the types of helminths noted by us and is the cause of serious changes in the host organism. The study of the ultrastructure of the nematode *T. tenuis* is important for identifying parasitic-host relationships, clarifying the systematic position of parasites and in preparing measures to combat these parasites. In addition, a wide variety of morphological features of the lateral alae, allows them to be used as one of the main features for identifying helminth species. The article first presents data on the ultrastructural features of the lateral alae of the nematode *T. tenuis*. As a result of the studies, it was found that, despite the fact that in some parasitic nematodes of the Trichostrongylidae family the morphological structure of the lateral alae of the cuticle is identical over the entire surface of the body, in the nematode *T. tenuis* belonging to the same family, four forms were revealed

during ultrastructural studies, which were represented using diagrams and electron diffraction patterns. Lateral alae consist of cortical, homogeneous, and fibrillary layers differing in size, thickness, and other features. From the front (oral) part of body of the nematode *T. tenuis* to the beginning of the intestine, the cuticle is smooth; on the body part from the small intestine and behind it, lateral alae begin to be observed, which resemble a “ridge” in shape. When approaching the posterior end of the body, the lateral alae take the form of “hooks”. On the caudal region, the lateral alae become even more complicated and get the form of “spikes”, and relatively small outgrowths are additionally observed on these lateral wings. These signs can be used to clarify the taxonomic position of helminth species.

Key words: *nematode Trichostrongylus tenuis, lateral alae (ridges), ultrastructure, transmission electron microscope.*

About the authors:

F.H. Rzayev – Institute of Zoology, Azerbaijan NAS, A.Abbas-zadeh Str., passage 1128, block 504, Baku, Azerbaijan, AZ1073; Azerbaijan Medical University, S.Vurgun Str., 163, Baku, Azerbaijan, AZ1078, f.rzayev@zoology.science.az, <https://orcid.org/0000-0002-8128-1101>

M.I. Seyidbeyli – Nakhchivan State University, University campus, Nakhchivan, Azerbaijan, AZ7012, m.seyidbeyli@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3458-5222>

S.H. Maharramov – Nakhchivan State University, University campus, Nakhchivan, Azerbaijan, AZ7012, salehmaharramov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0576-6561>

E.K. Gasimov – Azerbaijan Medical University, S.Vurgun Str., 163, Baku, Azerbaijan, AZ1078, eldar.gasimov@amu.edu.az, <https://orcid.org/0000-0002-5104-4260>

Представлено: Х.Г.Абдуллаєва / Presented by: Kh.G.Abdullayeva

Рецензент: А.Ю.Утевський / Reviewer: A.Yu.Utevsky

Подано до редакції / Received: 14.10.2019

... МІКРОБІОЛОГІЯ ... MICROBIOLOGIA ...

УДК: 631.46:579.64:574.34:574.38

Особливості колонізації фітосфери проростків пшениці інтродукованими штамми *Escherichia coli***О.О. Авксентьєва, О.І. Віннікова, В.В. Жмурко**

В роботі представлені результати дослідження здатності інтродукованих штамів *Escherichia coli* колонізувати різні ніші фітосфери – ризосферу, ендосферу та філосферу проростків озимої м'якої пшениці сорту Мерсія та впливати на ростову реакцію рослин за цих умов. Матеріалом дослідження служили ATCC 8739 та клінічний штам *E. coli*, а також ізолят, виділений з ґрунту агроценозу під пшеницею. Вегетаційні досліди проводили у факторостатній камері кафедри фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів ХНУ ім. В.Н.Каразіна. Дослідні рослини інокулювали суспензіями штамів та ґрунтового ізоляту *E. coli*, проводячи полив у вегетаційні посудини, де вирощували проростки протягом 10 діб. Паралельно методом послідовних змивів проводили аналіз динаміки чисельності КУО *E. coli* в ризо-, ендо- та філосфері проростків. Після завершення експерименту аналізували ростову реакцію за показниками лінійного росту та інтегральним показником ростових і біосинтетичних процесів – накопиченням біомаси. Результати експериментів показали, що за інокуляції ATCC 8739 та клінічним штамом *E. coli* знижується схожість насіння пшениці та гальмується ростова реакція. Інокуляція ґрунтовым ізолятом *E. coli* практично не впливає на схожість насіння, лінійний ріст та накопичення біомаси проростками пшениці сорту Мерсія. Встановлено, що чисельність бактерій *E. coli* у фітосфері рослин пшениці залежить від інокульованого штаму та різниться у різних частинах фітосфери проростків. Максимальну кількість КУО *E. coli* у фітосфері виявлено за інокуляції рослин клінічним штамом, втричі меншу – за впливу ґрунтового ізоляту, майже в 6 разів меншу – за інокуляції стандартним штамом. Виявлені розбіжності за ступенем колонізації різних частин фітосфери при інокуляції дослідних проростків різними штамми та ґрунтовым ізолятом *E. coli*: у контрольному варіанті та за впливу ATCC 8739 розподіл між ризо- та ендосферою приблизно однаковий, за дії клінічного штаму – переважно колонізується ендосфера рослин, за інокуляції ґрунтовым ізолятом – ризосфера. У філосфері дослідних проростків в незначній кількості виявлено клітини виключно клінічного штаму, що свідчить про його підвищені адгезивні властивості. Обговорюються рослинно-мікробні взаємовідносини та здатність умовно-патогенних бактерій *E. coli* колонізувати різні сфери рослинного організму та використовувати проростки пшениці як альтернативного хазяїна.

Ключові слова: ATCC 8739, клінічний штам, ґрунтовий ізолят *E. coli*, *Triticum aestivum* L., ростова реакція, колонізація фітосфери, ризосфера, ендосфера, філосфера.

Про авторів:

О.О. Авксентьєва – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

О.І. Віннікова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

В.В. Жмурко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Вступ

Відомо, що рослина, як і будь-який багатоклітинний організм, представляє собою екологічну нішу (фітосферу) для існування різноманітних мікроорганізмів (Мошинець, Косаківська, 2010а). Ця екологічна ніша – фітосфера – є неоднорідною та складається з різних зон: ризосфера – найбільш чисельна та продуктивна, ендосфера, або гітосфера, переважно представлена асоціативними мікроорганізмами, та дуже екстремальна для мікроорганізмів – філосфера (Мошинець, Косаківська, 2010а). Рослинно-мікробні взаємовідносини є дуже складними. Мікроорганізми, що асоційовані з рослиною, можуть бути корисними, патогенними або нейтральними. Дослідження взаємовідносин рослин та мікроорганізмів переважно спрямовані на вивчення ролі мутуалістичних та фітопатогенних взаємодій. Нейтральні мікроорганізми, як правило, досліджують як потенційні фітопатогени – умовно-патогенні для рослинного організму або як потенційно корисні мікроорганізми – представники бактерій групи PGPR (Мошинець, Косаківська, 2010б; Соловьева, Алещенкова, 2018). Однак в останні роки показано, що рослини можуть виступати як джерело умовно-патогенної або патогенної мікрофлори для людини, бути альтернативним господарем або

переносником до людського організму (Алексеев, 2010; Маркова, Турская, 2012; Hofmann et al., 2014; Holden et al., 2009).

Як відомо, шлях сільськогосподарської продукції від поля до споживача може мати декілька точок дотику з патогенними чи умовно-патогенними бактеріями, і актуальним завданням сучасності є мінімізація даних контактів з метою зниження ризику інфікування організму людини (Hofmann et al., 2014; Eibenbergera et al., 2018; Jo, Park, 2019).

На сьогодні в Україні та багатьох інших країнах працюють програми органічного землеробства (Органічне виробництво..., 2013). В рамках виробництва екологічно чистої «органічної» сільськогосподарської продукції використовуються органічні добрива, до складу яких можуть входити бактерії кишкової групи, а за умов отримання таких добрив від хворої худоби чи забруднених харчових відходів у них можуть міститися й патогенні штами різних видів ентеробактерій (Murphy et al., 2016; Eibenbergera et al., 2018; Jo, Park, 2019; Jechalke et al., 2019). Окрім того, значної популярності набуває вживання в їжу термічно не обробленого мікрогрину. Він являє собою молоді рослини різних сільськогосподарських культур, у тому числі й злаків (Рибалка, 2011; Riggio et al., 2019). Модельними експериментами було показано, що за умов обробки простерилізованого насіння патогенними штамми бактерій з подальшим вирощуванням мікрогрину в неґрунтовій культурі відбувається потрапляння цих бактерій всередину тканин проростків (Liu et al., 2018; Wright, Holden, 2018).

Щорічно у світі реєструється близько мільярда діарейних захворювань, при цьому більшість з них викликано умовно-патогенними бактеріями з родини Enterobacteriaceae (Поздеев, Федоров, 2007). Особливо небезпечним стає потрапляння патогенних ентеробактерій до рослинних тканин, а також їхня здатність до полігостальності та горизонтального перенесення генів (Іванова и др., 2013; Liu et al., 2018; Frank et al., 2017; Jo, Park, 2019). Однією з причин епідеміологічних негараздів, які пов'язані з умовно-патогенними мікроорганізмами, є їхня висока екологічна пластичність. Здатність бактерій колонізувати філоплану чи корені рослин регулюється багатьма як бактеріальними, так і рослинними факторами (Jechalke et al., 2019; Merget et al., 2019; Moune et al., 2020). Також встановлено, що існує висока адаптаційна здатність ентеробактерій до різних температур (Merget et al., 2019). Перехід до сапротрофного способу існування за умов зниження температури до позначок, які відповідають температурі навколишнього середовища, дозволяють таким бактеріям виживати в ґрунті та вступати у взаємовідносини з рослинами та іншою біотою. Окрім того, деяким ентеробактеріям властива здатність синтезувати целюлази та пектинази – ферменти, що каталізують реакції руйнування рослинних клітинних стінок, і саме з цим пов'язують здатність бактерій потрапляти всередину рослин та колонізувати її тканини (Karmakar et al., 2018). Таким чином, перебування бактерій-патогенів людини в рослинному організмі може бути частиною циклу їх циркуляції у зовнішньому середовищі, і в цьому випадку рослина використовується бактеріями як альтернативний хазяїн чи переносник до людського організму.

Нині вже встановлені вагомі механізми колонізації мікроорганізмами рослинного організму та взаємодії з ним бактерій, які позитивно впливають на ріст і розвиток рослини, сприяють процесу мінерального живлення, захисту від патогенів та ін. (Мошинець, Косаківська, 2010б). Однак все ще недостатньо вивчені взаємодії рослини з патогенними та умовно-патогенними для людини мікроорганізмами. Дослідження у цьому напрямку актуальні для запобігання можливого проникнення патогенів до організму людини з рослинною їжею, що може призвести до поширення різноманітних захворювань. Крім того, поглиблення досліджень взаємодії рослина-мікроорганізм необхідне для розуміння біологічної природи співіснування мікроорганізмів з рослинами, як вагомому компоненту функціонування біосфери.

У літературі накопичена певна кількість інформації щодо колонізації різними патогенними бактеріями різноманітних сільськогосподарських рослин, переважно овочевих та плодкових культур (Karmakar et al., 2018; Liu et al., 2018; Wright, Holden, 2018). Однак недостатньо вивчені закономірності колонізації різними штамми рослин пшениці, головної продовольчої культури України.

Отже, метою роботи було дослідження здатності інтродукованих штамів *Escherichia coli* колонізувати ніші фітосфери (ризосфери, ендосфери та філосфери) проростків пшениці та впливати на їх ростову реакцію.

Матеріал і методи дослідження

Біологічний матеріал. У роботі використовували типовий (ATCC 8739) та клінічний штами *E. coli*, отримані з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та імунології

Харківського національного медичного університету, а також ізолят *E. coli*, виділений з ґрунту агроценозу під пшеницею дослідної ділянки кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (розташована на території університетського Ботанічного саду, м. Харків). Бактерії культивували на середовищі МПБ в термостаті за температури +36°C. Як рослинний матеріал використовували озиму м'яку пшеницю *Triticum aestivum* L. сорту Мерсія з колекції кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В.Н.Каразіна.

Дизайн досліджень. Простерилізовані у спиртовому розчині та відмиті стерильною дистильованою водою зерна пшениці висівали у стерильні вегетаційні ємності з простерилізованим (автоклавуванням за температури +121°C протягом 1 год.) ґрунтом по 15–20 насінин на посуд. Рослини вирощували у факторостатній камері за температури +22°C/+18°C (день/ніч), 16-годинному фотоперіоді та освітленні 15–20 клк. На 7-му добу аналізували схожість насіння (ДСТУ 3768: 2019). Протягом 10 діб, починаючи з проростання насіння, на поверхню ґрунту вносили по 10 мл добової водної суспензії різних штамів та ґрунтового ізоляту бактерій *E. coli*, кількість клітин встановлювали за фотоелектроколориметричним методом (Практикум..., 2005), і вона складала 1×10^6 клітин/мл середовища. Як контроль використовували проростки, у ґрунт під якими вносили по 10 мл стерильної дистильованої води. В ході експерименту, за необхідності, ґрунт зволожували однаковою кількістю стерильної водогазної води. Після появи сходів щодоби аналізували фітосферу проростків на вміст бактерій *E. coli*. Методом послідовних змивів готували суспензії для визначення наявності бактерій на поверхні коренів і листків пшениці (Практикум..., 2005). Для визначення наявності бактерій в ендосфері (гітосфері) рослин, наважки рослинного матеріалу попередньо гомогенізували в стерильній ступці, а потім, шляхом послідовного відмивання у стерильній дистильованій воді, готували суспензії для визначення кількості бактерій. Чашки Петрі із диференційним середовищем Ешбі культивували в термостаті за температури +36°C. Підрахунок колоній *E. coli* здійснювали на третю добу (Практикум..., 2005). Заселеність різних ніш фітосфери виражали як КУО $\times 10^6$ /мг рослинної маси. Визначали динаміку КУО *E. coli* у фітосфері, яка може відображувати різну здатність штамів колонізувати певний елемент фітосфери – листки, корені та гітосферу. За цими показниками судили про взаємодію того чи іншого штаму з рослинним організмом. На 17-ту добу експерименту аналізували ростову реакцію проростків, проводячи вимірювання їх біомаси і показників лінійного росту – загальну довжину проростків, довжину надземної частини та коренів, аналізуючи в кожному варіанті не менш ніж 10–15 проростків.

Статистичний аналіз. Досліди проводили в трьох біологічних повторностях. В таблицях і на графіках наведені середні значення та стандартні відхилення. Статистичний аналіз отриманих результатів виконували стандартними методами варіаційної статистики (Лакин, 1990) за допомогою вбудованої опції програмного пакету Microsoft Excel™. При цьому значення залежної перемінної (вихідні значення \log КУО) піддавали двом логарифмуванням: спільне з перетворенням проміжного від'ємного результату на протилежне позитивне число, а значення асимптоти встановлювали емпірично з максимальним середнім значенням \log КУО, яке спостерігали у даній серії дослідів. Регресійний аналіз росту колоній здійснювали за різновидом функції Гомпертца:

$$Y = A \times e^{-e^{-(b+cx)t}}$$

де Y – досліджуваний ефект (\log КУО), t – час після проростання насіння, A – верхня асимптота, e – основа натурального логарифму, b і c – параметри росту, причому b встановлює зміщення за шкалою часу (затримку стартової фази росту), а c втілює швидкість росту (Шмидт, 1984).

Результати та обговорення

Одним з інтегральних показників, які можуть свідчити про взаємодію бактерій з рослинним організмом, може бути зміна у ростових процесах. З цієї точки зору доцільним було з'ясування впливу штамів кишкової палички на ростову реакцію пшениці.

Відомо, що схожість насіння визначає здатність рослини швидко формувати проросток і подальший нормальний хід росту і розвитку. Тому нами проведено її визначення за впливу різних штамів *E. coli*. Одержані результати показали (табл. 1), що дія суспензій досліджуваних штамів та ґрунтового ізоляту кишкової палички викликала прояв стійкої тенденції до зниження схожості насіння пшениці сорту Мерсія. Аналіз отриманих даних показав, що найбільш істотним зниження схожості було за дії клінічного штаму, менший негативний ефект проявив штам ATCC 8739, а

найменший – ізолят з ґрунту. На нашу думку, це може бути пов'язаним з відмінностями досліджуваних штамів та ґрунтового ізоляту за здатністю або ж проникати у зернівку (чи зародок), або ж заселяти насіння у процесі проростання (Liu et al., 2018; Wright, Holden, 2018). Вірогідно, що в результаті цього відбувається використання бактеріями метаболітів зернівки у якості трофічних факторів, що може негативно впливати на процес проростання. Не виключено, що бактерії, які проникають до зернівки, продукують речовини, що здатні порушувати або гальмувати у ній метаболічні процеси, від інтенсивності яких залежить схожість насіння.

Вагомим показником ростової реакції на дію різноманітних чинників довкілля може бути лінійний ріст, який визначається збільшенням довжини того чи іншого органу рослини. Нами було проведено визначення довжини цілої рослини, надземної частини та коренів за впливу інокуляції ґрунту *E. coli*. Результати показали (табл. 1), що лінійний ріст рослини, її надземної частини і коренів залежав від дії мікроорганізмів, які належали до різних штамів *E. coli*. Найбільше пригнічення лінійного росту цілої рослини виявлено за дії клінічного штаму, дещо менше – при дії штаму АТСС 8739, а мікроорганізми ґрунтового ізоляту істотно не впливали на лінійний ріст цілої рослини. Така ж закономірність у зміні лінійного росту за дії штамів виявлена і для надземної частини рослин.

Ріст коренів за дії штаму АТСС 8739 і ґрунтового ізоляту практично не змінювався і навіть проявлялася незначна тенденція до його стимуляції. Клінічний штам, навпаки, істотно гальмував ріст коренів рослини (табл. 1). Отже, проявлялася залежність лінійного росту рослини від різних штамів мікроорганізмів та ґрунтового ізоляту, а також певна специфічність їх ефектів на ріст надземної частини та коренів.

Накопичення біомаси рослиною є результатом біосинтетичних процесів, яке інтегрально відображає процеси морфогенезу за різних умов довкілля та дії тих чи інших факторів. Виходячи з цього, ми вивчали вплив бактерій різних штамів кишкової палички та ґрунтового ізоляту на накопичення біомаси рослиною. Результати показали (табл. 1), що найменшою була маса рослини за дії клінічного штаму, дещо більшою вона була за дії штаму АТСС 8739, порівняно до маси в контролі, а дія ґрунтового ізоляту на формування біомаси рослиною не проявлялася, про що свідчать однакові показники у дослідному і контрольному варіанті (табл. 1). Таким чином, проявлялася специфіка у дії досліджуваних штамів та ґрунтового ізоляту на біосинтетичні процеси рослин пшениці сорту Мерсія.

Таблиця 1.

Схожість насіння і ростова реакція проростків пшениці сорту Мерсія за інокуляції ґрунту суспензією різних штамів *Escherichia coli*

Варіант інокуляції	Схожість, %	Довжина, см			Біомаса рослини, мг
		Рослина	Надземна частина	Корені	
Стерильна вода (контроль)	98, 2±1,0	17,6±0,9	11,5±0,6	6,1±0,3	301±15
<i>E. coli</i> АТСС 8739	96,5±1,0*	16,5±0,8*	10,3±0,5*	6,2±0,3	252±13*
<i>E. coli</i> клінічний	94,2±1,0*	15,4±0,8*	9,8±0,5*	5,6±0,2*	225±12*
<i>E. coli</i> , ґрунтовий ізолят	97,1±1,0	17,2±0,9	10,9±0,6	6,3±0,4	292±14

Примітка * – відмінності з контролем істотні при $P \leq 0,05$.

На нашу думку, гальмування лінійного росту і накопичення біомаси цілою рослиною та її надземною частиною, які відбувалися за дії АТСС 8739 і клінічного штаму, можуть бути пов'язані зі змінами у перебігу фізіолого-біохімічних процесів у рослині, які можуть проявлятися за взаємодії з цими штамми. Відомо, що кишкова паличка за певних умов здатна синтезувати фактори патогенності – токсини, гемолізени, сидерофори (Іванова и др., 2013; Eibenbergera et al., 2018). Ці процеси можуть викликати перехід рослини у стан адаптації до несприятливого чинника, який, зокрема, характеризується посиленням процесів використання пластичного та енергетичного матеріалу рослини на забезпечення такого стану, що зменшує використання цього матеріалу на ростові та біосинтетичні процеси. Вірогідно також, що при проникненні мікроорганізму у гістосферу рослини чи при поверхневій колонізації її органів у результаті використання мікроорганізмом ендо-

та екзометаболітів рослини як трофічних факторів відбуваються зміни у фізіолого-біохімічних процесах рослини. Тобто зміна середовища (умов існування) мікроорганізму «забезпечується» зміною процесів життєдіяльності рослинного організму. Вірогідно, що саме такі зміни можуть негативно впливати на перебіг метаболічних процесів, унаслідок чого можуть гальмуватися лінійний ріст та біосинтетичні процеси у рослин (Мошенець, Косаківська, 2010б).

Той факт, що ґрунтовий ізолят кишкової палички практично не впливав на лінійний ріст та накопичення біомаси рослинами пшениці, на нашу думку, пояснюється наступним. Вірогідно, що мікроорганізми ґрунтового ізоляту найбільш пристосовані до взаємодії з рослиною саме в ризосфері та ризоплані. Відомо, що такі мікроорганізми здатні продукувати низку біологічно активних речовин, сприяти посиленню процесів мінерального живлення рослиною, що, в кінцевому рахунку, сприяє росту і розвитку рослин (Мошинець, Косаківська, 2010б).

Отже, досліджувані штами кишкової палички по-різному впливали на ростові процеси пшениці. Вірогідно, що це може бути пов'язане, зокрема з різною кількістю бактерій, які заселяють різні частини фітосфери, що може викликати різні ефекти на ростові процеси, за рахунок різної інтенсивності використання мікроорганізмами ендометаболітів рослини на забезпечення життєдіяльності (Мошинець, Косаківська, 2010б).

Визначення чисельності бактерій, які заселяли фітосферу пшениці, ми провели на останній (17-тий) день досліді. Результати показали (табл. 2), що чисельність бактерій істотно залежить від досліджуваного штаму і різниться у різних частинах рослини.

Таблиця 2.

Чисельність бактерій *E. coli* у фітосфері проростків пшениці сорту Мерсія в залежності від інтродукованого штаму, КУО × 10⁶/мг рослинної маси

Варіант інокуляції	Чисельність <i>E. coli</i> у фітосфері проростків, КУО, 10 ⁶ /мг рослинної маси*			
	Ризоплана	Ендосфера (гісто-)	Фітосфера	Фітосфера
Стерильна вода (контроль)	16±0,8	25±1,3	не виявлено	41±2,05
<i>E. coli</i> ATCC 8739	42±2,1	50±2,5	не виявлено	92±4,08
<i>E. coli</i> клінічний	133±6,7**	475±23,8	3±0,1	611±30,55
<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	150±8,1**	66±3,3	не виявлено	216±10,13

Примітки: * – відмінності з контролем та між варіантами істотні при $P \leq 0,001$; ** – відмінності між варіантами не істотні.

Так, у фітосфері (цілій рослині) у контрольному варіанті, у якому ґрунт під рослинами зволожували стерильною дистильованою водою, встановлена наявність бактерій. Хоча вона була найменшою, порівняно до кількості в інших варіантах, все ж це дає підставу вважати, що *E. coli* здатна заселяти рослину, незалежно від штучної інокуляції. Тобто, ці бактерії здатні існувати в рослинному організмі у природних умовах, що підтверджується літературними даними (Алексеевко, 2010; Маркова, Турская, 2012).

Аналіз чисельності бактерій різних штамів у фітосфері проростків (цілій рослині) показав, що найменша їх кількість була характерна для штаму ATCC 8739, удвічі більшою була кількість бактерій ґрунтового ізоляту, а найбільшою – у понад 6 разів більше – кількість бактерій клінічного штаму, порівняно до кількості бактерій інших штамів (табл. 2).

Чисельність бактерій досліджуваних штамів по частинах фітосфери розподілялась наступним чином. У ризоплані найбільшою була кількість бактерій ґрунтового ізоляту, дещо менше було бактерій клінічного штаму, а найменшою була кількість бактерій штаму ATCC 8739 (табл. 2). Найбільша чисельність бактерій ґрунтового ізоляту у ризоплані пов'язана з тим, що вони найбільшою мірою пристосовані до життєдіяльності у ризосфері, бо здатні використовувати для цього різноманітні кореневі екзометаболіти (Мошинець, Косаківська, 2010а, б). Вірогідно, що значна кількість, хоча й дещо менша, бактерій клінічного штаму у цій сфері рослини пов'язана з достатньо високою адгезивною здатністю його бактерій (Хахимова и др., 2017; Иванова и др., 2013; Eibenbergera et al., 2018). Вірогідно, що штам ATCC 8739 найменш пристосований до

життєдіяльності у кореневій зоні рослин, порівняно до ґрунтового ізоляту та клінічного штаму, чим і пояснюється найменша заселеність ним ризоплани.

До ендосфери бактерії проникають в рослину переважно через кореневий кортекс, інфікують судинну систему і утворюють ендофітні популяції в корені, стеблі, листках та інших органах (Мошинець, Косаківська, 2010а). У наших дослідках визначення чисельності бактерій у ендосфері показало, що вона розподілялася по-іншому, ніж у ризоплані. Так, найбільша їх кількість виявлена для клінічного штаму – у 7 та майже у 10 разів більше, ніж бактерій ґрунтового ізоляту та штаму АТСС 8739 відповідно (табл. 2). Вірогідно, що клінічний штам, порівняно до інших, проникає найбільшою мірою до ендосфери за рахунок здатності синтезувати целюлози та пектинази, які руйнують клітинну стінку (Іванова і др., 2013). Щодо наявності бактерій у філосфері, яка включає поверхню надземної частини проростків, то у ній виявлені тільки бактерії клінічного штаму у дуже незначній кількості (табл. 2). Цей факт, на нашу думку може бути пов'язаний з тим, що клінічний штам, порівняно з іншими, володіє підвищеною адгезивністю та інвазивністю (Іванова і др., 2013).

Ми також провели вивчення динаміки кількості бактерій досліджуваних штамів у різних частинах фітосфери проростків (рис. 1). Результати показали, що кількість мікроорганізмів штаму АТСС 8739 у ендосфері та ризоплані зростає протягом всього досліду (рис. 1А). При цьому вона в окремі дати визначення була або більшою, або меншою у ендосфері, порівняно до кількості у ризоплані. Визначення динаміки кількості бактерій клінічного штаму (рис. 1Б) показало, що протягом усього досліду найшвидше вона зростає у ендосфері, порівняно до швидкості цього процесу у ризоплані. Найповільніше відбувається зростання кількості бактерій клінічного штаму у філосфері.

Динаміка наростання кількості бактерій ґрунтового ізоляту характеризувалася більш інтенсивним її збільшенням у ризоплані, ніж у ендосфері (рис. 1В). Загалом криві росту кількості бактерій кишкової палички у різних частинах фітосфери мають подібний характер. При цьому вони відображують специфічність штамів та ґрунтового ізоляту за швидкістю колонізації бактеріями різних частин фітосфери. Аналіз кривих росту бактерій у фітосфері пшениці (рис. 1) та параметрів рівнянь регресії (табл. 3) показали, що за умов розвитку *E. coli* на поверхні коренів проростків, найшвидший ріст числа КУО був у варіанті досліду з використанням суспензії ізоляту, а найдовша затримка росту відбувалася при використанні клінічного штаму. Для ендосфери проростків пшениці було встановлено однакову для усіх варіантів досліду затримку початкової фази росту бактерій, а швидкість росту бактерій знижувалася в порядку варіантів «ізолят – клінічний – АТСС».

Таблиця 3.

Порівняння параметрів росту log КУО різних штамів та ізоляту *Escherichia coli*

Локалізація бактерій	Штам, ізолят	Параметри функції росту	
		b, затримка стартової фази	c, швидкість росту
Філософера	<i>E. coli</i> АТСС 8739	не визначався	не визначався
	<i>E. coli</i> клінічний	1,219	-0,475
	<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	не визначався	не визначався
Ризоплана	<i>E. coli</i> АТСС 8739	1,058	-0,544
	<i>E. coli</i> клінічний	1,560	-0,394
	<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	0,539	-0,331
Ендосфера	<i>E. coli</i> АТСС 8739	1,032	-0,590
	<i>E. coli</i> клінічний	1,003	-0,465
	<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	1,074	-0,369

Спираючись на отримані результати за чисельністю бактерій, ми розрахували частку (ступінь) колонізації бактеріями окремих частин рослин пшениці залежно від їх штаму відносно чисельності у цілій рослині (рис. 2).

Результати показали, що ступінь заселеності бактеріями фітосфери проростків пшениці сорту Мерсія залежить від штаму *E. coli* та різниться залежно від того, яку частину проростка заселяють бактерії.

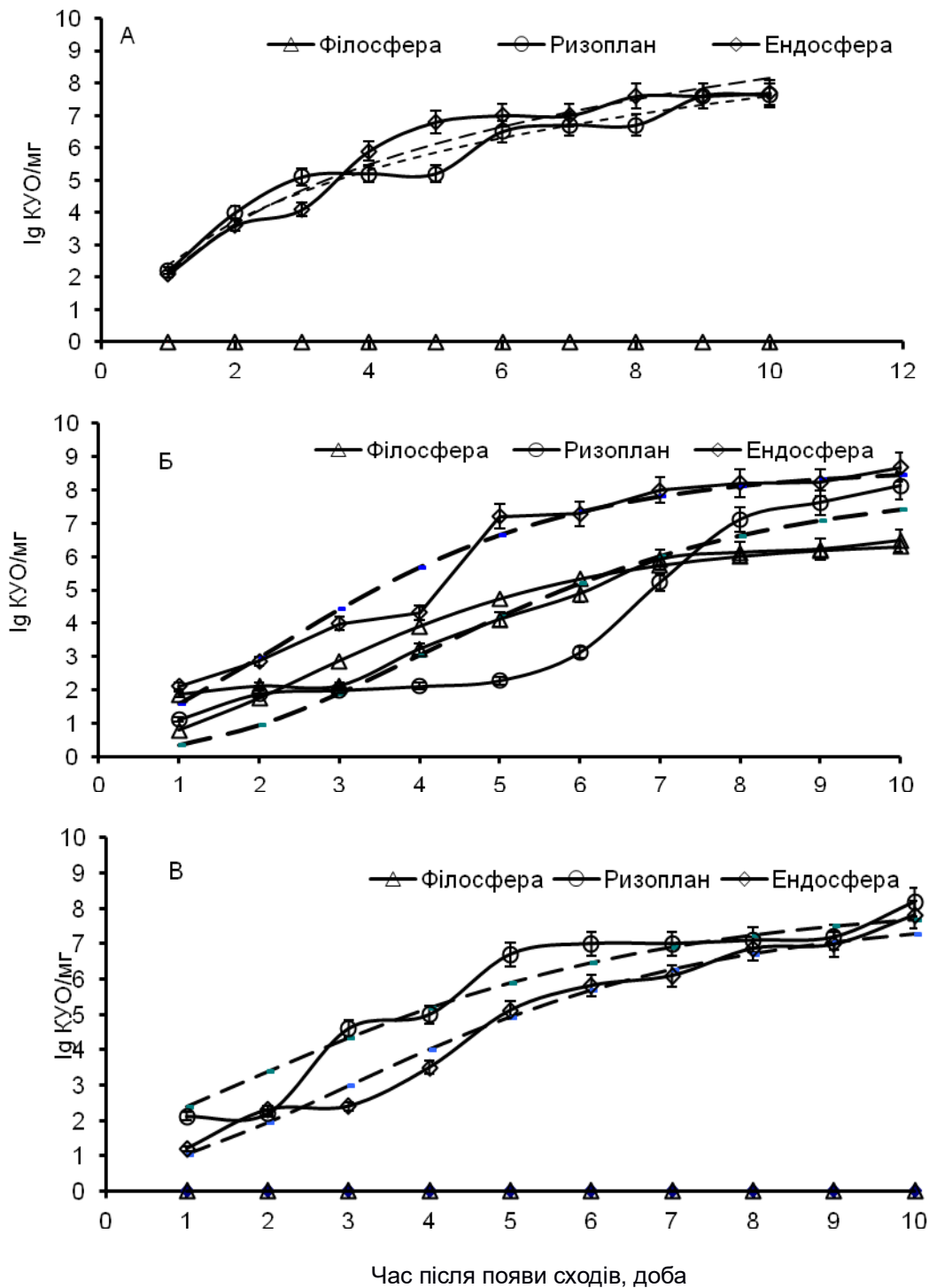


Рис. 1. Динаміка кількості бактерій *Escherichia coli* (lg КУО) у фітосфері рослин пшениці сорту Мерсія (А – штам ATCC 8739, Б – клінічний штам, В – ґрунтовий ізолят)

Порівняння різних частин фітосфери проростків пшениці за ступенем колонізації бактеріями кишкової палички показало (рис. 2), що у контрольному варіанті частка заселення ризосфери становила близько 40 %, а ендосфери – близько 60 %. Це підтверджує вище висловлене

припущення, що кишкова паличка, і як інші мікроорганізми, здатна достатньо інтенсивно заселювати рослинний організм шляхом ендосфітії насіння (Frank et al., 2017).

Заселеність бактеріями штаму ATCC 8739 ризоплани та ендосфери була співмірною до рівня заселеності цих зон фітосфери у контрольному варіанті.

Рівень заселення бактеріями клінічного штаму ризоплани був найнижчим, а ендосфери – найвищим, порівняно до заселення у контрольному варіанті та у варіанті з використанням штаму ATCC 8739 і ґрунтового ізоляту. Більше того, незначний рівень заселення бактеріями клінічного штаму був встановлений навіть у філосфері – 0,5 %, тобто на поверхні листків, що може свідчити про значну адгезивну здатність бактерій цього штаму кишкової палички.

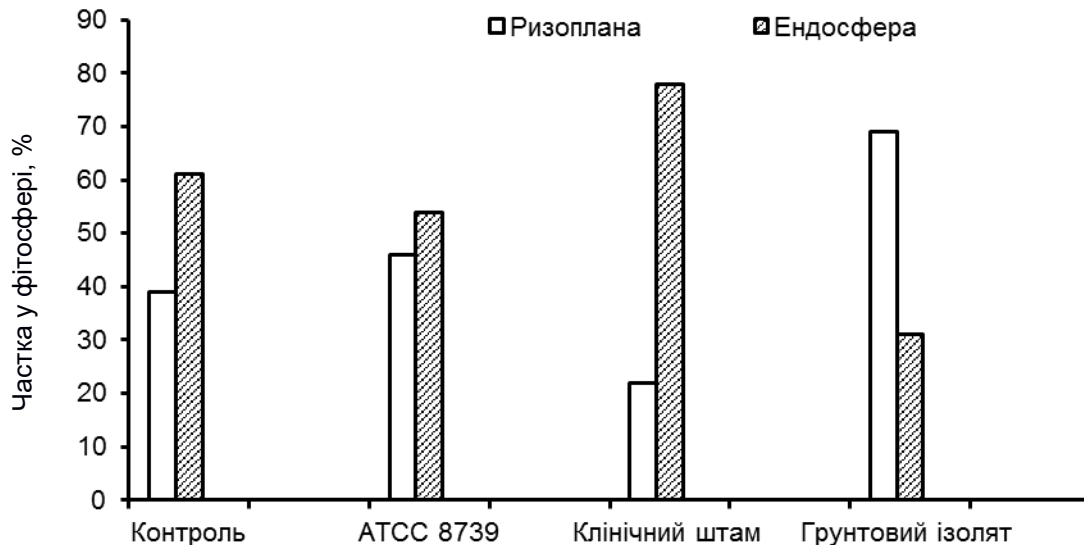


Рис. 2. Ступінь заселеності бактеріями *E. coli* різних частин фітосфери проростків пшениці сорту Мерсія, % від загальної чисельності бактерій у фітосфері

Бактерії ґрунтового ізоляту найбільшою мірою колонізували ризоплану, але найменшою мірою ендосферу, порівняно до рівня заселеності цих частин фітосфери бактеріями інших штамів (рис. 2). Вище було вказано (Мошинець, Косаківська, 2010б), що цей штам серед досліджуваних найбільш пристосований до життєдіяльності саме у кореневій зоні рослин.

Таким чином, визначення чисельності бактерій *E. coli*, а також ступеня заселеності ними фітосфери дає підставу констатувати, що колонізація проростків пшениці залежить від штаму, бактерії яких у різному ступені колонізують певні частини фітосфери.

Узагальнення

Одержані нами результати підтверджують існуючі уявлення про те, що рослина є екологічною нішею для існування мікроорганізмів. Мікроорганізми здатні використовувати рослину або як проміжного хазяїна, або як середовище постійного існування, що є вагомим чинником їх циркуляції у довкіллі.

Мікроорганізми досліджених штамів кишкової палички чинили на рослину як негативний, так і позитивний вплив, що, найбільш вірогідно, пов'язано з їх біологічними особливостями. Про це, за нашими даними, свідчить специфічність впливу різних штамів на схожість насіння, лінійний ріст цілої рослини, надземної частини і коренів та біосинтетичні процеси у проростках пшениці.

Наші дані свідчать, що характер колонізації рослини мікроорганізмами залежить від їх біологічних особливостей, бо досліджувані нами штами та ґрунтовий ізолят з різною інтенсивністю колонізували як фітосферу (рослину в цілому), так і окремі її частини – ризоплану, ендосферу та філосферу. Це вказує на певну пристосованість мікроорганізмів до життєдіяльності у тих мікронішах рослини, які є найбільш сприятливими для їх існування за своїми структурними та функціональними особливостями. Спираючись на специфічність ефектів досліджених штамів на

ростові та біосинтетичні процеси, а також динаміку колонізації їх бактерій у фітосфері, ми припускаємо, що одним з вагомих чинників існування *E. coli* у рослинному організмі може бути взаємодія рослина-мікроорганізм на рівні фізіолого-біохімічних (метаболических) процесів.

