



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovskogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 633.15:581.143.6

Оцінка здатності до прямої регенерації у ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер

К.В. Деркач¹, О.Є. Абраїмова¹, Т.М. Сатарова¹, О.А. Молитва²,
В.С. Калугина², М.Г. Панасенко², С.С. Печорна²

¹ДУ Інститут сільського господарства степової зони Національної академії аграрних наук України,
Дніпропетровськ, Україна

²ДВНЗ Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпропетровськ, Україна

Оцінено здатність до прямого органогенезу сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер. Відзначено особливості прямої регенерації даних експлантатів. Регенерація на 14-у добу культивування сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків відбувається лише шляхом прямого гомогенезу, а на 45-у добу – шляхом прямого геморизогенезу та прямого геморизогенезу. Відзначено вплив мінеральної основи живильного середовища на регенераційну здатність у культурі *in vitro* на 45-у добу культивування. Охарактеризовано сегменти вузлової області пагонів 5-добових проростків як експлантати для отримання ембріогенної калусної тканини та рослин-регенерантів. Відзначено зростання частоти утворення калусної тканини на поверхні вузлової області пагонів проростків при збільшенні тривалості культивування *in vitro*. Надано рекомендації щодо використання прямого гомогенезу та прямого геморизогенезу у біологічних системах агробактеріальної трансформації.

Ключові слова: *Zea mays* L.; прямий гомогенез; прямий геморизогенез; мінеральна основа; сегменти вузлової області проростків

Evaluation of the capacity for direct regeneration of maize inbreds of the Lancaster selection group

K.V. Derkach¹, O.E. Abraimova¹, T.M. Satarova¹, O.A. Molitva²,
V.S. Kalugina², M.G. Panasenko², S.S. Pechorna²

¹Agricultural Steppe Zone Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Ukrainian State University of Chemistry and Technology, Dnipropetrovsk, Ukraine

In connection with the necessity of bringing elite maize inbreds of the Lancaster germplasm group, which have potential for cultivation in Ukraine, into the system of genetic transformation, the aim of this investigation is to identify the ability of maize inbreds of this group to regenerate by direct organogenesis and to determine the optimal mineral basis for their nutritional environment using segments of the node area of shoots. As explantats we used sterile 4-day old seedlings of 4 maize inbreds of Lancaster germplasm and model inbred Chi31 exotic germplasm. The seedlings were obtained by germination of sterile seeds in Petri dishes between two layers of moist sterile filter paper at a temperature of 27 °C in dark conditions. A single 1 cm long segment was cut from each from each seedling, running from 0.5 cm before the node to 0.5 cm after the node. A cut was made in each segment of the node in order to create a wounded surface. Explantats were planted in a nutrient environment with mineral bases of MS or N₆, modified by the addition of 10 mg/l silver nitrate, 100 mg/l casein hydrolyzate, 690 mg/l L-proline, 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.1 mg/l abscisic acid. Cultivation was carried out at 25–27 °C in the light. Direct hemogenesis in this environment on the 14th day of cultivation *in vitro* reached 100% for each line. This meant that all researched lines of Lancaster germplasm and the model line showed a high capacity for direct regeneration through direct hemogenesis, which does not depend on the composition of the mineral content of their nutritional environment. Callus formation was observed in all genotypes on the 14th day of cultivation *in vitro* and the extent of its formation increased during the following month of cultivation. The callus formation was observed only at the site of the wounded surface. The calluses were transparent. Although green areas appeared in

Інститут сільського господарства степової зони Національної академії аграрних наук України,
вул. Дзержинського, 14, 49600, Дніпропетровськ, Україна

Agricultural Steppe Zone Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
Dzerzhinsky str., 14, 49600, Dnipropetrovsk, Ukraine. Tel.: +38056-745-02-36. E-mail: satarova2008@yandex.ru

these calluses, they were nonembryogenic and did not lead to regeneration. All explants were transplanted into fresh nutrient media with simultaneous removal of germinated shoots on the 14th day of cultivation. Regeneration on the 45th day of cultivation took place by direct hemogenesis (formation of shoot or leafy structures) or direct hemorizhogenesis (formation seedlings which had both shoot and root). Formation of ryzhogenic calli was observed in most inbreds. The frequency of regeneration of shoots and leaf structures was characterized by a tendency to increase indicators in the culture environment with mineral basis N_6 , and the frequency of regeneration of shoots was significantly marked using a medium with mineral basis MS. However, regeneration on the 45th day took place at a much lower rate than on the 14th day of cultivation, which must be taken into account when a system of genetic transformation systems using nodal segments of seedling shoots is being developed. Thus, using nodal sections of 4-day old seedling shoots of maize inbreds of Lancaster germplasm and model inbred Chi31, we can obtain viable seedlings for use in biological systems of agrobacterial transformation. We can recommend two variants of provoking regeneration by direct organogenesis *in vitro* for application in genetic transformation. The first variant suggests for all studied genotypes 100% induction on the 14th day of *in vitro* cultivation of direct organogenesis by hemogenesis and this requires further rooting of obtained shoots before planting into soil. Both variants of the nutrient environments of cultivation proposed us can be used. The second variant involves low frequency of regeneration by direct hemorizhogenesis in a limited number of genotypes, but excludes the rooting stage. The cultivation environment with the mineral basis MS is recommended for this variant. The choice of either variant for obtaining direct regeneration depends on the particularity and aim of the research.

Keywords: *Zea mays*; direct hemogenesis; direct hemorizhogenesis; mineral basis; segments of nodal sections of seedlings

Вступ

Розширення різноманіття генофонду сільськогосподарських рослин, у тому числі і кукурудзи, є актуальним напрямом біотехнологічних досліджень. Шляхом застосування генетичної трансформації та клітинної селекції можливо створювати нові генотипи, стійкі до біотичних і абіотичних факторів. При проведенні генетичної трансформації методами біолістики або агробактеріальної трансформації обов'язковим є отримання рослин-регенерантів, які б несли вбудовані в них конструкції, що кодують нові ознаки. Генетичну трансформацію кукурудзи шляхом біолістики ведуть на базі тільки калусної тканини з наступною регенерацією рослин (Wang and Frame, 2009; O'Kennedy et al., 2011). Агробактеріальна трансформація передбачає застосування або калусогенезу з наступною регенерацією, тобто непряму регенерацію (Frame et al., 2011; Ombori et al., 2013), або регенерацію без стадії калусогенезу – прямий органогенез (Mykhalskaya et al., 2012). Генетична трансформація на базі калусної тканини кукурудзи поширеніша, ніж із використанням інших експлантатів. За тривалого культивування *in vitro* калусна тканина може зазнавати соматоклональних змін (Andreev et al., 2009), що небажано у біотехнологічних системах генетичної трансформації.

Кукурудза характеризується обмеженим колом чутливих до культивування *in vitro* генотипів (Satarova et al., 2013), зокрема комерційно цінних. Складність культивування *in vitro* виникає як на стадії калусогенезу, так і на стадії регенерації рослин із калусної тканини. Калусогенний і регенераційний потенціал визначається як генотиповими особливостями експлантатів, так і складом живильного середовища та умовами культивування (Kunta et al., 2012; Jakubeková et al., 2011; Frame et al., 2011). Проте підбір складу живильних середовищ і умов культивування є складним і тривалим процесом, який іноді лишається безуспішним. Останніми роками активно розвивається перспективний напрям агробактеріальної трансформації із застосуванням сегментів вузлової області пагонів 7–10-добових проростків (Mykhalskaya et al., 2012), що зменшує вірогідність соматоклональної мінливості *in vitro*.

У зв'язку з необхідністю залучення до систем генетичної трансформації елітних ліній кукурудзи селекційно перспективної для України групи Ланкастер (Satarova et al., 2011) метою роботи є характеристика

здатності ліній кукурудзи цієї групи до регенерації шляхом прямого органогенезу та визначення оптимального за мінеральною основою складу живильного середовища з використанням сегментів вузлової області пагонів проростків.

