

Міністерство освіти і науки України

ВІСНИК

*Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна*

Серія "Біологія"

Випуск 43

Започаткований у 1970 р.

THE JOURNAL

of V. N. Karazin Kharkiv

National University

Series Biology

Issue 43

Founded in 1970

Харків-2024

УДК: 57

Засновник: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Рік заснування: 1970

Періодичність: двічі на рік

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, DOAJ, 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 №26 від 23.12.2024).

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

Ю. Г. Гамуля – заступник головного редактора, к.б.н., доцент кафедри ботаніки та екології рослин, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Е. С. Пустовалова – відповідальний секретар, PhD в галузі знань Біологія, старший викладач 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

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. Сибірня – 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 рецензування.

Ідентифікатор медіа у Реєстрі суб'єктів у сфері медіа: R30-04474 (Рішення № 1538 від 09.05.2024 р. Національної ради України з питань телебачення і радіомовлення. Протокол № 15)

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, оформлення, 2024

UDC: 57

Founder: V. N. Karazin Kharkiv National University

Year of foundation: 1970

Frequency: twice a year

The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series Biology is a collection of scientific works featuring research results and review articles in biology. It covers topics such as biochemistry and genetics, zoology and botany, animal and plant physiology, mycology, microbiology, soil science, cryobiology, and others. Additionally, it includes materials on scientific events and descriptions of original methods and instruments in the field of biology.

It is intended for educators, researchers, postgraduate students, and undergraduate students specializing in relevant or related scientific fields.

The Journal is included in the List of Professional Publications of Ukraine, Category «B», under specialty 091 Biology (Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine No. 1643, dated December 28, 2019). It is indexed in Google Scholar, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat, BASE, DOAJ, Web of Science (Zoological Record) and is part of the Clarivate Analytics Master Journal List.

Approved for publication by the decision of the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (Protocol No. 26 dated December 23, 2024).

D. A. Shabanov – Editor-in-Chief, Dr, Professor of the Department of Zoology and Animal Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University

Yu. H. Hamulya – Deputy Editor-in-Chief, PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Botany and Plant Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University

E. S. Pustovalova – Executive Secretary, PhD in Biology, Senior Lecturer of the Department of Genetics and Cytology, V. N. Karazin Kharkiv National University

Editorial Board Members:

L. O. Atramentova – Dr, Professor of the Department of Genetics and Cytology, V. N. Karazin Kharkiv National University

S. Yu. Utevsky – Dr, Professor of the Department of Zoology and Animal Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University

O. M. Utevska – Dr, Professor of the Department of Genetics and Cytology, V. N. Karazin Kharkiv National University

Ye. E. Perskyi – Dr, Professor of the Department of Biochemistry, V. N. Karazin Kharkiv National University

V. Yu. Strashnyuk – Dr, Professor of the Department of Genetics and Cytology, V. N. Karazin Kharkiv National University

O. Yu. Akulov – PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Mycology and Phytoimmunology, V. N. Karazin Kharkiv National University

N. Yu. Polchaninova – PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Zoology and Animal Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University

O. O. Avksentieva – PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Plant and Microorganism Physiology and Biochemistry, V. N. Karazin Kharkiv National University

V. P. Komarysta – PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Botany and Plant Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University

S. O. Kosterin – Dr, Academician of NASU, Head of the Muscle Biochemistry Department, O. V. Palladin Institute of Biochemistry, NASU

N. O. Sybirna – Dr, Professor of the Department of Biochemistry, Ivan Franko National University of Lviv

L. O. Bilyavska – Dr, Senior Researcher of the Department of General and Soil Microbiology, D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU

O. O. Stasik – Dr, Corresponding Member of NASU, Head of the Department of Physiology and Ecology of Photosynthesis, Institute of Plant Physiology and Genetics, NASU)

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

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

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

Editorial Address:

School of Biology,

V. N. Karazin Kharkiv National University,

Svobody Maidan, 4, Kharkiv, Ukraine, 61022

phone: +38 /057/ 707-55-71

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

e-mail: seriesbiology@karazin.ua

The articles are peer reviewed.

Media identifier in the Media Entities Register: R30-04474 (Decision No. 1538 dated 09.05.2024 of the National Council of Ukraine for Television and Radio Broadcasting. Protocol No. 15)

© V.N. Karazin Kharkiv National University,
design, 2024

... БОТАНІКА ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН ...

Каліста М.С., Коваленко О.А. Життєві форми та будова пагонів інвазійного виду <i>Geranium sibiricum</i> L. (Geraniaceae) у двох локальних популяціях в Україні /	6
Полатайко Т.І., Безроднова О.В. <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R.Br. (Orchidaceae) у природному заповіднику "Горгани": популяційні моніторингові дослідження і комплексна характеристика середовища існування /	16
Ярош А.В., Кучеренко Є.Ю., Рябчун В.К., Кузьмишина Н.В., Солонечна О.В. Екологічна пластичність короткостеблених сортів пшениці м'якої озимої (<i>Triticum aestivum</i> L.) та стійкість до збудників піренофорозу (<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Died.) Drechsler) і бурі листкової іржі (<i>Puccinia recondita</i> f. sp. <i>tritici</i> Rob. et Desm.) /	31

... ГЕНЕТИКА ...

Атраментова Л.О. Шуба В.В., Горпинченко М.Ю. Прізвища українського населення як інструмент популяційно-генетичних досліджень /	42
---	-----------

... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ...

Нельван М.Л. Комплекс <i>Schistosoma japonicum</i> : варіації COI-послідовностей паразитів та їх проміжних господарів, проаналізованих за допомогою BLAST /	48
Трохимчук Р., Кінеке А. Нові знахідки глибоководних Gastrotricha і Tardigrada в Іберійському та Канарському басейнах (північно-східна Атлантика) з коментарями щодо складу абісальної мейофауни та парадоксу мейофауни /	64
Шрестха М., Утєвський С. Поширення бранхіобделід (Annelida: Clitellata) на благородному раці <i>Astacus astacus</i> у Закарпатській області України /	83

... КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ...

Каверінська А.І., Прокопюк В.Ю. Порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні та метаболічні властивості різних типів клітин /	94
--	-----------

... ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ РОСТУ, РОЗВИТКУ ТА ПРОДУКТИВНОСТІ РОСЛИН ...

Віннікова О.І. Вплив штучної мікоризації на ріст і розвиток рослин в умовах вегетаційного дослідження /	103
--	------------

... ПРИРОДООХОРОННІ ТЕРИТОРІЇ ...

Безроднова О.В., Бондаренко З.С., Брусенцова Н.О., Іванова К.Ю. Створення ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" як складова збереження природних ландшафтів, біотопічного і видового різноманіття Північного Сходу України /	114
--	------------

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...

Феськов О.М., Жилкова Є.С., Феськова І.А., Іванова Г.В., Блажко О.В. Вплив підвищеного рівня активних форм кисню в еякуляті на показники репродуктивної функції у чоловіків зі зниженням фертильності /	130
Янко Р.В. Вікові відмінності впливу переривчастого голодування на морфофункціональні показники підшлункової залози щурів /	136

... ІНФОРМАЦІЯ ...

Правила для авторів /	143
------------------------------------	------------

*** BOTANY AND PLANT ECOLOGY ***

Kalista M.S., Kovalenko O.A. Life forms and shoot structure of the invasive species <i>Geranium sibiricum</i> L. (Geraniaceae) in two local populations in Ukraine /	6
Polataiko T.I., Bezrodnova O.V. <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R.Br. (Orchidaceae) in the "Gorgany" Nature Reserve: population monitoring studies and complex characteristics of the habitat.....	16
Yarosh A.V., Kucherenko Ye.Yu., Riabchun V.K., Kuzmyshyna N.V., Solonechna O.V. Environmental plasticity of short-stemmed winter bread wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) cultivars and resistance to yellow leaf blotch (<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Died.) Drechsler) and brown (leaf) rust (<i>Puccinia recondita</i> f. sp. <i>tritici</i> Rob. et Desm.) /	31

*** GENETICS ***

Atramentova L.O., Shuba V.V., Gorpichenko M.Yu. Surnames of the ukrainian population as a tool of population and genetic research /	42
--	----

*** ZOOLOGY AND ECOLOGY ***

Nelwan M.L. <i>Schistosoma japonicum</i> complex: COI-sequences variations of parasites and their intermediate hosts analyzed using BLAST /	48
Trokhymchuk R., A. Kieneke A. New records of deep-sea Gastrotricha and Tardigrada from Iberian and Canary Basins (Northeast Atlantic) with comments on abyssal meiofauna composition and the meiofauna paradox /	64
Shrestkha M., Utevsy S. The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, <i>Astacus astacus</i> , in the Transcarpathian region, Ukraine /	83

*** CELL BIOLOGY ***

Kaverinska A.I., Prokopiuk V.Yu. Comparison of the effects of umbilical cord cryoextract and lyophilized form on the adhesive, proliferative, and metabolic properties of various cell types /	94
---	----

*** PRACTICAL ASPECTS OF PLANTS GROWTH REGULATION, DEVELOPMENT AND PRODUCTIVITY ***

Vinnikova O.I. The effect of artificial mycorrhization on the growth and development of plants in a vegetation experiment /	103
--	-----

*** NATURE CONSERVATION AREAS ***

Bezrodnova O.V., Bondarenko Z.S., Brusentsova N.O., Ivanova K.Yu. Creation of the "Berezivskyi" landscape reserve of local importance as a component of preservation of natural landscapes, biotopes and species diversity of the Northeast of Ukraine /	114
---	------------

*** PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ***

Feskov O., Zhylkova Ye., Feskova I., Ivanova H., Blazhko O. The effect of increased levels of reactive oxygen species in ejaculate on parameters of reproductive function in men with low fertility /	130
Yanko R.V. Age-related differences in the effect of intermittent fasting on the morphofunctional parameters of the rat's pancreas /	136

*** INFORMATION ***

Author guidelines /	143
----------------------------------	------------

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

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-1

UDC: 581.522 (477)

Life forms and shoot structure of the invasive species *Geranium sibiricum* L. (Geraniaceae) in two local populations in Ukraine

M.S. Kalista, O.A. Kovalenko

It was found out that the life form of the alien invasive plant species *Geranium sibiricum* is interpreted ambiguously in various literature sources, and in the description of underground organs (shoot and root systems), the statements of different authors are often even contradictory. Eighty individuals of *G. sibiricum* collected in 2019–2021 during field research in two local populations: in Pyriatyn town (Poltava Oblast) and Kyiv City (Kyiv Oblast) were revised by varying the type of growth form and shoot structures using the deep concept of the caudexes diversity and their differences from other structural formations. The basic life form and model of shoot formation of *G. sibiricum*, which is a biennial conode taproot monocarpic with monopodial branching type, were clarified. In the connection with the pronounced polyvariety of the species life form two more types of it were described in *G. sibiricum* individuals: caudex taproot oligocarpic and basiphys fibrousroot oligocarpic with sympodial type of branching. The structure of elementary inflorescences of *G. sibiricum* was analysed, the structure of its above-ground and underground shoot system, as well as the root system, was investigated. It was identified that *G. sibiricum* individuals in Pyriatyn town and Kyiv City populations differ in the length of the flowering shoot, the length of the internodes, and the level of branching, and they have different types of generative shoots according to their location in space. It was found that the diversity of the architectural structure of individuals of this invasive species, associated with different growth conditions, could probably be an adaptation to the specific environmental conditions of their populations and could be valuable for studying the introduction of invasive species and determining the developmental stages at which the management of their populations will be most effective.

Key words: alien plant, populations, plant structure, life forms, plant morphology, polymorphism

Cite this article: Kalista M.S., Kovalenko O.A. (2024). Life forms and shoot structure of the invasive species *Geranium sibiricum* L. (Geraniaceae) in two local populations in Ukraine. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 8-17. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-1>

About the authors:

M.S. Kalista – National Museum of Natural History of NAS of Ukraine, 15 Bohdana Khmelnytskoho St., Kyiv 01054, Ukraine, crambe@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-2335-5184>

O.A. Kovalenko – National Museum of Natural History of NAS of Ukraine, 15 Bohdana Khmelnytskoho St., Kyiv 01054, Ukraine, corydalis.kovalenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6405-2035>

Received: 10.06.2024 / Revised: 18.07.2024 / Accepted: 14.09.2024

Introduction

Plant life and growth forms represent key functional strategies plants in relation to their environment and provide important insights into the ecological constraints acting on the distribution of biodiversity (Taylor et al., 2023). Studies on life forms and a more thorough insight into the plant structure which has enabled a better understanding of the growth strategy of each plant species (Perreta, Vegetti, 2005). This dynamical morphological approach is a comprehensive tool to clarify the various adaptations that occur in species concerning space occupation, competition and resistance to disturbing factors (Fournier, 1982; Barthélémy, Caraglio, 2007; DeellaFerrera et al., 2014).

Growth form is considered the complex of genetically constant vegetative and reproductive characters, which vary only within a specific range of phenotypic plasticity. The study of the forms of growth is comparative and is linked to the analysis of the interactions with the habitat. It takes into account the successive stages that lead to the construction of the plant body from germination, and also analyses the different phenological phases through which it goes through during the year, mainly with regard to exomorphology, although it can be complemented with anatomical studies of the different organs. In other

words, it reflects the local and temporal adaptation of the plant to abiotic factors (Meusel, 1952, 1970; Meusel et al., 1977; Montenegro, Ginocchio 1992; DeellaFerrera et al., 2014).

The knowledge about life forms is successfully applied in vegetation and floristic studies, to develop programs for the conservation of certain species, in ontogenetic research, and during the analysis of plant populations (Malynovskyi, 1998; Malynovsky, Bilonoha, 2003; Kyiak, 2012; Kalista et al., 2015). The same approach can be used for investigation of invasive species. Whereas both phenotypic plasticity and locally adapted ecotypes may contribute to the success of invasive species in a wide range of habitats (Sakai et al., 2003; Geng et al., 2007; Aniszewski, 2012), the study of the structural features of life forms at different ontogenetic stages could help to determine the strategies of rapid adaptation of invasive species to new habitats, their success and consolidation in habitats. All this information may be valuable for examining the introduction of invasive species and identifying life history stages where management will be most effective (Sakai et al., 2003).

Geranium sibiricum L. is a kenophyte of Asian origin (Protopopova, 1992; Drescher et al., 2012). By the middle of the twentieth century, it was a rare species in Ukraine (Dobrochaieva, 1955). However, in recent decades its localities have been recorded in many biogeographical zones of Ukraine (Kovtun, 2004; Lukash, 2008; Leshchenko, Bengus, 2016) (fig. 1). *G. sibiricum* is naturalized not only in ruderal habitats, but also occupies semi-natural and natural plant communities (Khlystun, 2006; Kovalenko, 2010). Phytocenotic activity of this species on steppe meadows increases under conditions of high anthropogenic pressure (Tishchenko, 2009).

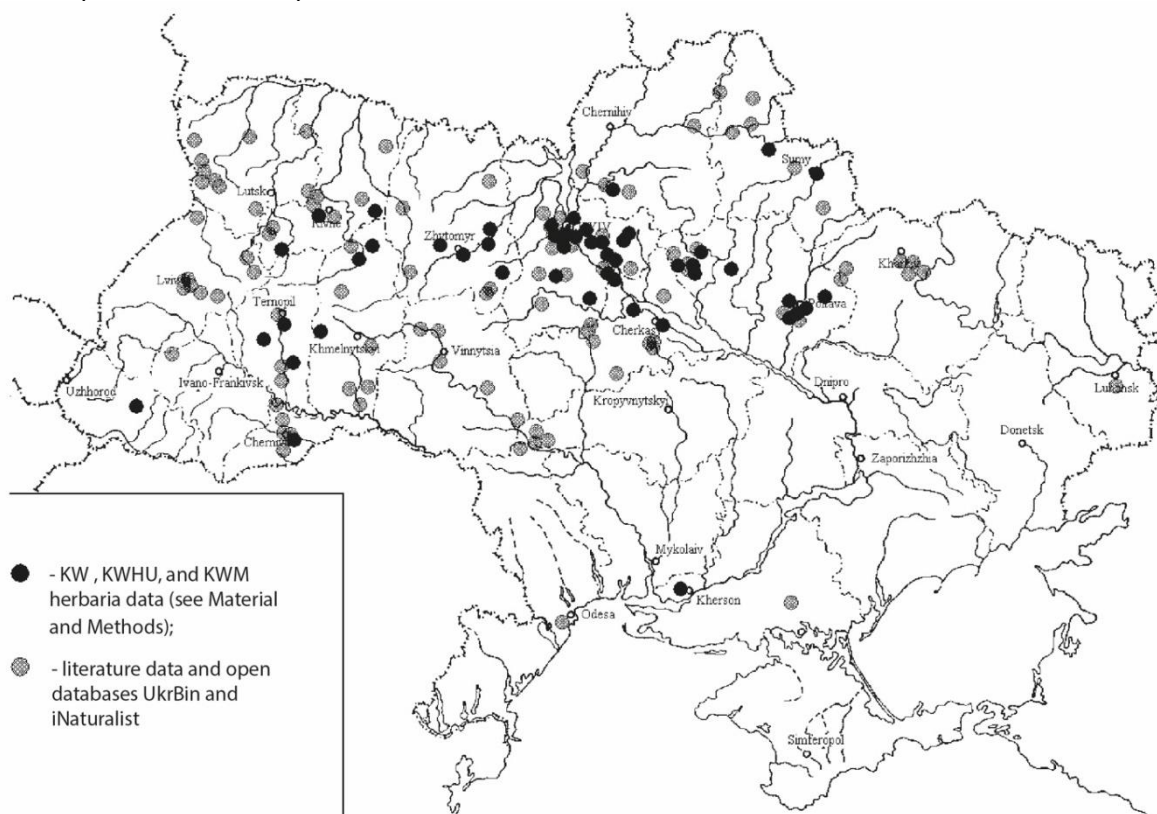


Fig. 1. Distribution map of *Geranium sibiricum* in Ukraine

Biomorphological features and population biology of *G. sibiricum* are poorly studied. Moreover, the life form of this species in the literature sources is interpreted ambiguously, so the statements of different authors sometimes are opposite. And there is no unambiguous definition in the description of its underground organs: as indistinct rhizome or short rhizome with a system of additional roots and even taproot system that is not combined with rhizome at all as with the biennial type of life form monocarpic life cycle. Besides in the literature sources shoot formation model of this plant is given as a semi-rosette

sympodial or monopodial (Kalista, Kovalenko, 2021a). Therefore, morphological features of *G. sibiricum* life form: shoots (particularly underground) and roots are a poorly or ambiguously studied and there is no common opinion on this, consequently, this study on the structure of *G. sibiricum* growth forms is a valuable and important task for understanding the biology of the species and its adaptive capabilities.

Materials and methods

Fresh plant materials and herbarium specimens of *G. sibiricum* collected in 2019–2021 during field surveys in its local populations. Also, KW (National Herbarium of Ukraine), KWHU (Herbarium of Academic O.V. Fomin Botanical Garden of Taras Shevchenko National University of Kyiv) and KWM (Herbarium of National Museum of Natural History of NAS of Ukraine) herbaria, two open databases UkrBin (<https://www.ukrbin.com>) and iNaturalist (<https://www.inaturalist.org>), and literature data used in this paper were revised and applied for species distribution map building. Eighty individuals from each population were analysed for studying their growth form type and structure of shoots according to Harper (1977) approaches.

Population investigations were conducted in two localities within Ukraine: I – roadside in Pyriatyn town (Poltava Oblast) (50.242825, 32.524750) and II – meadows on the territory of Sviatoshyn ponds (pond №14) in Kyiv city (Kyiv Oblast) (50.462757, 30.328101) (fig. 1). Population biology of plants was studied according to Harper (1977) with some changes (Crawley, 1997; Lehmann et al., 1999).

The dynamical morphological approach in this work are based on the study of life forms and plant structure (Meusel, 1952, 1970; Meusel et al., 1977; Montenegro, Ginocchio 1992; Deellaferreira et al., 2014). and a comprehensive analysis based on the ways of their joining in the body of plants (Hallé, Oldeman, 1970; Hallé et al., 1978; Barthélémy, Caraglio, 2007). The organization of the shoot is defined according to the position of its structural and functional differentiation proposed by Troll (1964).

The concept of the variety of caudexes and their difference from other different structural formations, as well as their parts – “residues” (consist of the shortened bases of the shoots after the death of their upper, usually elongated, parts and belong to annual, semi-annual, and over annual (oligocyclic) monocarpic shoots) was used according to Nukhimovskiy (1969a; 1969b), who deeply developed this issue and brought into plant morphology some specific terms that absolutely fits the *G. sibiricum* underground organs is reasonably aligned with current investigation (Kalista, Kovalenko, 2021a):

1) “conode” (from the Latin “co” – together, “nodus” – node) is a basal stem part with close nodes in monocarpic plants, which provides stem branching. Monocarpic plants with conode are perennial, biennial and annual. Conode of such plants can have different structural significance: it either whole participates in the stem branching, or only the axillary cones of growth of one or two of its upper nodes form lateral shoots, or does not participate in branching at all;

2) “basiphys” (from the Greek “basis” – base, “physis” – to grow, form) is a perennial stem part, which consists, commonly, of 1–2 (3) minimoresidues, of herbaceous perennials with a sympodial type of branching and a fibrous root system, instead of the caudex.

Results

It was found out that in the floristic publications *G. sibiricum* is characterised as annual or biannual herbaceous taproot monocarpics (Bezdelev, Bezdeleva, 2006), pauciennial (obsolete term for annual and biennial plants with high plasticity of the life cycle and ontogenetic polyvariety) (Bobrov, 1949; Kalista et al., 2015) and perennial (Dobrochaieva, 1955) plant with indistinct rhizome (Webb and Ferguson, 1968) or short rhizome with system of additional roots following Volkova and Osmanova (2012). *G. sibiricum* has one (rarely two or three) strongly branched prostrate or ascending shoot (Dobrochaieva, 1955) or semi-rosette creeping shoot with monopodial (Bezdelev, Bezdeleva, 2006) or sympodial (Tsyrenova, 2007) growth. Therefore, there is no common point of view about life form and growth form of this species. It is typical for many species of *Geranium* L. genus e.g., for *Geranium robertianum* L. that has been referred to as a biennial, but also as an annual, a winter annual, and a monocarpic or polycarpic perennial (Bertin, 2001).

As a result of our field studies of *G. sibiricum* in two local populations, it was found that its individuals collected in populations I and II differ in the length of the flowering shoot, they have different types of generative shoots in space, the length of the internodes and the level of branching (fig. 2). Such differences in plant structure are due to different conditions of their habitat. Thus, developed, tall, prostrate and recumbent generative shoots are characteristic of individuals that grow in conditions of sufficiently high humidity, partial shading by shrubs and with a fairly dense and tall grass are represented completely in

population II. Smaller plants with ascending shoots tend to grow in more open areas with less grass density and predominate in population I.

In the studied places of growth, this plant dominates in the grass cover. The phytocenotic activity of *G. sibiricum* increases with increased anthropogenic load on the flora of stepped meadows. The fruits of *G. sibiricum* open scattering the seeds up to 1–2 m from a mother plant (fig. 3). Due to such autochoria, the seeds are not spread over long distances; they are concentrated around the place of growth of mother plants. In this way a community is formed, which in a few years becomes thicken and slowly increases in size. This phenomenon ensures the dominance of this species in the grass cover in most areas. This is also facilitated by no damage by insects and diseases.

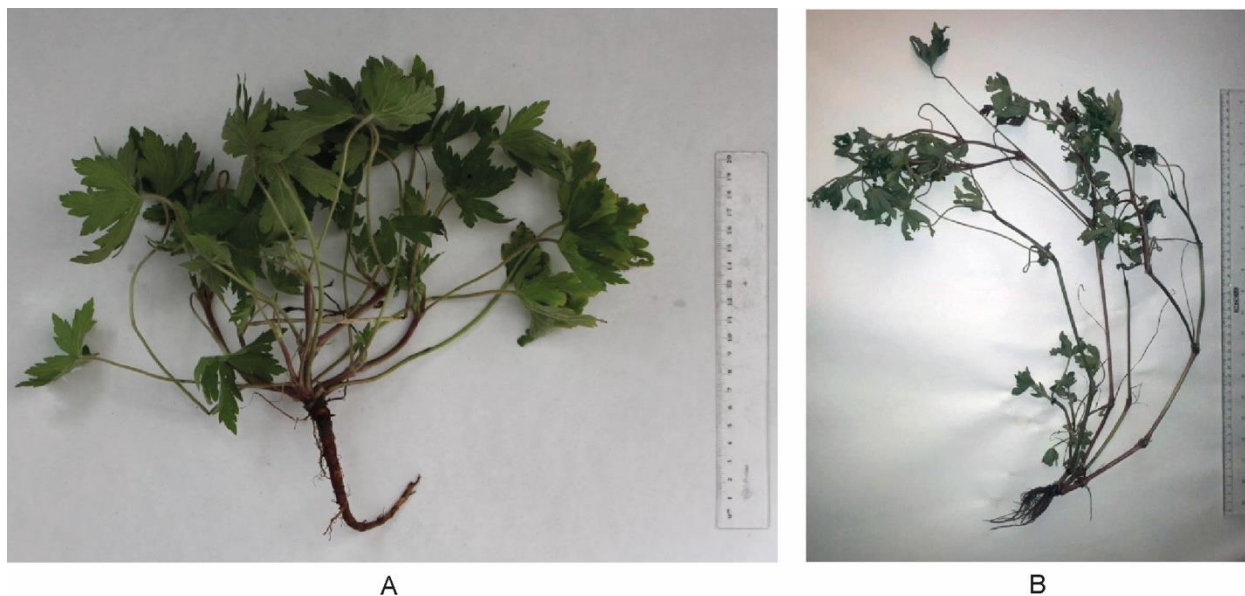


Figure 2. Generative plants of *Geranium sibiricum*: A – in population I, B – in population II

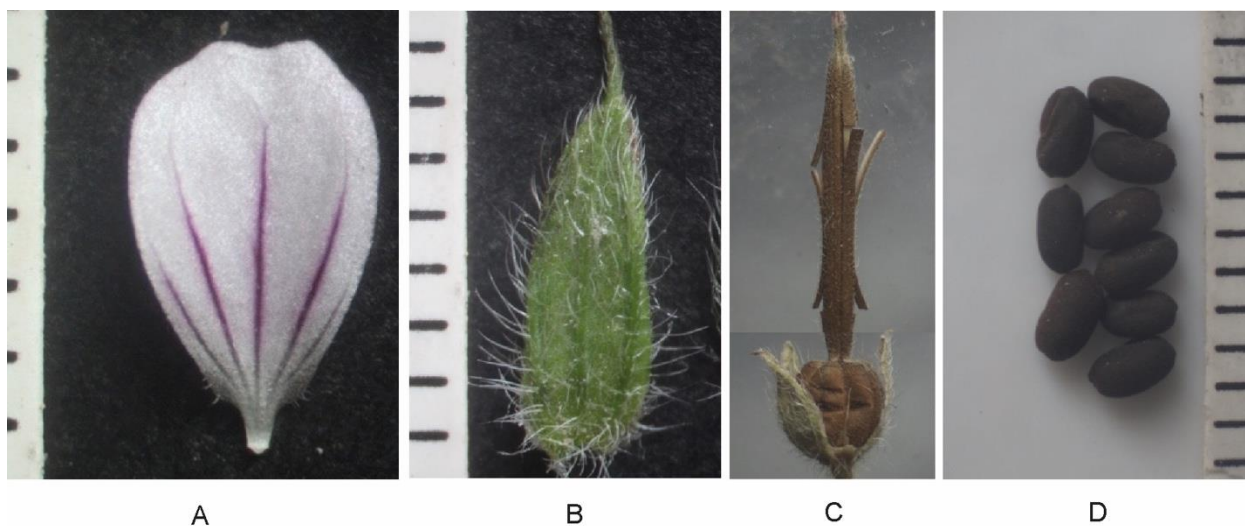


Figure 3. Generative organs of *Geranium sibiricum*: A – petal, B – sepal, C – fruit (fruitcase), D – seeds (division = 1mm)

Troll (1964) characterized the inflorescences of the family Geraniaceae as cymose, monothelic, closed, in which the main and lateral axes have limited growth and end in a flower on the top. Thus, inflorescence of *G. sibiricum* is a monochasium, and the generative shoots have a sympodial type of branching, because the main axis ends in the cymose inflorescence. Lateral shoots of the first level of branching are formed from axillary buds of opposite leaves in the lower node, also end in apical monochasia and form in the lower node shoots of the next level of branching from axillary buds of opposite leaves (fig. 4).

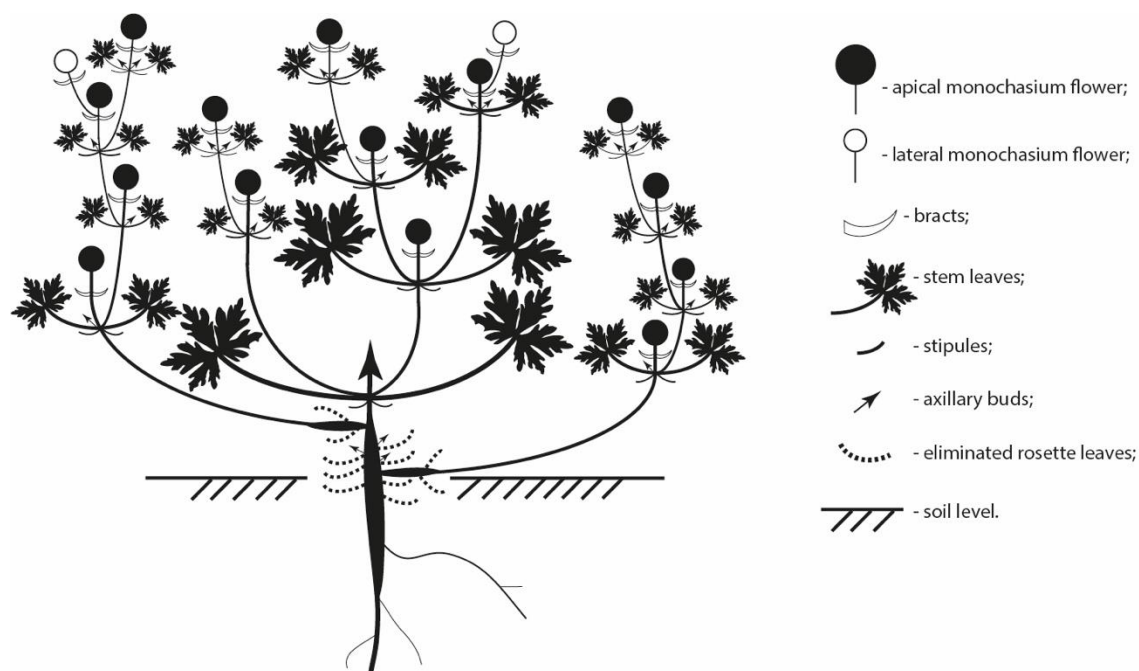


Fig. 4. Morphological structure of *Geranium sibiricum* shoots

Before flowering period, individuals have a main rosette shoot that develops as a polycyclic monocarpic shoot during 1(2) year of growth in seedlings, juvenile, immature and virginal plants. Mainly in the second growing season, the plants begin to bloom and vegetative rosette shoot transforms into monopodial semi-rosette generative shoot. In this shoot renovation, inhibition, and amplification zones are identified for *G. sibiricum* individuals. It was noted that the apex of the main shoot of *G. sibiricum* ends in two (rarely one) flowers on a flowering shoot with peduncles and two opposite underlying leaves with 1–2 (3) lateral shoots (Kalista, Kovalenko, 2021b). Based on our research, the apical bud of main shoot is never developing into an inflorescence or singular flower. Lateral branching of individuals gradually changes to sympodial and after regrowth in the next vegetative period the system of main sympodium is formed (Sugorkina, 1995), thus a subsequent development of *G. sibiricum* shoot system follows the sympodial semi-rosette model of shoot formation.

Probably due to the change in the type of branching during ontogenesis, different types of branching for *G. sibiricum* and even axillary inflorescences are cited in different publications as monopodial (Bezdelev, Bezdeleva, 2006) and sympodial (Tsyrenova, 2007). Although lateral shoots are formed from leaf axils and inflorescences complete axes of all orders of branching of all generative shoots. Since generative plants of *G. sibiricum* are characterized by a sympodial type of branching, we consider it the main in the formation of life forms.

It was also found that in population I generative shoots of individuals are mostly ascending, have 3-5 (7) levels of branching, while in population II generative shoots are ramose and decumbent, order of branching can reach 10–12, and these individuals had up to five times longer internodes and 6-7 times – the total height of plants (up to 1.2–1.6 m), in contrast to plants from population I, in which the shoots are 20-30 cm long. Elemental inflorescences of *G. sibiricum* are mostly monochasia, single-flowered (rarely two-flowered) (fig. 5).

According to our biomorphological studies, we identified that *G. sibiricum* growth forms is characterized by polyvariety and is represented by one main and two additional types. The main one is

mostly biennial conode taproot monocarpic with monopodial branching type. Occasionally, *G. sibiricum* individuals have such types of life forms: 1) caudex taproot oligocarpic with sympodial type of branching (for perennial plants that have connection of the perennial stem with the taproot); 2) basiphys fibrousroot oligocarpic with sympodial type of branching (fig. 6).

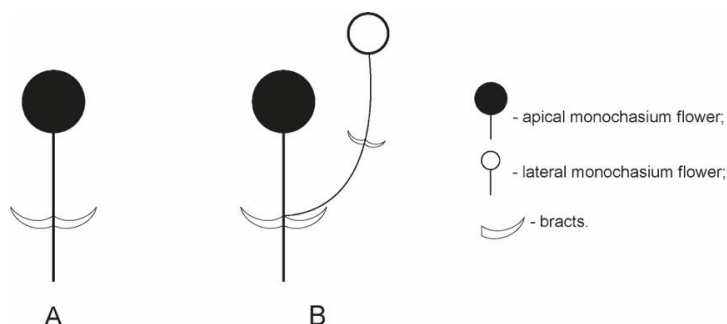


Fig. 5. Principal inflorescence of *Geranium sibiricum*: A – single-flowered monochasium, B – two-flowered monochasium

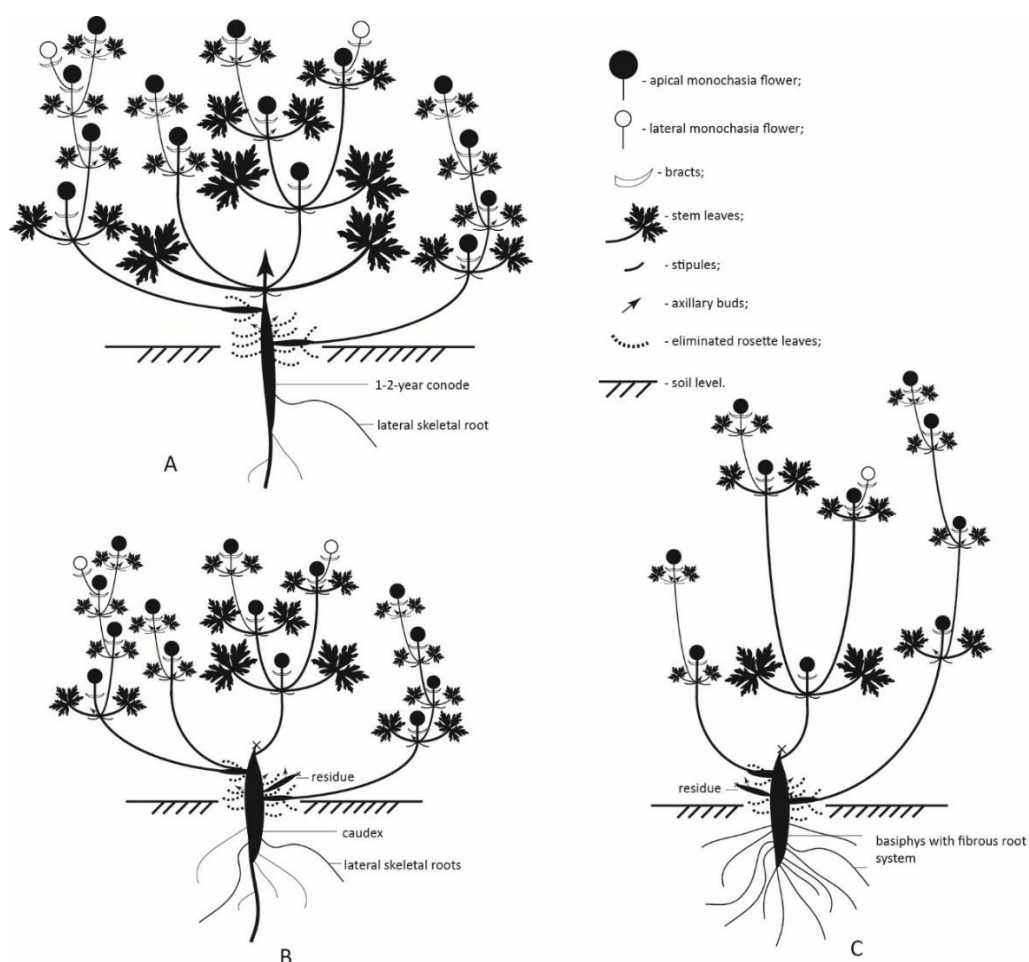


Fig. 6. Schematic growth forms of *Geranium sibiricum*: A – conode taproot monocarpic, B – caudex taproot oligocarpic, C – basiphys fibrousroot oligocarpic

We also have confirmed the data that in the process of ontogenesis the root system of individuals of *G. sibiricum* can be taproot, mixed and fibrous (Volkova and Osmanova, 2012). In plants with conode the

taproot system (fig. 2A, 6A) persists throughout life. For caudex plants of different levels of vitality after the first year of life with the onset of flowering may retain the taproot or form mixed with a distinct main root. And for basiphys plants, the taproot develops in a mixed with the beginning of flowering and becomes fibrous, while the main root becomes indistinct (but does not die) (Kalista, Kovalenko, 2021a) (fig. 7).



Fig. 7. Types of root systems of *Geranium sibiricum* basiphys plants: A – mixed, B – fibrous

Discussion

Conode is typical of most individuals of population I and small group of individuals of population II. In these plants the main taproot retains, thickens and it is clearly distinguished, root system contains also 1-2 lateral skeletal roots, there are not so many additional roots, they have a much shorter length and diameter than the main and skeletal roots, so we considered it appropriate to use the term “conode” for the main type of *G. sibiricum* life form (fig. 6A).

We have also designated that the life forms of individuals of *G. sibiricum* is polyvariant and it is represented by two more types of life forms:

- 1) caudex taproot oligocarpic with sympodial type of branching (fig. 6B);
- 2) basiphys fibrousroot oligocarpic with sympodial type of branching (fig. 6C).

The first type of life form variations – caudex with minimoresidues – is characteristic of individuals of part of both studied populations. Such plants are capable of repeated flowering, forming a caudex with minimoresidues and a taproot or mixed (in individuals with a high level of vitality) root system. Minimoresidues are the main structural elements of the sympodial caudex, which consist of the shortened bases of the shoots after the death of their upper, usually elongated, parts and belong to annual, semi-annual, and over annual (oligocyclic) monocarpic shoots by the features of their external morphology and size. Only plants are considered to be caudex, in which the connection of the perennial stem part with the tap main root is preserved, and the degree of lignification is not of fundamental importance (Nukhimovskiy, 1969a).

Caudex is functionally (both storage nutrients and continue vegetative growth after winter) and morphologically (thickening and shortening of internodes, perenniality) similar to rhizome. That is why, in our opinion, some floristic summaries indicate the presence of an “indistinct rhizome” for *G. sibiricum*. However, unlike rhizomes, caudexes do not die in the basal part and, together with the primary root system of the plant, remain throughout life (Serebryakov and Serebryakova, 1965). Hence, it is necessary to use the term “caudex” to characterize the first type of *G. sibiricum* life form.

Individuals of the second type of life form variation represented by oligocarpic plants with developed, elongated, prostrate and decumbent generative shoots, which grow in conditions of sufficiently high humidity, partial shading by shrubs and the presence of a fairly dense and tall grass cover. They dominate

only in population II, on the other hand, they were not found in the population I at all. And this population I is represented by much smaller plants with ascending shoots that grow in more open areas and have a lower density of grass cover of equal or slightly higher plants than *G. sibiricum*. In such plants at 2-3rd year of life the main root becomes indistinct (but does not die), a large number of powerful additional roots are formed, and a fibrous root system is established. Such herbaceous perennial individuals with a sympodial type of branching and a fibrous root system, instead of the caudex develop basiphys, a perennial stem part, which consists, as a rule, of 1–2 (3) minimoresidues (Nukhimovskiy, 1969b).

Polyvariance of plant development, and, consequently, structural polymorphism are considered as manifestations of the adaptive potential of plants to the ecological and cenotic conditions of specific places of growth. The plant habit that develops under certain environmental conditions, i.e. a certain type of its structural organization is the result of a holistic reaction of the organism, represented by many private responses of its individual parts in their infrastructural organization (Scherbakova, Kalistaya, 2013). Thus, architectural polyvariance of *G. sibiricum* life form indicates shoot system structure of individuals of this species dependance from the growing conditions.

Conclusion

The main type of *G. sibiricum* life form is conode taproot monocarpic with monopodial branching type. There are two additional types of *G. sibiricum* life form: caudex taproot oligocarpic with sympodial type of branching and basiphys fibrousroot oligocarpic with sympodial type of branching. It was found that the diversity of the architectural structure of these invasive species individuals associated with different growth conditions, possibly can be an adaptation to specific environmental conditions of their populations and may be valuable for examining the introduction of invasive species and identifying life history stages where management will be most effective.

References

- Aniszewski T. (2012). Phenomena, Biometrics and Canopy Behavior of Prickly Comfrey (*Symphytum asperum* Lep., Boraginaceae) in a Long-Term Experiment. *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica*, 54(1), 121–128. <https://doi.org/10.2478/v10182-012-0013-z>
- Barthélémy D., Caraglio Y. (2007). Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. *Annals of Botany*, 99 (3), 375–407. <http://doi.org/10.1093/aob/mcl260>
- Bertin R.I. (2001). Life cycle demography, and reproductive biology of herb Robert (*Geranium robertianum*). *Rhodora*, 103 (913), 96–116.
- Bezdelev A.B., Bezdeleva T.A. (2006). Life forms of seed plants of the Russian Far East. Dalnauka, Vladivostok. 296 p.
- Bobrov E.G. (1949). *Geranium* L. In: Shyshkin BK, Bobrov EG (eds.), *Flora of the SSSR* 14, 2–62. The Academy of Sciences of the USSR Press, Moscow and Leningrad.
- Crawley MJ (ed.) (1997). Plant ecology. Second edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dellafrerra I.M., Panigo E.S., Vegetti A.C., Perreta M.G. (2014). Growth forms of *Parietaria debilis* (Urticaceae) and *Veronica persica* (Plantaginaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49(3), 1–12.
- Dobrochaieva D.M. (1955). *Geranium* L. In: Klovov MV, Visiulina OD (eds.), *Flora of Ukrainian SSR* 7, 6–32. The USSR Academy of Sciences Press, Kyiv. 436 p. (in Ukrainian)
- dos Santos P., Brilhante M.A., Messerschmid T.F.E., Serrano H.C., Kadereit G., Branquinho C., de Vos J.M. (2022). Plant growth forms dictate adaptations to the local climate. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1023595. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1023595>
- Drescher A., Lechner M., Berg C. (2012). Pflanzen mit invasivem Potenzial in Botanischen Gärten III: *Geranium sibiricum* (Geraniaceae). *Carinthia II*, 202/122, 33–46.
- iNaturalist (2024). <https://www.inaturalist.org>
- Geng Y.P., Pan X.Y., Xu C.Y., Zhang W.J., Li B., Chen J.K., Lu B.R., Song Z.P. (2007). Phenotypic plasticity rather than locally adapted ecotypes allows the invasive alligator weed to colonize a wide range of habitats. *Biological Invasions*, 9, 245–256. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9029-1>
- Harper J.L. (1977). Population biology of plants. Academic Press, London; New York. 892 p.
- Kalista M., Kovalenko O. (2021a). Morphological investigation on underground organs of *Geranium sibiricum* L. In Brindza J. (ed.), *Book of Abstracts of the 5th International Scientific Conference*

- Agrobiodiversity for Improving the Nutrition, Health, Quality of Life and Spiritual Human Development, 71. Slovak University of Agriculture in Nitra, Nitra. p. 71. <https://doi.org/10.15414/2021.9788055224015>
- Kalista M., Kovalenko O. (2021b). Biomorphological features of the invasive species *Geranium sibiricum* L. in two local populations. *Conservation of plants in connection with climate changes and biological invasions: materials of the international scientific conference*. Alexandria, 31 March 2021, 275–277. (in Ukrainian)
- Kalista M.S., Scherbakova O.F., Novosad V.V. (2015). Polyvariance of ontomorphogenesis of the Crimean endemic rare species *Anthemis sterilis* Steven (Asteraceae Bercht. et J.Presl). *Plant Introduction*, 3, 25–34. (in Ukrainian)
- Khlystun N.Y. (2006). Adventive flora of Chernivtsi city. PhD theses, M. M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine, Kyiv. 20 p. (in Ukrainian)
- Kovalenko O.A. (2010). Findings of adventive plant species in the vicinity of the Pyryatynsky National Nature Park (Ukraine, Poltava region). *Bulletin of the National Museum of Natural History*, 8, 61–66. (in Ukrainian)
- Kovtun I.V. (2004). Flora of Kamenets Transnistria. PhD theses, M. G. Kholodnyi Institute of Botany of NAS of Ukraine, Kyiv. 20 p. (in Ukrainian)
- Kyyak V.H. (2012). Evaluation criteria for the state and recruitment ability of small populations of rare highmountain Carpathian plant species. *Proceedings of the State Natural History Museum*, 28, 41–50. (in Ukrainian)
- Lehmann C., Rebele F., Starfinger U. (1999). Plant Population Ecology. In: Esser K., Kadereit J.W., Lüttge U., Runge M. (eds.), *Progress in Botany*, 60, 502–526. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-59940-8_18
- Leshchenko Y.O., Bengus Y.V. (2016). Findings of *Geranium sibiricum* L. in Kharkiv city. *Biology and valeology*, 18, 105–115. <http://doi.org/10.5281/zenodo.167386> (in Ukrainian)
- Lukash O.V. (2008). Flora of vascular plants of Eastern Polissya: history of research, checklist. Phytosocial Center, Kyiv. 436 p. (in Ukrainian)
- Malynovsky A., Bilonoha V. (2003). Correlations of morphometric parameters of plants at population level. *Proceedings of the State Natural History Museum*, 18, 157–168. (in Ukrainian)
- Malynovskiy K.A. (ed.) (1998). *Structure of populations of rare species of Carpathian flora*. Naukova dumka, Kyiv. 176 p. (in Ukrainian)
- Meusel H., Jäger E., Mörchsen G. (1977). The study of growth-forms of higher plants in relation to application of biocide. *Vegetation Science and Environmental Protection. Proceedings of the International Symposium in Tokyo on protection of the environment and excursion on vegetation science through. Japan*, 5–7 June, 1974, 71–76.
- Meusel H. (1952). Über Wuchsformen, Verbreitung und Phylogenie einiger mediterran-mittel-europäischen Angiospermen-Gattungen. *Flora*, 139, 333–393. (in German)
- Meusel H. (1970). Wuchsformenreihen Mediterran-mitteuropäischer Angiosperm-Taxa. *Feddes Repertorium*, 81, 41–59. (in German)
- Montenegro G., Ginocchio R. (1992). Modular interpretation of architecture in shrub species. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 65, 189–202.
- Nukhimovskiy L.E. (1969a). About the term and concept “caudex”. Communication 2. The current state of the issue. *Bulletin of Moscow University*, 1, 55–62.
- Nukhimovskiy L.E. (1969b). About the term and concept “caudex”. Communication 3. The variety of caudexes and their difference from other structural formations. *Bulletin of Moscow University*, 2, 71–78.
- Perreta M., Vegetti A. (2005). Patrones estructurales en las plantas vasculares: una revision. *Gayana Botanica*, 62, 9–19.
- Protopopova V.V. (1992). Synanthropic flora of Ukraine. Naukova dumka, Kyiv. 204 p. (in Ukrainian)
- Sakai A.K., Allendorf F.W., Holt J.S., Lodge D.M., Molofsky J., With K.A., Baughman S., Cabin R.J., Cohen J.E., Ellstrand N.C., McCauley D.E., O’Neil P., Parker I.M., Thompson J.N., Weller S.G. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 305–332.
- Scherbakova O.F., Kalistaya M.S. (2013). Polyvariant architectural model of *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch shoot system. *Modern Phytomorphology*, 3, 153–160.
- Serebryakov I.G., Serebryakova T.I. (1965). On two types of rhizome forming by perennial plants. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists*, LXX (2), 241–245.
- Sugorkina N.S. (1995). Genus *Geranium*. In: Pavlov V.N, Tikhomirov V.N. (eds.), *Biological Flora of the Moscow Region*, 12, 134–163. Argus, Moscow.

- Taylor A., Weigelt P., Denelle P., Cai L., Kreft H. (2023). The contribution of plant life and growth forms to global gradients of vascular plant diversity. *New Phytologist*, 240(4), 1548–1560. <https://doi.org/10.1111/nph.19011>
- Tishchenko M.P. (2009). Meadows in the southwestern part of the Tomsk region. *Bulletin of Tomsk State university*, 329, 241–245.
- Troll W. (1964). Die Infloreszenzen. Bd. 1. Jena, Fischer Verlag. 615 p.
- Tsyrenova D.Y. (2007). *Geranium in the Amur basin. Systematics, distribution, phylogeny*. FESGU Press, Khabarovsk. 182 p.
- Volkova I.V., Osmanova G.O. (2012). Features of underground organs in individuals of Siberian geranium and the structure of its cenopopulations. *Modern problems of medicine and natural sciences*, 6, 209–212.
- Ukrainian Biodiversity Information Network (UkrBIN) (2024). <https://www.ukrbn.com>
- Webb D.A., Ferguson I.K. (1968). *Geranium* L. In: Tutin T.G. et al. (eds.), *Flora Europaea* 2, 193–199. Cambridge University Press, Cambridge.

Життєві форми та будова пагонів інвазійного виду *Geranium sibiricum* L. (Geraniaceae) у двох локальних популяціях в Україні М.С. Каліста, О.А. Коваленко

Було встановлено, що життєва форма чужорідного інвазійного виду рослин *Geranium sibiricum* в різних літературних джерелах трактується неоднозначно, а в описі підземних органів (пагонової та кореневої систем) твердження різних авторів є часто навіть суперечливими. У роботі було проаналізовано вісімдесят особин *G. sibiricum*, зібраних у 2019–2021 рр. під час польових досліджень у двох локальних популяціях: у м. Пирятин (Полтавська область) та м. Києві (Київська область), з метою вивчення типу форми росту та структури пагонів з використанням поглибленої концепції різноманітності каудексів та їх відмінності від інших структурних утворень. Було уточнено основну життєву форму та модель пагоноутворення *G. sibiricum*, яка представлена дворічним конодієвим стрижневокореневим монокарпіком з моноподіальним типом галушення. В зв'язку з вираженою поліваріантністю життєвої форми виду, у особин *G. sibiricum* було описано ще два її типи: каудексовий стрижневокореневий олігокарпик та базифізний мичкуватокореневий олігокарпик з симподіальним типом галушення. Проаналізовано будову елементарних суцвіть *G. sibiricum*, досліджено будову його надземної та підземної пагонової системи, а також кореневої системи. Встановлено, що особини *G. sibiricum* у популяціях м. Пирятин та м. Києва відрізняються довжиною квітконосного пагона, довжиною міжвузлів та рівнем галушення та мають різний тип генеративних пагонів за розміщенням у просторі. Було виявлено, що різноманітність архітектурної структури особин цього інвазійного виду, пов'язана з різними умовами зростання, ймовірно, може бути адаптацією до конкретних умов навколишнього середовища їхніх популяцій і може бути цінною для вивчення інтродукції інвазійних видів та визначення етапів розвитку, на яких менеджмент їхніх популяцій буде найбільш ефективним.

Ключові слова: чужорідна рослина, популяції, структура рослини, життєві форми, морфологія рослин, поліморфізм

Цитування: Kalista M.S., Kovalenko O.A. Life forms and shoot structure of the invasive species *Geranium sibiricum* L. (Geraniaceae) in two local populations in Ukraine. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*, 2024, 43, с. 8-17. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-1>

Про авторів:

М.С. Каліста – Національний науково-природничий музей НАН України, вул.. Богдана Хмельницького, 15, Київ 01054, Україна, crambe@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-2335-5184>
О.А. Коваленко – Національний науково-природничий музей НАН України, вул.. Богдана Хмельницького, 15, Київ 01054, Україна, crambe@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-6405-2035>

Подано до редакції: 10.06.2024 / Прорецензовано: 18.07.2024 / Прийнято до друку: 14.09.2024

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-2
УДК: 502:581.5

***Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Orchidaceae) у природному заповіднику
“Горгани”: популяційні моніторингові дослідження і комплексна
характеристика середовища існування
Т.І. Полатайко, О.В. Безроднова**

Вперше для території природного заповідника “Горгани” на прикладі постійної пробної площі № 1 складено комплексну характеристику типової післялісової луки: за результатами екоморфичного аналізу парціальної флори виявлено її екологічну специфіку; за даними вагового аналізу і показниками проективного покриття отримано інформацію щодо особливостей просторової організації рослинного покриву; на підставі фітоіндикації здійснено розрахунок показників екологічних режимів едафотопу і кліматопу; досліджено структуру ценопопуляції *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. і виявлено ступінь відповідності умов місцезростання зоні толерантності цього виду. Фітосоцологічна цінність пробної площі обумовлена наявністю сімох видів з Червоної книги України: *Gymnadenia conopsea*, *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F.Hunt & Summerh., *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Neottia ovata* (L.) Hartm., *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Traunsteinera globosa* (L.) Rchb., *Galanthus nivalis* L.. З'ясовано, що просторова організація рослинного покриву неоднорідна, показники вагового аналізу коливаються в значному діапазоні. Досліджена ділянка відповідає свіжим лісо-лучним екотопам з повним промочуванням кореневмісного шару ґрунту опадами і талими водами. Ґрунти помірно аеровані, слабкокислі, доволі багаті на мінеральні солі, але з незначним вмістом карбонатів і відносно бідні щодо мінерального азоту. Такі умови едафотопу є сприятливими для існування мезофітів, гемігідроконтрастобів, субацидофілів, гемінітрофілів, геміаерофілів, субомброфітів, геміокеаністів, субмікротермів, гемікріофітів. Встановлено, що показники екологічних режимів едафотопу і кліматопу, загалом, знаходяться у межах зони толерантності *G. conopsea*, але для режимів освітлення, змінності зволоження, аерації і кислотності наближаються до межі екологічної амплітуди виду. Позитивним для його існування є наявність сформованого прошарку підстилки (450-500 г на 1м² повітряно-сухої ваги); відсутність щільної дернини (менше 180 г на 1м²), відсутність (або незначний розвиток) ярусів напівчагарників і мохів. Кількість генеративних особин впродовж декількох років залишається відносно стабільною, хоча можна говорити про певну тенденцію до зменшення.

Ключові слова: Карпати, ценопопуляція, місцезростання, моніторинг, екологічні режими, вікова структура, морфометрія

Цитування: Полатайко Т.І., Безроднова О.В. *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Orchidaceae) у природному заповіднику “Горгани”: популяційні моніторингові дослідження і комплексна характеристика середовища існування. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 18–32. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-2>

Про авторів:

Полатайко Т.І. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tetiana.polataiko@student.karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0003-4493-1141>
Безроднова О.В. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, o.bezrodnova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-2506-0881>

Подано до редакції: 18.09.2024 / Прорецензовано: 14.11.2024 / Прийнято до друку: 15.11.2024

Вступ

Одним із аспектів збереження біологічного різноманіття є дослідження стану популяцій та умов місцезростань видів (особливо тих, що охороняються у межах України та Європи). До таких видів належать представники Orchidaceae, зокрема, євразійський вид *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (билинець довгорогий), який занесено до Додатку II Конвенції про міжнародну торгівлю видами дикої фауни і флори (Checklist of CITES species), а також до Червоної книги України з природоохоронним статусом “вразливий” (Червона книга України, 2009; Перелік видів рослин..., 2021). Багато видів родини орхідні мають доволі широкий ареал, але їх представленість у тій чи іншій його частині дуже різниться. Вивчення поширення Orchidaceae у Словаччині показало, що одним із найменш представлених видів у 129 досліджуваних локалітетах був саме *G. conopsea* (Wittlinger, 2021). На території України цей вид поширений у Поліссі, Розточчі, Опіллі, Лісостепу, Гірському Криму і

Карпатах. Популяції нараховують від декількох особин (на рівнині) до сотень і тисяч особин у Карпатах, де популяції є повночленними з перевагою генеративних особин (Червона книга України, 2009). Взагалі, Карпати є одним з осередків різноманіття орхідних в Україні, де вони поширені майже у всіх поясах – від низовини до альпійського поясу (Лоя, 2012; Москалюк, 2017).

Інформація щодо поширення орхідних на території природно-заповідного фонду України і поза його межами висвітлюється у багатьох публікаціях ХХ – початку ХХІ ст. (Чопик, 1967; Вархушева, 2012; Лоя, 2012). Разом із тим, Ю. Пилипів і В. Кияк зазначали, що значна частина з них містять застарілі дані, описів популяцій орхідних для території України усе ще замало, особливо недостатньо уваги приділяється вивченню небезпек, які загрожують представникам цієї родини. Актуалізація даних про стан популяцій орхідних і умов їх існування є важливою, як з наукової, так і практичної точок зору, бо є підґрунтям для розробки заходів з їхнього збереження (Пилипів, Кияк, 2021). Види цієї систематичної групи є важливою ланкою трофічних зв'язків (Слободян, 2010), характеризуються складною біологією, можуть використовуватися як індикатори стану навколишнього середовища, зміни якого знаходять віддзеркалення у зміні показників життєвого стану популяцій, оскільки останні доволі чутливі до дії несприятливих факторів (Лоя, 2012; Пилипів, Кияк, 2021). На особливу увагу заслуговують місцезростання, у межах яких можна зустріти декілька видів Orchidaceae. Наприклад, у складі травостою гірської післялісової луки природного заповідника "Горгани" на ботанічній постійній пробній площі №1 (далі в тексті ппп № 1) окрім *G. conopsea* зростає *Dactylorhiza majalis* (Reichenb.) P.F. Huntet Summerhayes, *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Neottia ovata* (L.) Hartm., *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Traunsteinera globosa* (L.) Rchb. Це третина усіх видів орхідних, що зустрічаються у межах заповідника (Клімук Ю.В. та ін., 2006).

Необхідно зазначити, що вперше конспект флори судинних рослин заповідника "Горгани" був опублікований ще у 2006 р. (Клімук та ін., 2006). У подальші роки науковці продовжували флористичні дослідження. Так була не тільки узагальнена інформація стосовно систематичної структури флори заповідника станом на 2021 р., але й охарактеризована у загальних рисах її ценоморфічна, біоморфічна і екологічна структура (Кузнецов, 2021). Упродовж багатьох років здійснювався моніторинг за станом популяцій видів із раритетної частини флори, у тому числі орхідних (Полатайко, 2022а, 2022б). Виявлення специфіки екологічної структури флори певних типів біотопів або дослідження екологічних режимів (зокрема, в місцях поширення рідкісних видів) до останнього часу не проводилося. Разом із тим, наприклад, під час дослідження *G. conopsea* на території Криму, було встановлено, що на стан популяції впливають, як кліматичні умови поточного вегетаційного, так і попереднього поствегетаційного періодів (Сверкунова, 2011; Кобечинская, 2012; Вархушева, 2012). Взагалі, основним чинником зміни чисельності цього виду (окрім заготівлі як лікарської сировини) є зміна еколого-ценотичних умов місцезростань, як наслідок дії природних факторів, так і антропогенного впливу (сильватизація території, корінне поліпшення лук тощо) (Червона книга України, 2009; Пилипів, 2021). Наша робота була спрямована на узагальнення результатів моніторингових популяційних досліджень *G. conopsea* на території природного заповідника "Горгани" і складання комплексної характеристики умов середовища існування. Зокрема, виявилася специфіка екологічних режимів кліматопу і едафотопу, а також особливості структури рослинного покриву.

Матеріали і методи

Для написання статті були використані результати особистих досліджень, здійснених у вегетаційний період 2022 року, і архівні дані науково-дослідного відділу природного заповідника "Горгани" (Літопис природи, 2016, 2019). Дослідження проводилося на території Горганського природоохоронного науково-дослідного відділення заповідника у межах ботанічної ппп №1, яка була закладена 02.04.2004 року у 4 виділі 13 кварталу (координати центральної частини 48°29'06.6"N 24°17'04.1"E) з метою комплексного вивчення біолого-екологічних особливостей та стану популяцій видів з Червоної книги України (рис. 1). Досліджена територія розташована на схилі західної експозиції стрімкістю 20° на висоті 985 м н.р.м. і представляє собою післялісову луку, яка до створення заповідника використовувалася для сінокошення. Наразі відбувається повільне заростання чагарниково-деревними видами.

Для отримання комплексу якісних та кількісних ознак, які характеризують стан досліджуваної ценопопуляції *G. conopsea*, проводили суцільний облік особин цього виду (виключаючи особини, що перебувають у стані вторинного спокою) на 5 трансектах (1 на 70 м кожна) і заміри морфометричних показників 60 модельних екземплярів з урахуванням їхнього онтогенетичного стану. Зокрема, із

використанням лінійки вимірювалась довжина і ширина листка для ювенільних особин, для генеративних – довжина стебла і суцвіття, а також у останніх рахувалася кількість квіток. Вікові групи визначали на підставі наявних методичних рекомендацій для орхідних (Вархушева, 2012). Для виявлення флористичного різноманіття і оцінки внеску окремих видів у формування рослинного покриву пп №1 було зроблено 20 стандартних геоботанічних описів ділянок площею 10 м². Для проведення вагового аналізу було закладено 8 облікових ділянок (ОД) по 0,5 м² (у межах найбільш типових угруповань). Проба фітомаси з кожної ділянки була розподілена на наступні фракції: ярус напівчагарників (за наявності), моховий і трав'яний яруси (у складі останнього виділяли такі агробіологічні групи, як різнотрав'я і злаки з осоками), відмерла надземна фітомаса, підземна фітомаса, що формує дернину. Зразки сушили і після досягнення повітряно-сухого стану зважували.

Розрахунок показників екологічних режимів місцезростання здійснювався на підставі екологічних шкал Я.П. Дідуха (Didukh, 2011) із застосуванням комп'ютерної програми Turboveg For Windows. При екоморфічному аналізі використана загальноприйнята у вітчизняних екологічних дослідженнях система екоморф, наведена у 1 томі видання "Екофлора України" (Екофлора України, 2010). Номенклатурні назви видів надано відповідно до WFO (2024). Обробку картографічних матеріалів здійснено у програмі QGIS.

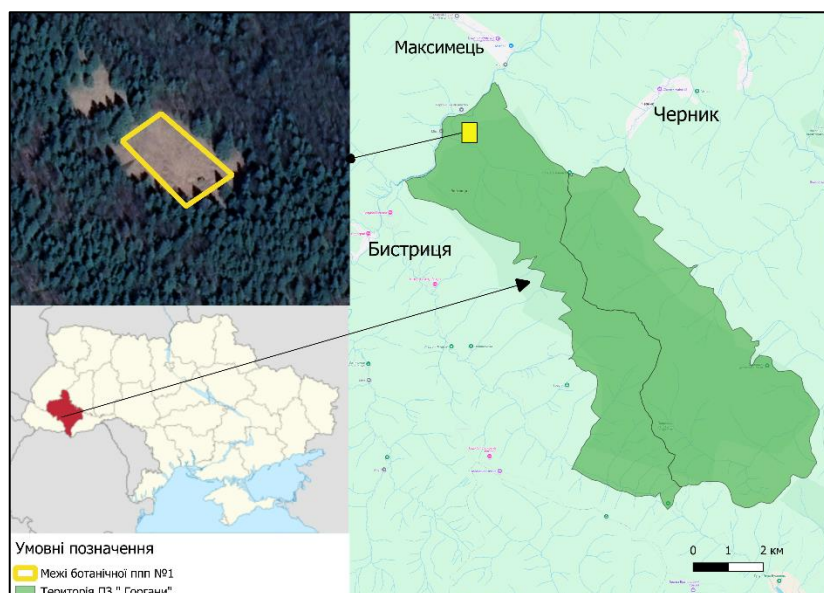


Рис. 1. Місце розташування ботанічної постійної пробної площі №1 на території природного заповідника "Горгани"

Fig. 1. Location of the botanical permanent trial area No. 1 on the «Gorgany» Nature Reserve territory

Результати та Обговорення

Аналіз останніх публікацій показав, що дослідження еколого-ценотичних особливостей місцезростання орхідних наразі не втрачають своєї актуальності. Так, наприклад, аналізувалися особливості поширення певних представників цієї родини у різних типах лісорослинних умов (долина р. Мерла) (Безроднова та ін., 2020). Безпосередньо для *G. conopsea* були отримані дані стосовно умов місцезростання його ценопопуляцій у складі злаково-різнотравних лучно-степових комплексів (урочище Підокруг на Буковинському Прикарпатті) (Токарюк, 2018). На підставі фітоіндикаційної оцінки для 15 видів орхідних (зокрема і *G. conopsea*), що поширені на території верхнього басейну р. Прут, було доповнено і уточнено відомості про ширину екологічної амплітуди, а отримані бальні показники є підставою для прогнозування можливих ризиків у разі змін умов навколишнього середовища (Буджак, 2020). Поза межами України дослідження *G. conopsea* проводилися у багатьох частинах його ареалу поширення: Чехії, Словаччині, Фінляндії, Китаї, островах Британії та Швеції (Wittlinger, 2021; Meekers, 2012; Kettunen, 2010; Marhold, 2005; Shang, 2017). Вони були присвячені вивченню різних аспектів – репродуктивної біології (Chapurlat, 2019), вмісту хімічних сполук та їх

фармакологічних властивостей (Shang, 2017), структури мікробіому коренів (Lin, 2020), морфологічних та молекулярно-генетичних особливостей (Kettunen, 2010; Marhold, 2005), впливу демографічних показників популяції на генетичну різноманітність (Söderquist, 2023; Sletvold, 2024). Таким чином, *G. conopsea* викликає неабиякий інтерес у науковців. Його популяції в різних частинах ареалу можуть проявляти значну варіабельність кількісних та якісних ознак, зокрема, внаслідок різноманіття середовищ існування. Тому подальші дослідження варто зосередити на виявленні усього спектру цього різноманіття, а це можливо лише за умови збереження існуючих популяцій *G. conopsea*.

Необхідно зазначити, що у межах України на національному рівні *G. conopsea* охороняється, як у складі колекцій ботанічних садів (Національному імені М.М. Гришка НАН України, Українського державного лісотехнічного університету), так і у складі природних угруповань Карпатського біосферного заповідника, шістьох національних природних парків і трьох природних заповідників (Червона книга України, 2009). У межах природного заповідника "Горгани" *G. conopsea* можна зустріти доволі часто (у порівнянні з іншими видами орхідних, які трапляються спорадично або зрідка) переважно у складі трав'яних угруповань вологих лук і лісових галявин, що мають, як правило, вторинне походження (Клімук, 2006). Саме такою типовою післялісовою лукою є рослинне угруповання ботанічної ппп №1.

Усього у флорі досліджуваної луки зафіксовано 58 видів судинних рослин, з яких найбільш численною є група лучно-лісових. Четверта частина видів є типовими пратантами, а до групи сільвантів належить лише восьма частина виявлених видів. Серед злаків зустрічаються *Elymus repens* (L.) Gould, *Agrostis capillaris* L., *Anthoxanthum odoratum* L., *Nardus stricta* L., *Festuca rubra* L., *Cynosurus cristatus* L. тощо. Осоки представлені менш різноманітно (*Carex pallescens* L., *C. panicea* L.). З видів різнотрав'я найбільше проєктивне покриття характерне для *Cruciata glabra* (L.) Opiz, *Centaurea mollis* Waldst. & Kit., *Hypericum maculatum* Crantz, найбільші показники трапляння для *Stellaria graminea* L., *Achillea millefolium* L., *Plantago lanceolata* L.. На окремих ділянках у значній кількості зустрічаються *Ranunculus acris* L., *Trollius europaeus* L., *Leucanthemum vulgare* Lam., *Rhinanthus minor* L., *Astrantia major* L., *Arnica montana* L., *Alchemilla monticola* Opiz, *Tanacetum corymbosum* subsp. *subcorymbosum* (Schur) Pawł., *Carlina acaulis* L.. Оскільки ппп №1 презентує відкриті простори, у спектрі геліоморф переважають субгеліофіти. До гемісціофітів належить трохи більше п'ятої частини видового складу, зокрема, *Soldanella hungarica* Simonk., *Cerastium fontanum* subsp. *vulgare* (Hartm.) Greuter & Burdet.

Взагалі, екоморфічний аналіз флори дуже добре демонструє її екологічну специфіку. Наприклад, спектр термоморф (рис. 2 А) підкреслює особливості мікроклімату, зокрема те, що переважна більшість видів пристосована до існування в умовах холодного помірного клімату з порівняно низькими температурами і здатна закінчувати життєвий цикл в умовах короткого і холодного літа. Такі види належать до двох груп: мікротерми та субмікротерми (відповідно 8 і 32 види). У складі першої групи переважають пристосовані до суворих зим субкріофіти та кріофіти (типовим представником останніх, наприклад, є *Homogyne alpina* (L.) Cass.). У групі субмікротермів майже однакова кількість субкріофітів і гемікріофітів. Представниками перших є *Agrostis capillaris*, *Festuca rubra* L., *Lolium pratense* (Huds.) Darbysh., *Elymus repens*, *Platanthera bifolia*, *Neottia ovata*, представниками других – *Sieglingia decumbens* (L.) DC., *Leontodon hispidus* L., *Veronica officinalis* L., *Polygala vulgaris* L. Друге місце у спектрі термоморф за числом видів (18) належить групі субмезотермів. У її складі лише декілька видів-субкріофітів (зокрема, *Cerastium fontanum* subsp. *vulgare*, *Stellaria holostea* L., *S. graminea*), а дві третини більш теплолюбні гемікріофіти. Останні у спектрі кріоморф, взагалі, посідають перше місце (рис.2 Г). Група акріофітів налічує лише один вид (*Luzula campestris* (L.) DC.).

У спектрі омброморф (рис. 2 В) представлено 6 груп, чотири з яких (мезо-, семі-, суб- і еуаридофіти) об'єднали 24 види, що пристосовані до життя в умовах значних добових і річних амплітуд температури повітря і незначної кількості опадів. Майже 60% видів є представниками суб- і мезоомброфітів (відповідно 29 і 4), більшість з яких є гемі- та субокеаністами. Ці види віддають перевагу регіонам, де клімат характеризується високою відносною вологістю повітря, значною хмарністю, прохолодним літом. Взагалі, у спектрі контрастоморф група геміокеаністів є найчисельнішою (охоплює більше половини видового складу), а видів, що пристосовані до більш жорстких умов континентального клімату – геміконтиненталів – лише 17 видів. Таким чином, структура спектрів омбро- та контрастоморф добре віддзеркалює особливості регіонального клімату.

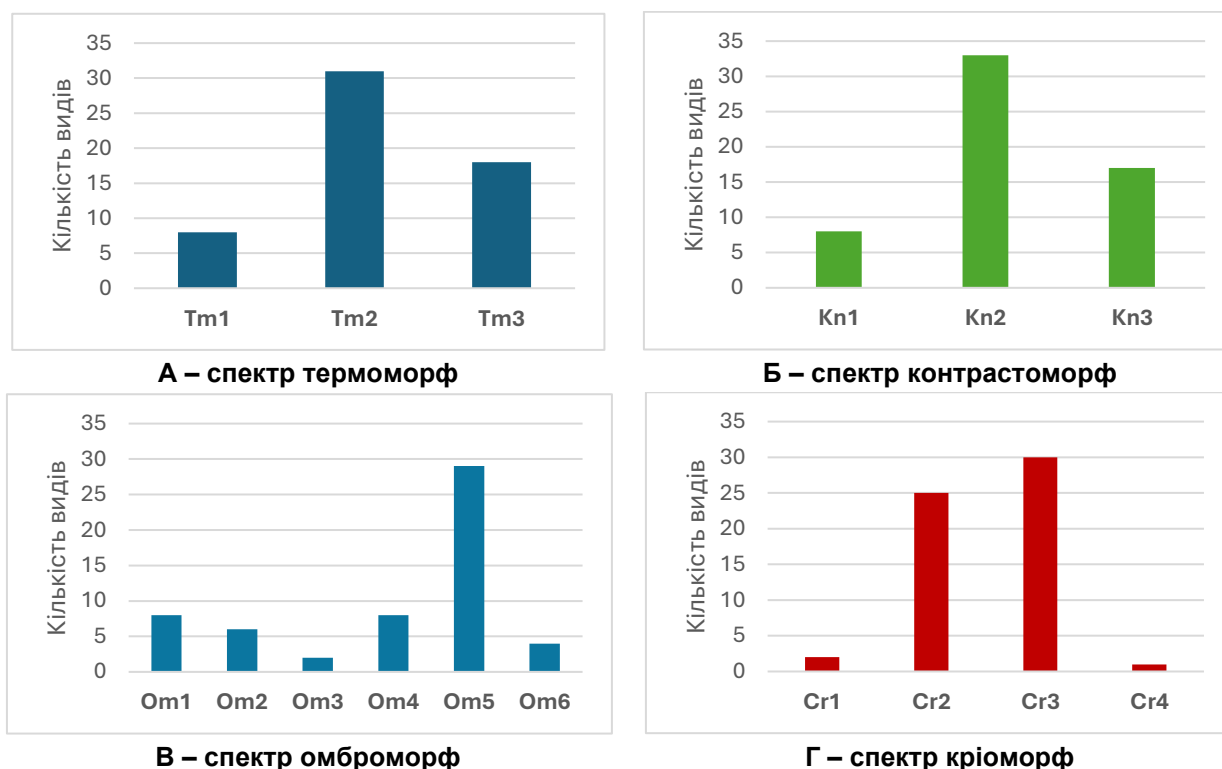


Рис. 2. Особливості кліматопу пп №1 (А – спектр термоморф, Б – спектр контрастоморф, В – спектр омброморф, Г – спектр кріоморф)

Екологічні групи: Тm1 – мікротерми, Тm2 – субмікротерми, Тm3 – субмезотерми; Kn1 – субокеаністи, Kn2 – геміокеаністи, Kn3 – геміконтинентали; Om1 – еуаридофіти, Om2 – семіаридофіти, Om3 – мезоаридофіти, Om4 – субаридофіти, Om5 – субомброфіти, Om6 – мезоомброфіти; Cr1 – кріофіти, Cr2 – субкріофіти, Cr3 – гемікріофіти, Cr4 – акріофіти.

Fig.2. Features of climatopes of the permanent trial area No. 1 (A – spectrum of thermomorphs, B – spectrum of contrastomorphs, C – spectrum of ombromorphs, D – spectrum of cryomorphs)

Ecogroups: Tm1 – microtherms, Tm2 – sub-microtherms, Tm3 – sub-mesotherms; Kn1 – sub-oceanic, Kn2 – hemi-oceanic, Kn3 – hemi-continental; Om1 – euaridophytes, Om2 – semi-aridophytes, Om3 – meso-aridophytes, Om4 – sub-aridophytes, Om5 – sub-ombrophytes, Om6 – meso-ombrophytes; Cr1 – cryophytes, Cr2 – sub-cryophytes, Cr3 – hemi-cryophytes, Cr4 – acryophytes.

Специфічною рисою флори природного заповідника "Горгани" є її мезофільний характер (Кузнецов, 2020), при цьому частка саме мезофітів становить лише 24 %, гігрозомезофітів – 15 %, а субмезофітів 42%. Специфікою досліджуваної парцільної флори пп № 1 (рис. 3 А) є переважання у спектрі гігрозоморф саме мезофітів (понад 50 %) і гігрозомезофітів (третина виявлених видів). З 21 виду пратентів мезофітами є лише 6, більшість же лучних видів належить до групи гігрозомезофітів. У групі мезофітів переважають гемідроконтрастофоби (17 видів, що потребують повного промочування опадами і талими водами кореневмісного шару ґрунту) і гемігідроконтрастофіли (10 видів, що можуть існувати при помірному або незначному промочуванні кореневмісного шару). Мезофіти-гідроконтрастофіли представлені лише одним видом (*Leucanthemum vulgare*), як і мезофіти-гідроконтрастофоби (*Vaccinium myrtillus* L.). Останній вид на території заповідника зустрічається, як у сухих і вологих екотопах з рівномірним стійким зволоженням кореневмісного шару ґрунту, так і у сухих екотопах, що спорадично промочуються опадами (Клімук, 2006). Представниками гігрозомезофітів-гігмідроконтрастофілів, пристосованих до існування в умовах сухих лісо-лучних екотопів з нерівномірним зволоженням кореневмісного шару ґрунту, є *Trifolium pratense* L. і *T. repens* L. З гігрозомезофітів-гігмідроконтрастофобів найбільшу участь у формуванні травостою беруть *Cruciata glabra*, *Poa pratensis* L., *Hypericum maculatum*. Саме до цієї групи належать і такі рідкісні види родини Orchidaceae, як *G. conopsea*, *Platanthera bifolia*, *Traunsteinera globosa*,

Neottia ovata, для яких зміна режиму зволоження є несприятливим фактором. Гіромезофітів-гідроконтрастофобів лише два види (*Ranunculus acris*, *Trollius europaeus*). Взагалі, якщо у складі мезофітів переважають гемігідроконтрастофоби, то у групі гіромезофітів майже однакова кількість гемігідроконтрастофобів і гемігідроконтрастофілів. Гемігідроконтрастофобами є обидва представники малочисельної групи гігрофітів (*Carex panicea*, *Dactylorhiza majalis*), а от усі шість видів субмезофітів є гемігідроконтрастофілами.