Список літератури / References

- Алексеенко А.Л. (2010). Особенности взаимодействия условно-патогенных энтеробактерий с растениями. Автореф. ... канд. биол. наук. Иркутск. 22 с. [Alekseyenko A.L. (2010). *Features of the interaction of opportunistic enterobacteria with plants*. Abstract of the thesis for the Degree of the Candidate of Biological Sciences. Irkutsk. 22 p.]
- Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б. (2013). Выявление генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию, у штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей. *Acta Biomedica Scientifica*, 2(2), 111–114. [Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioyev Y.P., Rakova E.B. (2013). Detection of pathogenicity genes encoding ability to toxigenesis in *Escherichia coli* isolated from the children intestinal biotope. *Acta Biomedica Scientifica*, 2(2), 111–114.]
- Лакин Г.Ф. (1973). Биометрия. М.: Высшая школа. 343 с. [Lakin G.F. (1973). *Biometrics*. Moscow: Vysshaya shkola Publ. 343 p.]
- Маркова Ю.А., Турская А.Л. (2012). Растения как экологическая ниша патогенных для человека бактерий. *Научный журнал Куб АУ*, 84(10), 1–15. [Markova Yu.A., Turskaya A.L. (2012). Plants as an ecological niche of bacteria pathogenic for humans. *Scientific Journal Cube AU*, 84(10), 1–15.]
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. (2010а). Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 1. Структурно-функціональна характеристика ризо-, ендо- та фітосфери. *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія*, 2, 19–35. [Moshynets O.V., Kosakivska I.V. (2010a). Phytosphere ecology: plant-microbial interactions. 1. Structure-functional characteristic of rhizo-, endo- and phyllosphere. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University: Series Biology*, 2, 19–35.]
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. (2010б). Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 2. Фітосфера як екологічна ніша рослинно-мікробних взаємовідносин. Функціональна активність мікроорганізмів та їхній вплив на рослини. *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія*, 3, 6–22. [Moshynets O.V., Kosakivska I.V. (2010b). Phytosphere ecology: plant-microbial interactions. 2. Phytosphere as a niche for plant-microbial interactions. Functional microbial activity and its influence on plants. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University: Series Biology*, 3, 6–22.]
- Органічне виробництво і продовольча безпека. (2013). Житомир: Полісся. 492 с. [Organic production and food safety. (2013). Zhytomyr: Polissya. 492 p.]
- Поздеев О.К., Федоров Р.В. (2007). Энтеробактерии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа. 720 с. [Pozdeyev O.K., Fedorov R.V. (2007). *Enterobacteria: a guide for doctors*. Moscow: GEOTAR-Media. 720 p.]
- Практикум по микробиологии (2005). / Под ред. А.И.Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия». 602 с. [Workshop on microbiology (2005). / Ed. A.I.Netrusov. Moscow: Publishing Center "Academy". 602 p.]
- Рибалка О.І. (2011). Якість пшениці та її поліпшення. К.: Логос. 496 с. [Rybalka O.I. (2011). *Wheat quality and its improvement*. Kyiv: Logos. 496 p.]
- Соловьева Е., Алещенкова З. (2018). Выделение эндофитных фосфатсольюбилизирующих бактерий, колонизирующих внутренние ткани сои и озимой пшеницы. *Žmogaus ir gamtos sauga*, 208–210. [Solovieva E., Aleschenkova Z. (2018). Isolation of endophytic phosphate-solubilizing bacteria that colonize the internal tissues of soy and winter wheat. *Žmogaus ir gamtos sauga*, 208–210.]
- Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Сербяева Э.Р. и др. (2017). Роль бактериальных адгезинов и других компонентов клеток на начальных этапах растительно-микробных взаимодействий. *Биомика*, 9(4), 325–339. [Khakimova L.R., Lavina A.M., Serbaeva E.R. et al. (2017). The role of bacterial adhesins and other cell components in the initial stages of plant-microbial interactions. *Biomika*, 9(4), 325–339.]
- Шмидт В.М. (1984). Математические методы в ботанике. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та. 288 с. [Shmidt V.M. (1984). *Mathematical methods in botany*. Leningrad: Publishing house of Leningrad University. 288 p.]
- Eibenbergera K., Moencha D., Drissnerb D. et al. (2018). Adherence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain Sakai influence its uptake into the roots of *Valerianella locusta* grown in soil. *Food Microbiology*, 76, 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.016>
- Frank A.C., Saldierna Guzmán J.P., Shay J.E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Hofmann A., Fischer D., Hartmann A., Schmid M. (2014). Colonization of plants by human pathogenic bacteria in the course of organic vegetable production. *Frontiers in Microbiology*, 5(191). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00191>

- Holden N., Pritchard L., Toth I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 689–703. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00153.x>
- Jechalke S., Schierstaedt J., Becker M. et al. (2019). *Salmonella* establishment in agricultural soil and colonization of crop plants depend on soil type and plant species. *Front. Microbiol.*, 10, 967. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00967>
- Jo S.H., Park J.M. (2019). The dark side of organic vegetables: interactions of human enteropathogenic bacteria with plants. *Plant Biotechnology Reports*, 13, 105–110. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00536-1>
- Karmakar K., Nath U., Nataraja K.N., Chakravorty D. (2018). Root mediated uptake of *Salmonella* is different from phyto-pathogen and associated with the colonization of edible organs. *BMC Plant Biology*, 18, 344. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1578-9>
- Liu D., Cui Y., Walcott R., Chena J. (2018). Fate of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* cells artificially internalized into vegetable seeds during germination. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1), e01888-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01888-17>
- Merget B., Forbes K.J., Brennan F. et al. (2019). Influence of plant species, tissue type, and temperature on the capacity of shiga-toxicogenic *Escherichia coli* to colonize, grow, and be internalized by plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(11), e00123-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00123-19>
- Moyne A.-L., Blessington T., Thomas R. et al. (2020). Conditions at the time of inoculation influence survival of attenuated *Escherichia coli* O157:H7 on field-inoculated lettuce. *Food Microbiology*, 85, 103274. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103274>
- Murphy S., Gaffney M.T., Fanning S., Burgess C.M. (2016). Potential for transfer of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Senftenberg from contaminated food waste derived compost and anaerobic digestate liquid to lettuce plants. *Food Microbiology*, 59, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.006>
- Riggio G.M., Wang Q., Kniel K.E., Gibson K.E. (2019). Microgreens – a review of food safety considerations along the farm to fork continuum. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.027>
- Wright K.M., Holden N.J. (2018). Quantification and colonization dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 inoculation of microgreens species and plant growth substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 273, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.025>

Features of colonization of the phytosphere of wheat seedlings by introduced strains of *Escherichia coli*

O.A. Avksentieva, O.I. Vinnikova, V.V. Zhmurko

The paper presents the results of the study of the ability of introduced *Escherichia coli* strains to colonize different niches of the phytosphere – the rhizosphere, endosphere, and phyllosphere of Mersia winter soft wheat seedlings and to influence the plant growth response under these conditions. The ATCC 8739 and clinical *E. coli* strains were used as the study material, as well as an isolate from the wheat agrocenosis soil. The vegetation experiments were carried out in the factorial chamber of the Department of Plant Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms of V.N.Karazin Kharkiv National University. The experimental plants were inoculated with suspensions of *E. coli* strains and soil isolate by watering them in vegetation vessels where seedlings were grown for 10 days. In parallel by the method of successive washes, we analyzed the dynamics of the number of *E. coli* CFU in the rhizome, endo- and phyllosphere of seedlings. After completion of the experiment, the growth response was analyzed by linear growth and by the integral index of growth and biosynthetic processes – biomass accumulation. The results of experiments show that inoculation with ATCC 8739 and clinical strains of *E. coli* reduced the germination of wheat seeds and inhibited the growth response. Inoculation with *E. coli* soil isolate has virtually no effect on seed germination, linear growth, and biomass accumulation by Mersia seedlings. It was found that the number of *E. coli* bacteria in the phytosphere of wheat plants depended on the type of inoculated strain and differs in different parts of the seedlings phytosphere. The maximum number of *E. coli* CFU in the phytosphere was detected at the inoculation of plants with the clinical strain, three times less – at exposure to the soil isolate, almost 6 times less – at the inoculation with the standard strain. Differences in the degree of colonization of different parts of the phytosphere were detected at the inoculation of the test seedlings with different strains and soil isolates of *E. coli*: in the control variant and under the influence of ATCC 8739, the distribution between the rhizo- and endosphere is approximately the same. When the plants were inoculated with the clinical strain, endosphere was colonized, when using the soil isolate – the rhizosphere. In the phyllosphere of the experimental seedlings, only cells of the clinical strain were found in a small number, which indicates its increased adhesive properties. Plant-microbial relationships and the ability of conditionally pathogenic *E. coli* bacteria to colonize different areas of the plant organism and to use wheat seedlings as an alternative host are discussed.

Key words: ATCC 8739, clinical strains, soil isolate of *E. coli*, *Triticum aestivum* L., growth response, phytosphere colonization, rhizosphere, endosphere, phyllosphere.

About the authors:

O.A. Avksentyeva – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

O.I. Vinnikova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

V.V. Zhmurko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

**Особенности колонизации фитосферы проростков пшеницы
интродуцированными штаммами *Escherichia coli*
О.А. Авксентьева, О.И. Винникова, В.В. Жмурко**

В работе представлены результаты исследования способности интродуцированных штаммов *Escherichia coli* колонизировать различные ниши фитосферы – ризосферу, эндосферу и филлосферу проростков озимой мягкой пшеницы сорта Мерсия и влиять на ростовую реакцию растений при этих условиях. Материалом исследования служили ATCC 8739 и клинический штамм *E. coli*, а также изолят, выделенный из почвы агроценоза под пшеницей. Вегетационные опыты проводили в факторостатной камере кафедры физиологии и биохимии растений и микроорганизмов ХНУ им. В.Н.Каразина. Опытные растения инокулировали суспензией штаммов и почвенного изолята *E. coli*, проводя полив в вегетационные сосуды, где выращивали проростки в течение 10 суток. Параллельно методом последовательных смывов проводили анализ динамики численности КОЕ *E. coli* в ризо-, эндо- и филлосфере проростков. После завершения эксперимента анализировали ростовую реакцию по показателям линейного роста и интегральному показателю ростовых и биосинтетических процессов – накоплению биомассы. Результаты экспериментов показали, что инокуляция ATCC 8739 и клиническим штаммом *E. coli* снижает всхожесть семян пшеницы и тормозит ростовую реакцию. Инокуляция почвенным изолятом *E. coli* практически не влияет на всхожесть семян, линейный рост и накопление биомассы проростками пшеницы сорта Мерсия. Установлено, что численность бактерий *E. coli* в фитосфере растений пшеницы зависит от инокулированных штаммов и отличается в разных частях фитосферы проростков. Максимальное количество КОЕ *E. coli* в фитосфере обнаружено при инокуляции растений клиническим штаммом, втрое меньше – под влиянием почвенного изолята, почти в 6 раз меньше – при инокуляции стандартным штаммом. Выявлены различия по степени колонизации частей фитосферы при инокуляции опытных проростков различными штаммами и почвенным изолятом *E. coli*: в контрольном варианте и при воздействии ATCC 8739 распределение между ризо- и эндосферой примерно одинаковое, при действии клинического штамма – преимущественно колонизируется эндосфера растений, при инокуляции почвенным изолятом – ризосфера. В филлосфере исследованных проростков в незначительном количестве обнаружены бактериальные клетки исключительно клинического штамма, что свидетельствует о его повышенных адгезивных свойствах. Обсуждаются растительно-микробные взаимоотношения и способность условно-патогенных бактерий *E. coli* колонизировать различные сферы растительного организма и использовать проростки пшеницы в качестве альтернативного хозяина.

Ключевые слова: ATCC 8739, клинический штамм, почвенный изолят *E. coli*, *Triticum aestivum* L., ростовая реакция, колонизация фитосферы, ризосфера, эндосфера, филлосфера.

Об авторах:

О.А. Авксентьева – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

О.И. Винникова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

В.В. Жмурко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Представлено: О.Ю.Леонов / Presented by: O.Yu.Leonov

Рецензент: С.В.Калініченко / Reviewer: S.V.Kalinichenko

Подано до редакції / Received: 10.04.2020

УДК: 579.64:631.461.51

Вплив сполук фосфору на утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272

Г.І. Звір, Г.М. Різун, С.О. Гнатуш

У статті наведено результати дослідження впливу неорганічних сполук фосфору (калію гідроортофосфату, натрію гідроортофосфату) та фосфорних добрив (суперфосфату, фосфоритного борошна) на нагромадження біомаси та утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272. Натрію гідроортофосфат, суперфосфат та фосфоритне борошно вносили у середовище культивування (середовище Ешбі) замість K_2HPO_4 у концентраціях, еквімолярних концентрації фосфат-іонів у середовищі Ешбі, і вдвічі вищих. Встановлено, що $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, суперфосфат та фосфоритне борошно в еквімолярній концентрації стимулювали нагромадження біомаси *A. chroococcum* ВКМ В-1272, проте за підвищеної концентрації пригнічували ріст бактерій порівняно з контролем. Зростання концентрації $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ і K_2HPO_4 у середовищі культивування пригнічувало не тільки ріст, але й утворення іонів амонію бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272. Фосфорні добрива за усіх концентрацій інгібували процес азотфіксації. Досліджено також ефективність використання бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 сполук фосфору у процесі росту. Встановлено, що розчинні неорганічні сполуки (калію гідроортофосфат, натрію гідроортофосфат) бактерії можуть з різною ефективністю використовувати як джерело фосфору. У середовищі з $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, K_2HPO_4 та суперфосфатом спостерігали зниження концентрації фосфат-іонів, що свідчить про використання їх бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту. Зростання вмісту фосфат-іонів у середовищі з фосфоритним борошном свідчить про здатність бактерій до фосфатмобілізації. Отже, нагромадження біомаси та утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 залежало від природи та концентрації джерела фосфору у середовищі росту. Тому подальші дослідження впливу фосфорного живлення на фізіолого-біохімічні властивості азотофіксувальних бактерій дозволять оцінити чутливість *A. chroococcum* ВКМ В-1272 до дії неорганічних забруднювачів та показати важливість раціонального використання у сільському господарстві фосфорних добрив.

Ключові слова: азотфіксація, азотофіксувальні бактерії, іони амонію, сполуки фосфору, фосфорні добрива, фосфатмобілізація.

Про авторів: Г.І. Звір – Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, galynazvir@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

Г.М. Різун – Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, rszun@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

С.О. Гнатуш – Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, gnatur88@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5353-102X>

Вступ

Фосфор є одним із найважливіших макроелементів, необхідних для метаболізму рослин. Він сприяє розвитку кореневої системи, прискореному росту рослин на початкових стадіях їхнього розвитку, поліпшує водний режим рослин, впливаючи на врожайність та показники якості врожаю. За нестачі фосфору пригнічується ріст вегетативних органів, знижується стійкість рослин до посухи тощо. У ґрунтах фосфор міститься у мінеральній та органічній формах. Доступними для рослин є лише розчинні фосфати, концентрація яких у ґрунтах є нижчою порівняно із вмістом важкорозчинних мінеральних солей – фосфатів кальцію, алюмінію, феруму, магнію, солей метафосфатної, пірофосфатної та інших кислот, а також органічних сполук (складних білків, фосфатидів, фітину тощо) (Бербець та ін., 2006; Гуляев, Патыка, 2004). Рослини можуть засвоювати фосфор з малорозчинних і нерозчинних сполук після гідролізу їх у ґрунті і перетворення за допомогою фосфатаз до ортофосфатної кислоти та її солей.

Мікроорганізми є важливою частиною процесу ґрунтоутворення та ланкою, що забезпечує екологічний баланс будь-якої ґрунтової екосистеми. Завдяки активності мікроорганізмів у ґрунті накопичуються сполуки нітрогену, фосфору і калію, необхідні для росту рослин. ґрунтові мікроорганізми, яким притаманна фосфатазна активність, сприяють зростанню концентрації фосфатів у ґрунтовому розчині, покращують засвоюваність рослинами слабкорозчинних фосфатів ґрунту (Лаврентьєва та ін., 2015). Вивільнення нерозчинних і малорухомих форм фосфору здійснюють фосфатмобілізуювальні бактерії, що належать до родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*,

Burkholderia, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Azospirillum*, *Flavobacterium* і *Erwinia* (Баб'єва і др., 2005; Пати́ка та ін., 2003; Nosrati et al., 2014). Вони здатні перетворювати у доступну для рослин форму трикальційфосфат, дикальційфосфат, гідроксиапатит, кам'яний фосфат завдяки секреції низькомолекулярних органічних кислот, переважно глюконових та кетоглюконових, та фосфатаз (Курдиш, 2012; Sashidhar, Podile, 2010).

Бактерії роду *Azotobacter* – вільноживучі азотофіксувальні бактерії, які отримують енергію завдяки окисно-відновним реакціям, використовуючи як донор електронів органічні сполуки; молекулярний азот фіксують за відсутності у середовищі росту зв'язаних форм нітрогену. Процес відновлення атмосферного азоту до аміаку у клітинах цих бактерій відбувається у три етапи: азот → диімін → гідразин → аміак. Аміак, який утворився, вони використовують для синтезу амінокислот (Nosrati et al., 2014).

Бактерії роду *Azotobacter* чутливі до вмісту у середовищі фосфору, калію, кальцію, бору, магнію та органічних речовин. Як джерело фосфору ці бактерії можуть використовувати мінеральні та органічні фосфоровмісні сполуки. Більшість штамів роду здатні до фосфатмобілізації важкорозчинних сполук фосфору у ґрунті завдяки продукуванню кислих продуктів обміну у середовище (Nosrati et al., 2014; Курдиш, 2012; Jnawali et al., 2015). Наявність у ґрунті азотофіксувальних бактерій може забезпечити рослинам достатню кількість сполук нітрогену та сприяти гідролізу широкого спектру фосфоровмісних сполук, що веде до підвищення врожайності. Однак мінеральні добрива можуть чинити вплив на метаболічні процеси, що протікають у клітинах бактерій роду *Azotobacter*, зокрема на процес діазотрофії.

Мета дослідження – дослідити вплив неорганічних сполук фосфору та фосфорних добрив на ріст та утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272; оцінити можливість бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 використовувати фосфат-іони у процесі росту.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження були азотофіксувальні бактерії *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272, що зберігаються в музейній колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 вирощували у пробірках об'ємом 20 мл у середовищі Ешбі упродовж 2–3 діб за температури 28°C та аеробних умов, а також у модифікованому середовищі Ешбі, вносячи замість K_2HPO_4 інші джерела фосфору (натрію гідроортофосфат ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), суперфосфат ($Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O + H_3PO_4 + CaSO_4$), фосфоритне борошно ($Ca_3(P_2O_7)_2$), концентрація яких була еквімолярною концентрації фосфат-іонів у середовищі Ешбі чи вдвічі вища. Контролем було середовище Ешбі, у яке вносили K_2HPO_4 у концентрації 0,22 г/л.

Біомасу визначали за мутністю розведеної суспензії клітин фотометруванням на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda = 390$ нм) у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою:

$$C \text{ (г/л)} = E_{390} \cdot n / K,$$

де E_{390} – екстинкція за довжини хвилі 390 нм; n – розведення, разів; K – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від сухої маси клітин ($K = 0,77$). Концентрацію іонів амонію вимірювали фотоелектроколориметричним методом ($\lambda = 640$ нм) (Гудзь та ін., 2014), фосфат-іонів – спектрофотометричним методом ($\lambda = 380\text{--}410$ нм), який ґрунтується на реакції утворення жовтої фосфорномолібденової гетерополікислоти $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ (Зінчук, Левицька, 2000).

Усі досліди проводили у п'яти повторностях. Результати представлені як середнє арифметичне \pm похибка середнього ($M \pm m$). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували t -критерій Стьюдента. Достовірною вважали різницю при рівні значимості $p \leq 0,05$ (Лакин, 1990).

Результати та обговорення

Для здійснення процесів живлення і розмноження бактеріям необхідні поживні речовини, з яких вони синтезують компоненти клітин і отримують внаслідок процесів окиснення чи відновлення енергію. Азотофіксувальні бактерії роду *Azotobacter* – облігатні аероби, здатні рости за низьких концентрацій кисню, використовуючи як джерело карбону різні вуглеводи, спирти й органічні кислоти, як джерело нітрогену – солі амонію, нітрити, нітрати, сечовину, амінокислоти. Тому на ріст бактерій роду *Azotobacter* і процес діазотрофії великий вплив має мінеральний склад ґрунту. Зокрема, фіксування нітрогену інгібуються за наявності доступних джерел зв'язаного нітрогену, наприклад нітратних добрив, які містять іони амонію або нітрату; відсутність або нестача фосфору у середовищі росту сповільнює ріст культури і негативно впливає на засвоєння нітрогену (Курдиш, 2012; Jnawali et al., 2015; Saribay, 2003). Тому ми дослідили, як впливають неорганічні сполуки фосфору та фосфорні добрива на ріст та утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272.

Для забезпечення росту у середовище культивування азотофіксувальних бактерій неорганічні фосфати вносять у вигляді кислих солей KH_2PO_4 чи K_2HPO_4 . Вони забезпечують певне значення рН середовища (буферність розчину). За умови росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у середовищі Ешбі (контроль), де джерелом фосфору був калій гідроортофосфат у концентрації 0,22 г/л, біомаса становила $1,20 \pm 0,01$ г/л на 24 год культивування та $1,600 \pm 0,012$ г/л на 48 год росту (рис. 1).

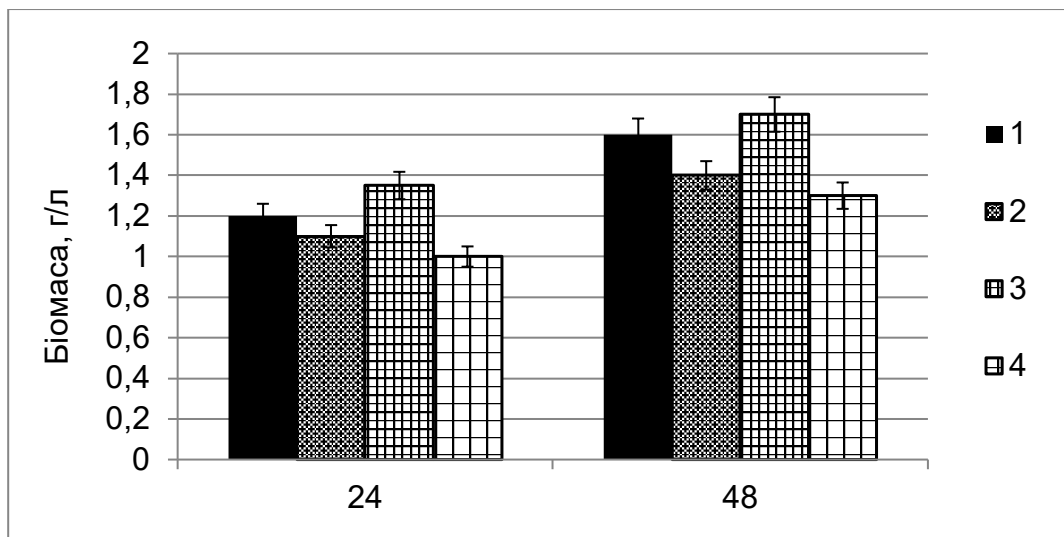


Рис. 1. Нагромадження біомаси азотофіксувальними бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту у середовищі Ешбі (1); у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом K_2HPO_4 (2); у модифікованому середовищі Ешбі з $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (3); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4)

Збільшення концентрації K_2HPO_4 вдвічі призвело до зниження нагромадження біомаси бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 порівняно з контролем на 8–12 %. Додавання у середовище Ешбі натрій гідроортофосфату замість K_2HPO_4 в еквімолярній концентрації сприяло зростанню нагромадження біомаси на 6–12 %. Проте за підвищеної концентрації $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ нагромадження біомаси бактеріями знизилася порівняно з контролем на 17–19 % упродовж культивування бактерій.

Негативно позначилося внесення у живильне середовище підвищених концентрацій натрію/калію гідроортофосфату і на фіксуванні атмосферного азоту дослідженими бактеріями. За умови підвищеного вмісту калій гідроортофосфату концентрація іонів амонію у культуральній рідині *A. chroococcum* ВКМ В-1272 знизилася порівняно з контролем приблизно на 27–35 % (рис. 2).

За умови внесення у середовище Ешбі натрію гідроортофосфату замість K_2HPO_4 в еквімолярній концентрації утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 незначно сповільнилося порівняно з контролем (на 3–5 %), проте за умови збільшення концентрації $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ вдвічі вміст іонів амонію у середовищі культивування знизився на 50–54 %. Отже, зростання концентрації калію/натрію гідроортофосфату у середовищі культивування пригнічує не тільки ріст, але й утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272.

Неорганічні фосфати (натрію гідроортофосфат, калію гідроортофосфат), використані у роботі як джерело фосфору, людина застосовує у різних сферах свого життя: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ відомий як харчова добавка Е339, емульгатор і буфер для виробництва плавлених сирів, консервант; K_2HPO_4 має значення не тільки як регулятор кислотності, він входить до складу комплексних добрив, його використовують у фармакологічному виробництві, як харчову добавку Е340, стабілізатор, розпушувач тощо (Ластухін, 2009). Тому забруднення довкілля неорганічними забруднювачами є не менш актуальним, ніж забруднення важкими металами, пестицидами, нафтопродуктами тощо. Безпечними для людини неорганічні фосфати є за умови застосування їх відповідно до належної виробничої практики, а їхній вміст у навколишньому середовищі повинен відповідати Державним санітарним нормам та правилам (ГОСТ 31725-2012; Markou et al., 2012). У літературі описано вплив неорганічних фосфатів на ріст, нагромадження біомаси та метаболічні процеси мікроорганізмів на прикладі ціанобактерій *Anabaena variabilis* та *Westiellopsis prolifica*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Yandigeri et al., 2010; Markou et al., 2012). Тому отримані нами результати дають цінну інформацію щодо культивування азотофіксувальних бактерій роду *Azotobacter*.

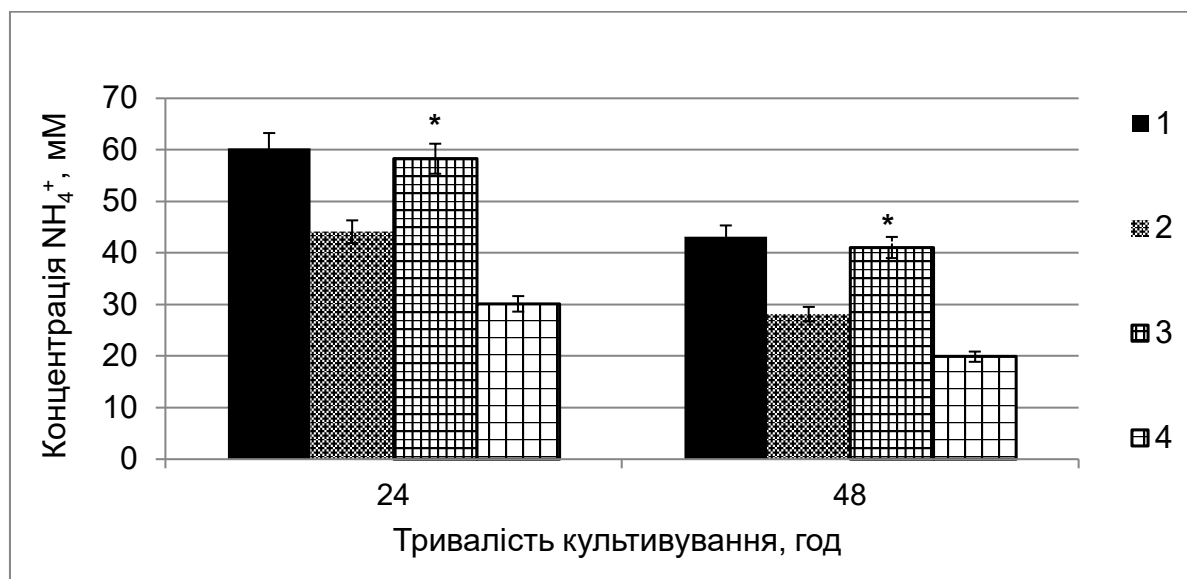


Рис. 2. Концентрація іонів амонію у культуральній рідині азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 за умови росту у середовищі Ешбі (1); у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом K_2HPO_4 (2); у модифікованому середовищі Ешбі з $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (3); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (4) (* $p \leq 0,05$)

Оскільки більшість сполук фосфору у ґрунті малорозчинна, застосування фосфорних добрив необхідне для підвищення врожаю сільськогосподарських культур. Хоча фосфорні добрива менш небезпечні для рослин навіть за дуже високих концентрацій порівняно з нітратними, оскільки не підвищують концентрації ґрунтового розчину, проте і для них потрібно дотримувати певних норм внесення залежно від типу ґрунту і видів добрив, оскільки вони можуть вплинути на автохтонну мікробіоту (Патика та ін., 2005). Зважаючи на здатність бактерій роду *Azotobacter* до фосфатмобілізації, актуальним було з'ясувати, які фосфорні добрива вони здатні використовувати (розчинні чи слабозрозчинні), та як ці сполуки впливають на нагромадження біомаси та утворення

іонів амонію дослідженими бактеріями. У роботі використано водорозчинне фосфорне добриво – суперфосфат – та слабозчинне – фосфоритне борошно. Результати досліджень наведено на рис. 3–4.

Унаслідок додавання у середовище Ешбі суперфосфату як джерела фосфору нагромадження біомаси бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 зросло порівняно з контролем на 13–16 %. Фосфоритне борошно за еквімолярної за фосфатом концентрації стимулювало ріст культури порівняно з контролем на 7–18 %. Підвищення концентрації фосфорних добрив удвічі спричинило зниження нагромадження біомаси дослідженими бактеріями порівняно з контролем та зразками, у які добрива вносили в еквімолярних за джерелом фосфору концентраціях (рис. 3).

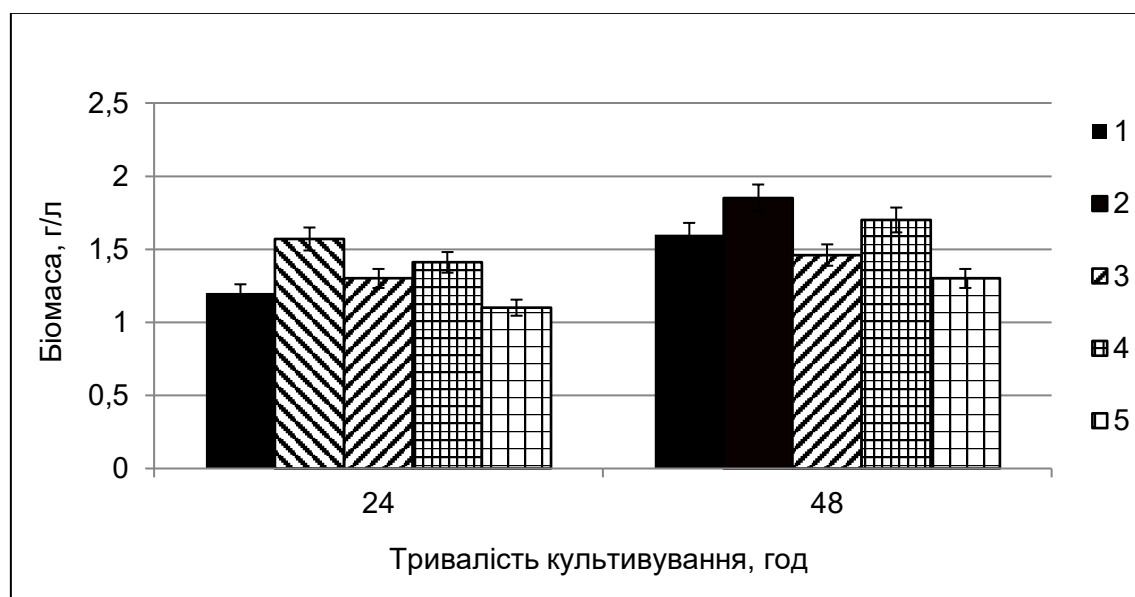


Рис. 3. Нагромадження біомаси азотофіксувальними бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту у середовищі Ешбі (1); у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом (2); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом суперфосфату (3); у модифікованому середовищі Ешбі з фосфоритним борошном (4); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна (5)

На відміну від нагромадження біомаси, утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 пригнічувалося фосфорними добривами. Так, за умови внесення у середовище Ешбі суперфосфату як джерела фосфору концентрація іонів амонію у культуральній рідині *A. chroococcum* ВКМ В-1272 знизилася порівняно з контролем на 8–12 %; вдвічі вищий вміст суперфосфату спричинив зниження концентрації іонів амонію у середовищі росту бактерій на 35–37 % порівняно з контролем. За умови росту досліджених бактерій у середовищі з фосфоритним борошном процес фіксування атмосферного азоту інгібувався порівняно з контролем на 16–18 %. За умови збільшення концентрації фосфоритного борошна спостерігали зниження концентрації іонів амонію у середовищі культивування майже вдвічі порівняно з контролем (рис. 4). Отримані результати дозволяють припустити, що фосфорні добрива можуть пригнічувати процес фіксування атмосферного азоту бактеріями роду *Azotobacter*. На нашу думку, однією з причин цього може бути підкислення середовища росту азотофіксувальних бактерій, що позначається на інтенсивності споживання енергетичного матеріалу і продуктивності діазотрофії бактеріями роду *Azotobacter* (Гуляев, Патыка, 2004; Курдиш, 2012; Jnawali et al., 2015).

Потребу бактерій роду *Azotobacter* у фосфорному живленні можуть задовольняти різні сполуки фосфору – як розчинні, так і слабозчинні. Мобілізація фосфору з важкодоступних сполук у них здійснюється за допомогою фосфатаз на поверхні клітин і обумовлена контактною взаємодією з кислими зонами глікокаліксу. Це сприяє розчиненню кальцію фосфату і задоволенню потреби

бактерій у фосфорному живленні (Курдиш, 2012; Sashidhar, Podile, 2010). Тому цікаво було дослідити особливості використання бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 фосфат-іонів під час росту у середовищі Ешбі з різними сполуками фосфору.

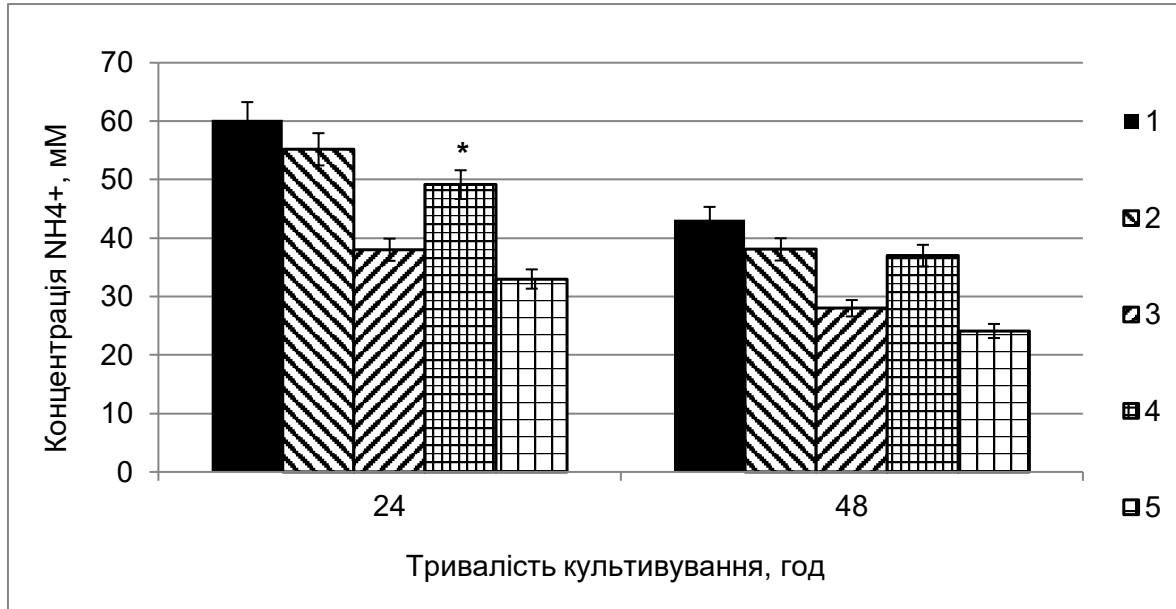


Рис. 4. Концентрація іонів амонію у культуральній рідині азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту у середовищі Ешбі (1); у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом (2); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом суперфосфату (3); у модифікованому середовищі Ешбі з фосфоритним борошном (4); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна (5) (* $p \leq 0,05$)

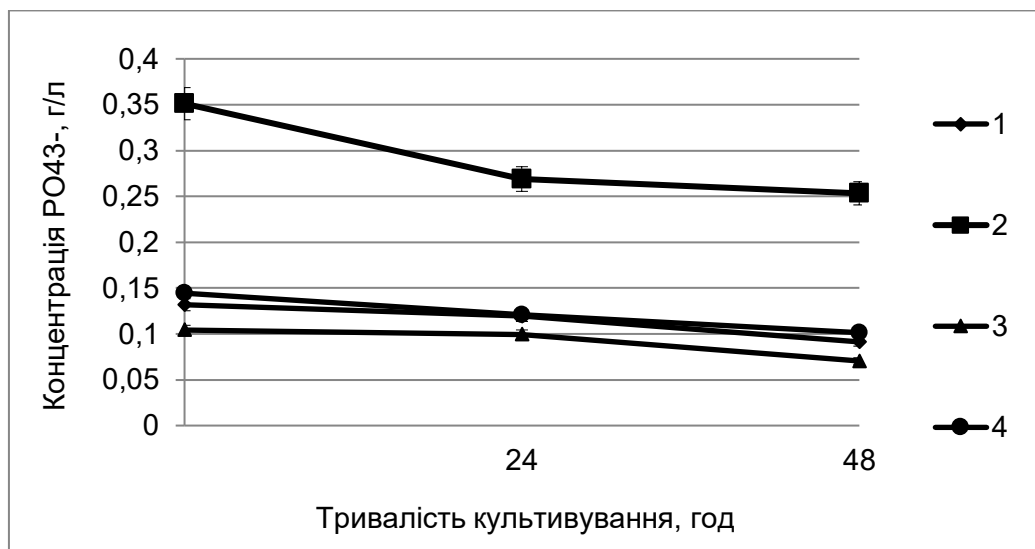


Рис. 5. Використання бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 фосфат-іонів під час росту у середовищі Ешбі (1); у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом K_2HPO_4 (2); у модифікованому середовищі Ешбі з $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (3); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4)

Ріст бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у середовищі Ешбі супроводжувався зниженням концентрації фосфат-іонів, які вносили у середовище у вигляді калію гідроортофосфату. Упродовж першої доби росту бактерії засвоїли 9 % фосфат-іонів, другої – 31 %. За умови внесення у середовище Ешбі підвищених концентрацій K_2HPO_4 бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 за першу добу засвоїли 23 % фосфат-іонів, за другу – 29 % (вихідна концентрація фосфат-іонів у середовищі Ешбі становила $0,131 \pm 0,011$ г/л, у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом K_2HPO_4 – $0,351 \pm 0,023$ г/л) (рис. 5).

За умови росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у середовищі з натрій гідроортофосфатом концентрація фосфат-іонів впродовж першої доби знизилася на 13 %, другої – на 33 % порівняно з контролем. У середовищі Ешбі з підвищеною концентрацією $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ бактерії використали за першу добу 9 % фосфат-іонів, за другу – 11 %. Отже, розчинні неорганічні сполуки (калію гідроортофосфат, натрію гідроортофосфат) бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 можуть з різною ефективністю використовувати у процесі росту як джерело фосфору.

Під час росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом концентрація фосфат-іонів знизилася на 8 %. За умови зростання концентрації суперфосфату бактерії упродовж двох діб засвоїли 3,5 % фосфат-іонів (рис. 6).

Унаслідок додавання у середовище Ешбі фосфоритного борошна замість K_2HPO_4 концентрація фосфат-іонів зросла на 9–16 % упродовж першої-другої діб, що може свідчити про фосфатмобілізувальні властивості *A. chroococcum* ВКМ В-1272. У середовищі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна концентрація фосфат-іонів суттєво не зросла порівняно зі зразком, у який вносили фосфоритне борошно в еквімолярній за K_2HPO_4 концентрації. Можливо, фосфат-іони, вивільнені бактеріями у процесі фосфатмобілізації з фосфоритного борошна, у середовищі не накопичуються, а використовуються культурою у процесі росту. За даними літератури, не завжди мікроорганізми, які проявляють високі фосфатмобілізувальні властивості, утворюючи значні зони розчинення ортофосфату кальцію на щільному живильному середовищі, утворюють високі концентрації фосфат-іонів у рідкому середовищі (Лаврентьєва та ін., 2011).

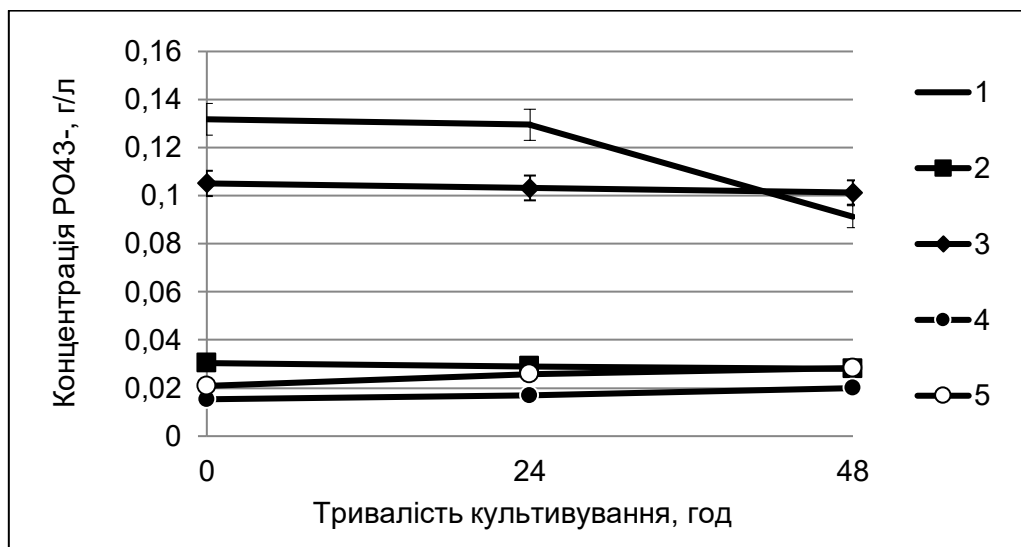


Рис. 6. Використання бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 фосфат-іонів під час росту у середовищі Ешбі (1); у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом (2); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом суперфосфату (3); у модифікованому середовищі Ешбі з фосфоритним борошном (4); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна (5)

Отже, азотофіксувальні бактерії роду *Azotobacter* можуть використовувати у процесі росту різні джерела фосфору – як розчинні, так і малорозчинні. Натрію і калію гідроортофосфат вони засвоюють

краще порівняно з суперфосфатом. Малорозчинне фосфоритне борошно досліджені бактерії теж використовують у метаболічних процесах завдяки здатності до фосфатмобілізації. Проте підвищені кількості цих сполук негативно впливають на нагромадження біомаси та фіксування атмосферного азоту цими бактеріями. Тому отримані нами результати не лише дають цінну інформацію щодо культивування азотофіксувальних бактерій роду *Azotobacter*, але свідчать також про чутливість азотофіксувальних бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 до вмісту у середовищі росту неорганічних забруднювачів та важливість раціонального використання у сільському господарстві фосфорних добрив.

Список літератури / References

- Бабьева И.П., Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. (2005). Биология почв. М.: Изд-во Московского ун-та. 445 с. [Babeyeva I.P., Zviagintsev D.G., Zenova G.M. (2005). *Soil biology*. Moscow: Moscow State University. 445 p.]
- Бербець М.А., Назаренко І.І., Том'юк Б.П. (2006). Про домінуючі фосфати твердих фаз ґрунту. *Ґрунтознавство*, 7(3–4), 15–20. [Berbets N.A., Nazarenko I.I., Tomyuk B.P. (2006). The dominating phosphates of the soil's solid phases. *Gruntoznavstvo (Soil Science)*, 7(3–4), 15–20.]
- ГОСТ 31725-2012. Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия. [GOST 31725-2012. Food supplements. Sodium phosphate E339. General specifications.]
- Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В. та ін. (2014). Практикум з мікробіології. Львів: ЛНУ імені Івана Франка. 436 с. [Gudz S.P., Hnatush S.O., Yavorska G.V. et al. (2014). *Workshop on microbiology*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv. 436 p.]
- Гуляев Б.И., Патыка В.Ф. (2004). Фосфор как энергетическая основа процессов фотосинтеза, роста и развития растений. *Агроэкологический журнал*, 2, 3–9. [Gulyaev B.I., Patyka V.P. (2004). Phosphorus as the energy basis of photosynthesis, growth and development of plants. *Agroecological Journal*, 2, 3–9.]
- Зінчук В.К., Левицька Г.Д. (2000). Лабораторний практикум з аналітичної хімії для студентів хімічного факультету. Львів: ЛНУ імені Івана Франка. 98 с. [Zinchuk V.K., Levytska H.D. (2000). *Laboratory workshop on analytical chemistry for students of the faculty of chemistry*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv. 98 p.]
- Курдиш І.К. (2012). Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів. *Сучасні аграрні технології*, 5, 10–19. [Kurdysh I.K. (2012). The role of microorganisms in rehabilitation of soil fertility. *Modern Agricultural Technology*, 5, 10–19.]
- Лаврентьева К.В., Харченко П.І., Черевач Н.В., Вінніков А.І. (2015). Фактори, що впливають на мобілізацію малорозчинних фосфатів ґрунтовими бактеріями. *Землеробство*, 3, 15–20. [Lavrentyeva K.V., Kharchenko P.I., Cherevach N.V., Vinnikov A.I. (2015). Factors affecting the mobilization of poorly soluble phosphates by soil bacteria. *Zemledelie*, 3, 15–20.]
- Лаврентьева К.В., Черевач Н.В., Вінніков А.І. (2011). Мобілізація фосфору з ортофосфату кальцію деякими ґрунтовими бактеріями. *Мікробіол. журн.*, 73(4), 41–45. [Lavrentyeva K.V., Cherevach N.V., Vinnikov A.I. (2011). Phosphorus mobilization from calcium orthophosphate by some soil bacteria. *Microbiol. J.*, 73(4), 41–45.]
- Лакин Г.Ф. (1990). Биометрия. М.: Высшая школа. 352 с. [Lakin G.F. (1990). *Biometrics*. Moscow: Vysshaya shkola. 352 p.]
- Патыка В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. (2003). Біологічний азот. К.: Світ. 422 с. [Patyka V.P., Kots S.Ya., Volkohon V.V. et al. (2003). *Biological nitrogen*. Kyiv: Svit. 422 p.]
- Ластухін Ю.О. (2009). Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості. Львів: Центр Європи, 2009. 836 с. [Lastukhin Yu.O. (2009). *Nutritional supplements. E-codes. Structure. Obtaining. Properties*. Lviv: Center of Europe. 836 p.]
- Патыка В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І. (2005). Агроэкологическая оценка минеральных удобрений та пестицидов. К.: Основа. 300 с. [Patyka V.P., Makarenko N.A., Mokliachuk L.I. (2005). *Agroecological evaluation of mineral fertilizers and pesticides*. Kyiv: Osnova. 300 p.]
- Jnawali A., Ojha R., Marahatta S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability – a review. *Adv. Plants Agric. Res.*, 2(6), 250–253. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
- Markou G., Chatzipavlidis I., Georgakakis D. (2012). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28(8), 2661–2670. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1076-4>

Nosrati R., Owlia P., Sadari H. et al. (2014). Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran J. Microbiol.*, 6(4), 285–295.