Матеріал і методи досліджень

Як експлантати використовували 4-добові стерильні проростки кукурудзи чотирьох ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер (ДК267, ДК298, ДК633/266 та ДК633/325) та модельну лінію Chi31 екзотичної зародкової плазми. Проростки отримували пророщуванням стерильних зернівок у чашках Петрі між двома шарами вологого стерильного фільтрувального паперу при +27 °C у темряві. Із кожного окремого проростка відрізали по одному сегменту довжиною 1 см, який включав 0,5 см до вузла і 0,5 см після вузла. У місці вузла у кожного сегмента робили надріз із метою створення раневої поверхні.

Експлантати висаджували на модифіковані за допомогою додавання 10 мг/л нітрату срібла, 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л *L*-проліну, 30 г/л сахарози, 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,1 мг/л абсцизової кислоти живильні середовища з мінеральними основами MS (Murashige and Skoog, 1962) чи N_6 (Chu et al., 1975). Культивування проводили при +25...+27 °C на світлі.

Для оцінки результатів культивування показники реєстрували на 14 та 45-ту добу від експлантації сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків на живильне середовище. На 14-ту добу культивування всі експлантати пересаджували на свіже живильне середовище з одночасним видаленням пророслих пагонів. Загальну частоту калусогенезу розраховували як процентне відношення кількості сегментів проростків, які характеризувалися утворенням калусу, до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Частоту утворення калусів із зеленими ділянками розраховували як процентне відношення кількості сегментів проростків, які характеризувалися утворенням калусу із зеленими ділянками, до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Частоту утворення ризогенних калусів розраховували як процентне відношення кількості калусів, які утворили корінці, до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Частоту

регенерації пагонів, рослин (пагонів із коренями, які виходили з однієї точки), листових структур розраховували як процентне відношення експлантатів із певним типом регенерації до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Статистичну обробку даних проводили за Chandler and Scott (2011). Дані в таблицях наведені у вигляді $M \pm m$ за рівня значущості 0,05.

Результати та їх обговорення

Уже упродовж першої доби культивування в усіх генотипів на обох середовищах спостерігалася проростання пагона, з боку кореня спостерігалася потовщення експлантатів, відбувалася регенерація шляхом прямого органогенезу, важлива при генетичній трансформації рослин. Проростання всіх сегментів вузлової області пагонів проростків відбувалося у вигляді формування пагонів (шляхом прямого гомогенезу) та відрізнялося залежно від генотипу кольором, довжиною та товщиною новоутворених пагонів. Прямий гомогенез уже на 14-ту добу культивування *in vitro* сягав 100% для кожної з ліній на кожному із живильних середовищ. Таким чи-

ном, у всіх досліджуваних ліній кукурудзи плазми Ланкастер та модельної лінії спостерігалася генотипічна висока здатність до прямої регенерації шляхом прямого гомогенезу, яка не залежала від складу живильного середовища за вмістом мінеральних солей. Відомо, що калусогенна та регенераційна здатність генотипів кукурудзи залежать від складу мінеральних солей середовища культивування (Rafiq et al., 2005).

На 14-ту добу культивування *in vitro* в усіх генотипів спостерігалася формування калусу, частота утворення якого зростала протягом наступного місяця культивування (табл. 1). Формування калусу спостерігалася лише у місці раневої поверхні. Калус був прозорим, на ньому зустрічалися зелені ділянки. Такий калус виявився не-ембріогенним і у подальшому регенерації не дав. На 14-ту добу культивування лише лінія Chi31 на середовищі з мінеральною основою N_6 характеризувалася утворенням калусу на кожному з експлантатів. На 45-ту добу культивування *in vitro* у лінії Chi31 загальна частота калусогенезу досягла рівня 100% і на середовищі з мінеральною основою MS. Лінія ДК633/325 характеризувалася 100% калусогенезом на середовищі з мінеральною основою N_6 .

Таблиця 1

Калусогенез у культурі сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків кукурудзи

Лінія	Мінеральна основа середовища культивування	Кількість культивованих експлантатів, шт.	Загальна частота калусогенезу на 14-ту добу культивування, %	Загальна частота калусогенезу на 45-ту добу культивування, %
ДК267	N_6	30	$63,33 \pm 17,90$	$83,83 \pm 13,84$
	MS	30	$73,33 \pm 16,42$	$83,83 \pm 13,84$
ДК633/266	N_6	17	$82,35 \pm 19,06$	$82,35 \pm 19,06$
	MS	17	$70,59 \pm 22,78$	$82,35 \pm 19,06$
ДК298	N_6	17	$58,82 \pm 24,61$	$58,82 \pm 24,61$
	MS	17	$52,94 \pm 24,96$	$76,47 \pm 21,21$
ДК633/325	N_6	25	$92,00 \pm 11,08$	$100,00 \pm 0,00$
	MS	25	$88,00 \pm 13,27$	$96,00 \pm 8,00$
Chi31	N_6	28	$100,00 \pm 0,00$	$100,00 \pm 0,00$
	MS	27	$96,30 \pm 7,41$	$100,00 \pm 0,00$
Середнє	N_6	117	$80,34 \pm 7,38$	$87,18 \pm 6,21$
	MS	116	$78,45 \pm 7,67$	$88,79 \pm 5,88$

Використовуючи сегменти вузлової області пагонів 4-добових проростків ліній кукурудзи плазми Ланкастер і модельної лінії Chi31, можна отримувати повноцінні проростки для застосування у біологічних системах агробактеріальної трансформації. Отримана таким способом калусна тканина не має перспектив до подальшого використання, оскільки є нерегенерувальною. Разом із тим, відомі праці, де з успіхом використані сегменти проростків та листків для отримання калусної тканини з наступною регенерацією рослин із неї (Ahmadabadi et al., 2007; Muoma et al., 2008). Після пересаджування на 14-ту добу культивування всіх експлантатів на свіже живильне середовище з одночасним видаленням пророслих пагонів, на 45-ту добу культивування знову фіксували пряму регенерацію (табл. 2). Регенерація відбувалася шляхом прямого гомогенезу (утворення пагонів або листових структур) або прямого геморизогенезу (утворення рослин, що мали одночасно пагін і корінь, які виходили з однієї точки). Частка калусів із зеленими ділянками коливалася у межах 17,6–74,1% залежно від генотипу та середовища культивування. Утворення ризогенних калусів спостерігалася в усіх варіантах досліджу, крім лінії ДК633/266 на середовищі MS.

Частота регенерації пагонів та листових структур характеризувалася тенденцією до зростання показників на середовищі культивування з мінеральною основою N_6 , а частота регенерації пагонів значно переважала при використанні середовища з мінеральною основою MS. Разом із цим, регенерація на 45-ту добу відбувалася зі значно нижчою частотою, ніж на 14-ту добу культивування, що необхідно враховувати при розробці системи генетичної трансформації із застосуванням сегментів вузлової області пагонів проростків.

Регенеровані пагони та листові структури потребують подальшого укорінення перед висадкою у ґрунт. Укорінення та приживаність у ґрунті пагонів ефективніші, ніж листових структур. Регенеровані рослини вже мають корінь, що виходить з однієї точки з пагоном. Вони характеризуються єдиною провідною системою пагона та кореня, яка забезпечує високу приживаність рослин у ґрунті. Тому для подальшого використання регенерації на 45-ту добу культивування *in vitro* рекомендовано застосовувати живильне середовище з мінеральною основою MS.