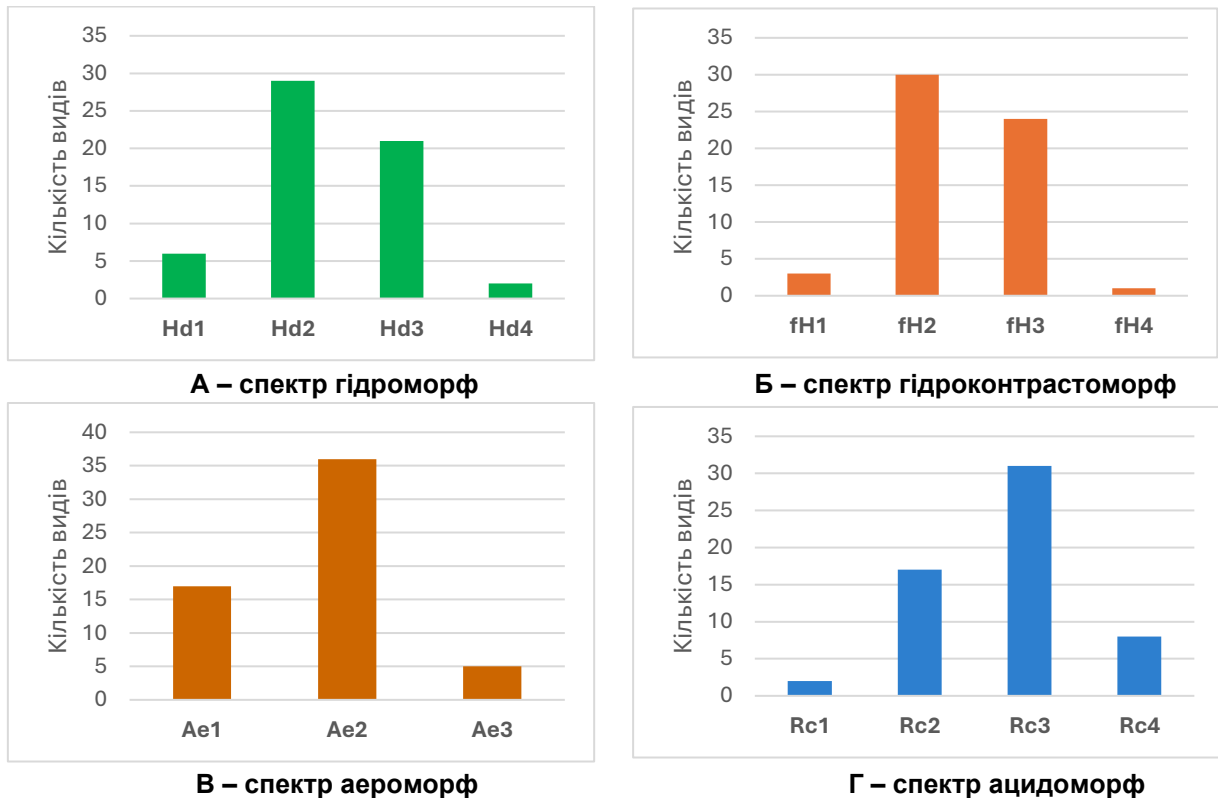


Рис. 3. Особливості едафотопу пп №1 (А – спектр гідроморф, Б – спектр гідроконтрастоморф, В – спектр аероморф, Г – спектр ацидоморф)

Екологічні групи: Hd1 – субмезофіти, Hd2 – мезофіти, Hd3 – гіромезофіти, Hd4 – гігрофіти; fH1 – гідроконтрастофоб, fH2 – гемігідроконтрастофоб, fH3 – гемігідроконтрастофіл, fH4 – гідроконтрастофіл; Ae1 – субаерофіли, Ae2 – геміаерофоби, Ae3 – субаерофоби; Rc1 – перацидофіли, Rc2 – ацидофіли, Rc3 – субацидофіли, Rc4 – нейтрофіли.

Fig. 3. Features of edaphotopes of the permanent trial area No. 1 (A – spectrum of hydromorphs, B – spectrum of hydrocontrastomorphs, C – spectrum of aeromorphs, D – spectrum of acidomorphs)

Ecogroups: Hd1 – sub-mesophytes, Hd2 – mesophytes, Hd3 – hygro-mesophytes, Hd4 – hygrophytes; fH1 – hydrocontrastophobes, fH2 – hemi-hydrocontrastophobes, fH3 – hemi-hydrocontrastophiles, fH4 – hydrocontrastophiles; Ae1 – sub-aerophiles, Ae2 – hemi-aerophobes, Ae3 – sub-aerophobes; Rc1 – per-acidophiles, Rc2 – acidophiles, Rc3 – sub-acidophiles, Rc4 – neutrophiles.

Переважаання у спектрі гідроморф групи мезофітів корелює з даними розрахунку показників екологічних режимів (табл. 1), згідно з якими за режимом зволоження пп №1 належить до свіжих лісо-лучних екотопів з повним промочуванням кореневмісного шару ґрунту опадами і талими водами. Незначне переважаання за кількістю видів гемігідроконтрастофобів над гемігідроконтрастофілами (лише на 5 видів) у спектрі гідроконтрастоморф свідчить про наявність ділянок з сухуватими лісо-лучними умовами зволоження, де спостерігається не повне, а помірне (і навіть незначне) промочування кореневмісного шару ґрунту (підвищення у мікрорельєфі, наявність

товстого, щільного прошарку дернини). Крім того, показник змінності зволоження 6,2 бали підкреслює помірно нерівномірний характер зволоження.

Таблиця 1. Показники екологічних режимів едафотопу і кліматопу, притаманні місцезростанням *Gymnadenia conopsea*

Table 1. Indicators of ecological regimes of edaphotope and climatology inherent in *Gymnadenia conopsea* habitats

Екологічні режими	Показники фітоіндикаційної оцінки (бали)	
	оригінальні дані	літературні дані*
Едафотоп		
Гідрологічний	11,8	11,7
Змінності зволоження	6,2	6,2
Кислотний	6,6	7,3
Загальносольовий	6,4	6,8
Карбонатний	6,8	7,1
Азотний	5,0	5,2
Аерації	6,8	6,9
Кліматоп		
Температурний	7,6	8,0
Вологості клімату	13,1	13,2
Континентальності клімату	7,5	7,9
Суворості зим (кріорежим)	8,6	8,3
Освітлення	6,9	7,3

Примітка: * – (Буджак, 2020)

Note: * – (Budzhak, 2020)

Обводненість ґрунту (а також особливості його механічного складу) є чинниками, що зумовлюють його аерацію. Показник фітоіндикаційної оцінки режиму аерації 6,8 бали (табл.1) відповідає помірно аерованим ґрунтам. Саме це підкреслює і структура спектру аероморф (рис.3 В), у якому за кількістю видів (36) переважають геміаерофоби. Лише 17 видів належить до субаерофілів, що краще ростуть у значно аерованих екотопах (з включенням щєбню гірських порід). Найменш численною є група субаерофобів, що є не дуже вимогливими до аерації ґрунту. Показник кислотного режиму ґрунту 6,6 балів (табл.1) відповідає слабкокислим ґрунтам, що також знайшло віддзеркалення у спектрі ацидоморф (рис.3 Г), де за кількістю видів (31) переважає група субацидофілів (рН 5,5–6,5). Група ацидофілів (рН 4,5–5,5) об'єднує трохи менше третини видового складу (17 видів, зокрема, такі представники флори Карпат, як *Homoglyne alpina*, *Laserpitium krapffii* Crantz, *Arnica montana*). Перацидофіли (рН 3,7–4,5) представлені лише двома видами (*Nardus stricta* та *Vaccinium myrtillus*). Кількість нейтрофільних видів незначна (усього 7), але саме до цієї групи належить *G. conopsea*, а от інші представники родини Orchidaceae є субацидофілами (*Epipactis helleborine*, *Neottia ovata*, *Platanthera bifolia*) і ацидофілами (*Dactylorhiza majalis*).

У спектрі трофоморф (рис.4 А) майже однаковою кількістю видів представлені сім'євтрофи і мезотрофи (відповідно 26 і 25 видів), хоча за показником загальносольового режиму 6,4 бали (табл.1) ґрунти пп №1 є доволі багатими на мінеральні солі. Саме сім'євтрофами є більшість видів, які формують основу травостою (*Centaurea mollis* Waldst. & Kit., *Cruciata glabra*, *Cynosurus cristatus* тощо), і саме до цієї групи належать майже всі виявлені у межах досліджуваного угруповання види Orchidaceae (за виключенням *Dactylorhiza majalis*, що є представником мезотрофів). Разом з тим, хоча група евтрофів налічує лише шість видів, вони характеризуються високими показниками трапляння. Місцями у формуванні приземного шару трав'яного ярусу значну участь беруть такі мезотрофні види, як *Thymus pulegioides* L. і *Arnica montana*.

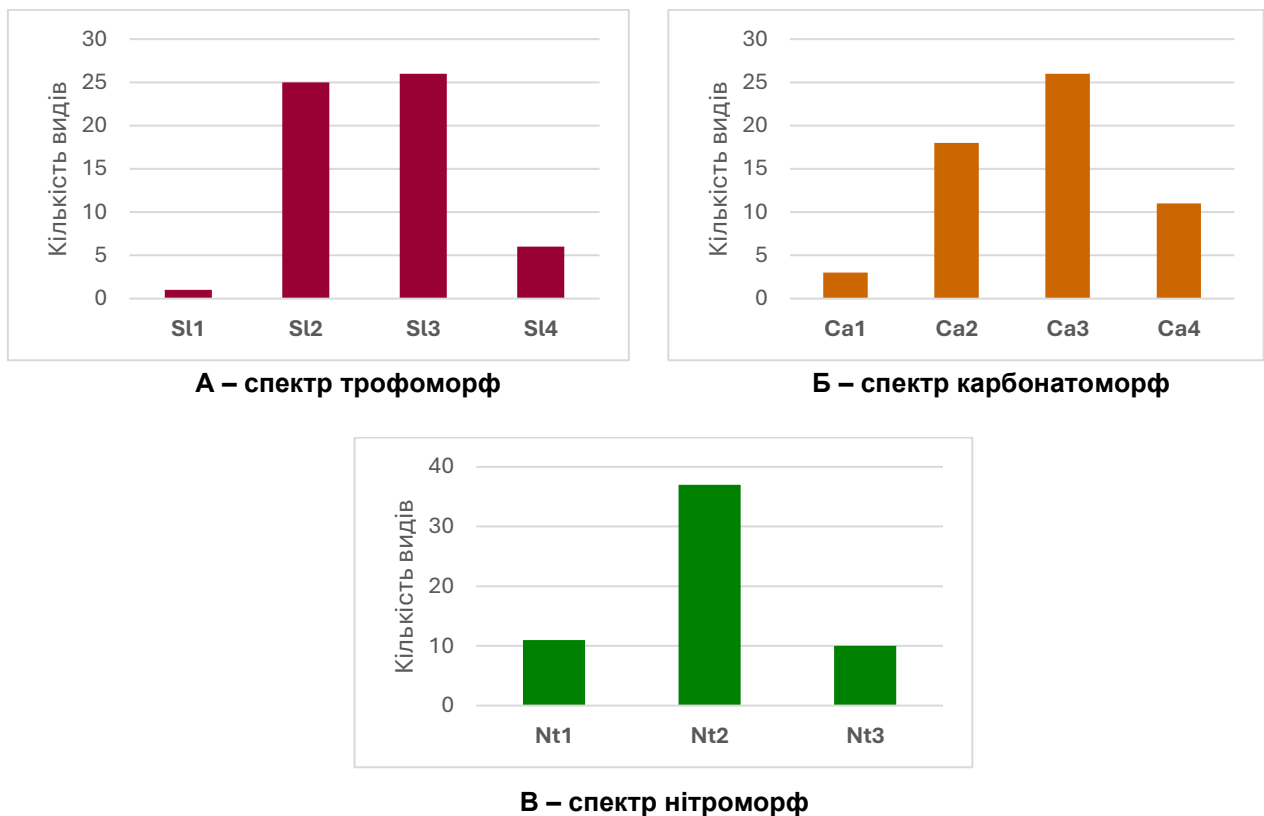


Рис. 4. Особливості едафотопу пп №1 (А – спектр трофоморф, Б – спектр карбонатоморф, В – спектр нітроморф)

Екологічні групи: SL1 – семіоліготрофи, SL2 – мезотрофи, SL3 – семіевтрофи, SL4 – евтрофи; Ca1 – карбонатобі, Ca2 – гемікарбонатобі, Ca3 – акарбонатобі, Ca4 – гемікарбонатобі; Nt1 – субанітрофі, Nt2 – гемінітрофі, Nt3 – нітрофі.

Fig. 4. Features of edaphotopes of the permanent trial area No. 1 (A – spectrum of trophomorphs, B – spectrum of carbonatomorphs, C – spectrum of nitromorphs)

Ecogroups: SL1 – semi-oligotrophes, SL2 – mesotrophes, SL3 – semi-eutrophes, SL4 – eutrophes; Ca1 – carbonatophobes, Ca2 – hemi-carbonatophobes, Ca3 – acarbonatophiles, Ca4 – hemi-carbonatophiles; Nt1 – sub-anitrophiles, Nt2 – hemi-nitrophiles, Nt3 – nitrophiles.

Стосовно карбонатного режиму пп №1 належить до екотопів із незначним вмістом карбонатів у ґрунті (6,8 балів), що певною мірою відповідає спектру карбонатоморф (рис. 4 Б), де переважають акарбонатобі (45% від загальної кількості видів), а понад третина видів (гемікарбонатобі і карбонатобі) намагаються уникати карбонатних субстратів. Цікаво, що дві третини невибагливих до вмісту кальцію гемікарбонатобі є нітрофілами або гемінітрофілами, що надають перевагу нітрифікованим ґрунтам. Взагалі, за результатами фітоіндикаційної оцінки ґрунти пп №1 відносно бідні щодо мінерального азоту (табл.1), тому у спектрі нітроморф (рис. 4 В) нітрофіли представлені лише сьома видами, переважають же гемінітрофіли (37 видів), а приблизно п'ята частина видового складу – субанітрофіли – пристосована до існування на ґрунтах дуже бідних щодо мінерального азоту (зокрема, *Soldanella hungarica*, *Arnica montana*, *Dactylorhiza majalis* тощо).

Різноманіття екоморфічного складу досліджуваної парцільної флори, на нашу думку, є віддзеркаленням певної неоднорідності екологічних умов у межах досліджуваної луки. Разом із тим, як можна побачити з таблиці 1, результати фітоіндикації екологічних режимів, загалом, узгоджуються з даними інших дослідників, отриманих для місцезростань *G. conopsea* на території Чернівецької та деяких районів Івано-Франківської областей (Буджак, 2020). Виявлена тотожність екологічних режимів цікава ще тим, що досліджувана нами територія знаходиться у басейні р. Бистриця Надвірнянська – притоки першого порядку р. Дністер, а літературні дані стосуються верхнього

басейну р. Прут, що є притокою першого порядку р. Дунай. Різниця між показниками, як правило, не перевищує 0,5 балів (знаходиться у межах 0,04–0,42), крім режиму кислотності, для якого ця різниця становить 0,73. Показники екологічних режимів едафотопу і кліматопу пп № 1 знаходяться у межах зони толерантності *G. conopsea* (рис. 5), але для чотирьох режимів (освітлення, змінності зволоження, аерації і кислотності) вони наближаються до межі екологічних амплітуд.

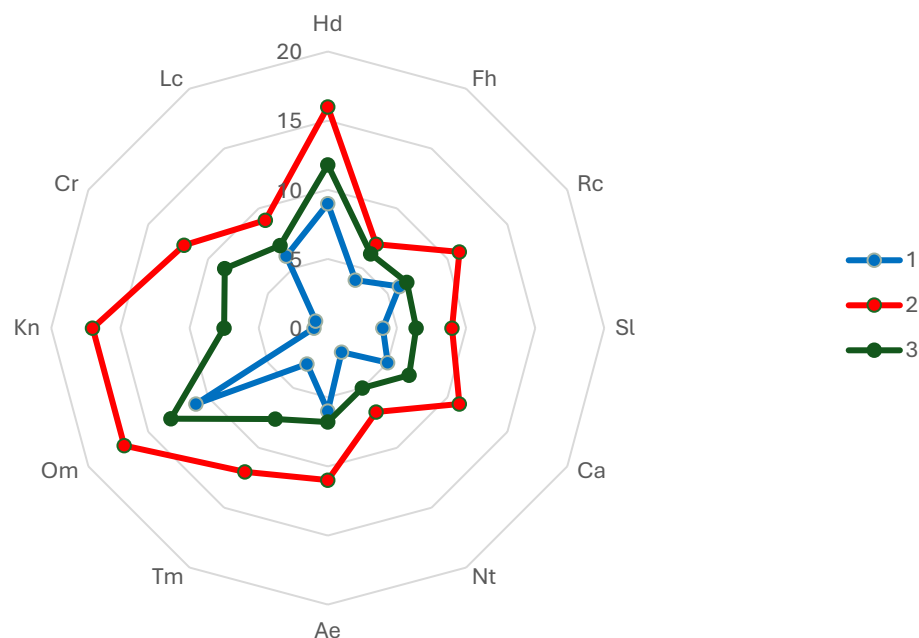


Рис. 5. Показники екологічної амплітуди *Gymnadenia conopsea* (1 – мінімальні значення, 2 – максимальні значення) і екологічних режимів дослідженого місцезростання (3).

Екологічні режими: Hd – гідрологічний, Fh – змінності зволоження, Rc – кислотності, Sl – загальносольовий, Ca – карбонатний, Nt – азотний, Ae – аерації, Tm – температурний, Om – вологості клімату, Kn – континентальності клімату, Cr – суворості зим (кріорежим), Lc – освітлення.

Fig. 5. Indicators of ecological amplitude of *Gymnadenia conopsea* (1 – minimum, 2 – maximum) and ecological regimes of the studied habitat (3).

Ecological regimes: Hd – hydrological, Fh – moisture variability, Rc – acidity, Sl – total salt, Ca – carbonate, Nt – nitrogen, Ae – aeration, Tm – temperature, Om – air humidity, Kn – continentality, Cr – cryoregime, Lc – lighting.

Підсумовуючи наведене вище, можна зазначити, що досліджена ділянка за особливостями розташування (985 м н.р.м.) і ценотичною характеристикою (післялісова лука) представляє тип біотопів Гірські сінокісні луки (T2.3.2) - Mountain hay meadows (Національний каталог біотопів України, 2018). Цьому типу відповідає флористичний склад рослинного угруповання, в якому присутні 8 з 29 характерних для біотопу видів (при пороговому значенні 6). Показники екологічних режимів дослідженого місцезростання також цілком узгоджуються з екологічною характеристикою біотопу T2.3.2, для якого характерні доволі багаті слабокислі ґрунти. Цей тип біотопу підлягає охороні згідно із Резолюцією 4 Бернської конвенції та Додатку 1 Оселищної Директиви (відповідно коди E2.3 і 6520).

Як субмікротерм і субкріофіт, *G. conopsea* пристосований до існування в умовах континентального клімату з низькими зимовими температурами, хоча будучи субомброфітом, тягнє до місцезростань з відносно вологим мікрокліматом. Цікаво, що Чопик вважав *G. conopsea* мезофітом і кальцефілом (Чопик, 1967). За екологічними шкалами Я.П. Дідуха (Diduch, 2011) цей вид є гіромезофітом і акарбонатфілом (едафотопи із незначним вмістом карбонатів), що співпадає з даними інших досліджень (Буджак, 2020) і результатами фітоіндикації екологічних режимів досліджуваного місцезростання. Абіотичні фактори безпосередньо впливають на фітобіоту, тому

для збереження природних популяцій, як зазначали Москалюк і Діденко (Москалюк, 2017), важливим є спостереження за їхнім станом і структурою.

Проведене у 2022 р. дослідження показало, що щільність *Gymnadenia conopsea* в межах ппп № 1 становить 0,63 особи на 1 м², а загальна чисельність – 1268 осіб, що на чверть більше порівняно з 2015 р. і майже удвічі більше ніж у 2018 р. Зміна чисельності відбулася насамперед за рахунок збільшення кількості імагурних і віргінільних особин. На рис. 6 представлено загальний розподіл особин за онтогенетичними групами. Група особин у ювенільному стані є найменш чисельною порівняно з іншими групами за весь час спостережень. Разом із тим, дев'ять років тому їх було втричі більше ніж у подальші роки. Необхідно зауважити, що кількість особин у віргінільному стані збільшилася втричі у порівнянні з 2018 р. Кількість генеративних особин впродовж декількох років залишається відносно стабільною, хоча можна говорити про певну тенденцію до зменшення з 342–360 у минулі роки до 286 особин у поточному році. Цікаво, що для ценопопуляцій орхідних на території Закарпаття були притаманні переважно одновершинні вікові спектри з максимумом на генеративних особинах, зокрема, для *G. conopsea* частка останніх знаходилася у межах 63–100% (Лоя, 2012).

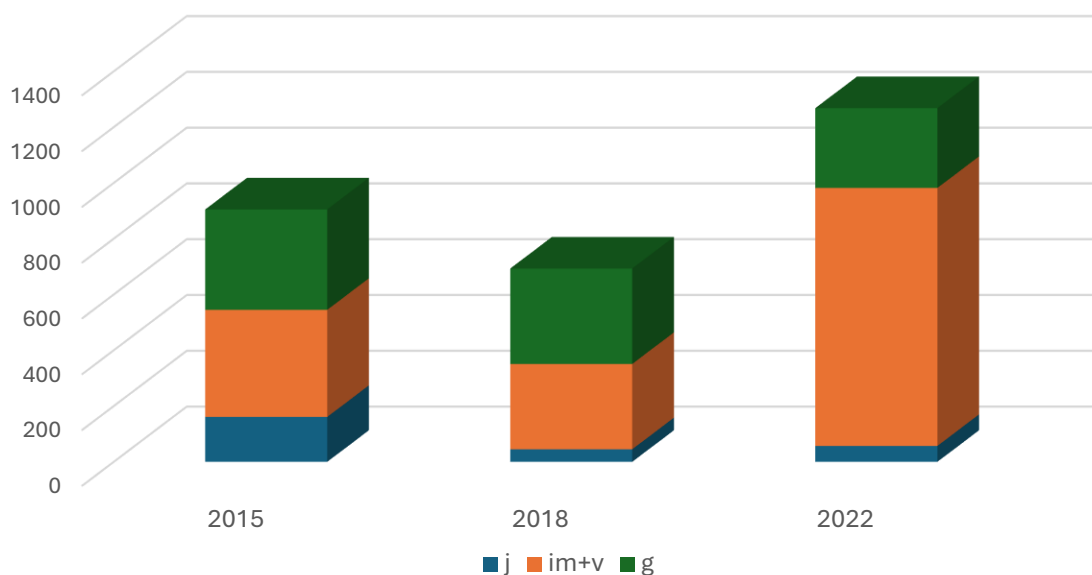


Рис. 6. Розподіл особин *Gymnadenia conopsea* за онтогенетичними групами (j – ювенільні; im+v – імагурні і віргінільні; g – генеративні)

Fig. 6. Distribution of *Gymnadenia conopsea* individuals by ontogenetic groups (j – juvenile; im+v – imaturated and virgin; g – generative)

G. conopsea морфологічно мінливий вид, особливо варіюють величина квітки та форма листків (Чопик, 1976; Marhold, 2005). У таблиці 2 наведені морфометричні характеристики особин *G. conopsea*. У порівнянні з ценопопуляцією цього виду, що вивчалася на території Криму (Вархушева 2012), у досліджуваній ценопопуляції листки ювенільних особин були дещо вужчими, стебла генеративних особин і їх суцвіття коротші, а кількість квіток на декілька десятків менша. Необхідно зауважити, що для досліджуваної популяції характерним було незначне коливання у межах кожної вікової групи довжини суцвіття на відміну від довжини стебла. На останній параметр, можливо, впливали особливості структури трав'яного ярусу. У складі останнього можна виділити 3 підяруси (висота першого від 50 до 85 см, другого від 25 до 50 см, третього до 25 см). Загальне проективне покриття цього ярусу коливається у межах від 70 до 95 %, а його фітомаса від 200-300 до майже 800 г повітряно-сухої ваги на 1м² (рис. 6). Дані вагового аналізу добре віддзеркалюють мозаїчний характер структури наземного покриття, що впливає на нерівномірність розподілу особин *G. conopsea* у межах ппп №1.

Таблиця 2. Морфометричні характеристики особин *Gymnadenia conopsea* у ювенільному (j) і генеративному (g) стані

Table 2. Morphometric characteristics of *Gymnadenia conopsea* individuals in juvenile (j) and generative (g) state

Ознака	Вікові стадії			
	j	g1	g2	g3
Кількість листків, шт	1	5	6	7
Довжина листка, см	$\frac{14,8 \pm 3,4^*}{14,1 \pm 1,5^{**}}$			
Ширина листка, см	$\frac{0,7 \pm 0,2}{0,85 \pm 0,2}$			
Кількість квіток, шт		$\frac{34,6 \pm 10,4}{49,6 \pm 2,4}$	$\frac{32,8 \pm 7,1}{64,5 \pm 2,2}$	$\frac{43,3 \pm 11,2}{70,4 \pm 2,5}$
Довжина суцвіття, см		$\frac{9 \pm 2,5}{12,85 \pm 2,1}$	$\frac{9 \pm 2,4}{16,7 \pm 1,7}$	$\frac{11,9 \pm 1,7}{17,8 \pm 1,8}$
Довжина стебла, см		$\frac{35,6 \pm 8,2}{44,65 \pm 1,5}$	$\frac{31 \pm 6,5}{55 \pm 2,6}$	$\frac{38,8 \pm 6,0}{55 \pm 2,2}$

Примітка: * – оригінальні дані, ** – літературні (Вархушева, 2012)

Note: * – collected data, ** – referenced data (Vakhrusheva, 2012)

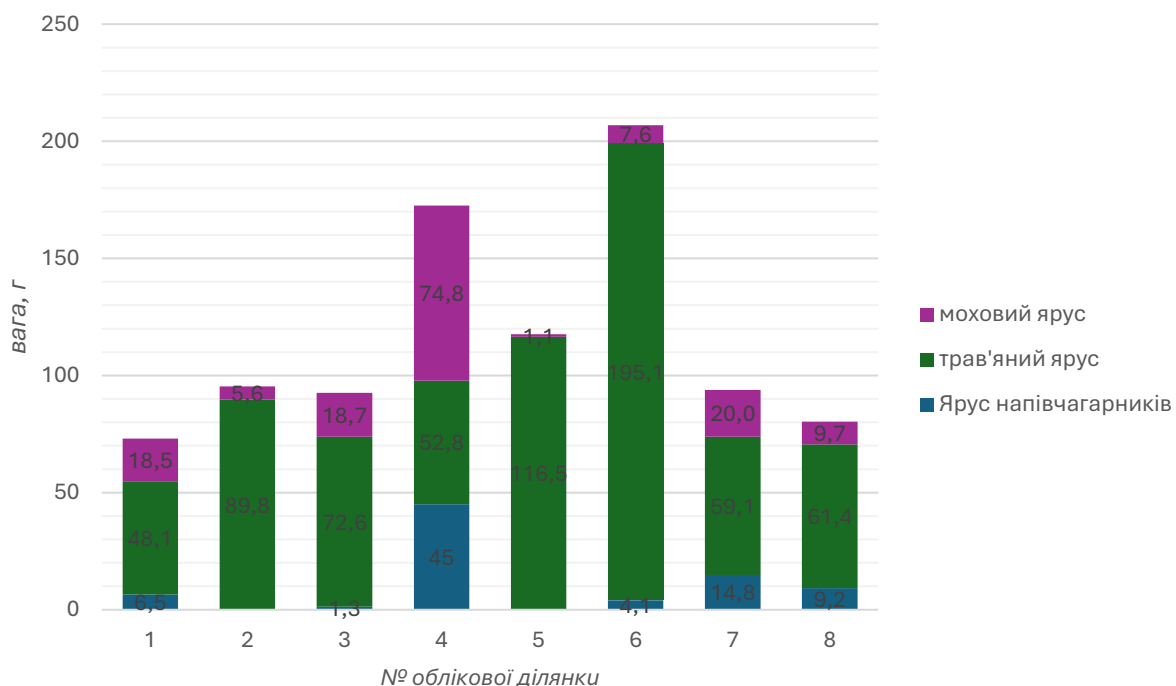


Рис. 7. Фракційний склад надземної фітомаси (у грамах) на облікових ділянках у межах ботанічної пп № 1 (1–8 номера ділянок)

Fig. 7. Composition of above-ground phytomass (in grams) in the accounting plots within botanical permanent trial area No. 1 (plot numbers 1-8).

Майже на всій площі розвинені трав'яний і моховий яруси, а на деяких ділянках наявний ярус напівчагарників, утворений *Vaccinium myrtillus* з проективним покриттям від 1–5 % до 30 % (подекуди до 50 %). Відповідно фітомаса чорниці складала від 1 % до 10–15 % від загальної надземної фітомаси, а іноді сягати навіть 25%. Проективне покриття мохового ярусу коливається від 3–5 % до

80 %. Найвищий відсоток спостерігається у середній частині ппп №1 у мікроугрупованнях з домінуванням *Vaccinium myrtillus*, де маса фракції мохів складає понад 30 % від загальної надземної фітомаси, як на обліковій ділянці 4 (рис. 7). Запаси підстилки коливалися від 180 до 832 г на 1 м². При дослідженні популяції *G. conopsea* на території Криму (Кобечинская, 2012) було встановлено, що одним з факторів, який призводить до скорочення чисельності особин, є саме малі запаси підстилки за наявності низьких зимових температур і відсутності достатньої кількості снігового покриву.

Як показали результати порівняльного вагового аналізу підземної і надземних фракцій фітомаси облікових ділянок найкращими умовами для *G. conopsea*, можна вважати наступну організацію рослинних угруповань. Це, як правило, наявність сформованого прошарку підстилки (450–500 г на 1 м²); відсутність (або незначний розвиток) ярусу напівчагарників і мохів (маса цих фракцій відповідно повинна бути менше ніж 25 і 75 г на 1 м²); не дуже щільна дернина (підземна фітомаса цього прошарку не більше 180 г на 1 м²). Частка різнотрав'я у складі трав'яного ярусу може бути і вдвічі менша, і в три рази більша за частку злаків з осоками, але оптимальні показники ваги останньої складають 100–130 г на 1 м². Найменш сприятливими для підтримання чисельності ценопопуляції *G. conopsea* на належному рівні є саме ті ділянки, де фракція злаків і осок становила 400–440 г на 1 м², оскільки *G. conopsea* розмножується переважно насінням (Червона книга України, 2009), а утворення щільної дернини може перешкоджати розвитку молодих рослин.

Висновки

Постійна пробна площа № 1 природного заповідника "Горгани" презентує типову післялісову луку і належить до типу біотопів Гірські сінокісні луки (Т2.3.2) - Mountain hay meadows. Просторова організація рослинного покриву неоднорідна. Ярус напівчагарників має фрагментарний характер (на окремих ділянках покриття *Vaccinium myrtillus* до 50 %). Загальне проективне покриття мохового ярусу від 3-5% до 80%, а трав'яного, що має мозаїчний характер, від 70 до 95 %. Фітосозологічна цінність пробної площі визначається наявністю сьоми видів з Червоної книги України: *Gymnadenia conopsea*, *Dactylorhiza majalis*, *Platanthera bifolia*, *Neottia ovata*, *Epipactis helleborine*, *Traunsteinera globosa*, *Galanthus nivalis*.

За результатами фітоіндикації досліджена ділянка відповідає свіжим лісо-лучним екотопам з повним промочуванням кореневмісного шару ґрунту опадами і талими водами. Ґрунти помірно аеровані, слабкокислі, доволі багаті на мінеральні солі, але з незначним вмістом карбонатів і відносно бідні щодо мінерального азоту. Такі умови едафотопу є сприятливими для існування мезофітів, гемігідроконтрастофобів, субацидофілів, гемінітрофілів, геміаерофобів. Структура спектрів омбро- та контрастоморф, де переважають субомброфіти і геміокеаністи, прекрасно віддзеркалює особливості регіонального клімату. Структура спектрів термоморф і кріоморф, де найбільшою кількістю видів представлені субмікротерми і гемікріофіти, підкреслює особливості мікроклімату ппп №1.

Визначені на підставі фітоіндикаційної оцінки показники екологічних режимів едафотопу і кліматопу ппп №1, загалом, знаходяться у межах зони толерантності *G. conopsea* (за винятком режимів освітлення, змінності зволоження, аерації і кислотності, показники яких наближаються до межі екологічних амплітуд. Позитивним для його існування є наявність сформованого прошарку підстилки (450–500 г на 1 м² повітряно сухої ваги); відсутність щільної дернини (менше 180 г на 1 м²), відсутність (або незначний розвиток) ярусів напівчагарників і мохів.

З року в рік відбувається коливання загальної кількості особин *G. conopsea* у складі ценопопуляції, але наразі маємо позитивну тенденцію її розвитку. Щодо морфометричних показників, то у досліджуваній ценопопуляції листки ювенільних особин є дещо вужчими, стебла у генеративних особин і їх суцвіття коротші, а кількість квіток на декілька десятків менша у порівнянні з аналогічними показниками рослин цього виду в інших ценопопуляціях. Загрозою для подальшого існування *G. conopsea* на ппп № 1 є заростання луки деревно-чагарниковою рослинністю через припинення традиційного менеджменту.

Подяки

Автори висловлюють вдячність науковим співробітникам заповідника "Горгани", які проводили моніторингові спостереження за станом популяції *G. conopsea*, а також волонтерам Гаргат Ю. В. і Стах М. О., які брали участь у зборі польових даних і проведенні кількісних обліків на ппп № 1.

Особливу подяку висловлюємо Міскевич У. Д. за корисні зауваження та поради під час підготовки та проведення дослідження, за допомогу в організації польових виїздів.

Список літератури / References

- Безроднова О. В. та ін. (2020). Лісотипологічна та фітосозологічна оцінка лісової рослинності НПП «Слобожанський». *Збалансоване природокористування*, 4, 157–168. [Bezrodnova, O.V. et al. (2020). Lisotipologichna ta fitosozologichna otsinka lisovoi roslinnosti NPP «Slobozhanskyi» [Forest typological and phytosozological assessment of forest vegetation of Slobozhansky National Natural Park]. *Zbalansovane pryrodokorystuvannya*, 4, 157–168.] DOI: 10.33730/2310-4678.4.2020.226651 (in Ukrainian)
- Буджак В. В., Дідух Я. П. (2020). Синфітоіндикаційна оцінка оселищ рослин Червоної книги України та ризиків їхніх втрат під впливом кліматогенних змін. *Український ботанічний журнал*, 77(6), 434–453. [Budzhak, V. Didukh Ya. (2020). Synfitoindykatsiina otsinka oselyshch roslin Chervonoï knyhy Ukrainy ta ryzykiv yikhnikh vtrat pid vplyvom klimatohenykh zmin [Synphytoindication evaluation of habitats of plant species listed in the Red Data Book of Ukraine and habitat risk assessment under the impact of climate change]. *Ukrainian Botanical Journal*, 77(6), 434–453.] DOI: <https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.06.434> (in Ukrainian)
- Вахрушева Л. П., Патлис М. В. (2012). Характеристика современного состояния ценопопуляции *Gymnadenia conopsea* на Долгоруковской яйле (Крым). *Экосистемы, их оптимизация та охорона*, 7, 217–222. [Vakhrusheva, L., Patlys, M. (2012). Kharakterystyka sovremennoho sostoiannya tsenopopulatsyy *Gymnadenia conopsea* na Dolgorukovskoi yaile (Krym) [The character the present state of coenopopulation *Gymnadenia conopsea* on Dolgorukovskaja jaila (Crimea)]. *Optimization and Protection of Ecosystems*, 7, 217–222.]
- Екофлора України / Відпов. ред. Я. П. Дідух. Київ: Фітосоціоцентр, 2000. Т. 1. 284 с. [Didukh YA. P. (Eds.). (2000). *Ecoflora Ukrainy* [Ecoflora of Ukraine]. Kyiv: Phytosociocentre, 1, 284.] (in Ukrainian)
- Клімук Ю. В. та ін. (2006). Природний заповідник «Горгани». Рослинний світ. Природно-заповідні території України. Рослинний світ. Вип. 6. / Ю. В. Клімук та ін. Київ: Фітосоціоцентр, 2006. 400 с. [Klimuk, Yu.V. et al. (2006). *Pryrodnyi zapovidnyk «Gorgany»*. Roslynniy svit. Pryrodno-zapovidni terytorii Ukrainy. Roslynniy svit. Vyp. 6. [Nature reserve "Gorgany". Plant World. Nature reserve territories of Ukraine. Plant World. Iss. 6.]. Kyiv: Phytosociocentre, 400.] (in Ukrainian)
- Кобечинская В. Г., Отурина И. П., Сверкунова Н. В. (2012) Динамика развития и цветения орхидеи кокушника комарникового (*Gymnadenia conopsea*) в Крыму. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 6, 151–161. [Kobechynskaia, V., Oturyna, Y., Sverkunova, N. (2012). Dynamika razvytiya y tsveteniya orkhidy kokushnyka komarnykovoho (*Gymnadenia conopsea*) v Krymu [Dynamics of development and flowering of the fragrant orchid (*Gymnadenia conopsea*) in the Crimea]. *Optimization and Protection of Ecosystems*, 6, 151–161]
- Кузнецов Р. І. (2021) Флористичне і еколого-ценотичне різноманіття природного заповідника "Горгани". Основні проблеми і тенденції розвитку природоохоронних територій в Українських Карпатах: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присвяченої 25-й річниці з дня створення природного заповідника «Горгани» (Україна, м.Надвірна, 16-17 вересня 2021 р.). Івано-Франківськ : Симфонія форте, 187-190. [Kuznetsov, R. (2021). Florystychne y ekoloho-tsenotychnе riznomanittia pryrodnoho zapovidnyka "Horhany" [Floristic and ecological-cenotic development of the Gorgany Nature Reserve]. *The main problems and trends in the development of protected areas in the Ukrainian Carpathians: Proceedings of the International Scientific-Practical Conference dedicated to the 25th anniversary of the Gorgany Nature Reserve establishment, Nadvirna, September 16-17 2021. Ivano-Frankivsk*, 187-190.] (in Ukrainian)
- Літопис природи. Природний заповідник "Горгани". Том 19, 2015. Надвірна: 2016. [Litopys pryrody. Pryrodnyi zapovidnyk "Horhany". Tom 19, Nadvirna: 2016.] (in Ukrainian)
- Літопис природи. Природний заповідник "Горгани". Том 22, 2018. Надвірна: 2019. [Litopys pryrody. Pryrodnyi zapovidnyk "Horhany". Tom 22, Nadvirna: 2019.] (in Ukrainian)
- Лоя В. В. (2012). Види родини Orchidaceae Juss. у флорі Закарпаття (хорологія, еколого-ценотичні особливості, охорона): автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.05. Київ, 20 с. [Loya, V. (2012). *Species of the Orchidaceae Juss. family within the flora of Transcarpathia (chorology, ecological-phytocoenotic peculiarities, conservation)*. Abstract of Ph.D. dissertation. M. M. Hryshko National Botanical Garden.] (in Ukrainian)
- Москалюк Б. І., Діденко С. Я. (2017). Види родини Orchidaceae урочища «Вовчий» гори Чолієнка (Українські Карпати (Закарпатська обл.)). *Інтродукція рослин*, 1, 21–27. [Moskaliuk, B., Didenko, S. (2017). Vidy rodyny Orchidaceae urochyscha «Vovchy» hory Cholienka (Ukrainski Karpaty (Zakarpatska obl.)) [Species of the Orchidaceae family in the Vovchy locality, Cholyenka mountaine (in Ukrainian Carpathians (Zakarpatsky region))]. *Plant introduction*, 1, 21–27.] (in Ukrainian)
- Національний каталог біотопів України (2018). За ред. А.А. Куземко, Я.П. Дідуха, В.А. Онищенко, Я. Шеффера. 442 с. [National habitat catalogue of Ukraine (2018).. FOP Klymenko Yu. Ya., Kyiv, 442 p.] (in Ukrainian)
- Перелік видів рослин, що заносяться до Червоної книги України (рослинний світ), та видів рослин, що виключені з Червоної книги України (рослинний світ). (2021a) Наказ Міністерства захисту довкілля

- та природних ресурсів України від 15 лютого 2021 року, №111. [A list of plant species listed in the Red Book of Ukraine (Plant world) and excluded from the Red Book of Ukraine (Plant world) (2021). Order of the Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine, February 15, 2021, No. 111]. (in Ukrainian). <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0370-21#Text>
- Пилипів Ю., Кияк В. (2021). Природні й антропогенні загрози існуванню популяцій видів родини орхідних (Orchidaceae Juss.) у басейні Полтви Львівська область). *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія*, 3 (54), 82-97. [Pylypiv, Yu., Kyiak, V. (2021). Pryrodni y antropohenni zahrozy isnuvanniu populatsii vydiv rodyny orkhidnykh (Orchidaceae Juss.) u baseini Poltvy Lvivska oblast) [Natural and anthropogenic threats to the existence of populations of species of the orchid family (Orchidaceae Juss.) in the Poltava basin (L'viv region)]. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarynoho universytetu. Seriya biolohiia*, 3 (54), 82-97.] DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2021.03.082> (in Ukrainian)
- Полатайко Т.І., Безроднова О.В. (2022б). Оцінка екологічних режимів ботанічної постійної пробної площі №1 природного заповідника «Горгани» / Охорона довкілля : зб. наук. статей XVIII Всеукраїнських наукових Таліївських читань. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 136-139. . [Polataiko T., Bezrodnova O. (2022b). Assessment of the ecological regimes of the botanical permanent trial area No. 1 of the Gorgany Nature Reserve / Environmental protection: a collection of scientific articles of the XVIII All-Ukrainian scientific Taliev readings. Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University, 136-139.] (in Ukrainian)
- Полатайко Т.І., Безроднова О.В., Гаргат Ю.В., Стах М.О., Окунь М.М. (2022а). «Ценопопуляція *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. у складі післялісової луки на території природного заповідника «Горгани»: вивчення і охорона» / Матеріали Четвертої Всеукраїнської науково-практичної конференції «Євроінтеграція екологічної політики України». – Одеса, 242-246. [Polataiko T., Bezrodnova O., Harhat Yu., Stah M., Okun M. (2022a). Cenopopulation of *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. in the post-forest meadow in the territory of the Gorgany Nature Reserve: study and protection / Proceedings of the Fourth All-Ukrainian Scientific and Practical Conference “European Integration of Environmental Policy of Ukraine, 242-246.] (in Ukrainian)
- Сверкунова Н.В., Кобечинская В.Г., Отурина И.П. (2011). Изучение особенностей произрастания кокушника комарникового (*Gymnadenia conopsea*) в горном Крыму. Актуальні проблеми дослідження довкілля: IV Всеукр. наук. конф. з міжнар. участю для молодих уч., М. Суми, 19–21 трав. 2011 р. Суми, 137-141. [Sverkunova, N., Kobechynskaia, V. Oturna, Y. (2011). Yzuchenye osobennostei proyzrastaniya kokushnyka komarnykovoho (*Gymnadenia conopsea*) v hornom Krymu. Aktualni problemy doslidzhennia dovkillia: IV Vseukr. nauk. konf. z mizhnar. uchastiu dlia molodykh uch., Sumy, May 19-21. Sumy, 137-141.]
- Слободян О.М. (2010). Екологічна роль популяцій восковика перев'язаного *Trichius fasciatus* (Linnaeus, 1758) в лучних екосистемах Горган. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія*, 29, 82-86. [Slobodian, O. (2010). Ekolohichna rol populatsii voskovyky perev'язanoho *Trichius fasciatus* (Linnaeus, 1758) v luchnykh ekosystemakh Gorgan [Ecological role of populations *Trichius fasciatus* (Linnaeus, 1758) in meadow ecosystems Gorgan.]. *Scientific herald of Uzhhorod university. Series Biologia*, 29, 82-86.] (in Ukrainian)
- Токарьук А. І., Чорней І. І., Буджак В. В. (2018). Асоціація *Brachypodio pinnati-molinietum arundinaceae* Klika 1939 в урочищі Підокруг (Буковинське Прикарпаття). *Біологічні Студії*, 12 (1), 125–134. [Tokariuk, A., Chornei, I. Budzhak, V. (2018). Asotsiatsiia *Brachypodio pinnati-molinietum arundinaceae* Klika 1939 v urochyshtsi Pidokruh (Bukovynske Prykarpattia) [Association of *Brachypodio pinnati-molinietum arundinaceae* Klika 1939 on the territory of Pidokruh tract (Bukovinian Precarpathia)]. *Studia Biologica*, 12 (1), 125–134.] DOI: 10.30970/sbi.1201.553 (in Ukrainian)
- Червона книга України. Рослинний світ. (2009). / за ред. Я. П. Дідуха. Київ, 912 с. [Chervona knyha Ukrainy. Roslynnyi svit. (2009). / Didukh, Ya. (ed.). [Red data book of Ukraine. Vegetable Kingdom]. Kyiv.] (in Ukrainian)
- Чопик В.І. (1967). Високогірна флора Українських Карпат. Київ: Наукова думка, 152. [Chopyk, V. (1976). *Vysokohirna flora Ukrainskykh Karpat*. Kyiv: Naukova dumka, 15.] (in Ukrainian)
- Chapurlat E., Agren J., Anderson J., Friberg M., Sletvold N. (2019). Conflicting selection on floral scent emission in the orchid *Gymnadenia conopsea*. *New Phytologist*, 222, 2009–2022. DOI: 10.1111/nph.15747 Checklist of CITES species. URL: <http://surl.li/fbgbyz> . Accessed on: 10.11.2024.
- Didukh YA. P. (2011). The ecological scales for the species of Ukrainian flora and their use in synphytoindication. Kyiv: Vyd-vo Ukraïns'koho Fitosotsiolohichnoho Tsentru, 26-174.
- Kettunen T., Uotila P. (2019). Morphological variation and a new variety of *Gymnadenia conopsea* (Orchidaceae) in Finland. *Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica*, 95, 89–99.
- Lin M., Xiong H., Xiang X., Zhou Z., Liang L. Mei Z. (2020). The Effect of Plant Geographical Location and Developmental Stage on Root-Associated Microbiomes of *Gymnadenia conopsea*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-17. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01257
- Marhold K., Jongepierova I., Krahulcova A., Kučera J. (2005) Morphological and karyological differentiation of *Gymnadenia densiflora* and *G. conopsea* in the Czech Republic and Slovakia. *Preslia*. Praha, 77, 159–176.

- Meekers T., Hutchings M., Honnay O., Jacquemyn H. (2012). Biological Flora of the British Isles :*Gymnadenia conopsea* s.l. *Journal of Ecology*, 100, 1269–1288. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2012.02006.x
- Shang X., Guo X., Liu Y., Pan H., Miao X., Zhang J. (2017). *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.: A Systemic Review of the Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology of an Important Asian Folk Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 8(24), 1-17. DOI: 10.3389/fphar.2017.00024
- Sletvold, N., N. Joffard, L. Söderquist. (2024). Fine-scale genetic structure in the orchid *Gymnadenia conopsea* is not associated with local density of flowering plants. *American Journal of Botany* 111(2): e16273. <https://doi.org/10.1002/ajb2.16273>
- Söderquist, L. (2023). Population size, viability and genetic diversity in the orchid *Gymnadenia conopsea*. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 2323. 52 pp. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis.
- WFO (2024). World Flora Online. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org>. Accessed on: 12 Nov 2024
- Wittlinger L., Petrikovicová L. (2021). Phytogeographical Analysis and Ecological Factors of the Distribution of Orchidaceae Taxa in the Western Carpathians (Local study). *Plants*, 10, 1-17. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10030588>

***Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Orchidaceae) in the "Gorgany" Nature Reserve: population monitoring studies and complex characteristics of the habitat**

T.I. Polataiko, O.V. Bezrodnova

For the first time, for the territory of the nature reserve "Gorgany" on the example of the permanent trial area No. 1, a complex characteristic of a typical post-forest meadow was compiled: based on the results of the ecomorphic analysis of the partial flora, its ecological specificity was revealed; according to the data of the weight analysis and the indicators of the projective cover, information was obtained about the features of the spatial organization of the vegetation cover; on the basis of phytosociological, the indicators of the ecological regimes of the edaphotope and climatope were calculated; the structure of the cenopopulation of *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br., was investigated and the degree of compliance of the growing conditions with the tolerance zone of this species was revealed. The phytosociological value of the trial area is due to the presence of seven species from the Red Book of Ukraine: *Gymnadenia conopsea*, *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F.Hunt Summerh., *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Neottia ovata* (L.) Hartm., *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Traunsteinera globosa* (L.) Rchb., *Galanthus nivalis* L.. It was found that the spatial organization of the plant cover is heterogeneous, the indicators of the weight analysis fluctuate in a significant range. The studied area corresponds to fresh forest-meadow ecotopes with complete wetting of the root layer of the soil by precipitation and meltwater. The soils are moderately aerated, weakly acidic, quite rich in mineral salts, but with an insignificant content of carbonates and relatively poor in terms of mineral nitrogen. Such conditions of the edaphotope are favorable for the existence of mesophytes, hemihydrocontrastophobes, subacidophiles, heminitrophiles, hemiaerophobes, subombrophytes, hemioceanists, submicrotherms, hemicryophytes. It was established that the indicators of the ecological regimes of the edaphotope and climatope are, in general, within the tolerance zone of *G. conopsea*, but for the regimes of lighting, variability of moisture, aeration and acidity, they approach the limit of the ecological amplitude of the species. A positive factor for its existence is the presence of a formed litter layer (450-500 g per 1 m² of air-dry weight); absence of dense turf (less than 180 g per 1 m²), absence (or insignificant development) of layers of semi-shrubs and mosses. The number of generative individuals has remained relatively stable for several years, although we can talk about a certain tendency to decrease.

Keywords: Carpathians, cenopopulation, habitat, monitoring, ecological regimes, age structure, morphometry

Cite this article: Polataiko T.I., Bezrodnova O.V. (2024). *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Orchidaceae) in the "Gorgany" Nature Reserve: population monitoring studies and complex characteristics of the habitat. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 16–30. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-2> (in Ukrainian)

About the authors:

T.I. Polataiko — V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tetiana.polataiko@student.karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0003-4493-1141>
O.V. Bezrodnova — V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, o.bezrodnova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-2506-0881>

Received: 18.09.2024 / Revised: 14.11.2024 / Accepted: 15.11.2024

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-3
UDC: 633.11:631.527:575:632.9

**Environmental plasticity of short-stemmed winter bread wheat
(*Triticum aestivum* L.) cultivars and resistance to yellow leaf blotch
(*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler) and brown (leaf) rust
(*Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.)**

A.V. Yarosh, Ye.Yu. Kucherenko, V.K. Riabchun, N.V. Kuzmyshyna, O.V. Solonechna

In the context of variability of common pathogens of foliar diseases of winter bread wheat, evolvement of virulent and aggressive races, and periodic droughts, which with climate changes increasingly occur in the territory of Ukraine, prerequisites for in-depth research into adaptability of plant varieties and selection of the best gene pool for breeding arise. The paper presents results on the environmental plasticity of short-stemmed winter bread wheat cultivars, which were differentiated by resistance to yellow leaf blotch and brown (leaf) rust. New sources of high and stable group resistance to pathogens of these diseases were identified: cv. 'Versiia odeska' (UKR) and cv. 'Mescal' (FRA). By genotypic effect (ϵ_i) and regression coefficient (R_i) for yield, the following genotypes showing the highest genetic potential for adaptability (sum of ranks = 2) to stressful conditions of cultivation in the eastern forest-steppe of Ukraine and yielding by 16% more than the check cultivar were identified among the short-stemmed cultivars under investigation: cv. 'Pokrovska' ($\epsilon_i = 1.92$; $R_i = 0.60$) (UKR), cv. 'Versiia odeska' ($\epsilon_i = 1.21$; $R_i = 0.77$) (UKR), cv. 'MIP Vidznaka' ($\epsilon_i = 1.05$; $R_i = 0.82$) (UKR), cv. 'Mescal' ($\epsilon_i = 0.98$; $R_i = 0.65$) (FRA), and cv. 'SY Wolf' ($\epsilon_i = 0.94$; $R_i = 0.69$) (USA). It was found that the genotypic effect for yield ranged from -1.71 to 1.92 in the short-stemmed cultivars, and the regression coefficient - from 0.60 to 1.45, which largely affected the environmental plasticity: the sum of ranks for this parameter varied from 2 to 6. The percentage of accessions with high genotypic effects was 33.3%; the percentage of accessions with consistently stable yields was 41.7%. It was revealed that in short-stemmed winter bread wheat, resistance to brown rust and yellow leaf blotch was significantly negatively correlated with the sum of ranks of the genotypic effect and regression coefficient for yield ($r = -0.65$, $P < 0.01$ and $r = -0.58$, $P < 0.01$, respectively). The selected sources of high group resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler and brown (leaf) rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.), with high yield potential and stability, are valuable starting materials for the breeding of new, highly promising winter bread wheat cultivars, which will be adaptable to stressful conditions of cultivation in the eastern forest-steppe of Ukraine.

Keywords: winter bread wheat, epiphytotes, plasticity, stability, genotypic effect, adaptability, yield, source

Cite this article: Yarosh A.V., Kucherenko Ye.Yu., Riabchun V.K., Kuzmyshyna N.V., Solonechna O.V. (2024). Environmental plasticity of short-stemmed winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and resistance to yellow leaf blotch (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler) and brown (leaf) rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.). The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology, 43, p. 33-43. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-3>

About the authors:

A.V. Yarosh – Plant Production Institute named after V.Ya. Yuriev of NAAS, National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine, 142 Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv, 61060, Ukraine, Jarosh_Andrij@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-6009-4139>

Ye.Yu. Kucherenko – Yuriev Plant Production Institute of NAAS, National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine, 142 Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv, 61060, Ukraine, egorkucherenko91@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9313-7385>

V.K. Riabchun – Plant Production Institute named after V.Ya. Yuriev of NAAS, National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine, 142 Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv, 61060, Ukraine, ncpgru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1855-5114>

N.V. Kuzmyshyna – Yuriev Plant Production Institute of NAAS, National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine, 142 Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv, 61060, Ukraine, nkuzmyshyna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8046-1760>

O.V. Solonechna – Plant Production Institute named after V.Ya. Yuriev of NAAS, National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine, 142 Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv, 61060, Ukraine, solonechnaya82@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1525-9501>

Received: 08.07.2023 / Revised: 08.08.2024 / Accepted: 02.09.2024

Introduction

Enhancement of the genetic potentials of yield, quality, and adaptability of crops is among the main objectives of the agricultural sector of the Ukrainian economy. Increased gross collection of grain and

stabilized grain production determine the level of farming intensification and the efficiency of agricultural development (Ilchuk et al., 2019). Studies of cultivars' environmental plasticity and selection among them of high-yielding sources adapted to certain growing conditions are necessary stages and a guarantee for breeding effectiveness in order to create highly adaptive genotypes for the corresponding ecological zone (Studnicki et al., 2019; Lavrynenko et al., 2020; Dhiwar et al., 2020).

The nutritional value and variety of technological uses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) determine the importance of this crop in the agrarian sector and ensure the food security of Ukraine, which is a basis for the economic development of the country (Ilchuk et al., 2019). Scientists from different countries confirmed that the stress resistance of winter bread wheat cultivars to biotic and abiotic factors was crucial for the stabilization and development of agriculture (Morhun et al., 2014; Raza et al., 2019; Laugerotte et al., 2022).

Ukrainian researchers noted that in the face of abnormally high air temperatures and droughts observed on the territory of Ukraine during the last decades, water deficit issues are becoming increasingly important among the abiotic stressors (Kolupaev et al., 2023; Sydorenko, Chebotar, 2020). Because of them, metabolic processes in plants are disrupted, proteins are denatured and cleft, chemical composition and state of the cytoplasm change, and plants accumulate less organic matter. These phenomena quite often reduce yields of plant cultivars (Sydorenko, Chebotar, 2020).

Polish researchers M. Różewicz et al. (2021) pointed out that, among the biotic limiting factors, fungal diseases caused the greatest damage to spiked cereals, reducing their yields on average by 15–20%, and losses can reach 60% in epiphytotic cases (Różewicz et al., 2021). Ukrainian scientists hold a similar opinion, stressing that possible loss from fungal diseases can amount to 25–50% (Trybel, 2006; Retman, 2007). Different fungicides that are applied to suppress pathogens of foliar diseases pollute the environment and boost the genetic variability of pathogens, which evolve into new races (Kang et al., 2020; Li et al., 2020). Growing of plant cultivars that are resistant to pathogens of foliar diseases is a way to suppress phytoinfections and prevent epiphytoses. However, due to mutational, combinational, and population variabilities and spore migration in pathogen populations, new virulence genes that can overcome the protective effects of plants' resistance genes appear (Lisovyi, Lisova, 2017). Alternative plant protection, based on the introduction of new cultivars with reliable genetic protection against pathogens of foliar diseases, is becoming more and more relevant due to the undeniable economic and ecological advantages (Petrenkova et al., 2018; Kovalyshyna et al., 2018; Wu et al., 2021). The occurrence and spread of epiphytoses are mainly determined by genetic protection against pathogens (Kang et al., 2020), weather conditions during the growing period, crop rotation, and tillage method (Iwańska et al., 2019; Różewicz et al., 2021).

Among foliar diseases of winter bread wheat in Ukraine, yellow leaf blotch and brown rust, which are caused by *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. (syn. *Puccinia triticina* Eriks.), respectively (Holosna, 2019; Horiainova et al., 2020). The causative agent of yellow leaf blotch, *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler, is a hemibiotrophic parasite that leads to preterm withering of leaves, formation of shriveled kernels, and a decline in the number of kernels per spike. By taxonomic status, it belongs to the class *Ascomycetes*, order *Pleosporales*, family *Pleosporaceae*. *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. belongs to the class *Basidiomycetes*, order *Uredinales*, family *Pucciniaceae*. By nutrition type, *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. is an obligate parasite; it enhances transpiration, reduces assimilation surface, and disrupts photosynthesis, resulting in the formation of low-performance spikes (Retman, 2007; Pinchuk et al. 2018). Over 200 races of *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. have been identified (Pinchuk et al. 2018); there are about 20 races of *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler (Shvets, 2016).

Selection of appropriate stress-resistant genotypes for the corresponding agro-ecological growing conditions allows for minimization of unwanted crop losses induced by limiting environmental factors (Studnicki et al., 2019; Filip et al., 2021). The resistance of a genotype to environmental stressors characterizes its stability, while the ability to adapt and exist under changing environmental conditions, i.e. plasticity, enables effective using favorable factors of an environment within the limits of the genetic norm of reaction, (Litun, 1980; Zamlila et al., 2019; Dhiwar et al., 2020).

Pre-selection of sources combining high group resistance to pathogens, yield capacity, and desirable adaptability under certain agro-ecological growing conditions improves the effectiveness of breeding to create highly promising cultivars and leverage the gene pool of Ukrainian plants (Khomenko, Sandetska, 2018; Nazarenko et al., 2020).

Our purpose was to determine the environmental plasticity of short-stemmed winter bread wheat cultivars differentiated by resistance to yellow leaf blotch and brown rust via analyzing the ranks of the

genotypic effect and regression coefficient for yield as well as to select high-yielding sources adapted to the eastern forest-steppe of Ukraine.

Materials and methods

Twenty-four (24) short-stemmed winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from nine countries were studied: eight Ukrainian cultivars, four Hungarian cultivars, three French accessions, three accessions from the US, two German accessions, one Romanian accession, one accession from Tajikistan, one Czech accession, and one Croatian accession. The study was carried out in the Laboratory of Genetic Resources of Cereals, Grain Legumes, and Groats Crops of the National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine (NCPGRU) at the Yuriev Plant Production Institute of NAAS (located in the Kharkivskyi District of the Kharkivska Oblast; the northeastern part of the left-bank forest-steppe of Ukraine) in 2019–2022. The experiments were conducted by the qualification examination techniques (Tkachyk, 2016). Post-fallow sowing was conducted with a SSFK-7 small seeder on plots of 5 m² in three replications within the optimal timeframe. The seeding rate was 4,500,000 seeds per 1 ha. In the spring, the plots were fertilized with ammonium nitrate (N₄₀). Cv. 'Bunchuk' was taken as the check cultivar and sown between every 20 accessions. The accessions were studied by S.O. Tkachyk's method (Tkachyk, 2016) and methods for assessing resistance of wheat cultivars to pests and pathogens (Trybel et al., 2010). The resistance to foliar diseases was evaluated on a 9-point scale, where 1 point corresponds to very low resistance (very strong damage, > 50%), 3 points – low resistance (strong damage, 26–50%), 5 points – medium resistance (moderate damage, 5–25%), 7 points – high resistance (weak damage, < 5%), 9 points – very high resistance (no damage, 0%). The environmental plasticity was determined as B.P. Hurieva, P.P. Litun, and I.A. Huriev (Huriev et al. 1981) recommended: this approach is based on evaluation of the genotypic effect (ϵ_i) as a degree of general adaptive capacity and the regression coefficient (R_i) as a degree of plasticity with the establishment of ranks. According to this approach, the higher genotypic effect is and the lower the regression coefficient is, the higher the rank is (1 – high, 2 – medium, 3 – low). Genotypes with a total number of ranks of 2–3 are of the greatest breeding value, as they combine the high potential of an investigated trait and its stable expression throughout the study period. To comprehensively evaluate the wetting modes in the study years, we used T.G. Selyaninov's hydrothermal coefficient (HTC) (Selyaninov, 1937), which was calculated by the following formula:

$$HTC = \sum \text{precipitation} / 0.1 \times \sum \text{temperatures above } 10^\circ \text{C}.$$

The traditional scale is as follows: HTC < 0.4 – very arid; HTC = 0.4–0.5 – arid; HTC = 0.6–0.7 – moderately arid; HTC = 0.8–0.9 – wet; HTC = 1.0–1.5 – sufficiently wet; HTC > 1.5 – excessively wet. The Chaddock scale (Chaddock, 1952) was used to qualitatively assess the correlation coefficients and strength of relationships between the studied characteristics.

To achieve the goal, we used the following research methods: general scientific (analysis and synthesis) – for differentiation and generalization of the results, field – for evaluation of the accessions' resistance to fungal pathogens and yield capacity, ANOVA – for determination of the environmental plasticity for yield and significance of differences. Experimental data were statistically processed by calculus of variations, analysis of variance, and correlation and regression analyses in MS Excel 2007 and Statistica 6.0.

Results and discussion

Having analyzed the weather during the growing periods in 2019–2022, we can conclude that different values of the hydrothermal coefficient (HTC) contributed to differentiation of the winter bread wheat accessions by resistance to yellow leaf blotch and brown rust as well as by yield. The autumn in 2021 was very dry (HTC = 0.36); the 2020 autumn was dry (HTC = 0.46), and the 2019 autumn was rather wet (HTC = 1.46). The meteorological conditions during the spring-summer vegetation differed significantly in terms of wetting and temperature: the 2022 spring was dry (HTC = 0.59); the 2021 spring was sufficiently wet (HTC = 1.46); and the 2020 spring was water-logged (HTC = 2.05). The summer months in 2020 (HTC = 1.27) and 2022 (HTC = 1.17) were sufficiently wet, while the 2021 summer was moderately dry (HTC = 0.64). 2020 and 2021 were favorable years for the selection of sources of resistance to yellow leaf blotch (*P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler) and brown rust (*P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.). 2020 and 2022 were the most favorable years for high yields. In 2021, the yields were mostly lower. Water deficit and high

temperature in July 2021 (HTC = 0.09) led to windburn of grain, negatively affecting the yields of the vast majority of the winter bread wheat under investigation.

Thus, the weather during the growing periods made it possible to differentiate the winter bread wheat accessions by resistance to yellow leaf blotch and brown rust as well as by yield, to determine the environmental plasticity of these parameters, and to identify high-yielding sources that are adapted to the eastern forest-steppe of Ukraine.

In 2019–2022, the variation series of resistance to *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler and *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. in the tested winter bread wheat cultivars ranged from 1 point to 9 points. As a result of the study, nine sources of high resistance to *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler (7–9 points) were selected, i.e. 37.5% of the total number of studied accessions. They are the following cultivars: 'Versiia odeska' (UKR), 'Pokrovska' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Perspektyva odeska' (UKR), 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Amurg' (ROU), 'MV Kaplar' (HUN), 'Mescal' (FRA), and 'SY Wolf' (USA), while the check cv. 'Bunchuk' showed a 4-point resistance (Fig. 1).

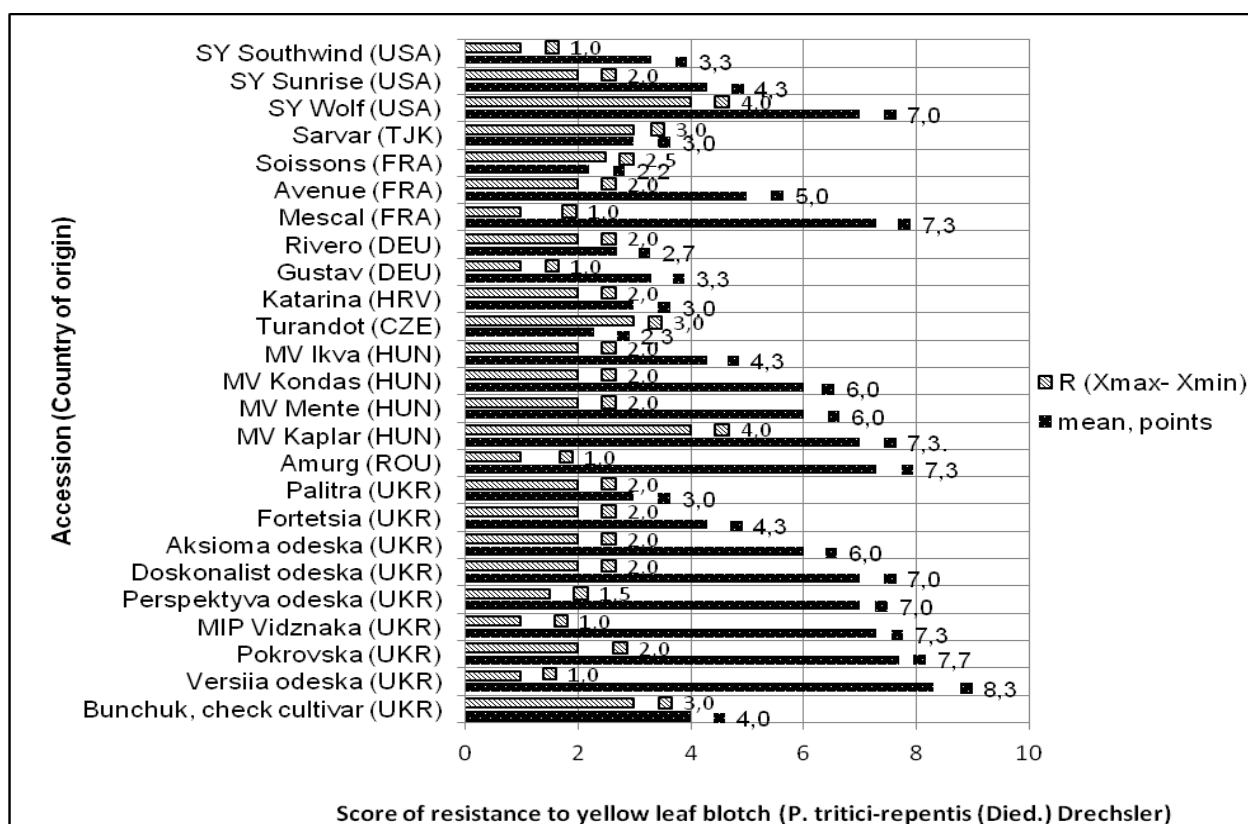


Fig. 1. Resistance of the short-stemmed winter bread wheat genotypes to the causative agent yellow leaf blotch (*P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler), 2019–2022

In the studied sample, the following accessions were characterized by 4– to 6-point resistance to yellow leaf blotch: cvs. 'Aksioma odeska' (UKR), 'Fortetsia' (UKR), 'MV Mente' (HUN), 'MV Kondas' (HUN), 'MV Ikva' (HUN), 'Avenue' (FRA), and 'SY Sunrise' (USA); their share was 29.2%. Eight cultivars (33.3%) showed low resistance to *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler: cvs. 'Palitra' (UKR), 'Turandot' (CZE), 'Gustav' (DEU), 'Rivero' (DEU), 'Soissons' (FRA), 'Sarvar' (TJK), and 'SY Southwind' (USA).

From the coefficient of variation (CV, %), it was seen that the resistance to yellow leaf blotch ranged from 6.9% to 65.5%. Having analyzed the variation series, we determined that cvs. 'Versiia odeska' (UKR), 'Pokrovska' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Amurg' (ROU), and 'Mescal' (FRA) were little variable (CV ≤ 10.0%); their share was 20.8%. Eight accessions (33.3%) were characterized by medium variability (CV = 11.0%–20.0%): cvs. 'Perspektyva odeska' (UKR), 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Aksioma odeska' (UKR), 'MV Mente' (HUN), 'MV Kondas' (HUN), 'Gustav' (DEU), 'Avenue' (FRA), and 'SY Southwind' (USA). The following cultivars were distinguished by high variability (CV > 20.0%) of resistance to *P. tritici-repentis*

(Died.) Drechsler: 'Fortetsia' (UKR), 'Palitra' (UKR), 'MV Ikva' (HUN), 'MV Kaplar' (HUN), 'Turandot' (CZE), 'Katarina' (HRV), 'Rivero' (DEU), 'Soissons' (FRA), 'Sarvar' (TJK), 'SY Sunrise' (USA), and 'SY Wolf' (USA). It was found that the percentage of accessions with significant variability of resistance yellow leaf blotch was 45.8%. The variability of resistance to yellow leaf blotch in cv. 'Bunchuk' (check cultivar) was considerable (CV = 43.3%).

High resistance to brown rust (7–9 points) was noted for nine genotypes; their share was 37.5% of the total number of tested accessions. These were the following cultivars: 'Perspektyva odeska' (UKR), 'Fortetsia' (UKR), 'Pokrovska' (UKR), 'Versiia odeska' (UKR), 'MV Kondas' (HUN), 'Gustav' (DEU), 'Rivero' (DEU), 'Mescal' (FRA), and 'Avenue' (FRA). The check cultivar, 'Bunchuk', showed resistance of 6 points (Fig. 2).

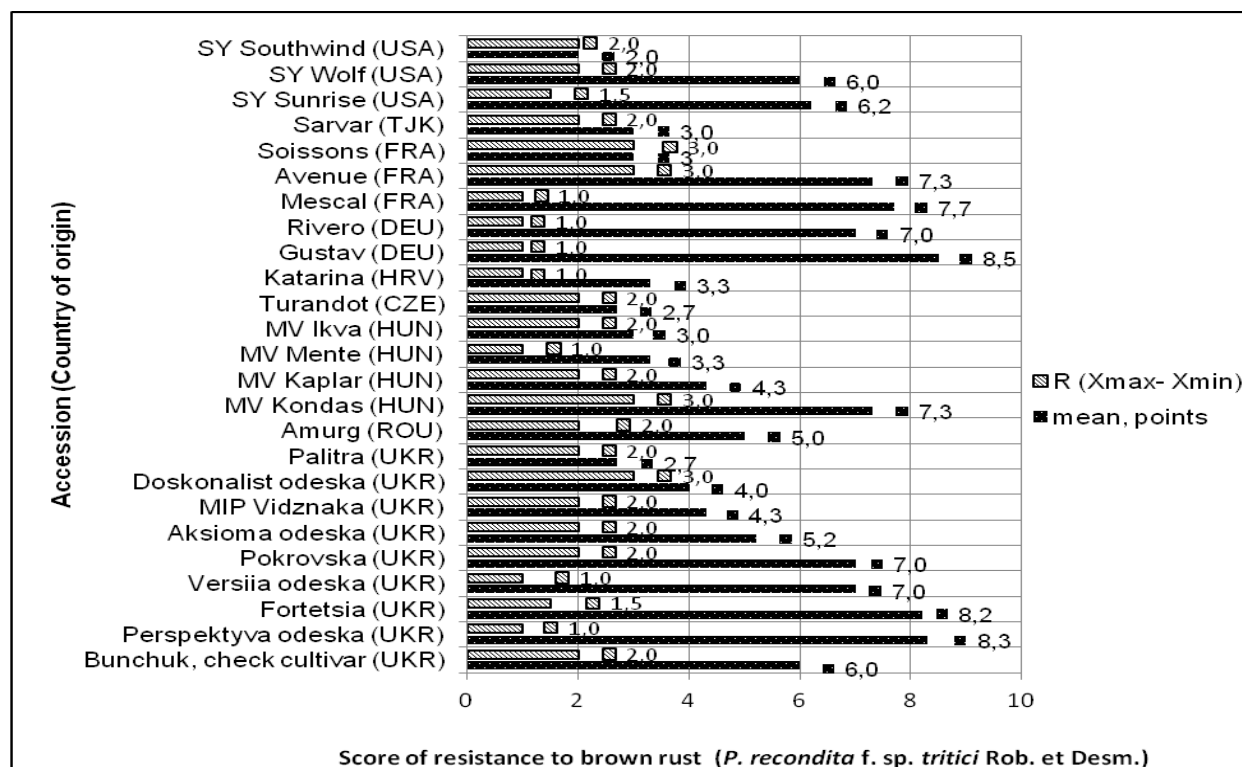


Fig. 2. Resistance of the short-stemmed winter bread wheat genotypes to the causative agent of brown rust (*P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.), 2019–2022

The following accessions were characterized by medium resistance (4–6 points): cvs. 'Aksioma odeska' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Amurg' (ROU), 'MV Kaplar' (HUN), 'SY Sunrise' (USA), and 'SY Wolf' (USA); their share was 29.2%.

Low resistance to *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. was noted in cvs. 'Palitra' (UKR), 'MV Mente' (HUN), 'MV Ikva' (HUN), 'Turandot' (CZE), 'Katarina' (HRV), 'Soissons' (FRA), 'Sarvar' (TJK), and 'SY Southwind' (USA); their share was 33.3%.

According to the coefficient of variation (CV, %), the variability of resistance to brown rust ranged from 5.9% to 57.7%. Having analyzed the variation series, we determined that cvs. 'Fortetsia' (UKR), 'Versiia odeska' (UKR), 'Perspektyva odeska' (UKR), 'Gustav' (DEU), 'Rivero' (DEU), and 'Mescal' (FRA) were little variable (CV ≤10.0 %); their share was 25.0%. Six cultivars (25.0%) showed medium variability (CV = 11.0% – 20.0%) of resistance to brown rust: cvs. 'Pokrovska' (UKR), 'Amurg' (ROU), 'MV Mente' (HUN), 'Katarina' (HRV), 'SY Sunrise' (USA), and 'SY Wolf' (USA). A high variability (CV > 20.0%) was noted in the following cultivars: 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Palitra' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Aksioma odeska' (UKR), 'MV Ikva' (HUN), 'MV Kaplar' (HUN), 'MV Kondas' (HUN), 'Soissons' (FRA), 'Avenue' (FRA), 'Sarvar' (TJK), and 'SY Southwind' (USA).

It was determined that the percentage of accessions with considerable variability in resistance to brown rust was 45.8%. The variability of resistance to *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm in cv. 'Bunchuk' (check cultivar) was medium (CV = 16.7%).

As a result of the analysis, little-variable sources of high and stable resistance to the causative agents of yellow leaf blotch and brown rust were identified in the studied group of short-stemmed winter bread wheat genotypes. They were cv. 'Versiia odeska' (UKR) and cv. 'Mescal' (FRA).

To determine the environmental plasticity of the short-stemmed winter bread wheat genotypes differentiated by resistance to yellow leaf blotch and brown rust, the tested sample was evaluated by the genotypic effect ranks and coefficient of regression for yield.

In 2019 - 2022, sources of high yield (plus > 16% to the yield from the check cultivar) were selected from the short-stemmed winter bread wheat genotypes of different eco-geographical origins. These sources included cvs. 'Pokrovska' (UKR), 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Versiia odeska' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Amurg' (ROU), 'MV Ikva' (HUN), 'Mescal' (FRA), and 'SY Wolf' (USA). The check cultivar, 'Bunchuk' (UKR), yielded 5.18 t/ha.