Saribay G.F. (2003). *Growth and nitrogen fixation dynamic of Azotobacter chroococcum in nitrogen-free and OMW containing medium* [Department of Food Engineering]. The Middle East Technical University. 68 p.

Sashidhar B., Podile A. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J. Appl. Microbiol.*, 109(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x>

Yandigeri M.S., Yadav A.K., Meena K.K., Pabbi S. (2010). Effect of mineral phosphates on growth and nitrogen fixation of diazotrophic cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Westiellopsis prolifica*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97(3), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9411-y>

Influence of phosphorus compounds on the formation of ammonium ions by cells of nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter chroococcum* VKM V-1272

G.I. Zvir, H.M. Rizun, S.O. Hnatush

This article presents the results of investigation of the influence of inorganic compounds of phosphorus (potassium hydroorthophosphate, sodium hydroorthophosphate) and phosphorus fertilizers (superphosphate, phosphorite flour) on the accumulation of biomass and the formation of ammonium ions by the cells of nitrogen-fixing bacteria *A. chroococcum* VKM V-1272. Sodium hydrophosphate, superphosphate and phosphorite flour were introduced into the culture medium (Ashby medium) instead of K_2HPO_4 at equimolar concentrations to the phosphate ion concentration in Ashby medium and at double concentration. It was established that $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, superphosphate and phosphorite flour at equimolar concentration stimulated the accumulation of biomass of *A. chroococcum* VKM V-1272, but at higher concentration they inhibited bacterial growth when compared to control. An increase of the concentration of $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ and K_2HPO_4 in the culture medium there was inhibited not only the growth but also the formation of ammonium ions by *A. chroococcum* VKM V-1272 bacteria. Phosphate fertilizers at all concentrations inhibited the nitrogen fixation process. The effectiveness of the using of phosphorus compounds by bacteria *A. chroococcum* VKM V-1272 in the growth process has also been investigated. It has been established that soluble inorganic compounds (potassium hydroorthophosphate, sodium hydroorthophosphate) can be used by bacteria with different effectiveness as a source of phosphorus. In a medium with $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, K_2HPO_4 and superphosphate we observed a decrease of the concentration of phosphate ions that evidences that bacteria *A. chroococcum* VKM B-1272 use them during growth. Increasing of the concentration of phosphate ions in the medium with phosphorite flour indicates the ability of bacteria to phosphate mobilization. So the accumulation of biomass and the formation of ammonium ions by nitrogen-fixing bacteria *A. chroococcum* VKM B-1272 depended on the nature and concentration of the phosphorus source in the growth medium. Therefore, further studies of the influence of phosphorus nutrition on the physiological and biochemical properties of nitrogen-fixing bacteria will allow to evaluate the sensitivity of *A. chroococcum* VKM B-1272 to the action of inorganic pollutants and to show the importance of rational use of phosphorus fertilizers in agriculture.

Key words: *nitrogen fixation, nitrogen-fixing bacteria, ammonium ions, phosphorus compounds, phosphorus fertilizers, phosphate mobilization.*

About the authors:

G.I. Zvir – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine, Hrushevsky Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005, galynazvir@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

H.M. Rizun – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine, Hrushevsky Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005, rszun@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

S.O. Hnatush – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine, Hrushevsky Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005, gmatuk88@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5353-102X>

Влияние соединений фосфора на образование ионов аммония клетками азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum* VKM B-1272

Г.И. Звір, А.М. Різун, С.А. Гнатуш

В статье представлены результаты исследования влияния неорганических соединений фосфора (гидроортофосфата калия, гидроортофосфата натрия) и фосфорных удобрений (суперфосфата, фосфоритной муки) на накопление биомассы и образование ионов аммония клетками азотфиксирующих бактерий *A. chroococcum* VKM B-1272. Гидроортофосфат натрия, суперфосфат и фосфоритную муку добавляли в среду

культивування (середя Ешбі) замість K_2HPO_4 в концентраціях, еквімолярних концентрації фосфат-іонів в середя Ешбі, і в два рази вище. Установлено, що $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, суперфосфат і фосфоритна мука в еквімолярній концентрації стимулювали накоплення біомаси *A. chroococcum* ВКМ В-1272, однак підвищені концентрації подавляли ріст бактерій по порівнянню з контролем. Зростання концентрації $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ і K_2HPO_4 в середя культивування інгібувало не тільки ріст, но і утворення іонів амонія бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272. Фосфорні добрива во всіх концентраціях інгібували процес азотфіксації. Досліджена також ефективність використання бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 з'єдиненій фосфора в процесі рiста. Установлено, що розчинимі неорганічні з'єдинення (гідроортофосфат калія, гідроортофосфат натрія) бактерії можуть з різною ефективністю використовувати як джерело фосфора. В середя з $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, K_2HPO_4 і суперфосфатом спiвляли зниження концентрації фосфат-іонів, що свідчить про використання їх бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 во время рiста. Зростання вмісту фосфат-іонів в середя з фосфоритної мукою свідчить про здатність бактерій до фосфатомобілізації. Ітак, накоплення біомаси і утворення іонів амонія азотфіксуючими бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 залежало від природи і концентрації джерела фосфора в середя рiста. Поєтому далішні дослідження впливу фосфорного живлення на фізіолого-біохімічні властивості азотфіксуючих бактерій дозволять оцінити чутливість *A. chroococcum* ВКМ В-1272 до дії неорганічних забруднювачів і показати важливість раціонального використання в сільському господарстві фосфорних добрив.

Ключові слова: азотфіксація, азотфіксуючі бактерії, іони амонія, з'єдинення фосфора, фосфорні добрива, фосфатомобілізація.

Об авторах:

Г.І. Звир – Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, galynazvir@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

А.М. Ризун – Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, rszun@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

С.А. Гнатуш – Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, gnatur88@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5353-102X>

Представлено: Н.М.Гринчишин / Presented by: N.M.Grynchyshyn

Рецензент: О.І.Віннікова / Reviewer: O.I.Vinnikova

Подано до редакції / Received: 09.02.2020

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...
... PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ...

УДК: 616.453-092.9:613.63

**Морфофункціональні перебудови кіркової речовини наднирників
статевозрілих щурів за умов експериментального мікроелементозу**

Н.Б. Гринцова, А.М. Романюк, М.С. Линдін, Т.В. Рябенко

Ксенобіотики, в тому числі і солі важких металів, детермінують розвиток патології окремих органів та систем організму. Гормони надниркових залоз займають одне з ключових місць у регуляції та підтриманні основних функцій організму. Вивчення морфологічних, біохімічних та імуногістохімічних перебудов у корі наднирників статевозрілих щурів-самців за умов впливу на організм комплексу солей важких металів залишається актуальним аспектом сучасної морфології. Експеримент був проведений на 24 білих статевозрілих щурах-самцях масою 250–300 г, у віці 7–8 місяців. Тварини експериментальної групи протягом 60 днів вживали звичайну питну воду, насичену комбінацією солей важких металів (Zn, Cu, Fe, Mg, Cr). Застосовувалися гістологічні, біохімічні (визначення вмісту гормонів: COR – кортизол, DHS –дегідроепіандростерону сульфат) та імуногістохімічні (визначення експресії маркера проліферації Ki-67) методи дослідження. Довготривале надходження до організму статевозрілих щурів комбінацій солей важких металів призводить до потовщення стромального компонента залози, запускання капілярів та порушення реологічних властивостей крові. У ядерному апараті спонгіоцитів виявляється конденсація хроматину, його маргінальне розташування, початкові етапи некробіотичних перебудов. З боку ендокриноцитів клубочкової та сітчастої зон залози спостерігається незначне збільшення проліферативної активності, при ареактивності клітин пучкової зони. Наведені морфологічні зміни корелюють з результатами біохімічного дослідження, згідно з якими у формуванні адаптивних реакцій в організмі експериментальних тварин при 60-добовому терміні надходження до організму комплексу солей важких металів беруть активну участь гормони сітчастої зони наднирників – DHS. Результати комплексних досліджень вказують на послаблення секреторної активності клітин пучкової зони наднирників, що негативно впливає на розвиток в організмі компенсаторно-приспосувальних процесів і перебіг загального адаптаційного синдрому у відповідь на дію пошкоджуючого агента.

Ключові слова: кора наднирників, важкі метали, кортизол, дегідроепіандростерону сульфат, Ki-67, адаптаційний синдром.

Про авторів:

Н.Б. Гринцова – Сумський державний університет, медичний інститут, вул. Санаторна, буд. 33, Суми, Україна, 40018, natalia.gryntsova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-6713-7533>

А.М. Романюк – Сумський державний університет, медичний інститут, вул. Санаторна, буд. 33, Суми, Україна, 40018, pathomorph@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2560-1382>

М.С. Линдін – Сумський державний університет, медичний інститут, вул. Санаторна, буд. 33, Суми, Україна, 40018, lyndin_nikolay@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-4385-3903>

Т.В. Рябенко – Сумський державний університет, медичний інститут, вул. Санаторна, буд. 33, Суми, Україна, 40018, anatomy@med.sumdu.edu.ua, <http://orcid.org/0000-0003-2740-389X>

Вступ

Важкі метали та їх сполуки утворюють особливу групу токсикантів, які зумовлюють негативний вплив на довкілля і безпосередньо на саму людину (Дмитруха, 2009; Koller, 1980). Хронічна дія хімічних факторів (зокрема солей важких металів) в умовах виробництва, призводячи в кінцевому рахунку до інтоксикації, як правило, супроводжується змінами різних органів та систем людини (Губар та ін., 2007). Солі важких металів, кількість яких у екосистемі постійно зростає, привертають особливу увагу дослідників (Рогозіна та ін., 2009; Romaniuk et al., 2017). Так, вміст солей важких металів в навколишньому середовищі (ґрунті, воді, повітрі) окремих регіонів нашої країни часом багаторазово перевищує санітарно-гігієнічні норми, перетворюючись в серйозну екологічну проблему, яка з роками все більше загрожує здоров'ю населення (Трахтенберг, 2008). В окремих північних районах України відзначено підвищення у ґрунті та питній воді солей цинку, хрому, свинцю, марганцю, міді та заліза, що зустрічаються в різних комбінаціях в залежності від регіону та чинять несприятливий вплив на здоров'я населення (Гринцова, 2017; Romanyuk et al., 2019). В умовах техногенного забруднення довкілля одним із пріоритетних напрямків екологічної морфології залишається вивчення особливостей і механізмів комбінованої дії найбільш поширених

ксенобіотиків – факторів ризику багатьох екологічно залежних мультифакторних захворювань (Луговской, 2005). Відомостей про біохімічні та імуногістохімічні особливості структурних елементів кори наднирників статевозрілих щурів-самців за умов впливу комбінації солей важких металів у науковій літературі ми не зустріли.

Актуальність проблеми спонукає до пошуку природних механізмів захисту від подібної хімічної агресії. На таку роль цілком можуть претендувати наднирники, біологічно активні речовини яких, зокрема глюко- та мінералокортикоїди, за певних умов забезпечують протективний ефект при несприятливих впливах на організм. На сьогоднішній день доведено негативну дію солей важких металів як на організм в цілому, так і на наднирники (Рожков, Гордієнко, 2005). Однак інформації щодо детального комплексного дослідження структурних компонентів наднирників після впливу комбінації солей важких металів автори не знайшли.

Наднирники є однією з важливих ланок у системі ендокринної регуляції більшості життєво важливих функцій організму. У той же час, наднирник є найбільш уразливим в ендокринній системі органом-мішенню для токсичності, і фактори, що сприяють цій уразливості, були визначені численними дослідниками (Harvey et al., 2007; Hinson, Raven, 2006). Наднирники займають одне з центральних місць в ендокринній регуляції життєдіяльності всіх органів та систем індивіда в залежності від умов існування. Вони відіграють провідну роль у здійсненні пристосувальних реакцій організму до мінливих умов зовнішнього середовища, зокрема при розладах водно-солевого обміну, гострому та хронічному стресі, регулюють синтез білків, жирів та вуглеводів. Наднирники вносять вагомий внесок у здійснення стрес-організуючих і стрес-лімітуючих механізмів, залучаючись до формування множинних адаптаційних відповідей організму на стресорний вплив. Гормони наднирників глюкокортикоїди є важливою ланкою адаптаційних механізмів до різноманітних екзогенних впливів. Отже, комплексне вивчення морфологічних, біохімічних та імуногістохімічних перетворень структурних компонентів кори наднирників за умов впливу комбінації солей важких металів є актуальною проблемою та потребує детального вивчення. На сьогоднішній день аналіз наукових робіт свідчить про те, що існує нерівномірність в розподілі знань. Більш дослідженими є питання, присвячені біохімічним та морфологічним аспектам, у той час як вивченню імуногістохімічних особливостей структурних компонентів кори наднирників, в особливості при різних патологічних станах організму, присвячена порівняно невелика кількість наукових публікацій (Луцик, Ященко, 2018; Ng, Liu, 1990; Rana, 2014; Rastogi, Singhal, 1975).

Метою роботи є вивчення морфологічних, та функціональних перебудов у корі наднирників статевозрілих щурів-самців за умов впливу на організм комплексу солей важких металів.

Об'єкти та методи дослідження

Експеримент проведений на 24 білих статевозрілих щурах-самцях масою 250–300 г, віком 7–8 місяців, що були розподілені на 2 групи (контрольну та експериментальну). Щури утримувалися у звичайних умовах віварію, на стандартному питному та харчовому раціоні, з постійною температурою оточуючого середовища 20–22°C. В експерименті використовували активних тварин із задовільним загальним станом та станом шкіряного покриву. У віварії тварини перебували в однакових умовах утримання, харчування, належного догляду та природного освітлення (день/ніч). Експеримент проведено в осінньо-зимовий період. Щури контрольної групи утримувалися в звичайних умовах віварію, отримували звичайну питну воду та їжу. Експериментальну групу склали щури, які протягом 60 діб вживали звичайну питну воду, насичену комбінацією солей важких металів: цинку ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) – 5 мг/л, міді ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) – 1 мг/л, заліза ($FeSO_4$) – 10 мг/л, марганцю ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$) – 0,1 мг/л, свинцю ($Pb(NO_3)_2$) – 0,1 мг/л та хрому ($K_2Cr_2O_7$) – 0,1 мг/л (Гринцова, 2017; Romanuk et al., 2019). Групи піддослідних тварин виводилися з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом на 60-ту добу від початку досліду. Утримання тварин та маніпуляції над ними проводилися у відповідності до положень «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006.

Для вивчення морфологічних перебудов у кірковій речовині наднирників застосовували загальноприйняті методики мікроанатомічного (гістологічного) методу дослідження. З метою проведення морфологічних та імуногістохімічних досліджень проводили виділення наднирників.

Фіксація органу впродовж 24 годин у 10%-ному розчині нейтрального формаліну. Процес зневоднення проводили у низці порцій етилового спирту з висхідними концентраціями 70°, 80°, 90°, 96°, після чого об'єкти заливали парафіном. З гістологічних блоків на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи завтовшки від 4 до 5 мкм. Зрізи фарбували гематоксилін-еозином за стандартною методикою. Загальний морфологічний аналіз проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа «Zeiss Primo Star», з об'єктивами $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, біокулярами 7, 10. Фотодокументування отриманих результатів проводили цифровою відеокамерою «Ахіосат ERC 5S Zeiss». Оцінку анатомічного стану наднирників проводили за рядом макроскопічних показників: форма органу, стан стромального та паренхіматозного компонентів. Оцінку гістологічного стану наднирників проводили за рядом мікроскопічних показників: стан спонгіоцитів клубочкової, пучкової та сітчастої зон кори наднирників, зокрема стан ядерного апарату клітин та наявність включень в цитоплазмі; стан судинного русла, зміни реологічних властивостей крові.

Визначення експресії маркера проліферації Ki-67 проводили на депарафінованих зрізах товщиною 4–5 мкм, із попереднім демаскуванням антигенів у цитратному буфері (рН 6,0) в умовах мікрохвильової печі протягом 10 хв. Для імуногістохімічної реакції використовували кролячі моноклональні антитіла (клон SP6 для визначення Ki-67, США) з титром 1 : 100 згідно з рекомендаціями виробника. Оцінку експресії маркера проліферації Ki-67 проводили за кількістю забарвлених ядер клітин залози. Мікроскопічно визначалося коричневе забарвлення ядер залозистого епітелію. Оцінка експресії Ki-67 проводилася напівкількісно методом підрахунку кількості забарвлених ядер на 100 клітин у трьох полях зору, результат виражався у відсотках і оцінювався за прийнятою шкалою: 1) відсутня проліферативна реакція (–), 2) 0–20 % – слабка проліферативна активність (+), 3) 21–50 % – помірна проліферативна активність (++) , 4) 51–100 % – значна проліферативна активність (+++) (Луцик, Яценко, 2018).

Функціональний стан кори надниркових залоз оцінювали шляхом визначення у сироватці периферійної крові дослідних тварин (методом ІФА) наступних гормонів та показників їх оптичної щільності (у.о.): кортизолу COR (нмоль/л) та DHS (мкмоль/л). Рівень гормонів та їх оптичної щільності визначався за допомогою реагентів фірми Siemens (серії 388 – для COR, 225 – для DHS) на автоматичному імунохемолюмінесцентному аналізаторі Immulite 1000 Siemens HealthCare Global. Забір крові у щурів проводили шляхом пункції хвостової вени безпосередньо перед декапітацією, в ранковий час, з 6 до 8 годин. Кров забирали в пробірки, центрифугували 20 хв при +4°C (1000 g), після чого здійснювали відбір сироватки. Всі зразки були проаналізовані у двох повторях.

Статистичний аналіз даних здійснювалася у пакеті програм «Statistica 8.0», з використанням критеріїв Стьюдента і Фішера. Значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати

При гістологічному дослідженні наднирник щурів контрольної групи мав овальну форму, ззовні оточений капсулою. Зовнішній шар капсули сформований жировою тканиною, яка є спільною для наднирника та нирки. Внутрішній шар капсули побудований із щільної оформленої сполучної тканини. Паренхіма наднирника представлена кірковою та мозковою речовиною. В свою чергу кіркова речовина включає в себе три зони: клубочкову, пучкову та сітчасту. Клітини клубочкової зони формують епітеліальні тяжі у вигляді клубочків, що знаходяться субкапсулярно. Клітини клубочкової зони дрібні, кубічної або призматичної форми, мають світлу цитоплазму з невеликою кількістю ліпідних включень. Ядра клітин з ядрцем мали овальну форму та займали центральне положення у клітині. Хроматин мав дрібнодисперсну будову. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складало 1 : 2–1 : 3. Міжклітинні простори в епітеліальних тяжках вузькі, не виразні.

Пучкова зона утворена паралельно орієнтованими тяжками клітин, між якими залягають гемокапіляри. Клітини пучкової зони дещо більші від клітин клубочкової зони, мають велике округле світле ядро з розвинутими ядрцями, що займає переважно центральне положення. Цитоплазма більшості клітин оксифільна, у ній визначаються вакуолі та ліпідні включення. У цій зоні поряд зі світлими клітинами зустрічаються в різній кількості темні з ущільненою цитоплазмою, що містила мало ліпідних включень. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складало 1 : 3,5–1 : 4 (рис. 1).

Сітчаста зона – найглибша зона кори наднирника, що прилягає до мозкової речовини. У цій зоні епітеліальних тяжкі розгалужуються, анастомозують та формують пухку мережу у вигляді сітки. Між ними розташовані численні капіляри. Адренкортикоцити в сітчастій зоні зменшуються в розмірах і набувають кубічної, округлої або полігональної форми. При світловій мікроскопії клітини сітчастої

зони мають кулясті ядра, ядерця та яскраво оксифільну цитоплазму. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складало 1 : 1,5-1:2.

Результати нашої оцінки гістологічного стану наднирників щурів контрольної групи співпадають з результатами досліджень ряду авторів (Грабовський, 2014; Скотаренко, 2015).

Згідно з результатами імуногістохімічного дослідження експресії Ki-67 у корі наднирників тварин контрольної групи визначено наступне: у клітинах клубочкової та сітчастої зони маркер Ki-67 виявлявся у 35 % ядер, що свідчить про помірну проліферативну активність клітин (++) у цих зонах залоз. Клітини пучкової зони експресували Ki-67 лише у поодиноких клітинах (5 %, +), що свідчить про низьку проліферативну активність клітин у цій зоні залози. Інтенсивність забарвлення ядер клітин оцінювалася як помірне (++) , а цитоплазми як низька (рис. 2).

Згідно з результатами біохімічного дослідження крові контрольних тварин рівень COR в периферійній крові становив $107,25 \pm 2,776$ нмоль/л. Рівень DHS, що є неактивною формою основного попередника андрогена (ДГЕА), мав показники $<0,407$ мкмоль/л в сироватці крові контрольних щурів. Також досліджували оптичну щільність DHS у сироватці крові, враховували закон Бугера-Ламберта-Бера, який вказує на те, що оптична щільність розчину прямо пропорційна концентрації аналізованої речовини. При цьому показник оптичної щільності цього гормону становив $28,006 \pm 0,926$ у.о.

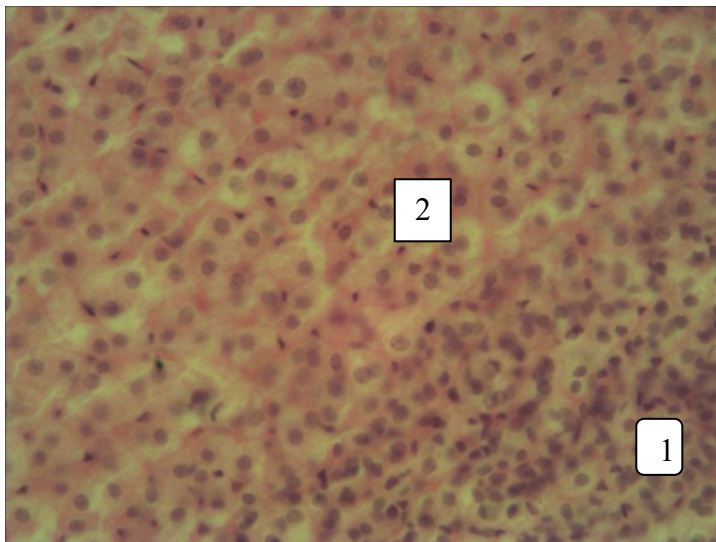


Рис. 1. Гістологічна будова наднирників щурів контрольної групи: 1 – клубочкова зона, 2 – пучкова зона. Забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 400$

Після 60-добового терміну впливу комплексу солей важких металів на організм експериментальних тварин у наднирниках визначалися значні морфофункціональні перебудови. Макроскопічно наднирник піддослідних щурів зберігав свою анатомічну будову. Фібозна капсула залоз щільно прилягала до паренхіми, на деяких ділянках була дещо потовщена та розпушена, цілісність її не порушена. Судини капсули розширені, з ознаками субкапсулярного повнокрів'я. Морфологія стінки артерій та артеріол капсули була порушена, м'язова оболонка потовщена, ендотеліоцити перебували у стані набряку, гіпертрофовані, гіперхромні, а їх ядра випиналися у просвіт судин. Місцями ендотеліальний шар судин порушений. Спостерігалось порушення реологічних властивостей крові у вигляді стазу еритроцитів та початкових процесів їх складжування. Цитоархітектоніка зон наднирника порушена. У клубочковій зоні клітинні тяжі дещо втрачали характерне розташування, визначалася дисконкомпексація клітинних трабекул. Міжтрабекулярні простори клубочкової зони не розширені, з ознаками запусівання переважної частини міжтрабекулярних капілярів (рис. 3).

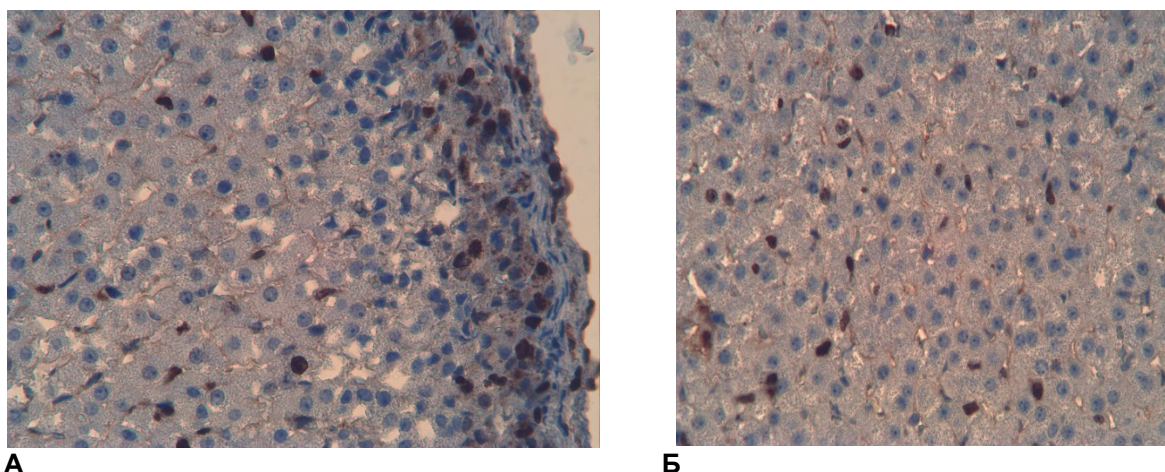


Рис. 2. Експресія Кі-67 у клубочковій і пучковій зоні (А) та сітчастій зоні (Б) кори наднирників щурів контрольної групи. $\times 400$

Клітини клубочкової зони мали нечіткі контури клітинної оболонки, дещо гіперхромну цитоплазму з дрібнодисперсною зернистістю. Ядра клітин клубочкової зони були гіперхромні, з початковими етапами пікнотичних перебудов. Лише поодинокі клітини мали округлі збільшені у розмірах ядра з дещо просвітленою хроматиною сіткою та добре контурованим ядерцем. Архітектоника пучкової зони у порівнянні з контролем порушена. Міжтрабекулярні простори були значно розширені, з ознаками набряку, але гіперемії капілярів не спостерігалось (рис. 3). Ендокриноцити пучкової зони мали оксифільну цитоплазму та округлі, базофільні, дещо зменшені в розмірах ядра. У препаратах спостерігалась тенденція до посилення процесів конденсації хроматину ядер, їх деформації. Кількість ядер, що мали ядерця, зменшувалась у порівнянні з контролем. У ядрах спостерігалось крайове розташування конденсованого хроматину, гіпертрофія та гіперхроматоз ядерця.

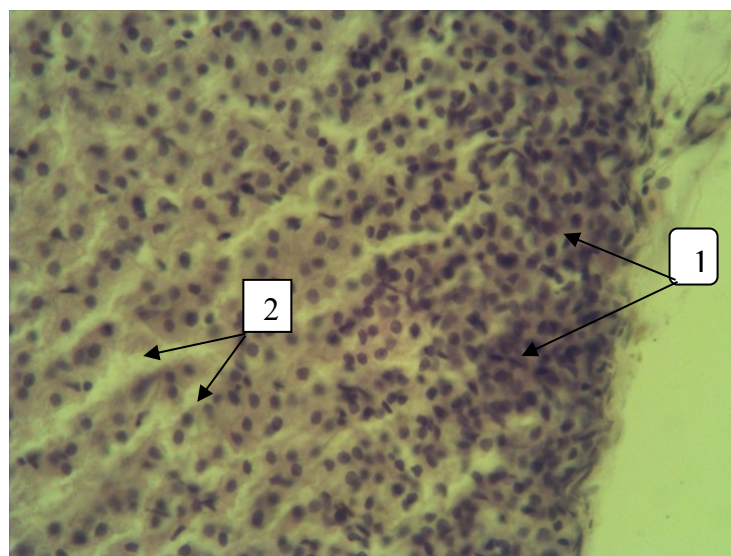


Рис. 3. Гістологічна будова кіркової речовини наднирника експериментальних тварин після 60-добового надходження в організм комбінації солей важких металів: 1 – порушення гістоархітектоніки клітин клубочкової зони; 2 – розширення та набряк міжтрабекулярних просторів у пучковій зоні. Фарбування: гематоксилін і еозин. $\times 400$

Сітчаста зона залози у порівнянні з контролем була дещо розширена, цитоархітектоніка епітеліальних трабекул, що сформовані спонгіоцитами сітчастої зони, була дещо порушена. Міжтрабекулярні простори та судини мікроциркуляторного русла були розширені, з ознаками набряку, але лише незначна частина просвітів капілярів частково заповнена клітинними елементами крові. Спостерігалось порушення реологічних властивостей крові у вигляді гемостазу, сладж-феномену, початкових етапів порушення проникності судинної стінки та виходу клітинних елементів крові та плазми у позасудинний простір. Частина капілярів була з ознаками запусівання. Епітеліальні тяжі склалися з великих клітин із світлою цитоплазмою та округлим помірно базофільним ядром, з ознаками конденсації хроматинової сітки. При цьому ступінь конденсації хроматину був більш виразним, ніж у ядрах клітин пучкової зони (рис. 4).

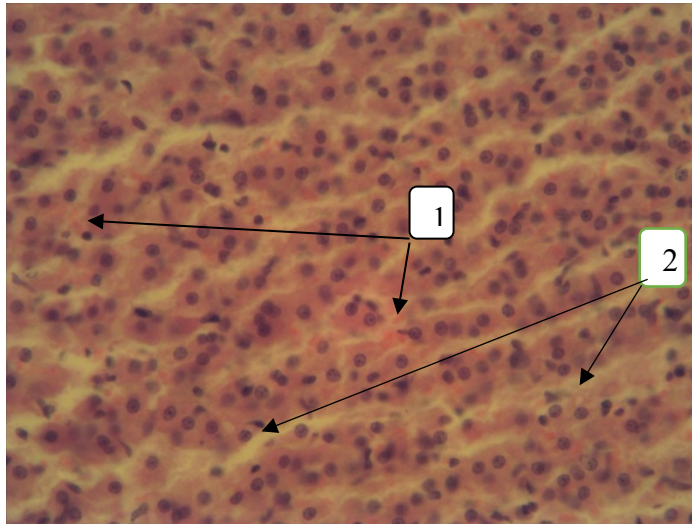


Рис. 4. Гістологічна будова кіркової речовини наднирника експериментальних тварин після 60-денного надходження в організм комбінації солей важких металів: 1 – повнокрів'я судин сітчастої зони; 2 – набряк строми. Фарбування: гематоксилін і еозин. $\times 400$

Згідно з результатами імуногістохімічного дослідження експресії маркеру проліферативної активності Ki-67 визначено, що на 60-ту добу досліду експресія Ki-67 спостерігалася у численних ядрах клітин клубочкової та сітчастої зон. При цьому відмічалось незначне збільшення кількості ядер клітин, що експресували Ki-67 (40 %) у порівнянні з контролем (35 %). Це свідчить про активацію процесів проліферації саме в цих ділянках кори наднирників (помірна проліферативна активність) у поєднанні з практичною ареаактивністю клітин пучкової зони паренхіми залози (5 % – низька проліферативна активність). Інтенсивність забарвлення ядер клітин оцінювалася як помірна (++) , а цитоплазми як низька (рис. 5).

Згідно з результатами біохімічного дослідження крові експериментальних тварин: рівень COR у сироватці крові достовірно зменшувався на 27,1 % ($p < 0,05$) у порівнянні з показниками контрольних тварин.

Рівень DHS мав показник $< 0,407$ мкмоль/л у сироватці крові як контрольних, так і експериментальних тварин. Але показник оптичної щільності цього гормону був значуще більший за показники контрольних тварин на 8,9 % ($p < 0,05$) (табл. 1). Це вказує на збільшення концентрації DHS у сироватці крові експериментальних тварин у порівнянні з тваринами контрольної групи.

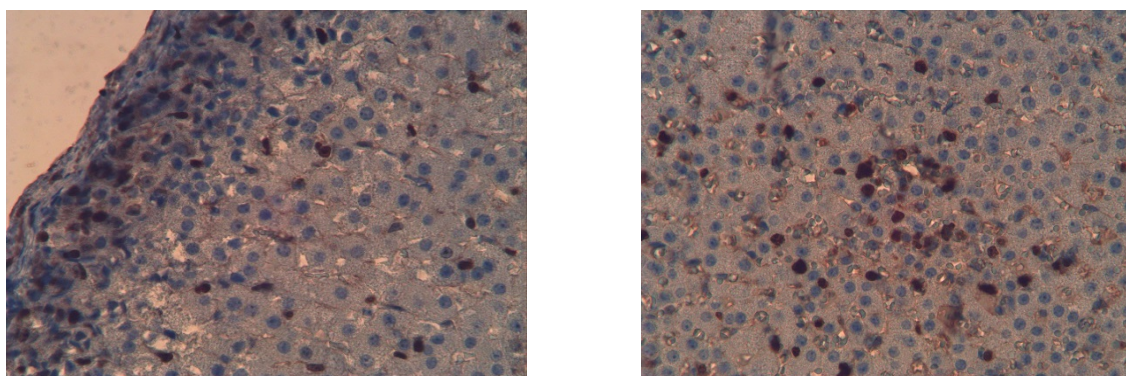


Рис. 5. Експресія Ki-67 у клітинах клубочкової та сітчастої зон наднирника експериментального щура після 60-добового терміну досліджу. $\times 400$

Таблиця 1.

Результати визначення гормонів у сироватці крові експериментальних та контрольних тварин ($M \pm m$), $n=6$

Показник	Досліджувані групи тварин	
	Контрольні тварини	Експериментальні тварини
Вміст гормонів у сироватці крові		
COR (нмоль/л)	107,25 \pm 2,776	78,2 \pm 9,5*
DHS (мкмоль/л)	<0,407	<0,407
DHS, оптична щільність (у.о.)	28,006 \pm 0,926	30,487 \pm 0,336*

Примітка: *різниця між показниками контролю та експерименту значуща, $p \leq 0,05$.

Обговорення

Довготривале надходження до організму статевозрілих щурів комбінацій солей важких металів призводить до морфологічних трансформацій усіх структурних компонентів кіркової речовини наднирників: строми, судинного русла, морфології та секреторної активності спонгіоцитів, переважно пучкової та сітчастої зон. Виявляється потовщення та набряк стромального компонента залози, запустіння капілярів та порушення реологічних властивостей крові. Морфологічні перебудови частини спонгіоцитів стосуються здебільшого їх ядерного апарату (конденсація хроматину та його маргінальне розташування, початкові етапи некробіотичних перебудов). Але, невелика частина ядер мають добре контуровані ядерця, що вказує на активні регенераторні перебудови у клітинах як відповідь на дію пошкоджуючого агента. Морфологічні перебудови у кірковій речовині залози експериментальних тварин підтверджуються біохімічними та імуногістохімічними результатами дослідження. Це виявляється у незначному збільшенні проліферативної активності з боку ендокриноцитів клубочкової та сітчастої зони, при ареактивності клітин пучкової зони. Наведені результати корелюють з результатами біохімічного дослідження, згідно з якими у формуванні адаптивних реакцій в організмі експериментальних тварин при 60-добовому терміні надходження до організму комплексу солей важких металів беруть активну участь гормони сітчастої зони кори наднирників. Результати морфологічних, імуногістохімічних та біохімічних досліджень вказують на послаблення секреторної активності клітин пучкової зони наднирників. Зменшення процесів синтезу кортизолу негативно впливає на розвиток в організмі компенсаторно-приспосувальних процесів та перебіг загального адаптаційного синдрому у відповідь на дію пошкоджуючого агента.

Отже, в результаті довготривалого впливу на організм щурів комбінації солей важких металів у корі наднирників розвиваються пристосувально-компенсаторні процеси з початковими ознаками зниженої функціональної активності.

Список літератури / References

- Грабовський С.С. (2014). Морфометрична характеристика наднирників і нирок щурів за умов передзабійного стресу під час використання біологічно активних речовин. *Біологічні Студії*, 8(2), 43–56. [Grabovsky S.S. (2014). Morphometric characterization of adrenal glands and kidneys under conditions of pre-slaughter stress during the use of biologically active substances. *Studia Biologica*, 8(2), 43–56.]
- Гринцова Н.Б. (2017). Морфологічні перебудови структурних компонентів проміжної частки гіпофіза статевозрілих щурів-самиць в умовах впливу солей важких металів / European Conference on Innovations in Technical and Natural Sciences: 15th International scientific conference. Vienna, Austria. С. 3–8. [Hryntsova N.B. (2017). Morphological rearrangements of the structural components of the intermediate lobe of the pituitary gland of female adult rats under the influence of heavy metal salts. *European Conference on Innovations in Technical and Natural Sciences: 15th International scientific conference*. Vienna, Austria, pp. 3–8.]
- Губар І.В., Козлов К.П., Левченко І.Л. (2007). Вплив низьких доз сполук свинцю, ртуті та марганцю на реографічні показники білих щурів в залежності від віку. *Современные проблемы токсикологии*, 4, 8–10. [Gubar I.V., Kozlov K.P., Levchenko I.L. (2007). The influence of low doses of lead, mercury and manganese on reographic indices of white rats of different age. *Modern Problems of Toxicology*, 4, 8–10.]
- Дмитруха Н.М. (2009). До проблеми імунотоксичності свинцю і кадмію (огляд літератури). *Современные проблемы токсикологии*, 1, 4–9. [Dmitrukha N.M. (2009). To the problem of immunotoxicity lead and cadmium (literature review). *Modern Problems of Toxicology*, 1, 4–9.]
- Луговской С.П. (2005). Морфофункціональна характеристика головного мозку щурів при хронічному впливі на організм малих доз свинцю. *Современные проблемы токсикологии*, 3, 23–28. [Lugovskoy S.P. (2005). Morphological and functional pattern of cerebrum of rats under chronic exposure with small doses of lead. *Modern Problems of Toxicology*, 3, 23–28.]
- Луцик С.О., Ященко А.М. (2018). Імуногістохімічне дослідження надниркових залоз потомства щурів, що розвивалося за умов експериментального гіпо- та гіпертирозу материнського організму. *Світ медицини та біології*, 4(66), 175–180. <https://doi.org/10.26724/2079-8334-2018-4-66-175-180> [Lutsik S.O., Yashchenko A.M. (2018). Immunohistochemical study of adrenal glands in rats progeny grown in the conditions of experimental hypo and hypertension of the maternal body. *World of Medicine and Biology*, 4(66), 175–180. <https://doi.org/10.26724/2079-8334-2018-4-66-175-180>]
- Рогозіна О.В., Озерова Н.Ю., Каширіна Н.К. (2009). Морфологія аденогіпофізу та наднирок під впливом свинцевої інтоксикації та її корекції. *Світ медицини та біології*, 3, 136–140. [Rogozina O.V., Ozerova N.Y., Kashirina N.K. (2009). Morphology of adenohipophysys and adrenal gland under the influence of lead intoxication and its correction. *World of Medicine and Biology*, 3, 136–140.]
- Рожков І.М., Гордієнко В.М. (2005). Деякі аспекти гістофізіологічних змін кортикоцитів пучкової зони надниркових залоз в умовах хронічної нітратної інтоксикації та її корекції плаванням. *Спортивна медицина*, 1, 75–78. [Rozhkov I.M., Hordienko V.M. (2005). Some aspects of histophysiological changes of adrenal corticocytes at chronic nitrate intoxication and its correction by swimming. *Sports Medicine*, 1, 75–78.]
- Скотаренко Т.А. (2015). Сучасні погляди на морфофункціональний стан наднирників в нормі, при гострому запаленні та можливості впливу на них фетоплацентарних тканин. *Актуальні проблеми сучасної медицини*, 15(2), 237–241. [Skotarenko T.A. (2015). Modern views on the morphofunctional state of the adrenal glands in normal, acute inflammation and the possibility of their influence on fetoplacental tissues. *Actual Problems of Modern Medicine*, 15(2), 237–241.]
- Трахтенберг І. (2008). Книга про отрути та отруєння. Тернопіль: ТДМУ, «Укрмедкнига». С. 122–123. [Trakhtenberg I. (2008). *The book about poisons and poisoning*. Ternopil: Ternopil State Medical University, "Ukrmedkniga", pp. 122–123.]
- Harvey P.W., Everett D.J., Springall C.J. (2007). Adrenal toxicology; a strategy for assessment of functional toxicity to the adrenal cortex and steroidogenesis. *J. Appl. Toxicol.*, 27, 103–115. <https://doi.org/10.1002/jat.1221>
- Hinson J.P., Raven P.W. (2006). Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.006>
- Koller L.D. (1980). Immunotoxicology of heavy metals. *Int. J. Immunopharmacol.*, 2, 269–279. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(80\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0192-0561(80)90027-2)
- Ng T.B., Liu W.K. (1990). Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis. *In Vitro Cellular & Development Biology*, 26(1), 24–28. <https://doi.org/10.1007/BF02624150>

- Rana S.V.S. (2014). Perspectives in endocrine toxicity of heavy metal. *Biological Trace Element Research*, 160(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0023-7>
- Rastogi R.B., Singhal R.L. (1975). Effect of chronic cadmium treatment on rat adrenal catecholamines. *Endocrine Research Communications*, 2(1), 87–94. <https://doi.org/10.1080/07435807509053840>
- Romanyuk A.M., Hryntsova N.B., Karpenko L.I. et al. (2019). The long-term effect of the complex of heavy metal salts on the morphofunctional changes in the structural components of the intermediate lobe of the mature rat's pituitary gland-the female. *Problems of Endocrine Pathology*, 2, 98–103. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2019.2.14>
- Romaniuk A., Sikora V., Lyndin M. et al. (2017). The features of morphological changes in the urinary bladder under combined effect of heavy metal salts. *Interventional Medicine and Applied Science*, 9(2), 105–111. <https://doi.org/10.1556/1646.9.2017.2.09>

Morphofunctional rearrangements of adrenal cortex of adult rats at the experimental microelementosis

N.B. Hryntsova, A.M. Romanyuk, M.S. Lyndin, T.V. Ryabenko

Xenobiotics, including salts of heavy metals, determine the development of pathology of individual organs and systems of the body. Adrenal hormones occupy a key place in the regulation and maintenance of the organism basic functions. The study of morphological, biochemical and immunohistochemical changes in the adrenal cortex of pubescent male rats at exposure to the complex of heavy metal salts remains an actual aspect of modern morphology. The experiment involved 24 white adult male rats weighing 250–300 g, aged 7–8 months. The animals of the experimental group consumed ordinary drinking water saturated with a combination of heavy metal salts (Zn, Cu, Fe, Mg, Cr) for 60 days. Histological, biochemical (determination of the content of hormones COR – cortisol, DHS – dehydroepiandrosterone sulfate) and immunohistochemical (determination of the expression of proliferation marker Ki-67) methods were used. Long-term consumption of the combination of heavy metals salts by mature rats leads to thickening of the stromal component of the gland, the rupture of capillaries and the violation of rheological properties of blood. Chromatin condensation, its marginal location, and initial stages of necrobiotic changes have been found in the spongicyte nuclear apparatus. For endocrinocytes of the zona glomerulosa and zona reticularis of the gland, a slight increase in proliferative activity has been revealed, while cells of the zona fasciculata were non-reactive. These results correlate with the results of biochemical research, according to which hormones of the zona reticularis – DHS were actively involved in the formation of adaptive reactions in the body of experimental animals at the 60-day period of administration of the complex of heavy metals salts. The results of complex studies indicate a weakening of the secretory activity of cells of the zona fasciculata, which adversely affects the development of compensatory-adaptive processes in the body and the course of the general adaptation syndrome in response to the action of the damaging agent.