Аналіз на 45-ту добу культивування сегментів вузлової області пагонів проростків кукурудзи

Лінія	Мінеральна основа середовища культивування	Кількість культивованих експлантів, шт.	Частота регенерації пагонів, %	Частота регенерації рослин, %	Частота регенерації листових структур, %	Частота утворення ризогенних калусів, %	Частота утворення калусів із зеленими ділянками, %
ДК267	N_6	30	0	0	$3,33 \pm 6,67$	$63,33 \pm 17,90$	$70,00 \pm 17,02$
	MS	30	$3,33 \pm 6,67$	$3,33 \pm 6,67$	$3,33 \pm 6,67$	$23,33 \pm 15,71$	$46,67 \pm 18,53$
ДК633/266	N_6	17	0	0	0	$52,94 \pm 24,96$	$17,65 \pm 19,06$
	MS	17	$5,88 \pm 11,76$	$5,88 \pm 11,76$	0	0	$23,53 \pm 21,21$
ДК298	N_6	17	0	0	$41,18 \pm 24,61$	$29,41 \pm 22,78$	$29,41 \pm 22,78$
	MS	17	0	0	$17,65 \pm 19,06$	$47,06 \pm 24,96$	$47,06 \pm 24,96$
ДК633/325	N_6	25	$12,00 \pm 13,27$	$4,00 \pm 8,00$	$4,00 \pm 8,00$	$12,00 \pm 13,27$	$20,00 \pm 16,33$
	MS	25	0	$12,00 \pm 13,27$	0	$20,00 \pm 16,33$	$20,00 \pm 16,33$
Chi31	N_6	28	$10,71 \pm 11,90$	0	$25,00 \pm 16,67$	$50,00 \pm 19,25$	$46,43 \pm 19,20$
	MS	27	$7,41 \pm 10,27$	$14,81 \pm 13,93$	$11,11 \pm 12,33$	$25,93 \pm 17,19$	$74,07 \pm 17,19$
Усього	N_6	117	$5,13 \pm 4,10$	$0,85 \pm 1,71$	$13,68 \pm 6,38$	$42,74 \pm 9,19$	$40,17 \pm 9,10$
	MS	116	$3,45 \pm 3,40$	$7,76 \pm 4,99$	$6,03 \pm 4,44$	$23,28 \pm 7,88$	$43,97 \pm 9,26$

Із метою застосування у генетичній трансформації нами рекомендовано два варіанти провокування регенерації шляхом прямого органогенезу. Перший варіант передбачає в усіх досліджених генотипів 100% індукцію на 14-ту добу культивування *in vitro* прямого органогенезу шляхом гемогенезу та потребує подальшого укорінення отриманих пагонів перед висадкою у ґрунт. Для цього варіанта можна використовувати обидва варіанти запропонованих нами середовищ культивування. Другий варіант передбачає низьку частоту регенерації шляхом прямого геморизогенезу на живильному середовищі з мінеральною основою MS в обмеженого кола генотипів, проте виключає стадію укорінення. Вибір того чи іншого варіанта отримання прямої регенерації залежить від особливостей та мети дослідження.

Висновки

Сегменти вузлової області пагонів 4-добових пагонів проростків – перспективні експлантати для отримання рослин-регенерантів із метою використання їх у біологічних системах агробактеріальної трансформації. Всі лінії кукурудзи селекційної групи Ланкастер володіють високою здатністю до регенерації шляхом прямого гемогенезу на 14-ту добу культивування *in vitro* та низькою здатністю – шляхом геморизогенезу на 45-ту добу культивування. Існує генотипова схильність ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер до високих показників прямого органогенезу на 14-ту добу культивування. Геморизогенез не можна отримати на 14-ту добу культивування. Регенерація шляхом прямого гемогенезу на 14-ту добу культивування не залежить від складу мінеральної основи живильного середовища. Шлях регенерації на 45-у добу культивування залежить від обраного середовища культивування. Для регенерації шляхом прямого геморизогенезу рекомендовано використовувати живильне середовище з мінеральною основою MS. Сегменти проростків ліній селекційної групи Ланкастер не рекомендовано застосовувати для отримання ембріогенної калусної тканини.

Бібліографічні посилання

- Ahmadabadi, M., Ruf, S., Bock, R., 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). Transgenic Res. 16(4), 437–448.
- Andreev, I.O., Spiridonova, K.V., Maidanyuk, D.M., Kunakh, V.A., 2009. Geneticheskie jeffekty kultivirovaniya *in vitro* tkanej kukuruzy [Genetic effects of tissue culture on maize]. Fiziologija i Biohimija Kul'turnyh Rastenij 41(6), 487–495.
- Chandler, R.E., Scott, E.M., 2011. Statistical methods for trend detection and analysis in the environmental sciences (Statistics in practice). John Wiley & Sons, Ltd.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. Sci. Sinica 18, 659–668.
- Frame, B., Main, M., Schick, R., Wang, K., 2011. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. Plant Embryo Culture 710, 327–341.
- Jakubeková, M., Preťová, A., Obert, B., 2011. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 1(4), 478–487.
- Kunta, R.K., Jyothi, K.B.L., Begum, S.S., 2012. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of Indian maize inbreds by embryo culture. Current Pharma Research 2(2), 508–510.
- Muoma, J., Muluvi, G., Machuka, J., 2008. *In vitro* regeneration by indirect organogenesis of selected Kenyan maize genotypes using shoot apices. Biotechnology 7(4), 732–738.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15, 473–497.
- Mykhalskaya, S.I., Adamenko, N.I., Morgun, B.V., Kochetov, A.V., Tischenko, O.M., 2012. Kompetentnost' k *Agrobacterium* oposredovannoj transformacii segmentov pobega jelitnyh inbrednyh linij kukuruzy [Competence to *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot nodal section segments of corn elite inbred lines]. Biotechnologija 5(3), 98–104 (in Russian).
- O'Kennedy, M.M., Stark, H.C., Dube, N., 2011. Biolistic-mediated transformation protocols for maize and pearl millet using pre-cultured immature zygotic embryos and embryogenic tissue. Plant Embryo Culture 710, 343–354.
- Ombori, O., Muoma, J.V.O., Machuka, J., 2013. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical

- inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 113, 11–23.
- Rafiq, M., Fatima, T., Husnain, T., Bashir, K., Riazuddin, S., 2005. Effect of different media on callus formation and regeneration of different genotypes of maize (*Zea mays* L.). Plant Tissue Culture 15(1), 57–65.
- Satarova, T.M., Derkach, K.V., Abraimova, O.E., 2011. Ocinka reciproknogo efektu v kul'turi *in vitro* u genotipiv kukurudzi zarodkovoї plazmi Lancaster [The estimation of reciprocal effect in *in vitro* culture for maize genotypes of Lancaster germplasm]. Bjuleten' Institutu Zernovogo Gospodarstva 40, 20–24 (in Ukrainian).
- Satarova, T.N., Cherchel, V.Y., Cherenkov, A.V., 2013. Kuku-ruza: Biotehnologicheskie i selekcionnye aspekty gaploidii [Maize: Biotechnological and breeding aspects of haploidy]. New Ideology, Dnipropetrovsk (in Russian).
- Wang, K., Frame, B., 2009. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. Transgenic Maize 526, 29–45.

Надійшла до редколегії 18.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovskogo universitetu. Seria Biologiya, ekologiya

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 599:574.4+577.15

Вплив іонів *Ni* на активність аспартатамінотрансферази в листках *Glechoma hederacea* в умовах рийної діяльності ссавців

О.Є. Пахомов, О.М. Василюк, Т.А. Замєсова

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Визначено загальну активність ферментів класу трансфераз і вміст білків водорозчинної фракції в листках *Glechoma hederacea* L. Оцінено середовищотвірну роль рийної активності крота (*Talpa europaea* L.) в умовах екзогенного забруднення *Ni* у спектрі концентрацій 0,2, 1,0 та 2,0 г/м², що відповідає 1, 5 та 10 гранично допустимим концентраціям (ГДК). Виявлено зниження активності аспартатамінотрансферази в листках *G. hederacea* на 12–65% і концентрації водорозчинної фракції білка на 30–60% відносно контролю (ділянка без забруднення на *Ni* та рийної активності крота). Комбінований ефект рийної активності *T. europaea* та дії *Ni* у дозах 5 та 10 ГДК сприяв збільшенню активності ферменту удвічі – утричі (порівняно з контролем у відповідній концентрації *Ni*). Концентрація водорозчинної фракції білка в листках *G. hederacea* L. в умовах рийної активності крота та за внесення *Ni* у максимальній концентрації знижена удвічі (порівняно з контролем у відповідній концентрації *Ni*), оскільки системі за даних умов навантаження важко відновити та нормалізувати функції, у той час як за низьких і середніх концентрацій *Ni* білковий обмін інтенсифікувався на 11–150%. Вивчено вплив рийної активності мишоподібних гризунів *Apodemus sylvaticus* L., *A. flavicollis* Melchior, *Clethrionomys glareolus* Schreber на формування біологічної активності ґрунтів заплавної діброви за умов їх забруднення *Ni*. Важкі метали значною мірою інгібують протеолітичну активність ґрунту, яка визначається активністю мікроорганізмів. Рийна діяльність гризунів сприяє відновленню біологічної активності та відіграє важливу роль у формуванні механізму гомеостазу в едафотопі. У місцях поривів тварин при концентрації *Ni* 1 ГДК на глибині 0–30 см протеолітична активність вища в 1,99 раза порівняно з відповідними ділянками без поривів, при 5 ГДК – у 1,92 раза, при 10 ГДК – в 1,90 раза вища.