Table 1. Environmental plasticity of the short-stemmed winter bread wheat genotypes differentiated by resistance to *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler, *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. and yield, 2019–2022

Accession	Country of origin	Yield, t/ha			Genotypic effect		Coefficient of regression (degree of plasticity)		Environmental plasticity, sum of ranks
		<i>max</i>	<i>min</i>	<i>X</i>	ε_i	Rank	R_i	Rank	
Bunchuk ¹⁾	UKR	7.00	4.10	5.18	-0.13	2	1.32	3	5
Pokrovska	UKR	7.50	6.70	7.23	1.92	1	0.60	1	2
Doskonalist odeska	UKR	7.80	5.50	6.61	1.30	1	1.29	3	4
Versiia odeska	UKR	7.15	5.85	6.52	1.21	1	0.77	1	2
MIP Vidznaka	UKR	6.75	5.62	6.36	1.05	1	0.82	1	2
Fortetsia	UKR	6.45	4.50	5.73	0.42	2	1.38	3	5
Palitra	UKR	6.50	4.42	5.52	0.21	2	1.27	3	5
Perspektyva odeska	UKR	5.20	4.20	4.83	-0.48	3	0.70	1	4
Aksioma odeska	UKR	5.70	4.00	4.67	-0.64	3	0.69	1	4
Amurg	ROU	7.22	5.20	6.47	1.16	1	1.43	3	4
MV Ikva	HUN	6.80	5.40	6.26	0.95	1	0.97	2	3
MV Kaplar	HUN	6.85	4.73	5.73	0.42	2	1.17	3	5
MV Mente	HUN	5.47	3.80	4.54	-0.77	3	0.79	1	4
MV Kondas	HUN	5.32	3.20	4.24	-1.07	3	1.12	3	6
Turandot	CZE	4.75	2.50	3.81	-1.50	3	1.45	3	6
Katarina	HRV	4.50	2.70	3.60	-1.71	3	0.97	2	5
Gustav	DEU	6.24	4.85	5.56	0.25	2	0.82	1	3
Rivero	DEU	5.80	4.35	5.16	-0.15	2	0.93	2	4
Mescal	FRA	6.61	5.71	6.29	0.98	1	0.65	1	2
Avenue	FRA	5.70	3.30	4.47	-0.84	3	1.25	3	6
Soissons	FRA	4.80	2.80	3.80	-1.51	3	1.08	2	5
Sarvar	TJK	5.65	3.50	4.55	-0.76	3	1.13	3	6
SY Wolf	USA	6.85	5.65	6.25	0.94	1	0.69	1	2
SY Sunrise	USA	6.53	4.43	5.17	-0.14	2	0.78	1	3
SY Southwind	USA	4.70	3.40	4.23	-1.08	3	0.94	2	5
LSD _{0.05}		—	—	0.43	—	—	—	—	—
min		4.50	2.50	3.60	-1.71	1	0.60	1	2
max		7.80	6.70	7.23	1.92	3	1.45	3	6
med		6.15	4.42	5.31	0.00	—	1.00	—	—

Note: ¹⁾ check cultivar.

Among the short-stemmed genotypes under investigation, high values of the genotypic effect (rank 1) for yield were noted for eight cultivars, accounting for 33.3%. These genotypes were cvs. 'Pokrovska'

(UKR), 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Versiia odeska' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Amurg' (ROU), 'MV Ikva' (HUN), 'Mescal' (FRA), and 'SY Wolf' (USA) (Table 1).

A medium genotypic effect (rank 2) was intrinsic to cvs. 'Fortetsia' (UKR), 'Palitra' (UKR), 'MV Kaplar' (HUN), 'Gustav' (DEU), 'Rivero' (DEU), and 'SY Sunrise' (USA), which accounted for 25.0%. A low genotypic effect (rank 3) was characteristic of ten cultivars (41.7%), viz: 'Perspektyva odeska' (UKR), 'Aksioma odeska' (UKR), 'MV Mente' (HUN), 'MV Kondas' (HUN), 'Turandot' (CZE), 'Katarina' (HRV), 'Avenue' (FRA), 'Soissons' (FRA), 'Sarvar' (TJK), and 'SY Southwind' (USA). The check cultivar, 'Bunchuk' (UKR), showed a medium genotypic effect on yield (rank 2). We demonstrated that the genotypic effect (ϵ_i) on yield in the tested group of short-stemmed cultivars differentiated by resistance to yellow leaf blotch and brown rust ranged from -1.71 to 1.92.

There were ten (41.7%) homeostatic accessions with high stability of yield (rank 1). The following accessions were noticeable for this genotypic feature: cvs. 'Pokrovska' (UKR), 'Versiia odeska' (UKR), 'MIP Vidznaka' (UKR), 'Perspektyva odeska' (UKR), 'Aksioma odeska' (UKR), 'MV Mente' (HUN), 'Gustav' (DEU), 'Mescal' (FRA), 'SY Wolf' (USA), and 'SY Sunrise' (USA). Five cultivars (20.8%) were classed as moderately sensitive to variable growing conditions in terms of yield (rank 2): cvs. 'MV Ikva' (HUN), 'Katarina' (HRV), 'Rivero' (DEU), 'Soissons' (FRA), and 'SY Southwind' (USA).

According to the degree of plasticity (R_i), there were nine (37.5%) intensive, i.e., sensitive to improved or worsened conditions of cultivation, genotypes (rank 3). They included cvs. 'Doskonalist odeska' (UKR), 'Fortetsia' (UKR), 'Palitra' (UKR), 'Amurg' (ROU), 'MV Kaplar' (HUN), 'MV Kondas' (HUN), 'Turandot' (CZE), 'Avenue' (FRA), and 'Sarvar' (TJK). According to the degree of plasticity, cv. 'Bunchuk' (check cultivar) was characterized by high sensitivity to changing conditions of cultivation (rank 3).

Having investigated the environmental plasticity of the short-stemmed winter bread wheat genotypes differentiated by resistance to yellow leaf blotch and brown rust and having analyzed the sum of ranks of the genotypic effect (ϵ_i) and the regression coefficient (R_i) for yield in the studied sample, we identified five cultivars (20.8%) with the highest genetic potential for adaptability to stressful growing conditions in the eastern forest-steppe of Ukraine and, accordingly, with the greatest breeding value, as evidenced by the lowest sum of ranks (sum of ranks = 2), viz: cvs. 'Pokrovska' ($\epsilon_i = 1.92$; $R_i = 0.60$) (UKR), 'Versiia odeska' ($\epsilon_i = 1.21$; $R_i = 0.77$) (UKR), 'MIP Vidznaka' ($\epsilon_i = 1.05$; $R_i = 0.82$) (UKR), 'Mescal' ($\epsilon_i = 0.98$; $R_i = 0.65$) (FRA), and 'SY Wolf' ($\epsilon_i = 0.94$; $R_i = 0.69$) (USA).

Scientists have different opinions about the possibility of combining relatively high and stable yield with resistance to environmental stressors in one genotype. Some scientists claim that there are no winter bread wheat cultivars that are capable of combining high resistance to stress factors, in particular drought, with high and stable yield (Zviahin et al., 2008). However, T. Yurchenko et al. (2020) point out that the negative correlation between stress resistance and yield is not absolute and, therefore, there are prospects for an optimal combination of these traits in one genotype (Yurchenko et al., 2020). It is noteworthy that British scientists managed to identify four modern British winter bread wheat cultivars ('Gladiator', 'Humber', 'Mercato', and 'Zebedee'), which combined a high yield potential with its stable manifestation (Pennacchi et al., 2019).

A lot of scientists, both Ukrainian and foreign ones, think that, when one breeds for increased yield only, the adaptive potentials of cultivars decrease over time, and therefore, genotypes' potential yields and parameters of adaptive capacity should be routinely monitored to improve existing cultivars (Lavrynenko et al., 2020; Dhiwar et al., 2020).

Our results indicate that the *T. aestivum* L. genotypes with high group resistance to pathogens have significant advantages in terms of adaptability compared to accessions with individual or low resistance to phytopathogens (Petrenkova et al., 2018; Khomenko, Sandetska, 2018). Thus, cvs. 'Versiia Odeska' (UKR) and 'Mescal' (FRA), which were noticeable for high and stable resistance to *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler and *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm., were included in the group of the most high-yielding and adapted genotypes.

Accessions 'MV Ikva' ($\epsilon_i = 0.95$; $R_i = 0.97$) (HUN), 'Gustav' ($\epsilon_i = 0.25$; $R_i = 0.82$) (DEU), and 'SY Sunrise' ($\epsilon_i = -0.14$; $R_i = 0.78$) (USA) were somewhat inferior (sum of ranks = 3) to cvs. 'Versiia Odeska' (UKR) and 'Mescal' (FRA). Six cultivars (25%) were ranged in group 3, based on potential for adaptability and relative practical value for production (sum of ranks = 4): cvs. 'Doskonalist odeska' ($\epsilon_i = 1.30$; $R_i = 1.29$) (UKR), 'Perspektyva odeska' ($\epsilon_i = -0.48$; $R_i = 0.70$) (UKR), 'Aksioma odeska' ($\epsilon_i = -0.64$; $R_i = 0.69$) (UKR), 'Amurg' ($\epsilon_i = 1.16$; $R_i = 1.43$) (ROU), 'MV Mente' ($\epsilon_i = -0.77$; $R_i = 0.79$) (HUN), and 'Rivero' ($\epsilon_i = -0.15$; $R_i = 0.93$) (DEU). The sum of ranks of 5 was scored by cvs. 'Fortetsia' ($\epsilon_i = 0.42$; $R_i = 1.38$) (UKR), 'Palitra' ($\epsilon_i = 0.21$; $R_i = 1.27$) (UKR), 'MV Kaplar' ($\epsilon_i = 0.42$; $R_i = 1.17$) (HUN), 'Katarina' ($\epsilon_i = -1.71$; $R_i = 0.97$) (HRV),

'Soissons' ($\epsilon_i = -1.54$; $R_i = 1.08$) (FRA), and 'SY Southwind' ($\epsilon_i = -1.08$; $R_i = 0.94$) (USA), which made up 25%. Four foreign cultivars (16.7%) had the lowest adaptability potential by genotypic effect and degree of plasticity (sum of ranks = 6), viz: cvs. 'MV Kondas' ($\epsilon_i = -1.07$; $R_i = 1.12$) (HUN), 'Turandot' ($\epsilon_i = -1.50$; $R_i = 1.45$) (CZE), 'Avenue' ($\epsilon_i = -0.84$; $R_i = 1.25$) (FRA), and 'Sarvar' ($\epsilon_i = -0.76$; $R_i = 1.13$) (TJK). Cv. 'Bunchuk' (check cultivar) ($\epsilon_i = -0.13$; $R_i = 1.32$) (UKR) had a sum of ranks of 5 for environmental plasticity.

The selected high-yielding short-stemmed genotypes with high adaptive potentials are valuable starting materials to breed new promising winter bread wheat cultivars, which will be adapted to the stressful conditions of growing in the eastern forest-steppe of Ukraine.

Having analyzed relationships between the investigated traits, we established that resistance to the causative agents of brown rust and yellow leaf blotch was significantly negatively correlated with the sum of ranks of the genotypic effect and degree of yield plasticity ($r = -0.65$ and $r = -0.58$, respectively) in the short-stemmed winter bread wheat genotypes. At the same time, the variability of resistance to the causative agents of brown rust and yellow leaf blotch was significantly positively correlated with the sum of ranks of the genotypic effect and yield plasticity degree ($r = 0.59$ and $r = 0.52$, respectively). The significance of the relationships was 99% ($P < 0.01$) (Table 2).

Table 2. Correlations (r) of the sum of ranks of the genotypic effect and degree of yield plasticity with resistance to the causative agents of yellow leaf blotch and brown rust and the variability of these phytopathogens in the short-stemmed winter bread wheat genotypes, 2019–2022

Trait		Sum of ranks of the genotypic effect (ϵ_i) and degree of plasticity (R_i) of yield, t/ha
Score of resistance to pathogens, points	Yellow leaf blotch	-0.58 ¹⁾
	Brown rust	-0.65 ¹⁾
Variability of resistance to pathogens (CV), %	Yellow leaf blotch	0.52 ¹⁾
	Brown rust	0.59 ¹⁾

Note: ¹⁾ – $P < 0.01$.

Thus, among biotic factors as environmental stressors, the pathogens *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm. negatively and significantly affected the potential and stability of yield in the group of short-stemmed winter bread wheat genotypes. This fact means that sources of group resistance to the specified phytopathogens are mandatory to involve in breeding to create genotypes adapted to the eastern forest-steppe of Ukraine.

Conclusions

According to the sum of ranks of the genotypic effect (ϵ_i) and the regression coefficient (R_i) for yield in the short-stemmed cultivars differentiated by resistance to yellow leaf blotch and brown rust, genotypes with the highest genetic potential of adaptability to the stressful conditions of cultivation in the eastern forest-steppe of Ukraine were identified, as evidenced by the lowest sum of ranks (sum of ranks = 2). These cultivars yielded by > 16% more than the check cultivar, viz: cvs. 'Pokrovska' ($\epsilon_i = 1.92$; $R_i = 0.60$) (UKR), 'Versiia odeska' ($\epsilon_i = 1.21$; $R_i = 0.77$) (UKR), 'MIP Vidznaka' ($\epsilon_i = 1.05$; $R_i = 0.82$) (UKR), 'Mescal' ($\epsilon_i = 0.98$; $R_i = 0.65$) (FRA), and 'SY Wolf' ($\epsilon_i = 0.94$; $R_i = 0.69$) (USA).

Due to this study, we detected new sources of high and stable group resistance to the causative agents of yellow leaf blotch and brown rust: cv. 'Versiia odeska' (UKR) and cv. 'Mescal' (FRA). It was established that in the short-stemmed cultivars differentiated by resistance to *P. tritici-repentis* (Died.) Drechsler and *P. recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm, the genotypic effect (ϵ_i) on yield ranged from -1.71 to 1.92 and the coefficient of regression (R_i) ranged from 0.60 to 1.45, largely affecting the environmental plasticity, the sum of ranks for which varied from 2 to 6. The percentage of accessions with high genotypic effects was 33.3%; the percentage of accessions with high stability of yield was 41.7%. It was found that in the short-stemmed winter bread wheat genotypes the resistance to the causative agents of brown rust and

yellow leaf blotch was significantly negatively correlated with the sum of ranks of the genotypic effect and degree of yield plasticity ($r = -0.65$, $P < 0.01$ and $r = -0.58$, $P < 0.01$, respectively).

The selected sources of high group resistance to yellow leaf blotch and brown rust, high potential and stability of yield are valuable starting materials for the breeding of new highly promising winter bread cultivars wheat that will be adaptable to growing in the eastern forest-steppe of Ukraine.

References

- Chaddock R.E. (1952). *Exercises in statistical methods*. Houghton, 166 p.
- Dhiwar K., Sharma D.J., Agrawal A.P., Pandey D. (2020). Stability analysis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9, 295–298. <https://doi.org/10.3390/agriculture12071002>
- Filip E., Woronko K., Stepień E., Czarniecka N. (2023). An overview of factors affecting the functional quality of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Science*, 24(8), article number 7524. <https://doi.org/10.3390/ijms24087524>.
- Holosna L.M., Lisova G.M., Afanasieva O.G., Kucheroва L.O. (2019). Resistance of spring wheat cultivars to pathogens of leaf diseases and root rot in the Right-bank Forest Steppe of Ukraine. *Interdepartmental Thematic Scientific Collection of Phytosanitary Safety*, 65, 35–50. <https://doi.org/10.36495/1606-9773.2019.65.35-50> (In Ukrainian)
- Horiainova V.V., Turenko V.P., Bilyk, M.O. et al. (2020). Species composition, morphological and biological peculiarities of leaf pathogens of spring wheat. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(3), 115–120. https://doi.org/10.15421/2020_143 (In Ukrainian)
- Huriev B.P., Lytun P.P., Hureva I.A. (1981). Methodological recommendations on ecological variety testing of maize. Kharkiv, 31 p. (Ukrainian).
- Ilchuk M.M., Konoval I.A., Baranovska O.D., Yevtushenko, V.D. (2019). Development of the grain market in Ukraine and its stabilization. *Ekonomika APK*, 4, 29–38. <https://doi.org/10.32317/2221-1055.201904029> (In Ukrainian)
- Iwańska M., Stepień M. (2019). The effect of soil and weather conditions on yields of winter wheat in multi-environmental trials. *Biometrical Letters*, 56, 263–279. <https://doi.org/10.2478/bile-2019-0016>
- Kang Y., Zhou M., Merry A. Barry K. (2020). Mechanisms of powdery mildew resistance of wheat – a review of molecular breeding. *Plant Pathology*, 69(4), 601–617. <https://doi.org/10.1111/ppa.13166>
- Khomenko L.O., Sandetska N.V. (2018). Sources of complex resistance of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in breeding for adaptability. *Plant Varieties Studying and Protection*, 14(3), 270–275. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.3.2018.145289> (In Ukrainian)
- Kolupaev Yu. Ye., Yastreb T. O., Riabchun N.I. et al. (2023). Cellular Mechanisms of the Formation of Plant Adaptive Responses to High Temperatures. *Cytology and Genetics*, 2023, 57(1), 55–75. <https://doi.org/10.3103/S0095452723010048> (In Ukrainian)
- Kovalyshyna H.M., Dmytrenko Y.M., Demydov A.A. et al. (2018). Results of winter wheat breeding for resistance to major pathogens at the Myronivka Wheat Institute. *Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Series Agronomy*, 294, 96–103. (In Ukrainian)
- Laugerotte J., Baumann U., Sourdille P. (2022). Genetic control of compatibility in crosses between wheat and its wild or cultivated relatives. *Plant Biotechnology Journal*, 20(5), 812–832. <https://doi.org/10.1111/pbi.13784>.
- Lavrynenko Yu.O., Bazaliy H.H., Usyk L.O., Zhupyna A.Yu. (2020). Adaptive ability of winter wheat varieties in the conditions of the Southern Steppe of Ukraine. *Agrarian Innovations*, 1, 97–102. <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2020.1.16>. (In Ukrainian)
- Li H., Dong Zh., Ma Ch. et al. (2020). A spontaneous wheat-Aegilops longissima translocation carrying Pm66 confers resistance to powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(4), 1149–1159. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03538-8>
- Lisovyi M.P., Lisova G.M. (2017). The coevolution of a host-plant and pathogen – research and a practical implementation. *Plant Protection and Quarantine*, 63, 104–118. DOI: 10.36495/1606-9773.2017.63.104-118 (Ukrainian).
- Litun P.P. (1980) Genotype-environment interaction in genetic research and methods of its study. *Problems of selection and evolution of breeding material*. Kyiv: Scientific thought, 63–93.
- Morhun V.V., Havryliuk M.M., Oksom V.P. et al. (2014). Introduction of new, stress-resistant, high-yielding winter wheat varieties created via chromosomal engineering and marker-assisted selection into production. *Science and Innovation*, 10(5), 40–48. <https://doi.org/10.15407/scin10.05.040> (In Ukrainian)
- Nazarenko M., Mykolenk, S., Okhmat, P. (2020). Variation in grain productivity and quality of modern winter wheat varieties in northern Ukrainian Steppe. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(3), 102–108. doi: 10.15421/2020_175. (In Ukrainian)

- Pennacchi J.P., Carmo-Silva E., Andralojc P.J. et al. (2019). Stability of wheat grain yield over three field seasons in the UK. *Food and Energy Security*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.1002/fes3.147>.
- Petrenkova V.P., Borovska I.Yu., Luchna I.S. et al. (2018). *Methodology for selection of field crop forms based on resistance to a set of biotic and abiotic factors*. Kharkiv: FOP Brovin, 242 p. (In Ukrainian)
- Pinchuk N.V., Verheles P.M., Kovalenko T.M., Okrushko S.Ye. (2018). General phytopathology: A textbook. Vinnytsia, 272 p. (Ukrainian)
- Raza A., Razzaq A., Saher-Mehmood S. et al. (2019). Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*, 8(2), article number 34. <https://doi.org/10.3390/plants8020034>.
- Retman S.V. (2007). Management of phytoinfection development. *Quarantine and Plant Protection*, 1, 19–20. (In Ukrainian)
- Rózewicz M., Wyżńska M., Grabiński J. (2021). The Most Important Fungal Diseases of Cereals—Problems and Possible Solutions. *Agronomy*, 11(4):714. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040714>
- Selyaninov G.T. (1937). Methods of Agricultural Characteristic of Climate. *World Agroclimatic Reference Book*. Leningrad–Moscow: Gidrometeoizdat, 5–29
- Shvets I. (2016). *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler – The causative agent of tan spot winter wheat: morphological-cultural specifics and characteristics on the basis of virulence. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, 74, 53–59. (In Ukrainian)
- Studnicki M., Derejko A., Wójcik-Gront E., Kosma M. (2019). Adaptation patterns of winter wheat cultivars in agro-ecological regions. *Scientia Agricola*, 76, 148–156. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2017-0183>
- Sydorenko M.V., Chebotar S.V. (2020). The Effect of Drought on Wheat Plants at different Growth Stages. *Odesa National University Herald*, 25.1(46), 67–87. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.1\(46\).205848](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.1(46).205848) (In Ukrainian)
- Tkachyk S.O. (2016). Methodology for the examination of plant varieties of cereals, cereals and legumes for their suitability for distribution in Ukraine. Vinnytsia: FOP Korzun D. Yu. 82 p.
- Trybel S., Hetman M., Stryhun O. et al. (2010). Methodology of Assessing Resistance of Wheat Varieties to Pests and Pathogens. Kyiv, UA: Kolobih, 362 p (In Ukrainian)
- Trybel S.O. (2006). Protection of seed crops. *Seed Production*, 9, 13–16. (In Ukrainian)
- Wu X., Bian Q., Gao Y. et al. (2021). Evaluation of resistance to powdery mildew and identification of resistance genes in wheat cultivars. *PeerJ*, 9, e10425. <https://doi.org/10.7717/peerj.10425>
- Yurchenko T., Pykalo S., Humeniuk O., Pirykh A. (2020). Evaluation of drought tolerance of winter bread wheat varieties of Myronivka breeding in the Central Forest-Steppe of Ukraine. *Bulletin of Lviv National Environmental University. Series Agronomy*, 24, 141–146. <https://doi.org/10.31734/agronomy2020.01.141> (In Ukrainian)
- Zamliia N.P., Demydov O.A., Volohdina H.B. et al. (2019). Yielding capacity and adaptability of breeding lines of winter bread wheat in environment of Ukrainian Forest-Steppe. *Myronivka Bulletin*, 9, 31–36. <https://doi.org/10.31073/mvis201909-05> (In Ukrainian)
- Zviahin A.F., Riabchun N.I., Yelnikov M.I. (2008). Adaptive potential of winter wheat varieties selected by the V. Yuriev Institute of Plant Industry of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences. *Plant Breeding and Seed Production*, 95, 223–229. <https://doi.org/10.30835/2413-7510.2008.84782> (In Ukrainian)

Екологічна пластичність короткостеблених сортів пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.) та стійкість до збудників піренофорозу (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler) і бурі листкової іржі (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.)

А.В. Ярош, Є.Ю. Кучеренко, В.К. Рябчун, Н.В. Кузьмишина, О.В. Солонечна

У зв'язку з мінливістю поширених збудників листових хвороб пшениці м'якої озимої, утворенням вірулентних та агресивних рас, а також з періодичними посухами, які зі змінами клімату все частіше спостерігаються на території України, виникають передумови для поглибленого вивчення адаптивних властивостей сортів рослин та виділення серед них кращого генотипу для селекції. У роботі представлені результати визначення екологічної пластичності в короткостеблених сортів пшениці м'якої озимої, диференційованих за стійкістю до збудників піренофорозу та бурі листкової іржі. Виділено нові джерела високої та стабільної групової стійкості до збудників піренофорозу та бурі листкової іржі – Версія одеська (UKR) та Mescal (FRA). За сумою рангів генотипового ефекту (ϵ_i) та коефіцієнту регресії (R_i) врожайності серед короткостеблених сортів, визначено генотипи, які відзначаються найвищим генетичним потенціалом адаптивності (сума рангів 2) до стресових умов вирощування в східній частині Лісостепу України, формуючи при цьому урожайність понад 16 % до стандарту, а саме: Покровська ($\epsilon_i = 1,92$; $R_i = 0,60$), Версія одеська ($\epsilon_i = 1,21$; $R_i = 0,77$), МІП Відзнака ($\epsilon_i = 1,05$; $R_i = 0,82$) (UKR); Mescal ($\epsilon_i = 0,98$; $R_i = 0,65$) (FRA) та SY Wolf ($\epsilon_i = 0,94$; $R_i = 0,69$) (USA). Встановлено, що у короткостеблених

сортів генотиповий ефект врожайності був у межах від -1,71 до 1,92, а коефіцієнт регресії – від 0,60 до 1,45, що значною мірою позначалося на рівні екологічної пластичності, діапазон суми рангів якої варіював при цьому від 2 до 6. Частка зразків з високими значеннями генотипового ефекту при цьому складала 33,3 %, а з високою стабільністю реалізації урожайності – 41,7 %. Встановлено, що у короткостеблих генотипів пшениці м'якої озимої стійкість до збудників бурого листкової іржі та піренофорозу на значному негативному рівні корелюють із сумою рангів генотипового ефекту і коефіцієнту регресії врожайності – $r = -0,65$, $P < 0,01$ та $r = -0,58$, $P < 0,01$ відповідно. Виділені джерела високих рівнів групової стійкості до збудників піренофорозу та бурого листкової іржі, високого потенціалу та стабільності урожайності є цінним вихідним матеріалом для створення нових та високоперспективних сортів пшениці м'якої озимої адаптивних до стресових умов вирощування у східній частині Лісостепу України

Ключові слова: пшениця м'яка озима, епіфітомії, пластичність, стабільність, генотиповий ефект, адаптивність, урожайність, джерело

Цитування: Yarosh V., Kucherenko Ye.Yu., Riabchun V.K., Kuzmyshyna N.V., Solonechna O.V. *Environmental plasticity of short-stemmed winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and resistance to yellow leaf blotch (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler) and brown (leaf) rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. et Desm.). Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 33-43. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-3>*

Про авторів:

А.В. Ярош – Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН, Національний центр генетичних ресурсів рослин України, просп. Героїв Харкова, 142, м. Харків, 61060, Україна, Jarosh_Andrij@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-6009-4139>

Є.Ю. Кучеренко – Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН, Національний центр генетичних ресурсів рослин України, просп. Героїв Харкова, 142, м. Харків, 61060, Україна, egorkucherenko91@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9313-7385>

В.К. Рябчун – Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН, Національний центр генетичних ресурсів рослин України, просп. Героїв Харкова, 142, м. Харків, 61060, Україна, ncpgru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1855-5114>

Н.В. Кузьмишина – Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН, Національний центр генетичних ресурсів рослин України, просп. Героїв Харкова, 142, м. Харків, 61060, Україна, ncpgru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8046-1760>

О.В. Солонечна – Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН, Національний центр генетичних ресурсів рослин України, просп. Героїв Харкова, 142, м. Харків, 61060, Україна, solonechnaya82@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1525-9501>

Подано до редакції: 08.07.2023 / Прорецензовано: 08.08.2024 / Прийнято до друку: 02.09.2024

... ГЕНЕТИКА ... GENETICS ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-4
УДК: 575.174+314.92

Прізвища українського населення як інструмент популяційно-генетичних досліджень Л.О. Атраментова, В.В. Шуба, М.Ю. Горпинченко

В статті приводяться результати популяційно-генетичного дослідження, виконаного за допомогою прізвищ. Доведено, що українські прізвища відповідають попереднім вимогам, що висуваються до них, як до інструменту популяційно-генетичного дослідження: вони стабільно успадковуються більше десяти поколінь за патрилійним типом; за семантикою і морфологією є найбільш різноманітними у світі; нерівномірно розподіляються по територіях країни, що відрізняються історією, демографічними процесами, антропологічними типами населення, розподілом біологічних маркерів. За коефіцієнтами кореляції між питомою вагою етнічної групи в популяції і числом етнічних прізвищ виявлено прямий зв'язок. Також прямий зв'язок існує між матрицями генетичних відстаней, розрахованих за групами крові, гаплогрупами Y хромосоми і відстанями за прізвищами. Досить сильний зв'язок прізвищ з генетичними маркерами дає підставу для екстраполяції значень, одержаних за допомогою прізвищ, на генофонд населення. Показано розподіл 20 найчастіших прізвищ в різних регіонах. Розраховані показники, які відбивають структуру популяції і генетичні процеси, що в них протікають: індекс ізонімії I_r , показники різноманіття α , інбридингу F_{st} , міграції v , показник упорядкованості H і надмірності розподілу R . Порівняно ці показники між популяціями у географічному і ієрархічному розташуваннях. Індекс ізонімії демонструють чіткий градієнт, що збільшується у напрямку від південного сходу країни до північного заходу. Інші показники також досить чітко змінюють своє значення з південного сходу у західному і північно-західному напрямках. На нижчих рівнях популяційної структури диференційна здатність показників, розрахованих за прізвищами, збільшується. На рівні районних популяцій виявлений ефект засновника, який є аналогом генетичного дрейфу, що особливо чітко демонструє показник індексу місця I_p . Розподіл популяційних показників знаходить пояснення в історичних подіях і демографічних процесах, що мали місце в історії країни.

Ключові слова: українські популяції, прізвища, показники ізонімії, інбридингу, різноманіття, міграції

Цитування: Атраментова Л.О., Шуба В.В., Горпинченко М.Ю. Прізвища українського населення як інструмент популяційно-генетичних досліджень. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 44-49. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-4>

Про авторів:

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

Шуба В.В. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022; Харківський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України, вулиця Ковтуна, 34, Харків, Україна, 61022, shubavladislav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4261-5228>

Горпинченко М.Ю. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, 8.gelios.8@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0362-6300>

Подано до редакції: 20.10.2023 / Прорецензовано: 10.07.2024 / Прийнято до друку: 19.08.2024

Вступ

Інформація щодо структури людських популяцій і процесів, що в них протікають, відноситься до фундаментальних знань, які використовуються у медико-генетичному консультування, при складанні демографічних та епідеміологічних прогнозів тощо. Від структури популяції залежить здоров'я, працездатність населення, його інтелектуальний та культурний потенціал. До недавнього часу територія України була білою плямою на генетико-географічній мапі світу. Генетичні дослідження українських популяцій, започатковані в Харківському національному університеті, заклали підвалини цього напрямку в країні. Продовження досліджень потребує розширення спектра методів. В світовій антропогенетиці при вивченні популяцій вже більш ніж півстоліття використовуються прізвища. Цей зручний фінансово необтяжливий метод дає змогу працювати з великими масивами даних.

Підстави для використання прізвищ як інструменту популяційних досліджень базуються на декількох їх властивостях. Семантика і морфологія прізвища несе відбиток приналежності особи до етносу з його специфічним генофондом; патрилійне успадкування прізвищ нагадує передачу Y хромосоми, матрилійне — передачу мтДНК. Розподіл прізвищ в населенні аналогічний моделі віртуального локусу *прізвище* з множинною системою алельних варіантів, зчепленого з Y хромосомою у народів з патрилійною традицією, або з мтДНК у народів, де приналежність до роду визначається по жіночій лінії. Рідкісні помилки написання або вимови прізвища, як і генні мутації, стабільно успадковуються, а частоти прізвищ аналогічні частотам алелів. Все перелічене за висловленням Н. Мортон за ефективності прізвища як маркерів порівняне з кодомінантною системою.

Прізвища не кожного народу придатні виконувати роль маркерів, для цього вони мають відповідати декільком умовам: стабільно передаватися не менше десяти поколінь, бути достатньо різноманітними, нерівномірно розподілятися по території, маркуючи окремі групи населення, мати зв'язок з біологічними ознаками, бути здатними диференціювати популяції. З'ясувати, чи відповідають прізвища українського населення вимогам, що висуваються до них як інструменту популяційно-генетичних досліджень було метою цього дослідження.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження слугували історичні та етнографічні джерела, дані демографічної статистики, анкети мешканців різних популяцій. Розраховано, прізвища населення України станом на 2001 рік. Використано методичні підходи, розроблені I. Barrai (Barrai, 1992).

Частоти прізвищ розраховані як:

$$q_i = \frac{a_i}{N}$$

де a_i — кількість носіїв i -го прізвища; N — кількість особин у популяції.

Показник випадкової ізонімії I_r розрахований за формулою:

$$I_r = \sum q_i^2$$

Випадкова компонента інбридингу F_{ST} визначалася як:

$$F_{st} = \sum q_i^2 / 4$$

Індекс міграції v розрахований за формулою:

$$v = \frac{1 - I_r}{I_r(N - 1)}$$

Показник різноманітності прізвищ α розрахований за формулою:

$$\alpha = \frac{Nv}{1-v}$$

де N — кількість особин у популяції; v — індекс міграції.

Індекс місця I_p одержано як середнє арифметичне рангів двадцяти найчастіших в популяції прізвищ.

Використано метод багатомірного шкалювання. Генетичні відстані між популяціями розраховані за М. Nei (Nei, 1975).

Результати та обговорення

Перші українські прізвища знаходять в грамотах XVIII століття (Редько, 1966). Це свідчить, що вони успадковуються понад 300 років, тобто протягом не менше 12 поколінь, а за семантикою морфологією українські прізвища є найбільш різноманітними у світі (Редько 1966, 1968). В населенні України було налічено 697 147 прізвищ. Серед вивчених країн більше лише в населенні США — 899 585 прізвищ (Barrai, 2001). Показник їх різноманітності в загальній українській популяції дорівнює $\alpha = 47 \times 10^2$ і є найвищим серед вивчених країн (табл. 1).

Щодо до вимоги нерівномірності розподілу по території, то відомо, що прізвища із суфіксом *-енко* розповсюджені в центрі та на сході країни, прізвища на *-ук*, *-юк*, *-ак*, *-як* поширені на заході (Редько, 1966, 1968). Рис. 1 демонструє розподіл двадцяти найчастіших в Україні прізвищ по п'яти регіонах країни. Ці території мають неоднакову історію (Грушевський, 1990), відрізняються антропологічними типами населення (Сегеда, 2001), розподілом груп крові (Тимошенко, 1978), маркерів мітохондріальної ДНК (Pshenichnov, 2007), гаплогруп Y хромосоми (Utevska, 2015). Наведене свідчить про зв'язок прізвищ з біологічними особливостями населення, з його генофондом, і щоб відобразити цей зв'язок кількісно були обчислені коефіцієнти кореляції між питомою вагою етнічної групи в популяціях і числом відповідних етнічних прізвищ серед ста найчастіших. Між цими

показниками виявлено прямий зв'язок, що описується позитивним коефіцієнтом кореляції Спірмана r_s : для українських прізвищ він дорівнює $r_s = 0,703$, російських $r_s = 0,739$, для «інших» $r_s = 0,393$.

Таблиця 1. Популяційні показники, одержані за прізвищами, в різних країнах
Table 1. Population indicators obtained by surnames in different countries

Популяція	$I_r \times 10^{-4}$	$a \times 10^2$	N	k	Автори
Австрія	2,60	8,54	1 000 000	140 766	Barrai, 2000
Бельгія	2,15	46,46	1 118 004	137 380	Barrai, 2004
Італія	1,71	—	5 100 000	215 623	Barrai, 1999
Німеччина	3,50	28,55	5 150 310	462 526	Rodriguez-Laralde, 1998
Нідерланди	4,20	23,78	2 400 210	126 485	Barrai, 2002
Франція	3,10	42,29	6 000 000	495 104	Scapoli, 2005
Україна	2,13	46,99	46 449 268*	697 147	Горпинченко, 2015
США	3,24	13,66	18 000 000	899 000	Barrai, 2001
Аргентина	11,02	4,22	22 600 000	414 441	Dipierri, 2005
Венесуела	18,00	2,10	3 905 487	68 665	Rodriguez-Laralde, 2000
Болівія	-	1,22	23 244 064	174 922	Rodriguez-Laralde, 2011
Парагвай	66,00	1,51	4 843 868	39 021	Dipierri, 2011
Якутія	23,10	4,33	491 259	44 625	Tarskaia, 2009
Китай	260,00	0,28	1 277 000 000*	7 327	Liu, 2012

Примітка. I_r — індекс ізонімії, a — індекс різноманіття N — чисельність вивчених груп, * — тотальний список, k — кількість прізвищ.

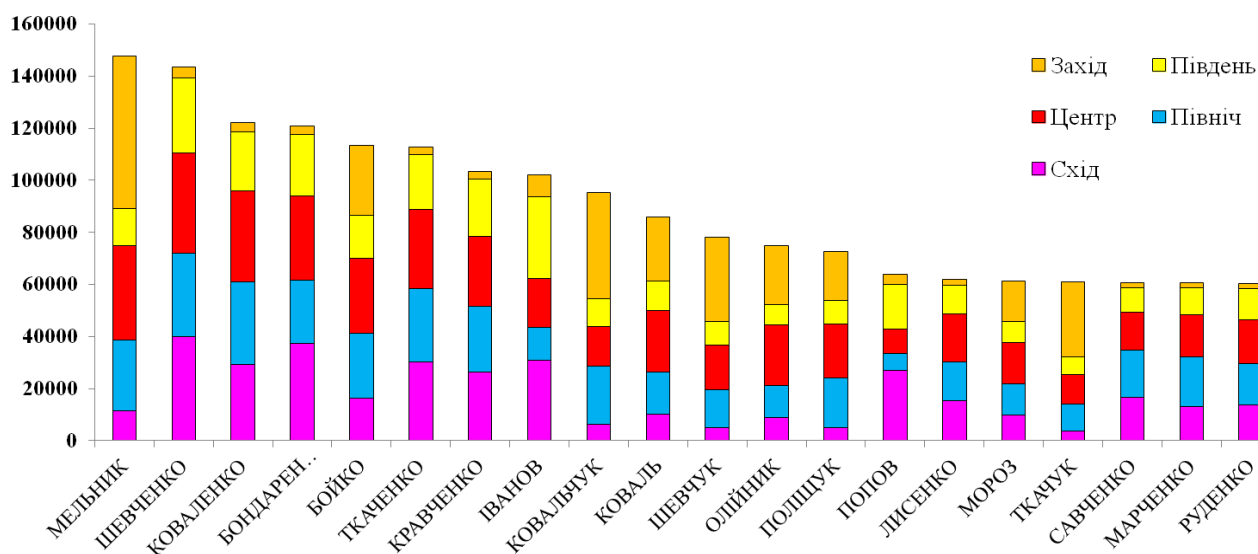


Рис. 1. Розподіл двадцяти найчастіших прізвищ в регіонах України (по вертикалі — кількість носіїв прізвищ)
Fig. 1. Distribution of the twenty most frequent surnames in the regions of Ukraine (vertically - the number of bearers of surnames)

Методом багатовимірного шкалювання одержано найважливіший аргумент для використання українських прізвищ в генетиці — це їх асоціація з біологічними ознаками. Встановлено, що між матрицями генетичних відстаней, розрахованих за групами крові систем АВ0, Rh, гаплогруп Y хромосоми і відстанями, і відстанями, розрахованими за прізвищами, існує зв'язок, що описується коефіцієнтом кореляції (r) становить 0,58–0,60, що співпадає зі значенням такого коефіцієнта в інших

слов'янських популяціях. Можливість українських прізвищ диференціювати популяції була з'ясована при аналізі заздалегідь розрахованих загальноприйнятих показників, за якими порівнювали популяції у горизонтальному (географічно) та вертикальному (ієрархічно) напрямках. Індекс ізонімії — інтегральний показник, що позначає ймовірність випадкового збігу прізвищ у двох членів популяції. Розподіл значень I_r для обласних популяцій демонструють чіткий градієнт, що збільшується у напрямку від південного сходу країни до північного заходу (рис. 2). Інші популяційні показники, розраховані на підставі I_r з використанням чисельності локального населення, також демонструють своєрідні територіально обумовлені градієнти, що заходять логічне пояснення в демографічних процесах, що мали місце в історії. Так показник різноманіття має найбільше значення серед областей України в Криму ($62,3 \times 10^2$) і обумовлений розташуванням місцевості на перетині торговельних шляхів і воєнних конфліктів, що призводили до переміщення великих мас різних народів. Найнижче значення показника різноманіття ($14,0 \times 10^2$) у Волинській області обумовлене особливостями ландшафту (ліси, болота), що перешкоджає міграціям. Саме це відбиває і показник генетичної ефективності міграції, який відбиває стабільність популяції під впливом міграції. Для населення України в цілому він дорівнює $v = 1,0 \times 10^{-4}$. Найбільшого генетичного впливу міграцій зазнало населення південних областей (Крим, Миколаївська та Херсонська області), де значення цього показника варіює в межах $(34,1-38,2) \times 10^{-4}$, а в інших областях в два-п'ять разів нижче. Коефіцієнт інбридингу функціонально пов'язаний з індексом ізонімії ($F_{st} = I_r/4$), тому його розподіл має таких вигляд, як на рис. 2. В цілому для населення України він дорівнює $F_{st} = 5,3 \times 10^{-5}$ з найвищим значенням серед областей в волинській популяції і найнижчим в Криму. Дотичність використання

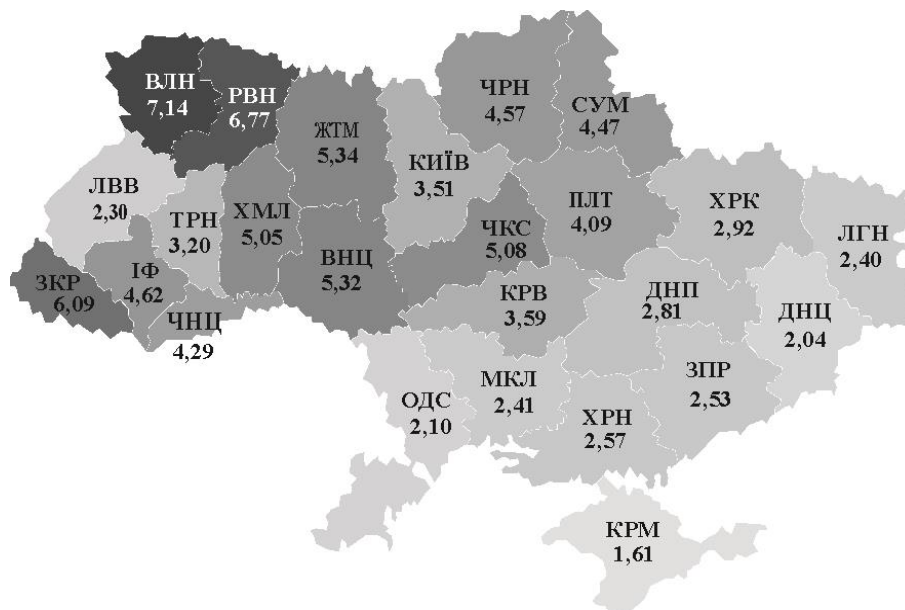


Рис. 2. Розподіл показника ізонімії $I_r (\times 10^2)$ в популяціях обласного рівня

(Позначення областей: ВНЦ — Вінницька, ВЛН — Волинська, ДНП — Дніпропетровська, ДНЦ — Донецька, ЖТМ — Житомирська, ЗКР — Закарпатська, ЗПР — Запорізька, ІФ — Івано-Франківська, КИЇВ — Київська, КРВ — Кіровоградська, КРМ — АР Крим, ЛГН — Луганська, ЛВВ — Львівська, МКЛ — Миколаївська, ОДС — Одеська, ПЛТ — Полтавська, РВН — Рівненська, СУМ — Сумська, ТРН — Тернопільська, ХРК — Харківська, ХРС — Херсонська, ХМЛ — Хмельницька, ЧРС — Черкаська, ЧРЦ — Чернівецька, ЧРН — Чернігівська)

Fig. 2. Distribution of the isonymy indicator $I_r (\times 10^2)$ in populations at the regional level

(Region designations: ВНЦ — Vinnytsia, ВЛН — Volyn, ДНП — Dnipropetrovsk, ДНЦ — Donetsk, ЖТМ — Zhytomyr, ЗКР — Zakarpattia, ЗПР — Zaporizhzhya, ІФ — Ivano-Frankivsk, КИЇВ — Kyiv, КРВ — Kirovohrad, КРМ — AR Crimea, ЛГН — Luhansk, ЛВВ — Lviv, МКЛ — Mykolaiv, ОДС — Odesa, ПЛТ — Poltava, РВН — Rivne, СУМ — Sumy, ТРН — Ternopil, ХРК — Kharkiv, ХРС — Kherson, ХМЛ — Khmelnytsky, ЧРС — Cherkasy, ЧРЦ — Chernivtsi, ЧРН — Chernihiv)

прізвищ для розрахунку інбридингу доведена також тим, що між F_{st} і чисельністю населення в районах існує зворотний зв'язок, відображений від'ємним коефіцієнтом кореляції ($r = -0,38$ в Одеській і $r = -0,80$ в Полтавській області).

Індекс місця I_p , обчислений за прізвищами, є аналогом генетичної відстані між популяціями. Він розраховується як середній ранг найбільш поширених прізвищ в популяціях, що порівнюються.

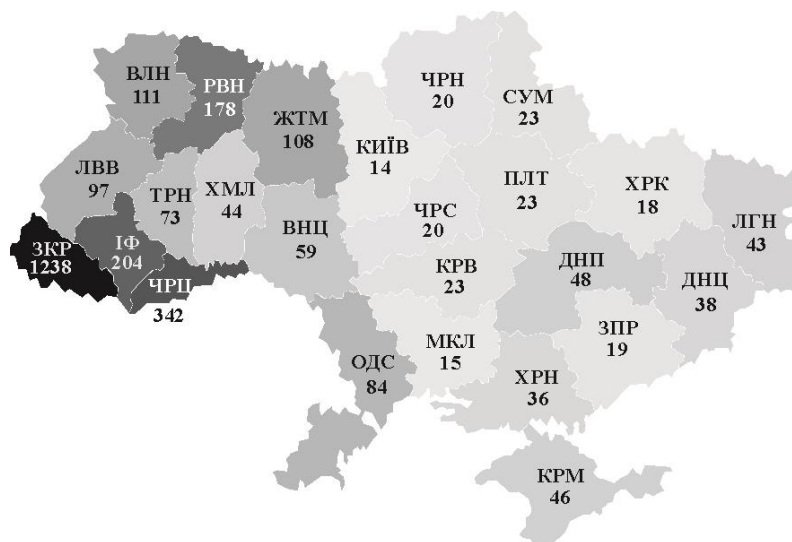


Рис. 3. Розподіл показника I_{20} по областях. Позначення як на рис. 2
Fig. 3. Distribution of the I_{20} indicator by regions. Designation as in Fig. 2

Середній індекс місця, розрахований за двадцятьма прізвищами для всієї України дорівнює $I_{20} = 10,5$. Близьче всіх до цього значення знаходиться київська обласна популяція ($I_{20} = 14$, рис. 3). У напрямку до кордонів значення індексу збільшується, особливо у західному напрямку, досягаючи відстані $I_{20} = 1238$ для закарпатської популяції. На рис. 3 вимальовується картина, що пояснюється подіями, які мали місце в минулому: знаходженню західної і східної частин України у складі різних імперій, західної в Австро-Угорській, східної у Російській. Встановлено, що роздільна здатність популяційних показників підвищується на нижчих ступенях популяційної ієрархії. Так, на обласному рівні чіткіше ніж на регіональному, спостерігається розподіл популяційних показників, який пояснюється глобальними історичними подіями. На районному рівні спостерігається явище, аналогічне дрейфу генів — ефект засновника. Він проявляється у величезній відстані між районними популяціями, що межують. Завдяки цьому мапи областей мають мозаїчний вигляд. Наслідком ефекту засновника служать приклади того, що в деяких областях дуже поширені прізвища, що є надзвичайно рідкісними в країні в цілому.

Досить сильний зв'язок прізвищ з генетичними маркерами дає підставу для екстраполяції значень, одержаних за допомогою прізвищ, на генофонд населення. Зокрема високе різноманіття прізвищ з великою ймовірністю свідчить про існування відповідного генетичного різноманіття, що забезпечує стійкість популяцій в екстремальних умовах, що постійно змінюються. Розподіл прізвищ, що відображується у популяційних показниках дає змогу уточнити історію окремих популяцій, орієнтувати демографів і медичних генетиків на локалітети з загрозливим станом для своєчасного вживання заходів для протидії негативних наслідків, а одержані популяційні показники служать точками у подальших дослідженнях.

Список літератури / References

- Грушевський М. Ілюстрована історія України — Репр. відтворення вид. 1913 р. — Київ, 1990. — 524 с. / Hrushevsky M. Illustrated history of Ukraine — repr. Interpretation of vol. 1913. — Kyiv, 1990. — 524 p.
- Редько Ю. К. Довідник українських прізвищ. / За редакцією кандидата філологічних наук Івана Варченка. Київ, 1968. 256 с. / Redko Y.K. (1968) Directory of Ukrainian surnames. Kiev : Naukova dumka. 256 p.
- Редько Ю. К. Сучасні українські прізвища. Київ, 1966. 216 с. / Redko Y.K. Modern Ukrainian surnames. Kiev : Naukova dumka, 1966 216 p. /

- Сегеда С. Антропология: Навч. посібник. Київ : Либідь, 2001. 336 с. / *Seheda S. (2001) Anthropology: Education. manual. Kyiv : Lybid. 336 p.*
- Barrai I., Cavalli-Sforza L. L., Moroni A. Isonymy structure of USA population // *Am J Phys Anthropol.* 2001. V. 114, № 2. P. 109–123. [https://doi.org/10.1002/1096-8644\(200102\)114:2<109::AID-AJPA1011>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1096-8644(200102)114:2<109::AID-AJPA1011>3.0.CO;2-I)
- Barrai I., Formica G., Scapoli C. et al. Microevolution in Ferrara: Isonymy 1890–1990 // *Annals of Human Biology.* 1992. V.19, № 4. P. 371–385. <https://doi.org/10.1080/03014469200002242>
- Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution.* North-Holland American Elsevier. 1975. 288 p.
- Pshenichnov A., Balanovska E., Balanovsky O. et al. Variation of paternal, maternal and autosomal genetic markers on intra-ethnic (Ukrainians) and inter-ethnic (Europe) level supports Y chromosomal marker bias // *International Society for Applied Biological Sciences. Split.* 2007. P.128.
- Timoshenko L. I., Lavrovskaya L. N. (1978) Allocation of erythrocyte antigens and protein factors of blood among the population of some genogeographic zones of the Ukrainian SSR. *Cytology and Genetics.* V. 12, № 6. P. 535–40.
- Utevska O. M., Pshenichnov A. S., Dibirova Kh. D., Rootsi S., Agdzhoyan A. T., Churnosov M. I., Balanovska E. V., Atramentova L. A. Balanovsky O. P. Gene Pool Similarities and Differences between Ukrainians and Russians of Slobozhanshchina Based on Y-Chromosome Data // *Cytology and Genetics.* 2015. V. 49, № 4. P. 245–253. <https://doi.org/10.3103/S0095452715040106>

Surnames of the ukrainian population as a tool of population and genetic research

L.O. Atramentova, V.V. Shuba, M.Yu. Gorpichenko

The article presents the results of population genetic research, Execution with the help of surnames. It is proved that Ukrainian surnames meet the previous requirements for them as a tool of population genetic research: the stench is stably inherited for more than ten generations by patrilineal type; semantics and morphology are the most diverse in the world; unevenly distributed throughout the country, differing in history, demographic processes, anthropological types of population, the distribution of biological markers. According to the correlation coefficients between the weight of the ethnic group in the population and the number of ethnic surnames, a direct connection was found. There is also a direct link between the matrix of genetic distances calculated by blood groups, haplogroups of the Y chromosome and distances by surnames. A rather strong connection of surnames with genetic markers provides a basis for extrapolating the values obtained with the help of surnames to the gene pool of the population. The distribution of the 20 most frequent surnames in different regions is shown. Calculated indicators that reflect the structure of the population and the genetic processes that take place in them: index of isonymy I_r , diversity α , inbreeding F_{st} , migration v , order H and redundancy distribution R . These indicators are compared between populations in geographical and hierarchical location. The isonymy index shows a clear gradient that increases in the direction from the southeast to the northwest. Other indicators also change their value quite clearly from the South-East to the North-West directions. At lower levels of the population structure, the differential ability of indicators calculated by surnames increases. At the level of district populations, Identifying the founder's effect is analogous to genetic drift, which is particularly clearly demonstrated by the index of the place I_p . The distribution of population indicators is explained by historical events and demographic processes that have taken place in the history of the country.

Key words: *Ukrainian populations, surnames, indicators of isonymy, inbreeding, diversity, migrations*

Cite this article: Atramentova L.O., Shuba V.V., Gorpichenko M.Yu. (2024). *Surnames of the ukrainian population as a tool of population and genetic research. The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 42-47. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-4> (in Ukrainian)

About the authors:

Atramentova L.O. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, lubov.atramentova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7143-9411>

Shuba V.V. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, Kharkiv, Ukraine, 61022; Kharkiv Research Expert Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine, Kovtuna Street, 34, Kharkiv, Ukraine, 61022, shubavladislav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4261-5228>

Gorpichenko M.Yu. – Kharkiv National University named after V. N. Karazin, Svobody Maidan, 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, 8.gelios.8@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0362-6300>

Received: 20.10.2023 / Revised: 10.07.2024 / Accepted: 19.08.2024

... ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ... ZOOLOGY AND ECOLOGY ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-5
UDC: 574+595

***Schistosoma japonicum* complex: COI-sequences variations of parasites and their intermediate hosts analyzed using BLAST** M.L. Nelwan

In this research, I report on the relationship between *S. ovuncatum*, *S. sinensium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, and *S. malayensis*. In addition, I also report on the relationship between five species of *Oncomelania* and *Neotricula aperta*, *Robertsiella* spp, and *Tricula* spp. Furthermore, I describe the formation of the genus *Oncomelania* from its predecessor forms. The results of nucleotide BLAST showed that *S. japonicum* shares 99.45% identity with *S. malayensis*, 98.77% identity with *S. mekongi*, 98.07% identity with *S. sinensium*, and 97.85% identity with *S. ovuncatum*. In addition, the sequence of *S. malayensis* shares 100% identity with *S. mekongi*. The E value is less than 0.01. There was no amino acid replacement in the alignment results of the *S. japonicum* complex. There are no base substitution in *S. malayensis* and *S. mekongi*, 37 base substitutions in *S. malayensis* and *S. sinensium*, ten base substitutions in *S. malayensis* and *S. japonicum*, five base substitutions in *S. malayensis* and *S. ovuncatum*. The tree-view slanted cladogram showed that *S. sinensium* is a sister to *S. ovuncatum*. It split into *S. japonicum*. *Schistosoma japonicum* splits into *S. mekongi* and *S. malayensis*. The results also showed that *Oncomelania robertsoni* shares 86.12% identity with *Neotricula aperta*, 85.88% identity with *Robertsiella* spp., and 85.28% identity with *Tricula bollingi*. The E value is less than 0.01. There are two amino acid replacements in *O. robertsoni* and *N. aperta* alignments, four amino acid replacements and 84 base substitutions in *O. robertsoni* and *Robertsiella*, and two amino acid replacements and 88 base substitutions in *O. robertsoni* and *T. bolingi*. The tree-view slanted cladogram showed that *Tricula* spp. split into *N. aperta* and *Robertsiella* spp. This study showed that *Oncomelania* rose from its predecessor forms. Nucleotide BLAST results showed that *S. ovuncatum* is close to *S. sinensium*. *Schistosoma sinensium* split into *S. japonicum*, *S. mekongi*, and *S. malayensis*. *Oncomelania robertsoni* was close to *N. aperta* than to *Robertsiella* spp., and then *Tricula* spp. (*Tricula bollingi*). *Oncomelania* species emerged from their predecessor forms.

Key words: *Schistosoma japonicum* complex, *Neotricula aperta*, *Oncomelania*, *Oncomelania lorelindoensis*, schistosomiasis, *Robertsiella* spp., *Tricula* spp.

Cite this article: Nelwan M.L. (2024). *Schistosoma japonicum* complex: COI-sequences variations of parasites and their intermediate hosts analyzed using BLAST. The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology, 43, p. 50-65. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-5>

About the author:

M.L. Nelwan – Animal Science – Other, Nelwan Institution for Human Resource Development, Palu, Central Sulawesi, Indonesia; mlnelwan2@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6367-828X>

Received: 10.06.2024 / Revised: 14.09.2024 / Accepted: 27.10.2024

Introduction

Blood flukes of the genus *Schistosoma* cause schistosomiasis infections in animals and humans. The genus *Schistosoma* infects approximately 220 to 230 million people (Sanchez et al., 2021). Schistosomiasis causes 24,072 to 200,000 deaths annually, and 779 million people are at risk. In addition, it causes a world burden of 3.3 million disability-adjusted life years (Nelwan, 2022). It is one of the main parasitic diseases that are important for public health in tropical and sub tropical countries (Orpin et al., 2022). The disease can spread through water-based development projects, immigration, and travel or tourism (Nelwan, 2019). It occurs in Africa, Asia, South America, and several Caribbean islands (Haggag et al., 2019; Neves et al., 2015). It can also occur in non developing countries such as France (Rothe et al., 2021).

Five *Schistosoma* species occur in the Far East: *Schistosoma japonicum*, *S. malayensis*, *S. mekongi*, *S. ovuncatum*, and *S. sinensium* (Wang et al., 2021). Three of them can cause human schistosomiasis: *Schistosoma japonicum*, *S. malayensis*, and *S. mekongi* (Al-Olayan et al., 2016; Gordon et al., 2019). *Schistosoma japonicum* occurs in East Asia and Southeast Asia, i.e., China, Indonesia, and the Philippines (Budiono et al., 2020). *Schistosoma malayensis* occurs in Malaysia, and *S. mekongi* occurs in Cambodia and Laos (Gordon et al., 2019).

Latif et al. (2013) showed that *S. malayensis* is approximately 10% different from *S. mekongi* and approximately 25% different from *S. japonicum* genetically (Latif et al., 2013), suggesting that *S. malayensis* has a closer family relationship with *S. mekongi* than with *S. japonicum*. *Schistosoma ovuncatum* occurs in Thailand. *Schistosoma sinensium* occurs in China and Thailand. *Schistosoma sinensium* can infect rodents, rabbits, and tree shrews (Wang et al., 2021). *Schistosoma ovuncatum* can infect rodents, rats, and *Tricula bollingi* (Inceboz, 2022).

The *Schistosoma japonicum* complex life cycle requires two hosts: a definitive host and an intermediate host. Sexual or asexual reproduction occurs in these parasites. Sexual reproduction occurs in mammals (Nelwan, 2022) or nonmammal hosts (Brant and Loker, 2005; Walker, 2011; Budiono et al., 2019). Mammals can include cattle, dogs, horses, and humans (Budiono et al., 2019). Schistosomes can infect birds (Brant and Loker, 2005; Walker, 2011), suggesting that schistosomes may infect mammals and nonmammals. Mouahid et al. (2018) stated that cercariae enter specific host skin, forming schistosomula, grow into schistosomes and adult worms, mate, and produce eggs. Definitive hosts release eggs into the external environment through feces. In fresh water, these eggs form miracidia, hatch, and infect an intermediate host, the *Oncomelania* snail. Inside the snail, this develops into a mother sporocyst and then produces daughter sporocysts. Daughter sporocysts produce either cercariae or more daughter sporocysts (Mouahid et al., 2018). Asexual reproduction occurs in intermediate hosts (Nelwan, 2019).

For intermediate hosts, *Schistosoma malayensis* infects *Robertsia* spp. snails (Gordon et al., 2019). *Schistosoma mekongi* infects *Neotricula aperta* snails (Attwood et al., 2019). *Schistosoma ovuncatum* and *S. sinensium* infect *Tricula* spp. snails (Wang et al., 2021). *Schistosoma japonicum* infects the genus *Oncomelania*: *Oncomelania hupensis* (Fang et al., 2022), *O. lorelindoensis*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi* (Nelwan, 2022; ZooBank, 2022). My sequence results showed that *Oncomelania hupensis* differs from *Robertsia* spp. by approximately 16% and from *Neotricula aperta* by approximately 15%, suggesting that *O. hupensis* has a closer relationship to *Neotricula aperta* than to *Robertsia* spp.

The study of the evolution of the genus *Schistosoma* (Lawton et al., 2011) and the evolution of their intermediate hosts, especially the genus *Oncomelania* (Nelwan, 2022), has been an area of major debate and research (Lawton et al., 2011). Latif et al. (2013) showed the relatedness between *S. japonicum*, *S. malayensis*, and *S. mekongi* (Latif et al., 2013). However, this explanation still requires further information regarding the relatedness. In addition, the relatedness of the five *Oncomelania* species isolates and *Neotricula aperta*, *Robertsia* sp. and *Tricula* sp. does not yet have a detailed explanation. More information is needed regarding, for example, the percentage of the relationship between *Oncomelania* and *N. aperta*. In addition, Carney et al. discovered the intermediate host of Sulawesi *S. japonicum* in Lindu Valley in 1971 and named it *Oncomelania hupensis linduensis* (Sudomo, 1983). This means that both of them admit that Sulawesi *Oncomelania* originates from China. My sequences show that Sulawesi *Oncomelania* originated from its antecedent form, i.e., proto-*Oncomelania lorelindoensis* in Sulawesi, the eastern part of Indonesia. It is beyond the *O. hupensis* group.

In this paper, I report on the relatedness between *S. japonicum*, *S. malayensis*, *S. mekongi*, *S. ovuncatum*, and *S. sinensium*. I also report on the relationship between five *Oncomelania* species, *Neotricula aperta*, *Robertsia* spp. and *Tricula* spp. Moreover, I describe the development of the genus *Oncomelania* from its antecedent form.

Materials and Methods

In this study, I used the nucleotide NCBI BLAST to assess similar identity using two or more alignments and tree views of Asian *Schistosoma* and its intermediate hosts. The NCBI BLAST sequences are reliable for carrying out analyses of the relatedness of Asian *Schistosoma* isolates and the relatedness of its intermediate host isolates.

I used nucleotide BLAST for two or more alignments to obtain accession numbers, E values, identity percentages, and query cover percentages. The sequences used in this study were all from GenBank for the *S. japonicum* complex and its intermediate hosts. The nucleotide BLASTs were performed with the nucleotide NCBI BLAST. For query cover, if the first BLAST (megablast) was nonsignificant, I performed BLAST for somewhat similar sequences (blastn) (Nelwan, 2022). These data were used for a tree-view slanted cladogram of Asian *Schistosoma* spp. and their intermediate hosts. These intermediate hosts include *Neotricula aperta*, *Oncomelania*, and *Robertsia* sp.

To see how the sequences might differ, I used pairwise dots for identities and the coding sequence (CDS) feature from the NCBI. For the sequence differences, from the nucleotide blast results, go to the Alignments tab, and in the Alignment view drop-down menu, select Pairwise with dots for identities, and then

click the checkbox next to the CDS feature. In the results, there are four lines. The top line is a query sequence containing amino acid translation. The second line comprises bases where the subject sequence is identical to the query sequence and is replaced by dots. Bases where the subject sequence differs from the query sequence appear in the third line as A, C, G, or T. The fourth line shows the amino acid translation for the subject sequence. I used the alignment results to count total base substitutions in the third line and total amino acid replacements in the fourth line. The CDS feature is good for comparing the relatedness of taxa.

Creation of the tree-view slanted cladogram was as follows: First, from the nucleotide NCBI BLAST results go to the Description tab and click the Distance Tree of the Results links. Second, in the rectangle tree, go to the menu Tools > Layout and select slanted cladogram (Nelwan, 2022; Smith, 2023). Rectangle cladogram from NCBI is comparable to rectangle cladogram from PhyML (Nelwan, 2023).

Nucleotide BLAST on the *Schistosoma japonicum* complex

For the nucleotide BLAST on the *S. japonicum* complex, I accessed the reference sequence from GenBank at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). For the *S. japonicum* complex, I used 18S for analysis. I performed a megablast analysis of these data. Data include accession numbers and locations (Table 1).

Table 1. Data used in locus 18S of *Schistosoma japonicum* complex

Species	accession	location
<i>S. japonicum</i>	AY157226.1	Philippines, Southeast Asia
<i>S. malayensis</i>	AY157227.1	Malaysia, Southeast Asia
<i>S. mekongi</i>	AF465928.1	Laos, Southeast Asia
<i>S. ovuncatum</i>	AF465929.1	Thailand, Southeast Asia
<i>S. sinensium</i>	AY157225.1	China, East Asia
<i>S.: Schistosoma</i>		

Nucleotide BLAST results were used to show relatedness between species in the *Schistosoma japonicum* complex. The results were also used to show identity similarity percentage, difference of amino acids if any, difference of genetic code (bases), and tree relationships in evolution.

Nucleotide BLAST on intermediate hosts of the *Schistosoma japonicum* complex

For nucleotide BLAST on intermediate hosts, I accessed the reference sequence from GenBank at NCBI that originated from sources such as Attwood et al. (2015) and Kameda and Kato (2011). The source is the cox1 locus (CO1) and the megablast. Data included accession numbers and their locations (Table 2).

Table 2. Data used in locus COI for intermediate hosts of *Schistosoma japonicum* complex

Species	accession	location
<i>Oncomelania minima</i>	AB611791.1	Japan, East Asia
<i>Neotricula aperta</i>	AF531541.1	Laos, Southeast Asia
<i>Robertsia</i> spp.	AF531550.1	Malaysia, Southeast Asia
<i>Oncomelania robertsoni</i>	KR002675.1	China, East Asia
<i>Tricula bollingi</i>	AF531553.1	Thailand, Southeast Asia
<i>Oncomelania hupensis</i>	GU367391.1	China, East Asia
<i>Oncomelania quadrasi</i>	DQ112287.1	Philippines, Southeast Asia

Nucleotide BLAST results were used to show a relationship between the intermediate hosts of the *Schistosoma japonicum* complex. The results were also used to show identity percentage, difference of amino acids if any, difference of bases, and tree relationships in evolution.

Megablast on *Oncomelania hupensis*

For the megablast on *O. hupensis*, I accessed the reference sequence from GenBank at NCBI. Data included accession numbers (Table 3).

Megablast results showed a relationship between *O. hupensis*, *O. hupensis hupensis*, *O. hupensis nosophora*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi*. The results were also used to compare different amino acids, different bases, and tree relationships in evolution. These data were obtained by performing a megablast of *O. hupensis* NC_013073.

Table 3. Data used on *Oncomelania hupensis* megacblast

Species	accession	location
<i>Oncomelania hupensis</i>	NC_013073.1	China, East Asia
<i>Oncomelania h. hupensis</i>	JF284688.1	China, East Asia
<i>Oncomelania h. hupensis</i>	JF284690.1	China, East Asia
<i>Oncomelania h. hupensis</i>	JF284692.1	China, East Asia
<i>Oncomelania robertsoni</i>	JF284697.1	China, East Asia
<i>Oncomelania quadrasi</i>	JF284698.1**	Philippines, Southeast Asia
<i>Oncomelania h. nosophora</i>	LC276225.1	Japan, East Asia
<i>Oncomelania h. nosophora</i>	LC2766.1	Japan, East Asia
<i>Oncomelania robertsoni</i>	EU079378.1	China, East Asia
<i>Oncomelania robertsoni</i>	LC276228.1	China, East Asia
<i>Oncomelania quadrasi</i>	LC276227.1	Philippines, Southeast Asia

h.: *hupensis*

Results

Percent sequence identity of the *Schistosoma japonicum* complex

Nucleotide BLAST, which is a megablast, showed that Philippines *S. japonicum* shares an identity of 99.45% with Malaysia *S. malayensis*, 98.77% identity with Laos *S. mekongi*, 98.07% identity similarity with China *S. sinensium*, and 97.85 identities with Thailand *S. ovuncatum*. E values are 0.0 for Malaysia *S. malayensis* and China *S. sinensium*, 1e-167 for Laos *S. mekongi*, and 1e-162 for Thailand *S. ovuncatum* (Table 4 and Figure 1). Moreover, the sequence of Malaysia *S. malayensis* shares 100% identity with Laos *S. mekongi*.

There was no amino acid replacement in the alignment results. In addition, there were no base substitutions in the alignments of Malaysia *S. malayensis*, Laos *S. mekongi*, Philippines *S. japonicum*, China *S. sinensium*, and Thailand *S. ovuncatum*. In Malaysia *S. malayensis* and Laos *S. mekongi*, there are no base substitutions (247/247 = 100%), 37 base substitutions (242/247 = 98%) in Malaysia *S. malayensis* and China *S. sinensium*, and ten base substitutions (1792/1802 = 99%) in Malaysia *S. malayensis* and Philippines *S. japonicum*, five base substitutions (242/247 = 98%) in Malaysia *S. malayensis* AY157227.1 and Thailand *S. ovuncatum*.

Percent sequence identity of intermediate hosts of the *Schistosoma japonicum* complex

The megablast results showed that Japan *O. minima* shares 82-85% identity with all the listed species. In addition, China *O. hupensis* shares 82-84% with all the listed species. All the E values are < 0.01 (Table 5, Figure 2, and Figure S).

There were amino acid replacements and base substitutions in the alignments of *O. robertsoni*, *Neotricula aperta*, *Robertsiella*, and *Tricula bollingi*. In the China *O. robertsoni* and Laos *N. aperta* alignments, there are two amino acid replacements and 83 base substitutions (515/598 = 86%), four amino acid replacements and 84 base substitutions (511/595 = 86%) in China *O. robertsoni* and Malaysia *Robertsiella*, and two amino acid replacements and 88 base substitutions (510/598 = 85%) in China *O. robertsoni* and Thailand *T. bollingi*.

Percent sequence identity of *Oncomelania hupensis*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi*

The megablast results showed that China *O. hupensis* shares 95-98% identity with all China *O. hupensis hupensis* and all Japan *O. hupensis nosophora*, indicating both are subspecies of China *O. hupensis*. The percentage is more than 95%. It also shares 89-91% identity with all Philippines *O. quadrasi* and all China *O. robertsoni*), indicating both are beyond *O. hupensis* group. All the E-values equal to 0.0 (Table 6 and Figure 3).

In this study, it was taken alignment results between China *O. hupensis* and Philippines *O. quadrasi*, China *O. robertsoni* and China *O. hupensis*, and China *O. robertsoni* and Philippines *O. quadrasi*. In the China *O. hupensis* and Philippines *O. quadrasi* alignments, there are 153 amino acid replacements and 1596 base substitutions (13599/15195 = 89%). In the China *O. robertsoni* and China *O. hupensis* alignments, there are 173 amino acid replacements and 1569 base substitutions (13636/15205 = 90%). In

the China *O. robertsoni* and Philippines *O. quadrasi* alignments, there are 170 amino acid replacements and 1675 base substitutions (13527/15202 = 89%).

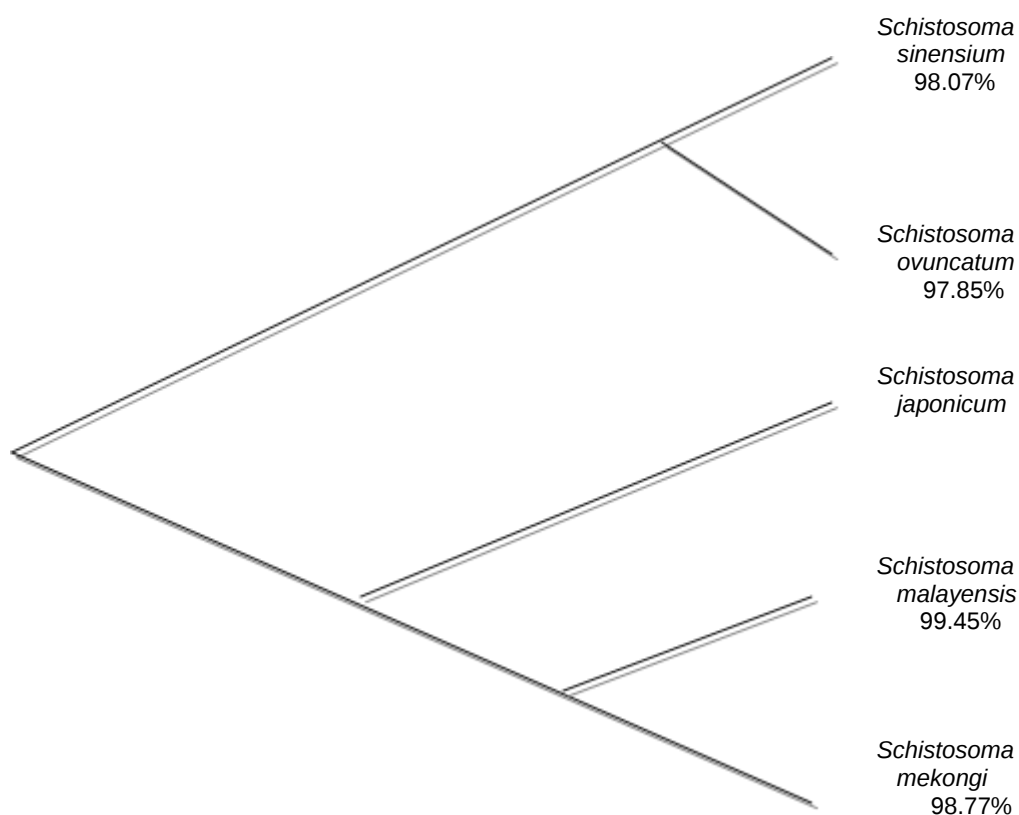


Figure 1. BLAST tree views slanted cladogram of Asian *Schistosoma* spp. Relatedness of Asian *Schistosoma*: *S. ovuncatum*, *S. sinensium*, *S. japonicum*, *S. japonicum*, *S. malayensis*, and *S. mekongi* with their percentages, respectively. *Schistosoma ovuncatum* and *S. sinensium* form their own branches in one group. *Schistosoma japonicum*, *S. mekongi*, and *S. malayensis* form branches in another group. Modified from NCBI BLAST pairwise alignment.

Table 4. Sequences analysis in locus 18S of *Schistosoma japonicum* complex

Species	Accession	E value	<i>S. japonicum</i> AY157226.1
<i>S. malayensis</i>	AY157227.1	0.0	99.45%
<i>S. mekongi</i>	AF465928.1	1e-167	98.77%
<i>S. sinensium</i>	AY157225.1	0.0	98.07%
<i>S. ovuncatum</i>	AF465929.1	1e-162	97.85%
Species	Accession	E value	<i>S. malayensis</i> AY157227.1
<i>S. mekongi</i>	AF465928.1	2e-131	100%
<i>S. japonicum</i>	AY157226.1	0.0	99.45%
<i>S. ovuncatum</i>	AF465929.1	1e-122	97.98%
<i>S. sinensium</i>	AY157225.1	0.0	97.92%

S.: *Schistosoma*

Table 5. Intermediate hosts of *Schistosoma japonicum* complex

Species			<i>Oncomelania minima</i>
			AB611791.1
<i>Neotricula aperta</i>	AF531541.1	0.0	85.43%
<i>Robertsiella</i> spp.	AF531550.1	3e-169	84.64%
<i>Oncomelania robertsoni</i>	KR002675.1	3e-169	84.62%
<i>Tricula bollingi</i>	AF531553.1	3e-164	83.75%
<i>Oncomelania hupensis</i>	GU367391.1	9e-160	82.44%
<i>Oncomelania quadrasi</i>	DQ112287.1	3e-169	82.23%
Species			<i>Oncomelania hupensis</i>
			GU367391.1
<i>Neotricula aperta</i>	AF531541.1	0.0	84.62%
<i>Robertsiella</i> spp.	AF531550.1	0.0	84.08%
<i>Tricula bollingi</i>	AF531553.1	1e-179	82.78%
Species			<i>Oncomelania robertsoni</i>
			KR002675.1
<i>Neotricula aperta</i>	AF531541.1	0.0	86.12%
<i>Robertsiella</i> spp.	AF531550.1	0.0	85.88%
<i>Tricula bollingi</i>	AF531553.1	1e-180	85.28%
Species			<i>Oncomelania quadrasi</i>
			DQ112287.1
<i>Neotricula aperta</i>	AF531541.1	0.0	83.39%
<i>Robertsiella</i> spp.	AF531550.1	0.0	83.56%
<i>Tricula bollingi</i>	AF531553.1	8e-176	82.38%

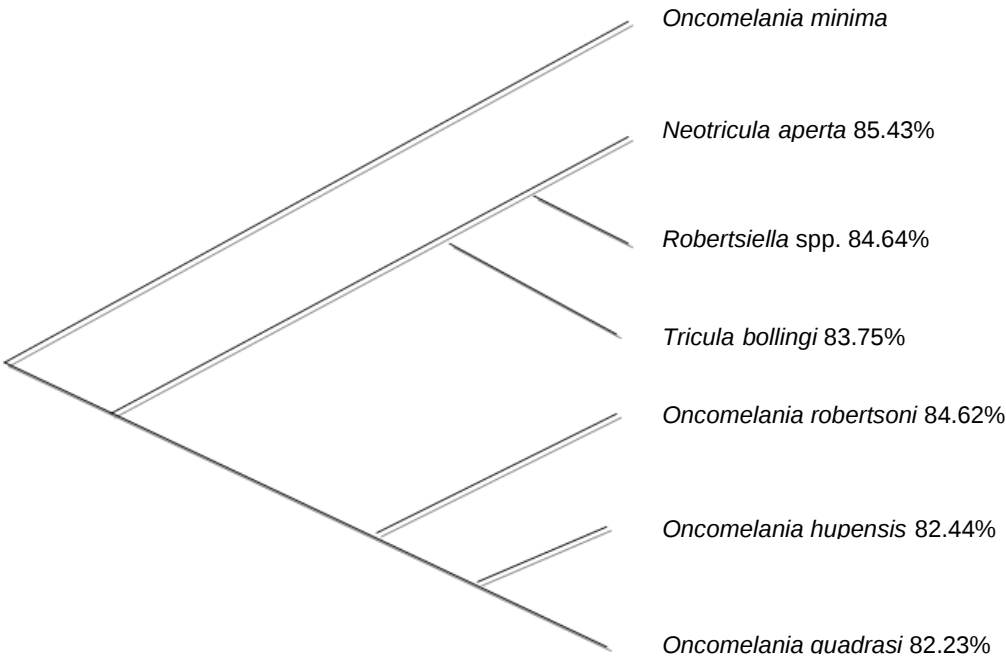


Figure 2. BLAST tree view slanted cladogram of Asian snails (modified from NCBI BLAST pairwise alignment). Asian schistosomiasis intermediate hosts: *O. hupensis*, *O. lorelindoensis*, *O. robertsoni*, *O. quadrasi*, *N. aperta*, *Robertsiella* spp, and *Tricula* spp. *Oncomelania hupensis*, *O. minima*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi* (*Pomatiopsinae*) form branches in a group, respectively. *Neotricula aperta*, *Robertsiella* spp. and *T. bollingi* (*Triculinae*) form their branches in another group. *Pomatiopsinae* and *Triculinae* were derived from the common ancestor (*Pomatiopsidae*).