Key words: *adrenal cortex, heavy metals, cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, Ki-67, adaptation syndrome.*

About the authors:

N.B. Hryntsova – Sumy State University, Medical Institute, Sanatorna Str., 33, Sumy, Ukraine, 40018, natalia.gryntsova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-6713-7533>
A.M. Romanyuk – Sumy State University, Medical Institute, Sanatorna Str., 33, Sumy, Ukraine, 40018, pathomorph@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2560-1382>
M.S. Lyndin – Sumy State University, Medical Institute, Sanatorna Str., 33, Sumy, Ukraine, 40018, lyndin_nikolay@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-4385-3903>
T.V. Ryabenko – Sumy State University, Medical Institute, Sanatorna Str., 33, Sumy, Ukraine, 40018, anatomy@med.sumdu.edu.ua, <http://orcid.org/0000-0003-2740-389X>

Морфофункциональные перестройки коры надпочечников половозрелых крыс в условиях экспериментального микроэлементоза

Н.Б. Гринцова, А.М. Романюк, Н.С. Линдін, Т.В. Рябенко

Ксенобиотики, в том числе и соли тяжелых металлов, детерминируют развитие патологии отдельных органов и систем организма. Гормоны надпочечников занимают одно из ключевых мест в регуляции и поддержании основных функций организма. Изучение морфологических, биохимических и иммуногистохимических перестроек в коре надпочечников половозрелых крыс-самцов в условиях воздействия на организм комплекса солей тяжелых металлов остается актуальным аспектом современной морфологии. Эксперимент был проведен на 24 белых половозрелых крысах-самцах массой 250–300 г, в возрасте 7–8 месяцев. Животные экспериментальной группы в течение 60 суток употребляли обычную питьевую воду, насыщенную комбинацией солей тяжелых металлов (Zn, Cu, Fe, Mg, Cr). Применялись гистологические, биохимические (определение содержания гормонов COR – кортизол, DHS – дегидроэпиандростерона сульфат) и иммуногистохимические

(определение экспрессии маркера пролиферации Ki-67) методы исследования. Длительное поступление в организм половозрелых крыс комбинаций солей тяжелых металлов приводит к утолщению стромального компонента железы, запустению капилляров и нарушению реологических свойств крови. В ядерном аппарате спонгиозитов наблюдается конденсация хроматина, его маргинальное положение, начальные этапы некробиотических перестроек. Со стороны эндокриноцитов клубочковой и сетчатой зон железы наблюдается незначительное увеличение пролиферативной активности, при ареактивности клеток пучковой зоны. Приведенные данные коррелируют с результатами биохимического исследования, согласно которым в формировании адаптивных реакций в организме экспериментальных животных при 60-суточном сроке поступления в организм комплекса солей тяжелых металлов активно участвуют гормоны сетчатой зоны надпочечников – DHS. Результаты комплексных исследований указывают на ослабление секреторной активности клеток пучковой зоны надпочечников, что негативно влияет на развитие в организме компенсаторно-приспособительных процессов и ход общего адаптационного синдрома в ответ на действие повреждающего агента.

Ключевые слова: *кора надпочечников, тяжелые металлы, кортизол, дегидроэпиандростерона сульфат, Ki-67, адаптационный синдром.*

Об авторах:

Н.Б. Гринцова – Сумской государственный университет, медицинский институт, ул. Санаторная, 33, Сумы, Украина, 40018, natalia.gryntsova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-6713-7533>

А.М. Романюк – Сумской государственный университет, медицинский институт, ул. Санаторная, 33, Сумы, Украина, 40018, pathomorph@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2560-1382>

Н.С. Лындин – Сумской государственный университет, медицинский институт, ул. Санаторная, 33, Сумы, Украина, 40018, lyndin_nikolay@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-4385-3903>

Т.В. Рябенко – Сумской государственный университет, медицинский институт, ул. Санаторная, 33, Сумы, Украина, 40018, anatomy@med.sumdu.edu.ua, <http://orcid.org/0000-0003-2740-389X>

Представлено: I.I.Старченко / Presented by: I.I.Starchenko

Рецензент: Л.В.Коба / Reviewer: L.V.Koba

Подано до редакції / Received: 10.02.2020

••• ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ••• PLANT PHYSIOLOGY •••

УДК: 57.033.576.353.581.142:633.358.633.34

Вплив червоного світла (660 нм) на проліферативну активність та ростові реакції у проростків рослин з контрастною фотоперіодичною реакцією

О.О. Авксентьева, Є.Д. Батуєва

У роботі представлені результати дослідження впливу опромінення червоним світлом (660 нм) на проліферативну активність кореневих меристем та ростові реакції проростків рослин з контрастною фотоперіодичною реакцією. Як рослинний матеріал в роботі використовували представників родини Бобових (Fabaceae), контрастних за фотоперіодичною реакцією: довгоденні рослини (ДДР) гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Меценат та короткоденні рослини (КДР) сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Корсак. Активацію фітохромів проводили, опромінюючи надземну частину дослідних проростків монохроматичним червоним світлом (ЧС) 660 нм з використанням LED матриці по 30 хвилин протягом 5 діб. Проліферативну активність клітин меристем визначали за аналізом мітотичного індексу (MI). Ростову реакцію досліджували за показниками лінійного росту: загальною довжиною проростка, довжиною надземної частини та коренів та інтегральним показником ростових і біосинтетичних процесів – накопиченням біомаси. За результатами експериментів показано, що мітотична активність кореневих меристем під впливом опромінення червоним світлом надземної частини у проростках ДДР гороху Меценат незначно знижувалася – на 8 %, а у проростках КДР сої Корсак зростала істотно – на 47 %. Лінійний ріст і накопичення біомаси у надземній частині за дії опромінення ЧС у проростках гороху сорту Меценат і сої сорту Корсак зменшувалися, причому у сої цей ефект був виражений істотніше, ніж у гороху. За дії ЧС лінійний ріст коренів і накопичення ними біомаси у ДДР проростків гороху незначно знижувалися, у той же час ці процеси у коренях КДР проростків сої істотно стимулювалися. Під впливом ЧС у проростках гороху швидкість росту у довжину надземної частини не змінювалась, а коренів – зростала, у той же час як швидкість накопичення ними біомаси – знижувалася. У проростків сої за опромінення ЧС швидкість росту як надземної частини, так і коренів знижувалася, швидкість накопичення біомаси надземною частиною зростала, а коренями – знижувалася. ДДР гороху Меценат і КДР сої Корсак відрізняються за характером реакції ростових процесів у відповідь на опромінення ЧС. Активація системи фітохромів у надземній частині викликає зміни проліферативної активності та ростових процесів коренів, що може свідчити про системність відповіді рослинного організму на дію цього фактору. Обговорюється зв'язок фотоперіодичної реакції рослин з реалізацією фітохромного сигналіngu у рослинному організмі шляхом активації чи інгібування проліферативної активності кореневих меристем та ростових реакцій.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., *Glycine max* (L.) Merr., фітохромна система, червоне світло (660 нм), фотоперіодична реакція, мітотичний індекс, ростова реакція.

Про авторів:

О.О. Авксентьева – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

Є.Д. Батуєва – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, batuyeva96@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2532-7141>

Вступ

Проблема дослідження механізмів регуляції фотоморфогенезу рослин є актуальною в сучасній фітофізіології. Світло не тільки головне енергетичне джерело для фотосинтезу рослин, воно також є джерелом інформації для регулювання процесів фотоморфогенезу рослинного організму. Відомо, що рослини сприймають світловий сигнал за допомогою п'яти фоторецепторних систем: кріптохромів, фототропінів, F-бокс-білків, рецепторів UV-B світла, а також системи фітохромів, які є сенсорами червоного (ЧС) і далеко-червоного (ДЧС) світла (Войцеховская, 2019; Авксентьева и др., 2013; Quail, 2010). Інтеграція цих систем дозволяє рослинному організму отримувати інформацію про інтенсивність освітлення, його спектральний склад, тривалість світлового дня, а також навіть про температуру оточуючого середовища, присутність патогенів, сусідів-конкурентів та іншу інформацію (Войцеховская, 2019). Рослина, сприймаючи світло шляхом фоторецепції, синхронізує фактори довкілля з внутрішніми фізіолого-біохімічними процесами, що призводить до зміни перебігу процесів росту та розвитку рослин.

Головним фоторецепторним комплексом рослин є система фітохромів (Синецкоков, 2013). На сьогодні досить детально досліджені фізико-хімічні властивості фітохромів (Quail, 2010),

встановлені структура молекул та механізми їх фотоконверсії (Кулаєва, 2001), виявлені різні форми фітохромів – Phy A-E (Franklin, Quail, 2010), їх локалізація в клітині, перебіг біосинтезу та подвійний генетичний контроль (Федоренко, Савушкін, 2006), основні молекулярні механізми трансдукції фітохромного сигналу (Смирнова і др., 2012; Casal, 2013; Franklin, Whitelam, 2005a) та його інтеграція з фітогормональним та стресовим сигналігом (Wang, Wang, 2015).

Фітохромна система контролює практично весь хід індивідуального розвитку рослин – від проростання насіння до зацвітання і плодоносіння (Kami et al., 2010). На клітинному рівні фітохромному контролю підлягають такі процеси, як транспорт речовин через плазматичну мембрану, інтенсивність руху протоплазми і окремих органел рослинних клітин, утворення різних форм РНК, кількість і фракційний склад гістонів, регуляція активності деяких ферментів, синтез хлорофілу та ін. (Синецеків, 2013; Parks, 2003). На організменному рівні досліджено так звані пролонговані ефекти фітохромів – регуляцію процесів фотосинтезу (Franklin, Whitelam, 2005b), вмісту асимілятів, біологічно активних речовин, перехід до цвітіння, спокою (Osugi et al., 2011), продуктивність рослин та ін.

Відомо, що фітохроми локалізуються практично у всіх рослинних тканинах, включаючи проростки, листки однодольних і дводольних рослин, коріння, сім'ядолі, плоди, насіння і т. д. Однак показано, що різні органи рослин концентрують різні форми фітохромів. Максимальним вмістом фітохромів А – самої нестабільної форми – характеризуються клітини меристем етіологованих проростків, в зелених органах рослин та органах, що зростають за інтенсивного освітлення, – основним є фітохром В (Кулаєва, 2001). Різноманітність (іноді протилежність) ефектів фітохромного сигналігу проявляється у рослин різних систематичних груп – одно- та дводольних; рослин, що ростуть за різних умов освітлення – тіньлюбних та світлолюбних; рослин з різною будовою насіння – дрібнонасінних та крупнонасінних (з великим запасом поживних речовин).

Трансдукція фотоперіодичного сигналу в рослинному організмі також здійснюється за участю фітохромів, які координують циркадну ритміку рослини і регулюють процес переходу до цвітіння (Феденко і др., 1999; Тоцький та ін., 2012; Osugi et al., 2011). Крім того, відомо, що у природних умовах ефекти фітохромів реалізуються через сприйняття ними певного співвідношення ЧС/ДЧС у спектрі сонячних променів (Casal, 2013; Franklin, Whitelam, 2005b). Це співвідношення закономірно змінюється протягом доби – від сходу до заходу сонця. Тобто ефекти активації фітохромів на темпи розвитку рослин, як короткоденних так і довгоденних, за природного дня залежать від співвідношення ЧС/ДЧС.

Більшість досліджень фітохромних ефектів проводились, в основному, на модельному об'єкті *Arabidopsis thaliana* (Войцеховская, 2019; Franklin, Whitelam, 2005a,b) або на інших рослинах без урахування їх фотоперіодичної реакції, що не дозволяє зробити висновки про роль фотоперіодичної реакції рослин у ефектах впливу ЧС на процеси фотоморфогенезу.

Відомо, що фітохроми проявляють істотні ефекти на морфогенез рослин, який здійснюється за рахунок поділу клітин меристем. Проліферативна активність тканин рослин визначається цілою низкою чинників – кількістю меристематичних клітин, тривалістю підготовки і протікання мітозу, рівнем синтезу ферментів, які беруть участь в реплікації, наявності сигнальних молекул, які запускають поділ та ін. (Іванов, 2011; Singh, 2016). Мітотичний індекс дозволяє оцінити рівень проліферативної активності клітинної популяції щодо впливу різноманітних факторів на ці процеси (Дмитрієва і др., 2006). Однак питання впливу активації фітохромів на проліферативні процеси рослин є мало дослідженими.

Метою роботи було дослідження ефектів активації системи фітохромів монохроматичним червоним світлом на проліферативну активність клітин кореневої меристеми та ростові процеси проростків бобових рослин, контрастних за фотоперіодичною реакцією.

Матеріали та методи дослідження

Для досягнення мети дослідження був використаний наступний методологічний підхід. Рослина реагує як система на дію будь-якого зовнішнього чинника. Виходячи з цього, фітохромну систему активували, опромінюючи червоним світлом (660 нм) надземну частину проростків, припускаючи, що фітохромний сигнал може трансдукуватися в корені. Фотоперіодична реакція рослин є однією з головних пристосувальних властивостей, яка, зокрема, реалізується і за рахунок фітохромної регуляції їх росту і розвитку, тому як модель у досліджах були обрані рослини з контрастною фотоперіодичною реакцією.

Рослинний матеріал. Як рослинний матеріал в роботі використовували представників родини Бобових (Fabaceae), контрастні за фотоперіодичною реакцією: доведенні рослини (ДДР) гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Меценат та короткоденні рослини (КДР) сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Корсак. Досліджені сорти внесені до Державного реєстру сортів рослин України. Насіння для досліджень було надано співробітниками Інституту рослинництва імені В.Я.Юр'єва НААНУ.

Дизайн дослідження. Насіння дослідних рослин поетапно стерилізували у 15%-ному розчині гіпохлориду натрію (15 хвилин) та 70%-ному етанолі (1 хвилину) та пророщували у зволоженому фільтрувальному папері рулонним методом в термостаті за температури 24°C протягом 3-х діб. Після цього етіольовані паростки переносили у люміністат та культивували за умов освітлення 2–5 клк та температури 22–23°C. Активацію фітохромної системи проводили за раніше розробленим протоколом (Авксентьева и др., 2013), опромінюючи дослідні рослини 30 хвилин монохроматичним червоним світлом (660 нм) за допомогою LED матриці протягом 5 діб. Контрольні рослини культивували за тих самих умов, але не проводячи фітохромну активацію селективним світлом. Відбір проб для аналізу проліферативної активності та вимірювання ростової реакції проводили на 6-ту, 7-ту та 8-ту добу, для того щоб ефекти активації фітохромів та міжорганного сигналіngu в проростках встигли проявитися.

Проліферативна активність кореневих меристем. Інтенсивність поділу клітин кореневої меристеми визначали, аналізуючи мітотичний індекс (MI) за стандартною методикою (Барыкина и др., 2004). Фіксацію рослинного матеріалу – головного кореня проростків проводили у фіксаторі Кларка (96 % етиловий спирт : крижана оцтова кислота (3 : 1)) протягом 24 годин за температури 0–3°C. Надалі проводили забарвлення ацетокарміном методом гарячого гідролізу і готували давлені тимчасові мікропрепарати за стандартною методикою (Барыкина и др., 2004). Препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопа Микромед XS-2610 при збільшенні $\times 400$, у кожному препараті проглядали не менш 5 полів зору у двох діагоналях, для кожного варіанту було проаналізовано не менше 600 клітин. Мітотичний індекс (MI) розраховували як відношення клітин, які перебували у мета-, ана- і телофазі мітозу, до загальної кількості клітин у полі зору (Барыкина и др., 2004).

Аналіз ростової реакції. Ростову реакцію аналізували за показниками лінійного росту, вимірюючи загальну довжину проростка, довжину надземної частини та коренів, та інтегральним показником ростових і біосинтетичних процесів – накопиченням біомаси проростком та його частинами. Вимірювання проводили, аналізуючи в кожному варіанті по 10–15 проростків. Швидкість ростових процесів у надземній та підземній частині проростків розраховували як відношення приросту показників лінійного росту та накопичення біомаси до тривалості експерименту.

Статистичний аналіз. Всього проведено 3 біологічні серії експериментів, статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою пакету програми Statistica 5.0. Істотність відмінностей між контрольними та дослідними варіантами визначали з використанням *t*-критерія Стьюдента за $p \leq 0,05$ (Атраментова, Утевская, 2008). В таблицях та на графіках наведені середні значення та їх стандартні похибки.

Результати та обговорення

Відомо, що в основі активації процесів росту рослинного організму на органічному рівні лежить стимуляція процесів клітинного росту, частиною якого є мітотична активність меристеми (Іванов, 2011). Зона росту коренів рослин складається з двох зон – власне меристеми, де клітини безпосередньо діляться, і зони розтягування, де клітини інтенсивно ростуть, здійснюючи специфічний тип росту «розтягуванням», характерний для рослинного організму. Незважаючи на значні розміри кореневої системи рослин, зростання кореня здійснюється саме в зоні росту, яка не перевищує одного сантиметра. Мітози – клітинні поділи – зосереджені тільки в апікальній меристематичній зоні – зоні проліферативної активності. Проліферативна активність клітин кореня тісно пов'язана з реакцією рослин на зміни навколишнього середовища, в тому числі й опромінювання селективним світлом. Будь-який неспецифічний вплив оточуючого середовища може привести до певних порушень життєдіяльності клітин, які відображаються таким показником, як мітотичний індекс (MI) (Дмитриева и др., 2006).

За результатами нашого дослідження, у ДДР гороху посівного сорту Меценат протягом досліджуваного періоду спостерігалось поступове збільшення MI (рис. 1А) з 10,3 % на 6-ту добу до 12,7 % на 8-му добу експерименту, що свідчить про активацію проліферативної активності клітин

кореневих меристем в даний онтогенетичний період. Під впливом опромінення ЧС на 6-ту та 7-му добу досліді зміни МІ в рослинах дослідного варіанту були несуттєві, а зменшення проліферативної активності клітин, порівняно з контролем, відбувалося тільки наприкінці експерименту (рис. 1А), що може свідчити про досить низьку чутливість корневих меристем довгоденної рослини гороху або якісь перешкоди на шляху трансдукції сигналу з надземної частини проростку до коренів. В цілому наприкінці експерименту спостерігалось уповільнення проліферативної активності (МІ) клітин корневих меристем за дії ЧС на 8 % відносно до контрольних рослин та зниження інтенсивності цього процесу протягом досліджуваного онтогенетичного періоду.

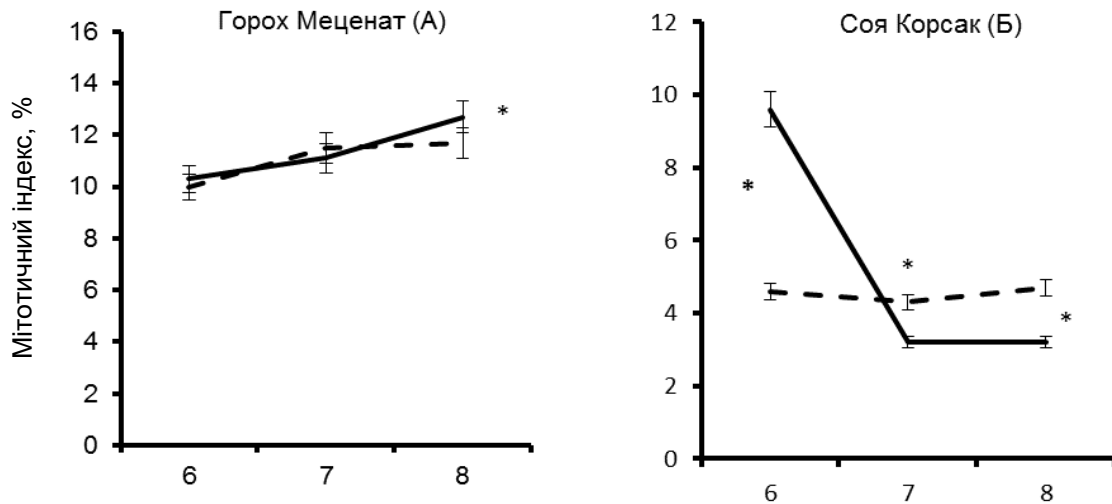


Рис. 1. Вплив опромінення червоним світлом на інтенсивність поділу клітин у апікальних меристемах коренів гороху Меценат (А) і сої Корсак (Б). Контроль — , опромінення ЧС . - - -

Примітка: * – різниця з контролем істотна при $p \leq 0,05$.

В апікальних меристемах головного кореня довгоденної рослини гороху сорту Меценат на 6–8 добу, як у контрольних, так і у дослідних проростках МІ був досить високим – 10,0–12,7 %, що свідчить про високу інтенсивність проліферації, тобто про значну кількість клітин, які заходилися на мета-, ана-, телофазах мітотичного циклу. У проростків КДР сорту Корсак МІ був значно нижчим, у порівнянні з МІ у довгоденної рослини, – 3,2–9,6 %, що, можливо, обумовлено генотиповими особливостями. Крім цього, у проростків сої спостерігалась значно менша кількість клітин, що знаходилися на різних фазах мітозу.

Протягом досліджуваного онтогенетичного періоду спостерігалось різке гальмування проліферативної активності меристематичних клітин апексу коренів у контрольних проростків сої сорту Корсак – на 6-ту добу показник МІ становив 9,6 %, а на 7-му – втричі менше – 3,2 %, на 8-му залишався на тому ж рівні – 3,2 % (рис. 1Б). Можливо, це пов'язане з періодичністю змін у інтенсивності мітотичного поділу клітин, яка характерна для рослин. Оскільки фіксацію матеріалу для аналізів проводили одночасно у контрольному і дослідному варіанті, але у дослідному варіанті не виявлено такого зниження МІ, то, вірогідно, що ЧС може викликати зміни у ритміці поділу клітин. Такі зміни за дії зовнішніх чинників можуть відбуватися за впливу, зокрема при модуляції циклу інозитом (Дмитриєва и др., 2006) та іншими екзогенними впливами. За активації фітохромної системи – опромінення ЧС (660 нм) змін протягом періоду досліді не відбувалося – МІ коливався в межах 4,3–4,7 %, тобто різкого гальмування проліферативної активності меристем не спостерігалось, можливо, це падіння відбулося раніше, тобто ще до початку вимірювань. Зниження МІ клітин досліджуваних рослин у порівнянні з контролем може свідчити про мітозомодифікуючу дію ЧС, у той час коли збільшення МІ може бути обумовлено збільшенням кількості клітин на різних стадіях мітозу або затримкою проходження клітинами мітотичних фаз через порушення структури хромосом (Singh, 2016). В цілому, на момент завершення експерименту МІ в опроміненіх проростках був на 32 %

вищим за показники MI в контрольних проростках короткоденної рослини сої сорту Корсак. Протягом експерименту в контрольних проростках спостерігалось значне падіння MI, в той час в дослідних – майже не відбувалось змін (рис. 1Б).

Отже, за реакцією проліферативної активності апікальних меристем у довгоденної та короткоденної рослини виявлені суттєві розбіжності: проростки довгоденної рослини гороху незначно знижують мітотичну активність за дії опромінення ЧС, а проростки короткоденної рослини, навпаки, суттєво її збільшують. Можливо, що фотоперіодична реакція рослин, яка є генетично детермінованою ознакою, може опосередковано впливати на трансдукцію фітохромного сигналу через зміни в проліферативній активності меристем. В наших попередніх дослідженнях було показано, що система генів *PPD*, яка детермінує фотоперіодичну чутливість пшениці м'якої, впливає на показники MI у корневих меристемах проростків ізогенних ліній. Лінії з довгоденною фотоперіодичною реакцією характеризувались більшими показниками MI в порівнянні з ізолініями з фотоперіодично нейтральною реакцією (Авксентьева и др., 2014).

Оскільки проліферативна активність меристем визначає процеси росту та розвитку (морфогенезу) рослин, було також досліджено вплив активації фітохромів на ростову реакцію проростків. Відомо, що ростова реакція рослинного організму на дію зовнішніх чинників проявляється у зміні лінійного росту органів. Вона також визначається і таким інтегральним показником, як накопичення структурної біомаси органу, що відображає інтенсивність біосинтетичних процесів у рослині (Іванов, 2011). Виходячи з цього, нами визначено дію червоного світла на динаміку лінійного росту надземної частини і коренів та динаміку їх біомаси. Виявлено загальну закономірність у протіканні ростових процесів у обох видів досліджених рослин, яка не залежала від варіанту досліду і їх фотоперіодичної реакції. У контрольному і у дослідному варіантах протягом досліду відбувалося поступове збільшення лінійного росту і наростання структурної біомаси рослин як надземної частини, так і коренів, що свідчить про нормальний хід росту і розвитку рослин.

Аналіз результатів визначення динаміки лінійного росту надземної частини проростків довгоденної рослини гороху Меценат показав (рис. 2А), що у рослин 6-денного віку, які вже опромінювалися червоним світлом протягом 3 діб, її довжина була меншою, ніж у контролі. Протягом наступної доби ріст надземної частини за впливу червоного світла істотно посилювався. При цьому її довжина була майже такою, як і у неопромінених рослин. Надалі – до 8-мої доби досліду – ріст надземної частини рослин у довжину гальмувався, про що свідчить менша її довжина, порівняно до контролю.

Отже, одержані дані свідчать про двофазний характер динаміки лінійного росту надземної частини довгоденної культури гороху Меценат під впливом опромінення червоним світлом – перша фаза характеризується інтенсифікацією, а друга його гальмуванням. При цьому показники довжини надземної частини за дії червоного світла були нижчими, ніж у контролі.

Визначення динаміки накопичення біомаси надземною частиною рослин гороху Меценат показало (рис. 2А), що за впливу триденного опромінення червоним світлом (рослини 6-денного віку) вона була дещо вищою, ніж у неопромінених рослин. Через добу біомаса за впливу червоного світла була такою ж, як і в контролі, а ще через добу – нижчою, порівняно до маси у неопромінених рослин. Таким чином, опромінення рослин гороху Меценат червоним світлом поступово (лінійно) гальмувало біосинтетичні процеси у надземній частині, порівняно до контролю.

Результати визначення динаміки лінійного росту надземної частини сої показали (рис. 2Б), що через три доби після опромінення червоним світлом (рослини 6-денного віку) довжина надземної частини була істотно меншою, ніж її довжина у неопромінених рослин. У рослин 7-денного віку – інтенсивність лінійного росту надземної частини за опромінення червоним світлом зростала, та її довжина ставала майже такою, як і в контрольному варіанті. У рослин 8-денного віку – лінійний ріст надземної частини за опромінення істотно гальмувався, порівняно до росту у неопромінених рослин. Загалом, показники довжини надземної частини за впливу червоного світла були меншими за показники у контролі.

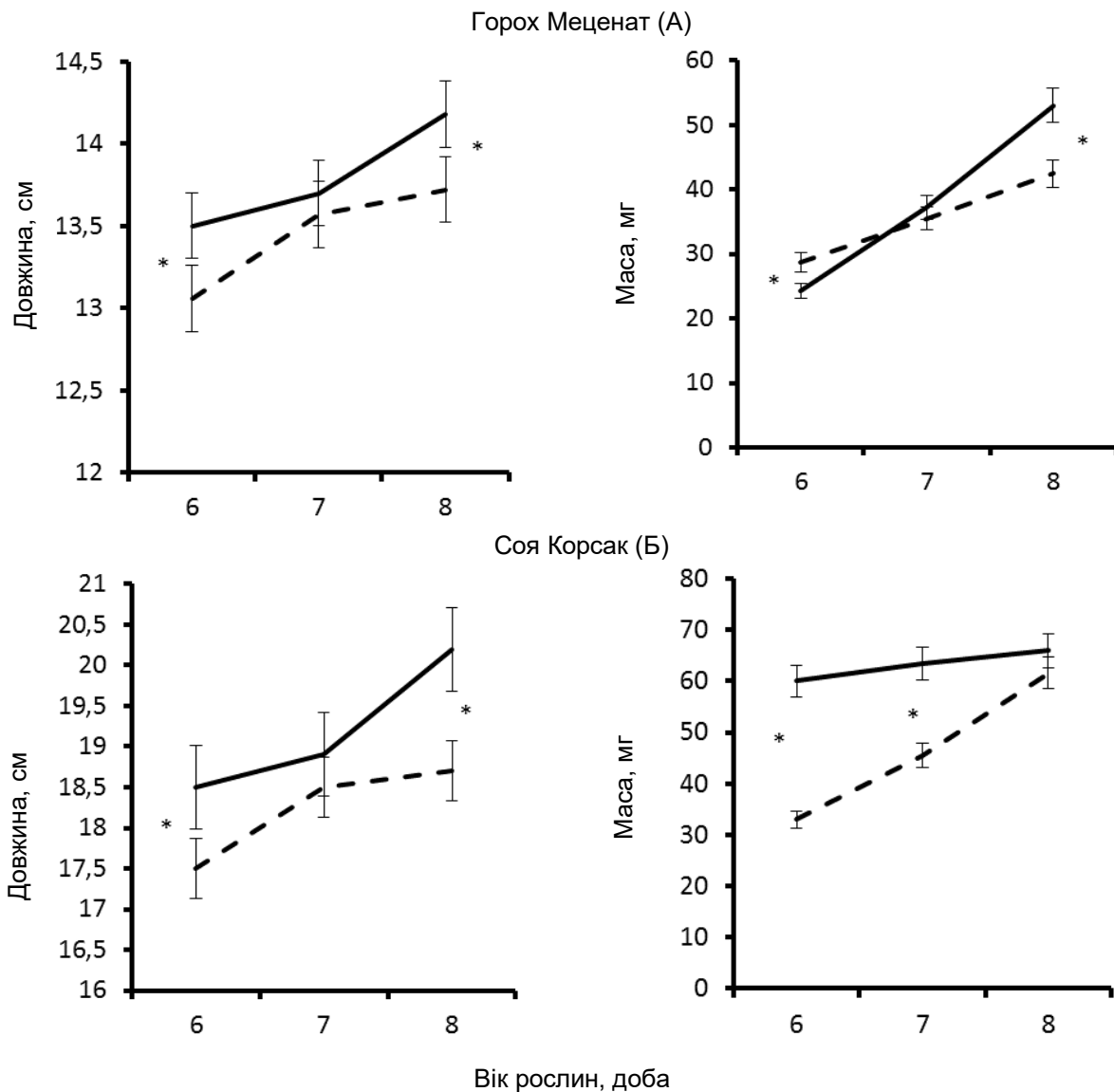


Рис. 2. Вплив опромінення червоним світлом на ростову реакцію надземної частини проростків гороху Меценат (А) і сої Корсак (Б). Контроль, — опромінення ЧС - - - -
Примітка: * – різниця з контролем істотна при $p \leq 0,05$.

Щодо динаміки накопичення структурної біомаси надземної частини за дії червоного світла, то результати показали (рис. 2Б), що на третю добу опромінення (6-денні рослини) вона була майже у два рази нижчою, ніж біомаса контрольних рослин. Протягом наступних двох діб (7- і 8-денні рослини) під впливом опромінення червоним світлом біомаса надземної частини інтенсивно зростала і після закінчення дослідів була такою ж, як і біомаса неопромінених рослин. Аналіз одержаних даних свідчить, що опромінення червоним світлом обумовлювало зниження абсолютних значень показників довжини і біомаси надземної частини. Однак при цьому відбувалася інтенсифікація лінійного росту і, особливо, накопичення біомаси надземної частини у короткоденної рослини сої.

З літератури відомо, що за низької інтенсивності опромінення червоним світлом у вегетативних органах (надземній частині у наших дослідів) активується Rhy В, який задіяний у регуляції низки фізіолого-біохімічних процесів і, зокрема, росту (Casal, 2013; Franklin, Whitelam, 2005b). У підземній частині (коренях) за такої дії активується Rhy А, який бере участь у регуляції ростових процесів (Синецеків, 2013). Показано також, що різні види рослин по-різному реагують

на активацію цих фітохромів червоним світлом слабкої інтенсивності на рівні зміни морфогенетичних процесів у надземній частині і коренях (Кулаєва, 2001). З цієї точки зору для поглиблення існуючих уявлень щодо фітохромної регуляції морфогенетичних процесів у рослин різних видів з різною фотоперіодичною реакцією доцільним було вивчення ростової реакції не тільки надземної, а й підземної частини за впливу червоного світла.

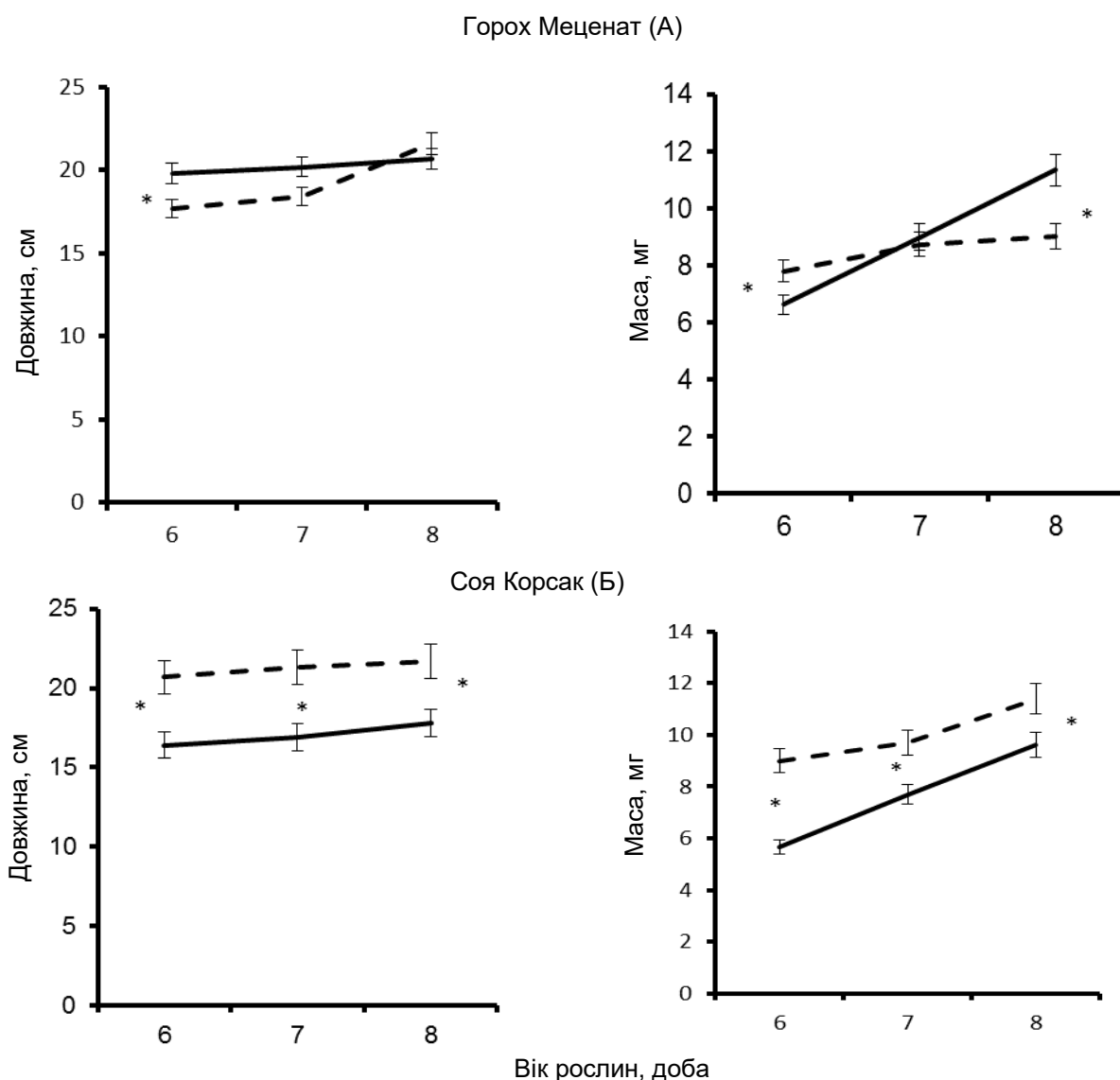


Рис. 3. Вплив опромінення червоним світлом на ростову реакцію підземної частини проростків гороху Меценат (А) і сої Корсак (Б). Контроль —————, опромінення ЧС - - - -
Примітка: * – різниця з контролем істотна при $p \leq 0,05$.

Нами проведено дослідження лінійного росту і біомаси підземної частини (коренів) довгоденної рослини гороху Меценат і короткоденної рослини сої Корсак за впливу опромінення червоним світлом надземної частини. При цьому ми припускали, що активація Rhy В у надземній частині може викликати трансдукцію певних інформаційних сигналів, які, в свою чергу, можуть впливати на зміну регуляції ростових процесів у кореневій системі. Результати визначення динаміки лінійного росту коренів гороху показали (рис. 3А), що за впливу триденного опромінення, що передувало визначенню довжини кореня, у 6-денних рослин вона була меншою, ніж у контролі. Через добу вона також була меншою, а після закінчення дослідження, на 8-му добу ставала такою ж, як і

в контрольному варіанті. Динаміка накопичення біомаси коренями гороху за дії червоного світла була наступною. У 6-добових рослин після попереднього опромінення протягом трьох діб біомаса кореня була дещо вищою, ніж у контролі. Надалі, протягом наступних двох діб досліду, вона знижувалася порівняно з контролем і в кінці досліду була істотно нижчою, ніж у неопромінених рослин (рис. 3А).

Досліди із соєю сорту Корсак показали, що лінійний ріст кореня істотно залежить від опромінення червоним світлом (рис. 3Б). Протягом всього досліду під впливом червоного світла довжина кореня поступово зростала і була значно більшою, ніж у неопромінених рослин. Динаміка біомаси кореня у сої також істотно залежала від опромінення червоним світлом (рис. 3Б). Так, після трьох діб опромінення (6-денні рослини) маса кореня була значно вищою, порівняно з масою у контролі. Надалі, за дії червоного світла відбувалося її зростання у рослин 7- і 8-денного віку при значно вищому рівні відносно маси контрольних рослин.

Таким чином, у ДДР гороху Меценат опромінення червоним світлом надземної частини викликало незначне зниження лінійного росту і накопичення біомаси коренями. В той же час у КДР сої Корсак за опромінення червоним світлом надземної частини істотно зростала інтенсивність лінійного росту кореня і накопичення його біомаси. Отже, рослини з контрастною фотоперіодичною реакцією до певної міри відрізнялися за ростовою реакцією коренів на опромінення червоним світлом надземної частини. Можливо, що це може бути пов'язаним з відмінностями між довгоденними і короткоденними рослинами за характером та інтенсивністю метаболічних та фітогормональних процесів.

Таблиця.

Швидкість лінійного росту і накопичення біомаси проростками рослин, контрастних за фотоперіодичною реакцією

Варіант	Надземна частина		Корені	
	Швидкість лінійного росту і накопичення біомаси			
	Ріст, см/доба	Біомаса, мг/доба	Ріст, см/доба	Біомаса, мг/доба
Горох сорт Меценат (ДДР)				
Контроль	0,23	9,57	0,32	1,57
Опромінення ЧС	0,22	4,60*	1,30*	0,41*
Соя сорт Корсак (КДР)				
Контроль	0,58	2,00	0,45	1,31
Опромінення ЧС	0,39*	9,53*	0,35*	0,80*

Примітка: * – різниця з контролем істотна при $p \leq 0,05$.