Ключові слова: водорозчинна фракція білка; гранично допустима концентрація; аспартатамінотрансфераза

Effect of *Ni* on aspartataminotransferase activity in *Glechoma hederacea* leaves subject to digging function by mammals

A.Y. Pakhomov, O.M. Vasilyuk, T.A. Zamesova

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Using simple and highly sensitive methods of biochemical analysis (determination of total enzyme activity of the class transferase and content of water-soluble protein fraction in *Glechoma hederacea* L. leaves, as response mechanisms of organisms to environmental change) we have detected an environment forming role played by *Talpa europaea* L. (european mole), through its digging function, studied against the background of anthropogenic *Ni* pollution with concentrations of 0.2, 1.0 and 2.0 g/m², which was equivalent to the presence of *Ni* at 1, 5, 10 times the dose of maximum permissible concentration (MPC). Thus, we discovered the fact of the reduction in total activity of aspartataminotransferase (AST) in *G. hederacea* leaves by 12–65% and concentrations of water-soluble protein fraction by 30–60% relative to control (the area without pollution of *Ni* and digging activity of mammals). The combined effect of the digging activity of *T. europaea* and *Ni* at doses of 5, 10 MAC contributed to the increased activity of the enzyme from 2.3 to 3.0 times (compared with the control in the corresponding concentration *Ni*). The concentration of water soluble protein fraction under the combined effect of the digging activity and *Ni* at maximum concentration in *G. hederacea* leaves was reduced by 2 times (compared with the control in the corresponding concentration *Ni*), because it was difficult for the system to operate the mechanisms of recovery and normalization function, while at low and medium metal concentration the processes of protein metabolism increased by 11–150%. Besides, the influence of the digging activity of mammals (*Apodemus sylvaticus* L., *A. flavicollis* Melchior, *Clethrionomys glareolus* Schreber) as our examples under the condition of artificial *Ni* soil pollution of the *Ni* polluted soil in the natural humid forest was assessed. Pollutants drastically influence the proteolytic activity of the soil that reflects microorganism's metabolism. The digging activity of mammals is shown to boost restoration biological activity of the soil, following the

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, 49010, Дніпропетровськ, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Av., 72, 49010, Dnipropetrovsk, Ukraine
Tel.: +38093-358-07-45. E-mail: Vasilyuk.elena@mail.ru

impact of pollutants and plays an essential creative role in the homeostatics mechanism in soil ecosystems. At the burrows dug by mammals proteolytic activity (at a depth of 0–30 cm) increases by 1.99 times at a pollution level of 1 MPC *Ni* concentration, by 1.92 times – at a level of 5 MPC, by 1.90 times – at 10 MPC compared to areas untouched by mammals.

Keywords: water-soluble protein fraction; the maximum permissible concentration; the total activity of aspartate aminotransferase

Вступ

Екологічний вплив (солоність, дефіцит води, інтенсивність опадів, хімічний склад ґрунтів, нестійкий температурний режим) і антропогенний прес (забруднення органічними та неорганічними сполуками) стимулювали вивчення дії різних чинників на компоненти біоти. Досліджено механізми для оптимізації стресу (Clemans, 2001; Nameed et al., 2011), запропоновано заходи з моніторингу, фітоіндикації (Ghavrii and Singh, 2010), фітореMediaції, з'ясовано вплив рослин на хімічний склад ґрунтів (Kupka et al., 2013), вивчено інтенсивність опадів (Akbarimehr and Jalilvand, 2013). Відбувається пошук чутливих і простих методів оцінки екологічного впливу, створені заходи зі збереження природних і відновлення порушених біосистем шляхом збільшення біорізноманіття на техногенно збіднених територіях (Dzyubak and Vasilyuk, 2009; Vasilyuk and Dzyubak, 2009). Визначено осмотичну та іонну фази сольового стресу (Shavruk, 2013), вплив гербіцидів, регуляторів росту, розроблено механізми захисту від важких металів (ВМ) у рослин (Varennes et al., 1996; Gardea-Torresdey et al., 2005; Sun et al., 2013; Lefcort et al., 2013), визначено механізми стійкості до засоленості (Martín et al., 2013), холодового шоку (Hébrard et al., 2013), встановлено специфічність і неспецифічність біохімічних відгуків біосистем на дію екзогенних чинників (Naji and Devaraj, 2011).

Механізми стійкості рослин до важких металів (ВМ) (Perfetto et al., 2006) тісно пов'язані з механічним захистом (Bulakhov and Pakhomov, 2006) (поглинання, блокування, зберігання, розповсюдження, детоксикація ВМ кореневою системою) і біохімічним захистом: обмін речовин, застосування регуляторів росту рослин, фітогормонів (Clemans, 2001; Bernini et al., 2010). Визначено метаболізм за умови впливу таких ВМ як *Cd*, *Co*, *Mn*, *Cr* (Vestena et al., 2011; Nameed et al., 2011; Hasan et al., 2011; Ruscitti et al., 2011; Millaleo et al., 2013; Becerril et al., 2013), роботу ферментативних реакцій, що відбуваються в рослинних, тваринних клітинах. У біотопі ферменти беруть участь у важливих біохімічних процесах: синтезі та розпаді гумусу, гідролізі органічних сполук, решток вищих рослин та мікроорганізмів, переведенні їх у доступні для засвоєння стани; фіксують вільні елементи, беруть активну участь у кругообігах життєво необхідних для рослин елементів, окисно-відновних реакціях тощо (Kong et al., 2009; Liu et al., 2008; Melero et al., 2008). Мікроорганізми відіграють визначну роль в утворенні ензимів та інтенсифікації ферментативної активності ґрунтів, яка може виступати раннім індикатором змін властивостей ґрунтів (Melero et al., 2008; Wang et al., 2011).

Забруднення ґрунту ВМ згубно відбивається на його ферментативній активності. У високих концентраціях ВМ коагулюють білки, що спричинює негайну загибель клітин (Azcon et al., 2009; Medina and Azcon, 2010).

У високих концентраціях їх дія може бути специфічнішою, оскільки різні метали мають спорідненість до певних активних груп молекул клітин. При цьому частіше за все пошкоджуються біохімічні блоки, пов'язані з диханням мікроорганізмів (Salminen et al., 2002). Зазначено (Bilanich, 2008), що існують екологічні заходи підвищення стійкості рослин до стресів від ВМ: використання *Bacillus subtilis* L. під час обробки насіння *Jatropha curcas* L. для поліпшення структури ґрунтів, забруднених *Fe* (Ghavri and Singh, 2010).