Table 6. Megablast results on *Oncomelania hupensis*

Species	Accession	E value	<i>O. hupensis</i> NC_013073.1
<i>O. h. hupensis</i>	JF284692.1	0.0	98.00%
<i>O. h. hupensis</i>	JF284688.1	0.0	97.80%
<i>O. h. hupensis</i>	JF284690.1	0.0	97.68%
<i>O. h. nosophora</i>	LC276225.1	0.0	95.44%
<i>O. h. nosophora</i>	LC276226.1	0.0	95.37%
<i>O. h. quadrasi</i>	LC276227.1	0.0	91.06%
<i>O. robertsoni</i>	LC276228.1	0.0	90.13%
<i>O. robertsoni</i>	JF284697.1*	0.0	90.06%
<i>O. robertsoni</i>	EU079378.1	0.0	89.68%
<i>O. quadrasi</i>	JF284698.1	0.0	89.50%
Species	Accession	E value	<i>O. robertsoni</i> EU079378.1
<i>O. robertsoni</i>	LC276228.1	0.0	94.04%
<i>O. robertsoni</i>	JF284697.1*	0.0	93.38%
<i>O. hupensis</i>	NC_013073.1	0.0	89.68%
<i>O. quadrasi</i>	LC276227.1	0.0	88.98%
<i>O. quadrasi</i>	JF284698.1**	0.0	88.50%

O.: *Oncomelania*; *h.*: *hupensis*;

* Attwood et al. (2015)

** Incorrectly listed as *Oncomelania hupensis hupensis* on GenBank (Attwood et al., 2015)

Discussion

Many theories about the origin of the genus *Schistosoma* of African or Asian origin have been stated and developed with their respective arguments (Lawton et al., 2011). Davis (1992) introduced the idea that the genus *Schistosoma* arose before the split of Gondwanaland more than 150 million years ago (Ma) and had begun exploiting pulmonate and pomatiopsid snails, whose fossil records suggest a Gondwanan origin (Sady et al., 2015). This theory implies that the dispersal of the genus *Schistosoma* was due to continental drift and that the Asian ancestor of the schistosomes was carried across to Asia when India separated from Africa and moved forward in Asia 70-148 Ma, generating the *S. indicum* and *S. japonicum* complex (Lawton et al., 2011).

The hypothesis "out of Asia" is the most commonly accepted hypothesis for the spread of schistosomiasis. This hypothesis suggests a migration followed by the dispersion of schistosomiasis from Asia to Africa (Nahum et al., 2012). The Asian schistosome ancestor may have originally had a pomatiopsid or a pulmonate snail host. Snyder and Loker (2000) suggest that the schistosome colonized Africa approximately 15-20 Ma (Au et al., 2023). Following the invasion of the African continent, the parasites evolved to exploit pulmonate snails exclusively, thereby developing a more specialized host range (Lawton et al., 2011).

Modern genetic analysis shows that the genus *Schistosoma* originates from Asia (Lawton et al., 2011). This parasite has at least two descendants, invading the African continent independently. In Africa, these descendants are easily radiated, parasitizing exclusively planorbisid snails. Back in Asia, the parasites diversified into a group of species characterized by the absence of an egg spoke (Nahum et al., 2012). The genus *Schistosoma* is split into six clades, which correlate with the different geographical distributions of the parasites. The genus forms the *S. japonicum* complex. It comprises *S. japonicum*, *S. malayensis*, *S. mekongi*, *S. ovuncatum*, and *S. sinensium* (Lawton et al., 2011). *Schistosoma japonicum* and subsequently *S. mekongi* diverged from antecedents resembling *S. sinensium*. *Schistosoma sinensium* is a relative of *S. ovuncatum*. It occurred in northern India, northwest Thailand, and southern China (Wang et al., 2021). In this study, it is revealed that *S. ovuncatum* diverged into *S. sinensium* and Asian human *Schistosoma*. Percent sequence identity and E values support this finding (Table 4 and Figure 1).

Schistosoma japonicum spreads eastward and establishes distinct groups in the central and eastern provinces of China along the Yangtze River (Young et al., 2015). However, Yin et al. (2015) suggested that *S. japonicum* spread from the middle and lower reaches of the Yangtze River to the mountainous regions

of China, to Japan, and then to Southeast Asia (Yin et al., 2015). *Schistosomiasis japonica* occurs in China, Indonesia, and the Philippines (Maezawa et al., 2018). Its intermediate hosts include *O. lorelindoensis* (formerly *O. lindoensis*) and *O. robertsoni* (formerly *O. hupensis robertsoni*) (Hauswald et al., 2011).

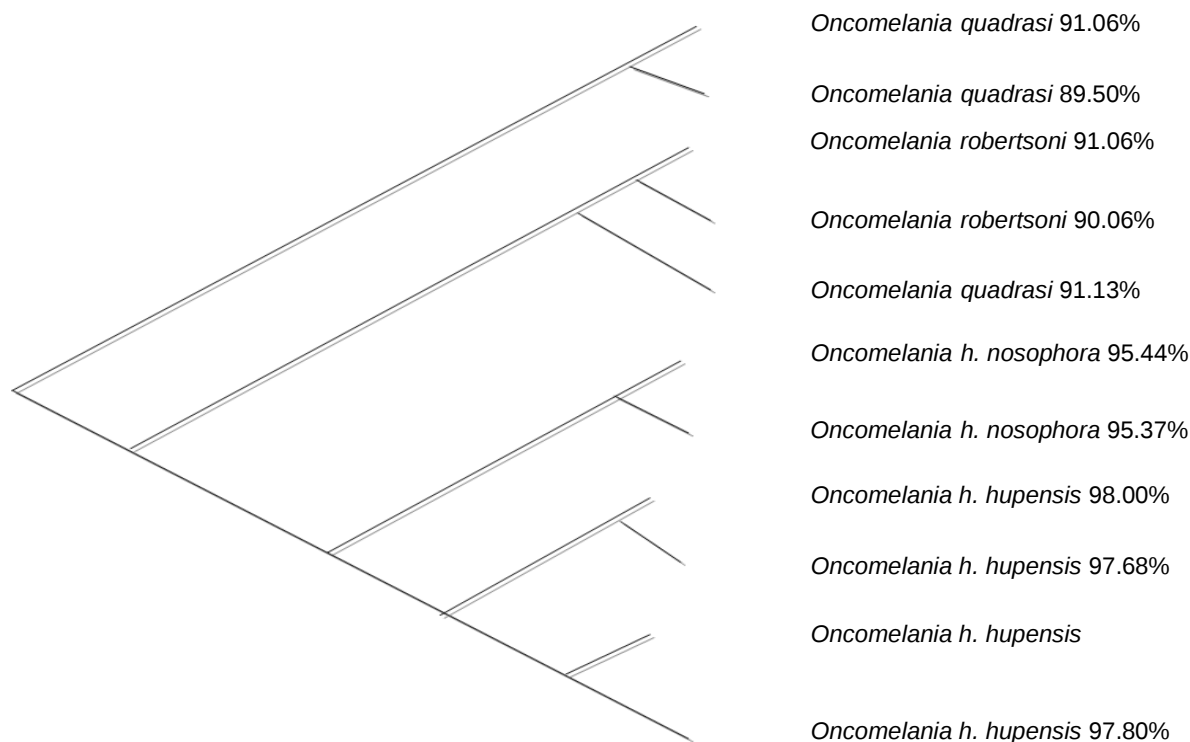


Figure 3. *Oncomelania* China, Japan, and Southeast Asia. Relatedness of *O. hupensis*, *O. h. hupensis*, *O. h. nosophora*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi*. *h.: hupensis*. Modified from NCBI BLAST pairwise alignment.

Phylogenetic tracking showed that *S. malayensis* originated from *S. mekongi* radiation in Cambodia at 2.5 Ma and approximately 3.8 Ma for *S. japonicum* (Attwood et al., 2019). The divergence of the *S. sinensium* group in Central Asia is dated to 4.6 Ma (Attwood et al., 2008). Phylogeography tracking shows that proto-*S. malayensis* entered Vietnam from Hunan via the Red River Valley (Attwood et al., 2019). The authors also stated that the *Schistosoma malayensis* clade entered Southeast Asia using a Vietnam-to-Cambodia route. Molecular dating suggests a radiation of *S. mekongi* into Cambodia and Laos at approximately 1.3 Ma. In addition, *S. malayensis-mekongi* diverged from *S. sinensium* during their migration from Hunan (Attwood et al., 2019). Furthermore, Lawton et al., (2011) suggested that *S. sinensium* is a sibling of *S. japonicum* (Lawron et al., 2011). It is also a sister group to other species: *Schistosoma ovuncatum*, *S. mekongi*, *S. malayensis*, and *S. japonicum*. *Schistosoma ovuncatum* is relatively close to *S. sinensium* (Wang et al., 2021). In Asia, three *Schistosoma* species cause human schistosomiasis: *Schistosoma japonicum*, *S. malayensis*, and *S. mekongi* (Leshem et al., 2009). *Schistosoma malayensis* and *S. mekongi* differ only in biogeography, life cycle parameters, and intermediate hosts (Attwood et al., 2008).

According to the obtained in this research sequencing results, I found that Philippines *S. japonicum* shares 99.45% identity with Malaysia *S. malayensis* and E value equals to 0.0. It also shares 98.77% identity with Laos *S. mekongi* and E value equals to 1e-167, suggesting that Philippines *S. japonicum* is closer to Malaysia *S. malayensis* than Laos *S. mekongi*. However, the sequence of Malaysia *S. malayensis* resulted in 100% identity with Laos *S. mekongi* and E value equals to 2e-131. It also resulted in 99.45% identity with Philippines *S. japonicum* and E value equals to 0.0 (Table 4), indicating Philippines *S. japonicum* first diverged into Laos *S. mekongi* then to Malaysia *S. malayensis*. All E values are close to 0.0. This means that the evolutionary relationships among these species have very robust sequence matches. In addition, according to pairwise alignments with dots for identities and CDS, Malaysia *S. malayensis* has no different genetic codes (bases) from Laos *S. mekongi*. However, it has ten different bases (99%) from

Philippines *S. japonicum*, 37 different bases from China *S. sinensium*, and five different bases from Thailand *S. ovuncatum* and China *S. sinensium*. This suggests that Malaysia *S. malayensis* is close to Laos *S. mekongi* than to Philippines *S. japonicum*. Philippines *S. japonicum* is 98.07% close to China *S. sinensium* with E value equals to 0.0 and 97.85% to Thailand *S. ovuncatum* with E value equals to $1e-162$, meaning that China *S. sinensium* diverged from Thailand *S. ovuncatum* and then to Philippines *S. japonicum* as described in slanted cladogram. Moreover, Laos *S. mekongi* diverged from Philippines *S. japonicum* and Malaysia *S. malayensis* diverged from Laos *S. mekongi*. It is according to the branching patterns and percentage identities in slanted cladogram (Table 4 and Figure 1).

Two subfamilies of Asian schistosomes intermediate hosts comprise *Pomatiopsinae* and *Triculinae* (Kameda and Kato, 2011). *Triculinae* radiate as aquatic snails in freshwater habitats in Southeast Asia and Southern China, namely Yunnan Province, China. It also occurs in Tibet (Wang et al., 2021). *Pomatiopsinae* spread throughout the world and have a variety of lifestyles ranging from aquatic to amphibian. *Triculinae* can include *Neotricula aperta*, *Robertsia* spp., and *Tricula* spp. such as *Tricula bollingi* and *Tricula hortensis* (Liu et al., 2014). *Pomatiopsinae* belongs to the genus *Oncomelania*, which comprises *O. hupensis* (Liu et al., 2014) *O. lorelindoensis*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi* (Nelwan, 2022). *Oncomelania* occurs in Sulawesi, the Philippines, Taiwan, Japan, and China. It is an intermediate host of *S. japonicum*. *Neotricula aperta* is the intermediate host of *S. mekongi*. It is the only intermediate host for *S. mekongi*. Attwood and Upatham (2012) suggested that there are three strains of *N. aperta*: α , β , and γ . Only the γ -strain is epidemiologically significant (Attwood and Uphatam, 2012). *Robertsia* spp. is an intermediate host of *S. malayensis*. *Tricula bollingi* and *Tricula hortensis* are intermediate hosts of *S. sinensium* (Wang et al., 2021). In addition, *Tricula* spp. can also be an intermediate host of *S. ovuncatum*.

According to the obtained in this work sequence results of the COI gene, China *O. robertsoni*, which belongs to *Pomatiopsinae*, shares 86.12% identity with Cambodia/Laos *N. aperta* and E value equals to 0.0. It has the highest percentage among *Triculinae*. The second place is *Robertsia* sp. Malaysia, with an identity similarity of 85.88% and E value equals to 0.0. The third most common species was Thailand *Tricula bollingi*, with an identity similarity of 85.28% and E value equals to $1e-180$ (Table 5). This means that all *Oncomelania*, *Neotricula aperta* and *Robertsia* spp. were derived from the same ancestor. The genus *Oncomelania* belongs to *Pomatiopsinae*, while the genera *Neotricula*, *Robertsia* and *Tricula* belong to *Triculinae*. All were derived from *Pomatiopsidae* as the same ancestor. According to alignments pairwise with dots for identities and CDS, China *O. robertsoni* has 83 different bases (86%) from Laos *N. aperta*, 84 different bases (86%) from Malaysia *Robertsia* sp., and 88 different bases (85%) from Thailand *T. bollingi*. Furthermore, the sequence results show that Laos's *N. aperta* shares approximately 84-86% identity with China *O. hupensis*, China *O. robertsoni*, China *O. hupensis hupensis*, and China *O. hupensis tangi*. These findings suggest that China *O. robertsoni* is close to Laos's *N. aperta* (86.12%) than to Malaysia *Robertsia* sp. (85.88%) and Thailand *Tricula bollingi* (85.28%). According to the branching patterns and percentage identities, it seems that China *O. robertsoni* (*Pomatiopsinae*) came from the same ancestor (*Pomatiopsidae*) as Laos's *N. aperta*, Malaysia *Robertsia* sp., and Thailand *Tricula bollingi* (*Triculinae*).

Nelwan (2022) suggests that the genus *Oncomelania* comprises five species: China *Oncomelania hupensis*, Sulawesi *O. lorelindoensis*, Japan *O. minima*, China *O. robertsoni*, and Philippines *O. quadrasi*. However, the author also points out that GenBank data for Sulawesi *O. lorelindoensis* (formerly *O. hupensis lindoensis*) are not yet available (Nelwan, 2022). *Oncomelania hupensis lindoensis* (Sulawesi *O. lorelindoensis*) has a distant relationship as a subspecies of China *O. hupensis*. It shares 86.10% identity with China *O. hupensis hupensis* (Sutrisnawati et al., 2022). In addition, Sulawesi *O. lorelindoensis* and Philippines *O. quadrasi* have a 6.2 pairwise difference in the percentage of the 12S rRNA gene (Okamoto et al., 2003). This suggests that Sulawesi *O. lorelindoensis* and Philippines *O. quadrasi* have distant relatedness. If the percentage of identity is high, it should be Philippines *O. quadrasi*, a subspecies of Sulawesi *O. lorelindoensis*. Liu et al. (2014) suggested that proto-*Oncomelania* originated from Northwest Australia, which today forms parts of Borneo and eastern Indonesia (Liu et al., 2014), including Sulawesi. This suggests that Sulawesi proto-*Oncomelania*, i.e., proto-*Oncomelania lorelindoensis*, is older than the Philippines proto-*Oncomelania*, i.e., proto-*Oncomelania quadrasi*. Other proto-*Oncomelania* comprises China proto-*Oncomelania hupensis*, Japan proto-*Oncomelania minima*, and China proto-*Oncomelania robertsoni*, due to each species of *Oncomelania* rising from its antecedent form.

In China, there are two species of *Oncomelania*: China *O. hupensis* and China *O. robertsoni*. China *O. hupensis* has subspecies such as China *O. hupensis hupensis* and China *O. hupensis tangi* (Nelwan, 2022). To make sure of this, I performed NCBI BLAST on China *O. hupensis*. I took eleven *Oncomelania* from the sequence results. These results show that China *O. hupensis* shares 97.68-98.00% identity with

all China *O. hupensis hupensis*. In addition, the sequence of China *O. hupensis* shares approximately 95% identity with all Japan *O. hupensis nosophora*. All E values are 0.0, indicating very strong robust sequence matches (Table 6). This suggests that all China *O. hupensis hupensis* and all Japan *O. hupensis nosophora* are closely related to China *O. hupensis*. This confirms that they are all subspecies of China *O. hupensis*, as suggested by Nelwan (2022). Moreover, the sequence results of China *O. hupensis* shares 90.06% identity with China *O. robertsoni* and 89.50% identity with Philippines *O. quadrasi*. According to Pairwise with dots for identities and CDS, China *O. hupensis* has 130 different amino acids from Philippines *O. quadrasi*. It has 1322 different bases from Philippines *O. quadrasi* (89%). China *O. robertsoni* has 173 different amino acids from China *O. hupensis*. It has 1569 different bases from China *O. hupensis* (13636/15205 = 89.63%). China *O. robertsoni* has 170 different amino acids from Philippines *O. quadrasi*. It has 1675 different bases from Philippines *O. quadrasi* (89%). These findings suggest that China *O. robertsoni* and Philippines *O. quadrasi* are distantly related to China *O. hupensis*.

Nelwan (2022) suggested that China *O. robertsoni* and Philippines *O. quadrasi* are full species in the genus *Oncomelania*. In addition, Sulawesi *O. lorelindoensis* is more closely related to China *O. robertsoni* than China *O. hupensis*. In the current study, I found that China *O. robertsoni* EU079378.1 shares 94.04% identity with all China *O. robertsoni*, *Oncomelania hupensis* has two species: China *O. hupensis hupensis* and Japan *O. hupensis nosophora* (Table 6 and Figure 3). Moreover, China *O. hupensis*, China *O. robertsoni*, and Philippines *O. quadrasi* are in different groups in a tree-view slanted cladogram (Figure 3). This finding supports the fact that China *O. hupensis*, China *O. robertsoni*, and Philippines *O. quadrasi* are separate species. This supports the fact that the genus *Oncomelania* comprises five species: China *O. hupensis*, Sulawesi *O. lorelindoensis*, Japan *O. minima*, China *O. robertsoni*, and Philippines *O. quadrasi*. In addition, these findings also support that China *O. hupensis* comprises five subspecies: China *O. hupensis hupensis*, Taiwan *O. hupensis chiui*, Taiwan *O. hupensis formosana*, Japan *O. hupensis nosophora*, and China *O. hupensis tangi* (Nelwan, 2022).

Sequences of China *O. hupensis* COI and Philippines *O. quadrasi* COI against all China *O. robertsoni* of the Sichuan Plain (SCB) (Attwood et al., 2015) confirm that Philippines *O. quadrasi* and China *O. robertsoni* are distinct from China *O. hupensis*. For example, the sequence of Philippines *O. quadrasi* shares 87.77% identity with China *O. robertsoni* and E value equals to 0.0 (Table S1), and the sequence of China *O. hupensis* shares 88.99% similarity with China *O. robertsoni* and E value equals to 0.0 (Table S2). The sequence of China *O. hupensis* shares an identity of 84.48% with Philippines *O. quadrasi* (Nelwan, 2022). This supports the fact that Philippines *O. quadrasi* and China *O. robertsoni* did not drive from China *O. hupensis* because they have a distant relationship. In addition, it also supports the fact that China *O. hupensis*, Sulawesi *O. lorelindoensis*, Japan *O. minima*, China *O. robertsoni*, and Philippines *O. quadrasi* are derived from their antecedent forms. Thus, the genus *Oncomelania* is derived from its antecedent forms. Moreover, these findings support the fact that, except for China *O. hupensis*, *Oncomelania* developed in its own territory. China *O. robertsoni* was developed in China. Sulawesi *O. lorelindoensis* was developed in Sulawesi (Indonesia). Japan *O. minima* were developed in Japan. Philippines *O. quadrasi* developed in the Philippines. China *O. hupensis* gave rise to Taiwan *O. hupensis chiui*, Taiwan *O. hupensis formosana*, China *O. hupensis hupensis*, Japan *O. hupensis nosophora*, and China *O. hupensis tangi*.

Sequence results did not support the idea that China *O. robertsoni* has subspecies. China *O. robertsoni* of the Sichuan Plain (SCB) (Attwood et al., 2015) shares 91.20% identity with China *O. robertsoni* and E value equals to 0.0 (Table S3). The sequence of China *O. robertsoni* from the Sichuan Anning River Valley (SAV) (Attwood et al., 2015) showed that China *O. robertsoni*, for example, shares 91-92% identity with all China *O. robertsoni* and E value equals to 0.0 (Table S4). The sequence of China *O. robertsoni* in the SCB shares 97.63% identity with China *O. robertsoni* and E value equals to 0.0 (SAV), shares 95.55% identity with China *O. robertsoni* and E value equals to 0.0 (YEB) (Table S5). These results show that there are four China *O. robertsoni* clades in China. *Oncomelania robertsoni* SAV, SCB, and YEB is a novel clade of *O. robertsoni*. All E values in Table S1 through Table S5 are 0.0, suggesting very robust sequence matches.

This study has advantages and limitations. Advantages can include the easy use and reliability of the BLAST technique. For example, the sequence of China *O. hupensis* NC_013073 using NCBI BLAST can produce other data, such as Philippines *O. quadrasi* LC276227.1 and China *O. robertsoni* LC276228.1. Another example, China *O. robertsoni* KR002675.1 in Table 1 is new data. In the NCBI BLAST results, the *O. robertsoni* group would occupy a separate group from other species in the slanted cladogram (see Figure 3). Thus, it does not require new data collection. NCBI BLAST is as reliable as ClustalW, MUSCLE, PhyML and RaxML. The limitations are that, in some cases, GenBank accession numbers are not accurate. For

example, China *O. hupensis hupensis* JF284697 should be China *O. robertsoni* JF284697. China *O. hupensis hupensis* JF284698 should be Philippines *O. quadrasi* JF284698. There were no samples of parasites and intermediate hosts taken to obtain partial DNA sequences using the popular Former and Palumbi primers to compare data from previous studies, for example, although it does not affect the results of this study. In addition, data on *O. hupensis lindoensis* (*O. lorelindoensis*) are not yet available at NCBI. In this study, I used only GenBank data from Philippines *O. quadrasi* to assess Southeast Asian *Oncomelania* as an intact species. However, this does not mean that Sulawesi *O. lorelindoensis* is not a full species of the genus *Oncomelania*. This is due to the proto-*Oncomelania* coming from eastern Indonesia, namely Sulawesi. Then, off to the Philippines, Japan, and China.

Conclusions

The *Schistosoma japonicum* complex comprises *S. japonicum*, *S. malayensis*, *S. mekongi*, *S. ovuncatum*, and *S. sinensium*. *Schistosoma japonicum*, *S. malayensis*, and *S. mekongi* cause human schistosomiasis in the Far East. The sequence results showed that in Southeast Asia, *Schistosoma ovuncatum* diverged to *S. sinensium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, and then to *S. malayensis*. The sequence results reveal that *S. japonicum* is close to *S. sinensium* than that of *S. ovuncatum*, meaning that *S. ovuncatum* diverged to *S. sinensium* then to *S. japonicum*. *Schistosoma malayensis* is 100% close to *S. mekongi* than that of *S. japonicum* with 99.45%, meaning that *S. japonicum* diverged to *S. mekongi* then to *S. malayensis*. *Schistosoma ovuncatum* and *S. sinensium* are not human schistosomiasis. Intermediate hosts of Far East schistosomiasis can include *Neotricula aperta*, *Oncomelania* snails, *Robertsia* sp., and *Tricula* sp. All *Oncomelania* are *Pomatiopsinae*, while *Neotricula*, *Robertsia* and *Tricula* are *Triculinae*. *Neotricula aperta*, *Robertsia* sp., and *Tricula* sp. occur in Southeast Asia. In addition, *Tricula* sp. can also be found in China and India. Southeast Asian *Oncomelania* includes *O. lorelindoensis* and *O. quadrasi*. *Oncomelania hupensis* and *O. robertsoni* occur in China. All *Oncomelania* have 82 to 86% close to *N. aperta*, *Robertsia* sp., and *Tricula bollingi*. For example, *O. robertsoni* is 86.12% close to *N. aperta*, followed by *Robertsia* sp. with 85.88% and *Tricula bollingi* with 85.28%, suggesting that they derived from the same ancestor (*Pomatiopsidae*). This study is the first to show that *Pomatiopsinae* and *Triculinae* have relatedness through *O. robertsoni* and *N. aperta*. *Oncomelania minima* occurs in Japan. *Oncomelania lorelindoensis* occurs in Indonesia, and *O. quadrasi* occurs in the Philippines. Proto-*Oncomelania* is derived from eastern Indonesia, i.e., Sulawesi. In addition, *Oncomelania* was derived from its antecedent forms at its respective locations. This is the first study explaining that the genus *Oncomelania* rose from its antecedent forms. In addition, this study confirms that this genus consists of five species: *O. hupensis*, *O. lorelindoensis*, *O. minima*, *O. robertsoni*, and *O. quadrasi*. *Oncomelania robertsoni* comprises four clades, and one of them is a novel clade of *O. robertsoni*.

Novel findings of this study include relatedness of *Schistosoma japonicum* complex, relatedness of *Pomatiopsinae* and *Triculinae*, and the new status of *Oncomelania*. This study reveals clearly the relatedness of *Schistosoma japonicum* complex. It was derived from *S. ovuncatum*, diverged to *S. sinensium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, and *S. malayensis*. Intermediate hosts of Asian human schistosomiasis were derived from *Pomatiopsidae* as common ancestor. These include the genera *Oncomelania*, *Neotricula*, *Robertsia*, and *Tricula*. The genus *Oncomelania* belongs to *Pomatiopsinae*. The genera *Neotricula*, *Robertsia* and *Tricula* belong to *Triculinae*. The close relationships between these two subfamilies are in *O. robertsoni* and *N. aperta*. This relatedness reveals that *O. robertsoni* and *N. aperta* were derived from the common ancestor. *Oncomelania robertsoni* represents *Pomatiopsinae* and *N. aperta* represents *Triculinae*. *Pomatiopsinae* and *Triculinae* were derived from *Pomatiopsidae*. This study also reveals the genus *Oncomelania* was derived from its predecessor forms in Sulawesi. It is proto-*Oncomelania lorelindoensis*. This predecessor form spread to Philippines, Japan, and China. In its own habitats, each predecessor forms gave rise to *Oncomelania* snails: China *Oncomelania hupensis*, Sulawesi *O. lorelindoensis*, Japan *O. minima*, China *O. robertsoni*, and Philippines *O. quadrasi*. *Oncomelania hupensis* formed its subspecies: *Oncomelania h. hupensis*, *O. h. tangi*, *O. h. chiui*, *O. h. formosana*, and *O. h. nosophora*. Others do not have subspecies. In addition, this study also reveals that *O. robertsoni* has four clades. Although this study did not support that *O. robertsoni* has a subspecies, further investigation is still needed.

Additional information

This study did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Exclusively, M. Nelwan performed research and manuscript development. I hereby declare that I have no conflicts of interest regarding the content of this article. All data generated or analyzed

during this study are included in this published article [and its supplementary information files]. The preliminary version of this manuscript is available at preprints archive (DOI: 10.21203/rs.3.rs-3469658/v2).

References

- Al-Olayan, E.M. et al. (2019). *Ceratonia siliqua* pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 434. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1389-1>.
- Attwood, S.W., Fatih, F.A., Upatham, E.S. (2008). DNA-sequence variation among *Schistosoma mekongi* populations and related taxa; phylogeography and the current distribution of Asian schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(3), e200. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000200>.
- Attwood, S.W., Upatham E.S. (2012). Observations on *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae) population densities in Thailand and Central Laos: implications for the spread of Mekong schistosomiasis. *Parasites & Vectors*, 5, 126. <https://doi.org/doi:10.1186/1756-3305-5-126>.
- Attwood, S.W. et al. (2015) Comparative phylogenetic studies on *Schistosoma japonicum* and its snail intermediate host *Oncomelania hupensis*: origins, dispersal and coevolution. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(7), e0003935. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003935>.
- Attwood, S.W., Liu, L., Huo, G-N. (2019). Population genetic structure and geographical variation in *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the snail intermediate host of *Schistosoma mekongi* (Digenea: Schistosomatidae). *PLoS Negl Trop Dis*, 13(1), e0007061. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007061>.
- Au, F.F.A. et al. (2023). Status quo and future perspectives of molecular and genomic studies on the genus *Biomphalaria*—the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*. *Molecular Sciences*, 24, 4895. <https://doi.org/10.3390/ijms24054895>.
- Brant, S.V., Loker, E.S. (2005). Can specialized pathogens colonize distantly related hosts? Schistosome evolution as a case study. *PLoS Pathog*, 1(3), e38. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010038>.
- Budiono, N.G. et al. (2019). The contribution of domestic animals to the transmission of schistosomiasis japonica in the Lindu Subdistrict of the Central Sulawesi Province, Indonesia. *Veterinary World*, 12(10), 1591-1598. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1591-1598>.
- Budiono, N.G. et al. (2020) Humoral responses to *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens in domestic animals in Lindu Subdistrict, Central Sulawesi Province, Indonesia. *International Journal of One Health*, 6(2), 99-108. <https://doi.org/10.14202/IJOH.2019.99-108>.
- Davis, G.M. (1992) Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. *Prog Clin Parasitol*, 3, 145-204.
- Fang, J. et al. (2022) Single-target detection of *Oncomelania hupensis* based on improved YOLOv5s. *Front. in Bioeng. Biotechnol*, 10, 861079. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.861079>.
- Gordon, C.A et al. (2019). Asian schistosomiasis: current status and prospects for control leading to elimination. *Trop. Med. Infect.*, 4: 40. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010040>.
- Inceboz, T. (2022) One health concept against schistosomiasis: an overview. New Horizon for schistosomiasis research, intechopen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106912>.
- Haggag, A.A. et al. (2019). Thirty-day Daily Comparisons of Kato-Katz and CCA Assays of 45 Egyptian Children in Areas with Very Low Prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med*, 100(3), 578-583. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0829>.
- Hauswald, A.K. et al. (2011). Stirred, not shaken: genetic structure of the intermediate snail host *Oncomelania hupensis robertsoni* in an historically endemic schistosomiasis area. *Parasites & Vectors*, 4, 206. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-206>.
- Kameda, Y., Kato, M. (2011) Terrestrial invasion of pomatiopsid gastropods in the heavy-snow region of the Japanese archipelago. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-118>.
- Latif, B. et al. (2013). Autochthonous human schistosomiasis, Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1340-1341. <https://doi.org/10.3201/eid1908.121710>.
- Lawton, S.P. et al. (2011). Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites and Vectors*, 4, 131. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-131>.
- Leshem, E., Marva, E., Schwartz, E. (2009) Travel-related schistosomiasis acquired in Laos. *Emerging Infectious Diseases*, 15(11), 1823-1825. <https://doi.org/10.3201/eid1511.090611>.
- Liu, L. et al. (2014). A phylogeny for the pomatiopsidae (Gastropoda: Rissooidea): A resource for taxonomic, parasitological, biodiversity studies. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-29>.
- Maezawa, K. et al. (2018). Real-time observation of pathophysiological processes during murine experimental *Schistosoma japonicum* infection using high-resolution ultrasound imaging. *Tropical Medicine and Health*, 46: 1. <https://doi.org/10.1186/s41182-017-0082-5>.
- Mouahid, G. et al. (2018). Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. *Wellcome Open Research*, 3(3). <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres>.

- Nahum, L.A. et al. (2012). New frontiers in *Schistosoma* genomics and transcriptomics. *International of Parasitology Research*, 2012(849132), 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/849132>.
- Nelwan, M.L. (2019). Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. *Current Therapeutic Research*, 91, 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2019.06.001>.
- Nelwan, M.L. (2023) *Oncomelania lorelindoensis*: the intermediate host of Sulawesi's *Schistosoma japonicum*. Preprint at <https://doi.org/10.2103/rs.3.rs-3471885/v1>
- Nelwan, M.L. (2022). Indonesia *Schistosoma japonicum*: Origin, genus *Oncomelania*, and elimination of the parasite with cluster genes inoculated into female *Oncomelania lorelindoensis* via CRISPR/Cas9 system. *Afr. J. Bio. Sc.*, 4(4), 23-38. <https://doi.org/10.33472/AFJBS.4.4.2022.23-38>.
- Neves, B.J. et al. (2015). Natural Products as Leads in Schistosome Drug Discovery. *Molecules*, 2, 1872-903. <https://doi.org/10.3390/molecules20021872>.
- Okamoto, M. et al. (2003) Phylogenetic relationships of snails of the genera *Oncomelania* and *Tricula* inferred from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 31(1), 5-10.
- Orpin, J.B., Mzungu, I., Usman-Sani, H. (2022). Prevalence of schistosomiasis among primary school pupils in Guma LGA of Benue state. *Afr. J. Bio. Sc.*, 4(4), 48-55. <https://doi.org/10.33472/AFJBS.4.4.02.48-55>.
- Rothe, C. et al. (2021). Developing Epidemicity of Schistosomiasis, Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*, 27(1), 319-321. <https://doi.org/10.3201/eid2701.204391>.
- Sady, H., et al. (2015) New insights into the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* in Yemen. *Parasites & Vectors*, 8, 544. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1168-8>.
- Sanchez, R.C.O. et al. (2021) Immunoinformatics design of multi-epitope peptide based vaccines against *Schistosoma mansoni* using transmembrane proteins as a target. *Front. Immunol*, 12, 021706. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.021706>.
- Smith, E. (2023). BLAST compares & identifies sequences. *Berkeley Library*, <https://guides.lib.berkeley.edu/ncbi/blast>
- Sudomo, M. (1983). Cross infectivity study of four subspecies of *Oncomelania hupensis* in four geographical strains of *Schistosoma japonicum*. *Proceedings ITB*, 16(2): 41-46.
- Sutrisnawati, Ramadhan, A., Trianto, M. (2022) Molecular identification of *Oncomelania hupensis lindensis*, snail intermediate hosts of *Schistosoma japonicum* from Central Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 23(11), 5989-5994. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d231153>.
- Walker, J.A. (2011). Insight into the functional biology of schistosomes. *Parasites & Vector*, 4, 203. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-203>.
- Wang, X. et al. (2021). First report of *Schistosoma sinensium* infecting *Tupaia belangeri* and *Tricula* sp. LF. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14(2021), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.01.005>.
- Yin, M. et al. (2015). Codispersal of the blood fluke *Schistosoma japonicum* and *Homo sapiens* in the Neolithic age. *Scientific Reports*, 5, 18058. <https://doi.org/10.1038/srep18058>.
- Young, N.D. et al. (2015). Exploring molecular variation in *Schistosoma japonicum* in China. *Scientific Reports*, 5, 17345. <https://doi.org/10.1038/srep17345>.
- ZooBank, <https://zoobank.org/References/d71b8509-ec6e-492b-8e81-8910957a7b6a>

Supplementary files

Table S1. Percentage identities of *Oncomelania quadrasi* and *Oncomelania robertsoni* CO1

Species	Accession	E value	<i>O. quadrasi</i> DQ112287.1
<i>O. robertsoni</i>	DQ212800.1	0.0	87.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212803.1	0.0	87.62%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212805.1	0.0	87.62%
<i>O. robertsoni</i>	KR002675.1	0.0	87.25%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212797.1	0.0	86.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212798.1	0.0	86.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212813.1	0.0	86.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212799.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212801.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212802.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212806.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212807.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212808.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212809.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212810.1	0.0	86.68%

Species	Accession	E value	<i>O. quadrasi</i> DQ112287.1
<i>O. robertsoni</i>	DQ212812.1	0.0	86.68%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212811.1	0.0	86.36%
<i>O. robertsoni</i>	JF284697.1	0.0	86.36%
<i>O. robertsoni</i>	AF531547.1	0.0	85.91%

O.: *Oncomelania*; S1: Supplementary 1

Table S2. Percentage identities of *Oncomelania hupensis* and *Oncomelania robertsoni* CO1

Species	Accession	E value	<i>O. hupensis</i> GU367391.1
<i>O. robertsoni</i>	DQ212802.1	0.0	88.99%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212797.1	0.0	88.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212798.1	0.0	88.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212803.1	0.0	88.71%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212805.1	0.0	88.71%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212800.1	0.0	88.67%
<i>O. robertsoni</i>	KR002675.1	0.0	88.29%
<i>O. robertsoni</i>	AF531547.1	0.0	87.84%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212813.1	0.0	87.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212808.1	0.0	87.62%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212809.1	0.0	87.62%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212810.1	0.0	87.62%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212812.1	0.0	87.62%
<i>O. robertsoni</i>	JF284697.1	0.0	87.30%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212799.1	0.0	86.99%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212801.1	0.0	86.99%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212804.1	0.0	86.99%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212806.1	0.0	86.99%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212807.1	0.0	86.99%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212811.1	0.0	86.68%

O.: *Oncomelania*; S2: Supplementary 2

Table S3. Megablast results on *Oncomelania robertsoni* Sichuan Plain SCB

Species	accession	E value	<i>O. robertsoni</i> KR002675.1
<i>O. robertsoni</i>	DQ212808.1	0.0	99.67%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212809.1	0.0	99.67%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212810.1	0.0	99.67%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212812.1	0.0	99.67%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212797.1	0.0	99.50%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212798.1	0.0	99.50%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212813.1	0.0	99.50%
<i>O. robertsoni</i>	JF284697.1	0.0	98.49%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212799.1	0.0	97.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212801.1	0.0	97.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212802.1	0.0	97.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212804.1	0.0	97.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212806.1	0.0	97.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212807.1	0.0	97.83%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212811.1	0.0	97.49%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212800.1	0.0	95.48%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212803.1	0.0	95.32%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212805.1	0.0	95.32%
<i>O. robertsoni</i>	AF531547.1	0.0	91.20%

O.: *Oncomelania*; S3: Supplementary 3

Table S4. Megablast results on *Oncomelania robertsoni* Sichuan Anning River Valley (China) – SAV

Species	accession	E value	<i>O. robertsoni</i> AF213339.1
<i>O. robertsoni</i>	DQ212814.1	0.0	100%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212815.1	0.0	100%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212816.1	0.0	100%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212831.1	0.0	98.90%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212834.1	0.0	98.90%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212835.1	0.0	98.90%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212836.1	0.0	98.90%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212822.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212825.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212826.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212827.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212828.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212830.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212832.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212833.1	0.0	98.75%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212817.1	0.0	98.59%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212823.1	0.0	98.59%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212824.1	0.0	98.59%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212818.1	0.0	98.43%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212819.1	0.0	98.43%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212820.1	0.0	98.43%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212828.1	0.0	98.43%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212821.1	0.0	98.28%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212837.1	0.0	98.28%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212838.1	0.0	98.28%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212839.1	0.0	98.28%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212840.1	0.0	98.28%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212841.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212842.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212843.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212845.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212847.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212849.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212851.1	0.0	95.77%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212848.1	0.0	95.61%
<i>O. robertsoni</i>	EU079378.1	0.0	92.16%
<i>O. robertsoni</i>	JF284697.1	0.0	92.16%
<i>O. robertsoni</i>	DQ112250.1	0.0	91.69%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212844.1	0.0	91.07%
<i>O. robertsoni</i>	DQ212846.1	0.0	91.07%

O.: *Oncomelania*; S4: Supplementary 4

Table S5. Megablast results of *Oncomelania robertsoni*

Species	accession	E value	<i>O. robertsoni</i> AF531547.1	Location SCB
<i>O. robertsoni</i>	DQ212846.1	0.0	97.63%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	DQ212844.1	0.0	97.46%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	DQ112252.1	0.0	96.79%	YEB
<i>O. robertsoni</i>	DQ112250.1	0.0	96.79%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	JF284691.1	0.0	96.15%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	EU079378.1	0.0	96.15%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	AF253075.1	0.0	95.89%	YEB
<i>O. robertsoni</i>	DQ212852.1	0.0	95.72%	YEB

Table S5. Megablast results of *Oncomelania robertsoni*

Species	accession	E value	<i>O. robertsoni</i> AF531547.1	Location SCB
<i>O. robertsoni</i>	DQ212850.1	0.0	95.40%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	AF253074.1	0.0	95.55%	YEB
<i>O. robertsoni</i>	AF213339.1	0.0	91.88%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	DQ212836.1	0.0	91.54%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	DQ212812.1	0.0	91.20%	SCB
<i>O. robertsoni</i>	KR002675.1	0.0	91.20%	SCB
<i>O. robertsoni</i>	DQ212851.1	0.0	90.52%	SAV
<i>O. robertsoni</i>	DQ212803.1	0.0	90.19%	SCB

O.: *Oncomelania*, Sichuan Anning River Valley (China)-SAV, Sichuan Plain (China)-SCB, Yunnan: Erhai Basin-YEB; S5: Supplementary 5

Комплекс *Schistosoma japonicum*: варіації COI-послідовностей паразитів та їх проміжних господарів, проаналізованих за допомогою BLAST М.Л. Нельван

У цьому дослідженні я розглядаю взаємозв'язок між *S. ovuncatum*, *S. sinensium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* та *S. malayensis*. Крім того, я аналізую взаємозв'язок між п'ятьма видами роду *Oncomelania* та *Neotricula aperta*, *Robertsiella* spp. і *Tricula* spp. Також я описую формування роду *Oncomelania* з його попередніх форм. Результати нуклеотидного аналізу за допомогою BLAST показали, що *S. japonicum* має 99,45% ідентичності з *S. malayensis*, 98,77% з *S. mekongi*, 98,07% з *S. sinensium* і 97,85% з *S. ovuncatum*. Послідовність *S. malayensis* виявила 100% ідентичності з *S. mekongi*. Значення E було меншим за 0,01. У результатах вирівнювання амінокислотних послідовностей у комплексі *S. japonicum* не було виявлено замін. У *S. malayensis* і *S. mekongi* не зафіксовано замін основ, між *S. malayensis* і *S. sinensium* виявлено 37 замін основ, між *S. malayensis* і *S. japonicum* — 10 замін основ, між *S. malayensis* і *S. ovuncatum* — 5 замін основ. На кладограмі було показано, що *S. sinensium* є сестринським видом до *S. ovuncatum*. Від них відокремився *S. japonicum*. *Schistosoma japonicum* розділився на *S. mekongi* та *S. malayensis*. Результати також показали, що *Oncomelania robertsoni* має 86,12% ідентичності з *Neotricula aperta*, 85,88% з *Robertsiella* spp. і 85,28% з *Tricula bollingi*. Значення E було меншим за 0,01. У вирівнюванні *O. robertsoni* та *N. aperta* виявлено дві заміни амінокислот, чотири заміни амінокислот і 84 заміни основ між *O. robertsoni* та *Robertsiella* spp., а також дві заміни амінокислот і 88 замін основ між *O. robertsoni* та *T. bollingi*. На нахиленому кладограмі дерево показало, що *Tricula* spp. розділився на *N. aperta* та *Robertsiella* spp. Це дослідження показало, що *Oncomelania* виник з попередніх форм. Результати нуклеотидного BLAST підтвердили, що *S. ovuncatum* близький до *S. sinensium*. *Schistosoma sinensium* розділився на *S. japonicum*, *S. mekongi* і *S. malayensis*. *Oncomelania robertsoni* був ближчий до *N. aperta*, ніж до *Robertsiella* spp., і до *Tricula* spp. (*Tricula bollingi*). Види роду *Oncomelania* виникли з їхніх попередників.

Ключові слова: *Schistosoma japonicum* complex, *Neotricula aperta*, *Oncomelania*, *Oncomelania lorelindoensis*, *schistosomiasis*, *Robertsiella* spp., *Tricula* spp.

Цитування: M.L.Nelwan. *Schistosoma japonicum* complex: COI-sequences variations of parasites and their intermediate hosts analyzed using BLAST. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 50-65. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-5>

Про автора:

М.Л.Нельван — Наука про тварин — інші напрями, Інститут розвитку людських ресурсів Нелван, Палу, Центральний Сулавесі, Індонезія; mlnelwan2@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6367-828X>

Подано до редакції: 10.06.2024 / Прорецензовано: 14.09.2024 / Прийнято до друку: 27.10.2024

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-6

UDC: 574.587:(595.188+595.412)

New records of deep-sea *Gastrotricha* and *Tardigrada* from Iberian and Canary Basins (Northeast Atlantic) with comments on abyssal meiofauna composition and the meiofauna paradox

R. Trokhymchuk, A. Kieneke

The “meiofauna paradox” refers to the amphi-oceanic or even cosmopolitan distribution of species of this ecological group, i.e. the marine meiofauna, as opposed to their weak dispersal potential. Dissolving this paradox includes on the one hand the discovery of complexes of genetically distinct but morphological cryptic species with much more limited distribution areas, but also involves the investigation of “stepping stone habitats” like the shelf area of oceanic islands and summits of seamounts. Such biotopes subdivide long distances, e.g. from one continent to the other, into shorter sections. However, what needs to be excluded is a possible distribution of “shallow water meiofauna” simply via population growth and range expansion at the abyssal plains of the world's oceans. In order to test if the abyssal plains may represent a barrier against dispersal of certain marine meiofauna taxa, we studied the composition of the meiofauna from six samples (stations) taken during the expedition IceDivA (SO280) of the R/V Sonne to the Iberian and Canary Basins from abyssal depths (4904-5485 m). The taxonomic focus was put on the *Gastrotricha* and *Tardigrada*. The dominant taxa in all samples were nematodes (13.0 - 97.7 ind./cm²) and copepods (0.4 - 9.6 ind./cm²), followed by annelids, kinorhynchids and ostracods. Three *Gastrotricha* species (*Desmodasys* sp. iberianA, *Desmodasys* sp. langsethA, *Musellifer* sp. iberianA (*Musellifer* aff. *tridentatus*)) and one tardigrade (*Coronarctus dissimilis*) were registered and examined using light microscopy (DIC and CLSM) and SEM. All gastrotrichs from the examined samples presumably represent new and still undescribed species. The range of geographic and bathymetric distribution of *Coronarctus dissimilis* increases to the Iberian Basin and to a depth of 4163 m. This finding further hints to a potential amphi-Atlantic distribution of this species. We compare our data with those from other studies on seamounts, oceanic islands and from the deep-sea and conclude that the abyssal plains represent a significant barrier against long distance dispersal for most genera (and species) of *Gastrotricha* and for a certain fraction of genera of *Tardigrada*, too.

Key words: Atlantic Ocean, biodiversity, biogeography, deep sea, *Desmodasys*, *Musellifer*, *Coronarctus*.

Cite this article: Trokhymchuk R., Kieneke A. (2024). New records of deep-sea *Gastrotricha* and *Tardigrada* from Iberian and Canary Basins (Northeast Atlantic) with comments on abyssal meiofauna composition and the meiofauna paradox. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 66-84. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-6>

About the authors:

Roman Trokhymchuk – V. N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, 61022, Kharkiv, Ukraine; German Centre for Marine Biodiversity Research (DZMB), Senckenberg am Meer, Suedstrand 44, 26382, Wilhelmshaven, Germany; rtrokhymchuk@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9570-0226>
 Alexander Kieneke – German Centre for Marine Biodiversity Research (DZMB), Senckenberg am Meer, Suedstrand 44, 26382, Wilhelmshaven, Germany; alexander.kieneke@senckenberg.de; <https://orcid.org/0000-0001-8180-2483>

Received: 05.09.2024 / Revised: 16.10.2024 / Accepted: 18.10.2024

Introduction

Meiofauna (meiobenthos) is the community (ecological group) of aquatic, microscopic metazoans passing a sieve of 1 mm, but being retained on the sieve of 40 µm mesh size (Higgins & Thiel 1988). Although the definition of this fraction of the benthic fauna is defined just by this measure of mesh size, it represents an ecological guild of high biodiversity and complexity in trophic interactions within this community, but also with other trophic levels. Species of the meiofauna occupy all kinds of aquatic habitats of our planet ranging from the deep-sea floor (Shimabukuro et al., 2022), over intertidal sediments (Armonies & Reise, 2000, Martínez et al., 2020), running and stagnant inland water bodies to phytotelm (Kolicka 2016) and even moist terrestrial biotopes such as leaf litter or bryophytes (Higgins & Thiel, 1988, Kreuzinger-Janik et al., 2021, Minowa et al., in press). While taxa of the “limno-terrestrial” meiofauna may produce various dormant stages that are also highly suitable for long distance dispersal via anemochory or zoochory, e.g. the characteristic “barrel-shaped tuns” of *Tardigrada* (Nelson et al., 2015, Gąsiorek, 2023) or the resting eggs of Rotifera (Fontaneto & Plewka, 2021), marine meiofaunal organisms are supposedly much more limited in dispersion by the absence of such stages. However, frequently amphi-oceanic or

even cosmopolitan distributions are observed in marine meiofaunal species. This phenomenon, i.e. the mismatch between wide distribution areas and the absence of life stages suitable for long distance dispersal is called the “meiofauna paradox” (Giere, 2009). However, during the past two decades several studies using DNA sequence data have revealed complexes of cryptic species with restricted distribution ranges within nominal species of various taxonomic groups that were before assumed as widespread or even cosmopolitan (e.g., Magpali et al., 2021, Jörger et al., 2012, Derycke et al., 2008, Cerca et al., 2020). The linked phenomena of stasis and recent speciation and further issues such as erroneous application of determination keys have let Cerca et al. (2018) conclude that the “meiofauna paradox” most likely does not exist. In addition, some real cases of widely distributed species might be potentially explained by natural dispersion e.g. via sea turtles (Ingels et al., 2020), as well as by anthropogenic distribution via marine traffic (e.g., in sediment of ballast water tanks; Radziejewska et al., 2006).

Different geomorphological features of the ocean floor may furthermore promote the spread of marine organisms – including the meiofauna – in different ways. In particular seamounts and likewise oceanic islands play an important role in the distribution of meiofauna. It has been suggested that seamounts can provide the function of “stepping stones” in the distribution of shallow-water meiofauna: exchange of individuals, and with this gene flow, is simply much more likely between adjacent seamounts and/or oceanic islands, than over long distances from the coast of one continent to the other (George, 2013 and references therein). At the same time, seamounts can also be “trapping stones” that stuck species there: arriving specimens can contribute to the formation of new populations and over time even new species may form through independent evolution and a strong restriction of gene flow (George, 2013, Cerca et al., 2018). Therefore, when exploring seamounts, one can in principle expect both, to observe shallow water (interstitial) meiofaunal species from adjacent areas or endemic species (George, 2013). In case of the concept of geographic rarity as an expanding issue for endemism, species restricted to such a limited distribution area like the summit plateau of a guyot seamount may appear to have a small population size, making them vulnerable to extinction (Fattorini, 2017).

If we want to learn about the function of seamounts and oceanic islands in conjunction with the biogeography of interstitial meiofauna, we need to study their inhabitants at species level. For the two systematic groups in focus of the current study, namely Tardigrada and Gastrotricha, there aren't very many of such taxonomically detailed studies yet.

Marine gastrotrich communities have been studied from the Faroe Bank in the Northeast Atlantic (Clausen, 2004), from the islands of Lanzarote, Canary Islands (Riera & Todaro, 2012, Todaro et al., 2019, Martínez et al., 2019), and from São Miguel, Azores (Araújo & Hochberg, 2021). From the 20 species of Gastrotricha that were identified on the Faroe Bank, 10 species also occur at several other east Atlantic sites and four were even known from the Atlantic coast of North America. These widespread North Atlantic distributions of marine gastrotrichs, with intermediate occurrences on the Faroe Bank, were interpreted as a possible indication of the so-called “Thule land bridge” in the Tertiary as a potential gateway for shallow water meiofauna distribution (Clausen, 2004). The impressive number of 61 species of marine Gastrotricha reported from Lanzarote (Canary Islands) yielded a high number of putative new species, but also 32 known species with a wider distribution in the Atlantic Ocean, or even from further Ocean basins (Todaro et al., 2019). Species such as *Dactylopodola typhle* (Remane, 1927) or *Acanthodasys aculeatus* Remane, 1927, with a reported trans-Atlantic distribution, can already be regarded as an indication of a stepping stone function of Lanzarote island. Furthermore, eight species that were already known from the Mediterranean Sea, but not from northern European sites, were discussed in the conjunction of the re-invasion of the Mediterranean after the Messinian crisis (Todaro et al., 2019). With a focus on endemism, Martínez et al. (2019) also studied the soft-bodied meiofauna of Lanzarote, including the Gastrotricha. Their analysis also yielded evidence for the “trapping stone” function of oceanic islands and seamounts as a number of at least 10 Canarian endemic gastrotrich species were identified (Martínez et al., 2019).

Analyses of tardigrade communities with a high taxonomic resolution have been carried out from the Faroe Bank (Hansen et al., 2001, Jørgensen & Kristensen, 2001, Hansen et al., 2003, Hansen et al., 2012, Hansen & Kristensen, 2021), from the Condor Seamount, Azores (Kristensen & Renaud-Mornant, 1983, Kristensen et al., 2015) and from the Great Meteor Seamount Plateau (Tchesunov, 2018). Reported from the Faroe Bank, 19 determined species of tardigrades were registered. The composition of genera is similar to that of shallow sublittoral sediments of the Mediterranean Sea and Florida, USA, but differs by the presence of the “deep-sea genus” *Coronarctus* (Hansen et al., 2001). *Tholoarctus natans* Kristensen & Renaud-Mornant, 1983 reported from the Faroe Bank and the Azores is also known from all other Oceans

(Kaczmarek et al., 2015). Such a cosmopolitan distribution in this species is possibly enabled by its ability to buoyancy with the bell-shaped cuticle (Kristensen & Renaud-Mornant, 1983). The marine tardigrade fauna of the Azores currently consists of two determined species and further undetermined representatives of genera *Chrysoarctus*, *Coronarctus* and *Tanarctus* (Kristensen & Renaud-Mornant, 1983, Kristensen et al., 2015). With only one reported endemic species, the Great Meteor Seamount Plateau is the exception rather than the rule (Tchesunov, 2018).

So far, we have only regarded the communities of putative “stepping stone” and/or “trapping stone” biotopes. However, it is furthermore of high relevance to regard the vast deep sea plains surrounding those isolated “underwater island biotopes” as well (see also “concluding remark 2” of George, 2013), if we try to understand their role in biogeography and dispersal of meiofauna. Are the abyssal plains a barrier against distribution of these microscopic organisms at all, or are they simply inhabited by species that also occur on seamount summits or island shelves? *Gastrotricha* and *Tardigrada* are frequently reported from deep sea sediments, however, their occurrence is patchy and the densities are mostly very low compared to most other meiobenthic higher level taxa (see, e.g., Vincx et al., 1994 and references therein, Gutzmann et al., 2004). Furthermore, most studies only report the occurrence of both phyla without any further taxonomic resolution. The only deep sea records of *Gastrotricha* on species level are so far those of *Desmodasys abyssalis* Kieneke & Zekely, 2008 from a Pacific hydrothermal vent site and of *Thaumastoderma antarctica* Kieneke, 2010 from the South Atlantic Drake Passage (Kieneke & Zekely, 2008, Kieneke, 2010). Deep-sea tardigrades, unlike gastrotrichs, are better studied, but rather mosaically (Kaczmarek et al. 2015). However, some genera such as *Coronarctus* and *Mjobergarctus* can be distinguished as explicit deep-sea taxa (Kaczmarek et al., 2015, Trokhymchuk & Kieneke, 2024, Trokhymchuk et al., 2024). Meanwhile, as shown by extensive studies of the deep sea tardigrade fauna (more than 1000 individuals from the Southern Ocean), some “shallow-water genera” may also have deep-water species, but with relatively low densities compared to the dominant species. This applies especially to the genus *Isoechiniscoides*, a putative new species of which is reported for the first time from the abyssal zone – the same situation as with the gastrotrich species *Thaumastoderma antarctica* (Kieneke, 2010, Trokhymchuk et al., 2024).

The current study shall help to understand if the sedimentary abyssal plains, one of the largest ecosystems on earth (Ramirez-Llodra et al., 2010), represent a barrier against long distance dispersal of certain meiobenthic and interstitial taxa like the *Gastrotricha* and *Tardigrada*. Such a knowledge will further sharpen our understanding about the role of isolated oceanic islands, archipelagos and seamounts for the dispersal and biogeography of marine meiobenthic organisms. We have studied the composition of meiobenthic higher level taxa of a selected subset of deep sea sediment samples from the northeast Atlantic (Iberian Basin and Canary Basin) taken with a multiple corer during expedition SO280 of the R/V Sonne. The recovered specimens of *Gastrotricha* and *Tardigrada* have been determined to species level and compared with data from relevant literature.

Materials and methods

Core samples with deep sea sediment were collected in the Northwest Atlantic (Fig. 1, Tab. 1) during the IceDivA1/SO280 expedition of the German R/V SONNE (Kieneke & Brix 2021, Brix et al. 2024). A multiple corer (MUC) with 12 independently closing acrylic glass tubes (Octopus GmbH, Hohenweststedt, Germany) was used as sampling gear for the deep-sea meiofauna. The inner radius of the core tubes is 4.75 cm, the sampled bottom area per core tube thereby covered 70.85 cm². After dismounting a core tube from the support frame of the MUC, the near bottom water was immediately poured over a 40 µm sieve. Subsequently, the filtrate containing the epibenthic fauna and a sediment slice of 5 cm height (sediment volume of ca. 354.25 cm³) was rinsed into a Kautex® wide neck container (1000 ml) with a roughly isosmotic aqueous solution of 7% MgCl₂ (w/v) using a spray bottle. The samples were left in the wet laboratory of the research vessel for about 10 minutes until fixation. The use of isosmotic magnesium chloride solution prior to fixation was to anesthetize soft-bodied meiofauna organisms in order to avoid body contractions through muscle spasms (Todaro & Hummon, 2008). For the fixation, a 37% and borax-buffered formaldehyde solution was added to the sample and the Kautex® wide neck container was filled up with filtered seawater to a final concentration of about 4% formaldehyde.

In order to separate the fixed meiofauna from the clayish sediment, the density gradient centrifugation was applied (Higgins & Thiel, 1988). For preparing a suspension with higher density than the organisms, we used the silica colloid Levasil®. An addition of Kaolin® should stabilize the sediment

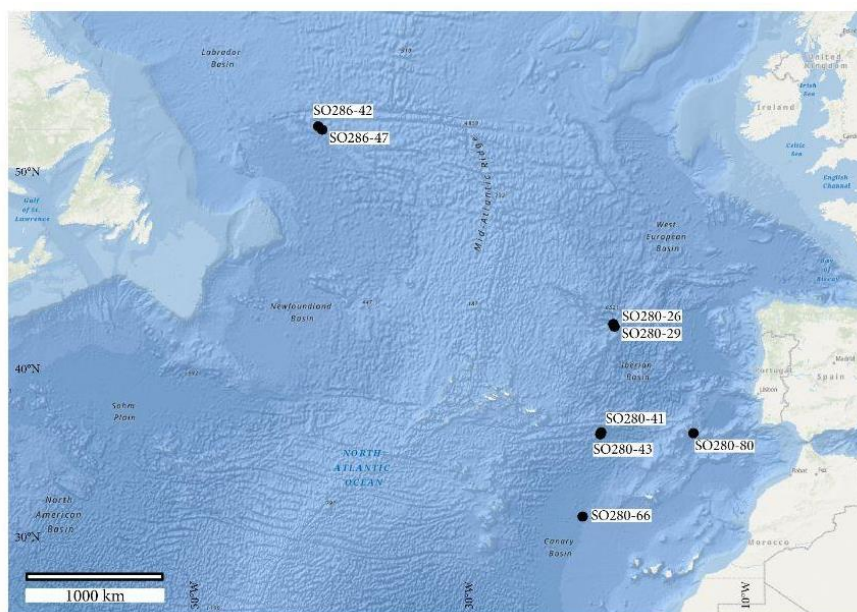


Figure 1. IceDivA/SO280 and IceDivA2/SO286 (see Trokhymchuk & Kieneke, 2024) expedition deployments (stations) we investigated. Map source: <https://www.ncei.noaa.gov/maps/bathymetry/>

Table 1. Selected deep-sea core samples (MUC) of expedition SO280 of which the meiofauna community was studied. Superscript letter G: core contained gastrotrichs, T: core contained tardigrades

station	latitude	longitude	depth	sea region
SO280-26, MUC 8 ^G	41° 57.540' N	018° 58.787' W	4904 m	Iberian Basin abyssal plain
SO280-29, MUC 6	41° 57.570' N	018° 58.823' W	4906 m	Iberian Basin abyssal plain
SO280-41, MUC 1 ^G	36° 02.059' N	019° 00.799' W	5485 m	Iberian Basin abyssal plain
SO280-43, MUC 9	36° 02.057' N	019° 00.832' W	5485 m	Iberian Basin abyssal plain
SO280-66, MUC 4 ^G	32° 01.989' N	022° 00.711' W	5121 m	Canary Basin; Madeira Abyssal Plain
SO280-80 MUC 2 ^T	36° 26.006' N	014° 00.025' W	4163 m	Iberian Basin; SE of Josephine Bank seamount

during the centrifugation, which was carried out three times at 3608 rpm. For sieving the supernatant containing the meiofauna organisms a mesh size of 40 µm was chosen. We added the dye Rose Bengal for a better recognition of the meiofauna organisms during sorting, which was carried out in Bogorov chambers (Bogorov, 1927) under dissecting microscopes with transmitted light illumination (Leica M80 or M125 stereo microscopes). We have investigated six MUC samples so far (Tab. 1), one from each of the six major working areas of expedition SO280 with bottom sampling (Kieneke & Brix 2021, Brix et al. 2024).

The single tardigrade specimen was stained with Acid Fuchsin and Congo Red 1:1 overnight for the further confocal laser scanning microscope (CLSM) examination with Leica TCS SP5 CLSM (DM5000B base). For this purpose, the specimen was mounted in pure glycerol on a temporary slide. We operated with the argon laser (488 nm) and the DPSS laser (561 nm). After CLSM investigation, the specimen was transferred to a glycerol drop on a slide surrounded with beeswax and paraffin mixture 1:2; covered with coverslip and heated until the wax melted (Trokhymchuk & Kieneke, 2024).

After careful investigation, photographing and filming with an Olympus BX53 light microscope equipped with DIC optics and an attached euromex HD Ultra digital camera, we carried out a well-established preparation method in order to prepare three gastrotrichs for the scanning electron microscope

(SEM) examination (see, e.g., Kieneke & Zekely, 2008, Kieneke et al., 2015, Trokhymchuk & Kieneke, 2024). The coverslip was carefully removed from the temporary slide and the specimen was transferred with an eyelash to a special cage, (invented by Dr. Wilko Ahlrichs) immersed in 40% ethanol (as in Trokhymchuk & Kieneke, 2024). Dehydration was carried out in steps of 10% to 100%, and finally dried in a Leica CPD300 critical point dryer. After removal from the cabinet, the specimen was placed on a round coverslip covered with a mounting resin (Tempfix, Plano GmbH, Wetzlar, Germany) and heated to about 50°C for 30 seconds to adhere the sample to the surface. The coverslip with the specimen glued to it was mounted on an aluminum stub. Gold-palladium coating was performed on the Bal-Tec SCD 050 sputter-coater operated within 150 seconds at 40 mA. SEM examination was conducted using a TESCAN VEGA3 SEM with an acceleration tension of 10 and 30 kV and both, the secondary and the backscattered electron detectors. Three specimens of gastrotrichs, each on individual SEM-stubs (specimens SO280-26-8_1v1, SO280-41-1_1v1, SO280-66-4_1v1 on stubs SN-240911-1, SN-240911-3 and SN-240911-2, respectively) are kept in the private collection of A. Kieneke, Senkenberg am Meer, Wilhelmshaven, Germany. The permanent slide with the tardigrade (SO280-80-2_1v1) is deposited in the Tardigrada collection of the Senckenberg Natural History Museum, Frankfurt am Main, Germany with the same permanent slide number but also with the SMF number 1311 (accessible via <https://search.senckenberg.de/aquila-public-search/search>). The occurrence record of the tardigrade was submitted to the GBIF database. For comparison with one of our gastrotrichs, a specimen of *Desmodasys* sp. langsethA collected from the central Arctic Langseth Ridge during the expedition PS101 with the research icebreaker "Polarstern" (Boetius & Purser, 2017) was likewise investigated with SEM (specimen PS101-194-3_7v98 on SEM-stub SN-200227-3).

Genus-level identification of the *Gastrotricha* was carried out with the aid of Kieneke et al. (2020). *Tardigrada* genus determination dealt with Fontoura et al. (2017). Species identification was made with taxonomic papers containing original species descriptions and redescrptions (see taxonomic part for references). For individuals that are not identified to any known species, we used a combination of the locality of first occurrence and a capital letter plus the prefix "sp." as a "working species name", e.g., "*Desmodasys* sp. iberianA" (unknown species reported from the Iberian Basin), instead of a usual naming of working species like simply "*Desmodasys* sp.1". This shall enable a clear and explicit reference of such working species in future comparative taxonomic studies (as already used in Hummon 2001-2010).

The figure plates were made in Adobe InDesign CS5.5 with single microscopic images, or using stacked images made with Picolay (www.picolay.de). The measurements were made according to the methodology of the original genus/species descriptions (see taxonomic part for references), using the light microscopic images and the image-processing software FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012).

Abbreviations used in the text below:

BL – body length, ec – external cirrus length, fu – furca length, hw – head width, ic – internal cirrus length, mc – median cirrus length, pc – primary clava length, TbA – anterior adhesive tubes, TbP – posterior adhesive tubes, tw – total (trunk) width, selV – leg IV sensory organ length, splV – leg IV coxal process length.

Results

Meiofauna communities

The meiofauna communities of the analysed samples consisted of Nematoda, Copepoda, Annelida (Polychaeta), Kinorhyncha and Ostracoda, with Nematoda and Copepoda as the first and second most abundant taxa (Tab. 2). Nauplii (potentially copepod larvae) were also more abundant than major taxa, while *Gastrotricha*, *Tardigrada* and Mollusca only occurred in few or single core samples and always with very low densities (Tab. 2).

Table 2. Densities (individuals per surface area of 10 cm²; one core per station) of meiofauna, Northeast Atlantic Ocean, expedition IceDivA/SO280.

Station	core	Nematoda	Copepoda	Nauplii	Annelida	Kinorhyncha	Ostracoda	Gastrotricha	Tardigrada	Mollusca
SO280-26	8	70.0	9.6	1.7	0.3	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0
SO280-29	6	86.8	7.3	7.9	1.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
SO280-41	1	97.7	4.8	5.9	1.4	0.6	0.4	0.1	0.0	0.1
SO280-43	9	74.2	4.1	3.5	0.8	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0
SO280-66	4	13.0	0.4	1.7	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
SO280-80	2	26.7	2.8	2.1	0.8	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0

Gastrotricha

Phylum Gastrotricha Metschnikoff, 1865

Order Macrodasyida Remane, 1925 [Rao and Clausen, 1970]

Family Turbanellidae Remane, 1926

Genus *Desmodasys* Clausen, 1965

Desmodasys* sp. *iberiana

Fig. 2 A – F, 3 A – D

1 adult (hermaphrodite)

Sample: SO280-26, 4904 m depth

Measurements: BL 310 μ m; hw 46 μ m; tw 60 μ m

Description: This *Desmodasys* has a roughly spindle-shaped, elongate body with an anterior end gradually narrowing towards the mouth opening (Figs. 2A-B, 3A-B). Posterior body end is drawn-out into a pair of lobes in a fin-like, acute-triangular shape of about 20 μ m length (Fig. 3A, C-D). However, only the right lobe was observable under the SEM, the left one seems to be broken off (Fig. 3A). As characteristic for the genus *Desmodasys*, adhesive tubes are only present in an anterior (TbA) and in a posterior group (TbP), but there are no further tubes along the body. There are about 22 TbA per body side arranged in a quite peculiar way: on each body side the TbA are grouped as a transverse row with a ventrolateral to ventral position. On the ventral side, there is only a narrow gap of about 15 μ m between both groups of TbA (Figs. 2C, 3A-B). At the external (lateral) end of each group, there are two elongated and thicker TbA of 25 μ m length, while all other TbA measure about 10 μ m (Figs. 2A, 3A-B). However, also at the inner (median) end of each group a few TbA seem to be slightly longer and thicker than the others (Fig. 3A-B). On the posterior lobes, there is a number of 14 TbP that measure up to 12.5 μ m in length (Fig. 3C-D). The specimen has a massive and about 120 μ m long myoepithelial pharynx that gradually increases in width from anterior to posterior (ca. 30 μ m diameter at the anterior part and 45 μ m in the posterior part, anterior to the pharyngeal bulbs). Close to the posterior end of the pharynx, there is a pair of pharyngeal bulbs leading to the pharyngeal pores. Due to the positioning of the specimen, the exact shape of the mouth opening was not determinable with certainty, but it leads to a spacious, cylindrical buccal cavity of about 12 x 15 μ m. The pharynx leads to the intestine that is more than 50 μ m wide and spacious in the middle third of the trunk and its epithelium contains a rather high abundance of refractive vesicles. Epidermal gland openings could be observed only under the SEM and only in the anterior end of the animal (Fig. 3A, B). This specimen of *Desmodasys* was an adult hermaphrodite with a mature and yolk-containing egg in a dorsal position of the posterior third of the trunk and paired testes in the middle third of the trunk. We were neither able to observe the pattern of ventral cilia under the light microscope, nor under the SEM. Cilia were obviously already lost during the centrifugation of the sample.

Remarks: So far, there are three described species in the genus *Desmodasys*: *D. phocoides* Clausen, 1965, *D. borealis* Clausen 2000, and *D. abyssalis* Kieneker & Zekely, 2008 (Clausen, 1965, 2000, Kieneker & Zekely, 2008). All these species have a quite similar appearance concerning their habitus, however, the two "shallow water species" *D. phocoides* and *D. borealis* are significantly larger than the deep-sea species *D. abyssalis* (see Kieneker & Zekely, 2008). A comparable body length, the absence of numerous and large epidermal glands along the entire body, and the shared occurrence in abyssal depth make the investigated specimen from expedition SO280 most similar to *D. abyssalis*. However, the number of anterior adhesive tubes in each tuft is much higher in the investigated specimen (22) than the number of TbA in the three known species (up to ten in *D. abyssalis*; 12-14 in *D. phocoides*; up to 16 in *D. borealis*). Furthermore, the pattern of two strongly elongated and thickened lateral-most TbA and the very narrow gap between both groups/rows of TbA distinguishes the specimen from SO280 from all known species of *Desmodasys* and especially from the most similar *D. abyssalis*. Since these character differences are significant, we cannot consider this individual to be a representative of any known species and regard it as a member of a new species of *Desmodasys*. Although species descriptions of Gastrotricha based on single specimens are frequently being carried out (e.g., Kieneker, 2010, Kieneker & Todaro, 2021), we refrain from doing so in this case because of the poor condition of the specimen and because there are further core samples available from the SO280 expedition that most likely contain further specimens.

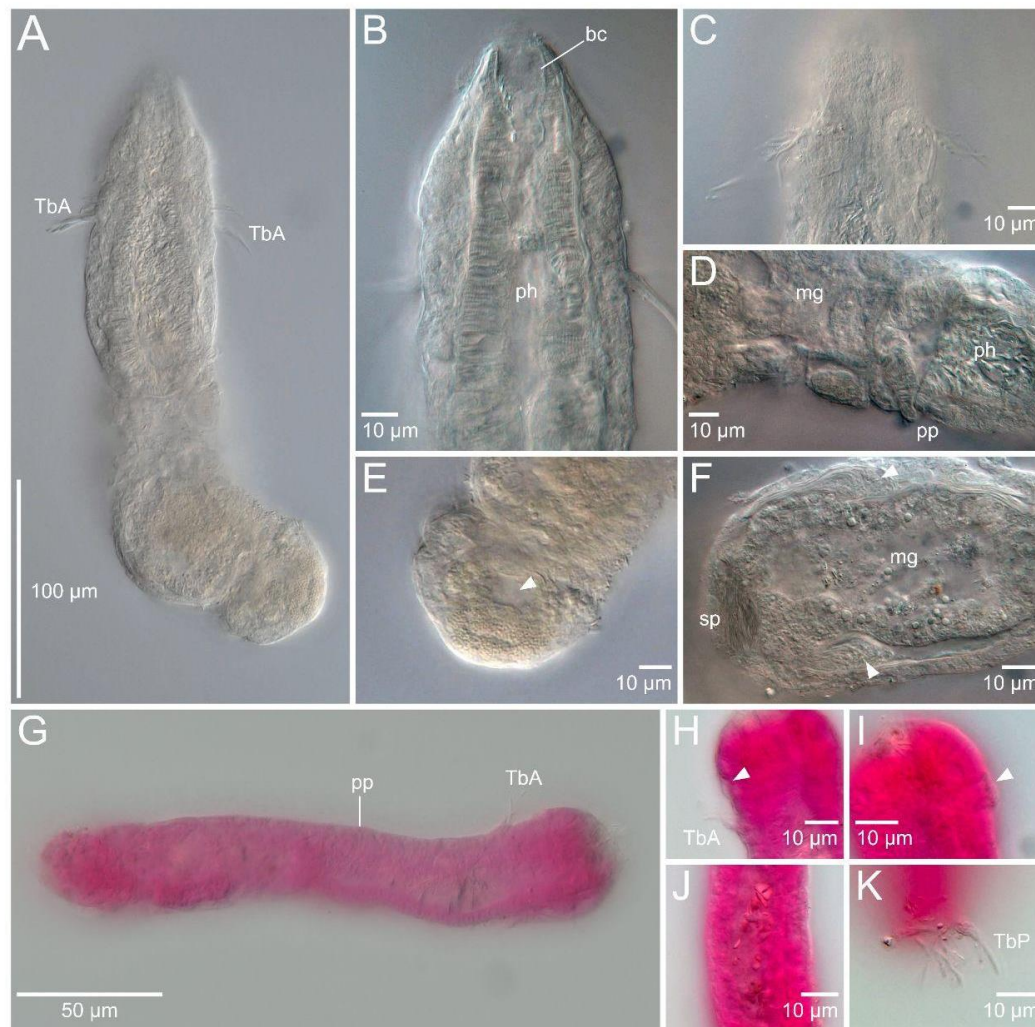


Figure 2. *Desmodasys* sp. iberianA, adult (A – F) and *Desmodasys* sp. langsethA, juvenile (G – K). A habitus; B anterior end; C anterior adhesive tubes; D pharynx region; E oocyte, note the nucleus (arrowhead); F midgut region, note testis (arrowheads); G juvenile, habitus; H anterior end, note sensory device (arrowhead); I anterior end, note sensory device (arrowhead); J debris in midgut; K posterior adhesive tubes. A – K light microscopy (DIC). Abbreviations: bc – buccal cavity; mg – midgut; ph – pharynx; pp – pharyngeal pore; sp – spermatozoa; TbA – anterior adhesive tubes; TbP – posterior adhesive tubes.