Зіставлення одержаних нами результатів і даних літератури (Casal, 2013; Wang, Wang, 2015) дає підставу припустити, що активація Rhu B у надземній частині (вегетативних органах) може виступати у якості сигналу, котрий здатен запускати механізми, пов'язані з регуляцією ростових процесів у кореневій системі. Літературні дані свідчать, що у якості такого сигналу, який виникає за активації Rhu B у листках і трансдукується до коренів, можуть виступати фітогормони, зокрема ауксини і цитокиніни (Творогова и др., 2012). Як відомо, ці фітогормони задіяні у регуляції ростових процесів – цитокиніни забезпечують регуляцію інтенсивності поділу клітин, в той час як ауксини – ріст «розтягненням» (Іванов, 2011). Показано, що активація системи фітохромів пов'язана з гормональним сигналінгом у рослин (Wang, Wang, 2015).

Не виключено також, що фітохромна регуляція ростових процесів може здійснюватися за рахунок зміни інтенсивності і характеру метаболічних процесів під впливом активних форм фітохромів. Зокрема показано, що активація фітохромів викликає зміни в інтенсивності обміну вуглеводів, які посилюють ростові процеси (Щоголев, Жмурко, 2015). У результаті цього може змінюватися рівень забезпечення процесів росту пластичним та енергетичним матеріалом, від якого може залежати його прискорення або гальмування.

Виявлена нами протилежна спрямованість ростової реакції надземної частини і коренів у відповідь на дію червоного світла в обох досліджуваних рослин, вірогідно, пов'язана з тим, що у вегетативних органах (у наших дослідах надземна частина проростка), які піддавалися впливу

червоного світла, переважає функціонування Rhy B, в той час як у коренях – основної серед форм фітохромів – фототабільного Rhy A (Войцеховская, 2019).

Вагомим показником інтенсивності протікання ростових процесів є накопичення структурної біомаси за одиницю часу, який відображує «продуктивність» біосинтетичних процесів. З цієї точки зору доцільним було визначення цього показника для лінійного росту і накопичення біомаси надземною частиною і коренями досліджуваних рослин за дії червоного світла. Розрахунки показали, що під впливом опромінення червоним світлом у ДДР гороху Меценат швидкість лінійного росту надземної частини практично не змінювалася, а накопичення біомаси знижувалася приблизно удвічі (табл.). Швидкість лінійного росту коренів у цієї рослини за впливу червоного світла зростала майже в чотири рази, в той час як накопичення біомаси, навпаки, знижувалася майже втричі (табл.). У КДР сої Корсак за опромінення червоним світлом швидкість лінійного росту надземної частини знижувалася вдвічі, а накопичення біомаси, навпаки, зростало приблизно в чотири рази (табл.). Щодо швидкості лінійного росту коренів і накопичення біомаси у цієї рослини, то вона істотно знижувалася за впливу червоного світла (табл.). Таким чином, опромінення червоним світлом, за одним винятком, істотно впливало на швидкість ростових процесів як у надземній частині, так і у коренях обох досліджуваних рослин.

При цьому швидкість ростових процесів у надземній частині за дії червоного світла у гороху і сої була різноспрямованою. Те ж саме проявлялося і у зміні швидкості лінійного росту коренів, але зміна швидкості накопичення біомаси коренями була у обох рослин односпрямованою.

Узагальнення

Аналіз власних результатів та літературних даних дозволяє висловити попередні узагальнення щодо ефектів активації системи фітохромів на ростові процеси у рослин з контрастною фотоперіодичною реакцією. Одержані результати свідчать, що довгоденна рослина горох, сорт Меценат і короткоденна рослина соя, сорт Корсак відрізняються за характером проліферативної активності кореневих меристем та ростової реакції як надземної частини, так і коренів у відповідь на активацію системи фітохромів червоним світлом (660 нм). З літератури відомо, що система фітохромів грає вагомий роль у сприйнятті фотоперіодичного сигналу, ефект якого на ріст і розвиток по-різному реалізується у довгоденних та короткоденних рослин. Тому, можливо, що ці рослини різняться за складом фітохромів і, відповідно, за характером реакції на їх активацію. Оскільки у наших дослідках активація фітохромів відбувалася у надземній частині рослин, а зміни у характері проліферативної активності та ростових процесів проявлялися у коренях, то вірогідно, що вони могли бути викликані трансдукцією фітохромного сигналу до кореневої системи. Вірогідно, що цей сигнал реалізується за рахунок зв'язку фітогормонального та фітохромного сигналіну. У ньому може бути задіяний фітогормон ауксин, який, як відомо, є провідним у регуляції ростових процесів та полярно транспортується з надземної частини до коренів рослин.

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Дослідження молекулярно-генетичних та фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного та фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин in vivo та in vitro» № Держреєстрації 0118U 002104.

Список літератури / References

- Авксентьева О.А., Жмурко В.В., Петренко В.А. и др. (2013). Фитохромная и криптохромная регуляция фотоморфогенеза в культуре *in vitro*. *Известия академии наук Молдовы. Науки о жизни*, 3(321), 72–78. [Avksentieva O.A., Zhmurko V.V., Petrenko V.A. et al. (2013). Phytochrome and cryptochrome regulation of photomorphogenesis *in vitro* culture. *News of the Academy of Sciences of Moldova. Life sciences*, 3(321), 72–78.]
- Авксентьева О.А., Москалев В.Б., Ковалёв В.В. (2014). Пролиферативная активность меристем и рост корней изогенных по генам *PPD* линий пшеницы / The 1st International Academic Conference “Science and Education in Australia, America and Eurasia: Fundamental and Applied Science”: papers and commentaries. Melbourne IADCES Press. Vol.1, pp. 585–588. [Avksentieva O.A., Moskalev V.B., Kovalev V.V. (2014). Proliferative activity of meristems and root growth of wheat line *PPD* isogenic genes. *The 1st International Academic Conference “Science and Education in Australia, America and Eurasia: Fundamental and Applied Science”*: papers and commentaries. Melbourne IADCES Press. Vol.1, pp. 585–588.]

- Атраментова Л.А., Утевская О.М. (2008). Статистические методы в биологии. Горловка: Ліхтар. 248 с. [Atramentova L.A., Utevskaia O.M. (2008). *Statistical methods in biology*. Gorlovka: Likhtar. 248 p.]
- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. (2004). Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ. 312 с. [Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G. et al. (2004). *Handbook for botanical microtechnology. Principles and methods*. Moscow: Publishing House of MSU. 312 p.]
- Войцеховская О.В. (2019). Фитохромы и другие (фото)рецепторы информации у растений. *Физиология растений*, 66(3), 163–177. [Voitsekhovskaja O.V. (2019). Phytochromes and other (photo)receptors of information in plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 66, 351–364. <https://doi.org/10.1134/S1021443719030154>]
- Дмитриева С.А., Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. (2006). Митотический индекс меристематических клеток и рост корней *Pisum sativum* зависит от модуляторов цикла инозита. *Цитология*, 48(6), 475–479. [Dmitrieva S.A., Minibaeva F.V., Gordon L.K. (2006). Mitotic index of meristematic cells and root growth of *Pisum sativum* is affected by inositol cycle modulators. *Tsitologija*, 48(6), 475–479.]
- Иванов В.Б. (2011). Клеточные механизмы роста растений. М.: Наука. 104 с. [Ivanov V.B. (2011). *Cellular mechanisms of plant growth*. Moscow: Nauka. 104 p.]
- Кулаева О.Н. (2001). Как свет регулирует жизнь растений. *Соросовский образовательный журнал*, 7, 6–12. [Kulayeva O.N. (2001). How light regulates plant life. *Soros Educational Journal*, 7, 6–12.]
- Синешчиков В.А. (2013). Фитохром А: полиморфизм и функциональность. Москва: Научный мир. 162 с. [Sineshchikov V.A. (2013). *Phytochrome A: polymorphism and functionality*. Moscow: Scientific World. 162 p.]
- Смирнова О.Г., Степаненко И.Л., Шумный В.К. (2012). Механизм действия и регуляция активности конститутивного репрессора фотоморфогенеза COP1. *Физиология растений*, 59(2), 179–191. [Smirnova O.G., Stepanenko I.L., Shumny V.K. (2012). Mechanism of action and activity regulation of COP1, a constitutive repressor of photomorphogenesis. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 59, 155–166. <https://doi.org/10.1134/S102144371202015X>]
- Творогова В.Е., Осипова М.А., Додуева И.Е., Лутова Л.А. (2012). Взаимодействие транскрипционных факторов и фитогормонов в регуляции активности меристем у растений. *Экологическая генетика*, 10(3), 28–40. [Tvorogova V.Ye., Osipova M.A., Dodueva I.Ye., Lutova L.A. (2012). The interaction of transcription factors and phytohormones in the regulation of the activity of meristems in plants. *Ecological Genetics*, 10(3), 28–40.]
- Тоцький В.М., Дьяченко Л.Ф., Мутерко О.Ф. та ін. (2012). Генетична детермінація та функція RR-білків – регуляторів фотоперіодичних реакцій і циркадних ритмів у рослин. *Цитология и генетика*, 46(5), 72–91. [Totskii V.M., Dyachenko L.F., Muterko O.F. et al. (2012). Genetic determination and function of RR proteins, regulators of photoperiodic reactions, and circadian rhythms in plants. *Cytol. Genet.*, 46, 319–334. <https://doi.org/10.3103/S009545271205009X>]
- Феденко Е.П., Агамалова С.Р., Кокшарова Т.А. (1999). Передача фитохромного сигнала и фотопериодизм. *Успехи современной биологии*, 119(1), 56–69. [Fedenko E.P., Agamalova S.R., Koksharova T.A. (1999). Transmission of the phytochrome signal and photoperiodism. *Usp. Sovrem. Biol.*, 119(1), 56–69.]
- Федоренко О.М., Савушкин А.И. (2006). Генетические аспекты фитохромной регуляции процессов фотоморфогенеза у высших растений. *Успехи современной биологии*, 126(2), 201–212. [Fedorenko O.M., Savushkin A.I. (2006). Genetic aspects of phytochrome regulation of photomorphogenesis processes in higher plants. *Usp. Sovrem. Biol.*, 126(2), 201–212.]
- Щоголев А.С., Жмурко В.В. (2015). Ростові процеси томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) незахищеного ґрунту за регуляції активності фітохромів у розсаді. *Физиология растений и генетика*, 47(3), 260–267. [Schogolev A.S., Zhmurko V.V. (2015). Growth of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in field upon regulation of phytochrome activity in seedlings. *Plant Physiology and Genetics*, 47(3), 208–215.]
- Casal J.J. (2013). Photoreceptor signaling networks in plant response to shade. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64, 403–427. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>
- Franklin K.A., Quail P.H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J. Exp. Botany*, 61, 11–24. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp304>
- Franklin K.A., Whitelam G.C. (2005a). The signal transducing photoreceptors of plants. *Int. J. Dev. Biol.*, 49, 653–664. <https://doi.org/10.1387/ijdb.051989f>
- Franklin K.A., Whitelam G.C. (2005b). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann Bot.*, 96(2), 169–175. <https://doi.org/10.1093/aob/mci165>

- Kami C., Lorrain S., Hornittshek P., Fankhauser C. (2010). Light-regulation plant growth and development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 91, 29–66. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91002-8)
- Osugi A., Itoh H., Ikeda-Kawakatsu K. et al. (2011). Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiology*, 157, 1128–1137. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181792>
- Parks B.M. (2003). The red side of photomorphogenesis. *Plant Physiology*, 133, 1437–1444. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029702>
- Quail P.H. (2010). Phytochromes. *Current Biology*, 20(12), R504–R507. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.014>
- Singh R.J. (2016). *Plant cytogenetics*. CRC PRESS. 528 p.
- Wang H., Wang H. (2015). Phytochrome signaling: time to tighten up the loose ends. *Molecular Plant*, 8, 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.021>

The effect of red light (660 nm) on proliferative activity and growth reactions in seedlings of plants with contrast photoperiodic reaction

O.A. Avksentieva, E.D. Batueva

The results of a study of the effect of red light irradiation (660 nm) on the proliferative activity of root meristems and growth reactions of plant seedlings with contrast photoperiodic reactions are presented in this paper. Plants of the family Fabaceae contrasting in the photoperiodic reaction were used as plant material: long-day plants (LDP) of peas (*Pisum sativum* L.) of the Metsenat variety and short-day plants (SDP) of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) of the Korsak variety. Phytochromes were activated by irradiating the aerial part of the experimental seedlings with monochromatic red light (RL) of 660 nm using an LED matrix for 30 minutes for 5 days. The proliferative activity of meristem cells was determined by analysis of the mitotic index (MI). The growth reaction was studied by linear growth indicators: the total length of the seedling, the length of the aerial part and roots, and the integral indicator of growth and biosynthetic processes – the accumulation of biomass. According to the results of the experiments, it was shown that the mitotic activity of root meristems under the influence of red light on the aerial part in seedlings of the LDP of pea Metsenat decreased slightly – by 8 %, and in the seedlings of the SDP of soybean Korsak increased significantly – by 47 %. The linear growth and accumulation of biomass in the aerial part under the action of RL irradiation in seedlings of pea of the Metsenat variety and soybean of the Korsak variety decreased, and this effect was more pronounced in soybean than in pea. During irradiation of RL the linear root growth and their biomass accumulation in seedlings of LDP pea decreased slightly, while at the same time, these processes in the roots of soybean SDP seedlings were significantly stimulated. Under the influence of RL in pea seedlings, the growth rate did not change in the length of the aerial part, but in the roots increased, while the rate of biomass accumulation by them decreased. In soybean seedlings during RL irradiation, the growth rate of both the aerial part and the roots decreased, the biomass accumulation rate by the aerial part increased, and by the roots – decreased. LDP of pea Metsenat and SDP of soybean Korsak variety differ in the nature of the reaction of growth processes in response to irradiation of RL. The activation of the phytochrome system in the aerial part causes changes in the proliferative activity and growth processes of the roots, which indicate a systemic response of the plant organism to the action of this factor. The relationship of the photoperiodic reaction of plants with the realization of phytochrome signal in the plant by activating or inhibiting the proliferative activity of root meristems and growth reactions is discussed.

Key words: *Pisum sativum* L., *Glycine max* (L.) Merr., phytochrome system, red light (660 nm), photoperiodic reaction, mitotic index, growth reaction.

About the authors:

O.A. Avksentieva – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>
E.D. Batueva – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, batueva96@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2532-7141>

Влияние красного света (660 нм) на пролиферативную активность и ростовые реакции у проростков растений с контрастной фотопериодической реакцией

О.А. Авксентьева, Е.Д. Батуева

В работе представлены результаты исследования влияния облучения красным светом (660 нм) на пролиферативную активность корневых меристем и ростовые реакции проростков растений с контрастной фотопериодической реакцией. Как растительный материал в работе использовали представителей семейства бобовых (Fabaceae), контрастных по фотопериодической реакции: длиннодневные растения (ДДР) гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Меценат и короткодневные растения (КДР) сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сорта

Корсак. Активацию фитохромов проводили, облучая надземную часть опытных проростков монохроматическим красным светом (КС) 660 нм с использованием LED матрицы по 30 минут в течение 5 суток. Проллиферативную активность клеток меристем определяли по анализу митотического индекса (МИ). Ростовую реакцию исследовали по показателям линейного роста: общей длине проростка, длине надземной части и корней и интегральному показателю ростовых и биосинтетических процессов – накоплению биомассы. По результатам экспериментов показано, что митотическая активность корневых меристем под влиянием облучения красным светом надземной части в проростках ДДР гороха Меценат незначительно снижалась – на 8 %, а в проростках КДР сои Корсак возрастала существенно – на 47 %. Линейный рост и накопление биомассы в надземной части при действии облучения КС в проростках гороха сорта Меценат и сои сорта Корсак уменьшались, причем у сои этот эффект был выражен существенно, чем у гороха. При облучении КС линейный рост корней и накопление ими биомассы в проростках ДДР гороха незначительно снижались, в то же время эти процессы в корнях проростков КДР сои существенно стимулировались. Под влиянием КС в проростках гороха скорость роста в длину надземной части не изменялась, а корней – возрастала, в то время как скорость накопления ими биомассы снижалась. В проростках сои при облучении КС скорость роста как надземной части, так и корней снижалась, скорость накопления биомассы надземной частью возрастала, а корнями – снижалась. ДДР гороха Меценат и КДР сои Корсак отличаются по характеру реакции ростовых процессов в ответ на облучение КС. Активация системы фитохромов в надземной части вызывает изменения пролиферативной активности и ростовых процессов корней, что может свидетельствовать о системности ответов растительного организма на действие этого фактора. Обсуждается связь фотопериодической реакции растений с реализацией фитохромного сигналинга в растительном организме путем активации или ингибирования пролиферативной активности корневых меристем и ростовых реакций.

Ключевые слова: *Pisum sativum L., Glycine max (L.) Merr.*, фитохромная система, красный свет (660 нм), фотопериодическая реакция, митотический индекс, ростовая реакция.

Об авторах:

О.А. Авксентьева – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

Е.Д. Батуева – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, batuyeva96@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2532-7141>

Представлено: В.М.Попов / Presented by: V.M.Popov

Рецензент: Г.О.Прядкіна / Reviewer: G.O.Pryadkina

Подано до редакції / Received: 14.04.2020

УДК: 631.847.211:633.31:631.81

Реакція самофертильних ліній люцерни на інокуляцію бульбочковими бактеріями

П.П. Пухтаєвич, К.П. Кукол, Н.А. Воробей, С.Я. Коць

В умовах модельного вегетаційного досліду вивчали реакцію самофертильних ліній люцерни Кишварді 46, Кишварді 27, Вертус і Зігуен на інокуляцію бульбочковими бактеріями *Sinorhizobium meliloti* AC48 та AC88. У результаті досліджень встановлено, що інтенсивність асиміляції N_2 симбіотичними системами, утвореними за участі різних генотипів люцерни та активних штамів *S. meliloti*, є одним із основних факторів, який впливає на урожай вегетативної маси цієї важливої кормової культури. Самофертильні лінії рослин *Medicago sativa* L., інокульовані різними штамми ризобій, характеризувалися більшими, порівняно з контрольними рослинами люцерни сорту Ярославна, показниками маси сформованих на коренях бульбочок. У всіх досліджуваних нами симбіотичних системах зберігалась традиційна динаміка азотфіксувальної активності кореневих бульбочок – із низькими значеннями у фазу стеблуння та інтенсивним зростанням до фаз бутонізації і цвітіння. Найвищий рівень азотфіксації та вегетативного росту рослин (показники зеленої та сухої маси рослин, маси коренів та кореневих бульбочок) встановлено при інокуляції люцерни лінії Кишварді 46 штамом *S. meliloti* AC48. У рослин цього варіанту показники маси сформованих на коренях бульбочок були більшими порівняно з контролем в 1,8–2,3 рази, зеленої маси в 1,2–1,6 рази та висоти рослин 1,2–1,4 рази упродовж вегетації. Азотфіксувальна активність симбіотичного комплексу рослин лінії Кишварді 27 та бульбочкових бактерій *S. meliloti* AC48 у фазу цвітіння перевищувала показники симбіотичних систем, сформованих за участю цього ж штаму і рослин ліній Зігуен та Вертус на 13,0 і 39,4 %. За інокуляції рослин ліній Вертус і Зігуен активними штамми *S. meliloti* AC48 та AC88 відмічені найменші показники азотфіксувальної активності, порівняно з симбіозами, утвореними рослинами ліній Кишварді 27 і 46 та сорту-контролю Ярославна з зазначеними штамми. Відмічено стимулюючий вплив інокуляції насіння люцерни різних генотипів на ріст і розвиток рослин, про що свідчить позитивна динаміка наростання надземної маси, накопичення сухої речовини та вищі, порівняно з контролем, значення (показники) висоти рослин упродовж вегетації.

Ключові слова: *Sinorhizobium meliloti*, азотфіксація, інокуляція, люцерна, надземна маса рослин, самофертильні лінії.

Про авторів:

П.П. Пухтаєвич – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, Україна, 03022, azot@ifrg.kiev.ua, <https://orcid.org/0000-0002-6179-6239>

К.П. Кукол – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, Україна, 03022, katerinakukol@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2889-9957>

Н.А. Воробей – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, Україна, 03022, n-vorobey@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5409>

С.Я. Коць – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, Україна, 03022, kots@ifrg.kiev.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3477-793X>

Вступ

Недостатня забезпеченість кормами та низька їх якість призводять до того, що генетичний потенціал тварин реалізується лише на 60–90 % (Постельга, Філоненко, 2016). Для стабілізації і подальшого нарощування їх виробництва необхідно оптимізувати посівні площі під кормовими культурами, підвищити урожайність цих культур та поживну цінність сировини (Обідняк, Башкірова, 2018).

У наш час при біологізації землеробства в умовах обмеженого ресурсного забезпечення зростає роль багаторічних бобових трав і особливо люцерни, яка збагачує ґрунт органічною речовиною і біологічним азотом, покращує його фізико-хімічні властивості та захищає від ерозії (Желтопузов и др., 2013).

Люцерна (*Medicago sativa* L.) – багаторічна бобова культура, яка широко використовується у всьому світі як одна з найважливіших кормових рослин. Це пов'язано, головним чином, з її достатньо високою урожайністю та якістю кормів, пластичністю і здатністю створювати симбіотичні системи з мікроорганізмами-азотфіксаторами, які асимілюють молекулярний азот повітря, забезпечують потребу в ньому макросимбіонтів й накопичують його в орному шарі ґрунту (Коць, Михалків, 2005; Tesfaye et al., 2006; Li, Brummer, 2012; Quan et al., 2016; Soto-Zarazua et al., 2016; Zhang et al., 2017; Pukhtaievych et al., 2019).

За результатами багаторічних досліджень, люцерна та її травосуміші із злаковими рослинами на сінокосах, пасовищах і в кормових сівозмінах забезпечують збереження й накопичення гумусу в ґрунті за рахунок накопичення великої кількості біологічного азоту і кореневої маси (Коць, Михалків, 2005; Гребенников и др., 2011).

Вирощування люцерни посівної позитивно впливає на структуру і водно-фізичний стан ґрунтів. На гектарі в умовах зрошення вона фіксує до 500 кг азоту в рік із повітря при урожайності сіна 25–30 т/га (за рахунок кількох укосів). За середніх урожаїв у богарних умовах 4–5 т/га сіна в ґрунті залишається 80–120 кг фіксованого азоту (Гудзь та ін., 2014). В умовах інтенсифікації сільськогосподарського виробництва люцерна відіграє важливе значення у підтриманні екологічної рівноваги в зрошуваних агроценозах (Данилов и др., 1997). Ця культура активно використовує запаси нітратного азоту за межами кореневмісного шару однорічних сільськогосподарських культур. У рік посіву вона поглинає їх на глибині до 120 см, а на другий рік – до 180 см, тому може широко застосовуватись для підвищення ефективності використання мінеральних азотних добрив і зменшення накопичення нітратів у ґрунті (Entz et al., 1993).

У сухій масі люцерни міститься 17–18 % протеїну, 2,5–3,0 – жиру, 24–28 – клітковини, 35–37 – безазотистих екстрактивних речовин, у 100 кг сіна – 11,5–12,5 кг перетравного білка, 56–63 кормових одиниць (Ковбасюк, 2013). Білки люцерни містять усі незамінні амінокислоти і добре за ними збалансовані, наближаючись за цим показником до яєчного білка (Аксенов, Аксенова, 2000).

Важливість люцерни як кормової культури у світі спонукає до проведення досліджень, направлених на вдосконалення елементів технології її вирощування. Науковці також працюють над тим, щоб нові сорти, створені у науково-дослідних установах, були стійкими до несприятливих ґрунтово-кліматичних умов, збудників хвороб і шкідників, добре реагували на внесення добрив та зрошення, були спроможними давати високі врожаї зеленої маси, мали стабільну насінневу продуктивність (Башкірова, Глибовець, 2014). Ідеальна люцерна повинна мати розширений потенціал для продукування біомаси, високу інтенсивність відростання після збору врожаю і прямий високий ріст стебла для полегшення механічного збирання врожаю, стійкість до вилягання (Robins et al., 2007; McCord et al., 2014). На сьогоднішній день суттєвою проблемою культури є низька насіннева продуктивність (Коць, 2001; Волинець, 2013), тому одним із основних завдань, які ставляться перед селекціонерами, є виведення нових, самофертильних сортів із високою насінневою продуктивністю.

Актуальним сьогодні є також пошук нових азотфіксувальних мікроорганізмів і створення на їх основі ефективних симбіотичних систем, які можна було б застосовувати для підвищення врожайності сільськогосподарських культур і водночас запобігати забрудненню навколишнього середовища синтетичними сполуками (Коць, 2011).

Процес активізації симбіотичної фіксації молекулярного азоту залежить від сортової чутливості бобових до бактеризації бульбочковими бактеріями та специфічності штамів ризобій. Сортова специфічність у бульбочкових бактерій люцерни є помірною (Спайнк и др., 2002). У роботах М. Тагаєва зі співавт. (Тагаєв, Рустамбекова, 1992) показано залежність симбіотичної азотфіксації від видових і сортових особливостей люцерни та штаму бульбочкових бактерій. Оцінка колекцій сортів люцерни виявила, що міжсортіві відмінності за показниками кількості та маси бульбочок виражені більш різко, ніж за азотфіксувальною активністю, оскільки ці ознаки, вірогідно, визначаються різними групами рослинних генів. Також встановлено, що ефективність симбіозу контролюється генотипом рослини-хазяїна, тоді як азотфіксувальна активність обумовлена переважно генотипом штаму (Назарюк и др., 2004).

На ефективність функціонування симбіотичних систем значний вплив має також і рівень забезпеченості рослин мінеральним азотом та застосування стимуляторів росту (Коць, Михалків, 2005).

Передпосівна інокуляція насіння бактеріальними препаратами, до складу яких входять біоагенти, які вступають у симбіоз із люцерною, позитивно впливає на загальний стан рослин: вони мають кращі біометричні показники, відзначаються високим ступенем метаболічних процесів, зокрема фотосинтезу та азотфіксації, характеризуються підвищеною резистентністю до фітопатогенів (Коць, Михалків, 2005).

Отже, метою нашої роботи було дослідити реакцію перспективних самофертильних ліній люцерни (*Medicago sativa* L.) на інокуляцію насіння різними штамми азотфіксувальних бактерій

Sinorhizobium meliloti, формування та функціонування утворених симбіотичних систем та аналіз впливу бактеризації на ріст і розвиток рослин.

Об'єкти та методи дослідження

Вегетаційні дослідження проводили з рослинами люцерни (*Medicago sativa* L.) сорту Ярославна (селекції Інституту землеробства НААН України) та самофертильними лініями Вертус, Кишварді 27, Кишварді 46 і Зігуен, які були надані к.б.н., доцентом Н.В.Башкіровою (Національний університет біоресурсів і природокористування України).

Схема дослідження включала варіанти із передпосівною інокуляцією насіння люцерни штамми бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* AC48 та AC88 із колекції азотфіксуючих мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Лінію Вертус отримано методом добору за рівнем самофертильності із сорту Вертус. Тричі було проведено примусове самозапилення, потім три покоління сибсового розмноження, тобто схрещування між самофертильними (рівень самосумісності >45 %), морфологічно однорідними рослинами, після цього повторно два примусових штучних самозапилення.

Лінія Кишварді – результат добору з угорського сорту Кишварді. Чотири послідовних примусових самозапилення, потім два схрещування між самофертильними (рівень самосумісності >45 %) рослинами, після цього два самозапилення.

Лінію Зігуен отримано методом добору за рівнем самофертильності з чилійського сорту Зігуен. Двічі було проведено примусове самозапилення, потім три схрещування між самофертильними (>45 %), морфологічно однорідними рослинами, після цього повторно три примусових самозапилення.

Усі лінії є восьмим поколінням насіннєвого розмноження.

Рослини люцерни вирощували у 14-кілограмових посудинах за природних освітлення та температури на вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України.

Посудини попередньо стерилізували 20 % розчином H_2O_2 . Субстратом для вирощування рослин слугував річковий пісок. Джерелом мінерального живлення була поживна суміш Гельрігеля, збагачена мікроелементами: молібденом, бором і міддю та збіднена на азот – 0,25 норми (1 норма відповідає $708 \text{ mg Ca (NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ на 1 кг піску).

Для приготування інокуляційних суспензій біомасу бактерій змивали з поверхні агаризованого поживного середовища стерильною водопровідною водою. Водні суспензії бульбочкових бактерій вирівнювали між собою за стандартом каламутності. Тривалість бактеризації насіння суспензією бактерій становила 60 хвилин. Інфекційне навантаження складало 10^9 кл/мл. У контролі насіння люцерни зволожували водопровідною водою. Повторність дослідження – п'ятиразова. Рослини для аналізу відбирали у фази стеблуння, бутонізації та цвітіння, відповідно 32, 39 та 45-та доба після появи сходів. Визначали та аналізували вплив інокуляції насіння бульбочковими бактеріями на біометричні показники люцерни.

Азотфіксувальну активність (АФА) визначали ацетиленовим методом за рівнем ацетиленвідновлювальної активності кореневих бульбочок і виражали в наномолях етилену, утвореного бульбочками однієї рослини за 1 годину. Газову суміш, що містила етилен, утворений у результаті редукції ацетилену нітрогеназою, аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6850 Network GC System, USA. Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 мл.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за загальноприйнятими методиками (Доспехов, 1985) із залученням пакету програм Microsoft Excel 2013. У таблицях наведено середньоарифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати та обговорення

У результаті досліджень встановлено, що бульбочки у люцерни утворилися на коренях рослин усіх варіантів, проте їх кількість та маса істотно відрізнялися, залежно від генотипів рослини-хазяїна та залучених у роботу штамів бульбочкових бактерій. Так, у контрольованих умовах вегетаційних дослідів інокуляція насіння *S. meliloti* AC48 забезпечувала формування на рослинах люцерни більшої кількості бульбочок, порівняно з інокуляцією штамом AC88.

У люцерни, інокерованої штамми бульбочкових бактерій *S. meliloti* AC48 та AC88, найбільшу масу бульбочок відмічено на коренях рослин самофертильних ліній Кишварді 27 та Кишварді 46, що

перевищувала показники рослин контрольного варіанту (сорт Ярославна) у фазу бутонізації в 1,4–1,8 рази, у фазу цвітіння – в 1,3–2,3 рази відповідно.

У рослин люцерни ліній Вертус та Зігуен симбіотичний апарат активніше формувалася на пізніших фазах вегетації, і, як наслідок, збільшення загальної маси кореневих бульбочок на 1 рослині відбувалося в фазу цвітіння в 1,3 та 1,7 рази порівняно з контрольними рослинами за інокуляції штамом AC48 (табл. 1).

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що на кореневій системі рослин люцерни селекційної самофертильної лінії Кишварді формувалось більше азотфіксуючих бульбочок, ніж на кореневій системі сорту люцерни Ярославна, за інокуляції обома досліджуваними штамми *S. meliloti*.

Таблиця 1.

Маса кореневих бульбочок різних ліній люцерни (мг/рослину) за інокуляції *Sinorhizobium meliloti* AC48 та AC88

Варіант	Фаза розвитку рослин, доба після сходів	
	бутонізація, 39-та	цвітіння, 45-та
Інокуляція <i>Sinorhizobium meliloti</i> AC48		
Ярославна (контроль)	16,62±0,99	28,07±2,38
Кишварді 27	28,51±1,14	56,25±5,06
Кишварді 46	30,24±1,51	66,41±4,85
Зігуен	22,15±1,77	48,15±4,62
Вертус	20,83±1,25	38,12±2,25
Інокуляція <i>Sinorhizobium meliloti</i> AC88		
Ярославна (контроль)	19,26±0,77	34,80±3,27
Кишварді 27	26,50±2,12	45,12±3,93
Кишварді 46	28,64±2,00	59,25±5,81
Зігуен	23,52±1,18	40,50±3,85
Вертус	18,92±1,14	37,18±3,20

Ефективні бульбочки з високою азотфіксувальною активністю утворюються при генетичній сумісності видів і сортів бобових рослин із штамми бульбочкових бактерій (Проворов, Симаров, 1992).

Із літературних джерел відомо, що маса кореневих бульбочок у бобових рослин здебільшого корелює з інтенсивністю фіксації ними молекулярного азоту. Загальна азотфіксувальна активність може слугувати інтегральним показником, який характеризує функціонування симбіотичної системи, оскільки високий рівень АФА спостерігається за наявності специфічного штаму ризобій, збалансованості С- і N-метаболізму в бульбочках і потреби рослин в елементах живлення (Спайнк и др., 2002).

Вважається, що загальна азотфіксувальна здатність кореневих бульбочок люцерни у період її активної вегетації є найбільш значущим критерієм для оцінювання ефективності симбіотичної взаємодії макро- та мікросимбіонтів.

Варто зауважити, що у всіх досліджуваних нами симбіотичних системах зберігалась традиційна динаміка азотфіксувальної активності кореневих бульбочок – із низькими значеннями у фазу стеблуння та інтенсивним зростанням до фаз бутонізації і цвітіння. При цьому в фазі цвітіння спостерігали незначну тенденцію до збільшення асиміляції N₂ досліджуваними симбіотичними системами люцерни у порівнянні із фазою бутонізації.

У результаті визначення азотфіксувальної активності кореневих бульбочок люцерни нами відмічено істотно нижчий рівень даного показника у симбіотичних системах, утворених штамми *S. meliloti* AC48 та AC88 із рослинами ліній Вертус та Зігуен, упродовж всього вегетаційного періоду, у порівнянні з симбіотичними системами, утвореними лініями Кишварді 27, Кишварді 46 та сортом Ярославна (рис. 1 та рис. 2).

З-поміж двох самофертильних ліній люцерни Зігуен і Вертус більш комплементарною до бульбочкових бактерій *S. meliloti* AC48 та *S. meliloti* AC88 виявилась перша (Зігуен), що підтверджується масою сформованих кореневих бульбочок та рівнем їх асиміляції N_2 упродовж вегетації. Найвищі значення азотфіксувальної активності (714,5 та 651,2 нмоль C_2H_4 /рослину*год) кореневих бульбочок люцерни, утворених на рослинах лінії Вертус штамми AC48 та AC88, відмічено у фазу цвітіння, проте вони були в 1,8 та 1,5 рази меншими порівняно з контрольними рослинами сорту Ярославна.

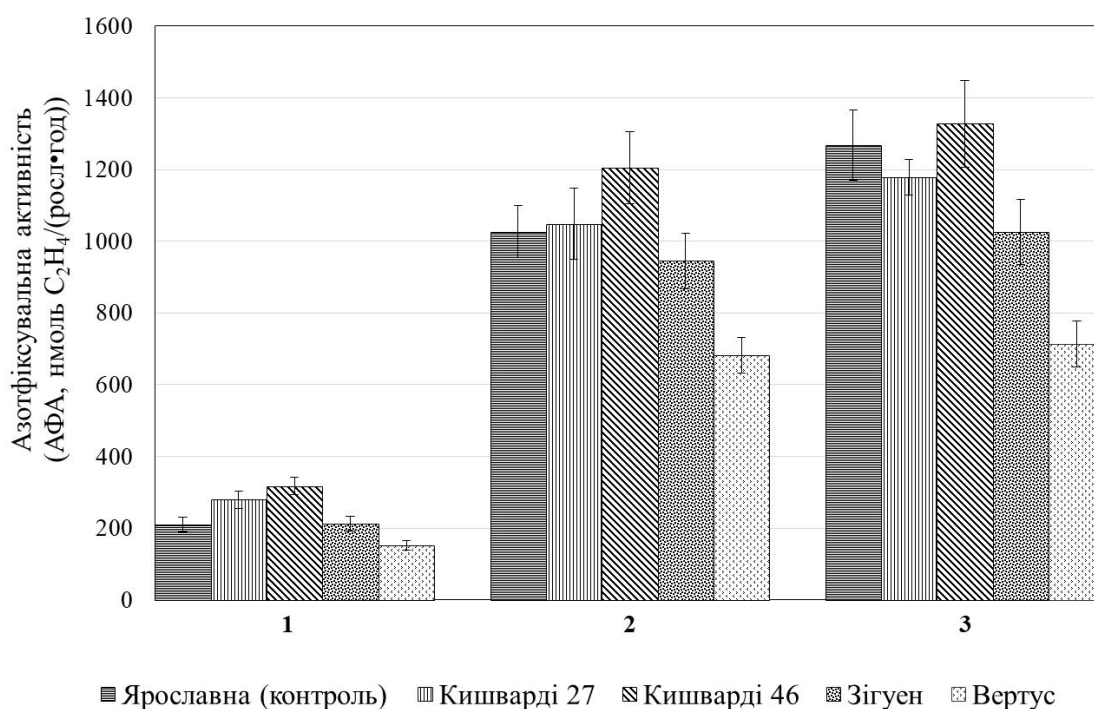


Рис. 1. Азотфіксувальна активність кореневих бульбочок різних генотипів люцерни (нмоль C_2H_4 /рослину*год) за інокуляції *Sinorhizobium meliloti* AC48. Фаза розвитку: 1 – стеблуння; 2 – бутонізація; 3 – цвітіння

Отже, інокуляція насіння люцерни лінії Кишварді 46 штамми *S. meliloti* AC48 та *S. meliloti* AC88 забезпечувала найвищий рівень асиміляції N_2 , порівняно з іншими варіантами дослідження. Так, АФА симбіотичних систем, утворених рослинами лінії Кишварді 46 з ризобіями *S. meliloti* AC48, перевищувала показник контрольних рослин на 50,9 % у фазу стеблуння, 17,4 % у фазу бутонізації та 4,8 % у фазу цвітіння. У варіанті з обробкою насіння люцерни вказаної лінії бульбочковими бактеріями AC88 перевищення показників порівняно із контрольними становило відповідно 12,5, 33,1 та 20,4 %.

Азотфіксувальна активність симбіотичного комплексу Кишварді 27 + *S. meliloti* AC48 у фазу цвітіння була на рівні 1179,1 нмоль C_2H_4 /рослину*год), що на 13,0 і 39,4 % більше порівняно із симбіотичними системами, сформованими за участю цього ж штаму і рослин ліній Зігуен та Вертус.

У рослин сорту Ярославна (контроль) дещо вищими показниками азотфіксувальної активності характеризувались кореневі бульбочки, утворені штамом *S. meliloti* AC48 (рис. 2).

Таким чином, штамми *S. meliloti* AC48 та AC88, використані для інокуляції насіння *M. sativa*, були комплементарними із різними самофертильними лініями люцерни та забезпечували інтенсивну азотфіксацію у фази бутонізації та цвітіння. У результаті досліджень виявлено максимально продуктивні за ознакою азотфіксувальної активності симбіотичні системи із урахуванням генетичних особливостей ліній та мікросимбіонтів: Кишварді 46 і 27 із *S. meliloti* AC48 і AC88.

Аналіз літературних джерел свідчить про те, що результати морфометричних вимірювань підтверджують існування прямої позитивної залежності між зростаючими показниками загальної

азотфіксувальної активності та динамікою формування рослинами вегетативної маси. Внаслідок асиміляції N_2 бульбочками забезпечуються кращі умови азотного живлення люцерни, що сприяє інтенсифікації метаболічних процесів росту та розвитку рослин (Патика та ін., 1993; Коць, Михалків, 2005). Тому інокуляція ефективними штамми бульбочкових бактерій є одним із засобів підвищення урожаю зеленої маси люцерни і вмісту в ній білка (Коць, Михалків, 2005).

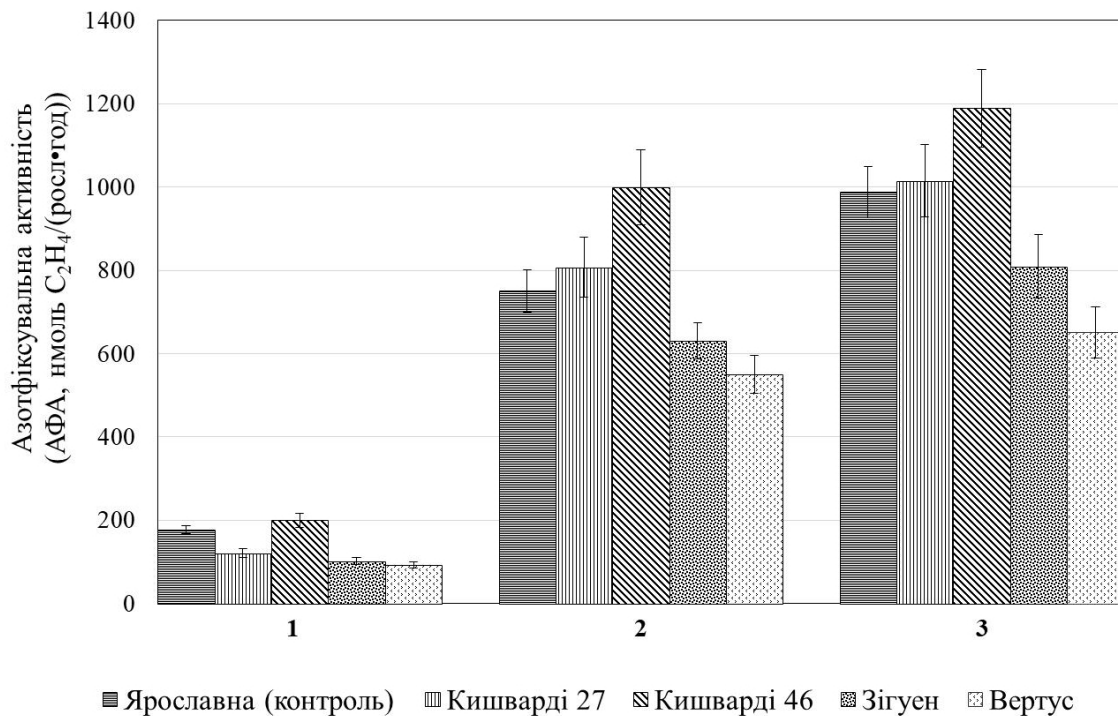


Рис. 2. Азотфіксувальна активність корневих бульбочок різних генотипів люцерни (нмоль C_2H_4 /(рослину•год)) за інокуляції *Sinorhizobium meliloti* AC88. Фаза розвитку: 1 – стеблуння; 2 – бутонізація; 3 – цвітіння

Крім того, існує декілька складових механізму впливу бульбочкових бактерій на бобові рослини, зокрема і люцерну, що пояснює дані результати:

- збільшення надходження атмосферного азоту в рослини за рахунок функціонування бактеріальної нітрогенази;
- підвищення асиміляції нітратів за рахунок активності бактеріальної нітратредуктази;
- синтез мікроорганізмами фізіологічно активних речовин (гормонів, вітамінів, амінокислот та ін.), які здійснюють пряму гормональну регуляцію росту рослин;
- здатність мікроорганізмів до синтезу екзополісахаридів, що є природними прилипаками бактерій до рослинних тканин і ґрунтових часточок (Коць і др., 2010).