Ми з'ясовували вплив *Ni* як одного з поширених забруднювачів Дніпропетровщини на рослинний організм. *Ni* цікавий і тим, що є кофактором уреаз *i*, водночас, належить до ВМ (Clemans, 2001; Lefcort et al., 2013). Зниженню токсичності іонів *Ni* сприяли такі екологічні чинники, як рийна активність ссавців (Pakhomov and Vasilyuk, 2011). Рийна функція ссавців (Bulakhov and Pakhomov, 2006) поліпшила фізичні (твердість, вологість, порозність) та хімічні властивості ґрунтів (амінокислотний склад і дихання ґрунтів, мікробна та ферментативна активність). Ссавці як біотичний чинник відіграють екологічну роль у відновленні техногенно забруднених та збіднених територій. Саме у створенні екологічного буфера проти антропогенного навантаження на біоту, у процесі самоочищення ґрунтів, у відновленні біорізноманіття в умовах антропогенного впливу на біоту, і полягає середовищотвірна роль ссавців. Рийна активність *Mammalia* сприяла адаптивним механізмам для підтримання стану гомеостазу під впливом металу в межах допустимого рівня, що має велике практичне значення. За допомогою ферментів азотного метаболізму (Vasilyuk and Pakhomov, 2012) як чутливих індикаторів зміни навколишнього середовища визначено вплив ВМ (антропогенний чинник) та порию (біотичний чинник) на деякі рослинні об'єкти.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження здійснювали в умовах Присамарського міжнародного біосферного стаціонару ім. О.Л. Бельгарда (с. Андріївка Новомосковського району Дніпропетровської області). Як контроль обрано територію без впливу ссавців і незабруднену *Ni* (ліпо-ясеневу діброву). При внесенні враховували кількість ГДК (для *Ni* – 4 мг/кг ґрунту). У дослідні варіанти *Ni* вносили у ґрунт у вигляді сольового розчину $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ з концентрацією 0,2, 1,0 та 2,0 г/м², що еквівалентно 1, 5 та 10 ГДК *Ni*. Для запобігання забрудненню шарів ґрунту сполуками *Ni* використано ізольовані ґрунтові блоки: у ґрунт по периметру ділянки вертикально розташували пластини з інертного водонепроникного матеріалу на глибину 20 см.

Через місяць визначено загальну активність ферменту аспартатамінотрансферази (АСТ, КФ 2.6.1.1; нМ піровиноградної кислоти/мл·с) методом В. Польового та О. Максимова (1978) і концентрацію водорозчинної фракції білка (мг/мл) методом М. Bradford (1976). Дані

біохімічні показники визначали в листках *Glechoma hederacea* L., що домінувала на дослідній території на фоні рийної активності *T. europaea* L. і в умовах екзогенного забруднення *Ni*. Аспаратамінотрансфераза і аланінамінотрансфераза (АЛТ, КФ 2.6.1.2) – частини ферментативних систем, що використовують первинний продукт фотосинтезу C_4 групи рослин – аспартат, який синтезується в мезофілі листка. За допомогою АСТ за присутності коферменту піридоксальфосфату (ПФ, похідного вітаміну B_6), відбувається декарбоксилювання аспартату. Утворюється щавлевооцтова кислота, яка за участю малатдегідрогенази перетворюється на малат. Малат вступає в наступну реакцію за участю малікензиму з утворенням піровиноградної кислоти та вуглекислого газу. Піруват, після амінування за участі АЛТ та присутності ПФ, повертається до мезофілу листка, де дезамінується за участю цього ж ферменту.

Експеримент зі впливу рийної активності *T. europaea* на відновлення біологічного різноманіття антропогенно забруднених територій, на фоні дії екзогенного внесення *Ni*, проводили протягом місяця за схемою: контроль (ділянка без забруднення на *Ni* і без активності ссавців), контроль *Ni* 1 ГДК, комбінована дія рийної активності ссавців та *Ni* у дозі 1 ГДК, контроль *Ni* 5 ГДК, комбінована дія рийної активності ссавців та *Ni* у дозі 5 ГДК, контроль *Ni* 10 ГДК, комбінований ефект рийної активності ссавців та *Ni* у дозі 10 ГДК.

Протеолітичну активність ґрунту визначали апікаційним методом (Mishustin et al., 1968) у таких ґрунтових горизонтах: ґрунтовий викид, 0–10, 10–20, 20–30 см. Експериментально оцінювали рийну активність *Apodemus sylvaticus* L., *A. flavicollis* Melchior, *Clethrionomys glareoles* Schreber. Відбирання проб здійснювали через місяць після забруднення політантом. Дослід виконували протягом місяця за такою схемою: контроль (непорушений ґрунт, забруднений *Ni* у дозі 1 ГДК), комбінована дія *Ni* у дозі 1 ГДК та рийна активність гризунів, контроль (непорушений ґрунт, що був забруднений *Ni* у дозі 5 ГДК), комбінована дія *Ni* у дозі 5 ГДК та рийна активність гризунів, контроль (непорушений ґрунт, забруднений *Ni* у дозі 10 ГДК), комбінована дія *Ni* у дозі 10 ГДК та рийна активність гризунів.

Отримані результати описуються розподілом Бернуллі, але при великих значеннях розподіл Бернуллі збігається із розподілом Гаусса, що суттєво спрощує статистичну обробку. Достовірно вважали різницю між вибірками за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Під впливом рийної активності *T. europaea* в листках *G. hederacea* спостерігали достовірне зниження загальної активності АСТ (на 20%). Концентрація водорозчинної фракції білків протягом одного місяця знизилася на 12% відносно контролю (ділянка без забруднення на *Ni* і без активності ссавців). Це може бути пояснено механічною деструкцією ґрунту, збідненням рослинності, недостатнім терміном для самовідновлення біохімічних процесів рослин і ґрунту. Додавання солі *Ni* в діапазоні концентрацій (1, 5, 10 ГДК) сприяло достовір-

ному ($P < 0,05$) зниженню активності АСТ на 18–65% для всіх варіантів експерименту порівняно з контролем (площа без забруднення *Ni* та без рийної активності *T. europaea*). Отриманий результат спростовує нульову гіпотезу ($P < 0,05$). Доведено токсичний вплив металу на ґрунти, ріст і розвиток рослин за даних концентрацій. Концентрація водорозчинної фракції білків у листках *G. hederacea* була зменшеною на 31–64% у всіх варіантах дослідів відносно контролю (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив *Ni* на загальну активність аспаратамінотрансферази та концентрацію водорозчинної фракції білків у листках *G. hederacea* L.

Показники	Варіанти дослідів	$x \pm S_x$	Співвідношення дослід / контроль, %
АСТ	Контроль	$0,88 \pm 0,079$	–
	<i>Ni</i> 1 ГДК	$0,53 \pm 0,032^*$	60,8
	<i>Ni</i> 5 ГДК	$0,31 \pm 0,018^*$	35,1
	<i>Ni</i> 10 ГДК	$0,72 \pm 0,066^*$	82,4
Водорозчинна фракція білка	Контроль	$0,91 \pm 0,051$	–
	<i>Ni</i> 1 ГДК	$0,63 \pm 0,011^*$	69,4
	<i>Ni</i> 5 ГДК	$0,34 \pm 0,005^*$	36,8
	<i>Ni</i> 10 ГДК	$0,60 \pm 0,023^*$	65,6

Примітки: x – середнє значення, S_x – стандартне відхилення; * – достовірність відмінності між дослідним варіантом і контролем, $P < 0,05$; для кожного варіанту дослідів $n = 3$.

Додавання солі *Ni* у дозі 1 ГДК в умовах рийної активності *T. europaea* (спільна дія антропогенних і природних чинників) сприяло невірогідному ($P > 0,05$) збільшенню активності АСТ на 11% відносно контролю (контроль *Ni* 1 ГДК), у той час, як зі збільшенням концентрації металу (5 та 10 ГДК) відбулось підвищення активності АСТ удвічі та у 3,8 раза ($P < 0,05$) порівняно з відповідним контролем (5 та 10 ГДК) відповідно. Тобто рийна активність крота сприяла інтенсифікації процесів нітратного метаболізму в умовах середніх і невисоких концентрацій *Ni*, що довело шкідливий вплив *Ni* на процеси самовідновлення біологічних систем (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив комбінованої дії рийної активності *T. europaea* L. та *Ni* на загальну активність аспаратамінотрансферази в листках *G. hederacea* L.