***Desmodasys* sp. langsethA**

Fig. 2 G – K, 3 E – H

1 juvenile

Sample: SO280-66, 5121 m depth

Measurements: BL 192 µm; hw 35 µm; tw 28 µm

Description: This *Desmodasys* has a cylindrical, elongate body. The shape of the anterior end cannot be described with certainty, because the buccal cavity seems to be contracted and therefore it appears truncated (Figs. 2G, 3E-F). Posterior body end is drawn-out into a pair of lobes in a fin-like, acute-triangular shape of about 10 µm length (Fig. 3E, G). In this case, only the left lobe was observable under the SEM, the right lobe was folded down (Fig. 3G). As characteristic for the genus *Desmodasys*, adhesive tubes are only present in an anterior (TbA) and in a posterior group (TbP), but there are no further tubes along the body. There are only 5 TbA per body side and again both most external (lateral) tubes are strongly elongated and thicker and of 10 and 15 µm length, while the three internal (median) TbA measure only up

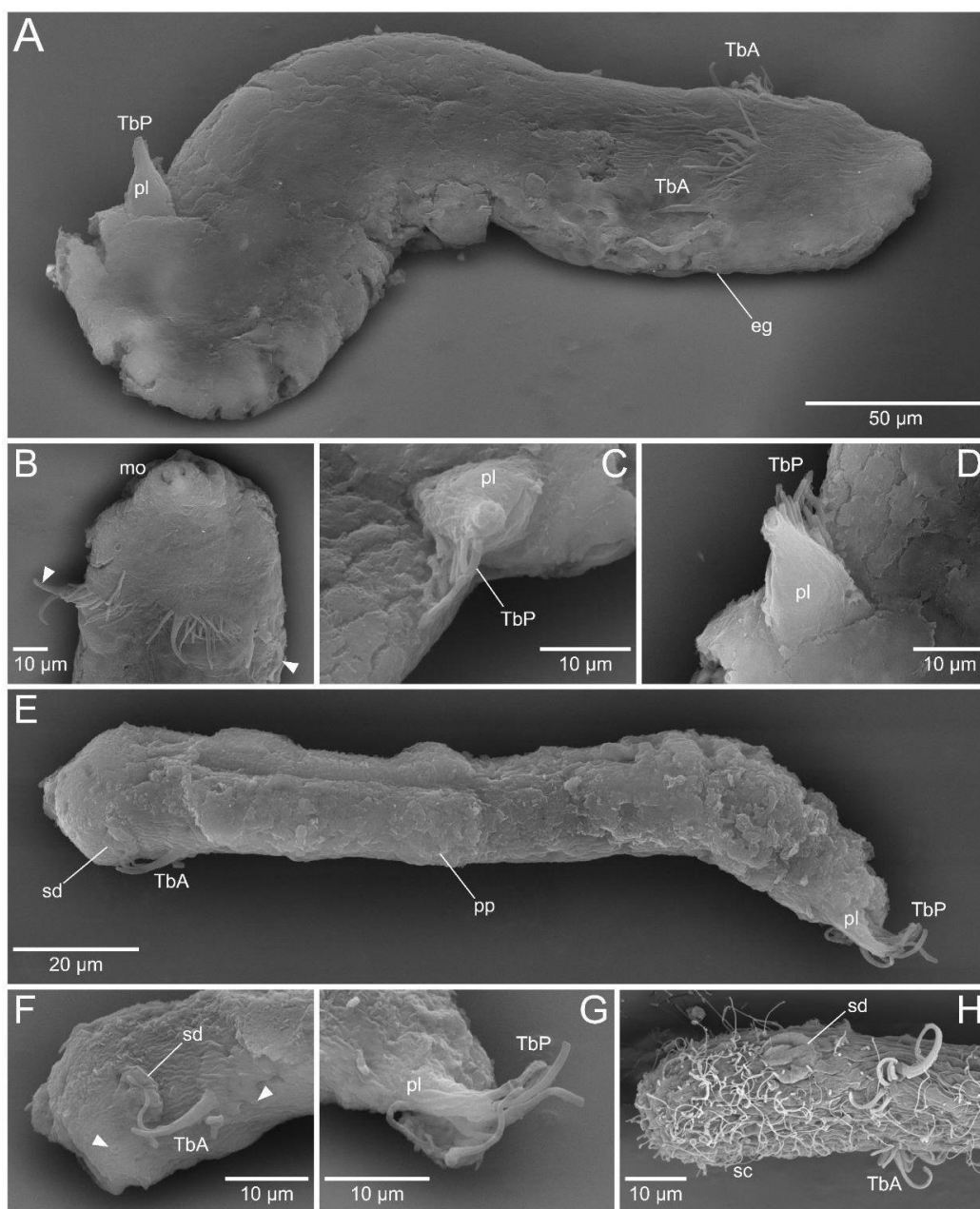


Figure 3. *Desmodasys sp. iberiana* A, adult (A – D) and *Desmodasys sp. langseth* A, juvenile (E – G), *Desmodasys sp. langseth* A SN-200227-3, adult (H). **A** habitus; **B** anterior end, note bigger adhesive tubes (arrowheads); **C** posterior adhesive tubes; **D** posterior adhesive tubes; **E** juvenile, habitus; **F** anterior end, lateral view, note epidermal glands (arrowheads); **G** posterior adhesive tubes; **H** *Desmodasys sp. langseth* A from “type locality” (A. Kienek private unpublished data). A – H scanning electron microscopy (SEM). Abbreviations: eg – epidermal gland; mo – mouth opening; pl – posterior lobe; pp – pharyngeal pore; sc – sensory cilia; sd – sensory device; TbA – anterior adhesive tubes; TbP – posterior adhesive tubes.

to 5 µm (Figs. 2G-H, 3E-F). There are a number of 6 TbP that measure up to 14 µm in length and are arranged on the inner margins of the posterior lobes (Figs. 2K, 3E, G). It was almost impossible to study internal organs of this specimen of *Desmodasys*, however, there were definitely no gonads indicating a juvenile or subadult specimen. Deduced from the position of the pharyngeal pores (Fig. 3E), the pharynx

occupies the complete anterior half of the animal (Fig. 3E), another indication of the adolescence of this specimen. Although no proper information on the gut system can be made, we were able to document a peculiarity related to it: in a mid trunk position, there was an accumulation of cristaline splinters that are most likely debris from food items (Fig. 2J). Epidermal gland openings were detected under the SEM and again in the anterior part of the animal (Fig. 3F). As in the other specimen, we were neither able to observe the pattern of ventral cilia under the light microscope, nor under the SEM. Cilia were obviously already lost during the centrifugation of the sample. The most peculiar structure of this second specimen of *Desmodasys* is a protrusion on both sides of the anterior body end, anterior to the TbA and in a slightly more dorsal position (Figs. 2H-I, 3F). This structure consists of a curved bulge in a dorso-ventral alignment and one shorter bulge branching from the center of the curved bulge and projecting towards anterior. On the left body side, it has therefore the shape of a rounded and mirrored capital “Є” (Ukrainian letter [je]) (Fig. 3F). This presumably chemosensory organ has a size of about 5 x 10 µm.

Remarks: As already mentioned above, due to the much smaller body size and the absence of large epidermal glands along the whole body, also the second specimen of *Desmodasys* definitely does not belong to the two “shallow water species” *D. phocoides* and *D. borealis*. Concerning the number of TbA and TbP, this second specimen possesses the least number of adhesive tubes compared to all three described species of *Desmodasys* and to the other specimen of expedition SO280 (see above). We need to keep in mind, though, that we here deal with a subadult specimen and measurements and numbers of adhesive tubes most likely differ in adult specimens. With the first specimen it shares the two elongated external TbA, however, this second specimen is unique in the possession of the peculiar Є-shaped structure on the sides of the anterior body end, presumably chemosensory organs. We need to emphasize that sample material from expedition PS101 of the German research icebreaker “Polarstern” to the Arctic Langseth Ridge (Boetius & Purser 2017) contained numerous specimens of *Desmodasys* with a similar putative sensory structure. A SEM image of one of those specimens is shown in Fig. 3H for comparison (private collection of A. Kieneker, unpublished data). Due to the striking similarity, we suggest this individual also belongs to the yet undescribed species “*Desmodasys* sp. langsethA” from the Central Arctic Basin. We refrain again from making a formal taxonomic species description, because of the poor condition of the specimen and because there are many more specimens from this undescribed species in a much better condition and preservation from the sample material of expedition PS101.

The midgut content is most likely non-organic debris of either calcareous or siliceous matter and could be foraminifera shell parts (see Traunspurger & Majdi 2017).

Order Chaetonotida Remane, 1925 [Rao and Clausen, 1970]

Family Muselliferidae Leasi & Todaro, 2008

Genus *Musellifer* Hummon, 1969

***Musellifer* sp. iberianA**

Musellifer aff. *tridentatus* Kanneby, Atherton & Hochberg, 2014

Fig. 4, 5

1 juvenile/subadult

Sample: SO280-41, 5485 m depth

Measurements: BL 96 µm; fu 64 µm; hw 33 µm; tw 33 µm

Description: The single specimen found so far in one core sample of expedition SO280 has the typical habitus of a member of the genus *Musellifer*, with an anteriorly tapering head region, a slightly broader and spindle-shaped trunk region, both regions separated by a distinct constriction, and a posterior furca with two elongate branches/TbP (Figs. 4A, 5A). The total body length is about 96 µm, however, due to a strong contraction and bending of the animal this measurement is biased. Since we could not trace any patterns of eggs or sperm, this is most likely a juvenile specimen. The conical anterior end (“head”) is densely covered with cilia, the typical “muzzle” of species of the genus *Musellifer* (Fig. 4A-B, D). These cilia of the anterior body end were mostly lost during the preparation for SEM (Fig. 5A-B). Inside the head region there is the muscular pharynx with a triradiate lumen (Fig. 4E), a distinct constriction at the level of the junction between pharynx and midgut demarcates the border between “head” and trunk (Figs. 4A-E, 5A,

D). The body surface of this specimen of *Musellifer* is covered by very thin and tight-fitting simple spined scales that continue on the furcal branches including the whole TbP (Figs. 4C, 5A, C-F). Each scale of the

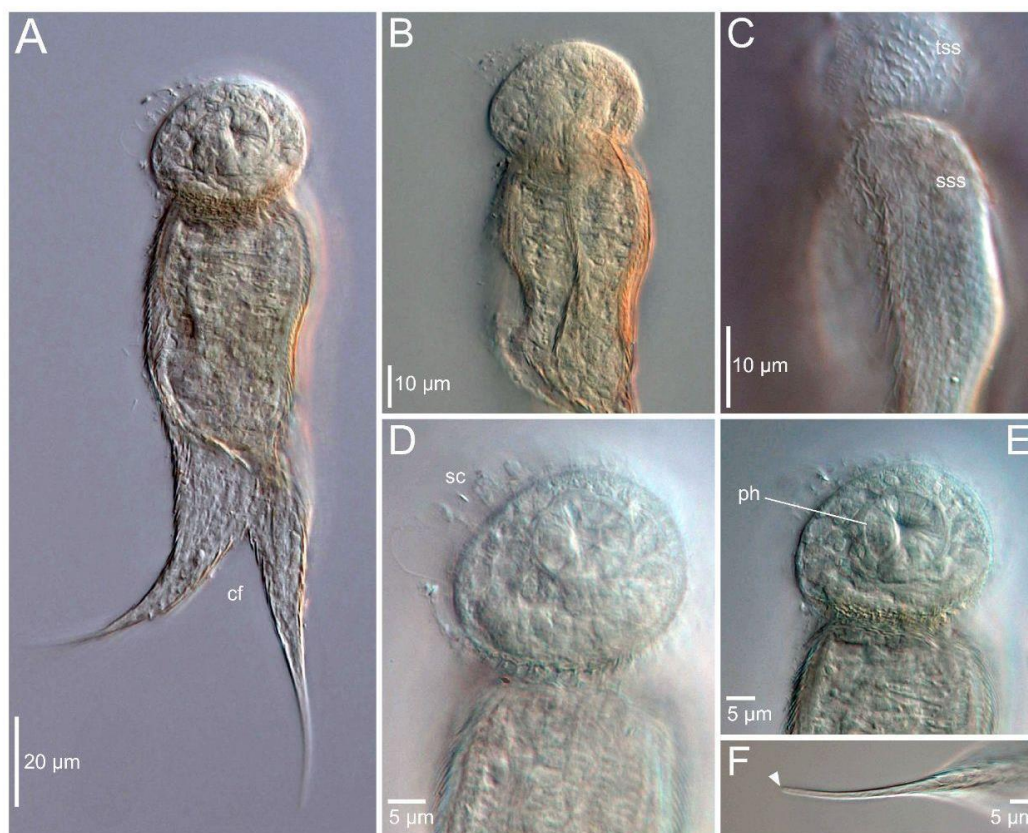


Figure 4. *Musellifer* sp. iberianaA (*Musellifer* aff. *tridentatus*), juvenile. **A** habitus; **B** note two ventral locomotory cilia bands; **C** body scales; **D** anterior end; **E** anterior end; **F** tube of caudal furca, note scale simple spine (arrowhead). **A – F** light microscopy (DIC). Abbreviations: cf – caudal furca; ph – pharynx; sc – sensory cilia; sss – simple spined scales; tss – trident-shaped scales.

trunk section has a convex anterior edge that is only observable under the light microscope due to the broad overlap of each scale by its preceding scale (e.g. Fig 4D). The free posterior edge of the trunk scales describes a rather rhombic shape, but with a concave central indentation. The edges of this indentation are drawn-out into short pinnacles and in the center of the indentation arises a short and flexible appearing spine (Fig. 5A, C-D). This basic “stingray-shape” of the trunk scales also applies to the scales of the furcal base and those of the actual TbP, however, these scales are gradually decreasing in width (3 to 3.5 µm in the trunk scales, 2.5 to 3 µm in the furcal scales, 0.5 to 1.5 µm in the scales covering each TbP; Fig. 5E-F). On the trunk section, there are about 10 longitudinal columns of scales with 25 scales in each column on the ventral side. Such counts of the dorsal side are not possible due to the position of the specimen on the SEM-stub, however, we expect similar numbers of columns and scales. The peculiarity of this specimen of *Musellifer* is a “collar” of strong and curved spines on the head section. Here, about 12 µm from the anterior end of the animal, a sharp line demarcates the “muzzle” from this collar of spines (Figs. 4C, 5A-B). The collar is about 8 to 10 µm wide (anterior-posterior direction) and surrounds the whole body like a belt. The shape of the basal scales is difficult to determine even with the high resolution of the SEM. This is due to a strong overlap of single scales and much likely also because of the contraction of the specimen. However, the shape seems to be crest-shaped as in several species of the gastrotrich genus *Chaetonotus* (Fig. 5B). The strongly curved and claw-like spines are about 2 µm long. There are about 18 longitudinal columns of spines/scales with 10 scales in each column on the ventral side.

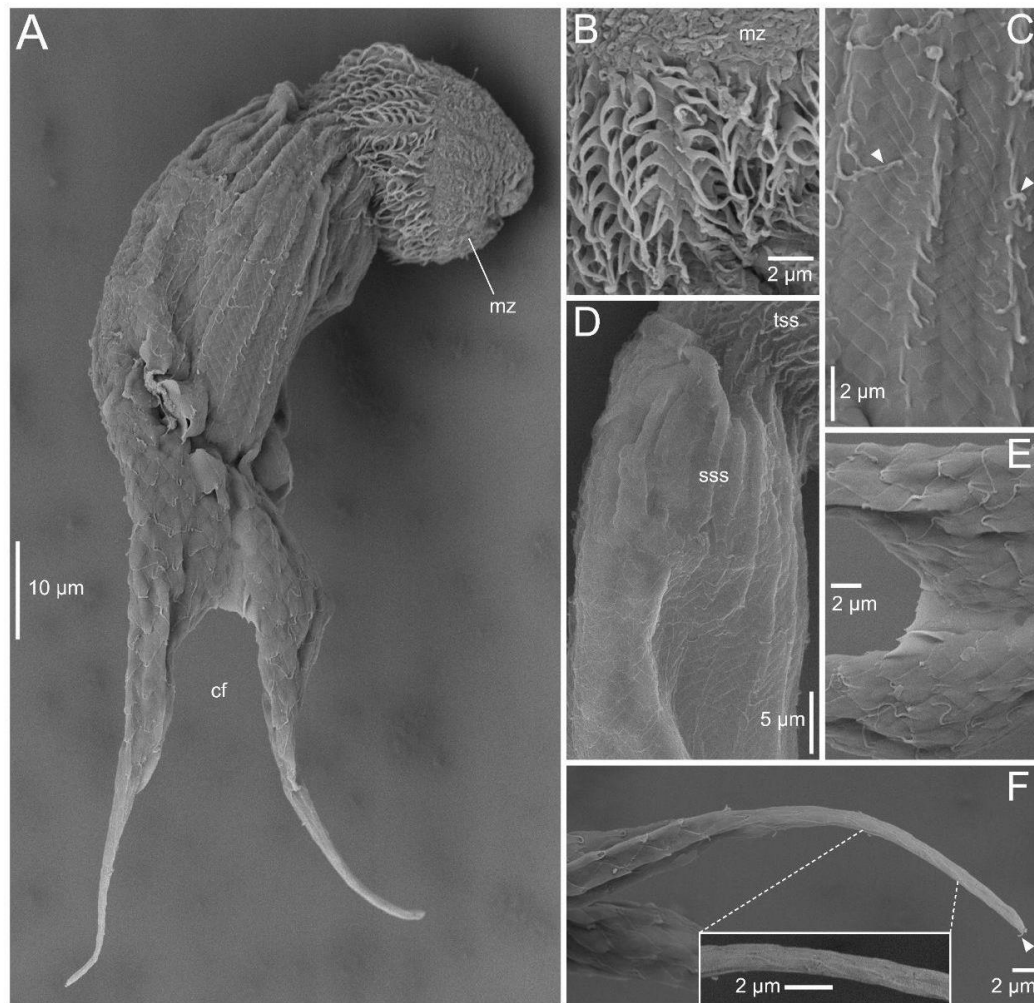


Figure 5. *Musellifer* sp. iberiana (*Musellifer* aff. *tridentatus*), juvenile. **A** habitus; **B** neck region spined scales; **C** ventral body scales, note locomotory cili (arrowheads); **D** lateral side, neck-body region; **E** caudal furca scales; **F** tube of caudal furca, note scale simple spine (arrowhead), closeup area marked with dashed lines. A – F scanning electron microscopy (SEM). Abbreviations: cf – caudal furca; mz – muzzle; sss – simple spined scales; tss – trident-shaped scales.

Remarks: So far, five described species of the genus *Musellifer* are known. Four of these species, namely *Musellifer delamarei* (Renaud-Mornant, 1968), *Musellifer sublitoralis* Hummon, 1969, *Musellifer reichhardtii* K  nneby, Atherton & Hochberg, 2014 and *Musellifer tridentatus* K  nneby, Atherton & Hochberg, 2014 occur in shallow sublittoral sandy sediments, while *Musellifer profundus* Vivier, 1974 is described and reported from deeper offshore sediments (e.g. Vivier, 1974, Sergeeva et al., 2019), but also from shallower bottoms (e.g., Leasi & Todaro, 2010). However, most of the species of *Musellifer*, including *M. profundus*, are characterized by a quite homogeneous cuticular armature, meaning there is only one type of scales on the whole body surface, only differing in size depending on the body region (head versus neck versus trunk etc.). It is only *M. tridentatus* that has an area of so-called trident-shaped scales on the anterior-most part of its head (K  nneby et al. 2014). In this regard, the specimen found in a core sample of expedition SO280 is most similar to *M. tridentatus*. However, there are three significant differences between both morphotypes: 1) The area with the different scale type of the specimen of the Iberian Basin forms a “collar” around the posterior part of the head section, while in *M. tridentatus* this area is in the anterior-most part of the head, at a comparable position where species of the freshwater-dwelling taxon Chaetonotidae possess the unpaired cephalion and paired pleurae. 2) The shape of these scales differs considerably, with the strong and curved spines in the deep-sea specimen and smaller scales with three keels in *M. tridentatus*.

3) *M. tridentatus* has a pair of peculiar elongated lateral spines about 20 μm anterior to the furca; such elongated spines are not present in the *Musellifer* found during expedition SO280. We again refrain from making a formal taxonomic species description, as in the other two cases, because of the poor condition of the specimen, which is strongly contracted and distorted. Furthermore, it is a juvenile specimen lacking taxonomically important reproductive traits (see discussion of Leasi & Todaro, 2010). In addition, there are further core samples available from the SO280 expedition that most likely contain further specimens of this undescribed *Musellifer*.

Tardigrada

Phylum Tardigrada Doyère, 1840

Class Heterotardigrada Marcus, 1927

Family Coronarctidae Renaud-Mornant, 1974

Genus *Coronarctus* Renaud-Mornant, 1974

Coronarctus dissimilis Gomes-Júnior, Santos, da Rocha, Santos & Fontoura, 2020

Fig. 6

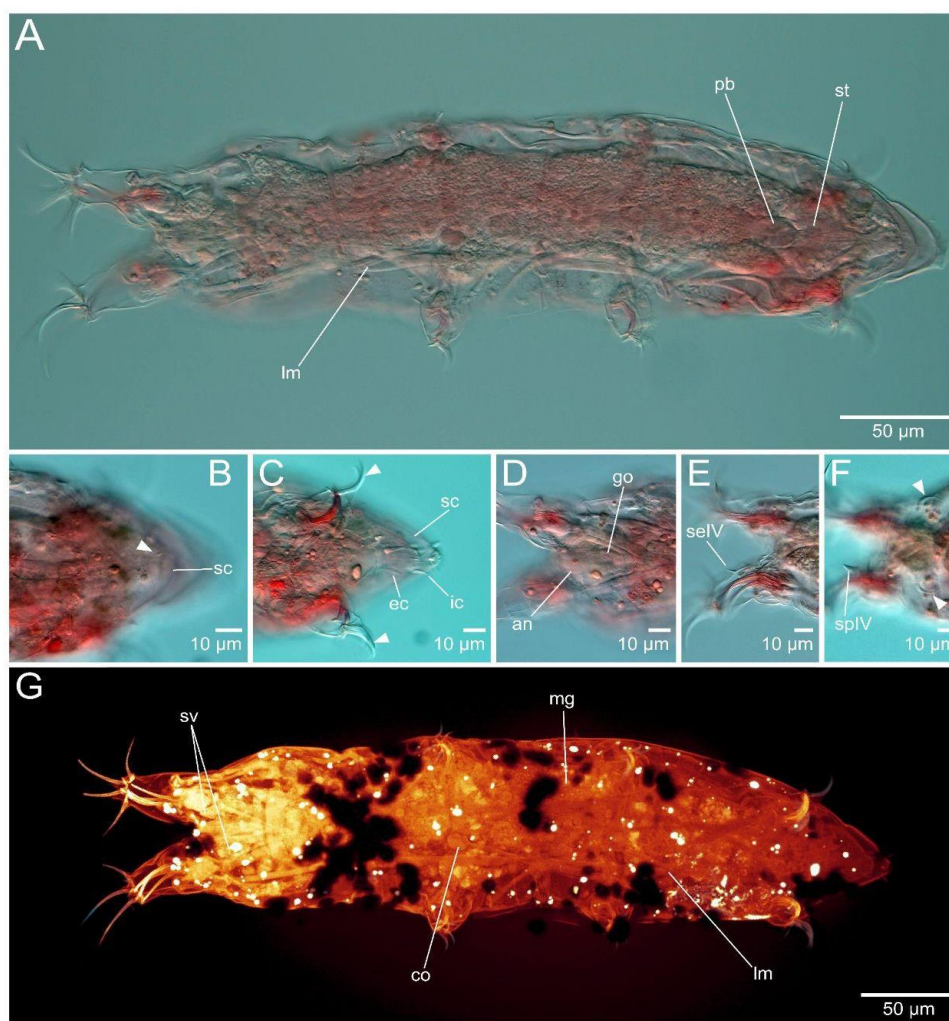


Figure 6. *Coronarctus dissimilis*, male. **A** habitus; **B** head, dorsal view, note median cirrus (arrowhead); **C** head, ventral view, note bigger internal claws on the leg I (arrowheads); **D** posterior body end, ventral view; **E** legs IV; **F** legs IV, note cirri E (arrowheads); **G** internal anatomy. **A – F** light microscopy (DIC), **G** – confocal microscopy (CLSM). Abbreviations: an – anus; co – coelomocyte; ec – external cirrus; go – gonopore; ic – internal cirrus; lm – longitudinal muscles; mg – midgut; pb – pharyngeal bulb; sc – secondary clava; selV – leg IV sensory organ; splV – leg IV coxal process; st – stylet, sv – seminal vesicle.

1 male

Sample: SO280-80, 4163 m depth

Measurements: BL 346 μm ; tw 89 μm ; pc 4.5 μm ; ec 6.5 μm ; ic 6 μm ; mc 3 μm ; splV 9 μm ; selV 5 μm .

Description: Adult *Coronarctus* male with robust cylindrical, elongated body with smooth cuticle. Large longitudinal muscles are visible (Fig. 6A, G). Pharyngeal bulb 19 x 12 μm and stylets present (Fig. 6A). Primary clavae are oval and short. Secondary clavae lobated: they dorsally diverge before median cirrus insertion (Fig. 6B); ventral part of the secondary clava surrounds the external cirrus (Fig. 6C) and has a second lobe. Leg I claws show heteromorphy with internal claws bigger than external (Fig. 6C). Spine-like sensory organs IV (Fig. 6E) and leg IV coxal processes (Fig. 6F) are present. Accessory spines on the claws of each leg. Male has a well-observable anus and gonopore (Fig. 6D). Two lateral seminal vesicles around gonopore present (Fig. 6G).

Remarks: This individual belongs to the *Coronarctus tenellus* group (Gomes-Júnior et al. 2020) due to the short cephalic cirri (less than 10 μm) and claws on leg IV much longer than claws on legs I-III. The morphological data corresponded to the original description by Gomes-Júnior et al. 2020. Species specific traits include the insertion of median cirrus between diverged posterior part of secondary clavae; shape of secondary clavae from the ventral view; claws heteromorphy and presence of apical accessory spine on each claw.

Discussion

Meiofauna densities

Meiofauna communities of the northeast Atlantic deep-sea (Iberian and Canary Basins) showed a rather low density value for nematodes (max. of 97.7 ind./cm²) and copepods (max. of 9.6 ind./cm²), compared to shallower Atlantic sites such as the Condor seamount at 1900 m depth. At sampling site 8, for instance, nematode densities reached 152.6 ind./cm² and copepod densities 10.78 ind./cm² (Zeppilli et al., 2013). However, the general trend of nematode and copepod density decreasing with depth is already known, e.g., from the Bay of Biscay where nematode density at 4415 m depth (station 09-5) was 152 ind./cm² and copepod density was 15 ind./cm²; but at 4460 m depth (station 69-5) it was only 5 ind./cm² and 1 ind./cm², accordingly (Dinet & Vivier, 1977). The density values of "minor" meiofauna taxa in our samples is highly similar to those of other deep sea studies in the closest regions (Vincx et al., 1994).

Biogeographic considerations

The major aim of the current study was a further step towards clarifying the role of the abyssal plains as possible barriers against long-distance dispersal of certain meiofauna taxa, i.e. the *Gastrotricha* and *Tardigrada*. If the deep-sea bottom would not be a barrier, long-distance dispersal could purely happen by population growth and therewith through range expansion of species. But if these biggest ecosystems of our planet indeed function as barriers against dispersal, this would in turn underline the outstanding role of seamounts and oceanic islands promoting long-distance dispersal of (shallow water) meiofauna as "stepping stones" or "staging posts" (George, 2013).

As already mentioned in the introduction, studies of gastrotrich and tardigrade communities from seamount and island shelf biotopes on genus or even species level are still rare. However, this limited number of studies already yielded a genus-level diversity of 28 genera of *Gastrotricha* from the Faroe Bank, São Miguel and Lanzarote, with 19 genera of *Macrotrachida*, 8 genera of *Paucitubulatinia* and the genus *Neodasys* (Araujo & Hochberg, 2021, Clausen, 2004, Martínez et al., 2019, Todaro et al., 2019; see Tab. 3). In contrast to this, we so far only know two macrotrachidan genera, i.e. *Desmodasys* and *Thaumastoderma*, and a single paucitubulatinian genus, *Musellifer*, from deeper offshore sediments to bathyal and abyssal depths (Vivier, 1974, Kieneke & Zekely, 2008, Kieneke, 2010, Sergeeva et al., 2019, current study). Apart from *Desmodasys*, the two other genera were also recorded from the Faroe Bank, São Miguel and Lanzarote (*Thaumastoderma*, see Tab. 3), or at least from Lanzarote (*Musellifer*, see Tab. 3), but *Desmodasys* is known from coastal shallow sublittoral sediments of Norway (Clausen, 1965, 2000). However, if we have a look on the species level, there is no overlap between deep-sea versus seamount, island, and continental-coastal biotopes: known deep-sea species of *Musellifer* are so far *M. profundus* and *M. sp. iberianA* (Vivier, 1974, Sergeeva et al., 2019, current study), but on Lanzarote *M. delamarei* was recorded (Martínez et al., 2019, Todaro et al., 2019); known deep-sea species of *Desmodasys* are so far *D. abyssalis*, *D. sp. iberianA* and *D. sp. langsethA* (Kieneke & Zekely, 2008, current study), but from the coastal sublittoral of Scandinavia *D. phocoides* and *D. borealis* were recorded (Clausen, 1965, 2000); the only known deep-sea species of *Thaumastoderma* is so far *T. antarctica* (Kieneke, 2010), but from the seamount and island biotopes *T. moebjergi* Clausen, 2004 and *T. mediterraneum* Remane, 1927 were

recorded (Clausen, 2004, Martínez et al., 2019, Todaro et al., 2019). Although the data concerning the Gastrotricha can only be regarded as highly preliminary – including the present study there are so far only three

Table 3. Occurrences of marine genera of Gastrotricha on seamount and island biotopes and at the deep-sea bottom. Note that several more genera occur at the Norwegian coast, but, only the genus *Desmodasys* is relevant for the aim of this study.

genus	Faroe Bank ¹	Norwegian west coast ^{2, 3}	São Miguel (Azores) ⁴	Lanzarote (Canary Islands.) ^{5, 6}	deep-sea ^{7, 8, 9}
<i>Dactylopodola</i>	x			x	
<i>Dendrodasys</i>				x	
<i>Cephalodasys</i>				x	
<i>Mesodasys</i>				x	
<i>Lepidodasys</i>	x		x	x	
<i>Macrodasys</i>			x	x	
<i>Urodasys</i>				x	
<i>Crasiella</i>			x	x	
<i>Megadasys</i>			x	x	
<i>Acanthodasys</i>			x	x	
<i>Diplodasys</i>	x		x	x	
<i>Oregodasys</i>	x		x	x	
<i>Pseudostomella</i>	x			x	
<i>Ptychostomella</i>	x			x	
<i>Tetranchyroderma</i>	x		x	x	
<i>Thaumastoderma</i>	x		x	x	x
<i>Paraturbanella</i>			x	x	
<i>Turbanella</i>			x		
<i>Desmodasys</i>		x			x
<i>Xenodasys</i>					
<i>Neodasys</i>				x	
<i>Aspidiophorus</i>				x	
<i>Chaetonotus</i>			x	x	
<i>Halichaetonotus</i>	x		x	x	
<i>Heterolepidoderma</i>				x	
<i>Musellifer</i>				x	x
<i>Draculiciteria</i>				x	
<i>Heteroxenotrichula</i>				x	
<i>Xenotrichula</i>				x	

Sources: 1 - Clausen (2004); 2, 3 - Clausen (1965, 2000); 4 - Arujo & Hochberg (2021); 5, 6 - Martínez et al. (2019), Todaro et al. (2019); 7, 8, 9 - Kieneke & Zekely (2008), Kieneke (2010), current study

publications of deep sea plus two publications of deeper offshore gastrotrichs on species level – we can still already draw an important conclusion: the overwhelming fraction of marine gastrotrich genera that occur in shallow to deeper sublittoral sediments (mostly sand) do not occur in deep-sea sediments of bathyal to abyssal depths! And this is, in our opinion, already a strong indication that the deep sea represents indeed a barrier against long-distance dispersal of many species of marine Gastrotricha.

Returning to tardigrades from the Faroe Bank, Condor Seamount and Great Meteor Seamount Plateau, the genus-level diversity of these locations sums up to 15 tardigrade genera (Kristensen & Renaud-Mornant, 1983, Hansen et al., 2001, Jørgensen & Kristensen, 2001, Hansen et al., 2003, Hansen et al., 2012, Kristensen et al., 2015, Tchesunov, 2018, Hansen & Kristensen, 2021). Among them are 5 genera (*Farostygartus*, *Higginsarctus*, *Rhomoarctus*, *Parmursa* and *Coronarctus*) that can be called “deep-sea taxa”, because most of their species are known from the bathyal zone and even deeper (Kaczmarek et al., 2015). However, the species *Coronarctus dissimilis* was not present in samples from these shallow localities. *Coronarctus dissimilis* is so far recorded from the Campos Basin, Brazil, at 1300 m depth (Gomes-Júnior et al., 2020), the Newfoundland Basin at 3685 m depth (Trokhymchuk & Kieneke, 2024) and from the Cape Basin at 2981 m depth (Trokhymchuk et al., 2024). In the current study we report this species from 4163 m depth. This new record extends the range of geographic distribution of this species and enlarges the bathymetric distribution as well. All these records may indicate an amphi-Atlantic distribution of *C. dissimilis* and likewise confirm it as a true deep-sea species. But are underwater features such as the mid-oceanic ridges obstacles against the distribution of this species/genus? Comparing the anatomy of *Coronarctus* to *Tholoarctus*, which can potentially float in the water column (as mentioned in the introduction), species of *Coronarctus* doesn't have any special traits for buoyancy. On the other hand, its vermiform body and huge longitudinal muscles favor better movement in dense substrates. Comparable patterns are also known for another species of *Coronarctus*: *Coronarctus laubieri* Renaud-Mornant, 1987 was found at the Bay of Biscay abyssal plain (Renaud-Mornant, 1988), but also at the Gulf of Mexico (Romano et al., 2011), Potiguar Basin and Campos Basin, Brazil (Gomes-Júnior et al., 2020), all records also from abyssal depths. We assume that the “meiofauna paradox” affects the genus *Coronarctus* and its species less, at least in the Atlantic Ocean, a conclusion similar to that of Westheide et al. (2002). With 5 of 15 tardigrade genera that occur in both shallow sediments of island shelves and seamount summits of the mentioned northeast Atlantic area, and also at the deep-sea bottom (see above), the ratio is less evident as in the *Gastrotricha*, but it is still two thirds of the genera from island shelves and seamounts that do not occur in the deep-sea. Therefore the abyssal plains represent a severe barrier against long distance dispersal also for several genera of the *Tardigrada*. However, the example of *Coronarctus* demonstrates that we need to look at the level of species in order to distinguish between exclusive deep-sea and exclusive shallow-water taxa, or if species can occur in a wide range of depth layers such as *Batillipes wyedeleinorum* Bartels et al., 2024, *Angursa lingua* Bussau, 1922 or *Tholoarctus olesenii* Jørgensen et al., 2014 (see Trokhymchuk et al., 2024).

Acknowledgments

The authors are grateful to the whole scientific and nautical crews of the expedition SO280. The cruise and the related project “IceDivA” was founded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF). Many thanks to Uliana Pysarenko and Jannes Lehmann for help in meiofauna sorting. This research is supported by DAAD found for R. T. This is publication number 71 that uses data from the Senckenberg am Meer Confocal Laser Scanning Microscope Facility (SGN-SaM-cLSM). The authors are grateful to Y. Kiosya for reviewing and improving the manuscript.

References

- Armonies, W., Reise, K. (2000). Faunal diversity across a sandy shore. *Marine Ecology Progress Series* 196, 49-57. <https://doi.org/10.3354/meps196049>
- Bartels, P. J., Fontoura, P., Nelson, D. R., Kaczmarek, Ł. (2024). Intertidal and shallow subtidal marine tardigrades from the British Virgin Islands with a description of a new *Batillipes* (Heterotardigrada: Batillipedidae). *Marine Biodiversity*, 54(4), 60. <https://doi.org/10.1007/s12526-024-01450-8>
- Boetius, A., Purser, A. (2017). The Expedition PS101 of the Research Vessel POLARSTERN to the Arctic Ocean in 2016. In *Berichte zur Polar- und Meeresforschung = Reports on Polar and Marine Research* (Vol. 706, pp. 1-230). Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung. https://doi.org/10.2312/BzPM_0706_2017
- Bogorov, W. G. (1927). Zur Methodik der Bearbeitung des Planktons. (Eine neue Kammer zur Bearbeitung des Zooplanktons). *Russian Hydrobiological Zhurnal*, 6, 193-198.
- Brix, S., Taylor, J., George, K. H., Tewes, S., Jenssen, C., Shipboard Scientific Party. (2024). Icelandic marine Animals: Genetics and Ecology meets Diversity along latitudinal gradients in the deep sea of the Atlantic Ocean, Cruise No. SO280, 08.01.2021 - 07.02.2021, Emden (Germany) - Emden (Germany). In

- SONNE-Berichte (SO280, pp. 1-36). Begutachtungspanel Forschungsschiffe. https://doi.org/10.48433/cr_so280
- Bussau, C. (1992). New deep-sea Tardigrada (Arthrotardigrada, Halechiniscidae) from manganese nodule area of the eastern South Pacific. *Zoologica Scripta*, 21(1), 79-91. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.1992.tb00311.x>
- Clausen, C. (1965). *Desmodasys phocoides* gen., et sp. n., family Turbanellidae (Gastrotricha Macrodasypoidea). *Sarsia*, 21(1), 17-21. <https://doi.org/10.1080/00364827.1965.10409557>
- Clausen, C. (2000). Gastrotricha Macrodasypoda from the Tromsø region, northern Norway. *Sarsia*, 85(5-6), 357-384. <https://doi.org/10.1080/00364827.2000.10414588>
- Cerca, J., Purschke, G., Struck, T. H. (2018). Marine connectivity dynamics: clarifying cosmopolitan distributions of marine interstitial invertebrates and the meiofauna paradox. *Marine Biology*, 165, 1-21. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3383-2>
- Cerca, J., Meyer, C., Purschke, G., Struck, T. H. (2020). Delimitation of cryptic species drastically reduces the geographical ranges of marine interstitial ghost-worms (*Stygocapitella*; Annelida, Sedentaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 143, 106663. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106663>
- Derycke, S., Remerie, T., Backeljau, T., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M., Moens, T. (2008). Phylogeography of the *Rhabditis* (*Pellioiditis*) *marina* species complex: evidence for long distance dispersal, and for range expansions and restricted gene flow in the northeast Atlantic. *Molecular ecology*, 17(14), 3306-3322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03846.x>
- Dinet, A., Vivier, M. H. (1977). Le méiobenthos abyssal du Golfe de Gascogne I. Considérations sur les données quantitatives. *Cahiers Biologie Marine*, 18, 85-97.
- Fattorini, S. (2017). Endemism in historical biogeography and conservation biology: concepts and implications. *Biogeographia—The Journal of Integrative Biogeography*, 32(1). <https://doi.org/10.21426/B632136433>
- Fontaneto, D., Plewka, M. (2021). Phylum Rotifera. In *Invertebrate Zoology* (pp. 265-278). CRC Press.
- Gasiorek, P. (2023). Catch me if you can, or how paradigms of tardigrade biogeography evolved from cosmopolitanism to 'localism'. *Zoological Journal of the Linnean Society*, zlad191. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad191>
- George, K. H. (2013). Faunistic research on metazoan meiofauna from seamounts—a review. *Meiofauna marina*, 20(February), 1-32.
- Giere, O. (2009). Meiofauna Taxa: A systematic account. *Meiobenthology: the microscopic motile fauna of aquatic sediments*, 103-234.
- Hansen, J. G., Jørgensen, A., Kristensen, R. M. (2001). Preliminary studies of the tardigrade fauna of the Faroe Bank. *Zoologischer Anzeiger—A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4), 385-393. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00046>
- Hansen, J.G., D'Addabbo Gallo, M., Grimaldi De Zio, S. (2003). A comparison of morphological characters within the genus *Rhomborhynchus* (Tardigrada: Heterotardigrada) with the description of two new species. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*. 242(1), 83-96. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00089>
- Hansen, J. G. (2007). The deep sea elements of the Faroe Bank tardigrade fauna with a description of two new species. *J. Limnol*, 66(1), 12-20. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2007.s1.12>
- Hansen, J. G., Kristensen, R. M., Jørgensen, A. (2012). The armoured marine tardigrades (Arthrotardigrada, Tardigrada). *Scientia Danica, series B Biologica 2, The Royal Danish Academy of Sciences and Letters*, pp. 91.
- Hansen, J. G., & Kristensen, R. M. (2021). A new genus and five new species of the subfamily Florarctinae (Tardigrada, Arthrotardigrada). *European Journal of Taxonomy*. 762, 149-184. <https://doi.org/10.5852/ejt.2021.762.1461>
- Higgins, R. P., Thiel, H. (1988). Introduction to the study of meiofauna. *Smithsonian Institution Press*.
- Hummon, W. D. (1969). *Musellifer sublitoralis*, a new genus and species of Gastrotricha from the San Juan Archipelago, Washington. *Transactions of the American Microscopical Society*, 88(2), 282-286. <https://doi.org/10.2307/3224502>
- Hummon, W.D., ed. 2001-2010. Global Distribution of Marine Gastrotricha (at <http://www.gastrotricha.unimore.it/checklist.htm>)
- Ingels, J., Valdes, Y., Pontes, L. P., Silva, A. C., Neres, P. F., Corrêa, G. V., ... dos Santos, G. A. (2020). Meiofauna life on loggerhead sea turtles-diversely structured abundance and biodiversity hotspots that challenge the meiofauna paradox. *Diversity*, 12(5), 203. <https://doi.org/10.3390/d12050203>

- Jørgensen, A., Kristensen, R. M. (2001). A new tanarctid arthrotardigrade with buoyant bodies. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4), 425-439. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00051>
- Jørgensen, A., Boesgaard, T. M., Møbjerg, N., Kristensen, R. M. (2014) The tardigrade fauna of Australian marine caves: With descriptions of nine new species of Arthrotardigrada. *Zootaxa*, 3802(4), 401-433. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00033>
- Jörger, K. M., Norenburg, J. L., Wilson, N. G., Schrödl, M. (2012). Barcoding against a paradox? Combined molecular species delineations reveal multiple cryptic lineages in elusive meiofaunal sea slugs. *BMC evolutionary biology*, 12, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-245>
- Kaczmarek, Ł., Bartels, P. J., Roszkowska, M., Nelson, D. R. (2015). The zoogeography of marine Tardigrada. *Zootaxa*, 4037(1), 1-189. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4037.1.1>
- Känneby, T., Atherton, S., Hochberg, R. (2014). Two new species of *Musellifer* (Gastrotricha: Chaetonotida) from Florida and Tobago and the systematic placement of the genus within Paucitubulatina. *Marine Biology Research*, 10(10), 983-995. <https://doi.org/10.1080/17451000.2013.872797>
- Kieneke, A. (2010). A new species of *Thaumastoderma* (Gastrotricha: Macrodsyida) from the Antarctic deep sea with a phylogenetic analysis of the whole genus. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(3), 575-584. <https://doi.org/10.1017/S002531540900085X>
- Kieneke, A., Zekely, J. (2008). *Desmodasys abyssalis* sp. nov.—first record of a deep-sea gastrotrich from hydrothermal vents. *Marine Biodiversity Records*, 1, e88. <https://doi.org/10.1017/S1755267207008950>
- Kieneke, A., Münter, L., Riemann, O. (2020): Gastrotricha. In: Schmidt-Rhaesa, A. (ed.): Guide to the Identification of Marine Meiofauna, Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, pp. 104-163.
- Kieneke, A., Brix, S. (2021). IceDivA (SO280) Eine Tiefseeexpedition zur Vernetzung langjähriger Messdaten und Proben (GfBS newsletter 39). 39, 16-23.
- Kolicka, M. (2016). Gastrotrichs in bromeliads—newly recorded *Chaetonotus* (*Hystricochaetonotus*) *furcatus* Kisielowski, 1991 (Chaetonotida) from the Łódź Palm House. *Zoosystema*, 38(1), 141-155. <https://doi.org/10.5252/z2016n1a5>
- Kreuzinger-Janik, B., Majdi, N., Traunspurger, W. (2021). Distribution and diversity of meiofauna along an aquatic-terrestrial moss ecotone. *Nematology*, 23(6), 695-714. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10070>
- Kristensen, R. M., Renaud-Mornant, J. (1983). Existence d'Arthrotardigrades semi-benthiques de genres nouveaux de la sous-famille des Styraconyxinae subfam. nov. *Cahiers de Biologie marine*, 24, 337-353.
- Kristensen, R. M., Sørensen, M. V., Hansen, J. G., Zeppilli, D. (2015). A new species of *Neostygartus* (Arthrotardigrada) from the Condor Seamount in the Azores, Northeast Atlantic. *Marine Biodiversity*, 45, 453-467. <https://doi.org/10.1007/s12526-015-0323-y>
- Leasi, F., Todaro, M. A. (2008). The muscular system of *Musellifer delamarei* (Renaud-Mornant, 1968) and other chaetonotidans with implications for the phylogeny and systematization of the Paucitubulatina (Gastrotricha). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94(2), 379-398. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.00974.x>
- Leasi, F., Todaro, M. A. (2010). The gastrotrich community of a north Adriatic Sea site, with a redescription of *Musellifer profundus* (Chaetonotida: Muselliferidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(4), 645-653. <https://doi.org/10.1017/S0025315409991068>
- Magpali, L., Machado, D. R., Araújo, T. Q., Garraffoni, A. R. (2021). Long distance dispersal and pseudo-cryptic species in Gastrotricha: first description of a new species (Chaetonotida, Chaetonotidae, *Polymerurus*) from an oceanic island with volcanic rocks. *European journal of taxonomy*, 746, 62-93. <https://doi.org/10.5852/ejt.2021.746.1319>
- Martínez, A., Eckert, E.M., Artois, T., Careddu, G., Casu, M., Curini-Galletti, M., Gazale, V., Gobert, S., Ivanenko, V.N., Jondelius, U., Marzano, M., Pesole, G., Zanello, A., M. Todaro, A., Fontaneto, D. (2020): Human access impacts biodiversity of microscopic animals in sandy beaches. *Communications Biology* 3, 175. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0912-6>
- Minowa, A. K., Kieneke, A., Campos, A., Balsamo, M., Guidi, L., Araújo, T. Q. Garraffoni, A. R. S. New branch of the Tree of Life of Gastrotrich: Establishment of a new genus for limno-terrestrial species. *Zoological Journal of the Linnean Society*. (under revision)
- Nelson, D. R., Guidetti, R., Rebecchi, L. (2015). Phylum tardigrada. In *Thorp and Covich's Freshwater invertebrates* (pp. 347-380). Academic Press.
- Radziejewska, T., Gruzka, P., Rokicka-Praxmayer, J. (2006): A home away from home: a meiobenthic assemblage in a ship's ballast water tank sediment. *Oceanologia*, 48, 259–265.

- Ramirez-Llodra, E., Brandt, A., Danovaro, R., De Mol, B., Escobar, E., German, C. R., ... Vecchione, M. (2010). Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem. *Biogeosciences*, 7(9), 2851-2899. <https://doi.org/10.5194/bg-7-2851-2010>
- Rao, G. C., Clausen, C. (1970). *Planodasys marginalis* gen. et sp. nov. and Planodasyidae fam. nov. (Gastrotricha Magrodasyoidea). *Sarsia*, 42(1), 73-82. <https://doi.org/10.1080/00364827.1970.10411164>
- Remane, A. (1925). Organisation und systematische Stellung der aberranten Gastrotrichen. *Verhandlungen der deutschen zoologischen Gesellschaft*, 30, 121-128.
- Remane, A. (1927). Beiträge zur Systematik der Süßwassergastrotrichen. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik*. 53(12), 269-320.
- Remane, A. (1926). Morphologie und Verwandtschaftsbeziehungen der aberranten Gastrotrichen I. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 625-754.
- Renaud-Mornant, J. (1968). Présence du genre *Polymerurus* en milieu marin, description de deux espèces nouvelles (Gastrotricha, Chaetonotidae). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*. 36, 141 – 51.
- Renaud-Mornant, J. (1988). Développement postembryonnaire du Tardigrade abyssal *Coronarctus laubieri*
- Renaud-Mornant, J. (1987) (Tardigrada, Heterotardigrada). *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. Section A, Zoologie, biologie et écologie animales*, 10(2), 327-345. <https://doi.org/10.5962/p.292211>
- Renaud-Mornant, J. (1987). Bathyal and abyssal Coronarctidae (Tardigrada), descriptions of new species and phylogenetical significance. In: R. Bertolani, editor. *Biology of Tardigrades. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., 1. Mucchi, Modena, Italy*, 93–101.
- Romano Iii, F., Gallo, M., D'Addabbo, R., Accogli, G., Baguley, J., Montagna, P. (2011). Deep-sea tardigrades in the northern Gulf of Mexico with a description of a new species of Coronarctidae (Tardigrada: Arthrotardigrada), *Coronarctus mexicus*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49, 48-52. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00597.x>
- Santos, E., Veiga, P., Rubal, M., Bartels, P. J., da Rocha, C. M. Fontoura, P. (2019). *Batillipes pennaki* Marcus, 1946 (Arthrotardigrada: Batillipedidae): deciphering a species complex. *Zootaxa*, 4648(3), zootaxa-4648. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4648.3.9>
- Sergeeva, N., Ürkmez, D., Todaro, M. A. (2019). Significant occurrence of *Musellifer profundus* Vivier, 1974 (Gastrotricha, Chaetonotida) in the Black Sea. *Check List*, 15(1), 219-224. <https://doi.org/10.15560/15.1.219>
- Shimabukuro, M., Zeppilli, D., Leduc, D., Wenzhöfer, F., Berg, P., Rowden, A. A., Glud, R. N. (2022). Intra- and inter-spatial variability of meiofauna in hadal trenches is linked to microbial activity and food availability. *Scientific reports*, 12(1), 4338. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08088-1>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Thiel, H. (1975). The size structure of the deep-sea benthos. *Integrations Revue der gesamten Hydrobiologie*. 60, 575–606
- Todaro, M. A. D., Hummon, W. D. (2008). An overview and a dichotomous key to genera of the phylum Gastrotricha. *Meiofauna Marina*, 16, 3-20.
- Traunspurger, W., Majdi, N. (2017). Meiofauna. In: *Methods in Stream Ecology, Volume 1* (pp. 273-295). Academic Press.
- Trokhymchuk, R., Kieneke, A. (2024). Novel distribution records of marine Tardigrada from abyssal sediments of the Northwest Atlantic Ocean. *Organisms Diversity & Evolution*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s13127-024-00641-2>
- Trokhymchuk, R., Schmidt-Rhaesa, A., Utevsky, S., Kristensen, R. M., Kieneke, A. (2024) Towards a better understanding of deep-sea tardigrade biogeography: numerous new records and a new species from the Southern Ocean. *Zootaxa*, 5543(1), 1-39. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5543.1.1>
- Tchesunov, A. V. (2018). A new tardigrade species of the genus *Neostygarcus* Grimaldi de Zio et al., 1982 (Tardigrada, Arthrotardigrada) from the Great Meteor Seamount, Northeast Atlantic. *European Journal of Taxonomy*, (479). <https://doi.org/10.5852/ejt.2018.479>
- Vincx, M., Bett, B. J., Dinert, A., Ferrero, T., Gooday, A. J., Lamshead, P. J. D., ... Vanreusel, A. (1994). Meiobenthos of the deep Northeast Atlantic. In: *Advances in Marine Biology* (Vol. 30, pp. 1-88). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60061-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60061-9)

Westheide, W., Haß-Cordes, E., Krabusch, M., Müller, M. (2003). *Ctenodrilus serratus* (Polychaeta: Ctenodrilidae) is a truly amphi-Atlantic meiofauna species—evidence from molecular data. *Marine Biology*, 142, 637-642. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0960-0>

Zeppilli, D., Bongiorno, L., Cattaneo, A., Danovaro, R., Santos, R. S. (2013). Meiofauna assemblages of the Condor Seamount (North-East Atlantic Ocean) and adjacent deep-sea sediments. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 98, 87-100 <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.08.009>.

Нові знахідки глибоководних *Gastrotricha* і *Tardigrada* в Іберійському та Канарському басейнах (північно-східна Атлантика) з коментарями щодо складу абісальної мейофауни та парадоксу мейофауни

Р. Трохимчук, А. Кінеке

“Парадокс мейофауни” пов’язаний з амфіокеанічним або навіть космополітичним поширенням видів цієї екологічної групи, а саме морської мейофауни, в протизагони їх слабкому потенціалу розселення. Розв’язання цього парадоксу включає, з одного боку, знахідки комплексів генетично різних, але морфологічно криптичних видів із значно обмеженими ареалами; а з іншого – дослідження “оселищ-сходинок”, таких як шельфові зони океанічних островів і вершини підводних гір. Такі біотопи поділяють великі дистанції, наприклад, від одного континенту до іншого, на більш короткі проміжки. Однак тоді слід виключити можливе поширення “мілководної мейофауни” просто через зростання популяції та розширення ареалу на абісальних рівнинах Світового океану. Для того, щоб перевірити, чи можуть абісальні рівнини бути бар’єром для розселення певних таксонів морської мейофауни, ми дослідили склад мейофауни з шести проб (станцій) під час експедиції R/V Sonne IceDivA (SO280) в Іберійському та Канарському басейнах з абісальних глибин (4904 - 5485 м). Домінантними таксонами в усіх пробах були нематоди (13.0 - 97.7 ос./см²) та копеподи (0.4 - 9.6 ос./см²); анеліди, кіноринхи і остракоди мали меншу щільність. Відмічено три види гастротрих (*Desmodasys* sp. iberiana, *Desmodasys* sp. langseth, *Musellifer* sp. iberiana (*Musellifer* aff. *tridentatus*)) та один тихохід (*Coronarctus dissimilis*), які дослідили з використанням світлової мікроскопії (ДІК та КЛСМ) а також СЕМ. Всі представлені гастротрихи, ймовірно, належать до нових та досі не описаних видів. Ареал *Coronarctus dissimilis* розширено до Іберійського басейну та глибини в 4163 м (банка Джозефіна). Ця знахідка може свідчити на користь потенційного амфіатлантичного поширення виду. Ми порівняли наші дані з іншими дослідженнями підводних гір, океанічних островів та з глибоководдя і прийшли до висновку, що абісальні рівнини є значним бар’єром на шляху поширення на великі відстані для більшості родів (і видів) гастротрих, а також для певної частини родів тихоходів.

Ключові слова: Атлантичний океан, біорізноманіття, біогеографія, глибоке море, *Desmodasys*, *Musellifer*, *Coronarctus*

Цитування: Trokhymchuk R., Kienek A. 2024. New records of deep-sea *Gastrotricha* and *Tardigrada* from Iberian and Canary Basins (Northeast Atlantic) with comments on abyssal meiofauna composition and the meiofauna paradox. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*, 43, с. 66-84. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-6>

Про авторів:

Трохимчук Р. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, 61022, Харків, Україна; Німецький центр досліджень морського біорізноманіття (DZMB), Зенкенберг ам Меєр, Зюдштранд 44, 26382, Вільгельмсгафен, Німеччина; rtrokhymchuk@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9570-0226>

Кінеке А. – Німецький центр досліджень морського біорізноманіття (DZMB), Зенкенберг ам Меєр, Зюдштранд 44, 26382, Вільгельмсгафен, Німеччина; alexander.kienek@senckenberg.de; <https://orcid.org/0000-0001-8180-2483>

Подано до редакції: 05.09.2024 / Прорецензовано: 16.10.2024 / Прийнято до друку: 18.10.2024

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-7

UDC: 591.5:597.5:574.5

The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, *Astacus astacus*, in the Transcarpathian region, Ukraine

M. Shrestkha, S. Utevsky

This study explores the distribution, abundance, and diversity of branchiobdellidans on freshwater crayfish in the Zakarpattia (Transcarpathian) region of Ukraine, focusing on populations in the Tereblyia River and Lake Synevyr. Surveys were conducted over the summer seasons of 2008, 2009, 2017, and 2022, examining a total of 68 noble crayfish (*Astacus astacus* Linnaeus, 1758). Four branchiobdellidan species were identified: *Branchiobdella parasita* (Braun, 1805), *B. balcanica* Moszynski, 1937, *B. pentadonta* Whitman, 1882, and *B. hexadonta* Gruber, 1883. This study presents the first records of *B. hexadonta* in Ukraine, expanding on the previously recorded presence of *B. parasita* and *B. balcanica*. Among the species observed, *B. balcanica* was the most prevalent, comprising 83% of the branchiobdellidans on individual crayfish in Lake Synevyr and 64% in the Tereblyia River. This species primarily occupied the claws, thoracic legs, and bases of the antennules, with cocoons mostly located in the lower cervical grooves. *B. pentadonta* was less frequent, accounting for 10% and 15% of branchiobdellidan specimens in Lake Synevyr and the Tereblyia River, respectively, and generally cohabited the same body regions as *B. balcanica*. *B. hexadonta*, detected exclusively in Lake Synevyr, was found within the gill chambers and represented only 3% of the total branchiobdellidans. Visible damage to some gill filaments suggests that this species may exhibit parasitic behavior. *B. parasita*, known for its considerable size and widespread presence across native European crayfish populations, accounted for approximately 21% of the branchiobdellidan specimens. It was commonly found on the eyes, maxillipeds, and lateral sides of the cephalothorax. This species displayed protective behavior around its cocoons, actively moving to shield them. In comparison, the recently described *B. bulgariensis*, identified in Bulgaria, differs from *B. parasita* primarily in spermathecal structure and is associated with *A. torrentium*. In this study, our samples exhibited distinct spermathecal structures from both *B. bulgariensis* and *B. parasita*, indicating potential taxonomic variation that needs further investigation through molecular genetic analysis. In this study, we enhance the existing descriptions of branchiobdellidan species by providing detailed morphological and anatomical parameters. Our findings are based on both original species descriptions and our own research contributing to the understanding of the diversity and morphology of European branchiobdellidans.

Key words: *Branchiobdella*, Ukraine, Transcarpathian, *Astacus astacus*, distribution

Cite this article: Shrestkha M, Utevsky S. (2024). The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, *Astacus Astacus*, in the Transcarpathian region, Ukraine. The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology, 43, p. 85-95. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-7>

About the authors:

Shrestkha M. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, 61022, Kharkiv, Ukraine, kmu6154@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4375-3021>

Utevsky S. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan, 4, 61022, Kharkiv, Ukraine, serge.utevsky@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0003-1290-6742>

Received: 12.10.2024 / Revised: 17.11.2024 / Accepted: 27.11.2024

Introduction

The Carpathian region is recognized as one of the most important biodiversity hotspots in Europe, with well-preserved ecosystems that support a wide range of animal and plant species (Bálint et al., 2011). This region provided a crucial glacial refugium during the Pleistocene, enabling temperate and cold-adapted species to survive climate fluctuations (Schmitt, 2009). Genetic studies indicate multiple glacial survival centers across the Carpathian area, which have contributed to the present distribution patterns of species in the region (Mráz and Ronikier, 2016; Mamos et al., 2021).

A key freshwater species in this region is the noble crayfish, *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), which likely colonized the Carpathian Danube basin during the late Pliocene or early Pleistocene (Trontelj et al., 2005; Klobučar et al., 2013). Populations of *A. astacus* have since been shaped over time by climatic shifts, with the Carpathians providing a relatively stable refuge (Schulz and Grandjean, 2005). In recent decades, however, these native crayfish have faced significant pressures, including habitat loss, competing invasive crayfish species and the crayfish plague, resulting in population declines across much of Europe (Holdich et al., 2009).

The Zakarpattia region of Ukraine, part of the Eastern Carpathians, hosts diverse and rich aquatic environments and associated flora and fauna (Kliment et al., 2016), with rivers, streams, and smaller water bodies interlacing to create ideal conditions for crayfish and their associated symbionts (Pârvulescu and Zaharia, 2014). This region also provides a core water resource in Ukraine (Gerenchuk, 1981). Thus, it is a key region for studying relationships between native *A. astacus* crayfish populations and their associated species such as branchiobdellidan ectosymbionts. Branchiobdellidans (*Annelida: Clitellata*) are small annelids that live on the surface of freshwater crayfish or in their gill chambers. Certain species of branchiobdellidans form mutualistic relationships with crayfish, benefiting both organisms. In these cases, Branchiobdellidans help keep the crayfish clean by removing debris and parasites, which supports the host's overall health. However, some branchiobdellidans exhibit parasitic behavior, feeding on crayfish tissues or bodily fluids. This can lead to stress, reduced growth, and increased vulnerability to disease for the host crayfish (Baker, 2003; Hollander, 2005).

In the Carpathian region, research on branchiobdellidans has been limited, despite the ecological significance of their freshwater crayfish hosts. This study set out to investigate branchiobdellidan species, associated with *A. astacus* in the Transcarpathian region of Ukraine and to increase knowledge of the interactions between crayfish and branchiobdellidans in the Carpathian refugium and to provide detailed descriptions of investigated species.

Materials and methods

Study sites

Surveys were conducted at two locations (Fig.1, A-D) in the Khust district of the Zakarpattia Region in Ukraine: Lake Synevyr and the Tereblya River near the village of Kolochava. The field studies were carried out over several years, during the summer months in 2008, 2009, 2017, and 2022. A total of 68 crayfish specimens were examined for the presence of branchiobdellidans. These included 30 crayfish from the Tereblya River in 2008, 10 in 2009, 10 in 2017, and 10 in 2022. In Lake Synevyr, 8 crayfish were examined in 2009.

1. **Lake Synevyr** (48°37'01"N; 23°41'02"E). Collection date: July 16, 2009, 8 crayfish.
2. **Tereblya River** (48°26'13"N; 23°44'29"E). Collection dates: July 21, 2008 (30 crayfish); July 13, 2009 (10 crayfish); August 16, 2017 (10 crayfish); August 27, 2022 (10 crayfish).

Lake Synevyr is a well-known tourist destination situated in the Synevyr National Nature Park at an altitude of 989 meters above sea level. The lake is fed by three mountain streams, with marshy ground present at their respective discharge areas into the lake. Water from the lake flows through underground aquifers into the river Tereblya, one of the numerous headwaters of the River Danube. The Tereblya River is located in the same region and is a tributary of the Tisza River, which also subsequently joins the Danube.

Specimen collection and examination

Crayfish were collected by hand from the water bodies at both sites and visually examined for the presence of branchiobdellidans. These were gently washed off their crayfish hosts and preserved in tubes containing 96% ethanol for further analysis. Immediately after examination, most of the crayfish were returned to their natural habitats. Two crayfish from each locality were euthanized to allow for subsequent detailed examination of their gill chambers. Branchiobdellidans were identified using a stereomicroscope Leica M205 C. Species identification was based on examination of external morphology, jaw structure and reproductive system organization. Measurements of body proportions and microscopic examination of jaws were carried out performed using the microscopy imaging application Axiolmager Z1 (Carl Zeiss). The terminology used to describe morphological and anatomical features adheres to the standards outlined by Neubert and Nesemann (1999). We believe it is essential to provide detailed parameters and proportions related to the structure of the jaws and external morphology of the collected specimens, as traditional morphometry often focuses solely on length and breadth measurements. Additionally, we include microscopic photographs of the reproductive system, whereas most previous articles have primarily relied on illustrations. We present standardized descriptions of the species based on characteristics documented in the original species descriptions as well as our own research findings. These descriptions encompass size, external features, jaw structure, reproductive system, and cocoon structure.

Results

Branchiobdellidan species identification was based on both external morphological features and internal structures, including the spermatheca and atrium. Here, we provide brief descriptions of each species, highlighting the key features important for species differentiation. All crayfish from both study sites were identified

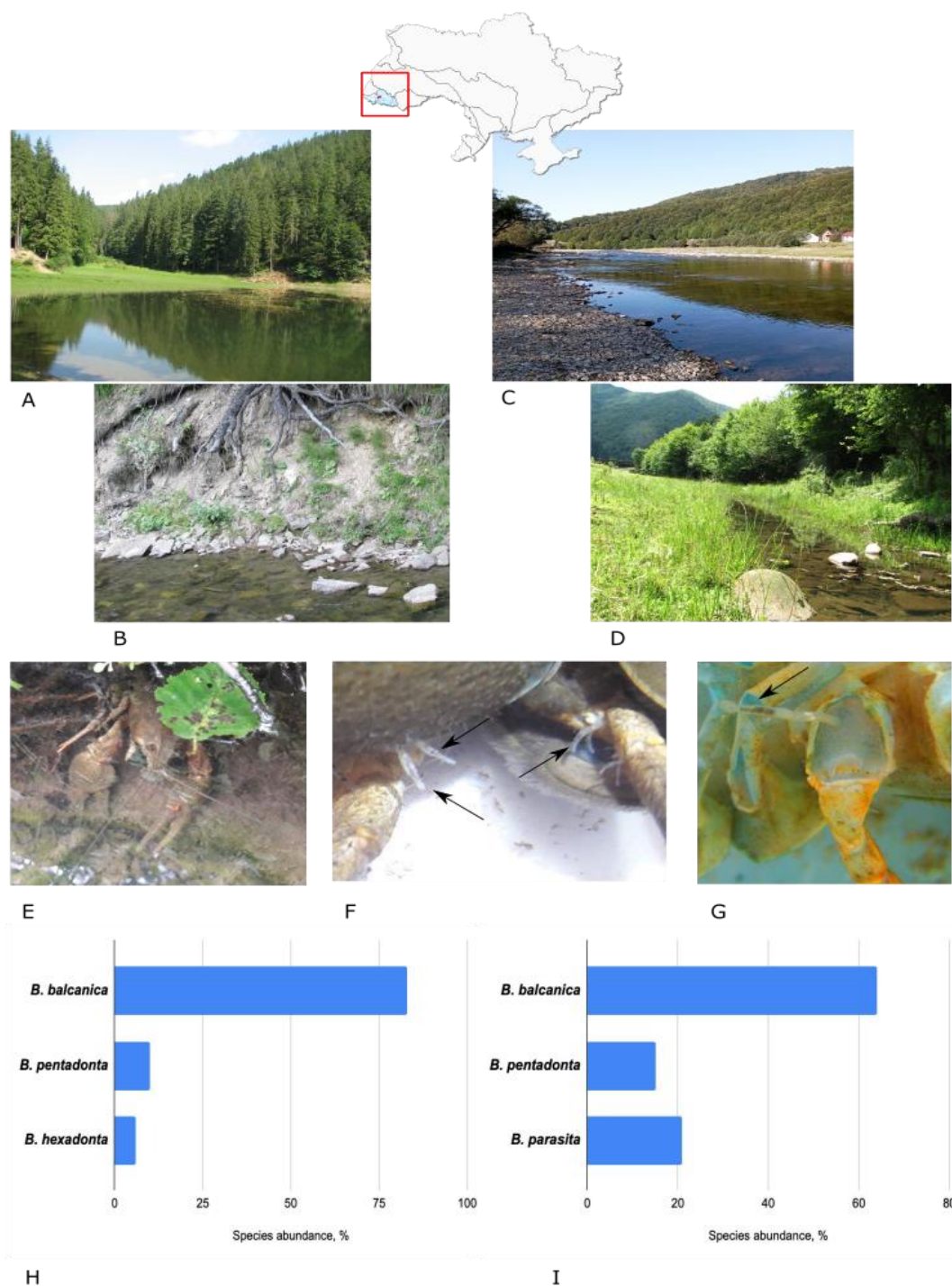


Figure 1. Surveyed locations in the Khust District, Zakarpattia Region, Ukraine (Photographs by M.Shrestkha). (A) General view of Lake Synevir; (B) Crayfish collection site in Synevir Lake; (C) General view of the Tereblya River; (D) Crayfish collection site in the Tereblya River; (E) *Astacus astacus* in its natural habitat; (F) *Branchiobdella balcanica* on its host; (G) *B. parasita* on its host; (H) The density and diversity of branchiobdellidans on the *A. astacus*, Lake Synevir; (I) The density and diversity of branchiobdellidans on the *A. astacus*, Tereblya River

as the noble crayfish, *A. astacus*. Three species of branchiobdellidan were recorded on crayfish collected from the Tereblyia River, namely *B. parasita*, *B. pentadonta*, and *B. balcanica*. The most abundant species was *B. balcanica*, with 20 to 30 individuals per host. *Branchiobdella parasita* was less numerous, with 6 to 10 individuals per host, while *B. pentadonta* was present in smaller numbers, ranging from 5 to 7 individuals per host (Fig. 1, E-I). Three species of branchiobdellidan were also identified in Lake Synevir, *B. balcanica*, *B. hexadonta*, and *B. pentadonta*. The dominant species was *B. balcanica*, with 20 to 40 individuals found per host. *Branchiobdella pentadonta* was observed in smaller numbers, with 3 to 5 individuals per host, while *B. hexadonta* was the least common, with only 1 to 3 individuals per host (Fig. 1, H, I).

***Branchiobdella balcanica* Moszynski, 1937**

Size: The length of fixed animals varied from 1.8–4 mm

External features: The body is cylindrical and of uniform width from the 1st to the 3rd segments, and then dorso-ventrally flattened from the 4th to the 8th segments. It broadens significantly at the 4th segment, where the frontal annulus forms "shoulders" and doubles in width compared to the 1st segment, maintaining this width up to the 7th segment. The frontal annulus of the 8th segment has distinct lateral processes, while the 9th segment also exhibits lateral processes located on the dorsal annulus (Fig. 2, D–E). These processes are clearly visible in specimens that have been slowly fixed; in specimens fixed rapidly, however, the processes appear contracted.

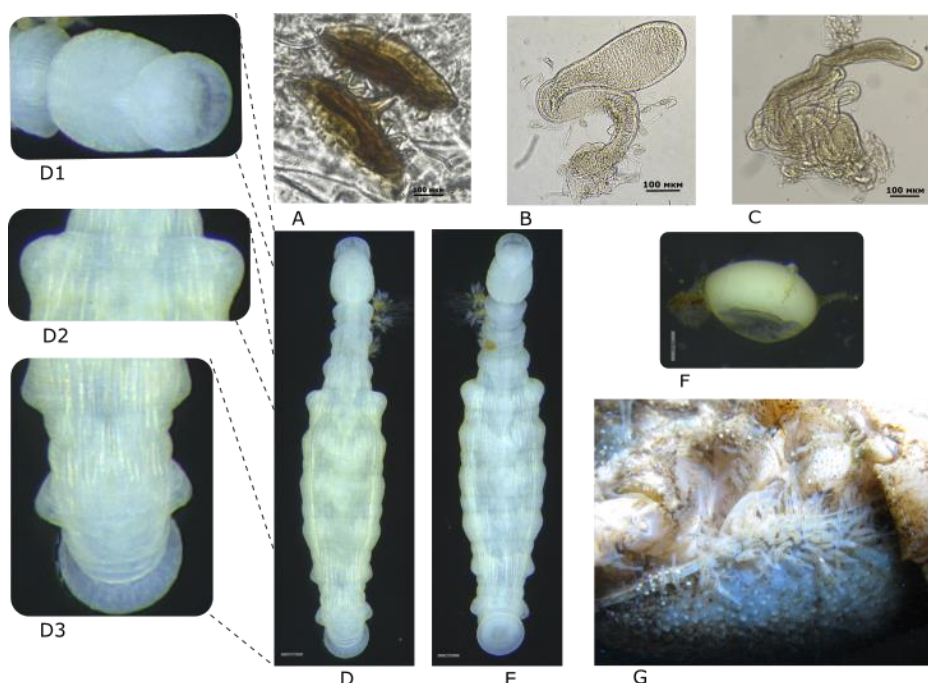


Figure 2. *Branchiobdella balcanica*: (A) dorsal and ventral jaws; (B) spermatheca; (C) atrium; (D) dorsal view; (D1) head region, (D2) 4th body segment, (D3) lateral processes on the frontal annulus of the 8th segment and the dorsal annulus of the 9th segment; (E) ventral view; (F) cocoon; (G) living worms on the crayfish host.

The head is oval, with a length approximately 10% greater than its width and nearly equal to the width of the 1st body segment. It comprises 15% of the total body length. The lips, which are distinctly separated from the head, are round (Fig. 2, D1) and account for 35% of the head length, lacking any lobes.

Jaw structure: The jaws are equal in size, dark brown, and elongated-oval in shape, with a width that is three times greater than their height. The teeth are arranged along the straight edge of each jaw (Fig. 2, A). The dorsal jaw bears five or six teeth, while the ventral jaw has five. On both jaws, the teeth are massive and generally uniform in size, with the middle tooth being distinctly larger than the others.

Reproductive system: In adult worms, the gonopores are clearly visible on the 5th and 6th body segments. The vesicle of the spermatheca has a bulbous shape, with a widened apical end and a narrower basal end. The ejaculatory canal is equal in length to the vesicle, curving beneath it to about half its length, then bending in the opposite direction toward the gonopore (Fig. 2, B). The glandular part of the atrium is

C-shaped, as described by Karaman (1967), and broad, while the tubular portion is thin and elongated, forming approximately four loops (Fig. 2, C). The copulative bursa is large.

Cocoon structure: The cocoon is flask-shaped, with a capsule measuring 0.4–0.5 mm in length and 0.3–0.35 mm in width. The cocoon stem is short, measuring 0.07–0.1 mm, and broadens toward the base of the capsule. The cocoon cap is mitriform, with a long spine measuring 0.1–0.15 mm, which is nearly equal to or exceeds the length of the stem (Fig. 2, F). Cocoons were observed on crayfish in various locations, including the inner side of the claws and their angular joints, along the lateral edge of the carapace, at the base of pereopods, on the lower part of the cervical groove, and on pleopods. Less frequently, cocoons were attached at the base of the antennae and maxillipeds (Fig. 2, G).

***Branchiobdella hexadonta* Grube, 1883**

Size: Length of fixed animals 3.2–3.7 mm

External features: The body is cylindrical along its entire length. The head is distinctly divided in the middle by a ring furrow, elongated, and makes up more than 30% of the total body length. Its width is comparable to, or slightly greater than, that of the first body segment and is about one-quarter of the head's length. The lips are separated from the head by a distinct furrow, with the upper lip divided into two lobes that slightly extend above the lower lip (Fig. 3, F). The lips constitute 30% of the head length. The body segments are generally uniform in width, with the widest point occurring at the 6th to 8th segments. The 4th segment is about 30% wider than the 1st segment (Fig. 3, G).

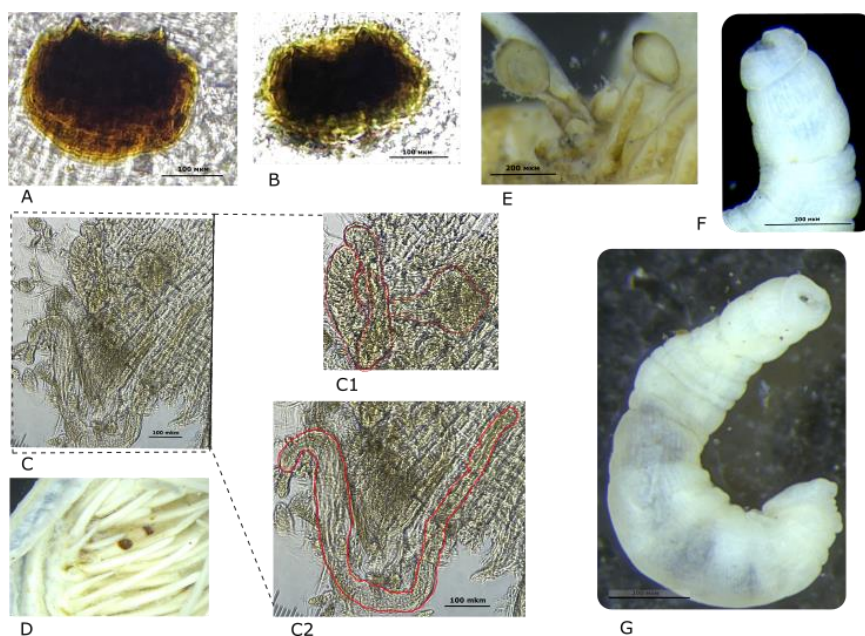


Figure 3. *Branchiobdella hexadonta*: (A) dorsal jaw; (B) ventral jaw; (C) reproductive organs: (C1) atrium, (C2) spermatheca; (D) damaged gills; (E) cocoon with a worm inside and an empty one nearby; (F) head region with deep furrow; (G) adult worm.

Jaw structure: The jaws are dense, dark brown, and have a rectangular-oval shape with a distinct concave upper margin. Nesemann (1999) describes this shape as reniform, or kidney-shaped. The dorsal jaw is slightly larger than the ventral jaw, with teeth arranged along the concave edge (Fig. 3, A, B). The dorsal jaw has six teeth, while the ventral jaw has five. The lateral teeth are significantly larger on both jaws.

Reproductive system: The gonopores are clearly visible in adult worms on the 5th and 6th body segments. The spermatheca resembles the shape of a fishing hook (Fig. 3, C2), with the vesicle and ejaculatory canal sharing the same width. The ejaculatory canal is twice the length of the vesicle, which is concave and scapular at its midpoint. The atrium is short, with a broad, short glandular section, while the tubular section is longer and forms a single loop (Fig. 3, C1).

Cocoon structure: The cocoon capsule is oval, featuring slightly elevated, with a flat brown cap (Fig. 3, E). The capsule measures 0.2 mm in length and 0.18 mm in width, with a stem length of 0.09 mm.

***Branchiobdella parasita* (Braun, 1805)**

Size: Length of fixed animals 2.4 – 5.5 mm

External features: Body cylindrical across entire length (Fig. 4, B). Frontal annulus of each body segment dorsally extended and in lateral view appears as a crest (Fig. 4, E). The body segments are broadly similar in width, reaching maximum width at the 5th to 7th segments. The 4th body segment is approximately 35% wider than the 1st segment.

The head is rectangular, 30% longer than wide, more than 20% of the total body length and 26% wider than the 1st body segment. The lips contribute 30% of the head length. The upper lip is divided into four lobes and slightly protrudes over the lower lip. The lobes are more distinct in young specimens and in well-fixed adult individuals (Fig. 4, F).

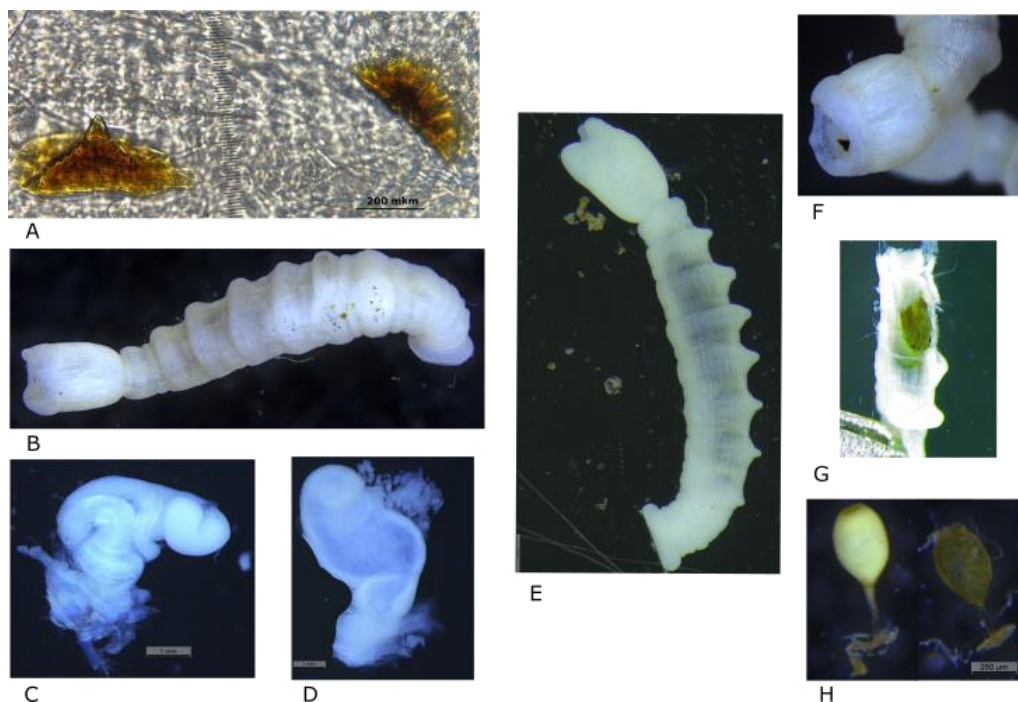


Figure 4. *Branchiobdella parasita*: (A) dorsal and ventral jaws; (B) dorsal view; (C) atrium; (D) spermatheca; (E) lateral view; (F) head region; (G) gut containing the head of a chironomid; (H) cocoon with a worm inside and an empty one nearby.