Отримані результати динаміки наростання зеленої маси рослинами досліджуваних ліній люцерни на фоні інокуляції активними штамми бульбочкових бактерій представлені в табл. 2.

Важливим показником росту рослин є їх висота. Ріст люцерни був значно інтенсивнішим у рослин самофертильної лінії Кишварді 46. За висотою стебла лінія люцерни Кишварді 46 перевищувала контрольні рослини на 30,5, 37,3 та 16,4 % за інокуляції штамом AC48 і на 24,1, 24,7, 35,8 % – за інокуляції *S. meliloti* AC88 у фази стеблуння, бутонізації та цвітіння відповідно. За ростовою активністю досліджені лінії та сорт люцерни можна розмістити у порядку зменшення їх висоти за інокуляції різними штамми бульбочкових бактерій – Кишварді 46, Кишварді 27, Зігуен, Вертус, Ярославна (табл. 2).

Слід зазначити, що інокуляція штамом *S. meliloti* AC48 сприяла кращому наростанню надземної маси рослин, порівняно з варіантами, де насіння обробляли штамом AC88 (табл. 2). У рослин лінії Кишварді 46 на фоні інокуляції штамом *S. meliloti* AC48 зафіксовано упродовж вегетації найвищі показники зеленої маси серед інших варіантів досліду. Зокрема, у фазу стеблуння маса

рослин лінії Кишварді 46 становила в середньому 1,77 г/рослину, що на 12,0–55,2 % більше порівняно з рослинами контролю та ліній Кишварді 27, Зігуен та Вертус. У фазу цвітіння маса рослин даного варіанту становила 2,59 г/рослину, при цьому відповідні показники зросли на 11,6–42,3 %.

За інокуляції насіння залучених у роботу ліній люцерни бактеріями *S. meliloti* AC88 спостерігали подібну динаміку приросту зеленої маси. Як у рослин самофертильних ліній люцерни Кишварді 46, Кишварді 27, Зігуен та Вертус, так і у рослин контрольного варіанту відмічено поступове зростання показника наростання зеленої маси протягом вегетації. Однак за обробки насіння люцерни обома штамми ризобій рослини ліній Зігуен і Вертус мали дещо меншу масу порівняно з сортом Ярославна і лініями Кишварді 27 і 46.

Таблиця 2.

Показники наростання надземної маси рослин різних ліній люцерни (*Medicago sativa* L.) за інокуляції насіння *Sinorhizobium meliloti* AC48 та AC88

Варіант	Зелена маса рослин, г			Суша надземна маса, г			Висота рослин, см		
	Фаза розвитку								
	стеблування	бутонізації	цвітіння	стеблування	бутонізації	цвітіння	стеблування	бутонізації	цвітіння
Інокуляція насіння бактеріями <i>Sinorhizobium meliloti</i> AC48									
Ярославна (контроль)	1,14± 0,06	1,52± 0,06	2,15± 0,11	0,31± 0,02	0,38± 0,03	0,41 ±0,03	21,31± 1,67	23,10± 1,75	35,24± 2,54
Кишварді 27	1,58± 0,11	1,62± 0,07	2,32± 0,14	0,43± 0,02	0,45± 0,03	0,67± 0,05	26,94± 2,37	30,96± 2,32	36,22± 2,96
Кишварді 46	1,77± 0,10	1,82± 0,06	2,59± 0,19	0,52± 0,04	0,55± 0,03	0,73± 0,06	27,81± 2,63	31,72± 2,88	41,05± 3,12
Зігуен	1,35± 0,10	1,60± 0,12	2,23± 0,17	0,36± 0,03	0,43± 0,04	0,57± 0,04	25,34± 1,81	30,60± 2,48	35,15± 2,83
Вертус	1,24± 0,07	1,53± 0,10	1,82± 0,15	0,32± 0,02	0,38± 0,04	0,46± 0,04	25,22± 2,05	30,01± 2,45	32,40± 2,82
Інокуляція насіння бактеріями <i>Sinorhizobium meliloti</i> AC88									
Ярославна (контроль)	0,87± 0,07	1,10± 0,08	1,52± 0,10	0,17± 0,01	0,23± 0,02	0,42± 0,04	20,22± 1,22	25,54± 2,05	28,91± 2,15
Кишварді 27	1,01± 0,09	1,51± 0,12	1,98± 0,13	0,22± 0,02	0,41± 0,03	0,56± 0,03	22,74± 1,83	27,13± 2,35	33,34± 2,65
Кишварді 46	1,15± 0,08	1,69± 0,09	2,32± 0,20	0,25± 0,02	0,49± 0,04	0,68± 0,05	25,10± 2,19	31,85± 2,48	39,27± 2,55
Зігуен	0,94± 0,06	1,43± 0,06	1,92± 0,13	0,21± 0,02	0,37± 0,02	0,52± 0,02	21,12± 1,66	27,05± 2,14	32,30± 2,82
Вертус	0,88± 0,06	0,90± 0,05	1,54± 0,14	0,18± 0,01	0,23± 0,02	0,43± 0,03	20,91± 1,43	24,21± 1,69	30,32± 2,71

Істотне підвищення показника наростання зеленої маси рослин люцерни у всіх варіантах дослідження відмічено у фазу цвітіння. Очевидно, це пов'язано з інтенсивним перебігом асиміляційних процесів.

Відомо, що люцерна посівна, як і усі бобові трави, багата на протеїн та каротин, але порівняно зі злаками бідніша на декстрини, натрій, фосфор і деякі мікроелементи. Найоптимальніший період використання її зеленої маси – це фази бутонізації та початку цвітіння. Як правило, у цей період проводять заготівлю грубих кормів сіна, сінажу, а також трав'яного борошна. Молоді неогрубілі

стебла рослин при висушуванні є більш м'якими і при збиранні менше втрачають листочки (Чорнолата та ін., 2019).

Під час бутонізації – початку цвітіння у зеленій масі бобових трав, у тому числі й люцерни, синтезується значний вміст сухої речовини та нагромаджується максимальна кількість білка. У цей період за оптимальних умов симбіозу досягають максимуму показники кількості та маси бульбочок, а також азотфіксуючої активності, і це сприяє інтенсивнішому синтезу білка. У результаті проведених нами досліджень відмічено найбільш позитивний вплив передпосівної інокуляції насіння люцерни штамом бульбочкових бактерій AC48 на показники сухої маси рослин лінії Кишварді 46 (вміст сухої речовини в надземній масі люцерни становив 0,52 г у фазу стеблуння, 0,55 г у фазу бутонізації та 0,73 г у фазу цвітіння) (табл. 2). Вірогідно, штам AC48 виявився найбільш комплементарним до цієї лінії люцерни, про що засвідчували також показники кількості та маси бульбочок і дані їх азотфіксуючої активності. Рослини ліній Кишварді 27, Зігуен та Вертус за інокуляції насіння штамом ризобій *S. meliloti* AC48 також мали подібну позитивну динаміку накопичення сухої речовини, проте дещо поступалися за кількісним показником.

За інокуляції насіння самофертильних ліній люцерни штамом *S. meliloti* AC88 найвищими показниками сухої надземної маси характеризувались рослини лінії Кишварді 46 (від 0,25 до 0,68 г) та Кишварді 27 (від 0,22 до 0,56 г). У рослин лінії Вертус кількість сухої речовини та динаміка її накопичення майже не відрізнялися від рослин контрольного варіанту.

Таким чином, для досягнення найефективнішої реалізації симбіотичного потенціалу необхідно постійно вести координовану селекцію сортів рослин і штамів бульбочкових бактерій, направлену на створення комплементарних генотипів мікро- і макросимбіонтів.

Перспективним може бути створення універсальних комплексних бактеріальних добрив на основі декількох штамів мікроорганізмів-азотфіксаторів, здатних формувати ефективні взаємовідносини з різними генотипами люцерни. При застосуванні таких комплексних добрив рослина сама буде добирати найбільш відповідного їй мікросимбіонта-партнера. Це дозволить ефективніше використовувати потенціал бобово-ризобіальних систем для підвищення продуктивності рослин.

Ефективне використання бульбочкових бактерій як біоагентів для мікробних препаратів у сільськогосподарському виробництві дає можливість підвищувати родючість ґрунтів, економити значну кількість азотних добрив, отримуючи при цьому високі та стабільні врожаї. Адже у ґрунті не завжди присутня достатня кількість бульбочкових бактерій, здатних продуктивно зв'язувати молекулярний азот. Часто вони представлені маловірулентними неактивними штамми, а в районах, де раніше не вирощувалися певні види бобових, такі бактерії взагалі відсутні. Тому посилити ефективність фіксації атмосферного азоту в таких регіонах можна лише завдяки використанню бактеріальних препаратів, виготовлених на основі активних, конкурентоздатних штамів ризобій. Застосування їх дає змогу покращити умови азотного живлення бобових культур, підвищити урожай зерна і зеленої маси, збільшити вміст білка в рослинах і суттєво зменшити або практично виключити внесення у ґрунт мінерального азоту при їх вирощуванні (Коць и др., 2010).

Висновки

Вивчено реакцію досліджуваних самофертильних ліній люцерни Кишварді 27, Кишварді 46, Зігуен та Вертус на інокуляцію бульбочковими бактеріями *S. meliloti* AC48 і AC88. Отримані показники азотфіксуючої активності кореневих бульбочок та динаміки приросту вегетативної маси рослин самофертильних ліній люцерни проаналізовані у порівнянні із сортом-контролем Ярославна.

У результаті проведених досліджень встановлено, що інтенсивність асиміляції N₂ симбіотичними системами, утвореними за участі самофертильних ліній люцерни Кишварді 27, Кишварді 46, Зігуен та Вертус і активних штамів *S. meliloti*, є одним із основних факторів, який впливає на урожай вегетативної маси *Medicago sativa* як важливої кормової культури.

Макро- та мікросимбіонти, які формують симбіотичну систему, мають значний вплив на показники наростання зеленої маси. Найвищий рівень азотфіксуючої активності та найбільші показники надземної маси й маси коренів і корневих бульбочок встановлено для симбіотичної системи люцерни лінії Кишварді 46 із *S. meliloti* AC48.

Симбіотичні системи, утворені рослинами ліній Вертус і Зігуен з активними штамами *S. meliloti* AC48 та AC88, характеризувалися нижчими показниками азотфіксуючої активності порівняно з симбіозами, утвореними рослинами ліній Кишварді 27 і 46 та сорту-контролю Ярославна.

Беручи до уваги те, що у даний час самофертильність є одним із найважливіших критеріїв продуктивності люцерни, можна вважати досліджені лінії перспективними і рекомендувати їх для включення в подальший селекційний процес із створення самофертильних сортів люцерни посівної із високим азотфіксувальним потенціалом.

Список літератури / References

- Аксенов Е.С., Аксенова Н.А. (2000). Травянистые растения / В кн.: Декоративные садовые растения. Москва: ЛБФ. Т.2. 608 с. [Aksenov Ye.S., Aksenova N.A. Herbaceous plants / In: *Ornamental garden plants*. Moscow: ABF. Vol.2. 608 p.]
- Башкірова Н.В., Глибовець А.О. (2014). Оцінка нових самофертильних селекційних зразків люцерни посівної (*Medicago sativa* L.). *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*, 1, 10–14. [Bashkirova, N.V., Hlybovets A.O. (2014). Evaluation of new self-fertile breeding samples of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*, 1, 10–14.]
- Волинець А.П. (2013). Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск: Беларуская навука. 283 с. [Volynets A.P. (2013). *Phenolic compounds in plant life*. Minsk: Belaruskaya navuka. 283 p.]
- Гребенников В.Г., Кушч Е.Д., Шипилов И.А. (2011). Многолетние травы как фактор сохранения и повышения плодородия каштановых почв. *Кормопроизводство*, 2, 16–17. [Grebennikov V.G., Kushch Ye.D., Shipilov I.A. (2011). Perennial herbs as a factor in preserving and increasing the fertility of chestnut soils. *Fodder Production*, 2, 16–17.]
- Гудзь В.П., Шувар І.А., Юник А.В. та ін. (2014). Адаптивні системи землеробства: підруч. / Ред. В.П.Гудзь. К.: «Центр учбової літератури». 336 с. [Hudz V.P., Shuvar I.A., Yunyk A.V. et al. (2014). *Adaptive farming systems*: textbook / Ed. V.P.Hudz. Kyiv: "Tsentr uchbovoi literatury". 336 p.]
- Данилов А.Н., Данилова С.А., Караваяева Г.И. (1997). Влияние удобрений и пожнивно-корневых остатков люцерны на содержание и воспроизводство гумуса в почве / «Развитие научного наследия академика Н.И.Вавилова»: тезисы международной научной конференции. Саратов. С. 33–35. [Danylov A.N., Danilova S.A., Karavaeva G.I. (1997). Influence of fertilizers and stubble-root residues of alfalfa on the content and reproduction of humus in the soil. *The development of the scientific heritage of academician N.I. Vavilov*: abstracts of International Scientific Conference. Saratov, pp. 33–35.]
- Доспехов Б.А. (1985). Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Москва: Агропромиздат. 351 с. [Dospikhov B.A. (1985). *Field experience methodology (with basics of statistical processing of research results)*. Moscow: Agropromizdat. 351 p.]
- Желтопузов В.Н., Шипилов И.А., Гребенников В.Г. и др. (2013). Перспективы выращивания новых сортов люцерны и ее смесей для производства высококачественных кормов. *Сельскохозяйственный журнал*, 6(2), 158–164. [Zheltopuzov V.N., Shipilov I.A., Grebennikov V.G. et al. (2013). Prospects for growing new varieties of alfalfa and its mixtures for the production of high quality fodders. *Agricultural Journal*, 6(2), 158–164.]
- Ковбасюк П. (2013). Вирощування люцерни та її кормова цінність. *Пропозиція*, 12, 78–81. [Kovbasiuk P. (2013). Growing alfalfa and its fodder value. *Proposition*, 12, 78–81.]
- Коць С.Я. (2011). Сучасний стан досліджень біологічної фіксації азоту. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*, 43(3), 212–225. [Kots S.Ya. (2011). Current state of biological nitrogen fixation studies. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 43(3), 212–225.]
- Коць С.Я. (2001). Фізіологічні основи вискоєфективного функціонування симбіотичних систем люцерни в агроценозах. Дис. ... д-ра. біол. наук. Київ, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, 2001. 323 с. (рукопис). [Kots S.Ya. (2001). *Physiological bases of highly efficient functioning of alfalfa symbiotic systems in agroecosystems*. Dr. Sci. Diss. Kyiv, Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine. 323 p. (manuscript).]
- Коць С.Я., Михалків Л.М. (2005). Фізіологія симбіозу та азотне живлення люцерни. К.: Логос. 300 с. [Kots S.Ya., Mykhalkiv L.M. (2005). *Physiology of symbiosis and nitrogen nutrition of alfalfa*. Kyiv: Logos. 300 p.]
- Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф. и др. (2010). Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз. Київ: Логос, 2010. Т.1. 508 с. [Kots S.Ya., Morgun V.V., Patyka V.F. et al. (2010). *Biological fixation of nitrogen. Legume-Rhizobium symbiosis*. Kiev: Logos. Vol.1. 508 p.]
- Назарюк В.М., Сидорова К.К., Шумный В.К., Кленова М.И. (2004). Роль генотипа макросимбионта в усвоении азота из почвы и воздуха. *Доклады АН РАН*, 394(1), 139–141. [Nazaryuk V.M., Sidorova K.K., Shumnyy V.K., Klenova M.I. (2004). Role of genotype of macrosymbiont in nitrogen assimilation from soil and air. *Doklady AN RAN*, 394(1), 139–141.]

- Shumny V.K., Klenova M.I. (2004). The role of the macrosymbiont genotype in nitrogen assimilation from the soil and the air. *Dokl. Biol. Sci.*, 394, 44–46. <https://doi.org/10.1023/B:DOBS.0000017127.10198.45>
- Обідняк Н.І., Башкірова Н.В. (2018). Самофертильність люцерни посівної як спосіб підвищення насінневої продуктивності сортів / «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур»: матеріали VI міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів. Вінниця: Нілан. С. 60–61. [Obidnyak N.I., Bashkirova N.V. (2018). Self-fertility of alfalfa as a way to improve seed productivity of varieties. *Breeding, genetics and technologies of cultivation of crops: the Fourth International Scientific-Practical Conference of Young Scientists and Specialists proceedings*. Vinnytsya: Nilan, pp. 60–61.]
- Патика В.П., Тихонович І.А., Філіп'єв І.Д. та ін. (1993). Мікроорганізми і альтернативне землеробство / Відп. ред. В.П.Патика. Київ: Урожай. 176 с. [Patyka V.P., Tykhonovych I.A., Filip'yev I.D. et al. (1993). *Microorganisms and alternative agriculture* / Ed. V.P.Patyka. Kyiv: Urozhay. 167 p.]
- Постельга С., Філоненко Л. (2016). Дослідження технології консервування соковитих кормів з використанням новітніх технічних засобів. *Техніко-технологічні аспекти розвитку та випробування нової техніки і технологій для сільського господарства України*, 20, 397–404. [Postelga S., Filonenko L. (2016). Research of technology for preserving juicy fodder using the latest technical means. *Technical and technological aspects of development and testing of new machinery and technologies for agriculture of Ukraine*, 20, 397–404.]
- Проворов Н.А., Симаров Б.В. (1992). Генетический полиморфизм бобовых культур по способности к симбиозу с клубеньковыми бактериями. *Генетика*, 28(6), 5–14. [Provorov N.A., Simarov B.V. (1992). Genetic polymorphism of legumes by symbiosis ability with nodule bacteria. *Genetika*, 28(6), 5–14.]
- Спайнк Г., Кондорози А., Хукас П. (2002). Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. СПб. 567 с. [Spaink G., Kondoroshi A., Khukas P. (2002). *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria*. Sankt-Peterburg. 567 p.]
- Тагаев М., Рустамбекова Н. (1992). Изучение сорто-штаммовой специфичности симбиотической азотфиксации клубеньковыми бактериями люцерны / Сб. тезисов 2 съезда Всесоюзного общества физиологии растений. Москва. Ч.2. С. 203. [Tagayev M., Rustambekova N. (1992). The study of varietal-strain specificity of symbiotic nitrogen fixation by nodule bacteria of alfalfa. *Abstracts of 2nd Congress of the All-Union Society of Plant Physiology*. Moscow. Part 2, p. 203.]
- Чорнолата Л.П., Ляхач С.М., Пирин Н.І. та ін. (2019). Характеристика зеленої маси люцерни посівної різних укосів, проведених у фазі бутонізації. *Корми і кормовиробництво*, 87, 114–120. [Chornolata L.P., Lykhach S.M., Pryn N.I. et al. (2019). Characteristics of the green mass of different slopes alfalfa carried out in the budding phase. *Fodder and fodder production*, 87, 114–120.]
- Entz M.H., Vessey J.K., Kelner D. et al. (1993). Extraction of deep-leached nitrate by short-term alfalfa stands. *Canadian Journal of Plant Science*, 73(1), 216.
- Li X., Brummer E.C. (2012). Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy*, 2(1), 40–61.
- McCord P., Gordon V., Saha G. et al. (2014). Detection of QTL for forage yield, lodging resistance and spring vigor traits in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, 200, 269–279. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1160-y>
- Pukhtaievych P.P., Kukol E.P., Vorobey N.A. et al. (2019). Efficiency of inoculation by nodule bacteria of alfalfa grown in mixture with smooth bromegrass at various rates of phosphorus and potassium nutrition. *Plant Physiology and Genetics*, 51(5), 415–424. <https://doi.org/10.15407/frg2019.05.415>
- Quan W.L., Liu X., Wang H.Q. et al. (2016). Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1256. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01256>
- Robins J.G., Bauchan G.R., Brummer E.C. (2007). Genetic mapping forage yield, plant height, and regrowth at multiple harvests in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Crop Science*, 47(1), 11–18. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.07.0447>
- Soto-Zarazua M.G., Rodrigues F., Pimentel F.B. et al. (2016). The isoflavone content of two new alfalfa-derived products for instant beverage preparation. *Food Function*, 7(1), 364–371. <https://doi.org/10.1039/C5FO01115A>
- Tesfaye M., Silverstein K.A.T., Bucciarelli B. et al. (2006). The affymetrix *Medicago* GeneChip® array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Functional Plant Biology*, 33(8), 783–788. <https://doi.org/10.1071/FP06065>

Zhang W., Mao P., Li Y. et al. (2017). Assessing of the contributions of pod photosynthesis to carbon acquisition of seed in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Sci. Rep.*, 7, 42026. <https://doi.org/10.1038/srep42026>

The reaction of self-fertile alfalfa lines to inoculation with nodule bacteria

P.P. Pukhtaievych, K.P. Kukol, N.A. Vorobey, S.Ya. Kots

Under the conditions of a model pot experiments, the reaction of the self-fertile lines of alfalfa Kishvardy 46, Kishvardy 27, Vertus and Ziguen to inoculation with nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti* AC48 and AC88 was studied. As a result of studies, it was found that the intensity of assimilation of N₂ by symbiotic systems created with the participation of various genotypes of alfalfa and active strains of *S. meliloti* is one of the main factors that affects the vegetative mass yield of this important forage crop. Self-fertile lines of *Medicago sativa* L. plants, inoculated with different strains of rhizobia were characterized by higher rates of the mass formed on the root nodules, compared to the control plants of the alfalfa variety Yaroslavna. The traditional dynamics of nitrogen-fixation activity of root nodules was maintained in all the symbiotic systems studied by us, with low values in the stems formation stage and intensive growth in the budding and flowering stages. The highest level of nitrogen fixation and vegetative growth of plants (values of plants green and dry mass, roots and root nodules mass) was established by inoculation of alfalfa line Kishvardy 46 with strain *S. meliloti* AC48. During the growing season the indices of the mass of nodules formed on the roots of these plants were higher by 1.8–2.3 times, the green mass by 1.2–1.6 times and the height of the plants 1.2–1.4 times as compared to the control. In the flowering stages the nitrogen-fixation activity of the symbiotic complex of plants of the Kishvardy line 27 and nodule bacteria *S. meliloti* AC48 exceeded the values in the symbiotic systems formed with the participation of the same strain and plants of the Ziguen and Vertus lines by 13.0 and 39.4 %. The lowest values of nitrogen fixation activity were observed by inoculation of plants of the Vertus and Ziguen lines with active strains *S. meliloti* AC48 and AC88 compared to the symbioses formed by the plants of the Kishvardy lines 27 and 46, as well as of the control-variety Yaroslavna with the noted strains. A stimulating effect of inoculation of alfalfa seeds of different genotypes on the growth and development of plants was noted, as evidenced by the positive dynamics of the increase in above-ground mass, the accumulation of dry matter and higher than the control values (indicators) of plant height during the growing season.

Key words: *Sinorhizobium meliloti*, nitrogen fixation, inoculation, alfalfa, above-ground mass of plants, self-fertile lines.

About the authors:

P.P. Pukhtaievych – Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska St., 31/17, Kyiv, Ukraine, 03022, azot@ifrg.kiev.ua, <https://orcid.org/0000-0002-6179-6239>

K.P. Kukol – Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska St., 31/17, Kyiv, Ukraine, 03022, katerinakukol@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2889-9957>

N.A. Vorobey – Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska St., 31/17, Kyiv, Ukraine, 03022, n-vorobey@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5409>

S.Ya. Kots – Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska St., 31/17, Kyiv, Ukraine, 03022, kots@ifrg.kiev.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3477-793X>

Реакция самофертильных линий люцерны на инокуляцию клубеньковыми бактериями

П.П. Пухтаєвич, Е.П. Кукол, Н.А. Воробей, С.Я. Коць

В условиях модельного вегетационного опыта изучали реакцию самофертильных линий люцерны Кишварди 46, Кишварди 27, Вертус и Зигуен на инокуляцию клубеньковыми бактериями *Sinorhizobium meliloti* AC48 и AC88. В результате исследований установлено, что интенсивность ассимиляции N₂ симбиотическими системами, созданными при участии различных генотипов люцерны и активных штаммов *S. meliloti*, является одним из основных факторов, который влияет на урожай вегетативной массы этой важной кормовой культуры. Самофертильные линии растений *Medicago sativa* L., инокулированные различными штаммами ризобий, характеризовались более высокими, по сравнению с контрольными растениями люцерны сорта Ярославна, показателями массы сформированных на корнях клубеньков. Во всех исследуемых нами симбиотических системах сохранялась традиционная динамика азотфиксирующей активности корневых клубеньков – с низкими значениями в фазу стеблевания и интенсивным ростом к фазам бутонизации и цветения. Самый высокий уровень азотфиксации и вегетативного роста растений (показатели зеленой и сухой массы растений, массы корней и корневых клубеньков) установлен при инокуляции люцерны линии Кишварди 46 штаммом *S. meliloti* AC48. У растений этого варианта показатели массы сформированных на корнях клубеньков были больше по сравнению с контролем в 1,8–2,3 раза, зеленой массы в 1,2–1,6 раза и высоты растений 1,2–1,4 раза в течение вегетации. Азотфиксирующая активность симбиотического комплекса растений линии Кишварди 27 и клубеньковых бактерий *S. meliloti* AC48 в фазу цветения превышала показатели симбиотических систем,

сформированных с участием этого же штамма и растений линий Зигуен и Вертус на 13,0 и 39,4 %. При инокуляции растений линий Вертус и Зигуен активными штаммами *S. meliloti* AC48 и AC88 отмечены самые низкие показатели азотфиксирующей активности, по сравнению с симбиозом, сформированным растениями линий Кишварди 27 и 46 и сорта-контроля Ярославна с указанными штаммами. Отмечено стимулирующее влияние инокуляции семян люцерны разных генотипов на рост и развитие растений, о чем свидетельствует положительная динамика нарастания надземной массы, накопление сухого вещества и более высокие, по сравнению с контролем, значения (показатели) высоты растений в течение вегетации.

Ключевые слова: *Sinorhizobium meliloti*, азотфиксация, инокуляция, люцерна, надземная масса растений, самофертильные линии.

Об авторах:

П.П. Пухтаевич – Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, Украина, 03022, azot@ifrg.kiev.ua, <https://orcid.org/0000-0002-6179-6239>

Е.П. Кукол – Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, Украина, 03022, katerinakukol@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2889-9957>

Н.А. Воробей – Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, Украина, 03022, n-vorobey@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-6039-5409>

С.Я. Коць – Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, Украина, 03022, kots@ifrg.kiev.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3477-793X>

Представлено: В.П.Патика / Presented by: V.P.Patyka

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 03.03.2020

УДК: 581.45:547:56:504.5:658 (477.64 – 2 Зп)

Вміст водорозчинних фенолів в листках деревних рослин санітарно-захисних зон заводів промислової зони Запоріжжя

А.В. Скляренко, В.П. Бессонова

Представлені результати вивчення накопичення водорозчинних фенолів в листках деревних рослин санітарно-захисних насаджень промислових підприємств м. Запоріжжя: Титаномагнієвий, Алюмінієвий, Абразивний комбінати, Запоріжсталь, Коксохімічний, Феросплавний, Вогнетрив, Український графіт та Трансформаторний. Встановлено значно більш високий вміст фенольних сполук у рослин, що зростають в техногенних умовах у порівнянні з контролем – «чистою зоною». Найвищі концентрації водорозчинних фенолів виявлені у листках деревних рослин лісосмуги біля Коксохімічного заводу. За рівнем акумуляції в листках дерев санітарно-захисної зони, а, отже, за ступенем забруднення повітря поллютантом підприємства можна ранжувати наступним чином: Коксохімічний > Запоріжсталь ≥ Завод Феросплавів > Вогнетрив > Укрграфіт > Алюмінієвий > Титаномагнієвий комбінат > Абразивний > Трансформаторний завод. Залежно від рівня накопичення фенолів у листках рослини поділені на три групи. Максимальну кількість поллютанта накопичують листки дерев наступних видів: *Ailanthus altissima*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus pyramidalis*, *Populus simonii*, *Elaeagnus angustifolia*, найменшу – *Morus alba*, *Robinia pseudoacacia*, *Tilia cordata*, *Ulmus carpiniifolia*, *Armeniaca vulgaris*, *Fraxinus lanceolata*. Проміжне положення між цими двома групами займають: *Acer negundo*, *Acer platanoides*, *Aesculus hippocastanum*, *Catalpa bignonioides*, *Salix alba*, *Ulmus laevis*. Види дерев, які характеризуються найбільшим накопиченням водорозчинних фенолів, можуть бути рекомендовані для оздоровлення атмосферного повітря. За величиною коефіцієнта відносного накопичення фенольних сполук виділені види рослин, які є найбільш інформативними тест-об'єктами забруднення атмосферного повітря. До цих рослин віднесені *Betula pendula*, *Catalpa bignonioides*, *Elaeagnus angustifolia*, *Ailanthus altissima*, *Populus simonii*, *Acer negundo*, *Ulmus laevis* та *Fraxinus lanceolata*.

Ключові слова: захисні смуги, зелені насадження, забруднення повітря, вміст фенолів, коефіцієнт накопичення поллютанта, фітоіндикатори.

Про авторів:

А.В. Скляренко – Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. Сергія Єфремова, 25, Дніпро, Україна, 49600, s-k2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4954-5007>

В.П. Бессонова – Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. Сергія Єфремова, 25, Дніпро, Україна, 49600, bessonova18@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-4310-0971>

Вступ

До токсичних широко розповсюджених інгредієнтів промислових викидів належать феноли (Lin et al., 2008; Gami et al., 2014). Атмосферне повітря фенолами забруднюють коксохімічні виробництва, заводи пластмас, газогенераторні станції, деревообробні та меблеві підприємства (Поліщук та ін., 2012). Не менш небезпечні феноли, які утворюються в атмосфері з вихлопних газів неповного згоряння в результаті хімічних реакцій, а також при пожежах. Присутність фенолів в екосистемах також пов'язана з виробництвом і деградацією численних пестицидів (Michałowicz, Duda, 2007).

Ці забруднювачі є токсичними для людини і тварин (Klimov, Basilaia, 2017). Вони мають канцерогенну дію (Бахитова, Пашин, 1982; Lin et al., 2008; Gami et al., 2014; Ghorani-Azam et al., 2016). Тому необхідно використовувати різні методи очищення повітря від фенольних сполук.

Рослини здатні не тільки локалізувати й нейтралізувати токсичні компоненти промислових викидів, а навіть здійснювати їх детоксикацію (Илькун, 1978; Сергейчик, 1984; Гетко, 1989; Wei et al., 2017). Саме рослинні організми підтримують гомеостаз багатьох факторів у біосфері й забезпечують її функціонування.

Слід зазначити, що масштаби природнього самоочищення довкілля за допомогою рослин в повній мірі ще не оцінені. Для того щоб належним чином захистити оточуюче середовище від поллютантів, необхідний значний об'єм знань з накопичення їх в органах різних видів рослин та із середовищевірної ролі рослинних організмів за певних умов зростання.

Мета даного дослідження – визначити здатність листків різних видів деревних рослин зелених насаджень санітарно-захисних зон акумулювати феноли та встановити найбільш інформативні індикатори забруднення довкілля цим поллютантом.

Матеріали і методи

Дослідження здійснювали в зелених масивах ряду підприємств м. Запоріжжя: Запорізький титано-магнієвий комбінат (Титаномагнієвий), ПАТ «Запорізький виробничий алюмінієвий комбінат» (Алюмінієвий), ПАТ «Запоріжжюк» (Коксохімічний), ПАТ «Запорізький металургійний комбінат «Запоріжсталь»» (Запоріжсталь), ПАТ «Запорізький завод феросплавів» (Феросплавний), які належать до першого класу шкідливості, ПАТ «Запорізький абразивний комбінат» (Абразивний) – другого, «Закрите акціонерне товариство Вогнетрив-СОЮЗ» (Вогнетрив) – третього, ПАТ «Український графіт» (Укрграфіт), ПАТ «Запоріжтрансформатор» (Трансформаторний) – четвертого. Надалі будуть використані переважно скорочені назви цих підприємств.

Такі підприємства, як Алюмінієвий, Коксохімічний, Запоріжсталь, Феросплавний, Укрграфіт, Вогнетрив та Титаномагнієвий розташовані в заводському районі, утворюючи промисловий комплекс. На відстані від цієї групи підприємств знаходяться Титаномагнієвий (3 км), Абразивний комбінати (6 км) та Трансформаторний завод (8 км). За контрольну ділянку використовували лісосмугу, що знаходиться на відстані 12 км від джерел забруднення.

Для дослідження обрали ті види деревних рослин, що зростають у всіх або більшості зелених масивів біля промислових підприємств, і частка яких у насадженнях достатньо велика: *Acer negundo* L., *Acer platanoides* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Ailanthus altissima* Mill., *Armeniaca vulgaris* Lam., *Betula pendula* Roth., *Catalpa bignonioides* Walter, *Elaeagnus angustifolia* L., *Fraxinus lanceolata* Borkh., *Juglans regia* L., *Morus alba* L., *Populus alba* L., *Populus nigra* L., *Populus pyramidalis* Borkh., *Populus simonii* Carr., *Robinia pseudoacacia* L., *Salix alba* L., *Tilia cordata* Mill., *Ulmus carpiniifolia* Rupp., *Ulmus laevis* Pall. На кожній ділянці було обрано 5 модельних дерев однієї вікової категорії кожного виду. Листки для визначення фенолу відбирали з південно-східного боку крони на висоті 2 м від поверхні ґрунту в однакових умовах освітлення. Використовували перші 3 листки від основи однорічних пагонів. Водорозчинні феноли визначали з водного екстракту фітомаси методом (Swain, Hillis, 1959), з реактивом Фолина-Чокальтеу, який включає солі фосфорновольфрамової та фосфорномолібденової кислот. У лужному середовищі ці солі при взаємодії з фенольними сполуками відновлюються з утворенням синіх комплексів, вміст яких оцінюється спектрофотометрично. Для побудови калібрувального графіка використовували розчин галової кислоти. Оптичну щільність реакційної суміші визначали на спектрофотометрі СФ-2000 при довжині хвилі 765 нм.

Коефіцієнт відносного накопичення поллютанту розраховували як відношення вмісту фенольних сполук в листках рослин у районі забруднення до їх вмісту в контролі – «чистій зоні».

Визначення фенолів у листках досліджуваних видів рослин санітарно-захисних зон промислових підприємств проводили в чотирьох повтореннях, в таблицях та на графіках представлені середні значення та їх стандартні похибки. Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням програмного забезпечення Statistica 6.0 за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) і застосовували критерій достовірної різниці групових середніх Тьюкі.

Результати і обговорення

Для виявлення періоду найбільшого накопичення водорозчинних фенолів в листках деревних рослин визначали динаміку цього процесу в контрольному варіанті і в умовах санітарно-захисної зони Коксохімічного заводу, де спостерігається найбільша забрудненість атмосферного повітря фенольними сполуками. Саме технологія виготовлення коксу сприяє значному надходженню в оточуюче середовище цього забруднювача (Кипоть и др., 1976; Поліщук та ін., 2012; Долина та ін., 2013; Полторацька, 2014).

У контрольному варіанті перший максимум кількості водорозчинних фенолів у листках виявлено в період закінчення їх росту (червень), після чого відбувається деяке зниження вмісту цих сполук з наступним зростанням і другим максимумом в старих листках в кінці вегетації (рис. 1а). Слід зазначити, що у роботі Л.М.Кавеленової зі спів. (Кавеленова и др., 2001) вказується, що максимальний вміст водорозчинних фенолів в листках берези повислої в різних умовах зростання (вологість і щільність ґрунту, освітлення тощо) встановлено в першій-другій декаді травня, далі він знижується з наступним пізньолітньо-осіннім підйомом. В техногенних умовах м. Самари, згідно з даними цих авторів, крива динаміки водорозчинних фенольних сполук також має два максимуми, проте їх кількість мало відрізняється в листках рослин різних дослідних ділянок. Можливо, у точках відбору проб рівень фенольних сполук у повітрі нижчий гранично-допустимих концентрацій, автори статті не вказують на забруднення довкілля фенолами.

За результатами наших досліджень, в умовах забруднення атмосферного повітря спостерігається безперервне поступове збільшення рівня фенолів, але темпи їх акумуляції на різних етапах онтогенезу листків неоднакові (рис. 1б). Найактивніше цей процес відбувається листками у період їх росту. Раніше було показано, що такий забруднювач, як сірка, найбільш інтенсивно накопичується в молодих листках, що вже закінчили ріст (Sklyarenko, Bessonova, 2018). І хоча вміст фенолів у листовій масі зростає безперервно, подальше збільшення їх вмісту відбувається більш повільно. У кінці вегетації листки містять найбільшу кількість водорозчинних фенолів, що узгоджується з даними інших дослідів, які були проведені поблизу джерел забруднення з використанням інших видів деревних рослин (Долгова, Козюкіна, 1972; Тарабрин и др., 1986; Капелюш, Бессонова, 2007). Тому надалі фенолнакопичувальну здатність листків різних видів рослин ми досліджували в кінці вегетаційного періоду.

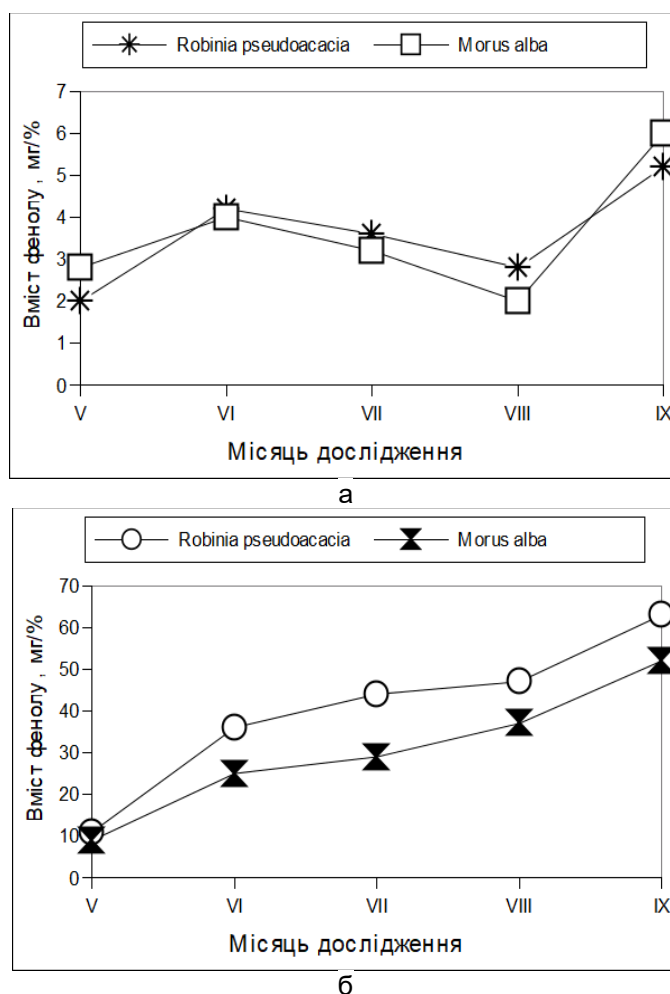


Рис. 1. Динаміка накопичення водорозчинних фенолів в листках (а – контроль, б – дослід)

В таблиці представлені дані вмісту водорозчинних фенолів у листках досліджуваних видів дерев, які зростають як на відносно чистій ділянці, так і у санітарно-захисних зонах промислових підприємств. Їх кількість у рослин контрольного варіанту в кінці вересня варіює від 4,56 до 16,20 мг/% абсолютно сухої маси. Вміст цих сполук в листках рослин всіх досліджуваних насаджень санітарно-захисних зон промислових підприємств перевищує показники контрольного варіанту (різниця статистично достовірна на рівні значимості 0,05), окрім даних для *Juglans regia* та *Populus pyramidalis*, що зростають поряд з Трансформаторним заводом (табл.).

Таблиця.