Варіанти дослідів	$x \pm S_x$	Співвідношення дослід/контроль, %
Контроль	$0,89 \pm 0,063$	78,7
Рийна активність	$0,69 \pm 0,048$	
Контроль + <i>Ni</i> 1 ГДК	$0,53 \pm 0,032$	111,1
Рийна активність + <i>Ni</i> 1 ГДК	$0,59 \pm 0,037$	
Контроль + <i>Ni</i> 5 ГДК	$0,31 \pm 0,018$	230,8
Рийна активність + <i>Ni</i> 5 ГДК	$0,71 \pm 0,063^*$	
Контроль + <i>Ni</i> 10 ГДК	$0,72 \pm 0,066$	308,2
Рийна активність + <i>Ni</i> 10 ГДК	$2,23 \pm 0,204^*$	

Примітка: див. табл. 1.

Рийна активність ссавців сприяла вірогідному ($P < 0,05$) зниженню концентрації водорозчинної фракції білків (на 12%) відносно контролю (ділянка без рийної активності ссавців та *Ni*). В умовах комбінованої дії рийної активності *T. europaea* та *Ni* у дозі 1 ГДК спостерігали невірогідне ($P < 0,05$) підвищення

концентрації водорозчинної фракції білків (на 10%) відносно контролю (1 ГДК), та у 2,5 раза ($P < 0,05$) порівняно з контролем (5 ГДК). Рийна активність малих ґрунторіїв та Ni у максимальній дозі 10 ГДК не нівелювала токсичної дії Ni . Відбулось вірогідне ($P < 0,05$) зниження удвічі концентрації водорозчинної фракції білків відносно контролю (10 ГДК). Рийна активність ссавців за умов дії солей Ni у максимальній дозі не забезпечила нівелювання токсичного впливу Ni через нездатність біологічних систем до адаптації та відновлення функціональної активності процесів метаболізму за даних концентрацій Ni . Активність крота зменшила антропогенний прес, забезпечила нівелювання токсичного впливу Ni на компоненти біосистем і навколишнє середовище в умовах невисоких і середніх доз Ni (табл. 3).

У місцях порийв гризунів *Apodemus sylvaticus* L., *A. flavicollis* Melchior, *Clethrionomys glareoles* Schreber загальний рівень ґрунтових біологічних процесів вищий, ніж на ділянках без порийв. На контрольних площах протеолітична активність ґрунту достатньо низька. В умовах трьох концентрацій Ni найменші значення протеолітичної активності спостерігалися на верхніх

ґрунтових горизонтах. Рівень протеолітичної активності ґрунту максимальний на нижньому ґрунтовому горизонті. На ділянках із пориями мишоподібних гризунів протеолітична активність ґрунту значно вища. На цих площах максимальне її значення в ґрунтових викидах. На верхніх і середніх ґрунтових горизонтах активність поступово коливалась: знижувалась із наступним зростанням на найнижчих горизонтах (табл. 4).

Таблиця 3

Вплив комбінованої дії рийної активності *T. europaea* L. та Ni на концентрацію водорозчинної фракції білків у листках *G. hederacea* L.

Варіанти дослідів	$x \pm S_x$	Співвідношення дослід / контроль, %
Контроль	$1,82 \pm 0,102$	88,96
Рийна активність	$1,62 \pm 0,112$	
Контроль I Ni 1 ГДК	$1,26 \pm 0,021$	
Рийна активність + Ni 1 ГДК	$1,39 \pm 0,085$	109,68
Контроль Ni 5 ГДК	$0,67 \pm 0,012$	
Рийна активність + Ni 5 ГДК	$1,68 \pm 0,077^*$	
Контроль Ni 10 ГДК	$1,20 \pm 0,046$	59,50
Рийна активність + Ni 10 ГДК	$0,71 \pm 0,053^*$	

Примітка: див. табл. 1.

Таблиця 4

Рівень протеолітичної активності ґрунту ($x \pm S_x$, %) в місцях порийв мишоподібних гризунів після забруднення Ni

Концентрація	Показники протеолітичної активності ґрунту	Ґрунтовий горизонт, см			
		викид	0–10	10–20	20–30
1 ГДК	контроль	–	$31,5 \pm 2,0$	$36,7 \pm 2,0$	$40,9 \pm 2,1$
	порий	$78,2 \pm 2,7$	$77,3 \pm 2,7$	$67,3 \pm 2,4$	$69,4 \pm 2,4$
	ефективність	–	245,0	183,0	170,0
5 ГДК	контроль	–	$30,3 \pm 2,0$	$35,7 \pm 2,1$	$39,8 \pm 2,2$
	порий	$74,3 \pm 2,5$	$67,1 \pm 2,4$	$64,6 \pm 2,3$	$69,5 \pm 2,4$
	ефективність	–	221,0	181,0	175,0
10 ГДК	контроль	–	$29,2 \pm 2,0$	$36,8 \pm 2,0$	$39,1 \pm 2,1$
	порий	$70,9 \pm 2,4$	$65,0 \pm 2,3$	$63,2 \pm 2,3$	$68,8 \pm 2,4$
	ефективність	–	223,0	172,0	176,0

Примітка: див. табл. 1.

У місцях рийної активності *A. sylvaticus* L., *A. flavicollis* Melchior, *C. glareoles* Schreber відбулося швидше вимивання полутантів у нижні ґрунтові горизонти, про що свідчить мінімальне значення рівня протеолітичної активності на горизонті 10–20 см і вище значення – на горизонті 0–10 см. На верхньому ґрунтовому горизонті, який максимально заселений живими організмами, ступінь токсичності Ni достовірно знижено.

Висновки

З'ясовано достовірне гальмування загальної активності АСТ на 12–65% ($P < 0,05$) і зниження концентрації водорозчинних білків на 30–60% ($P < 0,05$) порівняно з контролем (площа без забруднення Ni і рийної активності *T. europaea* L.) в листках *G. hederacea* L. за умов дії солей Ni у спектрі концентрацій 1, 5 та 10 ГДК. Комбінована дія рийної активності *T. europaea* L. і Ni сприяла підвищенню активності ферменту удвічі – утричі (порівняно з контролем у відповідній концентрації Ni). Концентрація водорозчинної фракції білків в умовах спільної дії рийної активності ссавців та Ni у максимальній концентрації

зменшена удвічі (порівняно з відповідним контролем). В умовах низької та середньої концентрації Ni процеси білкового метаболізму підвищені на 11–150% ($P < 0,05$). Рийна активність *T. europaea* L. сприяла зменшенню токсичного впливу Ni (у малих і середніх концентраціях) на нормальний ріст і розвиток рослин. На верхньому ґрунтовому горизонті, який максимально заселений живими організмами, ступінь токсичності Ni також достовірно знижено в умовах дії *Apodemus sylvaticus* L., *A. flavicollis* Melchior, *Clethrionomys glareoles* Schreber. Отже, рийна активність тварин на фоні антропогенного забруднення ґрунтів виступає чинником, що послаблює негативний вплив важких металів. Використання окремих елементів зооценозу в умовах степової зони України у системі охорони природи має позитивні результати.

Бібліографічні посилання

Akbarimehr, M., Jalilvand, H., 2013. Considering the relationship of slope and soil loss on skid trails in the north of Iran (a case study). J. For. Sci. 59, 339–344.