Jaw structure: Jaws large, light brown, triangular, height 30% of width. The upper jaw is 20% larger than the lower jaw. Teeth arranged along the triangle edges of the jaw. Each jaw bears seven or eight teeth. On both jaws, the lateral teeth are small and vary in number, while the middle tooth is noticeably larger (Fig. 4, A).

Reproductive system: Gonopores in 5th and 6th body segments are visible in adult worms. Vesicle of spermatheca has an oval-kidney shape with two folds on the concave edge. Fold on the apical end of the vesicle separates a round top. Another fold is located on the middle of the vesicle (Fig. 4, D). Ejaculatory canal is very short, forming a triangle widening at the base of the vesicle, which turns to the opposite direction from the fold.

Atrium has a massive glandular part and a double bend with a loop on its apical end (Fig. 4, C). Copulatory bursa large. Tubular part is wide in comparison with the other species considered here. Lengths of glandular and tubular parts are almost equal.

Cocoon description and location. Cocoon ovoid but with the widest part at the apex; capsule length 0.4–0.6 mm, width 0.28–0.36 mm. Cocoon stem 0.24–0.27 mm, nearly half of capsule length, cap flat (Fig. 4, H). Cocoons located latero-posteriorly on crayfish cephalothorax (usually symmetrically on both sides).

Remarks: The spermatheca of *B. parasita* exhibits high variability, despite the uniformity of the species' external morphology. The spermatheca differs in *B. bulgariensis* Subchev, 2021 and in *B. parasita* as described by Braun (1885), detailed by Henle (1835), and characterized by Karaman (1967) and

Kolesnykova (2013). Application of molecular genetic methods is now required to confirm the taxonomic validity of different morphotypes, including the material examined in this study and in the recently described *B. bulgariensis* (Subchev, 2021).

***Branchiobdella pentadonta* Whitman, 1882**

Size: Length of fixed animals 2.6 – 3.4 mm

External features: Body gradually broadening from 1st body segment to maximum width in 5th and 6th body segments and then gradually narrowing to the 9th segment. The first three segments are cylindrical, while segments 4– 8 are slightly flattened. The width of the 4th segment is 40% greater than the 1st while that of 6th segment is more than double that of the 1st. The frontal annulus of the 8th segment has small lateral processes which are more or less visible on all fixed specimens. Lateral processes are also present on the 9th segment but are located on the dorsal annulus (Fig. 5, C, E, F).

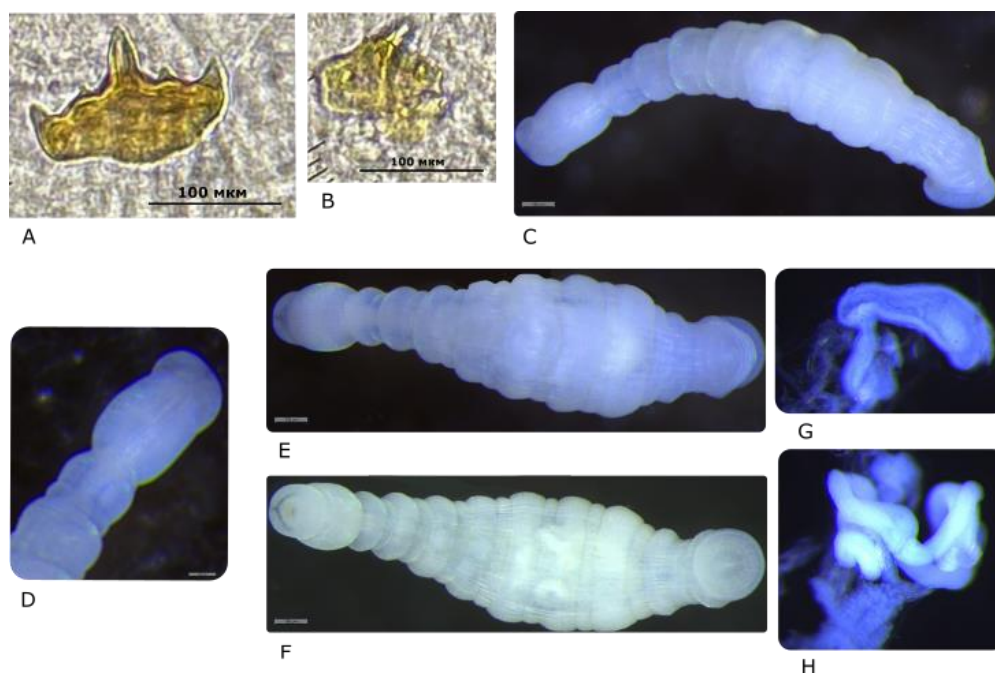


Figure 5. *Branchiobdella pentadonta*: (A) dorsal jaw; (B) lateral view of ventral jaw; (C) lateral view; (D) head region; (E) dorsal view; (F) ventral view; (G) spermatheca; (H) atrium.

Head rectangular-oval shaped, 30% longer than wide, about 20% of the total body length and 10% wider than the first body segment. The lips contribute about 25% of the head length. The upper lip has a small central furrow (Fig. 5, D).

Jaw structure: Jaws equal in size, light brown, rectangular, three times wider than high. Teeth arranged along the arc edge of the jaw (Fig. 5, A, B). Each jaw bears five or six teeth. On both jaws, the last lateral teeth are large and middle teeth are small, although the central of these is noticeably larger than the others.

Reproductive system: Gonopores in 5th and 6th body segments are visible in adult worms. Vesicle of spermatheca bulbous with a widened apical end with little narrowing (Fig. 5, G). Ejaculatory canal forms a small bend under the vesicle and then goes straight down, slightly bending at the end. The ejaculatory canal is half the length of the vesicle. Atrium has a short tubular section while its glandular part is long, forming several bends (Fig. 5, H). Copulatory bursa is small.

Discussion

Geographical distribution and hosts

The Carpathian Mountains continue to provide an important refugium for the noble crayfish, *A. astacus*, a species that has experienced considerable declines across its European range due to habitat degradation, pollution, and competition with anthropogenically introduced invasive species. They provide habitats with a number of environmental characteristics that are essential for the survival of *A. astacus* and

its ectosymbionts, including branchiobdellidans. The crayfish thrive in clean, well-oxygenated waters with stable substrata, such as gravel and cobbles, which are characteristic of the streams and rivers of the Carpathians (Pârvulescu et al., 2011). The region's relatively low levels of anthropogenic disturbance compared to other areas in Europe further contribute to the maintenance of suitable habitats for this crayfish species (Lovrenčić et al., 2022).

Until now, four species of branchiobdellidan, *B. kozarovi*, *B. pentadonta*, *B. parasita*, and *B. balcanica*, have been reported from Ukraine. All previous Ukrainian records derive from collections from the Dnieper River basin (Boshko, 2010; Kolesnykova, 2007, 2008) and the delta of the Danube River (Kolesnykova, 2013). Our data confirm the occurrence of ectosymbiotic branchiobdellidans on *A. astacus* in the Ukrainian Carpathians, specifically in Lake Synevyr and the Tereblya River. *Branchiobdella hexadonta* is recorded for the first time in Ukraine. This species inhabits the gill chamber, where it feeds on crayfish gill filaments (see Fig. 3, D), and cannot be observed by examining the body surface alone. Known hosts of *B. hexadonta* include *A. astacus*, *A. torrentium* (Subchev and Stanimirova, 1998; Klobučar et al. 2006; Subchev, 2011) and *A. pallipes* (Oberkofler et al. 2002; Füreder et al. 2009). It has also been found on the invasive crayfish *Orconectes limosus* (Duris et al., 2006). The distribution of *B. hexadonta* includes most of Europe but does not extend east of the Greece-Bulgaria-Romania-Poland line, with no reports from Nordic or Baltic countries, Russia or Ukraine (Subchev, 2014). Our findings therefore extend the documented range of *B. hexadonta* eastwards into Ukraine.

Our data also extend the known range of *B. pentadonta*, confirming its presence in the Tereblya River. Previously, this species has been reported in Ukraine from waters near the city of Truskavets in association with *A. astacus* (Boshko, 1983) and from the Kharkiv region on *A. leptodactylus* (Kolesnykova, 2008). However, records of this species beyond the Carpathian region require confirmation due to the potential for confusion with the morphologically similar *B. kozarovi*. *Branchiobdella pentadonta* is widespread in European freshwater systems, where it is associated with *A. astacus* (Subchev 1986; Klobučar et al. 2006; Füreder et al. 2009), *A. leptodactylus* (Subchev and Stanimirova, 1998) and *A. torrentium* (Klobučar et al. 2006; Kovács & Juhász 2007; Füreder et al. 2009).

Branchiobdella balcanica was found in this study in both Lake Synevyr and the Tereblya River. Previously, it has been reported in Ukraine near the city of Truskavets, in association with *A. astacus* (Boshko, 1983). Across its distribution range, this species is predominantly ectosymbiotic on *A. astacus* (Kozarov et al., 1972; Subchev and Stanimirova, 1998; Klobučar et al., 2006; Kovács and Juhász, 2007; Füreder et al., 2009) and on *A. torrentium* (Kovács and Juhász, 2007), occurring in European water bodies within the Danube River basin.

Branchiobdella parasita was found in this study only on crayfish from the Tereblya River. Previous reports have briefly noted its presence in western Ukraine in association with *A. astacus* (Kupchinskaya, 1970). More recently, Kolesnykova (2013) confirmed its occurrence on *A. leptodactylus* in the Ukrainian Danube Delta. This species is notable for its large size and occurs on all native crayfish species across Europe. Recently, a similar species, *B. bulgariensis* Subchev, 2021, was described, differing primarily in spermatheca structure and associated with *A. torrentium* in Bulgaria (Subchev, 2021). Our samples demonstrate differences in spermatheca structure from *B. bulgariensis* and *B. parasita*. Szenejko (2023) recently investigated the genetic diversification of *B. parasita*. To confirm the taxonomic validity of the various morphotypes, including both our collected samples and the newly described *B. bulgariensis*, molecular genetic comparisons are now required.

Abundance, location and co-occurrence

The presence and abundance of branchiobdellidans on crayfish can serve as indicators of crayfish health and the overall quality of aquatic ecosystems. Branchiobdellidan presence is influenced by host tolerance and environmental conditions, with suggestions that a healthy crayfish population may support a diverse branchiobdellidan community (Skelton et al., 2014; Oberkofler et al., 2002; Klobučar et al., 2006). Although branchiobdellidans may cause some damage, they generally do not pose a significant threat to the host and, perhaps counter-intuitively, higher symbiont densities are thought to reflect less-stressed, more robust, crayfish populations. For instance, a study in Greece reported that branchiobdellidan diversity was positively linked to crayfish health, suggesting that monitoring these organisms could help in assessments of the ecological status of freshwater habitats (Subchev et al., 2007).

Our study confirmed the occurrence of four branchiobdellidan species on *A. astacus* in the Zakarpattia region of Ukraine. Previous research in this region, particularly in the Tereblya River, recorded the co-occurrence of *B. parasita* and *B. balcanica* on *A. astacus* (Kolesnykova, 2013). Additional surveys

in 2017 and 2022 revealed a third species, *B. pentadonta*, cohabiting with *B. balcanica* and *B. parasita* on the same hosts. In the current study, among 60 crayfish surveyed from the Tereblya River and 8 from Lake Synevir, *B. balcanica* was the most prevalent species, comprising 83% of the branchiobdellidans present on individual crayfish in Lake Synevir and 64% in the Tereblya River (Fig. 1, H, I). This species primarily occupied the claws, thoracic legs (Fig. 1, F; Fig. 2, G), and base of the antennules, with cocoons attached mainly to the lower cervical grooves. *Branchiobdella pentadonta* was found less frequently, co-occurring with *B. balcanica* on the same body parts. It contributed 10% of branchiobdellidan specimens on individual crayfish in Lake Synevir and 15% in the Tereblya River (Fig. 1, H, I). *Branchiobdella hexadonta* was detected only in Lake Synevir and was located in the gill chamber, making its presence hard to assess without euthanizing the crayfish, as we did only with two individuals. This species accounted for only 3% of the branchiobdellidans observed (Fig. 1, H, I). Some gill filaments displayed visible damage, likely caused by *B. hexadonta*, perhaps, suggesting this species takes on a more parasitic rather than commensal function (Fig. 3, D). As with the previous surveys in the Tereblya River, we also observed *B. parasita*, recognizable by its large size and active movement. Representing ~21% of all observed branchiobdellidan specimens (Fig. 1, H, I), it was often found on the eyes, maxillipeds, and lateral sides of the cephalothorax (Fig. 1, G), where cocoons were also present. This species also exhibited protective behavior, actively moving around its cocoons.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to Prof. Pete Convey for constructive feedback on the text. We also thank the staff of the Synevir National Nature Park for permission to conduct sampling in Lake Synevir. We are especially grateful to Mira Shrestha and Maria Kovalenko for their invaluable assistance in making the collections. This research was supported in part by the Academic Sanctuaries Fund created by XTX Markets and through the EURIZON project, which is funded by the European Union under grant agreement No.871072.

References

- Baker, A. M., W. J. H. (2003). Branchiobdellae: A review of the biology and ecology of the branchiobdellidan annelids. *Freshwater Biology*, 48(6), 1097-1109.
- Bálint, M., Ujvárosi, L., Theissinger, K., Lehrian, S., Mészáros, N., Pauls, S. U. (2011). The Carpathians as a major diversity hotspot in Europe. In: Zachos FE, Habel JC eds. *Biodiversity hotspots*. Berlin: Springer Verlag, 189–205.
- Boshko, E. (1983). Oligochaets inhabiting freshwater crayfishes in some waters in Ukraine. Report I. Branchiobdellidae. – *Vestnik Zoologii*, 2: 13-20.
- Boshko, E. G. (2010). Parasites and commensals of freshwater crayfish in the water bodies of Russia and Ukraine. *Proceedings of V.G. Belinsky Penza State Pedagogical University*, (21), 39-44.
- Braun, J. F. P. (1805). *Systematische Beschreibung einiger Egelarten: sowohl nach ihren äussern Kennzeichen als nach ihrem innern Bau*. GW Müller.
- Duris, Z., Horká, I., Kristian, J., Kozák, P. (2006). Some cases of macro-epibiosis on the invasive crayfish *Orconectes limosus* in the Czech Republic. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (380-381), 1325-1337. <https://doi.org/10.1051/kmae:2006038>
- Füreder, L., Summerer, M., Brandstätter, A. (2009). Phylogeny and species composition of five European species of *Branchiobdella* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) reflect the biogeographic history of three endangered crayfish species. *Journal of Zoology*, 279(2), 164-172. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2009.00601.x>
- Gerenchuk, K.I. (Ed.) (1981). *Pryroda Zakarpats'koi oblasti. Vyscha shkola*, L'viv, 156 pp. (in Ukrainian).
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (394-395), 11. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>
- Hollander, J., M. A. (2005). The role of Branchiobdellidans in the ecology of freshwater crayfish. *Aquatic Ecology*, 39(2), 215-222.
- Karaman, S. M. (1967). Branchiobdellidae Jugoslavije. *Buletin i Punimeve Shkencore të Fakulteti Filozofi k të Prishtinës*, IV: 39-64.
- Kliment J, Turis P, Janišová M (2016) Taxa of vascular plants endemic to the Carpathian Mts. *Preslia* 88:19–76.

- Klobučar, G. I., Podnar, M., Jelić, M., Franjević, D., Faller, M., Štambuk, A., ... Maguire, I. (2013). Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology*, 58(6), 1089-1105. <https://doi.org/10.1111/fwb.12110>
- Klobučar G., I. Maguire, S. Gottstein-Matočec, S. Gelder (2006). Occurrence of Branchiobdellida (Annelida: Clitellata) on freshwater crayfish in Croatia. – *Annales de Limnologie*, 42 (4): 251-260. <https://doi.org/10.1051/limn/2006026>
- Kolesnikova, M. A., Utevsky, S., Utevsky, S. (2008). First record on *Branchiobdella kozarovi* (Clitellata: Branchiobdellida) from Eastern Ukraine. *Lauterbornia*, 65, 77-81.
- Kolesnikova, M. Y. (2007). New information on branchiobdellidans (Clitellata: Branchiobdellida) distribution in pools of Kharkiv region. *Visnik Harkivskogo nacional'nogo universitetu imeni VN Karazina. Serija: biologija*, 6(788), 97-103.
- Kolesnykova, M., Utevsky, S. (2013) New Ukrainian records of *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata: Branchiobdellida) from the Danube basin. *Scientific Annals of the Danube Delta Institute*, 19, 35-38.
- Kovács, T., Juhász, P. (2007). Data to the distribution of crayfish worms (Branchiobdellidae) in Hungary. *Folia Historico-Naturalia Musei Matraensis*, 31, 77-79.
- Kozarov, G., Michailova, P., Subchev, M. (1972). Studies on Branchiobdellidae (Oligochaeta, Annelida) in Bulgaria. – *Annuaire de l'Université de Sofia, Faculté de biologie*, 64 (1):77-89. (In Bulgarian).
- Kupchinskaya, O. S. (1970). Aquatic Oligochaetes and Their Parasites in the Fauna of the Western Regions of Ukraine. *Dissertation abstract for the degree of Candidate of Biological Sciences*, Lviv, Pp 21.
- Lovrenčić, L., Temunović, M., Gross, R., Grgurev, M., Maguire, I. (2022). Integrating population genetics and species distribution modeling to guide conservation of the noble crayfish, *Astacus astacus*, in Croatia. *Scientific Reports*, 12(1), 2040.
- Mamos, T., Jazdzewski, K., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Čiampor Jr, F., Grabowski, M. (2021). Fuzzy species borders of glacial survivalists in the Carpathian biodiversity hotspot revealed using a multimarker approach. *Scientific Reports*, 11(1), 21629. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00320-8>
- Moszyński, A. (1937). Oligochetes parasites de l'ecrevisse (*Potamobius astacus*) de la Yougoslavie. *Glasnik (Bull.) Soc. Sci. Scopye*, 18: 6, 69-75.
- Mráz, P., Ronikier, M. (2016). Biogeography of the Carpathians: evolutionary and spatial facets of biodiversity. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 528-559. <https://doi.org/10.1111/bij.12918>
- Nesemann, H., Neubert, E. (1999). Süßwasserfauna von Mitteleuropa. Bd. 6 Annelida. 2. Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. *Spectrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin*. Pp 192.
- Oberkofler, B., Quaglio, F., Füreder, L., Fioravanti, M. L., Giannetto, S., Morolli, C., Minelli, G. (2002). Species of Branchiobdellidae (Annelida) on freshwater crayfish in south Tyrol (northern Italy). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (367), 777-784. <https://doi.org/10.1051/kmae:2002065>
- Pârvulescu, L., Pacioglu, O., Hamchevici, C. (2011). The assessment of the habitat and water quality requirements of the stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) species in the rivers from the Anina Mountains (SW Romania). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (401), 03. <https://doi.org/10.1051/kmae/2010036>
- Pârvulescu, L., Zaharia, C. (2014). Distribution and ecological preferences of noble crayfish in the Carpathian Danube basin: biogeographical insights into the species history. *Hydrobiologia* 726, 53–63.
- Schmitt, C. B., Burgess, N. D., Coad, L., Belokurov, A., Besançon, C., Boisrobert, L., Winkel, G. (2009). Global analysis of the protection status of the world's forests. *Biological Conservation*, 142(10), 2122-2130. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.012>
- Schulz, H. K., Grandjean, F. (2005). Roundtable session 3: phylogeny of European crayfish—improving the taxonomy of European crayfish for a better conservation. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (376-377), 829-836. <https://doi.org/10.1051/kmae:2005035>
- Skelton, J., Creed, R. P., Brown, B. L. (2014). Ontogenetic shift in host tolerance controls initiation of a cleaning symbiosis. *Oikos*, 123(6), 677-686. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.00963.x>
- Subchev, M., Koutrakis, E., Perdikaris, C. (2007). Crayfish epibionts *Branchiobdella* sp. and *Hystricosoma chappuisi* (Annelida: Clitellata) in Greece. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (387), 59-66. <https://doi.org/10.1051/kmae:2007017>
- Subchev, M. (2014). The genus *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida, Clitellata, Branchiobdellida): a review of its european species. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66(1), 5-20.
- Subchev, M. A., Rimcheska, B. J. (2021). Description of *Branchiobdella bulgariensis* sp. n. (Branchiobdellida) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 73(3), 331-338.

- Subchev, M. A., Stanimirova, L. S. (1986). The epibiont *Hysterosoma chappuisi* Michaelsen, 1926 (Oligochaeta, Aeolosomatidae) – new species for Bulgarian fauna. – *Acta Zoologica Bulgarica*, 32: 66-68. (In Bulgarian).
- Subchev, M. A. (2011). First record of *Branchiobdella* Odier, 1823 (Annelida: Clitellata) in Albania and an overview of the geographic distribution of *Branchiobdella hexadonta* Gruber, 1882 in Europe. – *Acta Zoologica Bulgarica*, 63,1: 109-112.
- Szenejko, M., Eljasik, P., Panicz, R., Śmietana, P. (2023). Declining populations of *Astacus astacus* drag European *Branchiobdella parasita* (Annelida: Clitellata) ectosymbionts to serious biodiversity loss. *Global Ecology and Conservation*, 48, e02719. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02719>
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B. (2005). Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1), 212-226. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.09.010>

Поширення бранхіобделід (Annelida: Clitellata) на благородному раці *Astacus astacus* у Закарпатській області України М. Шрестха, С. Утевський

Наше дослідження присвячене поширенню, чисельності та різноманіттю бранхіобделід на прісноводних раках у Закарпатському регіоні України, зокрема у річці Теребля та озері Синевир. Під час літніх сезонів 2008, 2009, 2017 і 2022 років було обстежено 68 особин благородного рака (*Astacus astacus* Linnaeus, 1758), у яких було ідентифіковано чотири види бранхіобделід: *Branchiobdella parasita* (Braun, 1805), *B. balcanica* Moszynski, 1937, *B. pentadonta* Whitman, 1882 і *B. hexadonta* Gruber, 1883. У нашій роботі вперше для фауни України наводиться *B. hexadonta*, а також розширюються відомості про розповсюдження *B. parasita* та *B. balcanica*. Серед виявлених видів найбільш поширеним був *B. balcanica*, який складав 83% від загальної кількості бранхіобделід у зразках з озера Синевир та 64% у річці Теребля. Цей вид переважно локалізувався на клешнях, грудних ніжках та основах антенул раків, а кокони розташовувалися у нижніх цервікальних борознах. Менш численним був *B. pentadonta*, частка якого становила 10% у зразках з озера Синевир та 15% у річці Теребля; він зазвичай співіснував з *B. balcanica* на тих самих частинах тіла хазяїна. *B. hexadonta*, виявлений лише в озері Синевир, локалізувався в зябрових камерах та складав лише 3% загальної чисельності бранхіобделід; при цьому пошкодження зябрових філаментів може свідчити про паразитичну поведінку цього виду. *B. parasita*, відома своїми значними розмірами та широким ареалом у популяціях європейських раків, складала приблизно 21% від загальної кількості бранхіобделід і була виявлена переважно на очах, максиліпедах і боках головогрудей. Новоописаний вид *B. bulgariensis*, знайдений у Болгарії, відрізняється від *B. parasita* структурою сперматеки та асоціюється з *A. torrentium*. У нашому дослідженні зразки виявили відмінності у структурі сперматеки як від *B. bulgariensis*, так і *B. parasita*, що свідчить про можливі таксономічні відмінності, які потребують подальшого вивчення за допомогою молекулярно-генетичного аналізу. У цьому дослідженні ми розширюємо існуючі описи видів бранхіобделід Закарпатського регіону України, надаючи детальні морфологічні та анатомічні параметри.

Ключові слова: *Branchiobdella*, Україна, Закарпаття, *Astacus astacus*, розповсюдження

Цитування: Shrestkha M., Utevsky S. The distribution of branchiobdellidan worms (Annelida: Clitellata) on the noble crayfish, *Astacus Astacus*, in the Transcarpathian region, Ukraine. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія»*, 2024, 43, с. 85-95. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-7>

Про авторів:

Шрестха М.Ю. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, kmu6154@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4375-3021>
Утевський С. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, serge.utevsky@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0003-1290-6742>

Подано до редакції: 12.10.2024 / Прорецензовано: 17.11.2024 / Прийнято до друку: 27.11.2024

... КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ... CELL BIOLOGY ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-8

УДК: 576.5:[615.361:615.451.1:611.013.8]:616-003.93:57.017.3](045)

Порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні та метаболічні властивості різних типів клітин

А.І. Каверінська, В.Ю. Прокопюк

У дослідженні проведено порівняльний аналіз впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на функціональні характеристики різних типів клітин, зокрема фібробластів, нервових клітин, спленоцитів і клітин фетальної печінки. Метою було визначити можливість використання кріоекстракту пуповини як альтернативи фетальній бичачій сироватці (fetal bovine serum, FBS), що традиційно застосовується для стимуляції клітинного росту, але використання якої супроводжується етичними та безпековими обмеженнями. Кріоекстракт пуповини є багатим на біоактивні компоненти, здатні підвищувати адгезивну, проліферативну та метаболічну активність клітин, показав свою ефективність як заміник сироватки в культивуванні різних типів клітин, що робить його перспективним для широкого застосування в клітинних технологіях та регенеративній медицині.

Результати експериментів показали, що кріоекстракт пуповини значно покращує адгезивні та проліферативні властивості клітин порівняно з іншими досліджуваними умовами. Фібробласти демонстрували високу адгезію та швидку міграцію за умов додавання кріоекстракту, що надає переваги для потенційного використання у відновленні сполучнотканинної стромы різних органів та шкіри. Нервові клітини показали збільшення життєздатності та стабільності, в порівнянні з FBS, що робить екстракт пуповини перспективним для застосування в нейрореєнеративних технологіях. Крім того, кріоекстракт виявив значний позитивний вплив на клітини фетальної печінки, підвищуючи їхню метаболічну активність та адгезію, що відкриває можливості для досліджень у галузі печінкової регенерації. Вплив на спленоцити також був позитивним, що свідчить про можливість його застосування для підтримки імунної функції в умовах, де потрібна регуляція імунної відповіді. Ліофілізат кріоекстракту, у свою чергу, продемонстрував обмежений позитивний вплив, зокрема на адгезивні та проліферативні властивості, і був менш ефективним у порівнянні з кріоекстрактом. Його додавання до культур нервових клітин та фібробластів, призводило до зниження адгезії та міграційної активності, що свідчить про необхідність оптимізації процесу ліофілізації для збереження біологічної активності екстракту. Тим не менш, стабільність ліофілізованого екстракту та його здатність до тривалого зберігання робить його корисним для ситуацій, де важливі збереження біоактивних компонентів і тривалий термін придатності.

Таким чином кріоекстракт пуповини є перспективною альтернативою FBS, його використання може забезпечувати необхідну підтримку росту, адгезії та проліферації клітин. Однак, технологія отримання ліофілізату кріоекстракту пуповини потребує подальшого вдосконалення для досягнення такої ж ефективності, як у кріоекстракту. Подальші дослідження повинні зосередитися на детальному вивченні механізмів дії кріоекстракту, а також на оптимізації методів ліофілізації, щоб адаптувати цей продукт до потреб клітинних технологій та регенеративної медицини, що дозволить ширше використовувати його для стимуляції регенерації тканин та відновлення функціональної активності різних органів.

Ключові слова: первинна клітинна культура, пуповина, кріоекстракт, ліофілізація

Цитування: Каверінська А.І., Прокопюк В.Ю. Порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні та метаболічні властивості різних типів клітин. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 96-104. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-8>

Про авторів:

Каверінська А.І. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, kaverinskaanna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3414-1656>

Прокопюк В.Ю. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, v.yu.prokopiuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4379-4130>

Подано до редакції: 02.10.2024 / Прорецензовано: 10.11.2024 / Прийнято до друку: 19.11.2024

Вступ

В останні роки активно вивчається можливість застосування екстрактів плаценти, зокрема кріоекстрактів та ліофілізатів, для подовження часу збереження цих екстрактів (Prokopiuk, Falko et al., 2018; Shen et al., 2022). Використання екстракту пуповини є актуальним для використання в якості

альтернативи мезенхімальним стовбуровим клітинам (МСК), які виділяються з пуповини та згодом використовуються в регенеративній медицині (Li et al., 2014; Chen et al., 2020). Наприклад, було показано, що МСК з пуповини здатні послаблювати запалення та підтримувати відновлення тканин завдяки своїй паракринній дії (Galieva et al., 2017).

Отримання кріоекстракту не потребує використання високотехнологічних умов чи складного обладнання, що робить цей процес доступним і економічно вигідним. Використання доступних лабораторних методів, таких як трипсинізація та центрифугування, дозволяє отримати кріоекстракт із збереженням біоактивних компонентів, необхідних для підтримки життєздатності та функціональної активності клітин. Це відкриває перспективи для широкого застосування кріоекстракту в регенеративній медицині та клітинних технологіях як альтернативного фактору росту, який може замінити фетальну бичачу сироватку (FBS), широко застосовувану для стимуляції адгезії, проліферації та життєздатності клітин. Ліофілізація, як метод збереження біологічних речовин, також дає змогу створювати препарати, стабільні для тривалого зберігання (Ward, Matejschuk, 2021; Akers, 2015), однак вплив ліофілізату пуповини на клітини вивчено недостатньо.

Дослідження було спрямоване на порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні, метаболічні та міграційні властивості первинних культур фібробластів, нервових клітин, спленоцитів та клітин фетальної печінки. Кожен тип клітин має свої унікальні характеристики за культивування, відображаючи властивості тих органів з яких виділені клітини, таким чином дослідження дозволить виявити перспективи використання кріоекстракта пуповини та ліофілізата кріоекстракта пуповини. Визначення ефективності цих кріоекстрактів у підтримці росту і функціональності клітин дозволить оцінити їх потенціал у клітинних технологіях та регенеративній медицині як можливих заміників FBS або стовбурових клітин.

Матеріали та методи

Дослідження здійснювали на первинних культурах клітин різних типів, зокрема фібробластів, нервових клітин, спленоцитів та клітин фетальної печінки. Культуру фібробластів отримували з ембріональної шкіри мишей BALB/c (термін гестації 18-20 тижнів) (Prokopyuk, Onishchenko et al., 2021). Після вилучення ембріонів зі шкіри виділяли фрагменти (1-3 мм) та проводили трипсинізацію (0,25 % трипсин і 0,02 % EDTA у фосфатно-сольовому буфері, pH 7,4-7,6) на магнітній мішалці протягом 40 хв. Отриману суспензію фільтрували через 100 мкм стерильний фільтр, ресуспендували у середовищі DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) та 1% розчину антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція), висівали на флакони 25 см² (SPL, Республіка Корея), культивували в стандартних умовах, і, після досягнення моношару, пересівали. Для досліджень використовували клітини третього пасажу. Первинну культуру нервових клітин виділяли з головного мозку новонароджених мишей (Prokopyuk, Chub et al., 2017). Після обробки стерильним PBS - Phosphate buffered saline («Biowest», Франція) та подрібнення, здійснювали трипсинізацію (0,125 % трипсин-EDTA, 10 хв), фільтрували суспензію, ресуспендували у DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) та розчином антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція) і висівали у флакони на 25 см² (SPL, Республіка Корея). Спленоцити отримували з селезінки мишей BALB/c (Prokopiuk, Falko et al., 2018; Nayak, Mengi, 2010; Obaydi et al., 2020), яку після видалення промивали PBS («Biowest», Франція), подрібнювали та фільтрували. Суспензію ресуспендували у DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) та розчином антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція). Для отримання культури клітин фетальної печінки новонароджених мишей BALB/c, тканину подрібнювали та обробляли трипсином. Суспензію фільтрували, ресуспендували у DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) і розчином антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція), висівали на флакони 25 см² (SPL, Республіка Корея) та пересівали після досягнення моношару.

Пуповину отримували в умовно стерильних умовах під час пологів, обробляли фосфатно-сольовим буфером для видалення еритроцитів, гомогенізували з PBS, заморожували до -80°C для руйнування клітин, відтаювали, центрифугували, надосад (кріоекстракт) зберігали при -80°C. Для ліофілізації використовували охолодження до -80°C з подальшим сушінням в установці Alpha 1-2 LDplus, після чого зразки зберігали 3 місяці при +8°C.

Для оцінки впливу досліджуваних речовин клітини переносили у 24-лункові планшети (концентрація 2×10⁵/лунку) та культивували у DMEM при 37°C, 100% вологості і 5% CO₂. У дослідженні виділяли чотири групи: контрольна 1 - група DMEM, 2 - DMEM+FBS, 3 - DMEM з додаванням кріоекстракту пуповини (КП) та 4 - DMEM з додаванням ліофілізованого КП (ЛКП).

Речовини стандартизували за вмістом білка (концентрація 0,1 мг/мл) (Kim et al., 2013).

Оцінку клітинної морфології, конфлюентності та адгезивності проводили через добу культивування (Yildiz et al., 2023). Для дослідження клітинної міграції застосовували скретч-тест (Hulkower, Herber, 2011), а для оцінки життєздатності клітин та функціонального стану мітохондрій використовували МТТ тест (Sukhodub et al., 2024) та тест подвоєння популяції (Culenova et al., 2021; Priyadarshini et al., 2021). Для оцінки впливу кріоекстракту пуповини та ліофілізату кріоекстракту пуповини на різні типи клітин було використано такі методи: для фібробластів проводили оцінку адгезивних характеристик, конфлюентності моношару, тест подвоєння популяції, МТТ-тест та скретч-тест; для нервових клітин застосовували методи оцінки адгезивних характеристик, конфлюентності моношару та МТТ-тест; для спленоцитів використовували лише МТТ-тест. Оцінка впливу зразків на клітини фетальної печінки проводилася тими ж методами, що й для фібробластів. Обробку мікроскопічних зображень здійснювали у програмах ToupView V 3.7 (Hangzhou ToupTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China) та ImageJ V.1.48. (National Institutes of Health, USA), а статистичний аналіз виконували з використанням Past V.3.15 (University of Oslo, Norway), застосовуючи U критерій Мана-Уїтні.

Результати та обговорення

На мікрофотографіях представлено морфологічні особливості різних типів клітин. На Рис. 1а видно фібробласти з характерною веретеноподібною, витягнутою формою, які рівномірно розподілені й утворюють щільний моношар без видимих проміжків, що свідчить про 100% конфлюентність. У забарвлених за методом Романовського фібробластах (Рис. 2а) чітко візуалізуються їхні витягнуті ядра, що підтверджує їх морфологічну ідентичність. На Рис. 1б показано нервові клітини з типовою морфологією: серед них помітні витягнуті клітини з численними відростками (аксони і дендрити) та округлі клітини, ймовірно, тіла нейронів або гліальні клітини. Розподіл нервових клітин нерівномірний, і вони знаходяться в процесі формування міжклітинних зв'язків, характерного для розвитку нейронної мережі; конфлюентність шару складає менше 100%, оскільки між клітинами помітні проміжки. На забарвлених зразках нервових клітин (Рис. 2б) можна розрізнити окремі морфологічні деталі, зокрема добре помітні відростки, що відповідають аксонам і дендритам. На Рис. 1в продемонстровані клітини фетальної печінки з полігональною формою, які згруповані й оточені радіальними структурами, що свідчить про активне формування міжклітинних зв'язків. Конфлюентність їхнього моношару наближається до 100%, проте залишаються незначні проміжки між окремими групами клітин. При забарвленні за Романовським (Рис. 2в) виявляються чіткі контури клітин фетальної печінки та добре помітні міжклітинні структури, що відображають процеси активного формування міжклітинних контактів у культурі.

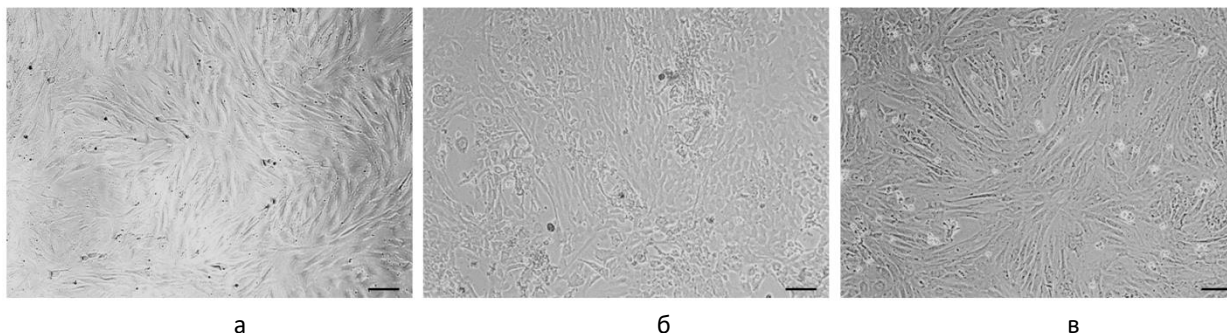


Рис. 1. Мікрофотографії моношарів фібробластів (а), нервових клітин (б), клітин фетальної печінки (в) після доби культивування. Фазовий контраст, масштаб лінійки 100 мкм.

Fig. 1. Microphotographs of fibroblast monolayers (a), nerve cells (б), and fetal liver cells (в) after one day of culture. Phase contrast, scale bar 100 μ m.

Фібробласти. Отримані результати аналізу адгезивних властивостей (Рис. 3а) показали, що ліофілізат кріоекстракту пуповини пригнічує адгезію клітин в 2 рази в порівнянні з клітинами, які культивувались лише у DMEM. Результати тесту подвоєння популяції фібробластів (Рис. 3б) продемонстрували, що час подвоєння клітинної популяції у клітин, культивованих із додаванням FBS та кріоекстракту пуповини, був приблизно однаковим і складав 20 годин. Водночас ліофілізований

кріоекстракт пуповини призвів до подвоєння цього часу, що статистично відрізнялося від обох контрольних груп. Для фібробластів, культивованих лише в середовищі без добавок, час подвоєння склав 55 годин. Було виявлено стимулюючий вплив кріоекстракту пуповини на метаболічну активність фібробластів (Рис 3в). Ліофілізат, у свою чергу, продемонстрував, близькі до контрольного зразка DMEM, без значних змін у метаболічній активності фібробластів. Результати скретч-тесту (Рис. 3г) показали очікуваний ефект для фібробластів, культивованих із додаванням FBS, що прискорила їхню міграцію, досягнувши близько 60% закриття подряпини, тоді як без сироватки цей показник становив близько 10%. Найвищу ефективність продемонстрував кріоекстракт пуповини, який забезпечив закриття подряпини приблизно на 80%, що на 20% перевищує результат культивування фібробластів в DMEM з додаванням FBS. Отже, додавання кріоекстракту пуповини значно посилило здатність до закриття подряпини у фібробластів, перевершуючи ефект FBS. Ліофілізат пуповини показав близький результат до FBS, досягнувши близько 70% закриття подряпини.

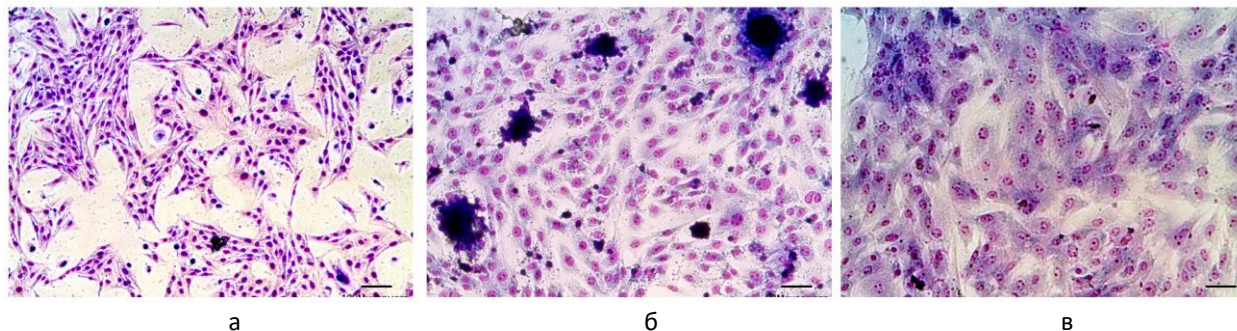


Рис. 2. Мікрофотографія моношарів фібробластів (а), нервових клітин (б), клітин фетальної печінки (в) після доби культивування. Фарбування за Романовським, масштаб лінійки 100 мкм (а) та 50 мкм (б, в).

Fig. 2. Microphotograph of monolayers of fibroblasts (a), nerve cells (б), fetal liver cells (в) after one day of cultivation. Romanowski staining, scale bar 100 μm (a) and 50 μm (б, в).

Нервові клітини. Досліджувані речовини позитивно впливали на адгезивні властивості нервових клітин; показник кількості адгезованих клітин при додаванні екстракту пуповини був на рівні з FBS, хоч і трохи нижчий. У той же час, ліофілізат -80 спричинив зменшення кількості адгезованих клітин порівняно з нервовими клітинами, культивованими без додавання FBS та становить 20% (Рис. 4а). Згідно з результатами МТТ-тесту (Рис. 4б), екстракт пуповини та контрольна група з FBS мали однаковий вплив на життєздатність клітин. У той час, як показник МТТ-тесту для ліофілізату залишився на рівні контрольної групи, де клітини культивувалися лише на базовому середовищі без додаткових факторів.

Спленоцити. Оцінка життєздатності спленоцитів проводилась методом МТТ-тесту. Результати контрольних груп показали, що присутність FBS сприяє покращенню функціонального стану мітохондрій, забезпечуючи високу життєздатність спленоцитів (Рис. 5). Подібний позитивний ефект було виявлено в групі з додаванням кріоекстракту пуповини. Додавання ліофілізату продемонструвало середній показник життєздатності порівняно з чистим середовищем та середовищем з FBS. Це свідчить, що екстракт пуповини може використовуватись як фактор росту для культивування спленоцитів.

Клітини фетальної печінки. Найбільш виражений позитивний вплив на адгезивні властивості клітин фетальної печінки був виявлений при застосуванні FBS та кріоекстракту пуповини, тоді як ліофілізат показав найнижчий результат адгезованих клітин (Рис. 6а). Рисунок 6б демонструє результати часу подвоєння популяції клітин фетальної печінки. Найдовший час подвоєння, близько 25 годин, відзначався у клітин, що культивувалися в базовому середовищі, що є очікуваним показником. Для клітин фетальної печінки, вирощених із додаванням FBS та кріоекстракту пуповини, час подвоєння склав приблизно 18 годин, що на 1,4 рази швидше, ніж у середовищі без додаткових факторів. Ліофілізат кріоекстракту показав час подвоєння, подібний до середовища без факторів, становлячи 23 години. Усі досліджувані зразки не продемонстрували значних відмінностей у показниках оптичної щіль-

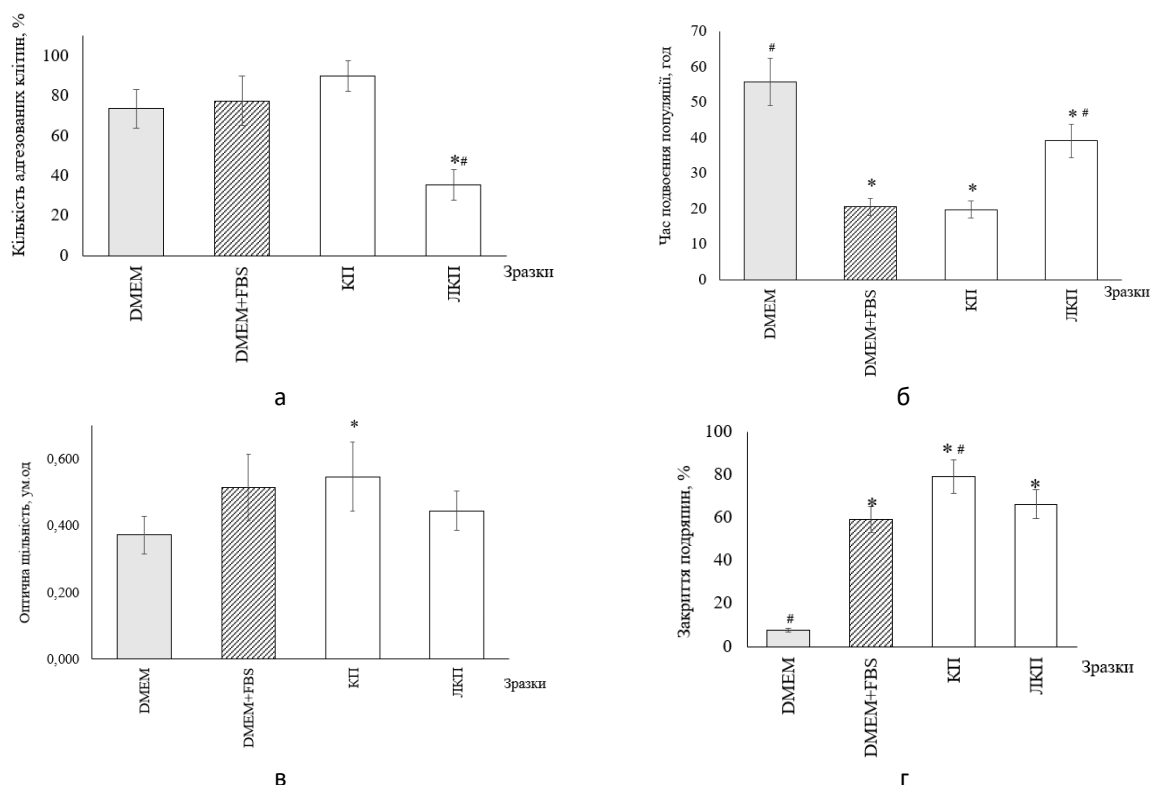


Рис. 3. Результати отримані на фібробластах в присутності досліджуваних речовин: а – адгезія клітин, %; б – тест подвоєння популяції клітин, год; в – МТТ тест, ум.од.; г – скретч тест, %. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.

Fig. 3. The results obtained on fibroblasts in the presence of the tested substances: а - cell adhesion, %; б - cell population doubling test, hours; в - MTT test, C.U.; г - scratch test, %. * - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated with FBS, $p < 0.05$.

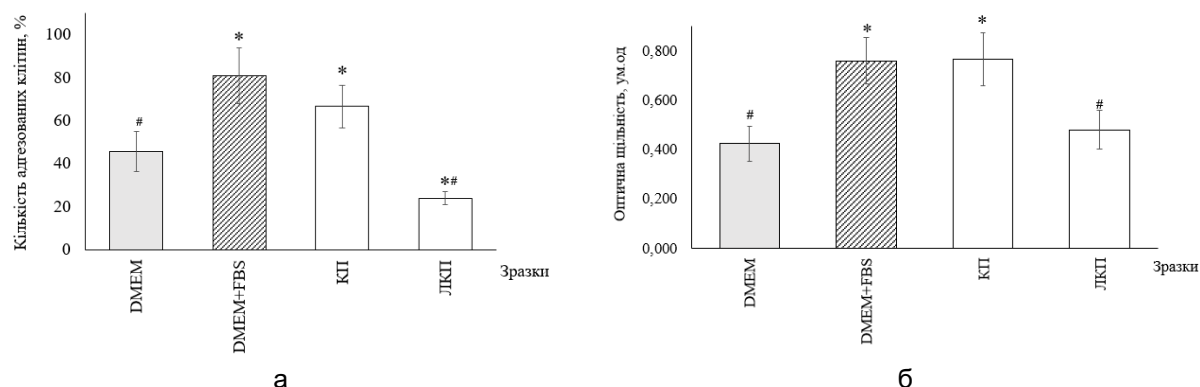


Рис. 4. Результати отримані на нервових клітинах в присутності досліджуваних речовин: а – адгезія клітин, %; б – МТТ тест, ум.од. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.

Fig. 4. The results obtained on nerve cells in the presence of the test substances: а - cell adhesion, %; б - MTT test, C.U. * - the indicator is statistically significantly different from the control cultured without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultured with FBS, $p < 0.05$.

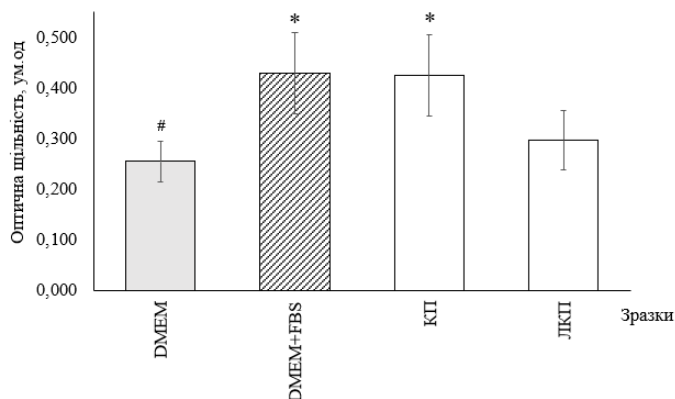


Рис. 5. Показники МТТ тесту спленоцитів в присутності досліджуваних речовин, ум. од. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.
Fig. 5. MTT test results of in the presence of the tested substances, C.U. * – the indicator is statistically significantly different from the control cultured without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultured with FBS, $p < 0.05$.

ності (Рис. 6в). Жоден із зразків не спричинив зниження метаболічної активності клітин фетальної печінки, що свідчить про відсутність токсичного впливу на клітини.

Контрольні результати скретч-тесту для клітин фетальної печінки були очікуваними: середовище з FBS майже втричі прискорило міграцію клітин. За допомогою скретч-тесту було встановлено, що ліофілізат пуповини майже не стимулює міграційну активність, так само як і середовище без додавання FBS. Водночас кріоекстракт пуповини підвищує міграцію клітин, забезпечуючи закриття подряпини приблизно на 70%, тоді як клітини, культивовані з FBS, закривають понад 80% (Рис. 6г).

Обговорення

Результати показали, що кріоекстракт пуповини значно перевищує ліофілізовану форму за ефективністю впливу на досліджувані клітини. У фібробластів додавання кріоекстракту пуповини сприяло підвищенню адгезії та міграційної активності, що узгоджується з раніше отриманими даними про позитивний вплив, наприклад екстрактів плаценти на проліферацію фібробластів шкіри, що відображає вплив на регенеративні процеси (Cho et al., 2008), підвищення проліферації та міграційної активності фібробластів при додаванні кріоекстракту пуповини (Shevchenko et al., 2023). Також результати дослідження кріоекстракту пуповини на оваріоектомованих щурах свідчать про зменшення проявів старіння, при цьому описується, що епідерміс та дерма стали товщими та спостерігалась проліферація клітин (Falko et al., 2024). Зокрема, у тесті на подвоєння популяції клітини, оброблені кріоекстрактом пуповини, показали аналогічні результати до групи FBS, що підтверджує його стимулюючий вплив на проліферацію. Ліофілізована форма кріоекстракту демонструє хороший результат міграційної активності клітин, цей показник дещо нижчий від кріоекстракту, однак на рівні з FBS.

Щодо нервових клітин, обидва досліджувані зразки також показали сприятливий вплив на адгезивні та метаболічні властивості. Проте кріоекстракт виявився більш ефективним у підтримці життєздатності клітин, про що свідчать результати МТТ-тесту. Це підтверджує його потенціал як компонента для культивування нейронних культур та підтверджує його нейропротекторний ефект, який також було виявлено у іншому дослідженні при використанні екстракту плаценти на нервові клітини, при цьому підвищувалась метаболічна активність клітин та екстракт плаценти захищав нервові клітини від токсичного впливу глутамату та сприяв відновленню після пошкодження (Prokoryuk, Chub et al., 2017).

Для спленоцитів кріоекстракт пуповини продемонстрував суттєве покращення функціонального стану мітохондрій, що є важливим показником для подальшого використання екстракту в імунологічних дослідженнях. Це збігається з результатами дослідження екстракту плаценти, який у поєднанні з кондиційованими середовищами знижував метаболічну активність спленоцитів та активність реакції бласттрансформації лімфоцитів, особливо при використанні

кріоконсервованих плацентарних клітин і експлантів (Prokopiuk, Falko et al., 2018). Ліофілізат у даному випадку продемонстрував помірний ефект, однак залишався менш ефективним у порівнянні з кріоекстрактом та FBS.

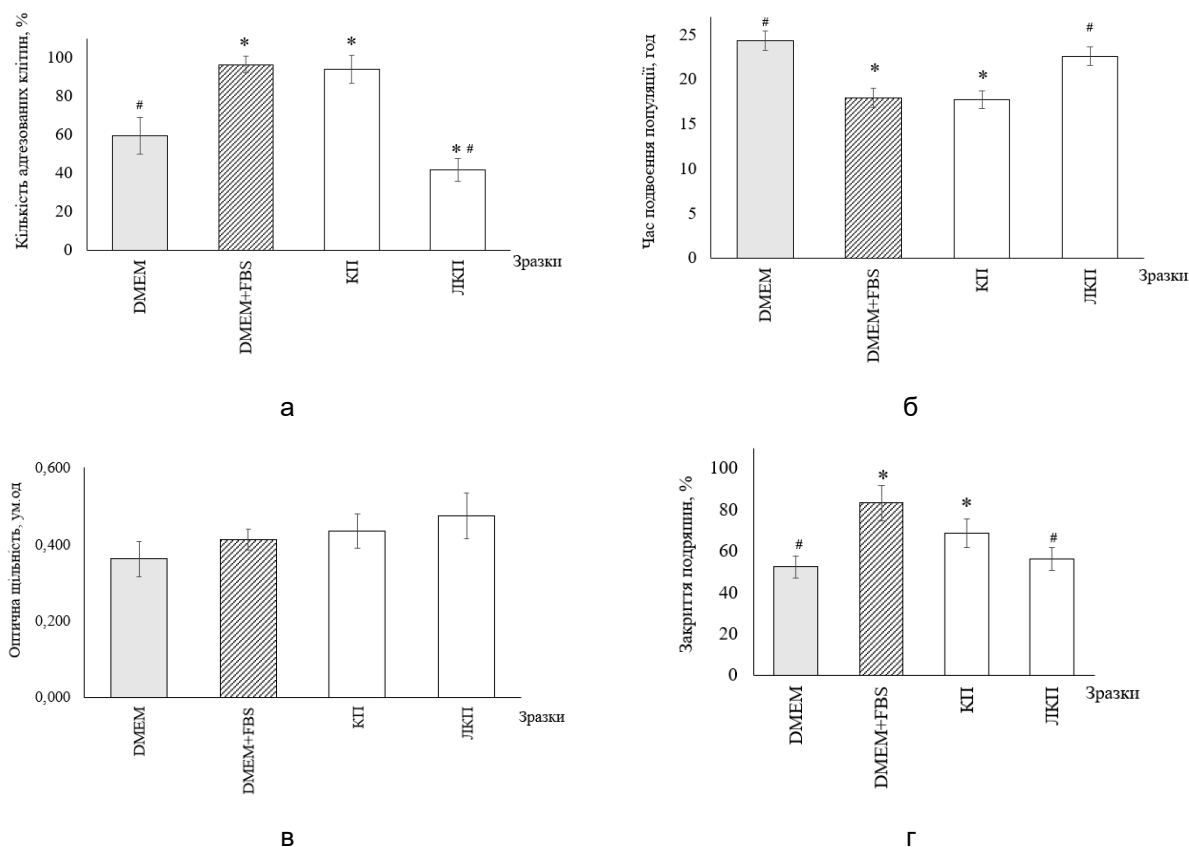


Рис. 6. Результати отримані на клітинах фетальної печінки в присутності досліджуваних речовин: а – адгезія клітин, %; б – тест подвоєння популяції клітин, год; в – МТТ тест, ум.од.; г – скретч тест, %. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.

Fig. 6. The results obtained on fetal liver cells in the presence of the test substances: а - cell adhesion, %; б - cell population doubling test, hours; в - MTT test, C.U.; г - scratch test, %. * - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated with FBS, $p < 0.05$.

Аналіз впливу на клітини фетальної печінки показав, що кріоекстракт пуповини позитивно впливає на адгезію та проліферацію, хоча міграційна активність залишалася дещо нижчою порівняно з групою FBS. Наприклад МСК отримані з пуповини послаблюють вплив аутоімунного гепатиту (Wei et al., 2023). Відомо, що екстракт плаценти має великий терапевтичний потенціал при захворюваннях печінки, таких як гепатит, фіброз та жирова дистрофія печінки (Shen et al., 2022). Результати оцінки здатності до адгезії демонструють пригнічення адгезії при культивуванні в середовищі з додаванням ЛКП. Це може бути пов'язано з денатурацією білків, яка відбувається під час процесу ліофілізації. Видалення водного оточення, що стабілізує природну конформацію білків, призводить до їхньої структурної нестабільності. Внаслідок цього білки втрачають здатність до правильного зв'язування з клітинами, що знижує їхні адгезивні властивості (Matejtschuk, 2007).

Висновки

В результаті проведеного дослідження було виявлено, що кріоекстракт пуповини показав перспективи як заміник FBS, оскільки він значно підсилює адгезію, проліферацію та метаболічну активність клітин, зокрема фібробластів, нервових клітин, клітин фетальної печінки та спленоцитів,

що робить його корисним для відновлення тканин шкіри, нервової та імунної систем. Натомість ліофілізат показав нижчу активність, зокрема у стимулюванні клітинної адгезії, але є ефективним для загоєння ран, завдяки позитивному впливу на фібробласти, і може бути корисним там, де важлива стабільність і тривалий термін зберігання. Перспективи подальших досліджень мають бути зосереджені на вивченні механізмів дії кріоекстракту та оптимізації ліофілізації для ширшого застосування у регенеративній медицині.

Список літератури / References

- Akers M. J. (2015). Basic Principles of Lyophilization, Part 1. International journal of pharmaceutical compounding, 19(6), 471–476.
- Al Obaydi, M. F., Hamed, W. M., Al Kury, L. T., Talib, W. H. (2020). Terfezia boudieri: A Desert Truffle With Anticancer and Immunomodulatory Activities. Frontiers in nutrition, 7, 38. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00038>
- Chen, K. H., Shao, P. L., Li, Y. C., Chiang, J. Y., Sung, P. H., Chien, H. W., Shih, F. Y., Lee, M. S., Chen, W. F., Yip, H. K. (2020). Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy Effectively Protected the Brain Architecture and Neurological Function in Rat After Acute Traumatic Brain Injury. Cell transplantation, 29, 963689720929313. <https://doi.org/10.1177/0963689720929313>
- Cho, H. R., Ryou, J. H., Lee, J. W., Lee, M. H. (2008). The effects of placental extract on fibroblast proliferation. Journal of cosmetic science, 59(3), 195–202.
- Culenova, M., Nicodemou, A., Novakova, Z. V., Debreova, M., Smolinská, V., Bernatova, S., Ivanisova, D., Novotna, O., Vasicek, J., Varga, I., Ziaran, S., Danisovic, L. (2021). Isolation, Culture and Comprehensive Characterization of Biological Properties of Human Urine-Derived Stem Cells. International journal of molecular sciences, 22(22), 12503. <https://doi.org/10.3390/ijms222212503>
- Falko O., Shevchenko N., Volina V., Terekhova O., Prokopyuk O., Kaverinska A., Karpenko V., Prokopyuk V. (2024). Cryopreserved Umbilical Cord Extract Restores the Skin Structure in Ovariectomized Rats. Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 34(1), 33-44. <https://doi.org/10.15407/cryo34.01.033>
- Galieva, L. R., Mukhamedshina, Y. O., Arkhipova, S. S., Rizvanov, A. A. (2017). Human Umbilical Cord Blood Cell Transplantation in Neuroregenerative Strategies. Frontiers in pharmacology, 8, 628. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00628>
- Hulkower, K. I., Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. Pharmaceutics, 3(1), 107–124. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>
- Kim, S. M., Moon, S. H., Lee, Y., Kim, G. J., Chung, H. M., Choi, Y. S. (2013). Alternative xeno-free biomaterials derived from human umbilical cord for the self-renewal ex-vivo expansion of mesenchymal stem cells. Stem cells and development, 22(22), 3025–3038. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0067>
- Li, W., Ye, B., Cai, X. Y., Lin, J. H., Gao, W. Q. (2014). Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into prostate-like epithelial cells in vivo. PloS one, 9(7), e102657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102657>
- Matejtschuk P. (2007). Lyophilization of proteins. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 368, 59–72. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_4
- Nayak, S., Mengi, S. (2010). Immunostimulant activity of noni (Morinda citrifolia) on T and B lymphocytes. Pharmaceutical biology, 48(7), 724–731. <https://doi.org/10.3109/13880200903264434>
- Priyadarshini, P., Samuel, S., Kurkalli, B. G., Kumar, C., Kumar, B. M., Shetty, N., Shetty, V., Vishwanath, K. (2021). In vitro Comparison of Adipogenic Differentiation in Human Adipose-Derived Stem Cells Cultured with Collagen Gel and Platelet-Rich Fibrin. Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India, 54(3), 278–283. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1733810>
- Prokopiuk V. Yu., Falko O. V., Karpenko V. G., Chub O. V., Loginova O. O. (2018). Influence of native and cryopreserved placental derivatives on the splenocyte functional characteristics in vitro. Вісник проблем біології і медицини, Вип. 2 (144), 221–224. [Doi:10.29254/2077-4214-2018-2-144-221-224](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2018-2-144-221-224)
- Prokopyuk V., Onishchenko A., Yefimova S., Chumachenko T., Kavok N., Maksimchuk P., Klochkov V., Tkachenko A. (2021). Cytotoxicity Tests on Cultured Rat Skin Fibroblasts Revealed no Toxicity for Low Concentrations of GdYVO4:Eu3+ Nanoparticles. IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications Properties (NAP), 1-4. [Doi: 10.1109/NAP51885.2021.9568547](https://doi.org/10.1109/NAP51885.2021.9568547).
- Prokopyuk V.Yu., Chub O.V., Shevchenko M.V., Prokopyuk O.S. (2017). Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity in vitro. Cell and Organ Transplantation, 5(1), 39-42. <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.67>
- Shen, L. H., Fan, L., Zhang, Y., Zhu, Y. K., Zong, X. L., Peng, G. N., Cao, S. Z. (2022). Protective Effect and Mechanism of Placenta Extract on Liver. Nutrients, 14(23), 5071. <https://doi.org/10.3390/nu14235071>
- Shevchenko N., Terekhova O., Kaverinska A., Prokopiuk O., Lazurenko V., Prokopiuk V. (2023). Evaluation of Effectiveness of Umbilical Cord Cryoextract in Aesthetic Medicine (in Vitro Study). Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 33(2), 133-8. <https://doi.org/10.15407/cryo33.02.133>

- Sukhodub L., Kumeda M., Sukhodub L., Tsyndrenko O., Petrenko O., Prokopiuk V., Tkachenko A. (2024). The effect of carbon and magnetic nanoparticles on the properties of chitosan-based neural tubes: Cytotoxicity, drug release, In Vivo nerve regeneration. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 8:100528. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100528>
- Ward, K. R., Matejtschuk, P. (2021). The Principles of Freeze-Drying and Application of Analytical Technologies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2180, 99–127. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_3
- Wei, X., Cheng, X., Luo, Y., Li, X. (2023). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate S100-Induced Autoimmune Hepatitis via Modulating Th1 and Th17 Cell Responses in Mice. *Stem cells international*, 2023, 9992207. <https://doi.org/10.1155/2023/9992207>
- Yildiz, H., Sen, E., Dalcik, H., Meseli, S. E. (2023). Evaluation of cell morphology and adhesion capacity of human gingival fibroblasts on titanium discs with different roughened surfaces: an in vitro scanning electron microscope analysis and cell culture study. *Folia morphologica*, 82(1), 63–71. <https://doi.org/10.5603/FM.a2022.0072>

Comparison of the effects of umbilical cord cryoextract and lyophilized form on the adhesive, proliferative, and metabolic properties of various cell types

A.I. Kaverinska, V.Yu. Prokopiuk

The objective was to ascertain the potential of cryo-umbilical cord extract as an alternative to fetal bovine serum (FBS), which is conventionally employed to stimulate cell growth but is subject to ethical and safety constraints. The umbilical cord cryo-extract is a rich source of bioactive components that have been demonstrated to enhance the adhesive, proliferative and metabolic activity of cells. Furthermore, it has been shown to be an effective substitute for serum in the cultivation of various cell types, making it a promising candidate for use in cellular technology and regenerative medicine. The findings of the experimental study demonstrated that the cryoextract of the umbilical cord exhibited a notable enhancement in the adhesive and proliferative attributes of the cells, when compared to the other conditions that were investigated. The fibroblasts demonstrated high adhesion and rapid migration in the presence of the cryoextract, which provides advantages for potential use in the restoration of the connective tissue stroma of various organs and skin. The nerve cells demonstrated enhanced viability and stability in comparison to FBS, which renders the umbilical cord cryoextract a promising candidate for incorporation into neuroregenerative technologies. Furthermore, the cryoextract exhibited a substantial beneficial impact on fetal liver cells, augmenting their metabolic activity and adhesion, thereby opening avenues for investigation into liver regeneration. The effect on splenocytes was also favorable, indicating that it can be employed to bolster immune function in circumstances where immune response regulation is necessary. The lyophilized cryoextract demonstrated a limited positive effect, particularly in relation to its adhesive and proliferative properties. However, this effect was less pronounced than that observed in the cryoextract. The addition of the lyophilized cryoextract to nerve cells and fibroblasts resulted in a reduction in adhesion and migration activity, indicating the necessity for optimization of the lyophilization process to preserve the biological activity of the extract. However, the stability of the lyophilized cryoextract and its capacity for long-term storage render it a valuable resource in situations where the preservation of bioactive components and a prolonged shelf life are of significance. Thus, cord cryoextract represents a promising alternative to FBS, which has the potential to provide the necessary support for cell growth, adhesion and proliferation. Nevertheless, the technology employed in the production of cryo-umbilical cord extract lyophilization must undergo further refinement in order to attain the same efficacy as that observed in cryoextract. Further research should concentrate on a comprehensive examination of the mechanisms of action of cryoextract, in addition to the optimization of lyophilization techniques to adapt this product to the requirements of cell technology and regenerative medicine. This will facilitate its wider application in the stimulation of tissue regeneration and the restoration of functional activity in various organs.

Key words: primary cell culture, umbilical cord, cryoextract, lyophilization.

Cite this article: Kaverinska A.I., Prokopiuk V.Yu. (2024). Comparison of the effects of umbilical cord cryoextract and lyophilized form on the adhesive, proliferative, and metabolic properties of various cell types. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 96-104. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-8> (in Ukrainian)

About the authors:

A.I. Kaverinska — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Peryaslavska St., Kharkiv, Ukraine, 61016, kaverinskaanna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3414-1656>
 V.Yu. Prokopiuk — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Peryaslavska St., Kharkiv, Ukraine, 61016, v.yu.prokopiuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4379-4130>

Received: 02.10.2024 / Revised: 10.11.2024 / Accepted: 19.11.2024

*** ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ РОСТУ, РОЗВИТКУ ТА ПРОДУКТИВНОСТІ РОСЛИН ***
*** PRACTICAL ASPECTS OF PLANTS GROWTH REGULATION, DEVELOPMENT AND PRODUCTIVITY ***

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-9
UDC: 579.6:633:631.8

The effect of artificial mycorrhization on the growth and development of plants in a vegetation experiment
O.I. Vinnikova

Nowadays, numerous commercially available biological preparations based on arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are suggested for practical use in agriculture. The potential benefits of inoculating soils with AM fungi for crop production have been shown in many studies. However, the level of the universality of such preparations, i.e. the effectiveness of artificial mycorrhization using one particular fungi species for different agricultural plants, still remains unclear. The aim of present study was to assess the possibility and effectiveness of artificial mycorrhization of tomatoes and wheat under in a vegetation experiment. The effects of adding preparation Mycoplant, which contains propagules of endomycorrhizal fungi, to the soil on seed germination, plant morphometric parameters, and the concentration of chlorophyll in wheat and tomato leaves were assessed. Seeds of wheat lines isogenic for Vrn genes of the Myronivska 808 variety and two varieties of tomatoes - the early-ripening Kremenchutsky rannij variety and the late-ripening Ace variety were used in the experiment. The use of Mycoplant stimulated the germination of wheat seeds: the wheat plants sprouted earlier and moved through the consequent stages of development earlier than in control. However, an opposite effect took place on the germination of tomato seeds. The treatment with Mycoplant caused an overall tendency to increase of morphometric parameters in wheat isogenic lines Vrn-A1a and Vrn-D1a at different stages of plant growth and development; that correlated with the formation of surface mycorrhiza on the roots. The positive effect of artificial mycorrhization on the photosynthesis was established only for the isogenic line Vrn-D1a, and only at the stage of grain filling. In tomatoes the formation of arbuscular mycorrhiza due to Mycoplant treatment was observed, but no positive effect on the morphometric parameters or chlorophyll concentration in leaves was detected. The maximum frequency of occurrence of mycorrhiza was found in tomatoes of the Kremenchugskii rannij variety, and the maximum intensity of mycorrhizal formation was found in experimental series of the late-ripening Ace variety.

Key words: *artificial mycorrhization, isogenic wheat lines, tomatoes, morphometric parameters, chlorophyll concentration*

Cite this article: Vinnikova O.I. (2024). The effect of artificial mycorrhization on the growth and development of plants in a vegetation experiment. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 105-115. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-9>

About the author:

O.I. Vinnikova – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine, 4, Svobody Maidan, Kharkiv, Ukraine 61022 o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

Received: 09.07.2024 / Revised: 26.10.2024 / Accepted: 26.11.2024

Introduction

Over the past few decades, the problem of sustainable development of agricultural production systems – grains and vegetables – has been considered a "hot topic" in applied science. Crop production systems need to be continually improved to reduce their environmental impact and protect and improve soil resources. At the same time, the intensity of food production must be maintained constantly growing, which is currently achieved by increasing soil fertility, mainly through the use of high doses of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers. However, preference should be given to technologies aimed at obtaining high yields while reducing the use of pesticides and synthetic fertilizers (Felföldi et al., 2022; Noceto et al., 2021). Also, for active development, plants need a balanced content of available forms of biogenic elements in the soil. The main natural suppliers of these elements in the soil are microorganisms - bacteria and micromycetes. The growth and development of plants directly depends on the activity of microorganisms, and most importantly, on their quantity. Among biogenic elements, phosphorus is a limited resource that can be depleted (Li et al., 2017). One of the ways to provide plants with phosphorus is the formation of mutualistic relations between the plant organism and mycorrhizal fungi. More than 80% of terrestrial plants form arbuscular mycorrhizae (AM) with Glomeromycota fungi. Mycorrhizae occur in almost

all associations and have a significant impact not only on phytobionts, but also on the entire biogeocenosis (Abarca, et al., 2024, Jiang et al., 2017).

Various forms of relationships between fungi and plants have become the basis for their variable use in biotechnology. In conditions of intensive agriculture, AM fungi are as important as in natural habitats. The ecological function of mycorrhizae is displayed, first of all, through the viability of the host plant. The mechanisms of this phenomenon are quite diverse and include mycorrhizal regulation of plant photosynthesis, improvement of the water consumption, increased resistance to adverse factors and provision of the host plant with mineral elements, primarily phosphorus and nitrogen, due to the enlargement of the contact zone between the roots and the soil, as well as the transfer of these elements into better accessible forms for plants. In addition, mycorrhizae help protect root systems against pathogenic soil microorganisms (Dowarah et al., 2022, Elliott et al., 2021, Wei et al., 2023). The symbiosis of agricultural crops with mycorrhizal fungi increases the nutritional value of grain and fruits due to more intensive plant production of organic substances (sugars, amino acids) and secondary metabolites – flavonoids, carotenoids, phytochemicals and volatile organic complexes (Dhiman et al., 2022, Fusco et al. 2022). Moreover, AM colonization of plant roots is believed to provide many “non-nutritional” benefits and positive agro-ecosystem properties, such as a preservation of soil inoculum potential and soil structure (De Vita, 2018).

Reducing the number of plant species in a certain area (for example, wheat-corn rotation), the use of mineral fertilizers and the use of fungicides leads to a decrease in the number and activity of AM fungi. On areas that are constantly used for agricultural production, the number of AM fungal propagules in the upper soil layer (0-30 cm) significantly drops down (Bakonyi, 2018, Elliott et al., 2021). Therefore, in agriculture, AM is a natural alternative to the introduction of large amounts of fertilizers, primarily phosphorus, and can be used both for the preservation of natural ecosystems or for their restoration in case of disruption.

Despite a large number of commercially available biological preparations based on AM fungi, a number of questions in regard of their optimum application still remain unanswered. In particular, it is unclear, whether there is a certain universality of such preparations, that is, whether mycorrhiza can be equally effective with different types of agricultural crops and whether it is possible to use a biopreparation in different conditions (Elliott et al., 2021, Thirkell et al., 2022). There are conflicting data on the sensitivity of some species of cultivated plants, in particular wheat, to AM fungi, that casts doubt on the commercial use of these preparations to improve grain productivity (Yang et al., 2022). Some studies revealed remarkable differences in plant susceptibility and/or response to mycorrhization among wheat genotypes differing in ploidy, geographic origin, and nutrient utilization efficiency (De Vita, 2018). Thus, the sensitivity of different plant varieties or isogenic lines to AM remains essentially uncertain.

In this regard, the aim of the present research was to evaluate the possibility and effectiveness of artificial mycorrhization of tomatoes and wheat under the conditions of a vegetation experiment.

Materials and methods

Biological material. The seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) isogenic lines of *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a*, and *VrnD1a* genes were used. These lines were created in the gene pool of the Myronivska 808 variety and are maintained at the Department of Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms of V.N. Karazin Kharkiv National University. *VRN* (vernalization response) genes control the response of wheat to vernalization. In particular, *VRN* genes determine the pace of plant development, and thus are responsible for the transition from the vegetative period of development to the generative one. The recessive state of these genes determines the winter type of plant development, and the dominance of at least one of the genes triggers a vigorous wheat development program (Dennis, Peacock, 2009).

Seeds of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) used in this study were of two commercially available varieties: the early-ripening Kremenchutsky rannij (Kr. rannij) and the late-ripening Ace.

Mycorrhization of seeds was carried out using Mycoplant (Mykolife, Germany), which contains propagules of endomycorrhizal fungi. This biological preparation is intended for artificial mycorrhization of cereals, vegetable crops and some berries. According to the manufacturer, the effectiveness of mycorrhization for various agricultural crops reaches 90%. Also, according to the manufacturer, the effectiveness of the drug does not depend on the type of soil – greenhouse or open field, as well as on soil composition or fertility.

Study design. Plant seeds (15 items of each plant and variety) were sown in vessels filled with 1 L (tomatoes) or 2 L (wheat) of sterile soil, taken from the agrocenosis of the experimental site of the Department of Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms of the Karazin University, located on the territory of the University Botanical Garden, Kharkiv. The Mycoplant drug was added in

quantity 5 g of granules per 1 L soil according to the manufacturer's recommendations. Vessels with drug-free sterile soil served as controls. Plants were grown in a vegetation chamber at a temperature of $+24\pm 2^{\circ}\text{C}$, 16 hours of light per day, and regular watering with tap water.

Seed germination was assessed by the number of sprouts that appeared on the fifth day after sowing. Morphometric parameters, such as length and mass of above-ground and underground parts, and chlorophyll content in the leaves were measured in experimental and control series, and the efficiency of mycorrhizal formation – in the experimental series only (the absence of spontaneous appearance of mycorrhizal fungi in the plants of control series was checked by microscopy, as described below). Wheat plants were examined at different stages of ontogenesis: tillering, output into a tube, earing and grain filling. Tomato plants were examined at the stages of growth cone differentiation (5-6 leaves), flower formation (7-8 leaves for the early-ripening *Kr. rannij* variety and 12-14 leaves for the late-ripening *Ace* variety) and budding. At mentioned stages of plant development, 5 plants were randomly selected within each series for measurements.

Quantification of chlorophyll a and b was carried out in fixed dry material (dried for 30 min at a temperature of $+120^{\circ}\text{C}$ followed by 24 h at $+70^{\circ}\text{C}$). Pigments were extracted with 80% acetone. Pigment contents in the solution was measured via the optical density on the spectrophotometer Ulab 102UV (China) at wavelengths $\lambda=649$ nm and $\lambda=665$ nm. The concentration of chlorophylls was calculated according to H. K. Lichtenthaler's formulas (Lichtenthaler, 1987).

Mycorrhizal formation was assessed in plant roots at the last studied phase of the plant growth. Roots were collected in 5 plants randomly chosen from each vessel. Roots were macerated (10% KOH, 30 min at 95°C), washed and stained with aniline blue in 90% lactic acid. Then 1 cm long root fragments were separated with a scalpel; 20 such fragments were randomly chosen in each experimental series, and pressed preparations were made. Microscopy was carried out using a light microscope at $\times 600$ magnification. On each preparation 50 randomly chosen fields of view per preparation were analyzed; the presence and location of fungi hyphae, arbuscules or vesicles were recorded. The frequency of occurrence of mycorrhizal infection (F, %) was calculated according to the formula:

$$F = \frac{n \times 100}{N}$$

where N – is the total number of analyzed fields of view; n is the number of fields of view in which mycorrhiza was detected.

The intensity of mycorrhizal infection (the degree of plant mycotrophy) was expressed as a cumulative frequency of root zones with different, arbitrary estimated grades of infection:

$$c = \frac{\sum_{i=1}^5 n_i \times i}{N \times K} \times 100$$

where n_1 – the number of zones with a score of 1; n_2 – the number of zones with a score of 2; n_3 – the number of zones with a score of 3, etc.; N is the total number of investigated root zones (with or without a fungi); K is the highest score on the accounting scale; i – the serial number of the root zone. For this assay, 5 zones were consequently analysed along a 1 cm long root fragment.

Statistical analysis. The parameters were measured in three parallel replicates of each series; the results were combined averaged. The entire experiment was repeated twice; the means obtained in two experiments were pooled, and their overall mean and its standard error (SE) were calculated using the built-in option of the Microsoft Excel™ software package. Mean values were compared between experimental series using the Tukey test, considering the difference to be significant at $p \leq 0.05$.