Вміст фенолів в листках деревних рослин, що зростають в насадженнях санітарно-захисних зон промислових підприємств, мг/% від абсолютної сухої маси ($M \pm m$, $n=4$)

Види рослин	Конт-роль	Промислові підприємства								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Acer negundo</i>	6,00± 0,38 ^a	22,86± 0,52 ^b	43,44± 0,82 ^c	–	–	–	85,86± 1,24 ^d	66,06± 1,02 ^e	–	103,68 ±1,58 ^f
<i>A. platanoides</i>	6,90± 0,37 ^a	24,24± 0,50 ^b	24,12± 0,52 ^{bc}	19,26± 0,46 ^d	34,56± 0,67 ^e	83,46± 1,21 ^f	86,16± 1,29 ^{fg}	77,64± 1,10 ^h	13,80± 0,48 ⁱ	110,34 ±1,64 ^j
<i>A. hippocastanum</i>	5,82± 0,32 ^a	16,92± 0,47 ^b	–	11,46± 0,45 ^c	12,84± 0,40 ^{cd}	48,18± 0,87 ^e	43,92± 0,85 ^f	66,36± 1,08 ^g	11,46± 0,45 ^{cd}	54,66± 0,96 ^h
<i>A. altissima</i>	12,66± 0,44 ^a	102,84 ±1,55 ^b	–	–	61,92± 1,03 ^c	178,32 ±2,20 ^d	193,08 ±2,48 ^e	151,08 ±2,04 ^f	32,40± 0,59 ^g	270,54 ±3,15 ^h
<i>A. vulgaris</i>	6,48± 0,39 ^a	13,62± 0,42 ^b	–	25,50± 0,53 ^c	–	30,36± 0,64 ^d	34,02± 0,68 ^e	–	12,06± 0,44 ^b	–
<i>Betula pendula</i>	6,66± 0,31 ^a	31,56± 0,60 ^b	61,98± 1,04 ^c	24,84± 0,51 ^d	–	109,74 ±1,58 ^e	121,08 ±1,74 ^f	94,32± 1,32 ^g	17,04± 0,49 ^h	163,56 ±2,17 ⁱ
<i>C. bignonioides</i>	5,88± 0,36 ^a	25,68± 0,59 ^b	39,62± 0,66 ^c	29,30± 0,58 ^d	30,12± 0,65 ^{de}	78,84± 1,15 ^f	76,92± 1,18 ^{fg}	86,34± 1,24 ^h	12,54± 0,48 ⁱ	104,28 ±1,58 ^j
<i>E. angustifolia</i>	7,38± 0,36 ^a	35,58± 0,64 ^b	49,38± 0,86 ^c	37,44± 0,65 ^{bd}	37,26± 0,66 ^{bd}	122,16 ±1,74 ^e	116,22 ±1,64 ^{ef}	97,86± 1,44 ^g	14,22± 0,47 ^h	151,74 ±2,13 ⁱ
<i>F. lanceolata</i>	4,56± 0,36 ^a	16,5± 0,46 ^b	27,06± 0,55 ^c	–	21,84± 0,56 ^d	54,18± 0,96 ^e	45,84± 0,84 ^f	38,22± 0,63 ^g	11,58± 0,46 ^h	68,94± 1,05 ⁱ
<i>Juglans regia</i>	12,06± 0,44 ^a	61,86± 1,05 ^b	–	45,66± 0,88 ^c	92,16± 1,41 ^d	115,68 ±1,69 ^e	132,84 ±1,86 ^f	110,46 ±1,64 ^f	13,08± 0,49 ^{ag}	–
<i>Morus alba</i>	6,90± 0,34 ^a	12,96± 0,49 ^b	23,88± 0,58 ^c	13,68± 0,46 ^{bd}	16,92± 0,49 ^e	30,48± 0,68 ^f	34,50± 0,63 ^g	30,48± 0,65 ^f	10,44± 0,43 ^g	51,06± 0,93 ^h
<i>Populus alba</i>	12,96± 0,47 ^a	61,20± 1,09 ^b	74,22± 1,20 ^c	–	68,70± 1,02 ^d	–	164,16 ±2,10 ^e	122,46 ±1,72 ^f	–	–
<i>Populus nigra</i>	16,20± 0,49 ^a	49,44± 0,80 ^b	103,32 ±1,50 ^c	–	92,64± 1,44 ^d	190,02 ±2,47 ^e	182,58 ±2,35 ^{ef}	167,1± 2,14 ^g	–	230,88 ±2,86 ^h
<i>Populus pyramidalis</i>	11,40± 0,44 ^a	–	56,64± 0,94 ^b	–	49,92± 0,84 ^c	161,04 ±2,14 ^d	–	123,84 ±1,79 ^e	14,70± 0,47 ^{af}	182,58 ±2,31 ^g
<i>Populus simonii</i>	10,80± 0,46 ^a	43,02± 0,84 ^b	81,72± 1,21 ^c	–	67,98± 1,09 ^d	–	145,20 ±1,92 ^e	111,96 ±1,64 ^f	28,86± 0,56 ^g	170,64 ±2,29 ^h
<i>R. pseudo-acacia</i>	5,22± 0,36 ^a	18,78± 0,46 ^b	30,30± 0,62 ^c	18,66± 0,45 ^{bd}	26,10± 0,54 ^e	48,90± 0,85 ^f	45,90± 0,82 ^{fg}	37,38± 0,65 ^h	13,02± 0,45 ⁱ	63,06± 1,02 ^j
<i>Salix alba</i>	6,90± 0,30 ^a	31,92± 0,62 ^b	29,22± 0,60 ^{bc}	24,84± 0,54 ^d	23,04± 0,59 ^{de}	54,30± 0,91 ^f	55,26± 0,95 ^{fg}	47,28± 0,82 ^h	15,54± 0,44 ⁱ	–
<i>Tilia cordata</i>	5,04± 0,32 ^a	16,20± 0,44 ^b	21,72± 0,53 ^c	13,92± 0,43 ^d	18,30± 0,54 ^{be}	42,48± 0,89 ^f	44,82± 0,81 ^{fg}	36,78± 0,65 ^h	10,68± 0,41 ⁱ	54,54± 0,98 ^j
<i>U. carpiniifolia</i>	6,72± 0,39 ^a	12,96± 0,40 ^b	24,18± 0,55 ^c	18,42± 0,50 ^d	19,92± 0,51 ^{de}	52,26± 0,95 ^f	48,78± 0,84 ^{fg}	31,62± 0,61 ^h	16,2± 0,49 ^{di}	66,72± 1,01 ^j
<i>Ulmus laevis</i>	4,98± 0,34 ^a	16,32± 0,41 ^b	30,54± 0,62 ^c	17,94± 0,47 ^{bd}	25,68± 0,53 ^e	60,72± 1,01 ^f	54,24± 0,97 ^g	–	17,64± 0,49 ^{bd}	–

Примітки:

1) «–» цей вид дерев відсутній;

2) однакові латинські букви означають статистично незначущі розбіжності середніх у ряді на основі результатів використання тесту Тьюкі ($P < 0,05$);

3) промислові підприємства: 1 – Титаномагнієвий; 2 – Укрерафіт; 3 – Абразивний; 4 – Алюмінієвий; 5 – Феросплавний; 6 – Запоріжсталь; 7 – Вогнетрив; 8 – Трансформаторний; 9 – Коксохімічний.

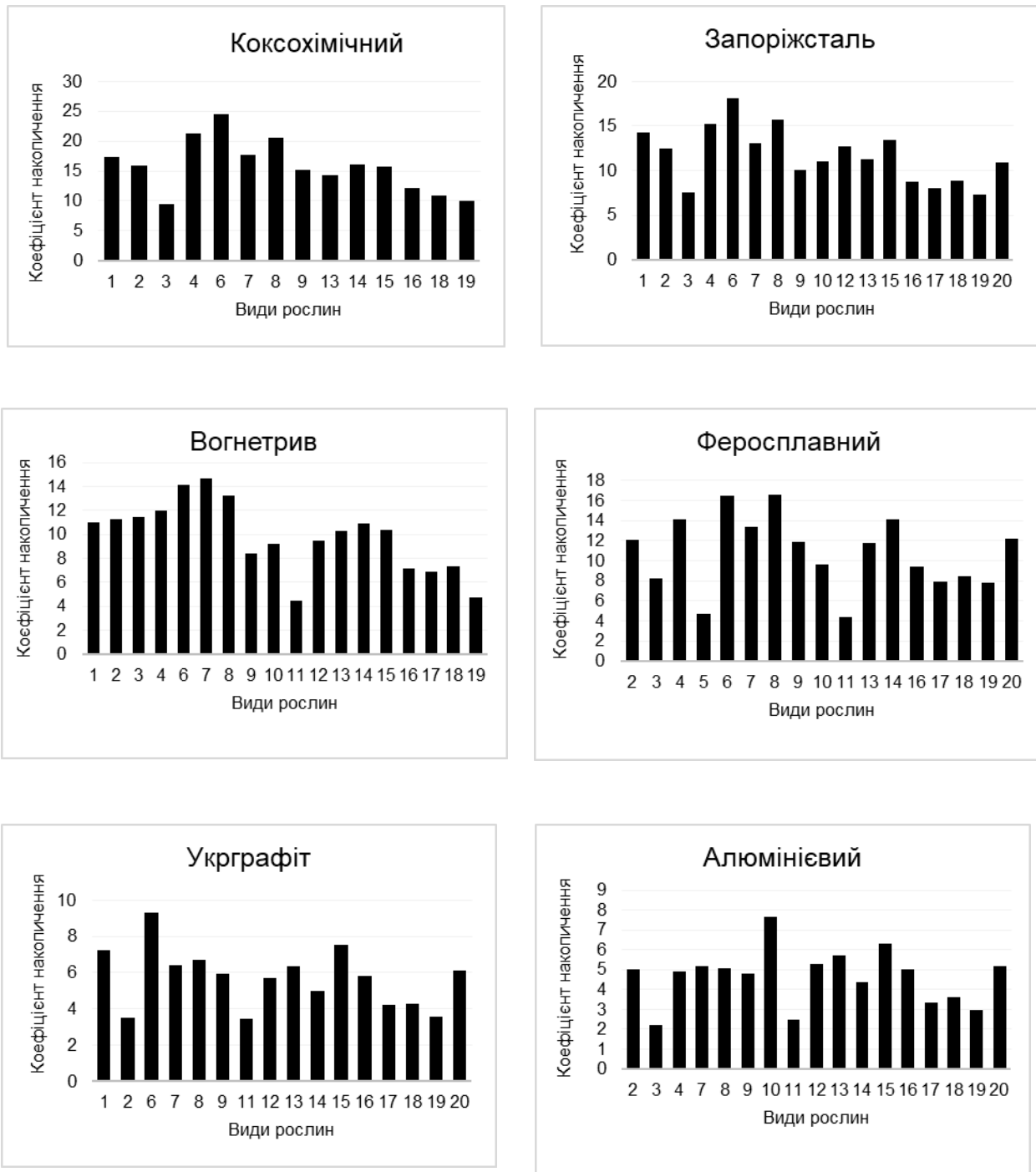
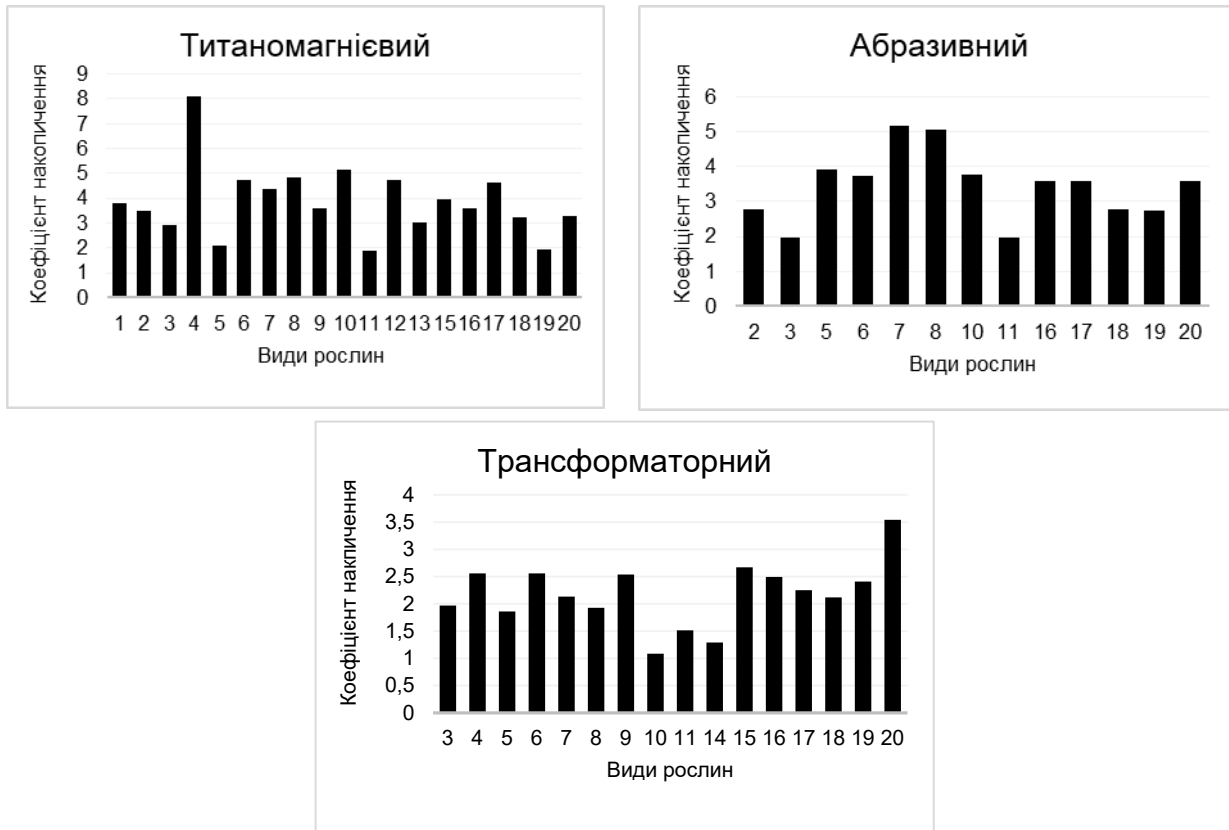


Рис. 2. Коефіцієнт відносного накопичення токсиканта (1 – *Acer negundo* L., 2 – *Acer platanoides* L., 3 – *Aesculus hippocastanum* L., 4 – *Ailanthus altissima* Mill., 5 – *Armeniaca vulgaris* Lam., 6 – *Betula pendula* Roth., 7 – *Catalpa bignonioides* Walter, 8 – *Elaeagnus angustifolia* L., 9 – *Fraxinus lanceolata* Borkh., 10 – *Juglans regia* L., 11 – *Morus alba* L., 12 – *Populus alba* L., 13 – *Populus nigra* L., 14 – *Populus pyramidalis* Borkh., 15 – *Populus simonii* Carr., 16 – *Robinia pseudoacacia* L., 17 – *Salix alba* L., 18 – *Tilia cordata* Mill., 19 – *Ulmus carpiniifolia* Rupp., 20 – *Ulmus laevis* Pall.)

Рис. 2, продовження



Відомо, що феноли здатні засвоюватись і коренями, і листками рослин. В останні вони надходять як через продиhi, так і через кутикулу й епідерміс (Тоуэрс, 1968; Угрехелидзе, 1976), завдяки добрій їх розчинності у ліпідах (Тарабрин и др., 1986). Феноли малорухливі і іммобілізуються переважно у тих органах деревних рослин, в які вони безпосередньо надходять (Тарабрин и др., 1986), тому перевищення їх кількості в листках в умовах забруднення відносно контролю в значній мірі відображує рівень поглинання їх з повітря. Проте величини їх акумуляції суттєво занижені, оскільки ці сполуки можуть піддаватися перетворенням в клітинах рослин. Так, відносно ряду екзогенних фенолів, відомо, що рослини можуть використовувати їх для синтезу β -глюкозидів (Glas, Bohm, 1971). Одним із шляхів детоксикації чужорідних монофенолів в рослинах може бути їх кон'югація з пептидами (Угрехелидзе, Цевелидзе, 1967). Є ряд відомостей, що рослини здатні здійснювати повне розщеплення ароматичної структури фенольних сполук до CO_2 (Угрехелидзе, Дурмишидзе, 1984). Клітинна стінка вважається одним з найбільш важливих місць детоксикації фенольних сполук в рослинах (Agostini et al., 2010).

Зіставлення вмісту токсиканту в листках різних видів деревних рослин санітарно-захисних зон промислових підприємств свідчить про видову специфіку його накопичення. Як видно з отриманих даних (табл.), максимальну кількість полютанта, порівняно з іншими видами деревних рослин, накопичують листки видів: *Ailanthus altissima*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus pyramidalis*, *Populus simonii*, *Elaeagnus angustifolia*, найменшу – *Morus alba*, *Robinia pseudoacacia*, *Tilia cordata*, *Ulmus carpinifolia*, *Armeniaca vulgaris*, *Fraxinus lanceolata*.

Проміжне положення між цими двома групами займають: *Acer negundo*, *Acer platanoides*, *Aesculus hippocastanum*, *Catalpa bignonioides*, *Salix alba*, *Ulmus laevis*. Характерно, що в санітарно-захисних зонах різних підприємств в основному зберігається закономірність розташування видів у ряду накопичення полютанту листками, хоча інколи спостерігається і відхилення від встановленої послідовності.

Кожен рід рослин, зростаючий на території санітарно-захисних зон, представлений одним видом, окрім *Populus* L. (чотири види), *Acer* L. та *Ulmus* L. (по два види). Всі представники роду *Populus* за вмістом токсиканту в листках віднесені до групи з максимальним накопиченням, роду *Acer* – до середньої. Два види, які входять до роду *Ulmus*, відрізняються за накопиченням. *Ulmus laevis* характеризується середнім рівнем акумуляції, *Ulmus carpinifolia* – найменшим. Більший абсолютний вміст у листках ряду дерев фенольних сполук в умовах забруднення ними повітря характеризує кращу їх атмосфероочисну функцію. До таких належать рослини, виділені в першу групу. Аналіз даних таблиці показує, що у вмісті водорозчинних фенолів у листках ряду однакових видів дерев захисних лісосмуг таких заводів, як Феросплавний та Запоріжсталь, різниця між показниками статистично не достовірна. Хоча у деяких однакових видів рослин кількість цих сполук у органах асиміляції вища біля заводу Запоріжсталь – *Acer platanoides*, *Catalpa bignonioides*, *Salix alba* та *Tilia cordata*. Близькі значення вмісту фенолів виявлені в листках однакових видів дерев, що зростають в санітарних зонах Абразивного та Титаномагнієвого комбінату, що пояснюється, можливо, відносно низькими концентраціями забруднювачів у повітрі.

За рівнем акумуляції в листках дерев, а, отже, за ступенем забруднення повітря фенолами, санітарно-захисної зони підприємства можна ранжувати наступним чином: Коксохім > Запоріжсталь ≥ Завод Феросплавів > Вогнетрив > Укрграфіт > Алюмінієвий > Титаномагнієвий > Абразивний > Трансформаторний завод.

Таким чином, найбільша кількість водорозчинних фенолів виявлена в листках рослин санітарно-захисних зон Коксохімічного заводу, Запоріжсталь, Феросплавний та Вогнетрив. Виробничий цикл перших трьох заводів характеризується найбільшою кількістю викидів токсиканта у повітрі (Фещенко, Каменова, 2016).

З точки зору фітоіндикації забруднення атмосферного повітря інгредієнтами промислових викидів становить інтерес такий показник, як коефіцієнт відносного накопичення – відношення кількості полютанта в листках рослин у районі забруднення до його вмісту в цих органах у контролі – «чистій зоні». Максимальне значення цього показника встановлено в листках *Betula pendula* санітарно-захисної зони Коксохімічного заводу (рис. 2). Ця рослина характеризується високим коефіцієнтом відносного накопичення і в захисних масивах інших підприємств. Найбільші його величини визначені в листках дослідних рослин зелених смуг заводів: Коксохімічний, Запоріжсталь, Феросплавний та Вогнетрив, а найменші – Абразивний та Трансформаторний. Порівнюючи дані, отримані для листків дерев санітарно-захисних зон різних підприємств, можна констатувати, що найвищі значення цього коефіцієнта встановлені у таких рослин, як *Betula pendula*, *Catalpa bignonioides*, *Elaeagnus angustifolia*, *Ailanthus altissima*, *Populus simonii*, *Acer negundo*, *Ulmus laevis* та *Fraxinus lanceolata* (рис. 2). Саме ці рослини можна використовувати як інформативні фітоіндикатори забруднення повітря фенолами. Мінімальний коефіцієнт відносного накопичення полютанта виявлено у *Aesculus hippocastanum*, *Morus alba*, *Ulmus carpinifolia*, *Armeniaca vulgaris* та *Acer platanoides*.

Висновки

Вміст водорозчинних фенолів у листках рослин всіх досліджуваних насаджень санітарно-захисних зон промислових підприємств перевищує показники контрольного варіанту.

За рівнем акумуляції в листках дерев санітарно-захисної зони, а, отже, за ступенем забруднення повітря фенолами підприємства можна ранжувати наступним чином: Коксохім > Запоріжсталь ≥ Завод Феросплавів > Вогнетрив > Укрграфіт > Алюмінієвий > Титаномагнієвий комбінат > Абразивний > Трансформаторний завод.

Максимальну кількість полютанта, порівняно з іншими видами деревних рослин, накопичують листки наступних видів: *Ailanthus altissima*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus pyramidalis*, *Populus simonii*, *Elaeagnus angustifolia*, що дозволяє їх рекомендувати для насаджень санітарно-захисного призначення.

Найбільш високі значення коефіцієнту відносного накопичення встановлені у таких рослин, як *Betula pendula*, *Catalpa bignonioides*, *Elaeagnus angustifolia*, *Ailanthus altissima*, *Populus simonii*, *Acer negundo*, *Ulmus laevis* та *Fraxinus lanceolata*. Саме ці рослини можна використовувати як інформативні фітоіндикатори забруднення повітря фенолами.

Отримані результати можуть бути використані для розробки рекомендацій з добору асортименту деревних рослин для реконструкції зелених насаджень в санітарно-захисних зонах підприємств.

Список літератури / References

- Бахитова Л.М., Пашин Ю.В. (1982) Модификация мутагенной и канцерогенной активности химических загрязнителей. *Успехи современной генетики*, 10, 131–142. [Bakhitova L.M., Pashin Yu.V. (1982). Modification of mutagenic and carcinogenic activity of chemical pollutants. *Advances in Modern Genetics*, 10, 131–142.]
- Гетко Н.В. (1989). Растения в техногенной среде. Минск: Наука и техника. 208 с. [Getko N.V. (1989). *Plants in an industrial environment*. Minsk: Nauka i tekhnika. 208 p.]
- Долгова Л.Г., Козюкіна Ж.Т. (1972). До питання про біологічне очищення атмосфери в умовах коксохімічного підприємства. *Український ботанічний журнал*, 29(2), 172–175. [Dolgova L.G., Kozuykina Zh.T. (1972). Regarding the matter of biological purification of atmospheric air under the conditions of a coke enterprise. *Ukrainian Botanical Journal*, 29(2), 172–175.]
- Долина Л.Ф., Козачина В.А., Пристинський В.В. (2013). Моніторинг забруднення атмосферного повітря бенз(а)піреном та вуглеводнем. *Електромагнітна сумісність та безпека на залізничному транспорті*, 6, 91–97. [Dolyna L.F., Kozachyna V.A., Prystyn'skyi V.V. Monitoring the atmospheric air pollution by benzo(a)pyrene and hydrocarbons. *Electromagnetic Compatibility and Railway Safety*, 6, 91–97. <https://doi.org/10.15802/ecsr2013/51294>]
- Илькун Г.М. (1978). Газоустойчивость растений. Київ: Наукова Думка. 142 с. [Il'kun G.M. (1978). *Gas resistance of plants*. Kyiv: Naukova Dumka. 142 p.]
- Кавеленова Л.М., Лищинская С.Н., Карандаева Л.Н. (2001). Особенности сезонной динамики водорастворимых фенольных соединений в листьях березы повислой в условиях урбосреды в лесостепи (на примере Самары). *Химия растительного сырья*, 3, 91–96. [Kavelenova L.M., Lishchinskaya S.N., Karandayeva L.N. (2001). Peculiarities in the seasonal dynamics of water-soluble phenolic compounds in the leaves of European white birch under the conditions of the urban environment in the forest steppe ecotone (using Samara region as an example). *Chemistry of plant raw materials*, 3, 91–96.]
- Капелюш Н.В., Бессонова В.П. (2007). Середовищеочищувальна роль *Platanus orientalis* у насадженнях санітарно-гігієнічного призначення. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*, 15(1), 59–66. <https://doi.org/10.15421/010711> [Kapelyush N.V., Bessonova V.P. (2007). The role of *Platanus orientalis* in sanitary and hygienic plantations as a universal biofilter. *Biosystems Diversity*, 15(1), 59–66. <https://doi.org/10.15421/010711>]
- Кипоть Н.С., Белопощенко В.П., Некомнящая А.С., Стеценко Е.А. (1976). О производстве фенольных продуктов на коксохимических заводах Украины. *Кокс и химия*, 5, 31–34. [Kipot' N.S., Vyeloposhchenko V.P., Nekomnyashchaya A.S., Stetsenko Ye.A. (1976). On the production of phenolic compounds at the Ukrainian coke plants. *Coke and Chemistry*, 5, 31–34.]
- Полторацька В.М. (2014). Системний аналіз визначення ступеня забруднення атмосфери викидами шкідливих речовин від автотранспорту та стаціонарних джерел коксохімічного виробництва ПАТ "Євраз ДМЗ ім. Петровського" на основі натурних спостережень та даних розрахунків на ЕОМ. *Вісник Придніпровської державної академії будівництва та архітектури*, 3, 27–37. [Poltorats'ka V.M. (2014). System analysis of the assessment of the degree of atmospheric pollution by emissions of harmful substances from vehicles and stationary sources of industrial production of coke at the "Petrovsky Evraz DMZ" PJSC on the basis of field observations and data analysis performed with the help of a personal electronic computer. *Bulletin of the Pridneprovsk State Academy of Civil Engineering and Architecture*, 3, 27–37.]
- Поліщук С.З., Полторацька В.М., Мінков Ю.І. (2012). Аналіз розподілу приземних концентрацій забруднюючих речовин на границі СЗЗ коксохімічного виробництва ПАТ "Євраз ДМЗ ім. Петровського" по даним натурних спостережень та розрахунків на ПЕОМ. *Збірник наукових праць Національного гірничого університету*, 38, 172–178. [Polishchuk S.Z., Poltorats'ka V.M., Minkov Yu.I. (2012). Analysis of the distribution of surface concentrations of pollutants at the boundary of a sanitary protection zone at the "Petrovsky Evraz DMZ" PJSC coke plant according to the field observations and calculations performed using a personal electronic computer. *Proceedings of the National Mining University*, 38, 172–178.]
- Сергейчик С.А. (1984). Древесные растения и промышленная среда. Минск: Наука и техника. 168 с. [Sergeyuchik S.A. (1984). *Woody plants and the industrial environment*. Minsk: Nauka i tekhnika. 168 p.]
- Тарабрин В.П., Кондратюк Е.Н., Башкатов В.Г. и др. (1986). Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. Киев: Наукова думка. 216 с. [Tarabrin V.P., Kondratyuk V.N., Bashkatov V.G. et al. (1986). *Phytotoxicity of organic and inorganic pollutants*. Kyiv: Naukova dumka, 1986. 216 p.]
- Тоуэрс Г.Х.Н. (1968). Метаболизм фенолов в высших растениях и микроорганизмах / Биохимия фенольных соединений. М.: Мир. С. 200–233. [Towers G.Kh.N. (1968). Metabolism of phenolic compounds in higher plants and microorganisms. *Biochemistry of phenolic compounds*. Moscow: Mir, pp. 200–233.]
- Угрехелидзе Д.Ш. (1976). Метаболизм экзогенных алканов и ароматических углеводородов в растениях. Тбилиси: Мецниереба. 224 с. [Ugrekheldize D.Sh. (1976). Metabolism of exogenous alkanes and aromatic hydrocarbons in plants. Tbilisi: Metzniereba. 224 p.]

- Угрєхєлїдзє Д.Ш., Цєвєлїдзє Д.Ш. (1967). Усвоєнїє фєнолє высшїмї рєстєнїямї. *Сooбщ. АН ГрузССР*, 47(1), 43–49. [Ugrekhelidze D.Sh., Tsevelidze D.Sh. (1967). The absorption of phenolic compounds by higher plants. *Proceedings of the Academy of Sciences of GeorgSSR*, 47(1), 43–49.]
- Угрєхєлїдзє Д.Ш., Дурмїшїдзє С.В. (1984). Поступлєнїє и дєтoксїкєцїє оргєнїчєскїх ксєнoбїoтїкoв в рєстєнїях. Тбїлїсї: Мєцнїєрєбє. 230 с. [Ugrekhelidze D.Sh., Durmishidze S.V. (1984). *The intake and detoxification of organic xenobiotics in plants*. Tbilisi: Metzniyereba. 230 p.]
- Фєщєнкo О.Л., Камєнєвє Н.В. (2016). Оцїнкє вплїву дїєлїнoстї мєтєлургїєнїх пїдпрїємств нє навкoлїшнє рєсєрєдoвїщє Укрєїнї. *Інвєстїцїї: прєктїкє тє дoсвїд*, 2, 28–32. [Feshchenko O.L., Kameneva N.V. (2016). Assessment of the impact of metallurgical enterprises on the environment of Ukraine. *Investytsiyi: praktyka ta dosvid*, 2, 28–32.]
- Agostini E.I., Talano M.A., González P.S. et al. (2010). Phytoremediation of phenolic compounds: Recent advances and perspectives / In: I.A.Golubev (ed.) *Handbook of Phytoremediation*. Vol.1. Nova Science Publishers, pp. 1–50.
- Gami A.A., Shukor M.Y., Khalil K.A. et al. (2014). Phenol and its toxicity. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*, 2(1), 11–24.
- Ghorani-Azam A., Riahi-Zanjani B., Balali-Mood M. (2016). Effects of air pollution on human health and practical measures for prevention in Iran. *Journal of Research in Medical Sciences*, 21(65), 24–29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.189646>
- Glass A.D.M., Bohm B.A. (1971). The uptake of simple phenols by barley roots. *Planta*, 100(2), 93–105. <https://doi.org/10.1007/BF00385211>
- Klimov P., Basilaia M. (2017). Estimation of atmospheric air pollution and health risk for Rostov-on-Don population. *Science Almanac of Black Sea region countries*, 10(2), 44–48. <https://doi.org/10.23947/2414-1143-2017-10-2-44-48>
- Lin J., Reddy M., Moorthi V., Qoma B.E. (2008). Bacterial removal of toxic phenols from an industrial effluent. *African Journal of Biotechnology*, 7(13), 2232–2238.
- Michałowicz J., Duda W. (2007). Phenols – sources and toxicity. *Polish J. of Environ. Stud.*, 16(3), 347–362.
- Sklyarenko A.V., Bessonova V.P. (2018). Accumulation of sulfur and glutathione in leaves of woody plants growing under the conditions of outdoor air pollution by sulfur dioxide. *Biosystems Diversity*, 26(4), 334–338. <https://doi.org/10.15421/011849>
- Swain T., Hillis W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. – The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63–68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Wei X., Lyu S., Yu Y. et al. (2017). Phylloremediation of air pollutants: exploiting the potential of plant leaves and leaf-associated microbes. *Frontiers in Plant Science*, 8(1318), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01318>

The content of water-soluble phenolic compounds in the leaves of woody plants growing in the area of sanitary protection zones of enterprises of the industrial region of Zaporizhzhya

A.V. Sklyarenko, V.P. Bessonova

The article presents the results of studying the accumulation of water-soluble phenolic compounds in the leaves of woody plants growing in the area of sanitary protection zones of a number of enterprises of Zaporizhzhya: Zaporizhzhya Titanium & Magnesium Combine, Zaporizhzhya Aluminium Plant, Zaporizhzhya Abrasive Plant, Zaporizhstal, Zaporizhcoke, Zaporizhzhya Ferroalloy Plant, Zaporizhvohnetryv, Ukrgrafit and Zaporizhtransformator. The concentration of phenolic compounds was found to be significantly higher under the technogenic conditions compared to the relatively "clean" area. Their highest concentration was found in the leaves of woody plants growing in the forest belt near the Zaporizhcoke plant. For the level of accumulation in the organs of assimilation of trees, and thereby for the degree of air pollution by the phenolic compounds, enterprises can be ranked as follows: Zaporizhcoke > Zaporizhstal ≥ Zaporizhzhya Ferroalloy Plant > Zaporizhvohnetryv > Ukrgrafit > Zaporizhzhya Aluminium Plant > Zaporizhzhya Titanium & Magnesium Combine > Zaporizhzhya Abrasive Plant > Zaporizhtransformator. Depending on the level of accumulation of phenolic compounds in the leaves, the plants have been divided into three groups. The largest amount of the pollutant, compared to the other species of woody plants, is being accumulated by the leaves of the following species: *Ailanthus altissima*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus pyramidalis*, *Populus simonii*, *Elaeagnus angustifolia*, and the least amount – by *Morus alba*, *Robinia pseudoacacia*, *Tilia cordata*, *Ulmus carpinifolia*, *Armeniaca vulgaris*, *Fraxinus lanceolata*. The following species occupy the intermediate position between the two groups: *Acer negundo*, *Acer platanoides*, *Aesculus hippocastanum*, *Catalpa bignonioides*, *Salix alba*, *Ulmus laevis*. The tree species that can be characterized by their capacity to accumulate the highest concentration of water-soluble phenolic compounds may be recommended for the purpose of purification of atmospheric air. The following plant species, which turned to be the most sensitive indicators of air pollution, have been listed in a descending order

according to the value of the coefficient of relative accumulation of phenolic compounds. Such species include *Betula pendula*, *Catalpa bignonioides*, *Elaeagnus angustifolia*, *Ailanthus altissima*, *Populus simonii*, *Acer negundo*, *Ulmus laevis* and *Fraxinus lanceolata*.

Key words: sanitary protection zones, green plantations, air pollution, content of phenols, coefficient of pollutant accumulation, phytoindicators.

About the authors:

A.V. Sklyarenko – Dnipro State Agrarian and Economic University, Sergiy Yefremov Str., 25, Dnipro, Ukraine, 49600, s-k2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4954-5007>

V.P. Bessonova – Dnipro State Agrarian and Economic University, Sergiy Yefremov Str., 25, Dnipro, Ukraine, 49600, bessonova18@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-4310-0971>

**Содержание водорастворимых фенолов в листьях древесных растений
санитарно-защитных зон заводов промышленной зоны Запорожья
А.В. Складенко, В.П. Бессонова**

Представлены результаты изучения накопления водорастворимых фенолов в листьях древесных растений санитарно-защитных насаждений промышленных предприятий г. Запорожье: Титаномагнийевый, Алюминиевый, Абразивный комбинаты, Запорожсталь, Коксохимический, Ферросплавный, Огнеупор, Украинский графит и Трансформаторный. Установлено значительно более высокое содержание фенольных соединений у растений, растущих в техногенных условиях по сравнению с контролем – «чистой зоной». Самые высокие концентрации фенолов обнаружены в листьях древесных растений лесополосы у завода Коксохим. По уровню аккумуляции в листьях деревьев санитарно-защитной зоны, а, значит, по степени загрязнения воздуха поллютантом, предприятия можно ранжировать следующим образом: Коксохим > Запорожсталь ≥ завод Ферросплавов > Огнеупор > Укрграфит > Алюминиевый > Титаномагнийевый комбинат > Абразивный > Трансформаторный завод. В зависимости от количества накапливающихся в листьях фенолов растения разделены на три группы. Максимальное количество поллютанта по сравнению с другими видами древесных растений накапливают листья деревьев следующих видов: *Ailanthus altissima*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus pyramidalis*, *Populus simonii*, *Elaeagnus angustifolia*, наименьшее – *Morus alba*, *Robinia pseudoacacia*, *Tilia cordata*, *Ulmus carpinifolia*, *Armeniaca vulgaris*, *Fraxinus lanceolata*. Промежуточное положение между этими двумя группами занимают: *Acer negundo*, *Acer platanoides*, *Aesculus hippocastanum*, *Catalpa bignonioides*, *Salix alba*, *Ulmus laevis*. Виды деревьев, которые характеризуются наибольшим накоплением водорастворимых фенолов, могут быть рекомендованы для оздоровления атмосферного воздуха. По величине коэффициента относительного накопления фенольных соединений выделены виды растений, которые являются наиболее информативными тест-объектами загрязнения атмосферного воздуха. К этим растениям отнесены *Betula pendula*, *Catalpa bignonioides*, *Elaeagnus angustifolia*, *Ailanthus altissima*, *Populus simonii*, *Acer negundo*, *Ulmus laevis* и *Fraxinus lanceolata*.

Ключевые слова: защитные полосы, зеленые насаждения, загрязнение воздуха, содержание фенолов, коэффициент накопления поллютанта, фитоиндикаторы.

Об авторах:

А.В. Складенко – Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, ул. Сергея Ефремова, 25, Днепр, Украина, 49600, s-k2015@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-4954-5007>

В.П. Бессонова – Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, ул. Сергея Ефремова, 25, Днепр, Украина, 49600, bessonova18@i.ua, <https://orcid.org/0000-0002-4310-0971>

Представлено: І.О.Зайцева / Presented by: I.O.Zaytseva

Рецензент: О.О.Авксентьєва / Reviewer: O.O.Avksentieva

Подано до редакції / Received: 25.02.2020

UDC: 581.1:581.8

Photochemical activity of chloroplasts of isogenic lines (*E* genes) of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under different periods of red-light irradiation

V.F. Timoshenko, V.V. Zhmurko

The effect of different periods of red-light (RL, 660 nm) irradiation of plants on the biomass, leaf area, chlorophyll content, level of the Hill reaction and photophosphorylation in short-day (SD) and photoperiodical neutral (PhPN) lines of soybean have been studied in vegetation experiments. The objects of study were the isogenic lines (*E* genes) of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), Clark variety. The SD (*E1E2E3*) and PhPN lines (*e1e2e3*) were used. The plants were grown in a vegetation chamber in the soil culture (black soil). Plants of SD and PhPN lines were grown in 9 vessels of three liters volume. 10–12 plants were grown in each vessel. The constant growing conditions were provided during the experiment: temperature – 20–24/17–20°C (day/night), soil moisture – 60–70 % of the total soil moisture content, intensity of illumination – 20 klx, photoperiod duration – 10 hours. After 4–5 weeks of vegetation (after the second true leaf formation), plants of each line in three vessels were irradiated for 30 minutes with low intensity red light at the beginning (experiment 1) or in the middle of the dark period (experiment 2). The light diodes emitting in the region of 630±10 nm were used for plant irradiation. Other plants in three vessels of each line, which were not illuminated by the red light, were used as a control group. It was shown that under the short day the SD line in the control group passed to flowering 43±1.8 days after germination and PhPN line – 44±2.2 days after germination. The red-light irradiation, both before the beginning and in the middle of night, caused a delay of the transition to flowering in the SD line by 5±1 and 7±2.2 days, respectively. In the PhPN line, changing flowering period due to RL was not established. In the SD line, activation of the phytochromes by RL before the dark period caused an increase of the biomass, leaf area, total chlorophyll content, reduction of potassium ferrocyanide and photophosphorylation by isolated chloroplasts per chlorophyll of one leaf. While interruption of the night by RL caused decrease of these parameters and Hill reaction intensity per 1 mg of chlorophyll. The effect of RL on the studied parameters in the PhPN soybean line has not been detected.

Key words: soybean *Glycine max* (L.) Merr., isogenic lines, phytochrome, photochemical activity of chloroplasts, morphogenesis.

About the authors:

V.F. Timoshenko – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, vtimoshenko56@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9345-6661>

V.V. Zhmurko – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Introduction

In the process of plant ontogeny, the changes occur in the formation of their attracting organs. Plant growth, development and photosynthesis are changed by environmental factors, of which light is very important (Voskresenskaya, 1987). The main regulator of morphogenesis, which affects the vast majority of metabolic processes, is the phytochrome system. Phytochromes are activated by red light (RL) with a wavelength of 660 nm, while light of 730 nm translates the phytochrome into an inactive form (Qvail, 2010). The literature provides data of many physiological effects of RL, one of which is related to the carbohydrate metabolism of plants. It was shown that interruption of the dark period by RL in the short-day photoperiodic cycle caused a significant decrease of the outflow of carbohydrates from the leaves (Tsybulko, 1998). According to the author, this is one of the reasons of a delay of the transition to flowering of short-day plants under short photoperiod. It was also shown that in the afternoon, RL irradiation caused a change in the dynamics of carbohydrate content (Timoshenko, Zhmurko, 2013) and the activity of sucrose phosphate synthase, which is one of the key enzymes of sucrose synthesis (Shchegolev, Zhmurko, 2013).

In experiments with winter wheat varieties manifested long-day (LD), short-day (SD) and photoperiodical neutral (PhPN) reactions to the photoperiod duration, it was shown that during the interruption of the long dark period in the SD photoperiodic cycle, the LD varieties accelerated the transition to spinning, SD delayed it and PhPN did not respond to such influence (Zhmurko et al., 1997). At the same time, LD significantly increased the outflow of carbohydrates from the leaf, and SD significantly decreased (Zhmurko, 2009).

Under conditions of an interruption of the dark period, the activity of oxidoreductases and ATPase increased in the SD variety, but in the LD variety it decreased (Zhmurko, 2009).

Therefore, in plants of winter type of development, effects are manifested from the activation of phytochromes. The effects are similar to those of plants of the spring type of development of different photoperiodic groups.

The above also indicates that an activation of phytochromes affects the metabolism of carbohydrates of plants of different photoperiodic groups.

To determine the role of the phytochrome system in regulating the process of plant transition to flowering and in the photoperiodic reaction, it is important to study the effect of phytochromes on the photosynthetic characteristics. According to Tsybulko, the role of photosynthesis in the photoperiodic response of plants is important, but there is no consensus about the presence and nature of such a link among scientists (Tsybulko, 1998). In addition, photosynthesis was generally considered as the process of formation of organic compounds. However, primary photosynthesis reactions provide energy, along with secondary photosynthesis reactions, other physiological and biochemical processes. In particular, photosynthesis supplies energy and plastic substances for forming processes in apices of shoots during the photoperiodic reaction of plants.

The question of the possible involvement of photoperiodic sensitivity genes in the photosynthesis regulation under the activation of phytochromes remains unknown, although these genes play an important role in the initiation of flowering (Chincinska et al., 2008; Matsoukas et al., 2012).