- Alexeev, J.V., 1987. Tjzhelye metally v pochve i rastenijah [Heavy metals in soil and plants]. Nauka, Leningrad (in Russian).
- Azcón, R., Perálvarez, M.C., Biró, B., Roldán, A., Ruíz-Lozano, J.M., 2009. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Appl. Soil Ecol.* 41, 168–177.
- Becerril, F.R., Juárez-Vázquez, L.V., Hernández-Cervantes, S.C., Acevedo-Sandoval, O.A., Vela-Correa, G., Cruz-Chávez, E., Moreno-Espíndola, I.P., Esquivel-Herrera, A., de León-González, F., 2013. Impacts of manganese mining activity on the environment: Interactions among soil, plants and arbuscular Mycorrhiza. *Environ. Contam. Toxicol.* 64(2), 219–227.
- Bernini, E.S., Carmo, T.M.S., Cuzzuol, do G.R.F., 2010. Spatial and temporal variation of the nutrients in the sediment and leaves of two Brazilian mangrove species and their role in the retention of environmental heavy metals. *Braz. J. Plant Physiol.* 22(3), 177–187.
- Bilanich, M.M., 2008. The current state of research of influence of heavy metals on plant life [Suchasnij stan doslidzhennja vplyvu vazhkih metaliv na roslinnij svit]. *Visn. Prikarpat'skyj Univ. Biol.* 12, 161–176 (in Ukrainian).
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *J. Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bulakhov, V.L., Pakhomov, O.Y., 2006. Biologichne riznomanittja Ukraïny. Dnipropetrovs'ka oblast'. Ssavi (Mammalia) [Biological diversity of Ukraine. Dnipropetrovsk region. Mammals (Mammalia)]. Dnipropetrovsk University Press, Dnipropetrovsk (in Ukrainian).
- Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta J.* 212(4), 475–486.
- Dzyubak, O.I., Vasilyuk, O.M., 2009. Vplyv hlorydnogo zasolenja na morfometrychni ta biohimichni pokaznyky roslin u dynamici rostu ta rozvytku [Effect of chloride salinity on morphometric and biochemical indices in the dynamics of plant growth and development]. *Fundamental'ni Ta Prykladni Doslidzhennja v biologii: 'Materialy I Mizhnarodnoi' Naukovoi' Konferencii'*. Veber, Donets'k, 2, 231–232 (in Ukrainian).
- Gardea-Torresdey, J.L., Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Cruz-Jimenez, G., Cano-Aguilera, I., 2005. Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Environ. Contam. Toxicol.* 48(2), 225–232.
- Ghavri, S.V., Singh, R.P., 2010. Phytotranslocation of *Fe* by biodiesel plant *Jatropha curcas* L. grown on iron rich wasteland soil. *Braz. J. Plant Physiol.* 22(4), 235–243.
- Hameed, A., Mahmooduzzafar, T.N.Q., Siddiqi, T.O., Iqbal, M., 2011. Differential activation of the enzymatic antioxidant system of *Abelmoschus esculentus* L. under $CdCl_2$ and $HgCl_2$ exposure. *Braz. J. Plant Physiol.* 23(1), 46–54.
- Hasan, S.A., Hayat, S., Wani, A.S., Ahmad, A., 2011. Establishment of sensitive and resistant variety of tomato on the basis of photosynthesis and antioxidative enzymes in the presence of cobalt applied as shotgun approach. *Braz. J. Plant Physiol.* 23(3), 175–185.
- Hébrard, C., Trap-Gentil, M.V., Lafon-Placette, C., Delaunay, A., Joseph, C., Lefebvre, M., Barnes, S., Maury, S., 2013. Identification of differentially methylated regions during vernalization revealed a role for RNA methyltransferases in bolting. *J. Exp. Bot.* 64(2), 651–663.
- Kupka, I., Podrážský, V., Kubeček, J., 2013. Soil-forming effect of Douglas fir at lower altitudes – a case study. *J. For. Sci.* 59, 345–351.
- Kong, L., Wang, Y.-B., Zhao, L.-N., Chen, Z.-H., 2009. Enzyme and root activities in surface-flow constructed wetland. *Chemosphere*. 76, 601–608.
- Lefcort, H., Wehner, E.A., Cocco, P.L., Lefcort, H., 2013. Look inside get access pre-exposure to heavy metal pollution and the odor of predation decrease the ability of snails to avoid stressors. *Environ. Contam. Toxicol.* 64(2), 273–280.
- Liu, X.-M., Li, Q., Liang, W.-J., Jiang, Y., 2008. Distribution of soil enzyme activities and microbial biomass along a latitudinal gradient in farmland of Songliao Plain, Northeast China. *Pedosphere*, 18, 431–440.
- Martín, J.A.R., Carbonell, G., Nanos, N., Gutiérrez, S.C., 2013. Identification of soil mercury in the Spanish Islands. *Environ. Contam. Toxicol.* 64(1), 171–179.
- Medina, A., Azcón, R., 2010. Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhiza fungi and organic amendments to improve soil quality and plant performance under stress conditions. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10(3), 354–372.
- Melero, S., Vanderlinden, K., Ruiz, J.C., Madejon, E., 2008. Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 437–442.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Ivanov, A.G., Krol, M., Hüner, N.P.A., 2013. Excess manganese differentially inhibits photo system I versus II in *Arabidopsis thaliana* L. *J. Exp. Bot.* 64(91), 343–354.
- Mishustin, Y.N., Nikitin, D.I., Vostrov, I.S., 1968. Prjamoy metod opredelenija summarnoy proteaznoj aktivnosti pochv [The direct method for determination of summary protease activity in soils]. *Sborn. Dokladov Simpoziuma po Fermentam Pochvy. Nauka i tehnika, Minsk*, 144–150 (in Russian).
- Naji, K.M., Devaraj, V.R., 2011. Antioxidant and other biochemical defense responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. (Horse gram) induced by high temperature and salt stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 23(3), 187–195.
- Pakhomov, O.Y., Vasilyuk, O.M., 2012. Vplyv antropogennykh faktoriv na aktyvnist' transferaz na foni seredovyshtvirnoi' funkcii' ssavciv [The influence of anthropogenic factors on the activity of transferases in the background environment generating function of mammals]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ecol.* 20(2), 64–70 (in Ukrainian).
- Perfetto, B., Lamberti, M., Giuliano, M.T., 2006. Analysis of the signal transduction pathway of nickel-induced matrix metalloproteinase-2 expression in the human keratinocytes *in vitro*: preliminary findings. *J. Cutan. Pathol.* 34(6), 441–447.
- Polevoy, V., Maximov, G. (eds.), 1978. Metody biohimicheskogo analiza rastenij [Methods of biochemical analysis of plants]. Leningrad University Publish., Leningrad (in Russian).
- Ruscitti, M., Arango, M., Ronco, M., Beltrano, J., 2011. Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Braz. J. Plant Physiol.* 23(1), 15–25.
- Salminen, I., Liiri, M., Haimi, J., 2002. Responses of microbial activity and decomposer organisms to contamination in microcosms containing forest soil. *Ecotox. Environ. Save.* 53(1), 93–103.
- Shavruk, Y., 2013. Salt stress or salt shock: Which genes are we studying. *J. Exp. Bot.* 64(1), 119–127.
- Sun, J., Cui, J., Luo, C., Gao, L., Chen, Y., Shen, Z., 2013. Contribution of cell walls, nonprotein thiols, and organic acids to cadmium resistance in two cabbage varieties. *Environ. Contam. Toxicol.* 64(2), 243–252.
- Varenes, A., Torres, M.O., Coutinho, J.F., Rocha, M.M.G.S., Neto, M.M.P.M., 1996. Effects of heavy metals on the growth and mineral composition of a nickel hyperaccumulator. *J. Plant Nutr.* 19(5), 669–676.
- Vasilyuk, O.M., Dzyubak, O.I., 2009. Physiological and biochemical parameters of plants as markers of a condition of

- environment. Fundamental'ni ta Prykladni Doslidzhennja v Biologii: Materialy I Mizhnarodnoi' Naukovoi' Konferencii'. Weber, Donets'k, 2, 348–349.
- Vasilyuk, O.M., Pakhomov, O.Y., 2012. Vplyv ioniv nikelju na funkcional'nu aktyvnist' transaminaz v lystkah *Glechoma hederatia* L. v umovah ryjnoi' aktyvnosti Mammalia [Effect of nickel ions on the functional activity of enzymes in the leaves of *Glechoma hederatia* L. under conditions of Mammalia digging activity]. Achievement of High school – 2012: Materialy VIII Mezhdunarodnoj Nauchno-Prakticheskoy Konferencii. Bjelgrad, Sofija, Bolgarija, 21, 43–49 (in Ukrainian).
- Vestena, S., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J.A, Oliva, M.A., 2011. Cadmium induced oxidative stress and antioxidative enzyme response in water hyacinth and salvinia. Braz. J. Plant Physiol. 23(2), 131–139.
- Wang, J.B., Chen, Z.H., Chen, L.J., Zhu, A.N., Wu, Z.J., 2011. Surface soil phosphorus and phosphatase activities affected by tillage and crop residue input amounts. Plant Soil Environ., 6, 251–257.