Results and Discussion

The first stage of the study included assessing the germination rate of tomato and wheat seeds (Table 1). The germination of wheat seeds was non-simultaneous in control and experimental series; a 5 day earlier germination was observed in series with lines *Vrn-A1a* and *Vrn-B1a* treated with Mycoplant compared to the control; less pronounced speeding up was noted for *Vrn-D1a*. Also, a different pattern was observed for tomatoes: seeds of the *Kr. rannij* germinated in the presence of the drug at the same time as in the control, while for tomato seeds of the *Ace* variety the Mycoplant caused a 5 days earlier germination compared to that in the untreated control.

Table 1. The effect of artificial mycorrhization on the germination of wheat and tomato seeds

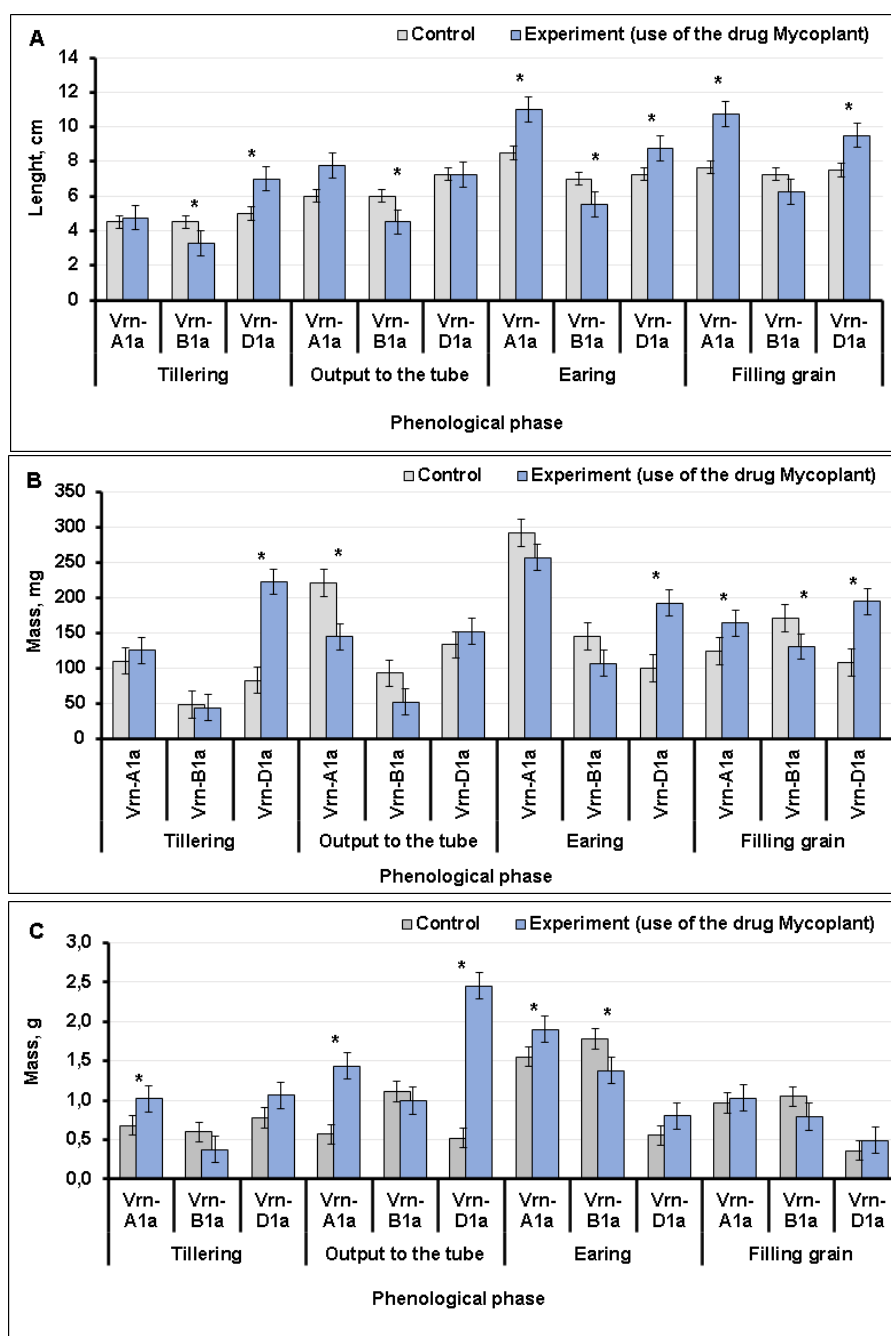
Seeds	Germination, days,	
	Untreated control	Mycoplant
Wheat, <i>Vrn-A1a</i>	11	6
Wheat, <i>Vrn -B1a</i>	12	7
Wheat, <i>Vrn-D1a</i>	8	6
Tomato, <i>Kr. rannij</i>	7	7
Tomato, <i>Ace</i>	17	9

Further observations of the growth and development of wheat and tomato plants showed that the average intervals of transition between subsequent stages of development were shorter in the series treated with Mycoplant than that in control. For wheat of the isogenic line *Vrn-A1a* this difference was 4.5 days, for the line *Vrn-B1a* – 2.75 days, and for the *Vrn-D1a* line – 3.8 days. For tomatoes, the average interval of transition from one stage of development to another was also shorter in the experiment than in control; mean difference was 8 and 6 days, respectively, for the *Kr. rannij* and *Ace* varieties. Thus, artificial mycorrhization stimulated the seed germination of wheat lines, which have an accelerated growth rates, and in tomatoes such an acceleration was observed only for the late-ripening variety. Also, the positive effect of various biological preparations based on mycorrhizal fungi on the germination and development of agricultural plants was reported by many authors (Berger, 2021, Dhiman, et al., 2022, Fusco et al., 2022, Poleva et al., 2022).

Morphometric parameters – the length of roots and the mass of raw leaves and roots, measured at different stages of plant development in isogenic lines of wheat, are presented in Fig. 1. The mean size of roots in lines *Vrn-A1a* and *Vrn-D1a*, whose seeds germinated in the presence of the Mycoplant, appeared to be significantly longer than that of control plants at almost all stages of development (Fig. 1A), except for the tillering stage in *Vrn-A1a* line and output into a tube in *Vrn-D1a* line. The opposite effect was found for the *Vrn-B1a* line – the average root length of the control plants at almost all stages of development was greater compared to the experimental plants (Fig. 1A). Similar trends occurred in the dynamics of the mass of wheat leaves (Fig. 1C). The mass of roots in the isogenic line *Vrn-D1a* in the Mycoplant-treated series was significantly higher, compared to the control, at almost all stages of growth (Fig. 1B). In contrast to that, in the isogenic line *Vrn-B1a* the mass of the roots was slightly higher in the control compared to the experimental plants during almost the entire study period, and at the grain filling stage this differences reached significance (Fig. 1B). The mass of roots in the isogenic line *Vrn-A1a*, treated with Mycoplant, dropped down significantly below the control level at the stage of output into the tube, but at the grain filling stage was higher than that in control (Fig. 1B).

The dynamics of changes in the morphometric parameters in two varieties of tomato plants are presented in Fig. 2. The root length in *Kr. rannij* differed significantly between treated and control series at the stage of 5-6 leaves, meanwhile in the *Ace* variety – In the phase of flower formation and budding (Fig. 2A). The leaf mass of both tomato varieties tended to decrease in the series treated with Mycoplant compared to the control; in *Kr. rannij* this difference was significant in the phase of flower formation (Fig. 2C). The root mass appeared to be significantly lower in treated series than in control of the *Ace* variety at the 5-6 leaf stage (Fig. 2B).

Thus, the positive effect of the Mycoplant on morphometric parameters was observed mainly in isogenic wheat lines, while it was absent in tomato varieties in our study. The data, available in the literature regarding the influence of AM fungi on plant growth, are quite controversial. The experiments on tomatoes of various varieties showed that plants, inoculated with mycorrhiza, had mainly higher root length and mass (Felföldi et al., Z., 2022). Also, mycorrhizae can modify the root morphology: the area of the absorbing surface increases that improves plant nutrition, and thus provides a positive effect on the increase of above-ground biomass (Shahrajabian et al., 2023). The positive effect of mycorrhization on the growth indicators of wheat was also demonstrated by the experiments of T.J. Thirkell (Thirkell et al., 2022); moreover, the intensity of mycorrhizal formation was not always positively correlated with the increase in biomass of plants of different lines. It was also found that the degree of benefit for plants resulting from their colonization by mycorrhizal fungi can vary. In particular, slow-growing plant species with shorter roots and larger diameters benefited more from a symbiotic association with AM fungi than fast-growing plants with thinner and longer



Note: * – difference is significant as compared with the control, $p \leq 0.05$

Fig. 1. Dynamics of changes in morphometric parameters of wheat plants: A – root length; B – mass of roots; C – mass of leaves.

roots (Tran et al., 2019). Plants, used in our experiments, had different types of root systems. Tomatoes, which had thicker roots compared to wheat, did not show a positive reaction after the treatment with AM-carrying substance.

Mycosymbionts to a certain extent influence the process of photosynthesis, which, in turn, determines the amount of products needed by the fungi for nutrition. During mycorrhization of plant roots, Na^+ transport from roots to shoots is restricted, that increases K^+ / Na^+ , $\text{Ca}^{2+} / \text{Na}^+$ and $\text{Mg}^{2+} / \text{Na}^+$ ratios in leaves and stems, and this stimulates photosynthetic processes. Also, the presence of AM fungi increases

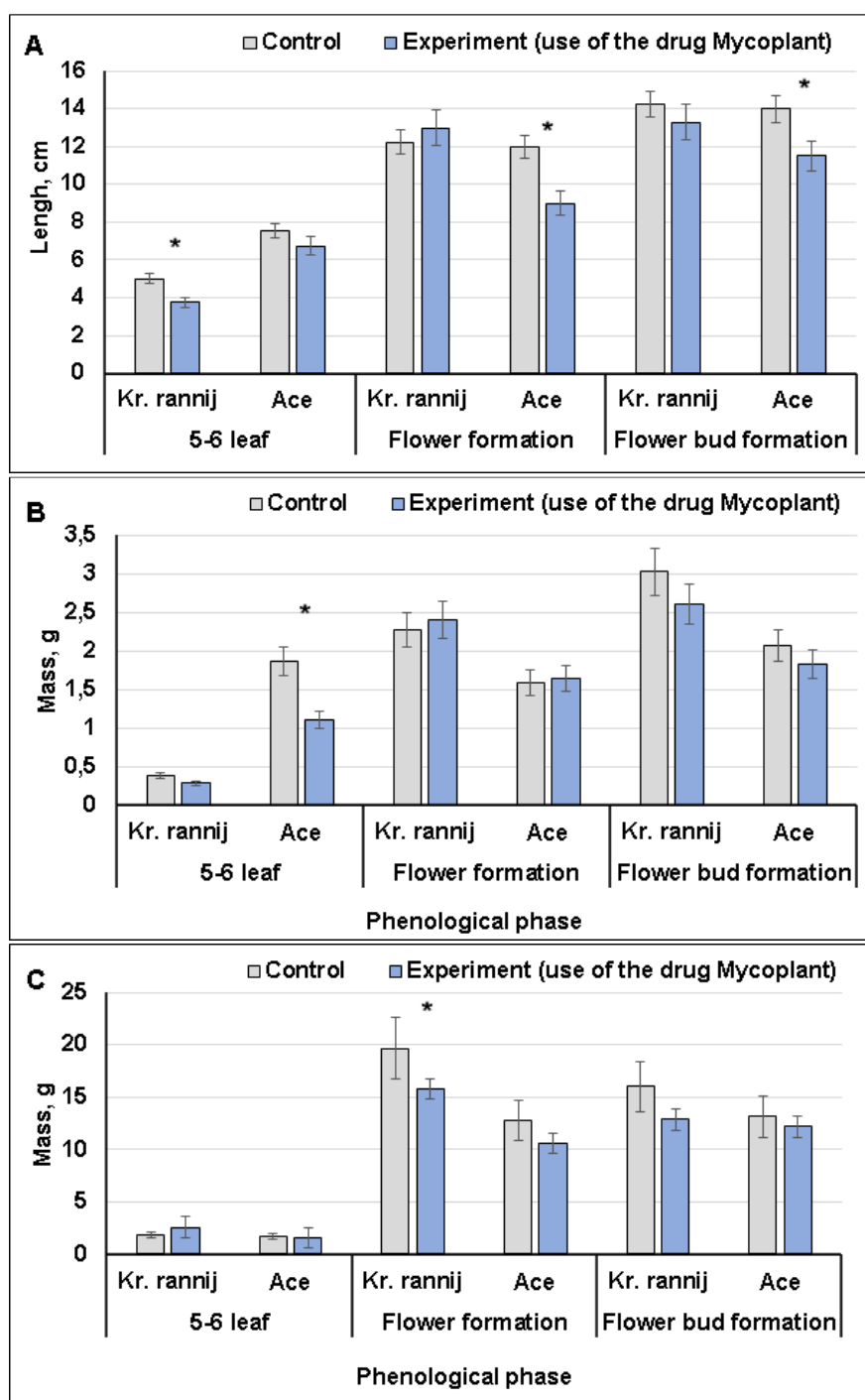


Fig. 2. Dynamics of changes in morphometric parameters of tomato plants: A – root length; B – mass of roots; C – mass of leaves. Note: * – difference is significant as compared with the control, $p \leq 0.05$

the concentration of chlorophyll in leaves of many plants, including crops and tomatoes (Fusco et al., 2022, Khan et al., 2022, Kong et al., 2020). Considering the potential role of the mycorrhizae in the development of the photosynthetic system of plants, we measured the content of chlorophylls in leaves at different stages of plant development. The concentration of chlorophylls *a* and *b* and the sum of chlorophylls were estimated (Fig. 3, Fig. 4).

At almost all studied stages of wheat ontogenesis there was a small difference in the concentrations of chlorophylls *a* and *b* in leaves of plants of Mycoplant-treated series compared to the control. The content of chlorophyll *a* was statistically lower compared to control in the isogenic line *Vrn-B1a* in the phase of output

into the tube and in the line *Vrn-A1a* in the earing phase (Fig. 3A). In the phase of grain filling in wheat leaves of *Vrn-B1a* and *Vrn-D1a* lines, the concentration of chlorophyll *a* was significantly higher in the experimental series compared to control plants (Fig. 3A).

The concentration of chlorophyll *b* in the leaves of wheat line *Vrn-B1a* at all stages of plant development, with the exception of the grain filling phase, was significantly lower in series treated with Mycoplant, compared to the control. However, during grain filling the concentration of chlorophyll *b* in leaves of *Vrn-B1a* line plants significantly exceeded that in control (Fig. 3B). A significant decrease in the contents of total chlorophyll compared to the control occurred in wheat leaves of isogenic lines *Vrn-B1a* and *Vrn-A1a*, respectively, in the phase of the output into the tube and earing, and a significant increase of this parameter was detected in lines *Vrn-B1a* and *Vrn-D1a* in grain filling phase (Fig. 3C).

For tomatos of both varieties, there were no significant differences in the concentrations of both chlorophylls either separately or of their sum, except for the content of chlorophyll *b* in leaves of *Ace* variety in the 5-6 leaf phase, when this parameter was significantly higher in the control (Fig. 3A, 3B, 3C). Comparing the effects of mycorrhization on plant growth and chlorophyll contents, it can be noted that in most cases the differences between the series treated with Mycoplant and the control for these two groups of parameters were the opposite. For example, for wheat of the *Vrn-D1a* line, there was a positive effect of mycorrhization on the length and weight of roots during most phases of development, but no increase in the content of photosynthetic pigments was observed (Fig. 1, Fig. 3). On the contrary, the increase in the chlorophyll concentration in the wheat leaves of the *Vrn-B1a* line at the grain filling stage was not accompanied by an increase in the length of the roots and the mass of the plants (Fig. 1, Fig. 3). Apparently, plant organisms have complex mechanisms of regulation of their growth and development; and, within the scope of this study, we cannot clearly explain the inverse correlation between observed effects. This phenomenon requires additional research and a wider set of measured parameters.

The rate of mycorrhization of wheat and tomato plants was estimated by microscopy analysis of roots. To prove that the mycorrhization was produced specifically by Mycoplant, the preparations from roots of plants of control series were examined along with that of the experimental series. No fungal hyphae were found either on the surface or inside the tissues of the analyzed roots of wheat and tomato plants in the control, which indicates the absence of spontaneous appearance of mycorrhizal fungi, e.g., through airborne contamination, under given experimental conditions. The frequency of mycorrhization and its intensity in the experimental series of wheat and tomato plants at the latest studied phases of plant development are given in Table 2.

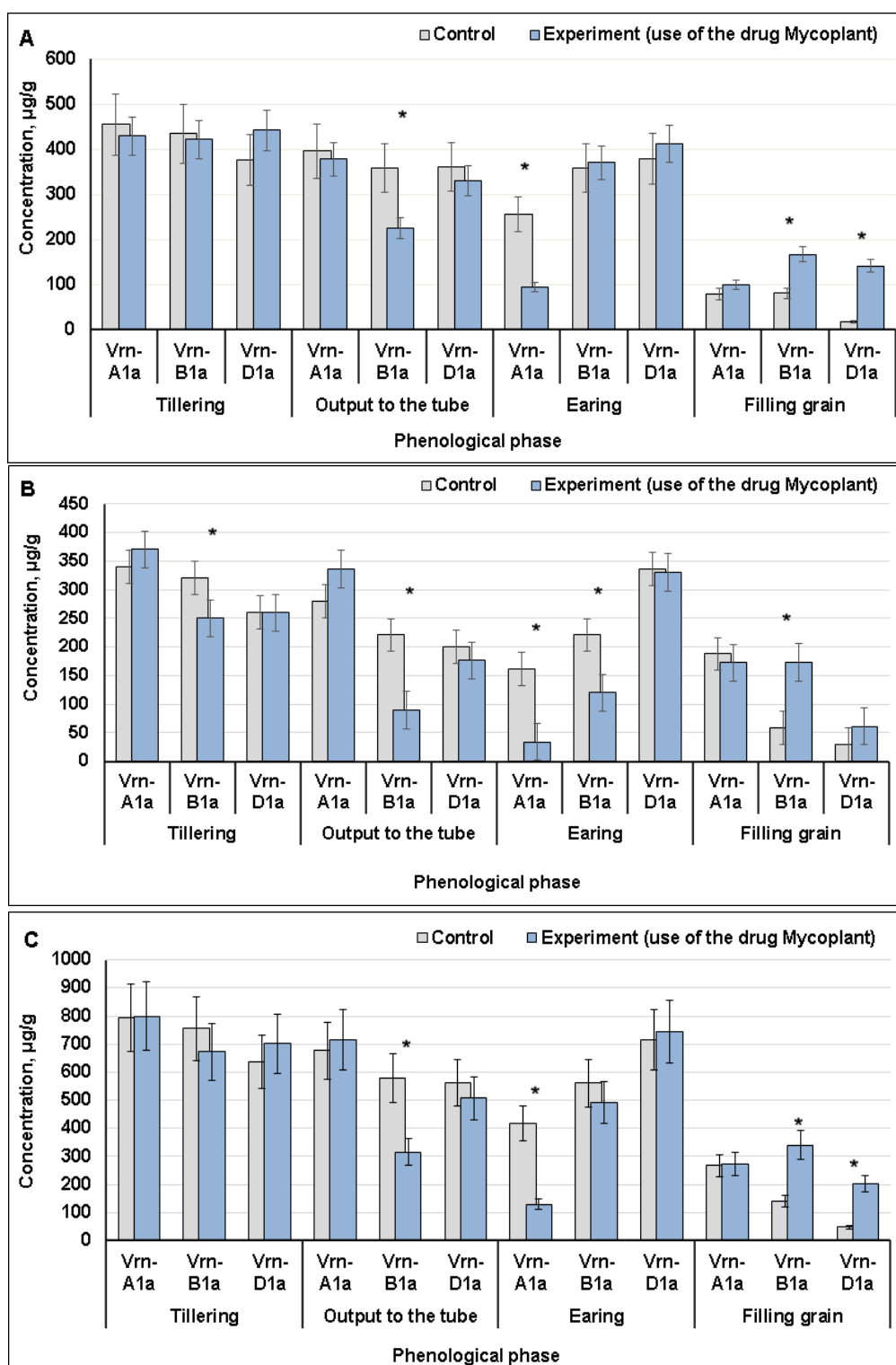
Table 2. Frequency of occurrence and intensity of mycorrhization of the roots of wheat plants (in the grain filling phase) and tomatos (in the flower bud formation phase) plants

Seeds	Frequency of occurrence of mycorrhizal infection (F, %)	Intensity of mycorrhizal infection (C, %)
Wheat, <i>Vrn-A1a</i>	73,0	31–42
Wheat, <i>Vrn -B1a</i>	62,5	63–67
Wheat, <i>Vrn-D1a</i>	81,0	54–57
Tomato, <i>Kr. rannij</i>	75,5	34–46
Tomato, <i>Ace</i>	52,0	67–71

Noteworthy, the presence of fungal hyphae in wheat was detected exclusively on the surface of the roots. In many cases the yield of fungal hyphae on the root surface was quite high. Despite this fact, which was noted at various studied stages of development of wheat plants, no occurrence of arbuscular mycorrhiza inside the roots was detected in our study. In general, about 72% of wheat plants showed signs of ectomycorrhiza formation, and the rest did not enter into symbiosis with fungi after treatment with Mycoplant.

Mycorrhiza of the arbuscular type was detected only in the roots of experimental tomato plants. Arbuscules were found in roots of both varieties of tomatoes at the stage of flower formation. The frequency of occurrence of mycorrhizal infection reached the maximum value of 75.5% in the series of *Kr. rannij*. In different zones of the roots (the tip was a start point), this parameter varied from 20 to 80%. The frequency of mycorrhizal formation in tomatos of the *Ace* variety was significantly lower – 52%. However, the intensity of mycorrhizal infection in this late-ripening variety was almost twice higher than that in *Kr. rannij* tomatoes.

Thus, the frequency of occurrence of mycorrhiza on root surface in wheat and tomatoes had variations



Note: * – difference is significant as compared with the control, $p \leq 0.05$

Fig. 3. Dynamics of changes in chlorophyll concentration in leaves of isogenic lines of wheat: A – chlorophyll a; B – chlorophyll b; C – sum of chlorophylls.

depending on the host plant line or variety. There was a tendency to a negative mutual correlation between the intensity of mycorrhization and the frequency of its occurrence in both plants.

According to the literature, the rate of root colonization by AM fungi is not always related to plant

growth response and varies widely depending on the host plant genotype. Moreover, under certain environmental conditions and during the development of mycorrhiza, the same fungus can be an endophyte, a mutualistic symbiont, a saprotroph, or a necrotrophic parasite. Suppression of plant growth

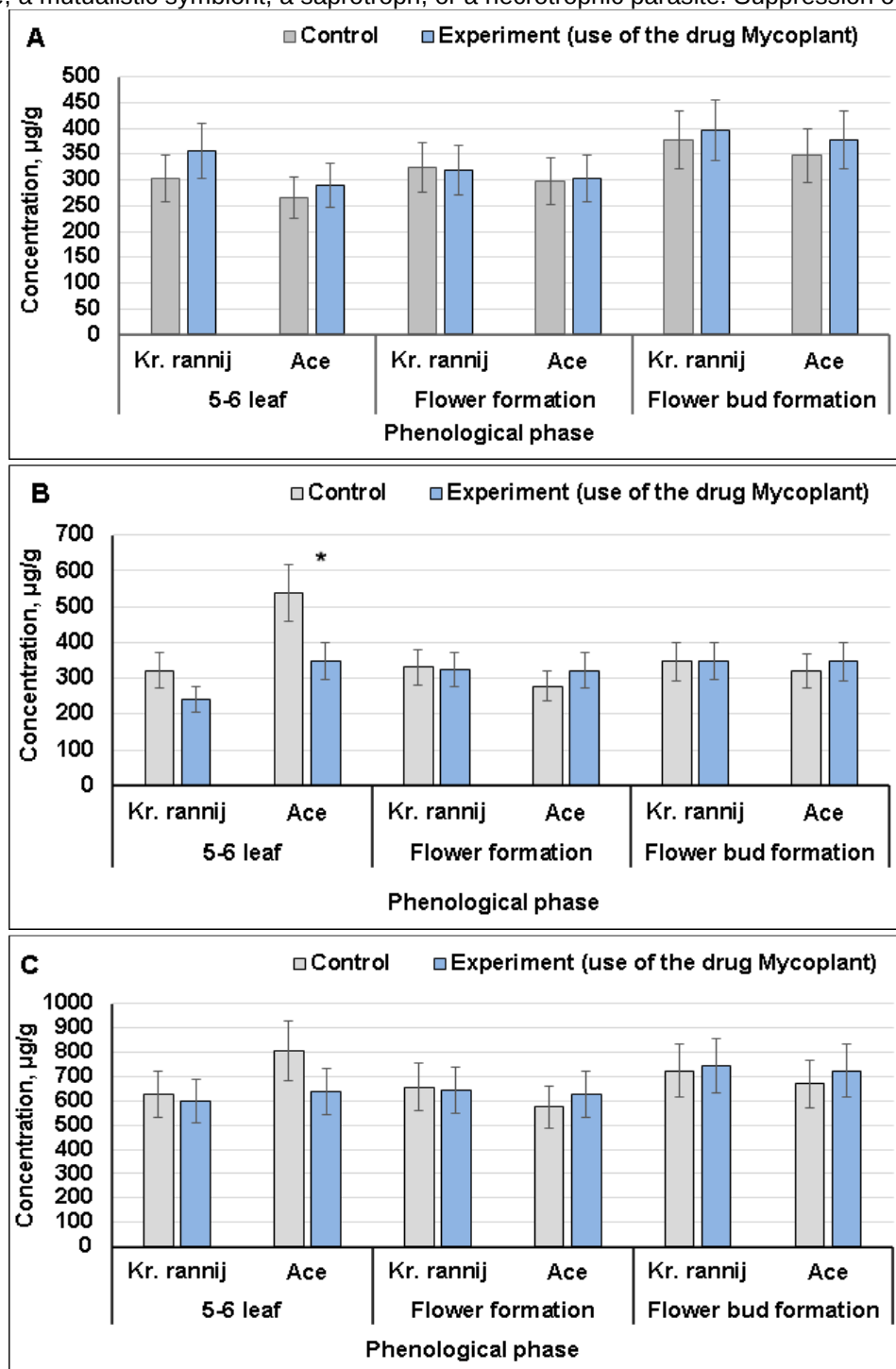


Fig. 4. Dynamics of changes in chlorophyll concentration in leaves of isogenic lines of tomato: A – chlorophyll concentration *a*; B – chlorophyll concentration *b*; C – sum of chlorophylls. due to the development of arbuscular mycorrhiza, as happened to tomatoes in our study, may be associated with the outflow of sugars from the above-ground parts of the plant to the roots to feed the fungus itself (Brundrett, 2004, Felföldi et al., 2022).

Thus, when the Mycoplant was added to the soil, the germination of wheat seeds was stimulated and the germination of tomato seeds was inhibited: the experimental wheat plants sprouted earlier than the control ones and also earlier moved to the next stage of development. In general, the use of the Mycoplant preparation can have a certain positive effect on morphometric parameters and the intensity of photosynthetic processes occurring in the leaves of wheat lines isogenic for *Vrn* genes. However, the development of arbuscular mycorrhiza in the roots of experimental plants was not detected; fungal hyphae grew actively only in the rhizoplane. Regarding tomatoes, the opposite effect was observed: on the background of the development of arbuscular mycorrhiza in the roots, there was practically no increase in the chlorophyll contents or in morphometric parameters in experimental plants grown after artificial mycorrhization. The benefits of using AM fungi are obvious for crop producers, so the possibility of soil inoculation with these fungi is the subject of various studies. Further comprehensive study of the mycorrhization of various species and varieties of plants will make it possible to use the acquired knowledge in the practice of sustainable agriculture.

Список використаних джерел / References

- Полева Л.А., Прокоп'як М.З., Майорова О.Ю. (2022) Використання мікоризного симбіозу в агрономії. Тернопільські біологічні читання. Матеріали Міжнародної наук.-практ. конф. Тернопіль: Вектор, 97-100. [Poleva L.A., Prokopyak M.Z., Mayorova O.Yu. (2022) The use of mycorrhizal symbiosis in agronomy. Ternopil biological readings. Materials of the International Science-Practice. conf. Ternopil: Vector, 97-100.] (In Ukrainian)
- Abarca C., Bidondo L. F., Bompadre J., Velázquez M. S. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi in tomato tolerance to pathogens and nematodes: A comprehensive review. *Scientia Horticulturae*, 329, 112969. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.112969>
- Bakonyi I., Csitári G. (2018). Response of winter wheat to arbuscular mycorrhizal fungal inoculation under farm conditions. *COLUMELLA: JOURNAL OF AGRICULTURAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES*, 5(1), 51-58. <https://doi.org/10.18380/SZIE.COLUM.2018.5.1.51>
- Berger F., Gutjahr C. (2021). Factors affecting plant responsiveness to arbuscular mycorrhiza. *Current opinion in plant biology*, 59, 101994. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101994>
- Brundrett M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews*, 79(3), 473-495. <http://dx.doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- De Vita, P., Avio L., Sbrana C. et al. (2018). Genetic markers associated to arbuscular mycorrhizal colonization in durum wheat. *Scientific reports*, 8(1), 10612. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29020-6>
- Dennis E.S., Peacock W.J. (2009). Vernalization in cereals. *Journal of biology*, 8, 1-4. <https://doi.org/10.1186/jbiol156>
- Dhiman M., Sharma L., Kaushik P. et al. (2022). Mycorrhiza: an ecofriendly bio-tool for better survival of plants in nature. *Sustainability*, 14(16), 10220 <https://doi.org/10.3390/su141610220>
- Dowarah B., Gill S.S., Agarwala N. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi in conferring tolerance to biotic stresses in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(4), 1429-1444. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10392-5>
- Elliott A.J., Daniell T.J., Cameron D.D., Field K.J. (2021). A commercial arbuscular mycorrhizal inoculum increases root colonization across wheat cultivars but does not increase assimilation of mycorrhiza-acquired nutrients. *Plants, people, planet*, 3(5), 588-599. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10094>
- Felföldi Z., Vidican R., Stoian V. et al. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi and fertilization influence yield, growth and root colonization of different tomato genotype. *Plants*, 11(13), 1743. <https://doi.org/10.3390/plants11131743>
- Fusco G.M., Nicastro R., Rouphael Y., Carillo P. (2022). The effects of the microbial biostimulants approved by EU regulation 2019/1009 on yield and quality of vegetable crops. *Foods*, 11(17), 2656. <https://doi.org/10.3390/foods11172656>
- Jiang Y., Wang W., Xie Q. et al. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 356(6343), 1172-1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Khan Y., Shah S., Tian H. (2022). The roles of arbuscular mycorrhizal fungi in influencing plant nutrients, photosynthesis, and metabolites of cereal crops—A review. *Agronomy*, 12(9), 2191. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092191>
- Kong L., Gong X., Zhang X. et al. (2020). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, ion balance of tomato plants under saline-alkali soil condition. *Journal of Plant Nutrition*, 43(5), 682-698. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1701029>
- Li B., Boiarkina I., Young B. et al. (2017). Prediction of future phosphate rock: a demand based model. <https://doi.org/10.3808/jei.201700364>
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

- Noceto P.A., Bettenfeld P., Boussageon R. et al. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi, a key symbiosis in the development of quality traits in crop production, alone or combined with plant growth-promoting bacteria. *Mycorrhiza*, 31(6), 655-669. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01054-1>
- Shahrajabian M.H., Petropoulos S.A., Sun W. (2023). Survey of the influences of microbial biostimulants on horticultural crops: Case studies and successful paradigms. *Horticulturae*, 9(2), 193. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020193>
- Thirkell T.J., Grimmer M., James L. et al. (2022). Variation in mycorrhizal growth response among a spring wheat mapping population shows potential to breed for symbiotic benefit. *Food and energy security*, 11(2), e370. <https://doi.org/10.1002/fes3.370>
- Tran B.T., Watts-Williams S.J., Cavagnaro T.R. (2019). Impact of an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth and nutrition of fifteen crop and pasture plant species. *Functional Plant Biology*, 46(8), 732-742. <https://doi.org/10.1071/fp18327>
- Wei H., He W., Kuang Y. et al. (2023). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and melatonin synergistically suppress heat-induced leaf senescence involves in abscisic acid, gibberellin, and cytokinin-mediated pathways in perennial ryegrass. *Environmental and Experimental Botany*, 213, 105436. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105436>
- Yang H., Fang C., Li Y. et al. (2022). Temporal complementarity between roots and mycorrhizal fungi drives wheat nitrogen use efficiency. *New Phytologist*, 236(3), 1168-1181. <https://doi.org/10.1111/nph.18419>

Вплив штучної мікоризації на ріст і розвиток рослин в умовах вегетаційного дослідження

О.І. Віннікова

Нині для практичного використання в сільському господарстві запропоновано численні комерційно доступні біопрепарати на основі арбускулярних мікоризних (АМ) грибів. Потенційні переваги інокуляції ґрунтів АМ грибами для виробництва рослинної продукції були показані в багатьох дослідженнях. Проте рівень універсальності таких препаратів, тобто ефективність штучної мікоризації одним видом грибів для різних сільськогосподарських рослин, досі залишається нез'ясованим. Метою роботи було оцінити можливість та ефективність штучної мікоризації томатів і пшениці у вегетаційному дослідженні. Оцінено вплив внесення в ґрунт препарату Мікоплант, що містить пропагули ендомікоризних міксоміцетів, на схожість насіння, морфометричні показники рослин, концентрацію хлорофілу в листках пшениці та томатів. У дослідженні використовували насіння ізогенних за генами *Vrn* ліній пшениці сорту *Миронівська 808* та двох сортів томатів – ранньостиглого сорту *Кременчуцький ранній* та пізньостиглого сорту *Асе*. Застосування препарату Мікоплант стимулювало проростання насіння пшениці: рослини пшениці проростали раніше і переходили до наступної стадії розвитку раніше, ніж у контролі. Проте спостерігався протилежний ефект на схожість насіння томатів. За обробки Мікоплантом виникала тенденція до підвищення морфометричних показників у рослин ізогенних ліній пшениці *Vrn-A1a* та *Vrn-D1a* на різних фазах росту і розвитку – на тлі утворення поверхневої мікоризи на коренях. Позитивний вплив штучної мікоризації на фотосинтез було встановлено лише для ізогенної лінії *Vrn-D1a* і тільки на стадії наливу зерна. У томатів спостерігали утворення арбускулярної мікоризи внаслідок обробки Мікоплантом, але істотного позитивного впливу на морфометричні показники і концентрацію хлорофілу в листках не було виявлено. Максимальна частота появи мікоризи визначалася у томатів сорту *Кременчуцький ранній*, а максимальна інтенсивність мікоризоутворення – у дослідних серіях пізньостиглого сорту *Асе*.

Ключові слова: штучна мікоризація, ізогенні лінії пшениці, томати, морфометричні показники, концентрація хлорофілу

Цитування: Віннікова О.І. Вплив штучної мікоризації на ріст і розвиток рослин в умовах вегетаційного дослідження. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія»*, 2024, 43, с. 105-115. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-9>

Про автора:

О.І. Віннікова – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

Подано до редакції: 09.07.2024 / Прорецензовано: 26.10.2024 / Прийнято до друку: 26.11.2024

... ПРИРОДООХОРОННІ ТЕРИТОРІЇ NATURE CONSERVATION AREAS ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-10
УДК: 502/504:574

Створення ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" як складова збереження природних ландшафтів, біотопічного і видового різноманіття Північного Сходу України О.В. Безроднова, З.С. Бондаренко, Н.О. Брусенцова, К.Ю. Иванова

З метою створення ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" було досліджено ділянки остепнених, лучних, перезволожених оселищ, що знаходяться на схилах та днищі балки. Балка належить до басейну річки Мерла. Пропонована для заповідання територія розташована на півночі Харківської області у околицях с.Березівка (Краснокутська селищна територіальна громада Богодухівського району). На верхніх частинах схилів збереглися фрагменти степових екосистем, які колись були поширені на цій території, а наразі зазнали антропогенного впливу і використовуються переважно під оранку. Флористичне різноманіття ділянок з остепненим травостоєм складає в середньому 23-26 видів судинних рослин на 100 м², а на деяких ділянках цей показник сягає 40 видів. Фітосозологічну цінність таким ділянкам надає наявність видів, що охороняються на державному рівні, зокрема, *Adonis vernalis* L., *Colchicum bulbocodium* Ker Gawl., *Crocus reticulatus* Steven ex Adams, *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. s.l., *Stipa capillata* L. Територія проєктованого заказника має велике значення для збереження поселень *Marmota bobak* (Müller, 1776) — виду, занесеного до Червоної книги України у 2021 році. На дні дослідженої балки знаходиться невеликий потічок, місцями запруджений греблями *Castor fiber* L., гирлова частина якого сполучається із штучним ставком. Ці водойми є важливим місцем існування та розмноження для амфібій: *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758), *Pelodytes punctatus* (Pallas, 1771), *Rana arvalis* (Nilsson, 1842), *Bufo viridis* (Laurenti, 1768), *Pelobates vespertinus* (Lichtenstein, 1823), *Bombina orientalis* (Linnaeus, 1758). На схилах балки мешкає велика популяція *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758), по берегах зустрічається *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758). Усі ці види амфібій та рептилій включені до додатків Бернської конвенції. Ландшафтне і фітоценологічне різноманіття на території проєктованого заказника обумовлює різноманітність орнітофауни і ентомофауни. Наразі виявлено та визначено 18 видів птахів. Хоча це переважно звичайні для Харківської області види, вони потребують охорони згідно з Бернською конвенцією. Один вид птахів (*Grus grus* (Linnaeus, 1758)) охороняється на державному рівні. Зафіксовано два види комах з Червоної книги України — *Xylосора valga* (Linnaeus, 1767) та *Hamearis lucina* (Linnaeus, 1758), але ентомофауна потребує подальшого детального вивчення. Таким чином, першечерговою задачею майбутнього заказника є збереження типових для Українського Лісостепу ландшафтів (особливо залишків степових екосистем), як середовища існування рідкісних і зникаючих видів, що підлягають охороні на регіональному, державному і загальноєвропейському рівнях. Не менш важливим завданням є відновлення біотопів трав'яного типу, що зазнали у минулому значного пасовищного навантаження (переважно днище балки і нижні положі частини схилів). Досліджувана територія має значну цінність ще і тому, що на час написання статті вона не зазнала деструктивного впливу бойових дій.

Ключові слова: флора, фауна, рідкісні та зникаючі види, біотопи, природно-заповідний фонд, басейн річки Мерла, лісостепова зона, Харківська область, Україна

Цитування: Безроднова О.В., Бондаренко З.С., Брусенцова Н.О., Иванова К.Ю. Створення ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" як складова збереження природних ландшафтів, біотопічного і видового різноманіття Північного Сходу України. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 116-131. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-10>

Про авторів:

О. В. Безроднова – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, Національний природний парк "Слобожанський", вул. Зарічна 15 А, сел. Краснокутськ, Богодухівський район, Харківська обл., Україна, 62002, o.bezrodnova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-2506-0881>
З. С. Бондаренко - Національний природний парк "Слобожанський", вул. Зарічна 15 А, сел. Краснокутськ, Богодухівський район, Харківська обл., Україна, 62002, zoya.ophidi@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-0347-6045>
Н. О. Брусенцова - Національний природний парк "Куяльницький", майдан Бориса Дерев'янка 1, м. Одеса, 65008; Національний природний парк "Слобожанський", вул. Зарічна 15 А, сел. Краснокутськ, Україна, 62002, n_brusentsova@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-1428-4855>

К. Ю. Иванова – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022; Національний природний парк “Слобожанський”, вул. Зарічна 15 А, сел. Краснокутськ, Богодухівський район, Харківська обл., Україна, 62002, katernayvanova.1995@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-5397-7317>

Подано до редакції: 10.09.2024 / Прорецензовано: 15.10.2024 / Прийнято до друку: 19.11.2024

Вступ

Згідно із Екологічним паспортом Харківської області у 2023 р. відсоток заповідних територій складає тільки 2,4% (Екологічний паспорт..., 2024). Відповідно, існує нагальна потреба подальшого заповідання у межах області територій, що презентують найбільш цінні природні комплекси. Такими, наприклад, є ділянки лучних степів із специфічною фауною і мікобіотою, які займають відносно невелику площу і збереглися, переважно, по схилах балок (Горелова, Алехин, 2002). Історично склалося так, що Український Лісостеп характеризується значною розореністю плакорних ділянок, зростанням площі агроландшафтів за рахунок природних екосистем (Парнікоза, 2008). Наразі в Україні проблема збільшення території природно-заповідного фонду (ПЗФ) залишається дуже актуальною ще тому, що внаслідок бойових дій значні площі на Сході України зазнали деструктивних змін і на відновлення їхньої структурно-функціональної організації піде багато років. Були зруйновані або опинилися у зоні ризику об'єкти ПЗФ України, а також території, що належать до Смарагдової мережі та потребують охорони на загальноєвропейському рівні (Shumilo et al., 2023; Timmins et al., 2023). У межах Харківської області в окупації перебувало 103 об'єкти у Ізюмському, Куп'янському, Харківському, Чугуївському районах (41,7% до загальної кількості об'єктів ПЗФ), з них безпосередньо в зоні бойових дій – 58 об'єктів ПЗФ (Екологічний паспорт..., 2024). Прикладами таких об'єктів є національний природний парк (НПП) “Дворічанський”, ботанічний заказник загальнодержавного значення “Вовчанський”, регіональний ландшафтний парк “Великобурлуцький степ”, низка заказників місцевого значення тощо. У межах цих об'єктів ПЗФ охоронялися, окрім інших біотопів, і ділянки степів. Саме тому, актуальним є пошук на підконтрольній Україні території нових ділянок із степовою флорою і фауною, а також розробка наукових обґрунтувань доцільності їх заповідання.

Науковцями Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна разом з представниками інших установ і організацій регулярно проводиться обстеження природних комплексів Харківської області, вивчення видів, що потребують охорони на місцевому, регіональному, національному або загальноєвропейському рівнях. Так в останні роки, наприклад, здійснювався, як моніторинг стану популяцій вже відомих місцезнаходжень, так і виявлення нових локалітетів (Брусенцова та ін., 2018, Казарінова та ін., 2021; Bondarenko, Gamulya, 2021; Безроднова, Иванова, 2023; Бондаренко та ін., 2023). Результатом таких досліджень є написання наукових обґрунтувань доцільності створення нових природоохоронних територій, що належать до різних категорій заповідності — ботанічний заказник (Gamulya and ets, 2017; Звягінцева, 2020), регіональний ландшафтний парк (Атемасова та ін., 2021), національний природний парк (Атемасова та ін., 2023) тощо. Метою цієї публікації є узагальнення даних про видове, біотопічне і ландшафтне різноманіття проектного ландшафтного заказника місцевого значення “Березівський” (Харківська область, Україна) та обґрунтування доцільності його створення.

Матеріали і методи

У 2023 р. неподалік від с. Березівка Краснокутської селищної територіальної громади (СТГ) Богодухівського району Харківської області було здійснено планомірне обстеження остепнених, лучних та перезволожених місцезростань, що знаходяться на схилах та днищі балки. Остання належить до басейну річки Мерла. Збір польового матеріалу відбувався з весни по осінь. Для виявлення видового, біотопічного та ландшафтного різноманіття застосовано напівстаціонарні і маршрутні методи. Маршрути пролягали по днищу і схилах самої балки, а також вздовж її відгалужень. Загальна протяжність маршрутів склала 15 км. Проводився цілеспрямований пошук рідкісних видів судинних рослин, для яких досліджували стан популяцій, фіксували координати окремих локалітетів. Для виявлення особливостей структурної організації рослинного покриву, окрім маршрутних досліджень, здійснено геоботанічні описи із застосуванням стандартних методичних підходів. Усього було описано 15 пробних площ (по 100 м² кожна) у різних типах біотопів. Внесок видів у формування рослинних угруповань визначався на підставі оцінки їх проективного покриття (%) і рясності (бальна шкала Друде). Маршрутні обстеження також передбачали інвентаризацію фауністичного різноманіття, картування місць перебування рідкісних видів, реєстрацію зустрічей тварин, слідів їхньої

життєдіяльності (відбитки лап, сховища, послід тощо) та знахідок загиблих особин. Частина відомостей про знахідки рідкісних видів у межах проєктованого заказника вже була опублікована нами раніше (Брусенцова та ін., 2018; Брусенцова та ін., 2019) та врахована під час підготовки цієї роботи.

Камеральну обробку геоботанічних описів здійснено із допомогою програми Turboveg for Windows 2.85 (<https://turboveg-for-windows.software.informer.com>, 2024). Для аналізу просторових даних та підготовки картографічних матеріалів використано програму QGIS 3.28 (QGIS.org, 2023). Наукові назви видів птахів наведені відповідно до видання "Анотований список українських наукових назв птахів фауни України" (Фесенко, Бокотей, 2007), назви інших тварин — відповідно до Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (Nicolson et al., 2024). Наукові назви видів рослин надано відповідно до World Flora Online (WFO) Plant List (<https://wfoplantlist.org/>). При складанні узагальнюючої таблиці щодо наявності на дослідженій території рідкісних видів керувалися Червоною книгою України (Червона книга..., 2009), відповідними офіційними переліками видів рослин і тварин, що охороняються на державному рівні (Перелік видів рослин..., 2021; Перелік видів тварин..., 2021), обласними переліками видів рослин і тварин, що підлягають особливій охороні на території Харківської області (Перелік видів рослин..., 2024; Перелік видів тварин..., 2024). В таблиці також зазначено види, що потребують охорони на міждержавному рівні згідно з Бернською конвенцією (Convention..., 1979a, 1979b) та Конвенцією про збереження мігруючих видів диких тварин (Конвенція..., 1999). Рідкісні рослинні угруповання наведені за Зеленою книгою України (Зелена книга..., 2009), а типи біотопів із відповідними кодами надані за Національним каталогом біотопів України (Національний каталог..., 2018).

Результати та обговорення

Територіально досліджувана балка розташована у двох адміністративних областях (рис. 1). Її верхів'я знаходяться у межах Скороходівської СТГ Полтавської області. Площа балки на території Полтавської області складає орієнтовно 92 га, більша ж частина балки (майже 156 га) належить до території Харківської області. Оскільки головною метою роботи було підготувати клопотання щодо створення ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" у північно-західній частині Харківської області, то дослідження проводилося на ділянці від межі області до околиць с. Березівка (Краснокутська СТГ).

У тектонічному відношенні досліджувана територія є частиною Дніпровсько-Донецької западини, що знаходиться північніше осі глибокого прогину земної кори, крила якого на південному сході заходять на Воронежський кристалічний масив, а на південному заході наближаються до Донецького кряжу. Цей прогин заповнюють осадові і метаморфозовані гірські породи різного віку, починаючи від карбону в нижніх шарах і до неогенових і четвертинних серій, що наближаються до денної поверхні. На ерозійних схилах відслонюються переважно породи палеогенові і неогенові: міоцену (полтавська серія) і пліоцену (яруси різнобарвних і червоно-бурих глин). У геоморфологічному відношенні територія є частиною розлогого долинно-балкового зниження, яке оточене полого-горбистою рівниною. Ґрунти переважно — суглинки. Підземні води належать до Новопетрівського і Межигірського водоносних горизонтів (Екологічний атлас..., 2005). Виходи ґрунтових вод на днищі балки формують водотік, який впадає у ставок у північній її частині. Територія проєктованого заказника "Березівський" за геоботанічним районуванням розташована на крайній східній межі Полтавського округу липово-дубових, соснових, дубово-соснових лісів, остепнених луків, лучних степів та евтрофних боліт, на крайній східній межі Української степової підпровінції, що належить до Східноєвропейської лісостепової провінції дубових лісів, остепнених луків та лучних степів, у межах Лісостепової підобласті (зони) та Євразійської степової області (Дідух, Шеляг-Сосонко, 2003). За фізико-географічним районуванням територія входить до складу Східнополтавської височинної області Лівобережно-Дніпровського лісостепового краю Лісостепової недостатньо зволоженої теплої зони (Національний атлас..., 2008). Клімат континентальний, помірний. Переважні напрямки вітру — східний, південно-західний, південно-східний. Середньорічна відносна вологість повітря 72,6 %. Середньорічна температура +8 °C, найхолодніший місяць — січень, найспекотніший — серпень або липень. Основний режим зволоження — атмосферні опади та виходи ґрунтових вод. Кількість опадів за рік становить 940 мм (середньорічний показник за період з 2013 по 2019 р.). Переважна кількість опадів припадає на зимовий і весняний період, влітку різкі зливи чергуються з місячними періодами посухи, також у холодний період часто спостерігаються тумани (Екологічний атлас..., 2005).

Необхідно зазначити, що перші експедиційні виїзди на досліджувану територію відбулися ще у

2015 році та були спрямовані на виявлення нових місцезнаходжень рідкісних видів рослин і тварин поза межами НПП "Слобожанський". Згодом отримані дані були опубліковані у декількох наукових збірках (Брусенцова та ін., 2018; Брусенцова та ін., 2019). Попереднє обстеження показало, що ця територія презентує типові природні комплекси лісостепової зони України і є перспективною для заповідання.

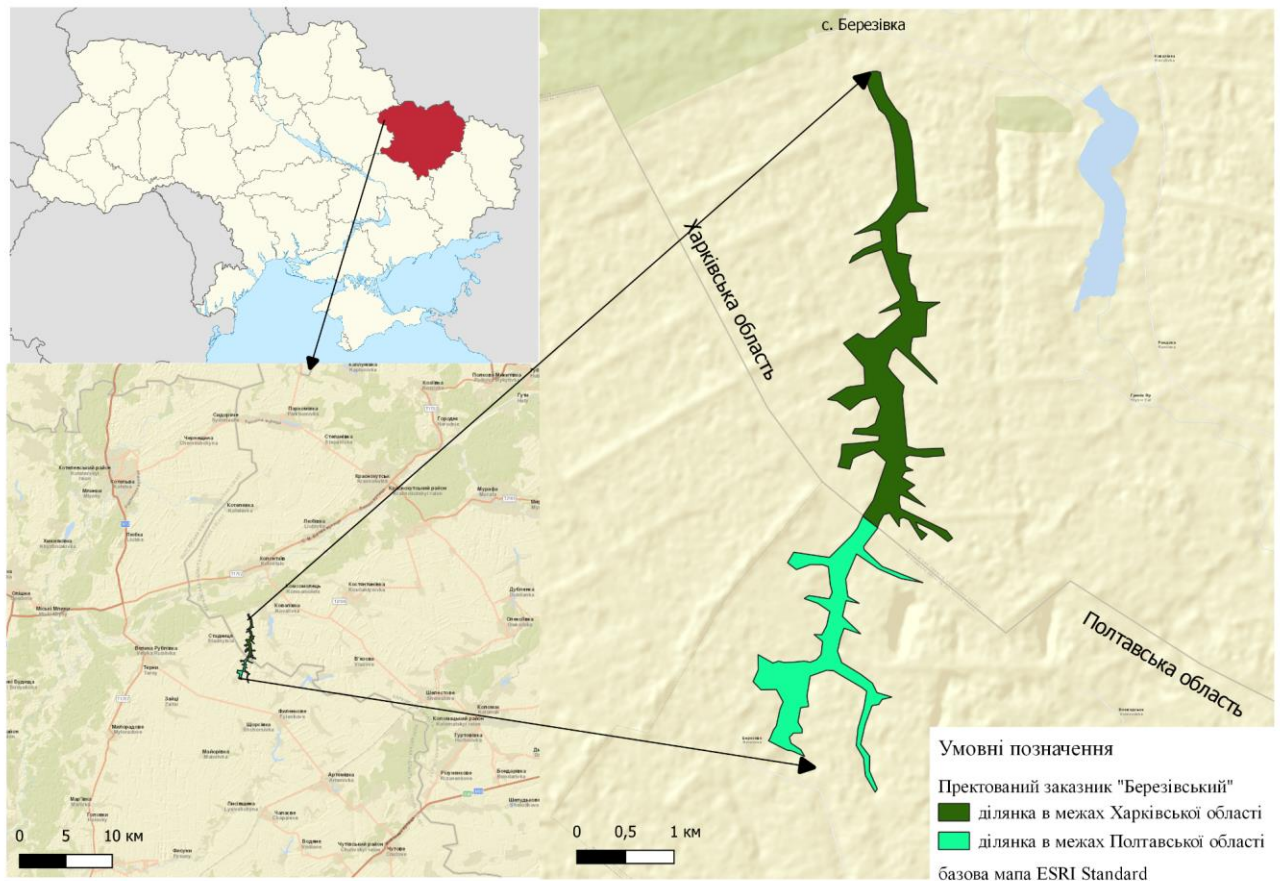


Рис. 1. Місцезнаходження та конфігурація проєктованого ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" (Харківська область, Україна)
Fig. 1. Location and configuration of the proposed local landscape reserve "Berezivskyi" (Kharkiv region, Ukraine)

Біотопічне різноманіття. Особливості рельєфу (наявність схилів різної експозиції, із різним кутом нахилу, а також ділянок з рівною поверхнею по дну балки) обумовлюють розмаїття мікрокліматичних умов, різний гідрологічний режим окремих ділянок тощо. Все це сприяло формуванню біотопічного різноманіття. У межах проєктованого заказника присутні, як різноманітні біотопи трав'яного типу (до 85% від загальної площі), так і біотопи фанерофітного типу. Відповідно з Національним каталогом біотопів України (Національний каталог..., 2018) на досліджуваній території представлені наступні типи біотопів:

В1.1.2 Мезотрофні та евтрофні водойми з макрофітною рослинністю (обводнені ділянки тальвегу балки; орієнтовно 2% від загальної площі);

В2.1.1 Алювіальні ділянки та дніща пересохлих водойм з однорічною земноводною рослинністю (тальвег балки; орієнтовно 5% від загальної площі);

В4.1.1 Прибережні та підтоплені ділянки з угрупованнями високих гелофітів (формують приривчасту смугу на мілководних ділянках ставка, утворюються при заростанні старих каналів, що були утворені внаслідок діяльності бобрів; орієнтовно 3% від загальної площі);

Б2.2.1 Болотні та підтоплені ділянки з угрупованнями високих гелофітів (доволі поширений тип, що відіграє значну роль у процесах заростання водотоку та прилеглих перезволожених ділянок; орієнтовно 8% від загальної площі);

Б2.2.2 Болотні та підтоплені ділянки з угрупованнями високих кореневищних осок (у порівнянні із попереднім типом трапляються зрідка на невеликих за площею ділянках із дещо меншим рівнем зволоження ґрунту; орієнтовно до 1% загальної площі);

Т1.3.2 Лучні степи на чорноземах (формується у верхніх та середніх частинах середньокрутих схилів переважно східної і південно-східної експозиції, також трапляються у верхніх частинах схилів західної і південно-західної експозиції; орієнтовно 20% від загальної площі);

Т2.2.1 Рівнинні та низькогірні пасовища (низькотравні луки у нижніх частинах середньокрутих схилів і на пологих схилах різної експозиції, зрідка у верхніх частинах невисоких підвищень; орієнтовно 15% від загальної площі);

Т2.3.1 Рівнинні та низькогірні сінокісні луки (фрагментарно на відносно пологих схилах, що знаходяться недалеко від околиць с. Березівка; орієнтовно 1% від загальної площі);

Т3.2 Вологі луки пасовищного використання (розташовані по днищах ярів та балок; орієнтовно 20% від загальної площі);

Т3.3.1 Мокрі луки з домінуванням злакоподібних трав (приурочені до знижено-рівнинних ділянок по берегу водотоку і неглибоких непроточних понижень на прилеглих ділянках днища балки із близьким заляганням ґрунтових вод; орієнтовно 3% від загальної площі);

Т3.3.2 Мокрі луки з домінуванням високотрав'я (зустрічаються фрагментарно у неглибоких зниженнях та на рівнинно-знижених ділянках по тальвегу балки; орієнтовно 2% від загальної площі);

Т5.2.1 Мезофільні узлісся та галявини на нейтральних і слабколужних ґрунтах (займають дещо рудералізовані місцезростання вздовж лісосмуг, що межують з ріллею, іноді формують кайму по зовнішній межі чагарникових заростей; орієнтовно 2% від загальної площі);

Ч4.1 Мезофільні і ксеромезофільні чагарники (зустрічаються фрагментарно, орієнтовно 3% від загальної площі);

Ч4.2 Степові чагарники (зустрічаються фрагментарно, переважно у комплексі з біотопами Т1.3.2; орієнтовно 7% від загальної площі);

Ч7.3. Заболочені чагарники (розташовані на окремих ділянках на дні балки, де ґрунтові води знаходяться біля поверхні землі, або де вода стоїть на поверхні; орієнтовно 5% від загальної площі);

С1.2.2 Рудеральні біотопи багаторічних трав нітрофільного типу (переважно днище балки, в залежності від особливостей рельєфу утворюють або відносно вузьку, або доволі широку смугу; орієнтовно 7% від загальної площі балки).

Згідно з Додатком I Резолюції 4 Бернської конвенції (Revised Annex I..., 2019) з перелічених вище біотопів охороні у межах Європи підлягають сім:

- а) E1.2 Perennial calcareous grasslands and basic steppes (відповідають типу Т1.3.2);
- б) E2.2 Low and medium altitude hay meadows (відповідають типу Т2.3.1);
- в) E3.5 Moist or wet oligotrophic grassland (відповідають типу Т3.2);
- г) E3.4 Moist or wet eutrophic and mesotrophic grassland (відповідають типу Т3.3.1);
- д) E5.4 Moist or wet tall-herb and fern fringes and meadows (відповідають типу Т3.3.2);
- е) F3.241 Central European subcontinental thickets (відповідають типу Ч4.1);
- ж) F3.247 Ponto-Sarmatic deciduous thickets (відповідають типу Ч4.2).

Рослинний покрив. Біотопічне різноманіття має безпосередній зв'язок із фітоценотичним і флористичним різноманіттям. Уздовж водотоку на перезволожених ділянках формуються трав'яні угруповання болотної і прибережно-водної рослинності, а також угруповання фанерофітного типу з чагарникової верби. Зарості високотравних гелофітів з стоячими стеблами, що перезимовують у засохлому вигляді, сягають висоти 2,5–3 м. Вони займають, як частково оводнені ділянки, так і заболочені, які влітку місцями пересихають. Найчастіше це монодомінантні маловидові угруповання, де у першому під'ярусі домінують однодольні види *Typha latifolia* L. і *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (проективне покриття 70–90%), і подекуди зустрічаються дводольні види з родини айстрові *Cirsium palustre* (L.) Scop. і *Eupatorium cannabinum* L. (від 3–5 до 20% покриття). Другий і третій під'яруси формують мезогігрофітні представники лучно-болотного різнотрав'я. У складі другого під'ярусу часто трапляються *Epilobium hirsutum* L., *Lythrum virgatum* L., *Lycopus europaeus* L., *Solanum dulcamara* L., *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre, *Ranunculus repens* L. Загальне покриття третього під'ярусу коливається у межах 10–40%, переважає *Lysimachia nummularia* L., з меншою постійністю трапляються такі види, як *Potentilla reptans* L. і *Argentina anserina* (L.) Rydb. Подекуди, по окрайкам

водотоків на перезволожених поверхнево оторфованих ґрунтах, у складі рослинного покриву фрагментарно поширені скупчено-ситникові та зрідка осокові угруповання (рис. 2). У місцях пересихання водотоку утворюються ділянки, що характеризуються неоднорідним мікрорельєфом. Середньо-високі (0,5–1,2 м заввишки) купини утворені едифікатором *Juncus conglomeratus* L. Доволі часто трапляються *Lythrum virgatum*, *Lycopus europaeus*, *Peucedanum palustre* (L.) Moench, *Heracleum sphondylium* subsp. *sibiricum* (L.) Simonk. По частково оводненим зниженням поширені *Stellaria aquatica* Scop., *Persicaria hydropiper*, *Ranunculus repens*, *Lysimachia nummularia*.

У перезволожених біотопах фанерофітного типу висота чагарникового ярусу у середньому становить 2,5–4 м, його структуру визначає *Salix triandra* L. (зімкнення 0,6–0,9). Площа таких угруповань, як правило, усього 50–150 м², а загальне проективне покриття трав'яного ярусу не перевищує 20%. У складі останнього можна зустріти майже усі згадані вище види. Подекуди, як у високотравних заростях, так і чагарникових вербняках, до 15–30% покриття приходить на ліану *Humulus lupulus* L.



Рис. 2. Перезволожені біотопи трав'яного типу у межах проектного ландшафтного заказника місцевого значення “Березівський” (фото О.В. Безроднової).

Fig. 2. Waterlogged herbaceous biotopes within the proposed local landscape reserve “Berezivskyi” (Photo by O.V. Bezrodnova).

У рослинному покриві плоского днища центральної балки й її розгалужень, а також на пологіх нижніх частинах схилів (найчастіше східної і східно-північної експозиції) переважають рослинні угруповання із домінуванням *Elymus repens* (L.) Gould, проективне покриття якого 50–70%. Окрім цього виду, злакову основу травостою на окремих ділянках утворюють *Phleum pratense* L., *Poa pratensis* L., *Lolium pratense* (Huds.) Darbysh, *Dactylis glomerata* L., але проективне покриття таких видів, як правило, не перевищує 5–8%. Частка різнотрав'я може складати від 10–15% до 40% загального покриття. Найбільші показники трапляння мають мезофітні і ксеромезофітні лучні види *Daucus carota* L., *Geranium pratense* L., *Achillea millefolium* L., *Centaurea jacea* L., *Trifolium pratense* L., *Plantago major* L., *Taraxacum officinale* F.H.Wigg. З меншою постійністю трапляються *Veronica chamaedrys* L., *Vicia cracca* L., *Equisetum arvense* L., а на більш зволожених ділянках — *Argentina anserina* (L.) Rydb., *Ranunculus repens* L., *Juncus gerardii* Loisel. Саме у складі угруповань такого типу наявний регіонально рідкісний вид *Sanguisorba officinalis* L. (рис. 3А).



Рис. 3. Представники раритетної фітобіоти: регіонально рідкісний вид *Sanguisorba officinalis* (А) та *Crocus reticulatus* (Б), що охороняється на державному рівні (фото О.В. Безродної та Н.О. Брусенцової).

Fig. 3. Representatives of rare phytobiota: the regionally rare species *Sanguisorba officinalis* (A) and *Crocus reticulatus* (B), protected at the national level (Photo by O.V. Bezrodnova and N.O. Brusentsova).

На схилах західної й у верхній частині схилів південної експозиції широко поширені угруповання щільнодерновинних злаків (*Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin, *Koeleria pyramidata* (Lam.) P.Beauv., *Stipa capillata* L.), а також наявні угруповання, де едифікаторну роль грають напівчагарники (*Chamaecytisus austriacus* (L.) Link, *Thymus pannonicus* All., *Genista tinctoria* L.) (рис. 4А). Структурну організацію трав'яного ярусу у таких угрупованнях визначають переважно рослини сухуватих лучно-степових екотопів, хоча подекуди значний внесок також видів сухуватих і свіжих лісо-лучних екотопів. Високі показники трапляння і проективного покриття (від 5–8 до 15%) зафіксовані для *Salvia nemorosa* L., *Malva thuringiaca* Vis., *Euphorbia stepposa* Zoz, *Centaurea scabiosa* L., *Phlomis tuberosa* (L.) Moench, *Filipendula vulgaris* Moench, *Viola ambigua* Waldst. Kit. Проективне покриття до 5% притаманно для *Stachys recta* L., *Scabiosa ochroleuca* L., *Knautia arvensis* (L.) Coult., *Potentilla neglecta* Baumg., *Falcaria vulgaris* Bernh. Менша постійність, але проективне покриття до 15%, характерні для *Salvia nutans* L., *Artemisia marschalliana* Spreng. Іноді та, як правило, з низькими показниками проективного покриття, можна побачити такі види, як *Verbascum densiflorum* Bertol., *Veronica austriaca* L., *Trifolium alpestre* L., *Vicia tetrasperma* (L.) Moench, *Ranunculus polyanthemus* L., *Plantago media* L., *Phlomis herba-venti* subsp. *pungens* (Willd.) Maire ex DeFilipps, *Thesium linophyllum* L. Необхідно зазначити, що саме для ділянок із степовими рослинними угрупованнями трав'яного типу притаманне найбільше видове різноманіття (до 40 видів судинних рослин на 100 м²). Це співпадає з даними інших дослідників (Горелова, Алехин, 2002), які констатували, що за відсутності випасання або там, де пасовищне навантаження помірне, флористичне різноманіття угруповань лучних степів становить 30–45 видів на 100 м².

Фітосозологічну цінність таким ділянкам надає наявність видів, що охороняються на державному рівні: *Stipa capillata*, *Adonis vernalis* L., *Pulsatilla pratensis* Mill., *Colchicum bulbocodium* Ker Gawl., *Crocus reticulatus* Steven ex Adams (Червона книга..., 2009; Перелік рослин... 2021). Перші три види на окремих ділянках відіграють значну роль у формуванні рослинного покриву. З усіх перелічених видів, найбільша частота трапляння була притаманна саме *Stipa capillata*, показники проективного покриття якого коливалися у широких межах — від 3–5% до 50% (рис. 4А). Угруповання ковили волосистої занесені до Зеленої книги України (Зелена книга..., 2009). Разом із тим, у межах Харківською області це один з найбільш поширених представників роду *Stipa* L. (Горелова, Алехин, 1999). *Adonis vernalis* і *Pulsatilla pratensis* у межах досліджуваної території мали набагато меншу частоту трапляння, але у деяких локалітетах проективне покриття цих видів сягало 10-20% (рис. 5). Наявність ефемероїдів *Colchicum bulbocodium* і *Crocus reticulatus* у складі

рослинного покриття ділянок, що презентують лучні степи, є типовим для центральної і західної частин Харківської області (Горелова, Алехин, 2002).



Рис. 4. Фрагменти рослинних угруповань із домінуванням *Stipa capillata* на схилі південно-східної експозиції (А) та *Elymus repens* на дні балки (Б) (фото О.В. Безроднovoї).
Fig. 4. Fragments of plant communities dominated by *Stipa capillata* on a South-Eastern slope (A) and *Elymus repens* at the bottom of a ravine (Б) (Photo by O.V. Bezrodnova).



Рис. 5. Локалітети ценопопуляцій рідкісних видів *Adonis vernalis* (А) і *Pulsatilla pratensis* (Б) у складі рослинного покриття на схилах балки (фото Н.О. Брусенцової).
Fig. 5. Localities of coenopopulations of the rare species *Adonis vernalis* (A) and *Pulsatilla pratensis* (Б) within the vegetation cover on ravine slopes (Photo by N.O. Brusentsova).

Необхідно зазначити, що переважна більшість біотопів зазнала впливу великої рогатої худоби, а частина рослинних угруповань сформувалась саме внаслідок випасання. Ділянки із остепненим травостоєм характеризуються значною участю у флористичному складі видів широкої екологічної амплітуди, здатних витримувати помірне пасовищне навантаження (*Nonea pulla* DC., *Odontites vulgaris* Moench, *Cichorium intybus* L., *Agrimonia eupatoria* L., *Verbascum lychnitis* L., *Eryngium planum* L.). На ділянках схилів, що зазнали значного впливу під час випасання, у рослинному покритті частка *Eryngium campestre* L. може сягати 25% проективного покриття. У складі лучних рослинних угруповань знижених частин схилів і плоского днища під впливом перевипасання утворилися зарості бур'янів (*Cirsium arvense* (L.) Scop., *Ballota nigra* L., *Urtica dioica* L., *Chenopodium hybridum* L., *Rumex confertus* Willd., *Rumex crispus* L.). Поширення дигресивних угруповань у складі

степової рослинності, іноді навіть тонконогово-полинових чи молочайно-полинових толок, було типовим явищем для Харківської області (Горелова, Алехин, 2002).

Тваринний світ. Розгалужена балка із поєднанням лучно-степових, прибережних та водних біотопів посеред агроландшафтів створює сприятливі умови для існування багатьох, у тому числі рідкісних, видів тварин. Наприклад, ділянки із лучно-степовою рослинністю (рис. 6) мають велике значення для збереження поселень бабака степового (*Marmota bobak* (Müller, 1776)) — виду, занесеного до Червоної книги України (Перелік видів тварин..., 2021). У межах проєктованого заказника мешкає кілька родин цих тварин. З видів плазунів для території пропонуваного заказника на даний час відомі вуж звичайний (*Natrix natrix* (Linnaeus, 1758)) та ящірка прудка (*Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758)). Популяція останньої приурочена переважно до остепнених схилів балки і має доволі велику щільність — біля 50 особин на гектар. Вужі трапляються у пониженнях ближче до водойм.



Рис. 6. *Marmota bobak* біля нори у межах проєктованого ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" (фото Н.О. Брусенцової).

Fig. 6. *Marmota bobak* near its burrow within the proposed local landscape reserve "Berezivskyi" (Photo by N.O. Brusentsova).

У водоймах на дні балки масово нерестяться зелені жаби (*Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)), дещо менш чисельні ропухи зелені (*Bufo viridis* (Laurenti, 1768)) та жаби гостроморді (*Rana arvalis* (Nilsson, 1842)), можлива присутність *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758), часничниці (*Pelobates vespertinus* (Lichtenstein, 1823)), кумки червоночереви (*Bombina bombina* (Linnaeus, 1758)). У струмку зафіксований тритон звичайний (*Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758)).

Серед видів ссавців на території проєктованого заказника систематично трапляються заєць сірий (*Lepus europaeus* (Pallas, 1778)), лисиця звичайна (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)), сарна європейська (*Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758)). У струмку та ставку на дні балки виявлено 2 родинні ділянки бобра європейського (*Castor fiber* (Linnaeus, 1758)). Велика кількість нір гризунів свідчить про багату фауну дрібних ссавців.

Орнітофауна представлена переважно звичайними для Харківської області видами птахів. Серед рідкісних видів тут зафіксовано журавля сірого (*Grus grus* (Linnaeus, 1758)) (Перелік видів тварин..., 2021), для якого вологі лучні ділянки мають велике значення як кормові угіддя. На даний

час за результатами спостережень на території, що пропонується для заповідання, усього виявлено і визначено 18 видів птахів (табл.). Подальші дослідження можуть розширити список орнітофауни.



Рис. 7. Родинні ділянки *Castor fiber* у межах проектного ландшафтного заказника місцевого значення "Березівський" (фото О.В. Безроднової)
Fig. 7. Family territories of *Castor fiber* within the proposed local landscape reserve "Berezivskiy" (Photo by O.V. Bezrodnova).

Різноманіття комах пропонованого заказника потребує подальшого детального вивчення, але вже зараз відомо про наявність таких рідкісних видів, як ксилокопа звичайна (*Xylocopa valga* (Linnaeus, 1767)) та люцина (*Hamearis lucina* (Linnaeus, 1758)), що охороняються на державному рівні (Перелік видів тварин..., 2021), і регіонально рідкісного виду вусача-товстуна вербового (*Lamia textor* (Linnaeus, 1758)) (Перелік видів тварин..., 2018). Були зафіксовані на дослідженій території також махаон (*Papilio machaon* (Linnaeus, 1758)) і подалірій (*Iphiclidides podalirius* (Linnaeus, 1758)), що до 2021 р. підлягали охороні на державному рівні (Червона книга..., 2009). З огляду на те, що балка оточена орними землями, використання пестицидів може становити значну загрозу для збереження ентомокомплексів цієї природної ділянки.

У таблиці узагальнено інформацію про раритетну фіто- і зообіоту проектного заказника «Березівський». Усього у межах дослідженої території було виявлено 27 видів тварин, що підлягають охороні на загальноєвропейському рівні згідно з Бернською конвенцією і наведені у Додатку 2 (Convention..., 1979a) та Додатку 3 (Convention..., 1979b). Третина з цих видів є мігруючими видами, які охороняються також Конвенцією про збереження мігруючих видів диких тварин (Конвенція..., 1999). Для порівняння у межах проектного регіонального ландшафтного парку "Смарагдове джерело" загальною площею понад шість тисяч гектарів виявлено 65 видів тварин з Додатків 2 і 3 Бернської конвенції, з яких тільки 6 видів є мігруючими видами, внесеними до Додатків 1 і 2 Боннської конвенції (Атемасова та ін., 2021). На державному рівні у межах території проектного заказника «Березівський» потребують охорони чотири види тварин і п'ять видів рослин. При цьому, тварини мають різні категорії: два види рідкісні, один вид вразливий, один — зникаючий. Переважна ж більшість видів рослин відноситься до категорії "неоцінений вид", тобто є такими, про які відомо, що вони можуть належати до категорії зникаючих, вразливих чи рідкісних, але ще не віднесені до жодної. Необхідно мати більше інформації про поширення таких видів, про чисельність і особливості структури популяцій в різних частинах ареалу, їх динаміку (Червона книга..., 2009). Хоча на даний час у раритетній частині зоо- і фітобіоти було виявлено небагато видів, що підлягають особливій охороні на всій території Харківської області, подальші дослідження дозволять суттєво доповнити їх перелік. Відповідними нормативними документами передбачається охорона земельних ділянок, де поширені регіонально рідкісні види, власниками та користувачами (в тому числі орендарями) цих ділянок, створення на таких територіях заповідних та інших об'єктів, що особливо охороняються (Офіційні переліки..., 2012). Таким чином, зі соціологічної точки зору

досліджувана територія є доволі цінною і потребує охорони, що найкращим чином забезпечить введення її до складу ПЗФ України.

Таблиця. Рідкісні види тварин і рослин проектного заказника «Березівський»
Table. Rare animals and plants species of the proposed reserve "Berezivskyi"

Назва виду	Види, занесені до			
	Червоної книги України (вказано категорію)	Червоного списку Харківської області	Бернської конвенції (вказано Додаток)	Боннської конвенції (вказано Додаток)
Тварини				
Люцина <i>Hamearis lucina</i> (Linnaeus, 1758)	вразливий			
Бджола-тесляр звичайна <i>Xylocopa valga</i> (Gerstaecker, 1872)	рідкісний			
Вусач товстун вербовий <i>Lamia textor</i> (Linnaeus, 1758)		+		
Тритон звичайний <i>Lissotriton vulgaris</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Жаба озерна <i>Pelodytes punctatus</i> (Pallas, 1771)			3	
Кумка червоночерева <i>Bombina orientalis</i> (Linnaeus, 1761)			2	
Часничниця <i>Pelobates vespertinus</i> (Laurenti, 1768)			2	
Ропуха зелена <i>Bufo viridis</i> (Laurenti, 1768)			2	
Жаба гостроморда <i>Rana arvalis</i> (Nilsson, 1842)			2	
Ящірка прудка <i>Lacerta agilis</i> (Linnaeus, 1758)			2	
Вуж звичайний <i>Natrix natrix</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Чапля сіра <i>Ardea cinerea</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Лелека білий <i>Ciconia ciconia</i> (Linnaeus, 1758)			2	2
Крижень <i>Anas platyrhynchos</i> (Linnaeus, 1758)			3	2
Яструб малий <i>Accipiter nisus</i> (Linnaeus, 1758)			2	2
Канюк звичайний <i>Buteo buteo</i> (Linnaeus, 1758)			2	2
Журавель сірий <i>Grus grus</i> (Linnaeus, 1758)	рідкісний		2	2
Лиска звичайна <i>Fulica atra</i> (Linnaeus, 1758)			3	2
Зозуля звичайна <i>Cuculus canorus</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Вивільга <i>Oriolus oriolus</i> (Linnaeus, 1758)			2	2
Крук <i>Corvus corax</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Соловейко східний <i>Luscinia luscinia</i> (Linnaeus, 1758)			2	2
Дрізд-омелюх <i>Turdus viscivorus</i> (Linnaeus, 1758)			3	2
Вівчарик жовтобровий <i>Phylloscopus sibilatrix</i> (Bechstein, 1793)			2	2
Синиця блакитна <i>Parus caeruleus</i> (Linnaeus, 1758)			2	
Синиця велика <i>Parus major</i> (Linnaeus, 1758)			2	
Горобець польовий <i>Passer montanus</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Бабак степовий <i>Marmota bobak</i> (Müller, 1776)	зникаючий			
Бобер європейський <i>Castor fiber</i> (Linnaeus, 1758)			3	
Заєць сірий <i>Lepus europaeus</i> (Pallas, 1778)			3	
Сарна європейська <i>Capreolus capreolus</i> (Linnaeus, 1758)			3	

Назва виду	Види, занесені до			
	Червоної книги України (вказано категорію)	Червоного списку Харківської області	Бернської конвенції (вказано Додаток)	Боннської конвенції (вказано Додаток)
Рослини				
Брандушка різнобарвна <i>Colchicum bulbocodium versicolor</i> (Ker Gawl.) K. Perss.	вразливий			
Горицвіт весніний <i>Adonis vernalis</i> L.	неоцінений	+		
Ковила волосиста <i>Stipa capillata</i> L.	неоцінений			
Родовик лікарський <i>Sanquisorba officinalis</i> L.		+		
Сон лучний <i>Pulsatilla pratensis</i> (L.) Mill. s.l.	неоцінений			
Шавлія поникла <i>Salvia nutans</i> L.		+		
Шафран сітчастий <i>Crocus reticulatus</i> Steven ex Adams	неоцінений			

Виходячи з вищезазначеного, створення ландшафтного заказника “Березівський” буде сприяти:

- збереженню у природному стані ландшафту, що є типовим для лісостепової зони України;
- збереженню біотопічного різноманіття;
- підтриманню існування популяцій типових видів флори і фауни;
- охороні рідкісних представників біоти;
- підтримці загального екологічного балансу в регіоні.