From this point of view, in order to study this issue it is advisable to use the near isogenic lines of plants, carrying genes of photoperiodic sensitivity control, as a plant material. In particular, these may be soybean plants, in which the genes that control the time from germination to flowering (*E* genes) have been identified. Today, in soybean 8 major early maturity *E*-series genes have been identified that control time to flowering and ripening: *E1*, *E2*, *E3* (Buzzell, 1971), *E4* (Buzzell, Voldeng, 1980), *E5* (McBlain, Bernard, 1987), *E6* (Bonato, Velio, 1999), *E7* (Cober, Voldeng, 2001) and *E8* (Cober et al., 2010), as well as the locus *J* (long juvenile). In the presence of the last locus, soybean plants bloom late even under the short day (Ray et al., 1995).

According to the above, the purpose of our research was to study the effect of different activation periods of phytochromes by RL (660 nm) on the biomass, leaf area, chlorophyll content, Hill reaction and photophosphorylation in the SD and PhPN isogenic lines of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.).

Materials and methods

The objects of study were isogenic lines (*E* genes) of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Clark. We used the SD line (*E1E2E3*) and PhPN line (*e1e2e3*). The seeds of the lines were obtained at the National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine and were reproduced at the experimental site of the Department of Plant and Microorganisms Physiology and Biochemistry of V.N.Karazin KhNU. Since soybeans are self-pollinated, the genetic homogeneity of the lines has been maintained by control to prevent mechanical mixing of the seeds of the different lines during harvesting.

The plants were grown in the vegetation chamber of the Department of Plant and Microorganisms Physiology and Biochemistry of V.N.Karazin KhNU in the soil culture (black soil). The SD and PhPN plants were grown in 9 vessels of three liters volume. 10–12 plants were grown in each vessel. The constant growing conditions have been provided during the experiment: temperature – 20–24/17–20°C (day/night), soil moisture – 60–70 % of the total soil moisture content, intensity of illumination – 20 klx, photoperiod duration – 10 hours. After 4–5 weeks of vegetation (after the second true leaf formation), plants of each line in three vessels were irradiated for 30 minutes with low intensity of red light at the beginning (experiment 1) and in the middle of the dark period (experiment 2). The light diodes emitting in the region of 630±10 nm were used for plant irradiation. Other plants in three vessels of each line, which were not illuminated by the red light, were used as a control group.

A fully developed second leaf from the apex was taken into the analysis. Biomass and leaf area were evaluated after sevenfold irradiation. Sampling for the analyzes of the photochemical activity of isolated chloroplasts was performed at 9.00 and 13.00 after fourfold and sevenfold irradiation of plants.

The content of chlorophyll was determined by spectrophotometric method after extraction of chlorophyll with 80 % acetone at a wavelength of 663 and 645 nm. The photochemical activity of chloroplasts (Hill reaction) was determined by the rate of reduction of potassium ferricyanide, photophosphorylation – by reducing the content of inorganic phosphate in the reaction mixture of the Hill reaction (containing KH_2PO_4 and ADP) (Gavrilenko et al., 1975). PA (Pure for Analysis) reagents were used for the analyzes. The leaf area was determined using the program "Photo M".

The significance of differences was calculated using the Student's *t*-test (Dospekhov, 1972). The tables present average values of 6–8 definitions.

Results and discussion

Phenological observations made it possible to establish that plants of the control group of two soybean lines bloomed almost simultaneously. Under the short day, SD plants bloomed 43 ± 1.8 days after germination. PhPN plants bloomed 44 ± 2.2 days after germination. As for the effect of red light at the flowering period, in both cases, both irradiation before beginning of the dark period and interruption of the night by red light, caused a delay of the transition to flowering of SD plants. Under RL irradiation before beginning of the dark period, the delay was 5 ± 1.0 days and under irradiation in the middle of night, the SD line bloomed 7 ± 2.2 days later than the control plants. The effect of RL on the change of flowering period in the PhPN line was not detected.

Studying the effect of RL on photosynthetic processes, we began by determining the change of biomass after irradiation of plants. Fig. 1 shows the values of dry biomass of control plants and irradiated plants. In the SD line, the result of exposure to the red light depended on the period of plant irradiation. Irradiation before the start of dark period accelerated the biomass growth. After seven exposures it was greater than the control by 15%. Whereas, after interruption of the night by RL, it was found a decrease of the biomass of irradiated plants compared to the control (after seven illuminations – by 13%). We have not established a biomass change of the PhPN line under the RL influence. Shpilova and Shchegolev observed earlier the varietal differences of growth reaction of tomatoes under the RL influence. Thus, during week after the termination of the RL irradiation, the plant biomass of the early Kremenchuk variety, breeding by the Ukrainian Institute of Vegetables and Melon Growing, continued to grow relatively to control. The changes for the late Ace 55 vf variety (Asgrow company) were not observed (Shpilova, Shchegolev, 2008).

The decrease of biomass that we observed in the SD soybean plants after interruption of night by RL may be explained by the fact that a long dark period is required for the complete outflow from photosynthetic organs of assimilates. An interruption of the dark period can disrupt starch hydrolysis in chloroplasts at night and outflow of carbohydrates from leaves (Tsybulko, 1998). A disruption of outflow, in turn, can cause a deficit of support of plastics and energy equivalents required for growth processes.

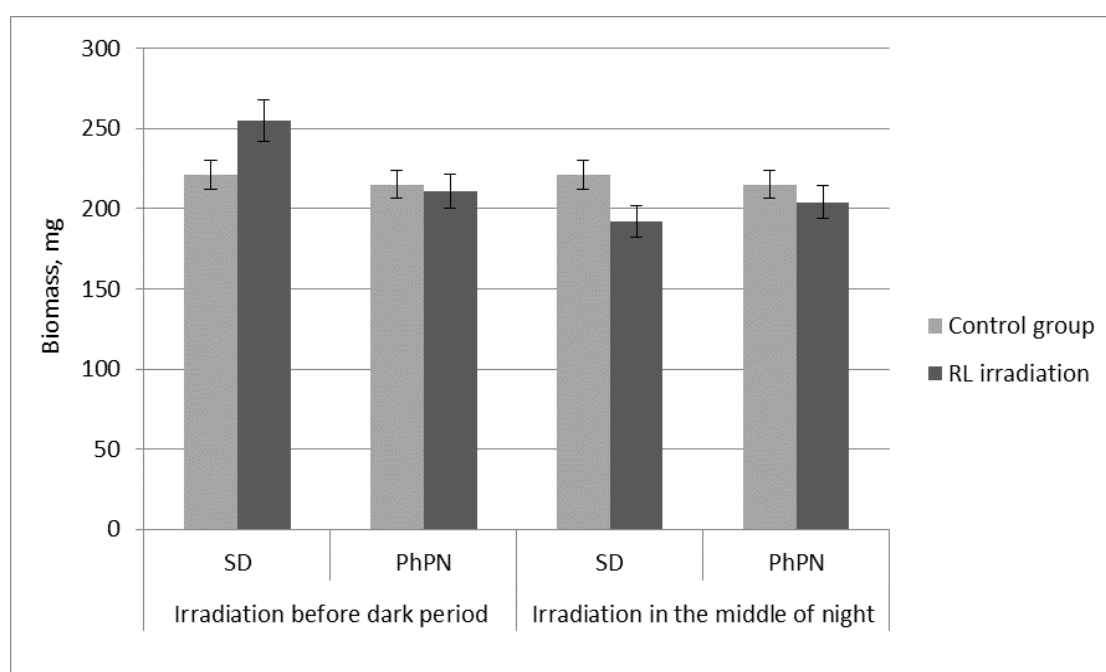


Fig. 1. Effect of RL on a biomass of the SD and PhPN soybean lines under different times of RL irradiation

It is known that a support of growth with assimilates determines the photosynthetic apparatus and processes of transport of assimilates to the attracting organs (Martirosyan et al., 2013; Tsybulko, 1998). For studying the productivity of photosynthesis, the indicators characterizing the size of the photosynthetic apparatus and the intensity of its functioning should be estimated. In response to RL, we consider extensive indicators including an area of the leaves as the main photosynthetic organs and content of chlorophyll in leaves; the indicators of the intensity of photosynthetic apparatus including the rate of photochemical reactions.

The study of the total area of leaves (table 1) showed that in the SD line the RL irradiation before the dark period caused the growth of photosynthetic surface. An interruption of night by the illumination of RL, in contrast, led to a decrease of the size of the total leaf area compared with control plants.

In addition, we analyzed effect of RL on an area of the second leaf from the apex. Because, as we know, the second leaf is fully formed and has the highest photosynthetic activity (Mokronosov, Gavrilenko, 1992). We used it for physiological and biochemical analyzes. The analysis of the second leaf area of the SD line showed the same directionality of changes under the RL influence. However, larger difference of its size between the control and irradiated plants was shown than of the total area of leaves. Thus, the second leaf area of SD plants irradiated with RL before night was 13 % higher than in the control, and this difference was 7 % for the total area. Under an interruption of night by RL, the reduction of the area of second leaves relatively to the control was 16 % and of the total area of leaves – 10 %. This pattern may be due to the fact that second leaves from the apex are formed when the RL irradiation has been carrying out.

As for different effects of the evening and night RL irradiation on growth processes, we believe that the stimulating effect of evening RL irradiation on the SD line can be considered as a reaction of short-day plants to increase the duration of photoperiod, which is manifested in the vegetative growth and delay of development. The decrease of leaf surface as a result of an interruption of night by RL can be a result of metabolic disorders (Tsybulko, 1998).

The effects of RL irradiation on the area of leaves of the PhPN line were not observed in our experiments.

Table 1.
Leaf surface area of the SD and PhPN isogenic soybean lines (cm²) under the RL irradiation

Variant	The total leaves area		The second leaf area	
	Exposure time			
	Before dark period	In the middle of night	Before dark period	In the middle of night
SD line, genotype $E_1E_2E_3$				
Control group	96.3 ± 4.8	96.3 ± 4.8	32.6 ± 1.6	32.6 ± 1.6
RL irradiation	102.8* ± 5.2	85.7* ± 5.0	35.9* ± 1.5	29.2* ± 1.4
PhPN line, genotype $e_1e_2e_3$				
Control group	95.4 ± 5.1	95.4 ± 5.1	29.4 ± 1.6	29.4 ± 1.6
RL irradiation	96.2 ± 14	96.1 ± 13	30.7 ± 1.7	28.5 ± 1.4

* differences with control are significant: $P \leq 0.05$.

One of the important criteria of evaluating the plant photosynthetic potential is the content of photosynthetic pigments. The determination of the content of main photosynthetic pigments chlorophylls showed (table 2) that in the SD plants the RL irradiation before the dark period led to an increase of the content of chlorophyll sum in leaves compared with the control plants irradiated four and seven times. An interruption of night by the RL irradiation in this line caused a decrease of the chlorophyll content. In PhPN plants effects of RL on the content of chlorophylls were not detected either in the case of evening irradiation or after night irradiation.

The stimulating effect of RL on the chlorophyll content was observed by other authors (Golovatskaya et al., 2012), when the RL irradiation had been conducting during the light period. RL decreased the lag-phase of the chlorophyll synthesis and increased its content. We obtained a similar result in the SD line under the RL irradiation at the end of the light period. But during the interruption of night by RL in the SD line there was a decrease of the chlorophyll content. This can be explained as

follows. An interruption of the night, according to Tsybulko, disrupts the hydrolysis of starch in chloroplasts (Tsybulko, 1998). Carbohydrates are also known to be a source of carbon skeleton for the synthesis of organic compounds including chlorophyll. It is likely that disruption of starch hydrolysis after the interruption of night by RL resulted in a decrease in the chlorophyll synthesis.

Table 2.
Influence of different RL irradiation terms (before dark period and at night) on the content of chlorophyll sum in leaves of the SD and PhPN isogenic lines

Variant	Number of exposures	Chlorophyll content, mg/g wet weight	
		Before dark period	In the middle of night
SD line, genotype $E_1E_2E_3$			
Control group	–	1.01 ± 0.05	1.01 ± 0.05
RL irradiation	4	1.12* ± 0.05	0.83* ± 0.06
Control group	–	1.03 ± 0.04	1.03 ± 0.04
RL irradiation	7	1.21* ± 0.06	0.76* ± 0.06
PhPN line, genotype $e_1e_2e_3$			
Control group	-	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04
RL irradiation	4	1.02 ± 0.06	0.96 ± 0.05
Control group	-	1.02 ± 0.05	1.02 ± 0.05
RL irradiation	7	1.06 ± 0.06	0.94 ± 0.06

* differences with control are significant: $P \leq 0.05$.

The central process of primary photosynthesis reactions is a transport of electrons in the electron transport chain (ETC) of chloroplasts. The Hill reaction is the model reaction that characterizes the electron transfer intensity through ETC. This reaction has similar dynamics of changes under the influence of external factors with photosynthesis as a whole (Mokronosov, Gavrilenko, 1992). The results of the analysis of the RL influence on the Hill reaction are presented in table 3. Since the photochemical activity of chloroplasts is a dynamic indicator, we have evaluated the reaction twice a day: in the morning – at 9.00 and in the afternoon – at 13.00. Table 3 shows that a level of potassium ferrocyanide reduction in the afternoon was lower than in the morning. The decrease of the rate of the Hill reaction may be explained by the increase of starch content in the chloroplasts in the afternoon, which is characteristic of soybean plants. Starch overflow of plastids reduces the level of photochemical processes. It may be due to the deterioration of the mode of illumination of light harvesting complexes, mechanical influence of starch on functional membranes and sorption of proteins on the starch particles. Both enzymes of secondary photosynthesis reactions and ferredoxin, which is a surface protein of thylakoid membranes, can be sorbed on the starch. Moreover, a starch binds cations on its surface, in particular Mg^{2+} cations, which are cofactors of the Hill reaction (Mokronosov, Gavrilenko, 1992).

After the RL irradiation in the evening, the level of specific activity of the Hill reaction did not change in the SD and PhPN lines compared to the control. Irradiation with RL in the middle of the night reduced the reaction level of the SD line relative to control in the morning and afternoon, but did not affect the electron transport in the PhPN line. The decrease of the level of photochemical activity of chloroplasts under RL effect on *Triticum aestivum* L. was previously observed by Mokronosov and co-authors (Mokronosov, Gavrilenko, 1992). In their experiments, it was shown that plants grown under RL had two-fold lower Hill reaction rate compared to plants grown under white light. The authors explained this effect by changes of the biosynthesis of chloroplast electron transport proteins. According to authors, the reason of the decrease of the electron transport intensity after RL irradiation is reducing the activity of the water photolysis system in photosystem II. But we supposed that in our experiments a decrease of the rate of potassium ferricyanide reducing by chloroplasts is the result of interruption of night outflow of assimilates in SD lines, since in the PhPN line RL radiation line did not change the photochemical activity of chloroplasts. Moreover, in the SD line after evening RL irradiation the level of Hill reaction also did not change.

Studying the photochemical activity of chloroplasts, in addition to the reducing potassium ferricyanide, we determined the intensity of reduction of the mineral phosphorus content in the reaction mixture. These data were used to evaluate the speed of photophosphorylation processes. The results in

table 4 indicate that no significant change of the rate of photophosphorylation after evening and night RL irradiation in both lines occurred. The absence of the photophosphorylation decrease is notable as a result of interruption of the night by RL in the SD line, because there was a decrease of the level of potassium ferricyanide reducing. A decrease of the rate of potassium ferricyanide reducing indicates a decrease of the rate of non-cyclic electron transport. If so, then the proton gradient generated by non-cyclic electron transport should also decrease. The latter may be a decrease of the intensity of photophosphorylation. At the same time, literature data indicate that cyclic photophosphorylation can be compensated by reducing the rate of non-cyclic transport. In cyclic photophosphorylation, only the first photosystem is involved and the process is not related to the reducing of potassium ferricyanide (Mokronosov, Gavrilenko, 1992). Thus, the contradictions between a decrease of non-cyclic electron transfer in the SD line as a result of an interruption of night by RL and the unchanged level of photophosphorylation can be explained by the compensation of a decrease of non-cyclic photophosphorylation by an increase of the cyclic photophosphorylation intensity.

Table 3.
Photochemical activity of chloroplasts ($\mu\text{mol K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{mg}$ chlorophyll per hour) of the SD and PhPN isogenic soybean lines under different RL irradiation terms

Variant	Number of exposures	Photochemical activity in the morning (9.00)		Photochemical activity in the afternoon (13.00)	
		Exposure time			
		Before dark period	In the middle of night	Before dark period	In the middle of night
SD line, genotype $E_1E_2E_3$					
Control group	–	281 ± 14	281 ± 14	255 ± 11	255 ± 11
RL irradiation	4	297 ± 15	225* ± 13	270 ± 11	217* ± 15
Control group	–	275 ± 13	275 ± 13	241 ± 10	241 ± 10
RL irradiation	7	289 ± 15	226* ± 10	256 ± 12	206* ± 10
PhPN line, genotype $e_1e_2e_3$					
Control group	-	290 ± 14	290 ± 14	248 ± 12	248 ± 12
RL irradiation	4	285 ± 16	259 ± 13	243 ± 14	236 ± 15
Control group	-	272 ± 14	272 ± 14	239 ± 13	239 ± 13
RL irradiation	7	288 ± 15	253 ± 15	255 ± 14	226 ± 15

* differences with control are significant: $P \leq 0.05$.

Table 4.
Photophosphorylation ($\mu\text{mol KH}_2\text{PO}_4/\text{mg}$ chlorophyll per hour) in isolated chloroplasts of SD and PhPN isogenic soybean lines under different RL irradiation terms

Variant	Photophosphorylation in the morning (9.00)		Photophosphorylation in the afternoon (13.00)	
	Exposure time			
	Before dark period	In the middle of night	Before dark period	In the middle of night
SD line, genotype $E_1E_2E_3$				
Control group	118 ± 5.9	118 ± 5.9	105 ± 6.7	105 ± 6.7
RL irradiation	113 ± 5.5	110 ± 6.3	101 ± 6.6	98 ± 5.3
PhPN line, genotype $e_1e_2e_3$				
Control group	114 ± 6.1	114 ± 6.1	104 ± 4.7	104 ± 4.7
RL irradiation	118 ± 6.7	117 ± 6.6	108 ± 14	109 ± 4.8

* differences with control are significant: $P \leq 0.05$.

The intensity of functioning of the photosynthetic apparatus and the content of chlorophyll, by which we calculated the rate of Hill reaction and photophosphorylation, in some cases did not change in one direction. Therefore, we have studied the effect of RL on indicators that take both of these values into

account at the same time. We analyzed the effect of RL irradiation on the Hill reaction level and photophosphorylation based on the chlorophyll of one leaf (second from the apex) (Table 5). For this purpose, in each experiment we determined the weight of leaves, and knowing the chlorophyll content in one gram of leaves and the photochemical activity attributed to one milligram of chlorophyll, made the appropriate calculations. These indicators are also interesting because they also take into account the size of leaves, which also changed after RL irradiation in the SD line. Data obtained (Table 5) indicate that evening irradiation by RL in the SD line resulted in an increase of ferricyanide reducing and photophosphorylation of one leaf by 38 % and 27 %, respectively, and interruption of night by RL reduced these rates by 45 % and 36 %, respectively, compared to the control. In PhPN plants after irradiation the intensity of ferricyanide reducing and photophosphorylation based on chlorophyll of 1 leaf did not change significantly.

Table 5.
Photochemical activity of chloroplasts of the SD and PhPN isogenic lines under different RL irradiation terms

Variant	Hill reaction ($\mu\text{mol K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{chlorophyll of 1 leaf} \cdot \text{hour}$)		Photophosphorylation ($\mu\text{mol KH}_2\text{PO}_4/\text{chlorophyll of 1 leaf} \cdot \text{hour}$)	
	Exposure time			
	Before dark period	In the middle of night	Before dark period	In the middle of night
SD line, genotype $E_1E_2E_3$				
Control group	110 ± 16	110 ± 16	47 ± 4.9	47 ± 4.9
RL irradiation	152* ± 18	61* ± 14	60* ± 5.5	30* ± 5.2
PhPN line, genotype $e_1e_2e_3$				
Control group	109 ± 15	109 ± 16	46 ± 4.1	46 ± 4.1
RL irradiation	124 ± 17	90 ± 14	51 ± 5.7	42 ± 4.6

* differences with control are significant: $P \leq 0.05$.

Thus, our research showed that photosynthetic apparatus of plants of isolines of the same variety, but with different reactions to the duration of photoperiod, responded differently to red light. It is known that the phytochrome system is important for plants to perceive alternating day and night. "Matching" phytochrome signals with circadian rhythms, plants can respond to the duration of photoperiod (Salomé et al., 2002; Lagercrantz, 2009). It can be assumed that control of the photosynthetic apparatus by the phytochrome system and participation in the photoperiodic reaction of plants are interrelated, because red light induced changes of the chlorophyll content and photochemical activity of chloroplasts in the short-day line. However, in the photoperiodical neutral line changes were not observed. It is likely that a state of the *E* (dominant or recessive) genes indirectly effect on the photosynthetic apparatus.

References

- Bonato E.R., Velio N.A. (1999). *E6*, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans. *Genet. Mol. Biol.*, 22, 229–232. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000200016>
- Buzzell R.I. (1971). Inheritance of a soybean flowering response to fluorescent daylength conditions. *Can. J. Genet. Cytol.*, 13, 703–707. <https://doi.org/10.1139/g71-100>
- Buzzell R.I., Voldeng H.D. (1980). Inheritance of insensitivity to long daylength. *Soybean Genet. Newsl.*, 7, 26–29.
- Chincinska I., Liesche J., Krugel U. et al. (2008). Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiol.*, 146, 515–528. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112334>
- Cober E.R., Molnar S.J., Charette M., Voldeng H.D. (2010). A new locus for early maturity in soybean. *Crop Sci.*, 50, 524–527. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2009.04.0174>
- Cober E.R., Voldeng H.D. (2001). A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to *E1* and *T*. *Crop Sci.*, 41, 698–701. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413698x>
- Dospekhov B.A. (1972). *Planning field experience and statistical processing of data*. Moscow: Kolos. 205 p. (In Russian)

- Gavrilenko V.F., Ladygina M.E., Handobina L.M. (1975). *Special lab practice for plant physiology*. Moscow: Vysshaya shkola. 391 p. (In Russian)
- Golovatskaya I.F., Minich A.S., Minich I.B., Bolshakova M.A. (2012). Regulation of growth and development of plants *Brassica oleracea* L. through the correction of solar radiation. *Bulletin of Tomsk State University. Series "Biology"*, 2, 151–165. (In Russian)
- Lagercrantz U. (2009). At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants. *J. Exp. Bot.*, 60(9), 2501–2515. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp139>
- Martirosyan Yu.Ts., Polyakova M.N., Danilova T.A. (2013). Photosynthesis and productivity of potatoes plants under different spectral irradiation. *Agricultural Biology*, 1, 107–112. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2013.1.107rus> (In Russian)
- Matsoukas I.G.I., Massiah A.J., Thomas B. (2012). Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant Cell Physiol.*, 53, 1827–1842. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs130>
- McBlain B.A., Bernard R.L. (1987). A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybeans. *J. Hered.*, 78, 160–162. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110349>
- Mokronosov A.T., Gavrilenko V.F. (1992). *Photosynthesis. Physiological and biochemical aspects*. Moscow: Moscow State University Publishing house. 320 p. (In Russian)
- Salomé P.A., Michael T.P., Kearns E.V. et al. (2002). The out of phase 1 mutant defines a role for PHYB in circadian phase control in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 129(4), 1674–1685. <https://doi.org/10.1104/pp.003418>
- Quail P.H. (2010). Phytochromes. *Curr. Biol.*, 20(12), R504–R507. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.014>
- Ray J.D., Hinson K.E., Manjono J.B., Maio M.F. (1995). Genetic control of long juvenile trait in soybean. *Crop Sci.*, 35, 1001–1006. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500040012x>
- Shchegolev A., Zhmurko V. (2013). Effect of red light on the activity of sucrose phosphate synthase and sucrose synthase in leaves of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *The Journal of Lviv National University. Biology series*, 61, 208–215. (In Ukrainian)
- Shpilova T.G., Shchegolev A.S. (2008). Phytochrome regulation of growth processes in tomatoes. *Biology: From a molecule up to the biosphere: Materials of the III Intern. Conf. Kharkiv*, pp. 302–303. (In Russian)
- Timoshenko V.F., Zhmurko V.V. (2013). The effect of red light on the growth and carbohydrate content of short-day and photoperiodically neutral soybean lines. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 1079, 186–192. (In Russian)
- Tsybulko V.S. (1998). *Metabolic patterns of plant photoperiodism*. Kiev: Agrarna nauka. 187 p. (In Russian)
- Voskresenskaya N.P. (1987). Photoregulatory reactions and photosynthetic apparatus activity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 34(4), 669–684. (In Russian)
- Zhmurko V.V. (2009). *Physiological and biochemical aspects of photoperiodic and vernalization control of plant development*. Abstract of the dissertation of Doctor of Biological Sciences. Institute of Plant Physiology and Genetics, NASU, Kyiv. 44 p. (In Ukrainian)
- Zhmurko V.V., Gridin N.N., Shabanova A.S. (1997). The effect of interruption of the dark period by light on the development of winter wheat. *Biological Bulletin*, 1(1), 94–95. (In Russian)

Фотохімічна активність хлоропластів ізогенних за генами *E* лінії сої (*Glycine max* (L.) Merr.) за різних термінів опромінення червоним світлом В.Ф. Тимошенко, В.В. Жмурко

У вегетаційних досліджах вивчали вплив різних термінів опромінення рослин червоним світлом (ЧС, 630 нм) на біомасу, площу листя, вміст хлорофілу, рівень реакції Хілла і фотофосфорилування у короткоденної (КД) і фотоперіодично нейтральної (ФПН) ліній сої. Об'єктами досліджень були ізогенні за генами *E* лінії сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Clark. Використовували КД лінію (*E1E2E3*) і ФПН лінію (*e1e2e3*). Рослини вирощували у вегетаційній камері в ґрунтовій культурі, ґрунт чорнозем. Рослини КД і ФПН ліній вирощували в 9 посудинах об'ємом три літри, у кожній посудині по 10–12 рослин. Протягом дослідження підтримували постійні умови вирощування: температура 20–24/17–20°C (день/ніч), вологість ґрунту 60–70 % від повної вологоємності ґрунту, інтенсивність освітлення 20 клк, фотоперіод 10 годин. Через 4–5 тижнів вегетації після формування другого справжнього листка рослини кожної лінії в трьох посудинах на початку темного періоду (дослід 1) або в середині ночі (дослід 2) протягом 30 хвилин опромінювали червоним світлом слабкої інтенсивності. Для опромінення використовували світлодіоди, що випромінюють в області 630±10 нм. Інші рослини кожної лінії, що не освітлювали червоним світлом, в трьох посудинах, слугували контролем. Фенологічні спостереження показали, що в контролі на короткому дні КД лінія зацвітала через 43±1,8 доби після появи сходів, а фотоперіодично нейтральна – через 44±2,2 доби. Опромінення ЧС, як перед початком темного періоду доби, так і при перериванні ночі червоним світлом, викликало затримку переходу до цвітіння у КД лінії відповідно на

5±1 і на 7±2,2 діб. У фотоперіодично нейтральної лінії зміни терміну цвітіння в результаті опромінення червоним світлом не встановлено. У короткоденної лінії сої активація фітохромів ЧС перед темним періодом доби викликала зростання біомаси, площі листя, вмісту сумарного хлорофілу, зростання відновлення ферицианіду калію і фотофосфорилування ізольованими хлоропластами у розрахунку на хлорофіл одного листка, тоді як переривання ночі ЧС знижувало ці показники, а також рівень реакції Хилла у розрахунку на 1 мг хлорофілу. Впливу ЧС на вивчені показники у ФПН лінії сої не виявлено.

Ключові слова: соя *Glycine max* (L.) Merr., ізогенні лінії, фітохром, фотохімічна активність хлоропластів, морфогенез.

Про авторів:

В.Ф. Тимошенко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, vtimoshenko56@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9345-6661>

В.В. Жмурко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Фотохимическая активность хлоропластов изогенных по генам *E* линий сои (*Glycine max* (L.) Merr.) при различных сроках облучения красным светом
В.Ф. Тимошенко, В.В. Жмурко

В вегетационных опытах изучали влияние различных сроков облучения растений красным светом (КС, 630 нм) на биомассу, площадь листьев, содержание хлорофилла, уровень реакции Хилла и фотофосфорилирование у короткодневной (КД) и фотопериодически нейтральной (ФПН) линий сои. Объектами исследований были изогенные по генам *E* линии сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сорта Clark. Использовали КД линию (*E1E2E3*) и ФПН линию (*e1e2e3*). Растения выращивали в вегетационной камере в почвенной культуре, почва чернозем. Растения КД и ФПН линий выращивали в 9 сосудах объемом три литра. В каждом сосуде росло по 10–12 растений. В течение всего опыта поддерживали постоянные условия выращивания: температура 20–24/17–20°C (день/ночь), влажность почвы 60–70 % от полной влагоемкости почвы, интенсивность освещения 20 клк, фотопериод 10 часов. Через 4–5 недель вегетации после формирования второго настоящего листа растения каждой линии в трех сосудах в начале темного периода (опыт 1) или в середине ночи (опыт 2) в течение 30 минут облучали красным светом слабой интенсивности. Для облучения использовали светодиоды, излучающие в области 630±10 нм. Другие растения каждой линии, которые не освещали красным светом, в трех сосудах, служили контролем. Фенологические наблюдения показали, что в контроле на коротком дне КД линия зацветала через 43±1,8 суток после появления всходов, а фотопериодически нейтральная – через 44±2,2 суток. Облучение КС, как перед началом темного времени суток, так и при прерывании ночи красным светом вызвало задержку перехода к цветению у КД линии соответственно на 5±1 и на 7±2,2 суток. У фотопериодически нейтральной линии изменения срока цветения в результате облучения КС не установлено. У короткодневной линии сои активация фитохромов КС перед темным периодом суток вызвала увеличение биомассы, площади листьев, содержания суммарного хлорофилла, восстановления феррицианида калия и фотофосфорилирования изолированными хлоропластами в расчете на хлорофилл одного листа, тогда как прерывание ночи КС снижало эти показатели, а также уровень реакции Хилла в расчете на 1 мг хлорофилла. Влияния КС на изученные показатели у ФПН линии сои не обнаружено.

Ключевые слова: соя *Glycine max* (L.) Merr., изогенные линии, фитохром, фотохимическая активность хлоропластов, морфогенез.

Об авторах:

В.Ф. Тимошенко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, vtimoshenko56@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9345-6661>

В.В. Жмурко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Представлено: В.М.Гришко / Presented by: V.M.Gryshko

Рецензент: Ю.В.Лихолат / Reviewer: Yu.V.Lykhohat

Подано до редакції / Received: 09.12.2019

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ
журналу «Вісник Харківського національного
університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»

У журналі публікуються результати досліджень за всіма напрямками біологічних наук. До публікації приймаються:

- закінчені оригінальні роботи, що досі ніде не видавалися;
- описи оригінальних методів та приладів;
- теоретичні та оглядові статті;
- матеріали та повідомлення про події наукового життя;
- рецензії на книги.

Статті друкуються українською, російською та англійською мовами.

Текст експериментальної статті має складатися з наступних розділів: «Вступ», «Методика» («Об'єкти та методи дослідження»), «Результати», «Обговорення» (можливий об'єднаний розділ «Результати та обговорення»), «Перелік посилань». Тексти статей повинні бути виконані у редакторі Ms Word з використанням шрифту Arial – 10 pt; абзац – 1 см; міжрядковий інтервал – одинарний; поля: верхнє та нижнє – 3,5 см; ліве – 2,5 см, праве – 2 см. Текст статті починається з індексу УДК, далі заголовок (Arial – 12 pt), ініціали та прізвища авторів (Arial – 10 pt), повні назви наукових установ, адреси електронної пошти (Arial – 9 pt). Анотація розміщується під «шапкою» статті мовою оригіналу (Arial – 9 pt). Під анотацією друкується список ключових слів (не більше 10). Далі друкуються анотації (Arial – 9 pt) англійською і російською (якщо стаття написана українською) мовами разом із транскрипціями прізвищ авторів, перекладом назви роботи і відповідними списками ключових слів. Обсяг кожного з трьох резюме – не менш ніж 1800 фонетичних символів. Таблиці і рисунки розміщуються у тексті. Посилання на літературу у тексті подаються у круглих дужках із вказуванням прізвища автора та року видання. Список використаних джерел оформлюється за алфавітом (спочатку – джерела кирилицею, потім – латиницею), без нумерації.

Бібліографічний опис джерел та посилань у тексті виконується відповідно до вимог МОН України, зокрема – ДСТУ 8302:2015, але у варіанті, наближеному до норм стилю APA (American Psychological Association). При описі друкованого джерела обов'язково слід зазначати місце видання (місто), видавництво, рік видання, загальну кількість сторінок (у періодичних виданнях – сторінки статті). Бібліографічний опис джерел англійською мовою (References) оформлюється відповідно до норм стилю APA (American Psychological Association). Джерела після слова «References» розташовуються за англійським алфавітом, без нумерації. До посилань обов'язково треба додавати DOI, якщо він присвоєний.

Електронні версії статей надсилаються до редакції електронною поштою. Разом з електронною версією до редакції надсилається друкована копія, підписана авторами. На окремій сторінці вказують прізвища та ініціали усіх авторів, повні назви наукових установ та поштові адреси установ, адреси електронної пошти авторів та посилання на їх профілі у мережі ORCID. Ця інформація наводиться українською, англійською та російською мовами.

Стаття, яка надходить до редакції, реєструється та направляється до рецензента, який підписує статтю до друку або відхиляє її. При наявності зауважень статтю повертають авторам для доопрацювання.

*** CONTENT ***

In memory of Viktor Arsentiyevich Tokarsky.....	5
In memory of Yury Georgiyevich Shckorbatov.....	8

*** BIOCHEMISTRY ***

Zeleniuk K.V., Golichenko O.A., Shtemenko A.V., Shtemenko N.I. Further evidence for redox activation of the plasmid – dirhenium(III) complexes interactions.....	11
Nikitchenko I.V., Rybalchenko T.P., Barannik T.V., Pavychenko O.V. The effect of nitrogen monoxide donors on the indexes of cadmium-induced oxidative stress in different rat tissues.....	18
Okhrimenko S.M., Grishkova A.Yu. Effect of hemin and glutathione on some indicators of nitrogen and carbohydrate metabolism in rats.....	28
Polokhina K.V., Babiy S.O., Golichenko O.A., Shtemenko N.I. Dirhenium(III) complex with beta-alanine ligand: anticancer, antioxidant and DNA-binding properties.....	35

*** BOTANY AND PLANT ECOLOGY ***

Baranets M.O., Korshykov I.I. Formation and self-maintenance of the population <i>Hyssopus officinalis</i> L. in conditions of the iron ore dump of Kryvyi Rih area.....	43
---	----

*** GENETICS ***

Gorenskaya O.V., Rybak D.V., Rybak N.V., Horenskyi H.H., Shckorbatov Yu.G. Analysis of <i>Drosophila melanogaster</i> reproduction and preadult mortality after the influence of microwave radiation.....	52
Ehyakonandeh H., Atramentova L.A. Prognostic value of markers in associative genetics.....	63

*** ZOOLOGY AND ECOLOGY ***

Alizade G.A. Mites of the genus <i>Erythraeus</i> Latreille, 1806 (Acariformes: Actinedida: Erythraeidae) in the Greater Caucasus (within Azerbaijan).....	69
Katrushenko S.A. External morphological anomalies of the amphibians of the Kharkiv region.....	78
Kiosya Ye.O., Shuba V.V., Matsko Ye.D. New records of tardigrade species of <i>Macrobiotus hufelandi</i> group (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) from Ukraine	89
Mansimova I.F., Alekperov I.Kh. Seasonal changes of free-living ciliate communities in different biotopes of the Agzibir Lake.....	99
Rzayev F.H., Seyidbeyli M.I., Maharramov S.H., Gasimov E.K. Forms and ultrastructural features of the lateral alae of the helminth <i>Trichostrongylus tenuis</i> Mehlis, 1846 (Nematoda: Trichostrongylidae).....	112

*** MICROBIOLOGY ***

Avksentieva O.A., Vinnikova O.I., Zhmurko V.V. Features of colonization of the phytosphere of wheat seedlings by introduced strains of <i>Escherichia coli</i>	120
Zvir G.I., Rizun H.M., Hnatush S.O. Influence of phosphorus compounds on the formation of ammonium ions by cells of nitrogen-fixing bacteria <i>Azotobacter chroococcum</i> VKM V-1272.....	131

*** PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ***

Hryntsova N.B., Romanyuk A.M., Lyndin M.S., Ryabenko T.V. Morphofunctional rearrangements of adrenal cortex of adult rats at the experimental microelementosis.....	141
--	------------

*** PLANT PHYSIOLOGY ***

Avksentieva O.A., Batueva E.D. The effect of red light (660 nm) on proliferative activity and growth reactions in seedlings of plants with contrast photoperiodic reaction.....	151
Pukhtaievych P.P., Kukol K.P., Vorobey N.A., Kots S.Ya. The reaction of self-fertile alfalfa lines to inoculation with nodule bacteria.....	163
Sklyarenko A.V., Bessonova V.P. The content of water-soluble phenolic compounds in the leaves of woody plants growing in the area of sanitary protection zones of enterprises of the industrial region of Zaporizhzhya.....	175
Tymoshenko V.F., Zhmurko V.V. Photochemical activity of chloroplasts of isogenic lines (<i>E</i> genes) of soybean (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) under different periods of red-light irradiation.....	185

*** INFORMATION ***

Author guidelines	194
--------------------------------	------------

*** СОДЕРЖАНИЕ ***

Памяти Виктора Арсентиевича Токарского.....	5
Памяти Юрия Георгиевича Шкорбатова.....	8

*** БИОХИМИЯ ***

Зеленюк К.В., Голиченко А.А., Штеменко А.В., Штеменко Н.И. Дополнительные доказательства редокс-активации взаимодействий плазмиды – комплексы дирения(III).....	11
Никитченко И.В., Рыбальченко Т.П., Баранник Т.В., Павиченко О.В. Влияние доноров монооксида азота на показатели кадмий-индуцированного оксидативного стресса в разных органах крыс.....	18
Охрименко С.М., Гришкова А.Ю. Влияние гемина и глутатиона на некоторые показатели азотистого и углеводного метаболизма у крыс.....	28
Полохина К.В., Бабий С.О., Голиченко А.А., Штеменко Н.И. Комплекс дирения(III) с бета-аланиновым лигандом: противоопухолевые, антиоксидантные и ДНК-связывающие свойства...	35

*** БОТАНИКА И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ ***

Баранец Н.А., Коршиков И.И. Формирование и самоподдержание популяции <i>Hyssopus officinalis</i> L. в условиях железорудного отвала Криворожья.....	43
--	----

*** ГЕНЕТИКА ***

Горенская О.В., Рыбак Д.В., Рыбак Н.В., Горенский Г.Г., Шкорбатов Ю.Г. Анализ репродукции и предимагинальной смертности у <i>Drosophila melanogaster</i> при действии микроволнового излучения.....	52
Эхьяконандех Х., Атраментова Л.А. Прогностическое значение маркёров в ассоциативной генетике.....	63

*** ЗООЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ ***

Ализаде Г.А. Клещи рода <i>Erythraeus</i> Latreille, 1806 (Acariformes: Actinedida: Erythraeidae) природной области Большого Кавказа (в пределах Азербайджана).....	69
Катрушенко С.А. Внешнеморфологические аномалии амфибий Харьковской области.....	78
Киося Е.А., Шуба В.В., Мацко Е.Д. Новые находки видов тихоходок рода <i>Macrobotus</i> группы <i>hufelandi</i> (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) в Украине.....	89
Мансимова И.Ф., Алекперов И.Х. Сезонные изменения сообществ свободноживущих инфузорий различных биотопов озера Агзыбир.....	99
Рзаев Ф.Г., Сеидбейли М.И., Магеррамов С.Г., Гасымов Э.К. Формы и ультраструктурные особенности латеральных крыльев гельминта <i>Trichostrongylus tenuis</i> Mehlis, 1846 (Nematoda: Trichostrongylidae).....	112

*** МИКРОБИОЛОГИЯ ***

Авксентьева О.А., Винникова О.И., Жмурко В.В. Особенности колонизации фитосферы проростков пшеницы интродуцированными штаммами <i>Escherichia coli</i>	120
Звир Г.И., Ризун А.М., Гнатуш С.А. Влияние соединений фосфора на образование ионов аммония клетками азотфиксирующих бактерий <i>Azotobacter chroococcum</i> ВКМ В-1272	131

*** ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ ***

Гринцова Н.Б., Романюк А.М., Лындин Н.С., Рябенко Т.В. Морфофункциональные перестройки коры надпочечников половозрелых крыс в условиях экспериментального микроэлементоза.....	141
--	-----

*** ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ ***

Авксентьева О.А., Батуева Е.Д. Влияние красного света (660 нм) на пролиферативную активность и ростовые реакции у проростков растений с контрастной фотопериодической реакцией.....	151
Пухтаевич П.П., Кукол Е.П., Воробей Н.А., Коць С.Я. Реакция самофертильных линий люцерны на инокуляцию клубеньковыми бактериями.....	163
Скляренко А.В., Бессонова В.П. Содержание водорастворимых фенолов в листьях древесных растений санитарно-защитных зон заводов промышленной зоны Запорожья.....	175
Тимошенко В.Ф., Жмурко В.В. Фотохимическая активность хлоропластов изогенных по генам <i>E</i> линий сои (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) при различных сроках облучения красным светом.....	185

*** ИНФОРМАЦИЯ ***

Правила для авторов	194
---------------------------	-----

Наукове видання

**Вісник Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна.**

Серія «Біологія»

Випуск 34

Збірник наукових праць

Українською, російською, англійською мовами

Підписано до друку 26.05.2020. Формат 60×84 1/8. Папір офсетний. Друк ризографічний.

Ум. друк. арк. 18,2. Обл.-вид. арк. 20,8.

Наклад 100 пр. Зам. №

**61022, Харків, майдан Свободи, 4,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна.**

Віддруковано: ХНУ імені В. Н. Каразіна

61022, Харків, майдан Свободи, 4.

Видавництво

Тел. +38/057/705–24–32

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09