Для реалізації цих завдань на його території необхідно впровадити охоронний режим, який забороняє:

- будь-які види капітального будівництва, у тому числі використання території під дачне будівництво та садівництво;
- проведення геолого-розвідувальних робіт;
- пошкодження ґрунтового покриву, зокрема, використання території під оранку;
- проїзд поза межами існуючих доріг;
- осушення заболочених ділянок та штучного спрямлення водотоків;
- влаштування звалищ і захоронень;
- випалювання сухої трави.

Оскільки Закон України “Про природно-заповідний фонд” (Закон..., 1992) на території заказників забороняє полювання та іншу діяльність, що суперечить цілям і завданням, передбаченим положенням про заказник (стаття 26), необхідним також є визначення у межах мисливських угідь за територією проєктованого заказника ролі відтворювальної ділянки. Разом із тим, ця ж стаття дозволяє здійснювати господарську діяльність із дотриманням загальних вимог щодо охорони навколишнього природного середовища, тому для місцевих мешканців доцільно визначити можливим ручне сінокосіння і випас худоби (без надмірного випасання). Такий режим буде запобігати розростанню рослин-інтродуцентів, у першу чергу деревно-чагарникових видів. Помірна господарська діяльність має позитивний вплив на угруповання за участю видів ковили, бо до скорочення, а зрештою і зникнення їхніх популяцій, призводять не тільки антропогенні фактори (розорювання, надмірний випас і рекреація тощо), але і режим абсолютного заповідання у заповідниках (Червона книга..., 2009). Аналогічна ситуація спостерігається стосовно певних рідкісних видів тварин. Так, наприклад, не тільки розорювання природних біотопів існування бабака, у тому числі вже існуючих поселень, призвело до скорочення чисельності цього виду у ХХ ст. Припинення випасання у зв'язку з глобальною перебудовою сільськогосподарського виробництва, скорочення площ пасовищних екосистем в регіоні мало катастрофічні наслідки для тварин, які органічно були пов'язані з цими екосистемами, зокрема, ховрахи, тушканчики, бабаки. Саме тому для підтримання існування бабака доцільним є залучення суб'єктів господарювання, зацікавлених у розвитку традиційного пасовищного скотарства (Атемасова та ін., 2023).

Концепція створення ландшафтного заказника полягає в об'єднанні у його межах різних типів біотопів, що мають генетичний зв'язок. З метою збереження цілісного природно-територіального комплексу, місцеіснування рідкісних видів рослин і тварин, можна рекомендувати створити у

подальшому не одну, а дві природоохоронні території (як у Харківській, так і у Полтавській області), що будуть просторово і функціонально одним цілим. Такий підхід вже має аналог, реалізований для збереження екосистем Тилігульського лиману — регіональний ландшафтний парк "Тилігульський" у Одеській і Миколаївській областях (відповідно до рішень Одеської обласної ради від 25 листопада 1997 року № 176-XXII і Миколаївської обласної ради від 28 квітня 1995 року № 8).

Висновки

Досліджувана територія є частиною розгалуженої балки у межах басейну р. Мерла, що презентує степові, лучні, прибережно-водні і водні біотопи. Біотопічна різноманітність обумовлює видове різноманіття, створює умови для існування багатьох видів рослин і тварин, у тому числі рідкісних. На час написання статті досліджена територія не зазнала змін, які викликають бойові дії на Північному Сході України. Зважаючи на це, доцільним є внести досліджувану територію до складу ПЗФ України, як ландшафтний заказник місцевого значення "Березівський". Альтернативним варіантом заповідання цієї соціологічно цінної території є внесення її до складу НПП "Слобожанський" при розширенні його меж.

Першечерговою задачею майбутнього заказника є збереження залишків степових екосистем, як середовища існування рідкісних і зникаючих видів, що є представниками степової фауни і флори. Не менш важливим завданням є відновлення біотопів трав'яного типу, що зазнали у минулому значного пасовищного навантаження (переважно днище балки і нижні положі частини схилів). Найбільшими загрозами для природного комплексу вищезазначеної території є випалювання сухої трави, можливість забруднення пестицидами з сусідніх орних земель, надмірне розростання чужорідних видів рослин, пошкодження цілісності трав'яного і ґрунтового покриву, браконьєрство. Обмеження та заходи, які сприятимуть зменшенню цих негативних антропогенних впливів, доцільно врахувати у природоохоронному зобов'язанні.

Подяки

Автори висловлюють подяку співробітникам науково-дослідного відділу НПП "Слобожанський" Шуміловій А., Атемасову А., Вьюннику В. за сприяння у проведенні експедиційних виїздів та допомогу у зборі первинних польових даних.

Список використаних джерел / References

- Атемасова Т.А., Атемасов А.А., Вітер С.Г., Гамуля Ю.Г., Дрогваленко О.М., Полчанінова Н.Ю., Прилуцький О.В., Сінна О.І., Терехова В.В. (2021) Матеріали до створення регіонального ландшафтного парку «Смарагдове джерело» (Харківська область, Україна). Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 37, 95–130. [Atemasova T.A., Atemasov A.A., Viter S.H., Hamulya Y.H., Drohvalenko O.M., Polchaninova N.Yu., Prylutskyi O.V., Sinna O.I., Terekhova V.V. (2021). Materials to the creation of the Regional Landscape Park "Smaragdove Dzherelo" (Kharkiv region, Ukraine). The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 37, 95–130]. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-9> (in Ukrainian)
- Атемасова Т.А., Ронкін В.І., Савченко Г.О., Сінна О.І. (2023) Створення Національного природного парку «Східний степ» як засіб збереження зникаючих природних екосистем Північного Сходу України. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 40, 26–48. [Atemasova T.A., Ronkin V.I., Savchenko H.O., Sinna O.I. (2023). Creation of the National Nature Park "Skhidnyi Steppe" as a means of preserving natural ecosystems in Northeastern Ukraine. The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 40, 26–48]. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-40-3>. (in Ukrainian)
- Безроднова О., Іванова К. (2023) *Fritillaria meleagris* L. (Liliaceae) у Харківській області: екологічна приуроченість, проблеми збереження. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 41, 4–16. [Bezrodnova O., Ivanova K. (2023). *Fritillaria meleagris* L. (Liliaceae) in the Kharkiv Region: ecological preferences, conservation issues. The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 41, 4–16]. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-41-1> (in Ukrainian)
- Бондаренко Г., Гамуля Ю. та Сіранський В. (2023) Рідкісні, охоронювані та малодосліджені види судинних рослин борових комплексів долини р. Мож (Харківська область, Україна). Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 41, 17–31. [Bondarenko H., Gamulya Yu., Siranskyi V. (2023). Rare, protected and understudied vascular plant species of the pinewood complex of the Mosh River valley (Kharkiv Region, Ukraine). The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 41, 17–31]. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-41-2> (in Ukrainian)
- Брусенцова Н.О., Бондаренко З.С., Скрильник Ю.Є. (2018) Види тварин з Червоної книги України на території Краснокутського району Харківської області. Матеріали до 4-го видання Червоної книги

України. Тваринний світ. Серія: «Conservation Biology in Ukraine», Вип. 7, Т. 1. Інститут зоології ім. І. Шмальгаузена НАН України, 52–55. [Brusentsova N.O., Bondarenko Z.S., Skrylnyk Yu.Ye. (2018). Animal species from the Red Book of Ukraine in the Krasnokutsk District of the Kharkiv Region. Materials for the 4th edition of the Red Book of Ukraine. Animal World. Series: "Conservation Biology in Ukraine", Issue 7, Vol. 1. Schmalhausen Institute of Zoology of the NAS of Ukraine, 52–55]. (in Ukrainian)

Брусенцова Н.О., Безроднова О.В., Саїдахмедова Н.Б. (2019). Види рослин та мікобіоти з Червоної книги України та Бернської конвенції на території Кrasнокутського району Харківської області. Знахідки рослин і грибів Червоної книги та Бернської конвенції (Резолюція 6), Т. 1 (Серія: «Conservation Biology in Ukraine». Вип. 11), Київ-Чернівці: Друк Арт, 84–88. [Brusentsova N.O., Bezrodnova O.V., Saidakhmedova N.B. (2019). Plant and mycobiota species from the Red Book of Ukraine and Bern Convention in the Krasnokutsk District of the Kharkiv Region. Findings of plants and fungi of the Red Book and Bern Convention (Resolution 6), Vol. 1 (Series: "Conservation Biology in Ukraine", Issue 11). Kyiv-Chernivtsi: Druk Art, 84–88]. (in Ukrainian)

Горелова Л.Н., Алехин А.А. (1999). Редкие растения Харьковщины (Систематический список редких сосудистых растений, вопросы их охраны). Харьков: Изд-во ХНУ им. В.Н.Каразина, 52. [Gorelova L.N., Alyokhin A.A. (1999). Rare plants of Kharkiv region (Systematic list of rare vascular plants, issues of their protection). Kharkiv: Publishing House of V.N. Karazin Kharkiv National University, 52].

Горелова Л.Н., Алехин А.А. (2002). Растительный покров Харьковщины: Очерк растительности, вопросы охраны, аннотированный список сосудистых растений. Харьков: Изд. центр Харьк. нац. ун-та им. В.Н.Каразина, 231. [Gorelova L.N., Alyokhin A.A. (2002). Vegetation of Kharkiv region: Essay on vegetation, protection issues, annotated list of vascular plants. Kharkiv: Publishing Centre of V.N. Karazin Kharkiv National University, 231].

Дідух Я.П., Шеляг-Сосонко Ю.Р. (2003). Геоботаничне районування України та суміжних територій. Український ботанічний журнал, 60(1), 617. [Didukh Ya.P., Shelyag-Sosonko Yu.R. (2003). Geobotanical zoning of Ukraine and adjusting territories. Ukrainian Botanical Journal, 60(1), 6–17] (in Ukrainian)

Екологічний атлас Харківської області (2005). За ред. А. В. Гриценко. Харків, 80. [Ecological Atlas of the Kharkiv Region (2005). Ed. A. V. Hrytsenko. Kharkiv, 80.]. (in Ukrainian)

Екологічний паспорт Харківської області за 2023 рік. (2024) [Ecological Passport of Kharkiv Region for 2023. (2024)]. (in Ukrainian). URL: <http://surl.li/hmfuqm> Доступ на: 15.11.2014

Закон України "Про природно-заповідний фонд" (1992) [Law of Ukraine "On Nature Reserve Fund" (1992)] (in Ukrainian) URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2456-12#Text> Access: 15.11.2024

Звягінцева К.О. (2020). Матеріали до створення ботанічного заказника «Новожанівський» (м. Харків, Україна). Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 35, 16-23. [Zviahintseva K.O. (2020). Materials to the creation of the botanical preserve of local importance "Novozhanivskiy" (Kharkiv City, Ukraine). The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 35, 16-23]. (in Ukrainian)

Зелена книга України (2009). За ред. Я. П. Дідуха. К.: Альтерпрес, 448. [Green Book of Ukraine (2009). Ed. Ya. P. Didukh. Kyiv: Alterpres, 448]. (in Ukrainian)

Казарінова Г.О., Скрыга О.В., Бондаренко Г.М. (2021). Флора борів околиць с. Графське (Вовчанський район, Харківська область). Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 37, 4–19. [Kazarinova H.O., Skryha O.V., Bondarenko H.M. (2021). Flora of the forests in the vicinity of Hrafske village (Vovchansk District, Kharkiv Region). The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 37, 4–19]. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2021-37-1> (in Ukrainian)

Національний атлас України (2008). За ред. Л. Г. Руденка. К.: ДНВП «Картографія». 440. [National Atlas of Ukraine (2008) Ed. L.H. Rudenko. Kyiv: State Scientific-Production Enterprise "Kartographia". 440]. (in Ukrainian)

Національний каталог біотопів України (2018). За ред. А.А. Куземко, Я.П. Дідуха, В.А. Онищенко, Я. Шеффера. К.: ФОП Клименко Ю.Я., 442. [National Habitat Catalog of Ukraine (2018). K.: NPE Klymenko Yu.Ya., 442] (in Ukrainian)

Конвенція про збереження мігруючих видів диких тварин (1999) [Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals (1999)] (in Ukrainian) URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/995_136?lang=en#Text Access: 15.11.2014

Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України (довідкове видання) (2012) / Укладачі: докт. біол. наук, проф. Т.Л. Андриєнко, канд. біол. наук М.М. Перегрим. Київ: Альтерпрес, 148. [Official lists of regional rare plants of administrative territories of Ukraine (reference book) (2012) / Compiled by Prof., Dr. Tetyana L. Andrienko, Dr. Mykyta M. Peregrym. Kyiv: Alterpress, 148] (in Ukrainian)

Парнікоза І. (2008) Збереження українського степу: що можна зробити вже сьогодні? Паритетна теріофауна та її охорона. Праці Теріологічної школи, 9, 53–62. [Parnikozha I. (2008). Conservation of Ukrainian steppes: what can be done today? Proceedings of the Theriological School, 9, 53–62]. (in Ukrainian)

Перелік видів рослин, що заносяться до Червоної книги України (рослинний світ), та видів рослин, що виключені з Червоної книги України (рослинний світ). (2021) Наказ Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України від 15 лютого 2021 року, №111. [A list of plant species listed in the Red Book of Ukraine (Plant world) and excluded from the Red Book of Ukraine (Plant world) (2021). Order of

the Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine, February 15, 2021, No. 111] (in Ukrainian). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0370-21#Text> Access: 15.11.2024

Перелік видів тварин, що заносяться до Червоної книги України (тваринний світ), та видів тварин, що виключені з Червоної книги України (тваринний світ). (2021) Наказ Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України від 19 січня 2021 року, №29. [A list of animal species listed in the Red Book of Ukraine (Animal world) and excluded from the Red Book of Ukraine (Animal world) (2021). Order of the Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine, January 19, 2021, No. 29]. (in Ukrainian). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0260-21#Text> Access: 15.11.2024

Перелік видів рослин та грибів, що підлягають особливій охороні на території Харківської області станом на 01.01.2024 року. [A list of plants and fungi under special protection within the Kharkiv Region as of January 1, 2024] (in Ukrainian). URL: <http://surl.li/hmfuqm> Access: 15.11.2024

Перелік видів тварин, що підлягають особливій охороні на території Харківської області (2018) Наказ Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України від 06 червня 2018 року, №237 [List of species of animals under special protection within the Kharkiv Region (2018). Order of the Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine, June 06, 2018, No. 237] (in Ukrainian). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0847-18#n15> Access: 15.11.2024

Червона книга України. Рослинний світ. (2009). За ред. Я.П. Дідуха. К.: Глобалконсалтинг. 900 с. [Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom. (2009). Ed. Ya.P. Didukh. Kyiv: Globalconsulting. 900 p.] (in Ukrainian)

Фесенко Г. В., Бокотей А. А. (2007) Анотований список українських наукових назв птахів фауни України (з характеристикою статусу видів). Київ–Львів, 112 [Fesenko H. V., Bokotej A. A. (2007) The Annotated List of the Ukrainian Scientific Names of the Bird Species Belonging to the Fauna of Ukraine (with Characteristics of Status of the Species). Kyiv–L'viv, 112] (in Ukrainian)

Bondarenko, H. M., Gamulya Yu. G. (2021). An annotated list of the flora of the perspective local botanical reserve "Vovchi Vody" (Kharkiv Region, Ukraine). Chornomors'k. bot. z., 17 (3): 242–252. <https://doi.org/10.32999/ksu1990-553X/2021-17-3-4>

Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Appendix II – Strictly Protected Fauna Species. (1979a). European Treaty series, No. 104. Bern, 19. IX. 1979. URL: <https://rm.coe.int/168078e2ff> Access to: 26.11.2024

Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Appendix III – Protected Fauna Species (1979b). European Treaty series, No. 104. Bern, 19. IX. 1979. URL: <https://rm.coe.int/168097eb57> Access to: 26.11.2024

Gamulya Yu.G., Bityutska V.V., Loseva N.L. (2017). Phytosozological evaluation of the flora of a perspective botanical reserve of local significance "Zapadne" (Dvurechansky district, Kharkiv Region). Biology and Valeology, 19: 98–106.

Nicolson, D., Alexander, S., Hodson, A., Mitchell, D., Orrell, T., Perez-Gelabert, D. (2024). The Integrated Taxonomic Information System (Version 2024-10-22). URL: <https://itis.gov> Access to: 26.11.2024

Revised Annex I to Resolution 4 (1996) of the Bern Convention on endangered natural habitat types using the EUNIS habitat classification (Adopted by the Standing Committee on 6 December 2019). URL: <https://rm.coe.int/16807469e7> Access to: 26.11.2024

Shumilo, L., Skakun, S., Gore, M.L., Shelestov A., Kussul A., Hurtt G., Karabchuk D., Yarotskiy V. (2023) Conservation policies and management in the Ukrainian Emerald Network have maintained reforestation rate despite the war. Communications Earth Environment, 4, 443. URL: <https://doi.org/10.1038/s43247-023-01099-4>

Timmins H.L., Petrovych O., Drapaliuk A., Polianska K., Vasyliuk O., Bragger J., Kuzemko A., Vishnevsky D. (2023) The state of Ukraine's protected areas: an interim update on damage from the full-scale invasion. PARKS, 29 (2), 52-64. URL: <https://doi.org/10.2305/wuer4443>

QGIS.org (2023). QGIS Geographic Information System. QGIS Association. URL: <http://www.qgis.org> Access to: 26.11.2024

Turboveg for Windows 2.85 (2024) Software informer URL: https://turboveg-for-windows.software.informer.com/#google_vignette Access to: 26.11.2024

World Flora Online (WFO) Plant List. URL: <https://wfo.plantlist.org/> Access to: 26.11.2024

Creation of the "Berezivskyi" landscape reserve of local importance as a component of preservation of natural landscapes, biotopes and species diversity of the Northeast of Ukraine

O.V. Bezrodnova, Z.S. Bondarenko, N.O. Brusentsova, K.Yu. Ivanova

In the process of creating the "Berezivskyi" landscape reserve, surveys were conducted on xerophytic, meadow, and waterlogged habitats located on the slopes and the floor of a ravine. The ravine belongs to the basin of the Merla River. The proposed reserve area is situated in northern Kharkiv Oblast near the village of Berezivka, within the Krasnokutsk territorial community in Bohodukhiv District. Remnants of steppe ecosystems that once dominated this area have

survived on the upper slopes but have been affected by human activity and are now primarily used for agriculture. The floristic diversity of the xerophytic vegetation averages 23-26 vascular plant species per 100 m², with some patches supporting up to 40 species. These areas hold phytocoenotic value due to the presence of state-protected plant species, including *Adonis vernalis* L., *Colchicum bulbocodium* Ker Gawl., *Crocus reticulatus* Steven ex Adams, *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. s.l., and *Stipa capillata* L. The proposed reserve is also significant for the conservation of *Marmota bobak* (Müller, 1776), a species listed in Ukraine's Red Data Book in 2021. A small stream flows along the ravine floor, partially dammed by *Castor fiber* L., with its lower reaches connected to an artificial pond. These water bodies provide vital habitats for breeding amphibians such as *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758), *Pelodytes punctatus* (Pallas, 1771), *Rana arvalis* (Nilsson, 1842), *Bufotes viridis* (Laurenti, 1768), *Pelobates vespertinus* (Lichtenstein, 1823), and *Bombina orientalis* (Linnaeus, 1758). Additionally, a large population of *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758) inhabits the ravine slopes, with *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) encountered along the stream banks. All these amphibian and reptile species are included in the appendices of the Bern Convention. The landscape and phytocoenotic diversity within the proposed reserve contribute to a diverse avifauna and entomofauna. Eighteen bird species have been identified to date; though common to Kharkiv Oblast, they require protection under the Bern Convention. One bird species, *Grus grus* (Linnaeus, 1758), is protected at the national level. Additionally, two insect species listed in Ukraine's Red Data Book, *Xyllocopa valga* (Linnaeus, 1767) and *Hamearis lucina* (Linnaeus, 1758), have been recorded, though further studies of the entomofauna are necessary. The primary goal of the proposed reserve is to conserve landscapes typical of the Ukrainian Forest-Steppe, particularly remnant steppe ecosystems, as habitats for rare and endangered species protected at regional, national, and pan-European levels. Another important objective is the restoration of herbaceous biotopes that have experienced heavy grazing impacts in the past, mainly along the ravine floor and lower gentle slopes. The area has additional conservation value because, at the time of writing, it has remained unaffected by the destructive impacts of ongoing hostilities.

Key words: flora, fauna, rare and endangered species, habitats, protected areas, Merla River basin, forest-steppe zone, Kharkiv Oblast, Ukraine.

Cite this article: Bezrodnova O.V., Bondarenko Z.S., Brusentsova N.O., Ivanova K.Yu. (2024). Creation of the "Berezivskyi" landscape reserve of local importance as a component of preservation of natural landscapes, biotopes and species diversity of the Northeast of Ukraine. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 116-131. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-10> (in Ukrainian)

About the authors:

O. V. Bezrodnova – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan 4, Kharkiv, Ukraine, 61022; Slobzhanskyi National Nature Park, Zarychna St. 15 A, Krasnokutsk, Bohodukhiv District, Kharkiv Oblast, 62002 o.bezrodnova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-2506-0881>

Z. S. Bondarenko – Slobzhanskyi National Nature Park, Zarychna St. 15 A, Krasnokutsk, Bohodukhiv District, Kharkiv Oblast, 62002, zoya.ophidi@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-0347-6045>

N. O. Brusentsova – Kuialnytskyi National Nature Park, Boris Derevianko Maidan 1, Odesa, 65008; Slobzhanskyi National Nature Park, Zarychna St. 15 A, Krasnokutsk, Bohodukhiv District, Kharkiv Oblast, 62002, n_brusentsova@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-1428-4855>

K. Yu. Ivanova – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Maidan 4, Kharkiv, Ukraine, 61022; Slobzhanskyi National Nature Park, Zarychna St. 15 A, Krasnokutsk, Bohodukhiv District, Kharkiv Oblast, 62002, katernyanaivanova.1995@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-5397-7317>

Received: 10.09.2024 / Revised: 15.10.2024 / Accepted: 19.11.2024

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-11
УДК: 573.6:577.21-076

Вплив підвищеного рівня активних форм кисню в еякуляті на показники репродуктивної функції у чоловіків зі зниженням фертильності О.М. Феськов, Є.С. Жилкова, І.А. Феськова, Г.В. Іванова, О.В. Блажко

Високий рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті є однією з причин зниження чоловічої репродуктивної функції. Окислювальний стрес визначається як дисбаланс між утворенням активних форм кисню та здатністю антиоксидантної системи їх детоксикувати. Надлишок активних форм кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни сперматозоїдів, викликаючи окисне пошкодження клітинних оболонок, білків і ДНК. Вимірюванню вмісту активних форм кисню перешкоджає відсутність стандартизації. У даному дослідженні визначено вплив окислативного стресу на стандартні мікроскопічні параметри спермограми та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією. Отримані результати підтверджують значну роль роботи системи детоксикації у підтримці нормальних мікроскопічних показників спермограми. Встановлено негативний вплив високого рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів у чоловіків з порушенням фертильності ($p < 0,05$). Показано, що рівень окислативного стресу в еякуляті статистично значуще вищий у пацієнтів зі зниженими параметрами спермограми, у порівнянні з даним показником для чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції ($p < 0,01$). Не виявлено впливу віку чоловіків на мікроскопічні показники еякуляту. Кореляції між рівнем активних форм кисню та часткою сперматозоїдів з фрагментованою ДНК в еякуляті не встановлено. Втім показано, що частка сперматозоїдів з фрагментованою ДНК значно вища у безплідних пацієнтів у порівнянні з групою чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції ($p < 0,05$). Отже, високий рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті також можна вважати однією з причин зниження чоловічої фертильності. Доведено доцільність визначення рівня окислативного стресу у чоловіків зі зниженими параметрами спермограми у рамках обстеження з метою встановлення причин безпліддя у парі. Надалі необхідно стандартизувати правила забору матеріала та виконання аналізу визначення рівня активних форм кисню в еякуляті.

Ключові слова: активні форми кисню, окислативний стрес, чоловіче безпліддя, репродуктивна функція, фрагментація ДНК

Цитування: Феськов О.М., Жилкова Є.С., Феськова І.А., Іванова Г.В., Блажко О.В. Вплив підвищеного рівня активних форм кисню в еякуляті на показники репродуктивної функції у чоловіків зі зниженням фертильності. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 132-137. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-11>

Про авторів:

О.М. Феськов - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, fmad@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0003-3626-0229>
Є.С. Жилкова - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, zhilkova@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5706-3577>
І.А. Феськова - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, fiadivf@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6268-5178>
Г.В. Іванова - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, ivanova@feskov.ua, <https://orcid.org/0009-0000-5994-3183>
О.В. Блажко - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, blazhko@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5048-7273>

Подано до редакції: 23.12.2023 / Прорецензовано: 31.09.2024 / Прийнято до друку: 19.11.2024

Вступ

За даними літератури, у країнах Європи і в Україні чоловіче безпліддя є причиною ненастання вагітності у подружжі більше, ніж у 50% випадків (Mazzilli, 2023). Наразі ряд наукових досліджень свідчить про те, що високий рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті є однією з причин зниження

чоловічої репродуктивної функції. Активні форми кисню – це необхідна умова для дозрівання, існування та здатності сперматозоїдів запліднювати ооцит (Amanda, 2022; Wagner, 2018). Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується антиоксидантною системою. Окислювальний стрес визначається як дисбаланс між утворенням активних форм кисню та здатністю антиоксидантної системи їх детоксикації. З іншого боку, вимірюванню вмісту активних форм кисню перешкоджає відсутність стандартизації, включаючи вибір контролів і відбір зразків (Latchoumycandane, 2020). Літературні дані щодо впливу оксидативного стресу на стандартні показники фертильності (рухливість, кількість та морфологія сперматозоїдів) та на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті неоднозначні. Більшість робіт свідчить про те, що надлишок активних форм кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни сперматозоїдів, викликаючи окисне пошкодження клітинних оболонок, білків і ДНК. З іншого боку у ряді досліджень не доведено вплив оксидативного стресу на цілісність ДНК (фрагментацію ДНК) сперматозоїдів (O'Flaherty, 2020). Метою даної роботи було визначити вплив оксидативного стресу на стандартні мікроскопічні параметри спермограми та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією.

Об'єкт та методи дослідження

Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проводили в «Клініці професора Феськова О.М.» (м. Харків). Проведення даного дослідження ухвалено Етичним комітетом ТОВ «Сана-Мед» (Центра репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.») відповідно до протоколу № 3 від 01 квітня 2023 року. За період квітень-вересень 2023 року було сформовано групу з 42 пацієнтів з нормальним чоловічим каріотипом 46,XY з порушенням фертильності (Група 1). Середній вік пацієнтів у Групі 1 становив $35,2 \pm 4,3$ років. До групи контролю увійшли 25 чоловіків середнім віком $36,2 \pm 2,6$ років з показниками параметрів спермограми у межах норми (Група 2). Проведений мікроскопічний аналіз еякуляту, досліджено рівень активних форм кисню та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів у Групах 1 та 2.

Аналіз еякуляту проведено за допомогою спермограми. Під час дослідження визначалися кількісні, якісні та морфологічні параметри еякуляту. Показники сперми оцінювалися за критеріями ВООЗ 2010 року (World Health Organization, 2010).

Визначення рівня фрагментації ДНК сперми проводилося методом дисперсії хроматину сперматозоїдів (SCD, sperm chromatin dispersion). Дослідження проведено з використанням комерційних наборів для визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті Halosperm G2 (Halotech DNA, Іспанія). Відповідно до рекомендацій Європейської Асоціації Урологів, рівень фрагментації ДНК у спермі не повинен перевищувати 20 % (Okubo, 2023).

Рівень оксидативного стресу в еякуляті проаналізовано за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія). Аналіз базується на здатності нітросинього тетразолію та інших молекул, пов'язаних з окислювальним стресом, перетворюватися під дією супероксид-аніонів на нерозчинний у воді синій кристал формазан, що змінює інтенсивність кольору у реактивному гелі (від жовтого до різних рівнів фіолетово-синього). Результат аналізу визначався за кольоровою школою за інтенсивністю забарвлення. Згідно з градацією виробника, було виділено 4 рівні оксидативного стресу (рівні 1 та 2 – це низький вплив АФК; рівень 3 – середній вплив АФК; рівень 4 – високий вплив АФК) (Castleton, 2022).

Аналіз каріотипу пацієнтів виконаний із застосуванням цитогенетичних методів. Культивування лімфоцитів проводилося з використанням середовища для культивування PB MAX Karyotyping (Gibco) протягом 72 годин при рівні CO₂ 5,5–6 % та за температурою 36,9°C. Фарбування цитогенетичних препаратів здійснювалося за допомогою GTG (G-метод) та CBG (C-метод) методів. Аналіз проведено з використанням Міжнародної цитогенетичної номенклатури (International System for Cytogenetic Nomenclature, ISCN) (Shaffer, 2009).

Перевірку розподілу кількісних даних на відповідність закону нормального розподілу виконали з використанням методів Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова. Порівняння середніх арифметичних проводили за допомогою критерію Стюдента. Для дослідження зв'язків між ознаками використали метод кореляційного аналізу за Спірменом. Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критеріїв t , r_s за рівнів значущості 0,05 та 0,01 (Атраментова, 2007).

Результати та обговорення

Під час дослідження було встановлено негативний вплив високого рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів у чоловіків з порушенням фертильності. Отримані результати наведені у таблиці 1. Принцип визначення рівня АФК (оксидативного стресу) в еякуляті схематично наведений на рис. 1.

Таблиця 1. Зв'язок рівня активних форм кисню в еякуляті з класичними параметрами спермограми у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією

Table 1. The correlation between the level of reactive oxygen species in the ejaculate and the classical parameters of the spermogram in men with low reproductive function

Параметр спермограми		Кількість чоловіків, N	Середній рівень оксидативного стресу	r_s	$R_{кр}$	p
Найменування	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$					
Рухливість, %	50,6±14,1	42	3,1±0,9	-0,45	0,329	$p<0,05$
Концентрація, млн./мл	55,8±30,7	42	3,1±0,9	-0,42	0,329	$p<0,05$
Морфологія, %	14,2±10,9	42	3,1±0,9	-0,44	0,329	$p<0,05$

Примітка: p – рівень значущості, r_s — коефіцієнт кореляції Спірмена

Notes: p – significance level, r_s — Spearman coefficient

Не було виявлено впливу віку чоловіків на мікроскопічні показники еякуляту. Статистично значущої кореляції між рівнем активних форм кисню та часткою сперматозоїдів з фрагментованою ДНК в еякуляті не встановлено у групі пацієнтів зі зниженими показниками фертильності ($p>0,05$). Фото сперматозоїдів з нормальною та пошкодженою ДНК наведено на рис. 2. Відсутність статистично значущої кореляції між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та рівнем АФК в еякуляті у розглянутій групі чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією підтверджує дані, отримані рядом авторів щодо відсутності впливу оксидативного стресу на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті (Agarwal, 2017; Steiner, 2020). Було встановлено, що рівень оксидативного стресу в еякуляті статистично значущо вищий у пацієнтів Групи 1, порівнюючи з даним показником для чоловіків у контрольній групі (2,4±0,8 проти 1,6±0,6; $t_{емп.} = 3,3$, $t_{крит.} = 2,797$ $p<0,01$, відповідно).

Не виявлено кореляції між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та параметрами спермограми у чоловіків зі зниженням репродуктивної функції (табл. 2). Втім середній рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті був значно вищий у групі пацієнтів зі зниженням фертильності у порівнянні з групою контролю (18,6±12,5 % проти 5,5±2,1 %, $p<0,05$, відповідно).

Таблиця 2. Зв'язок рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті з класичними параметрами спермограми у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією

Table 2. The correlation between the level of sperm DNA fragmentation in the ejaculate and the classical parameters of the spermogram in men with low reproductive function

Параметр спермограми		Кількість чоловіків, N	Середній рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів, %	r_s	$R_{кр}$	p
Найменування	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$					
Рухливість, %	50,6±14,1	42	18,6±12,5	-0,14	0,329	$p>0,05$
Концентрація, млн./мл	55,8±30,7	42	18,6±12,5	-0,24	0,329	$p>0,05$
Морфологія, %	14,2±10,9	42	18,6±12,5	-0,27	0,329	$p>0,05$

Примітка: p – рівень значущості, r_s — коефіцієнт кореляції Спірмена

Notes: p – significance level, r_s — Spearman coefficient

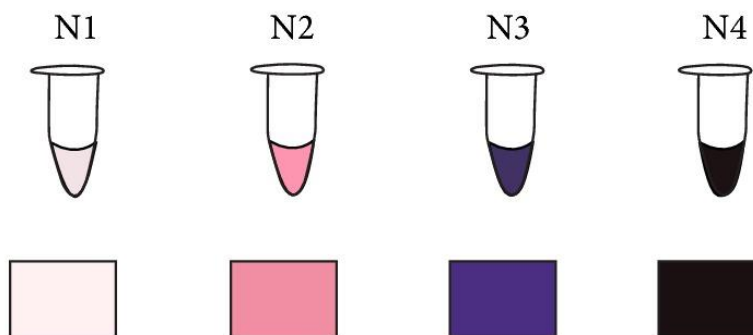


Рис. 1. Схема визначення рівня оксидативного стресу в еякуляті за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія): N1, N2 – низький вплив АФК; N3 – середній вплив АФК; N4 - високий вплив АФК

Fig. 1. Scheme for determining the level of oxidative stress in the eculeate using Oxisperm kits (Halotech DNA, Spain): N1, N2 – low exposure to ROS; N3 – average exposure to ROS; N4 - high exposure to ROS

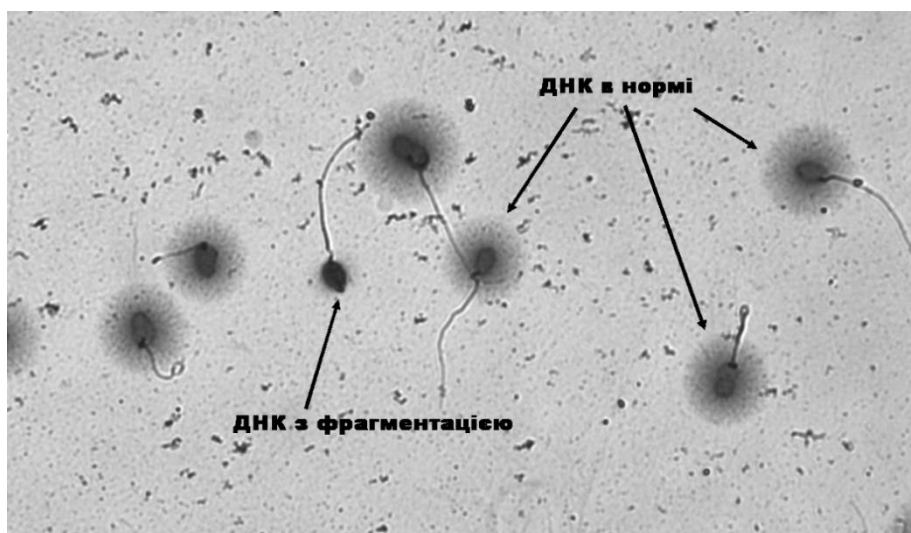


Рис. 2. Дослідження рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах методом дисперсії хроматину, метод фазового контрасту. Збільшення x400

Fig. 2. Investigation of the level of DNA fragmentation in spermatozoa by the method of chromatin dispersion, the phase contrast method. Magnification x400

Оксидативний стрес є одним з факторів зниження репродуктивної функції у чоловіків (Aitken, 2013; Aitken, 2016; Asadi, 2017). Дане дослідження показало, що підвищений рівень активних форм кисню в еякуляті негативно впливає на рухливість, концентрацію, та морфологічні властивості сперматозоїдів. Отримані у даній роботі результати підтверджують значну роль системи детоксикації у підтримці нормальних мікроскопічних показників спермограми (Benkhalifa, 2014; Bisht, 2017). Наразі не було виявлено кореляції між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та високим рівнем АФК у розглянутій групі пацієнтів зі зниженням фертильності. Втім було показано, що частка сперматозоїдів з фрагментованою ДНК значно вища у безплідних пацієнтів у порівнянні з групою чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції. А отже, високий рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті також можна вважати однією з причин зниження чоловічої фертильності.

Доведено, що підвищений рівень активних форм кисню в еякуляті веде до зниження рухливості, кількості та до порушення морфології сперматозоїдів. Показано, що частка сперматозоїдів з фрагментованою ДНК статистично вища у пацієнтів з порушенням фертильності у порівнянні з чоловіками з нормальними показниками репродуктивної функції. Визначення рівня оксидативного стресу в еякуляті може бути доцільним у чоловіків зі зниженими параметрами спермограми для визначення можливої причини зниження показників фертильності.

Список використаних джерел/References

- Атраментова, Л.О., Утевська, О.М. (2007) Статистичні методи в біології: підруч. для студ. біол. спец. вищих навч. закладів. Харків, 286 с. [Atramentova L.A., Utevska O.M. (2008). Statistical methods in biology. Gorlovka: Likhtar. 248 p.]
- World Health Organization. (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen / World Health Organization, 5th ed. Geneva, 2010. 286 pp.
- Wagner, H., Cheng, J., Ko, Edmund Y. (2018) Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. Arab J Urol., 16(1): 35–43. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.001
- Steiner, A. Z., Hansen, K. R., Barnhart, K. T., Cedars, M. I., Legro, R. S., Diamond, M. P., et al. (2020). The Effect of Antioxidants on Male Factor Infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) Randomized Clinical Trial. Fertil. Sterility 113 (3), 552–560. e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.11.008
- Shaffer, K.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J. (2009) ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger, 138 p.
- Okubo, T., Onda, N., Hayashi, T. et al. (2023) Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes. BMC Urology, 23: 78. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12894-023-01257-y>
- Mazzilli, R., Rucci, C., Vaiarelli, A. et al. (2023) Male factor infertility and assisted reproductive technologies: indications, minimum access criteria and outcomes. J Endocrinol Invest., 46(6): 1079–1085. DOI: 10.1007/s40618-022-02000-4
- Latchoumycandane, C, Vaithinathan, S, D'Cruz, S, Mathur, P.P. Apoptosis and male infertility. In: Parekattil S.J., Esteves S.C., Agarwal A., editors. Male infertility. Switzerland: Springer; 2020: 479–486.
- O'Flaherty, Ch. (2020) Reactive Oxygen Species and Male Fertility. Antioxidants, 9(4), 287; <https://doi.org/10.3390/antiox9040287>
- Castleton, P.E., Deluao, J.C., Sharkey, D.J., McPherson, N. (2022) Antioxidants (Basel), 28;11(2):264. doi: 10.3390/antiox11020264.
- Bisht, S., Dada, R. (2017). Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventative strategies. Frontiers in Bioscience (Schol Ed), 9: 420–447.
- Benkhalifa, M., Ferreira, Y., Chahine, H., Louanjli, N., Miron, P., Merviel, P., Copin, H. (2014). Mitochondria: Participation to infertility as source of energy and cause of senescence. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 55: 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.08.011>
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafieian-Kopaei, M. (2017). The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 11, IE01–IE05.
- Amanda, M., Argento, F.R., Fins, E. et al. (2022) The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. Sec. Molecular Diagnostics and Therapeutics, 8: DOI <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.799294>
- Aitken, R., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. Reproduction and Fertility Development, 28, 1–10. <https://doi.org/10.1071/RD15325>
- Aitken, R. J., Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. International Journal of Developmental Biology, 57, 265–272. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130146ja>
- Agarwal, A., Cho, C., Esteves, S., Majzoub, A. (2017). Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. Translational Andrology and Urology, 6 (4), S691-4. doi: 10.21037/tau.2017.05.40.

The effect of increased levels of reactive oxygen species in ejaculate on parameters of reproductive function in men with low fertility

O. Feskov, Ye. Zhylkova, I. Feskova, H. Ivanova, O. Blazhko

A high level of reactive oxygen species (ROS) in the ejaculate is one of the reasons for the failure in male reproductive function. Oxidative stress is defined as an imbalance between the formation of reactive oxygen species and the ability of the antioxidant system to detoxify them. An excess of reactive oxygen species in sperm can initiate pathological changes in spermatozoa, causing oxidative damage to cell membranes, proteins and DNA. Measurement of the content of reactive oxygen species is hindered by the lack of standardization. This study determined the effect of oxidative stress on standard microscopic parameters of the spermogram and the DNA fragmentation level of spermatozoa in the ejaculate of men with reduced reproductive function. The obtained results confirm the significant role of the detoxification system in maintaining normal microscopic parameters of the spermogram. A negative effect of a high level of reactive oxygen species in the ejaculate on the sperm motility, concentration and morphology of spermatozoa

in men with reduced fertility was established ($p < 0.05$). It is shown that the level of oxidative stress in the ejaculate is statistically significantly higher in patients with reduced parameters of the spermogram, compared with this indicator for men with normal indicators of reproductive function ($p < 0.01$). No influence of men's age on microscopic indicators of ejaculate was found. No correlation was established between the level of reactive oxygen species and the percentage of spermatozoa with fragmented DNA in the ejaculate. However, it was shown that the proportion of spermatozoa with fragmented DNA is significantly higher in infertile patients compared to the group of men with normal reproductive function ($p < 0.05$). Therefore, a high level of sperm DNA fragmentation in the ejaculate can also be considered as one of the reasons for the decline in male fertility. The necessity of determining the level of oxidative stress in men with reduced spermogram parameters as part of an examination to find out the causes of infertility in a couple has been proven. In the future, it is necessary to standardize the rules for taking the material and performing the analysis for determining the level of reactive oxygen species in the ejaculate.

Key words: *reactive oxygen species, oxidative stress, male infertility, reproductive function, DNA fragmentation*

Cite this article: Feskov O., Zhylkova Ye., Feskova I., Ivanova G., Blazhko O. (2024). The effect of increased levels of reactive oxygen species in ejaculate on parameters of reproductive function in men with low fertility. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 132-137. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-11> (in Ukrainian)

About the authors:

O. Feskov - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, fmad@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0003-3626-0229>

Ye. Zhylkova - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, zhilkova@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5706-3577>

I. Feskova - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, fiadivf@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6268-5178>

G. Ivanova - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, ivanova@feskov.ua, <https://orcid.org/0009-0000-5994-3183>

O. Blazhko - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, blazhko@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5048-7273>

Received: 23.12.2023 / Revised: 31.09.2024 / Accepted: 19.11.2024

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-12
УДК: 616.37+615.874.24

Вікові відмінності впливу переривчастого голодування на морфофункціональні показники підшлункової залози щурів

Р.В. Янко

Ефективність застосування переривчастого голодування (ПГ) для активації функції підшлункової залози (ПЗ) не є однозначним. Одними з причин цього можуть бути відмінності у використанні режиму ПГ, тривалості дослідів, а також залучення до експерименту тварин різного віку. Також залишається відкритим питання про те, наскільки вираженим є ефект застосування ПГ для підвищення функціональної активності ПЗ у осіб похилого віку. Метою роботи було дослідити і порівняти морфофункціональні зміни ПЗ щурів різного віку після впливу ПГ і оцінити перспективність його використання в якості засобу для корекції виражених вікових знижень функції залози. Експерименти були виконані на 40 щурах-самцях 3- і 15-міс віку. Піддослідні тварини зазнавали впливу ПГ, а саме – 1 доба повне голодування / 2 доби стандартний віварний раціон. Доступ до води був вільний. Тривалість дослідів становила 28 діб. З тканини ПЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою. Гістоморфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Image J». Дослідження проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Виявлено, що вплив ПГ протягом 28-ми діб призводив до появи чітко виражених морфофункціональних ознак підвищення активності ПЗ у дорослих щурів. Особливо зростала ендокринна функція залози, про що свідчило вірогідне збільшення відносної площі ендокринної частини (на 108%), середньої кількості островців Лангерганса (на 44%), розмірів островців, кількості розміщених у них ендокриноцитів (на 20%) та зниження концентрації глюкози в крові. У молодих тварин, навпаки, ПГ знижувала активність як екзо-, так і ендокринної (більшою мірою) частини залози. Вплив ПГ знижував кількість сполучної тканини в ПЗ щурів різного віку. Отримані дані можуть бути використані для підвищення функції ПЗ у дорослих і осіб похилого віку, а також при профілактиці вікових хронічних захворювань залози, що супроводжуються появою фіброзу. Тоді як використання ПГ у молодому віці не бажане.

Ключові слова: переривчасте голодування, підшлункова залоза, вік, гістоморфологія, щури

Цитування: Янко Р.В. Вікові відмінності впливу переривчастого голодування на морфофункціональні показники підшлункової залози щурів. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 138-144. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-12>

Про автора:

О Р.В. Янко – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця, 4, Київ, Україна, 01024, biolag@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0002-0397-7517>

Подано до редакції: 10.03.2024 / Прорецензовано: 06.09.2024 / Прийнято до друку: 01.10.2024

Вступ

Загальновідомо, що тривале переривчасте голодування (ПГ) здатне зменшувати масу тіла, подовжувати тривалість життя, знижувати серцево-судинні фактори ризику та запальний стан організму (шляхом регулювання метаболічних сигнальних шляхів), збільшувати чутливість до інсуліну, стимулювати функцію мітохондрій, тощо (Duregon et al., 2021; Song et al., 2023; Brandhorst et al., 2017). При ПГ в організмі активуються різноманітні механізми, які призводять до покращення та оновлення його різних систем (Jaramillo et al., 2023).

Проте, літературних даних щодо впливу ПГ на морфофункціональну активність підшлункової залози (ПЗ) недостатньо, а отримані результати часто неоднозначні (Munhoz et al., 2020; Test et al., 2023). Це може бути пов'язано з різним режимом застосування ПГ, тривалістю проведення дослідів, а також використання тварин різного віку. Адже відомо, що з віком ПЗ (як і більшість органів) по-різному реагує на різні стресогенні фактори. Вікова деструкція ПЗ полягає в розвитку змін судин органу з їх звуженням, склерозі стінок протоків, їх обструкції, проліферації епітелію, заміщення секретуючих клітин сполучною тканиною. Загальна кількість ацинарної тканини ПЗ знижується до 30-40%. Інволюційні зміни призводять до зниження ферментативної активності ПЗ та обсягу панкреатичного соку. Погіршується інтенсивність та якість травлення: відбувається неповне перетравлення білків, жирів, вуглеводів (Löhr et al., 2018). Крім того, з віком спостерігається зменшення кількості та активності β -клітин острівцевого апарату ПЗ та числа рецепторів до інсуліну, що призводить до розвитку інсулінорезистентності з подальшим порушенням обміну речовин (Kehm

et al., 2018). Тому, пошук методів і шляхів, які могли б у разі потреби стимулювати активність (втрачену з віком) ПЗ є актуальним напрямком досліджень.

Більшість робіт присвячена впливу голодування на ендокринну функцію ПЗ (Cheng et al., 2017; Munhoz et al., 2020). Тоді, як змінюється екзокринна активність залози при ПГ та як впливає на отримані результати вік тварин не відомо.

Мета роботи – дослідити і порівняти морфофункціональні зміни у ПЗ щурів 3 і 15 міс віку після впливу 28-ми добового ПГ і оцінити перспективність його використання в якості засобу для корекції виражених вікових знижень функції залози.

Матеріали та методи дослідження

В досліді було використано 40 щурів лінії Вістар віком 3 та 15 міс, отриманих з віварію Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України. Щурів утримували при температурі 21°C і вологості 40-60% з 12-годинним циклом світло/темрява. Тварини знаходилися окремо в клітках із сітчастими перегородками, щоб мінімізувати стрес від соціальної ізоляції. Усі протоколи погоджені Комітетом з біомедичної етики догляду та використання тварин Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під ізофлурановою анестезією відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Щури були розподілені на 4 групи (по 10 тварин у кожній): I і III – контрольні тварини 3- і 15-міс віку відповідно, II і IV – дослідні щури молодого та дорослого віку, які перебували на ПГ, а саме – 1 доба повне голодування / 2 доби стандартний віварний раціон. Доступ до води був вільний. Тривалість досліді становила 28 діб. Адаптація до нових умов існування, активність метаболічних процесів стабілізується на новому рівні, а отримані результати стають більш вираженими.

Були використані гістологічні, морфометричні, статистичні методи дослідження, а також визначення глюкози в крові. З тіла ПЗ кожного щура брали 5 зразків тканини, з яких виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливали в парафін. На санному мікромомі (МС-2) робили парафінові зрізи, товщина яких становила 5-6 мкм. Забарвлення зрізів здійснювали гематоксиліном Бемера і еозинном, а також по методу Ван-Гізону (Rehfeld et al., 2017). З використанням цифрової камери мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Nicon ECLIPSE E100» (Японія). Морфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Image J» (Yanko., 2023).

На гістологічних зрізах ПЗ проводили гістоморфометричний аналіз. У екзокринній частині залози вимірювали діаметр і площу поперечного перерізу ацинусів, висоту епітелію, площу екзокриноцитів, їх ядер і цитоплазми, підраховували кількість ядерців в ядрах екзокриноцитів і кількість клітин в ацинусі. В ендокринній частині залози рахували кількість острівців Лангерганса на одиницю площі (0,25 мм²) і кількість розміщених у них клітин, вимірювали площу і діаметр поперечного перерізу острівців, визначали щільність розташування клітин. Методом накладання точкових морфометричних сіток вираховували відносну площу екзо- і ендокринної частини, а також сполучної тканини в залозі (Hossain et al., 2014; Yanko et al., 2020).

За допомогою стандартних наборів реактивів ("Філісит-Діагностика", Україна) на біохімічному аналізаторі ("Sinnova", КНП) в сироватці крові визначали концентрацію глюкози.

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення "Statistica 6.0 for Windows" (StatSoft, USA) та "Excel 2010" (Microsoft, USA). Дані представлені як середнє ± SEM при нормальному розподілі. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за t-критерієм Стюдента. Значення $p < 0,05$ вважали вірогідним. Групи також аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу.

Результати та обговорення

Гістоморфометричні відмінності в ПЗ контрольних щурів різного віку

При порівнянні гісто-морфометричних показників ПЗ контрольних щурів виявлено зниження її активності з віком. Так, у екзокринній частині залози 15-міс щурів спостерігали меншу площу ацинусів на 27% ($p < 0,05$) та площу екзокриноцитів на 13%, ніж у 3-міс тварин (табл. 1; рис). Ендокринна частина ПЗ зазнавала ще більших вікових змін. Так, у дорослих тварин відмічали вірогідно меншу відносну площу ендокринної частини (на 32%), меншу середню кількість острівців Лангерганса (на 22%), їх площу (на 31%) та кількість розміщених у них ендокриноцитів (на 18%) порівняно з молодими щурами (табл. 2; рис). Також у ПЗ дорослих щурів спостерігали більшу кількість сполучної тканини, а саме: вірогідно більшу відносну площу стромы на 20% та стромально-паренхіматозний індекс на 28%, більшу ширину прошарків міжчасточкової та міжацинусної сполучної тканини на 21 і 30% відповідно, ніж у молодих тварин (табл.1). Це відповідає загальній закономірності зниження активності ПЗ з віком (Kehm et al., 2018; Löhr et al., 2018).

Таблиця 1. Морфометричні показники екзокринної частини підшлункової залози ($M \pm m$; $n=10$)
Table 1. Morphometric indicators of the exocrine pancreas ($M \pm m$; $n=10$)

Показники \ Indicators	3-міс щури \ 3-month-old rats		15-міс щури \ 15-month-old rats	
	Контроль \ Control	Переривчасте голодування \ Intermittent fasting	Контроль \ Control	Переривчасте голодування \ Intermittent fasting
Відносна площа екзокринної частини, % \ Relative area of the exocrine part, %	76,1 $\pm$ 1,5	78,9 $\pm$ 1,3	73,2 $\pm$ 1,7	75,6 $\pm$ 1,9
Відносна площа строми, % \ Relative area of the connective tissue, %	20,1 $\pm$ 0,9	17,4 $\pm$ 0,3	24,2 $\pm$ 1,5**	19,0 $\pm$ 1,5*
Стромально-паренхіматозний індекс \ Stromal-parenchymal index	0,25 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02**	0,23 $\pm$ 0,03*
Ширина прошарків сполучної тканини, мкм \ Width of the connective tissue layers, μ m: міжчасточкова \ interlobular міжацинусна \ interacinus	3,16 $\pm$ 0,11 0,74 $\pm$ 0,02	2,63 $\pm$ 0,15 0,70 $\pm$ 0,03	3,81 $\pm$ 0,12** 0,96 $\pm$ 0,02**	2,76 $\pm$ 0,15* 0,63 $\pm$ 0,02*
Діаметр ацинуса, мкм \ Diameter of the acinus, μ m	30,3 $\pm$ 0,9	29,5 $\pm$ 0,6	27,7 $\pm$ 0,7	28,9 $\pm$ 0,5
Площа поперечного перерізу ацинуса, мкм ² \ Cross-sectional area of the acinus, μ m ²	952 $\pm$ 26	831 $\pm$ 13	692 $\pm$ 16**	784 $\pm$ 19
Площа, мкм ² \ Area, μ m ² : екзокриноцита \ exocrinocyte ядра \ nucleus	139,2 $\pm$ 3,7 19,1 $\pm$ 1,0 120,1 $\pm$ 3,7	111,0 $\pm$ 3,0* 19,5 $\pm$ 0,4 91,5 $\pm$ 2,9*	120,6 $\pm$ 2,5 17,6 $\pm$ 0,1 103,0 $\pm$ 2,6**	121,3 $\pm$ 4,9 19,8 $\pm$ 0,2 101,5 $\pm$ 4,3
цитоплазми \ cytoplasm Ядерно-цитоплазматичне співвідношення \ Nuclear-cytoplasmic ratio	0,160 $\pm$ 0,003	0,211 $\pm$ 0,004*	0,170 $\pm$ 0,006	0,201 $\pm$ 0,006*
Кількість ядерців в екзокриноциті, шт \ Number of nucleoli in an exocrinocyte, pcs	1,57 $\pm$ 0,02	1,77 $\pm$ 0,03	1,48 $\pm$ 0,05	1,91 $\pm$ 0,07*
Висота епітелію ацинуса, мкм \ Height of the epithelium of the acinus, μ m	12,4 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,1	11,2 $\pm$ 0,2	11,9 $\pm$ 0,4
Кількість екзокриноцитів в ацинусі, шт \ Number of exocrinocytes in the acinus, pcs	8,7 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,2

Примітка: тут і в таблиці 2 * $p < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем; ** $p < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем 3-міс щурів.

Note: here and in Table 2 * $p < 0.05$ – significant compared with the control; ** $p < 0.05$ – significant compared with the control 3-month old rats.

Структурні відмінності в екзокринній частині ПЗ щурів різного віку, які зазнавали впливу ПГ

Паренхіма ПЗ щурів, які знаходилися на ПГ, зберігала фізіологічну структуру. Зовні залоза покрита тонкою сполучнотканинною капсулою. Паренхіма органу розділена на часточки, між якими розташовуються сполучнотканинні перегородки з кровоносними судинами, нервами та вивідними протоками. Екзокринна частина представлена структурно-функціональними одиницями – ацинусами, а також системою протоків. Ацинуси мали переважно округлу форму і складалися з 7-10 екзокриноцитів пірамідальної форми (рис.).

У 15-міс щурів, які перебували на ПГ, площа ацинусів ПЗ була на 13% більшою, ніж у контрольних тварин. Тенденцію до зростання (на 13%) мала також площа ядер екзокриноцитів, що призвело до зростання ядерно-цитоплазматичного співвідношення на 18% ($p < 0,05$). Гіпертрофія ядра і збільшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення свідчить, перш за все, про підвищення функціональної активності клітини (Koda et al., 2006). Кількість ядерців в ядрах екзокриноцитів у цих

дослідних щурів була вірогідно більшою на 29%, ніж у контролі (табл. 1). Оскільки до основних функцій ядерця відносять синтез рРНК, з якої утворюються субодиниці рибосом, вважають, що гіперплазія ядерця вказує на підвищення білоксинтетичної активності екзокриноцитів (Dubois et al., 2016).

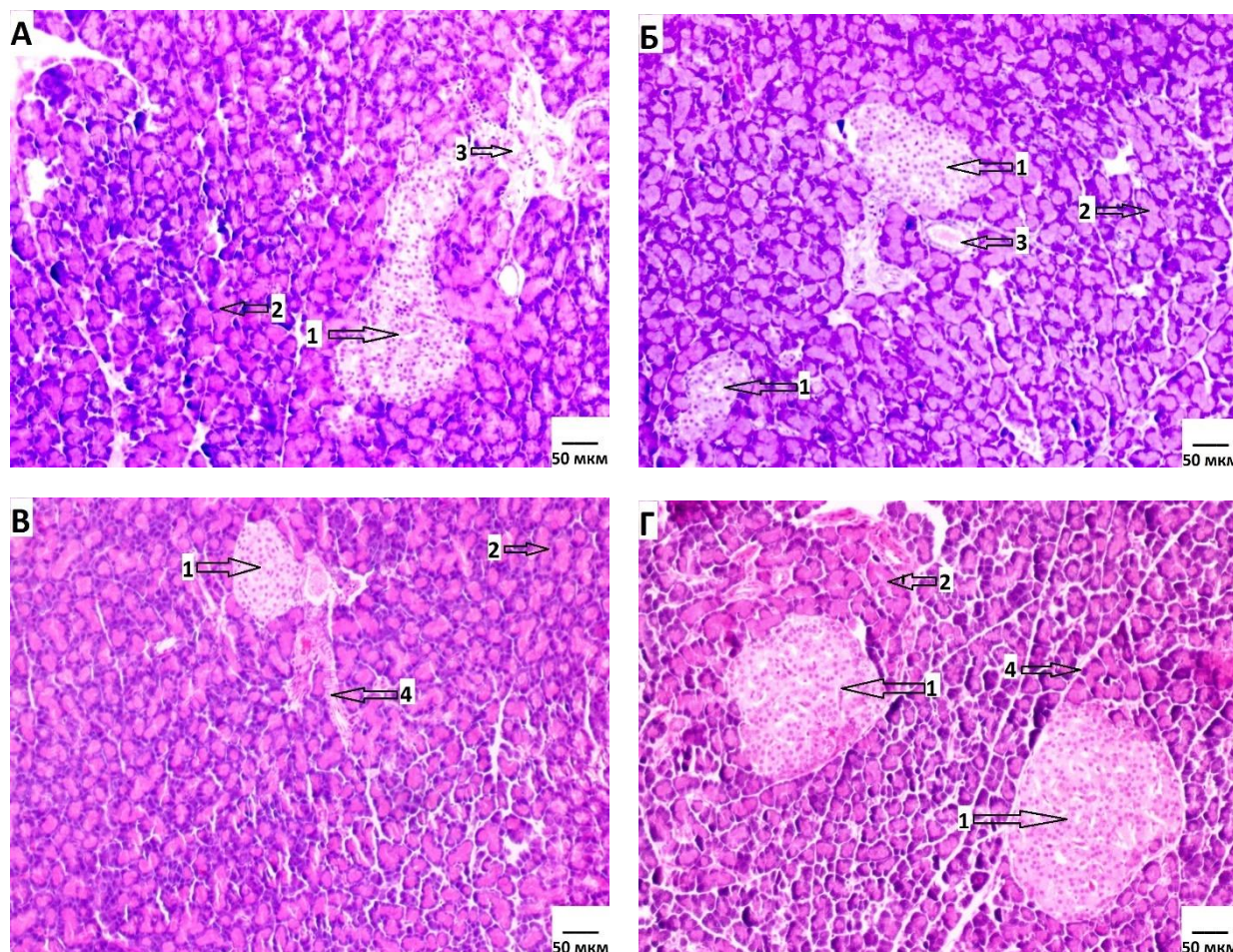


Рисунок. Мікрофотографія підшлункової залози щура контрольної групи (А – 3-міс, В – 15-міс) і після впливу переривчастого голодування (Б – 3-міс, Г – 15-міс).

Примітка: 1 – острівцеві Лангерганса; 2 – ацинус; 3 – вивідний проток; 4 – міжчасточкова сполучна тканина. Забарвлення гематоксилін-еозин. $\times 200$.

Figure. Photomicrograph of the rat's pancreas of the control group (A – 3 months old, B – 15 months old) and after exposure to intermittent fasting (Б – 3 months old, Г – 15 months old).

Note: 1 – Langerhans islet; 2 – acinus; 3 – pancreatic duct; 4 – interlobular connective tissue. Hematoxylin-eosin staining. $\times 200$.

У екзокринній частині ПЗ 3-міс щурів, які зазнавали впливу ПГ, спостерігали гістоморфометричні ознаки зниження її активності. Так, про це свідчило менша площа ацинусів (на 13%), площа екзокриноцитів (на 20%; $p < 0,05$) та їх цитоплазми (на 24%; $p < 0,05$), менша висота епітелію ацинусів (на 14%) та кількість екзокриноцитів у них (на 13%) порівняно з контролем. Проте, кількість ядерця у цих тварин була більшою на 13% (табл. 1). Таким чином, характер і ступінь вираженості змін досліджених морфометричних показників ПЗ, після впливу ПГ, може свідчити про зростання активності її екзокринної частини у 15-міс тварин, і зниження – у 3-міс щурів.

Результати наших досліджень показали зниження кількості сполучної тканини як у 3-міс, так і в 15-міс (в більшій мірі) щурів, які перебували на ПГ. Так, у тканині ПЗ дослідних дорослих щурів площа строми і стромально-паренхіматозний індекс були достовірно меншими, ніж у контрольних, відповідно на 21 і 28%. Ширина прошарків міжчасточкової і міжацинусної сполучної тканини у цих тварин була достовірно меншою відповідно на 28 і 34%. У 3-міс дослідних тварин також відмічали зниження відносної площі строми (на 13%), стромально-паренхіматозного індексу (на 16%) та

ширини прошарків міжчасточкової сполучної тканини (на 17%) порівняно з контролем (табл. 1). Зменшення кількості сполучнотканинних елементів у тканині ПЗ можна розглядати як одну з ознак активації її функції і підвищення регенераторних можливостей, а також як один з важливих факторів, що сприяє поліпшенню обміну речовин між ацинусами.

Таблиця 2. Морфометричні показники ендокринної частини підшлункової залози ($M \pm m$; $n=10$)
Table 2. Morphometric indicators of the endocrine pancreas ($M \pm m$; $n=10$)

Показники \ Indicators	3-міс щури \ 3-month-old rats		15-міс щури \ 15-month-old rats	
	Контроль \ Control	Переривчасте голодування \ Intermittent fasting	Контроль \ Control	Переривчасте голодування \ Intermittent fasting
Відносна площа, % \ Relative area, %	3,8 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,5**	5,4 $\pm$ 0,7*
Кількість островців (на 0,25 мм ²), шт \ Number of islets (by 0.25 mm ²), pcs	1,15 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,05**	1,3 $\pm$ 0,1*
Площа поперечного перерізу островка, мкм ² \ Cross-sectional area of the islet, μ m ²	13816 $\pm$ 121	9027 $\pm$ 132*	9538 $\pm$ 92**	12543 $\pm$ 103*
Діаметр островка, мкм \ Islet diameter, μ m	114,1 $\pm$ 3,1	87,6 $\pm$ 2,7*	93,8 $\pm$ 4,9**	111 $\pm$ 7*
Кількість ендокриноцитів в островці, шт \ Number of endocrinocytes in the islet, pcs	145,9 $\pm$ 4,3	113,8 $\pm$ 19,3*	119,8 $\pm$ 10,8**	144,2 $\pm$ 7,6*
Щільність розміщення ендокриноцитів в островці, шт/1000 мкм ² \ Density of placement of endocrinocytes in the islet, units/1000 μ m ²	11,0 $\pm$ 0,7	13,1 $\pm$ 0,5*	13,0 $\pm$ 0,1**	11,1 $\pm$ 0,3*

Морфофункціональні відмінності в ендокринній частині ПЗ щурів різного віку після впливу ПГ

Ендокринна частина представлена островцями Лангерганса, що лежать між ацинусами. Форма островців округла або овальна, але також вони зустрічалися стрічкоподібною та зірчастою форми (рис.).

Виявлено вікові відмінності у гістоморфометричних показниках активності ендокринної частини ПЗ щурів, які знаходилися на ПГ. У 15-міс дослідних тварин спостерігали суттєве зростання активності ендокринної функції залози. Про це свідчило вірогідне зростання відносної площі ендокринної частини (на 108%), середньої кількості островців Лангерганса (на 44%), більша площа поперечного перерізу островців (на 32%) і їх діаметр (на 18%) та більша кількість розміщених у них ендокриноцитів (на 20%) порівняно з контролем. У 3-міс дослідних щурів, навпаки, спостерігали ознаки зниження активності ендокринної функції залози. Про це свідчили вірогідно менші розміри островців (площа – на 35%, діаметр – на 23%) і кількість розміщених у них клітин (на 22%), ніж у контролі (табл. 2; рис.).

Про зростання функціональної активності ендокринної частини ПЗ дорослих дослідних щурів вказує вірогідне зниження концентрації глюкози в сироватці крові на 20% порівняно з вихідним рівнем. У 3-міс щурів концентрація глюкози, навпаки, була більшою на 10%. Такий характер змін морфофункціональних показників може свідчити про активацію ендокринної частини ПЗ у дорослих тварин, і зниження її активності у молодих щурів після перебування їх на ПГ.

Порівняння результатів з літературними даними

З літератури відомо, що обмежене харчування викликає фізіологічні зміни ендокринної частини ПЗ, а саме – зміни в секреції інсуліну, метаболізмі островців Лангерганса та редокс-стані β -клітин (Bonassa et al., 2018). В дослідях на мишах з цукровим діабетом, які перебували на аліментарній депривації, виявлено зниження симптомів даної патології, активувалася проліферація β -клітин, відновлювалася секреція інсуліну і гомеостаз глюкози (Cheng et al., 2017). В іншій роботі виявлено, що щури, які отримували раціон знижений по калорійності на 30%, мали більшу активність β -клітин, про що свідчить рання секреція інсуліну при внутрішньочеревному тесті толерантності до глюкози. При цьому зростали розміри β -клітин і їх кількість у островцях Лангерганса (He et al., 2012). Досліджено, що обмеження харчування запобігає розвитку новоутворень в залозі (Lanza-Jacoby et al., 2013). Також виявлено, що ПГ має значно більший протипухлинний ефект у ПЗ, ніж постійна дія

голодування (Chen et al., 2016). Показано, що обмеження харчування на 40% впливає на β -клітинну дисфункцію і резистентність до інсуліну, відновлює гомеостаз глюкози, активує аутофагію β -клітин у мишей (Gao et al., 2015). Досліджено, що ПГ підвищує виживання β -клітин і стимулює маркери регенерації при діабеті, викликаному ожирінням (Liu et al., 2017). Також виявлено і негативний ефект від ПГ. Так, ПГ в режимі 1 день повне голодування / 1 день звичайний раціон, протягом 12 тижнів, зменшує масу ПЗ, збільшує продукцію активних форм кисню, активує апоптоз в острівцях Лангерганса та сприяє дисфункції β -клітин (Munhoz et al., 2020). Проте механізм, за допомогою якого ПГ впливає на функцію β -клітин, досі залишається нез'ясованим. Тому, доцільність проведення подальших досліджень в даному напрямку є актуальною.

Таким чином, аналіз літератури ще раз підтверджує про неоднозначність даних стосовно морфофункціонального стану ендокринної частини ПЗ тварин, які отримували обмежене харчування. Це може бути пов'язано з різним типом голодування, тривалості проведення експериментів, віку та статі тварин тощо. Все це обумовлює продовження досліджень у даному напрямку та розкриття механізмів впливу голодування на активність ПЗ.

Висновки

Таким чином вплив ПГ протягом 28-ми діб призводив до появи виражених морфофункціональних ознак підвищення активності ПЗ у дорослих щурів. У молодих тварин, навпаки, ПГ знижувало активність як екзо-, так і ендокринної (більшою мірою) частини залози. Вплив ПГ знижував кількість сполучної тканини в ПЗ щурів, незалежно від їх віку. Отримані дані потенційно можуть бути використані для корекції виражених вікових знижень функції ПЗ у дорослих і осіб похилого віку, а також при профілактиці вікових хронічних захворювань залози, що супроводжуються появою фіброзу. В той же час використання ПГ у молодому віці не бажане

Список використаних джерел / References

- Bonassa A.M., Carpinelli A.R. (2018). Intermittent fasting for three months decreases pancreatic islet mass and increases insulin resistance in Wistar rats. *Endocrine Abstracts*, 56, 519. <https://doi.org/10.1530/endoabs.56.P519>
- Brandhorst S., Harputlugil E., Mitchell J.R., Longo V.D. (2017). Protective effects of short-term dietary restriction in surgical stress and chemotherapy. *Ageing Res Rev*, 39, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.02.001>
- Chen Y., Ling L., Su G. et al. (2016). Effect of intermittent versus chronic calorie restriction on tumor incidence: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Scientific Reports*, 6, 33739. <https://doi.org/10.1038/srep33739>
- Cheng C.W., Villani V., Buono R. et al. (2017). Fasting-Mimicking diet promotes Ngn3-Driven b-cell regeneration to reverse diabetes. *Cell*, 168(5), 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.040>
- Dubois M.L., Boisvert F.M. (2016). The Nucleolus: Structure and function. *The Functional Nucleus*, 23, 29–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-38882-3_2
- Duregon E., Pomatto-Watson L.C.D., Bernier M., et al. (2021). Intermittent fasting: from calories to time restriction. *Geroscience*, 43(3), 1083–1092. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00335-z>
- Gao X., Yan D., Zhao Y. et al. (2015). Moderate calorie restriction to achieve normal weight reverses β -cell dysfunction in diet-induced obese mice: involvement of autophagy. *Nutrition Metabolism*, 12, 34. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0028-z>
- He X.Y., Zhao X.L., Gu Q. et al. (2012). Calorie restriction from a young age preserves the functions of pancreatic β cells in aging rats. *Tohoku J Exp Med*, 227(4), 245–252.
- Hossain M.A., Mostofa M., Awal M.A. et al. (2014). Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with aqueous extracts of *Momordica charantia* (karela) fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), S698–S704. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60710-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60710-6)
- Jaramillo A.P., Castells J., Ibrahimli S., et al. (2023). Time-restricted feeding and intermittent fasting as preventive therapeutics: A systematic review of the literature. *Cureus*, 15(7), e42300. <https://doi.org/10.7759/cureus.42300>
- Kehm R., König J., Nowotny K., et al. (2018). Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system. *Redox Biol*, 15, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.015>
- Koda M., Takemura G., Okada H., et al. (2006). Nuclear hypertrophy reflects increased biosynthetic activities in myocytes of human hypertrophic hearts. *Circ J*, 70(6), 710–718. <https://doi.org/10.1253/circj.70.710>
- Lanza-Jacoby S., Yan G., Radice G. et al. (2013). Calorie restriction delays the progression of lesions to pancreatic cancer in the LSL-KrasG12D; Pdx-1/Cre mouse model of pancreatic cancer. *Exp Biol Med* (Maywood), 238(7), 787–797. <https://doi.org/10.1177/1535370213493727>

- Liu H., Javaheri A., Godar R.J., et al. (2017). Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy*, 13(11), 1952–1968. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1368596>
- Löhr J.M., Panic N., Vujasinovic M., Verbeke C.S. (2018). The ageing pancreas: a systematic review of the evidence and analysis of the consequences. *J Intern Med*, 283(5), 446–460. <https://doi.org/10.1111/joim.12745>
- Munhoz A.C., Vilas-Boas E.A., Panveloski-Costa A. C. et al. (2020). Intermittent fasting for twelve weeks leads to increases in fat mass and hyperinsulinemia in young female Wistar rats. *Nutrients*, 129(4), 1029. <https://doi.org/10.3390/nu12041029>
- Rehfeld A., Nylander M., Karnov K. (2017). Histological Methods. In: *Compendium of Histology*. Springer, Cham. 11–24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5_2
- Song D.K., Kim Y.W. (2023). Beneficial effects of intermittent fasting: a narrative review. *J Yeungnam Med Sci*, 40(1), 4–11. <https://doi.org/10.12701/jyms.2022.00010>
- Test B., Shubrook J.H. (2023). Prevention of type 2 diabetes: The role of intermittent fasting. *Diabetology*, 4(4), 507–518. <https://doi.org/10.3390/diabetology4040044>
- Yanko R. (2023). Age-related differences in the effect of L-methionine on histo-morphometric indicators of pancreas activity in rats. *Acta Scientific Gastrointestinal Disorders*, 6(12), 02–08.
- Yanko R., Levashov M., Chaka E., Safonov S. (2020). Histomorphological changes in the rat pancreas after methionine administration. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 35, 117–123. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2020-35-13> (in Ukrainian)

Age-related differences in the effect of intermittent fasting on the morphofunctional parameters of the rat's pancreas

R.V. Yanko

The effectiveness of using intermittent fasting (IF) to activate pancreas function is not clear. One of the reasons for this may be differences in the use of IF mode, the duration of the experiment, as well as the involvement of animals of different ages in the experiment. Also, the question of how pronounced is the effect of the use of IF to increase the functional activity of the pancreas in the elderly remains open. The aim of the work was to investigate and compare the morphofunctional changes in the pancreas of rats of different ages after exposure to IF and to evaluate the prospects of its use as a means to correct pronounced age-related decreases in gland function. Experiments were performed on 40 male rats aged 3 and 15 months. Experimental animals were exposed to IF, namely, 1 day – complete fasting / 2 days – standard diet. Access to water was free. The duration of the experiment was 28 days. Histological preparations were made from pancreas tissue according to the standard method. Histomorphometry was carried out using the computer program "Image J". Research was conducted in accordance with the provisions of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986). It was found that exposure to IF for 28 days led to the appearance of clearly expressed morphofunctional signs of increased activity of the pancreas in adult rats. The endocrine function of the gland increased in particular, as evidenced by a probable increase in the relative area of the endocrine part (by 108%), the average number of Langerhans islets (by 44%), the size of the islets, the number of endocrinocytes located in them (by 20%), and a decrease in the concentration of glucose in the blood. In young animals, on the contrary, IF reduced the activity of both exo- and endocrine (to a greater extent) part of the gland. The effect of IF reduced the amount of connective tissue in the pancreas of rats of different ages. The obtained data can be used to improve the function of the pancreas in adults and the elderly, as well as in the prevention of age-related chronic diseases of the gland accompanied by the appearance of fibrosis. At the same time, the use of IF at a young age is not desirable.

Key words: *intermittent fasting, pancreas, age, histomorphology, rats*

Cite this article: Yanko R.V. (2024). Age-related differences in the effect of intermittent fasting on the morphofunctional parameters of the rat's pancreas. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 138-144. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-12> (in Ukrainian)

About the author:

R.V. Yanko – Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Bogomoletz Str., 4, Kyiv, Ukraine, 01024, biolag@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-0397-7517>

Received: 10.03.2024 / Revised: 06.09.2024 / Accepted: 01.10.2024

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 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; лівє – 2,5 см, правє – 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 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. Назви таблиць і рисунків та примітки до них подаються українською та англійською мовами. 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 та англійською 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.

AUTHOR GUIDELINES
The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National
University. Series «Biology»

The journal publishes research findings across all areas of biological sciences. Submissions are accepted in the following categories:

- Completed original studies that have not been published elsewhere;
- Descriptions of original methods and instruments;
- Theoretical and review articles;
- Materials and reports on scientific events;
- Book reviews.

Articles are published in Ukrainian and English.

The text of an experimental article must include the following sections: "Introduction," "Methods" ("Objects and Methods of Research"), "Results," "Discussion" (or a combined section "Results and Discussion"), and "References." Articles should be prepared in MS Word using Arial font, 10 pt; paragraph indent – 1 cm; single line spacing; margins: top and bottom – 3.5 cm, left – 2.5 cm, right – 2 cm.

The article text begins with the UDC index, followed by the title (Arial, 12 pt), authors' initials and surnames (Arial, 10 pt), full names of scientific institutions, and email addresses (Arial, 9 pt). An abstract in the original language of the article is placed under the header (Arial, 9 pt), followed by a list of up to 10 keywords. Abstracts (Arial, 9 pt) in English and Ukrainian must also be included, along with the transliterations of the authors' names, the translated title of the article, and the corresponding keywords. Each abstract must be no less than 1,800 phonetic characters.

Tables and figures should be embedded in the text. Titles, captions, and notes for tables and figures must be provided in both Ukrainian and English.

References in the text should appear in parentheses, indicating the author's surname and the year of publication. The reference list is arranged alphabetically (first in Cyrillic, then in Latin script) without numbering. Bibliographic descriptions must comply with the standards of the Ministry of Education and Science of Ukraine, specifically DSTU 8302:2015, adapted to APA style (American Psychological Association). Descriptions of printed sources must include the place of publication (city), publisher, year, and total page count (or article pages for periodicals).

References in English should be formatted according to APA style and listed under "References", arranged alphabetically without numbering. DOIs must be included if assigned.

Electronic versions of articles should be submitted via email to the editorial office. Along with the electronic version, a printed copy signed by all authors must also be provided.

A separate page should include the authors' surnames and initials, full names of scientific institutions, postal addresses, email addresses, and links to their ORCID profiles. This information must be provided in both Ukrainian and English.

Articles submitted to the editorial office are registered and sent for peer review. The reviewer either approves the article for publication or rejects it. If revisions are required, the article is returned to the authors for correction.

Наукове видання

**Вісник Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна.**

Серія «Біологія»

Випуск 43

Збірник наукових праць

Українською, англійською мовами

Підписано до друку 23.12.2024. Формат 60×84 1/8. Папір офсетний. Друк цифровий.

Ум. друк. арк. 14,06. Обл.-вид. арк. 9,27.

Наклад 100 пр. Зам. № 32/24

**61022, Харків, майдан Свободи, 4,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна.**

**Видавець і виготовлювач Харківський
національний університет імені В. Н. Каразіна
61022, Харків, майдан Свободи, 4.**

Видавництво

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09