Надійшла до редколегії 27.10.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Serii Biologiya, ekologiya

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 581.1.03+631.531.173

Автоматизована система реєстрації біоелектричних потенціалів

Д.В. Чернетченко, М.П. Моцний, Н.П. Боцьва, О.В. Єліна, М.М. Мілих

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Розроблено апаратно-програмний комплекс автоматизованої системи реєстрації біоелектричних потенціалів на базі USB-пристрою з подальшою обробкою оцифрованих сигналів на ПК. Запропоновано універсальну схему реєстрації біопотенціалів, яка дозволяє проводити експериментальні дослідження як в умовах окремого впливу на досліджуваний об'єкт холодової, теплової, фото- та електростимуляції, так і в умовах різноманітних комбінацій вказаних впливів. Клієнтська частина програми забезпечує візуалізацію, кількісний аналіз і збереження отриманих результатів у базі даних. Засобами комплексної автоматизованої системи зафіксовано біоелектричні потенціали листя кукурудзи у відповідь на теплові стимули. Охарактеризовано динаміку вказаних потенціалів, кількісно оцінено рівень потенціалів стабілізації. На базі отриманих експериментальних даних визначено параметри математичної моделі процесів генерації електричних імпульсів у клітині.

Ключові слова: реєстрація біоелектричних потенціалів; автоматизація фізичного експерименту; математична модель клітини; біопотенціали листя кукурудзи

Automated experiment for registration of bioelectrical potentials

D.V. Chernetchenko, M.P. Motsnyj, N.P. Botsva, O.V. Elina, M.M. Milykh

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

A hardware-software complex automated system of recording bioelectrical potentials, which is based on a USB-device with subsequent processing of signals with PC was developed in this work. We proposed a universal scheme of registration of bioelectrical potentials, which allows one to detect the reaction of biological objects to different stimuli, such as cold, heat, photo- and electrical stimulation, and to different combinations of these stimuli (Motsnyj et al., 2004). They could be applied for deeper understanding of the biological mechanisms of generation of electrical potentials in cells and discovering the accommodation processes of organisms as a whole to these stimuli. The system for registration of bioelectrical potentials consists of hardware and software parts. The software part consists of the client and server sides, which transmit experimental data to the network. The client-side software renders a quantitative analysis and stores the results in a database. An integrated system of registration and biometrical processing was applied for analysis of the electrical responses of maize leaves to heat stimuli. The dynamics of these potentials were studied and a quantitative analysis of the potential level stabilization was made. We found that amplitude relation of the potential response increased and stabilized at the level of 130%. Mathematical models of the plant cell for discovering intracellular mechanisms of biopotentials registration were developed. As a result of modeling, we found that the electrical response of the cells is based on selective conductance of the cell membrane for H^+ and K^+ ions. By this way, we show the biophysical relation of plant potentials to intracellular biophysical mechanisms.

Keywords: bioelectrical potentials registration; automatized physical experiment; mathematical cell model; maize leaves biopotentials

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,

пр. Гагаріна, 72, 49010, Дніпропетровськ, Україна

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin ave., 72, 49010, Dnipropetrovsk, Ukraine

Tel.: +38050-420-86-04. E-mail: rakon3@gmail.com

Вступ

Останніми роками в Україні зростає зацікавленість дослідників і практиків щодо вирощування рослин у штучних контрольованих умовах. Оптимізація кліматичних і енергетичних характеристик середовища у такому процесі потребує безперервного прижиттєвого контролю показників життєдіяльності рослин, який ускладнюється необхідністю уникнення їх можливих пошкоджень. За таких умов стають актуальними методи електрофізіологічної діагностики стану та розвитку рослин (Motsnyj et al., 2004). Електричне збудження та відповідь вищих рослин зазвичай пов'язані зі швидкими відповідями на зовнішній стимул (Davies, 2004). Останні досліді з електрогенезу рослин показують, що існує дуже велике різноманіття форм електричних відповідей (Fromm et al., 2007), навіть на стандартні зовнішні подразники: механічні, фото- чи теплові стимули. Сьогодні достатньо точно описаний електрогенез рослин: види їх електричної активності у відповідь на різні подразнення та роль клітинної мембрани у процесах генерації біоелектричних потенціалів (Davies, 1987; Davies, 2004). Але роль у внутрішньоклітинних процесах, міра та механізм їх впливу на динаміку біоелектричних реакцій окремих клітин в цілому розкриті недостатньо.

Теплові потенціали відповіді рослини зумовлені сильним локальним зменшенням концентрації CO_2 , який активно поглинається електронним мембранним транспортом (Kaziolek et al., 2004) фотосистеми II (PS II). Детальніше (Lautner et al., 2005) розглянуто відповіді на тепловий подразник *Populus trichocarpa*: встановлено, що сигнал залежить від наявності у клітинах рослини іонів кальцію. Як і потенціали дії клітин тварин, поширення електричних сигналів у рослинах відбувається завдяки іонним каналам. Іонні механізми збудливості клітин тварин зазвичай пов'язані з потоками іонів Na^+ та K^+ , у той час як для рослин головну роль при формуванні потенціалів дії відіграють іони Ca^{2+} , Cl^- та K^+ (Samejima and Sibaoka, 1980; Felle and Zimmermann, 2007). Транспорт H^+ крізь плазматичну мембрану також може відігравати важливу роль для потенціалів дії (Oprytov and Pyatygin, 2002; Vodeneev, Oprytov and Pyatygin, 2006) та їх розповсюдження. Під час нагрівання листка рослини спостерігалось електричне збудження, що супроводжується активними H^+ -потоками у плазматичній мембрані та розпадом P -тип H^+ -АТФ-ази (Stahlberg et al., 2006). Ензими клітинної стінки, плазматичної мембрани та цитоплазми змінюють активність під час локальних змін концентрації іонів (Davies, 1987). Внесок H^+ -потоків устанавлюють завдяки факту локального підкислювання цитоплазми клітини (Bulychev and Kamzolnikina 2006; Vodeneev et al., 2006) під час зростання потенціалів дії. Покладаючись на факти щодо іонної динаміки під час зростання електричного збудження клітин, можна побудувати еквівалентну математичну модель для детальнішого вивчення цих процесів, визначення внеску описаних електрохімічних механізмів у процес електрогенезу.

Опис динаміки електричних процесів на клітинному рівні після публікації відомої роботи А. Ходжкіна та А. Хакслі (Hodgkin and Huxley, 1952), де був започатко-

ваний такий підхід до нервової клітини, традиційно здійснюється із застосуванням методів моделювання. Розробка та перевірка адекватності подібної моделі для опису електродинаміки рослинної клітини потребують накопичення значного обсягу експериментальних даних, зокрема в умовах різних способів подразнення рослин і комбінацій таких подразнень.

Сучасні електронно-вимірювальні прилади здатні забезпечити реєстрацію біоелектричних потенціалів рослин як контактну, так і дистанційно, із високою чутливістю та малою інерційністю (Zhu, 2002). Але при цьому як для наукових досліджень, так і для виконання практичних завдань актуальною залишається комплексна автоматизація процесу реєстрації та обробки біопотенціалів із застосуванням сучасних комп'ютерних технологій (Hoppensteadt et al., 1986).

Мета цієї статті – розробити автоматизовану систему реєстрації та обробки біоелектричних потенціалів, описати процеси генерації електричних імпульсів у клітині в рамках математичної моделі.

Матеріал і методи досліджень

Схема системи реєстрації біоелектричних потенціалів (рис. 1) складається з таких модулів. Блок вимірювання (1) містить екрановану камеру для досліджуваного об'єкта та електроди ЕВЛ-ІМ, що не поляризуються. Блок реєстрації (2) забезпечує можливість одночасного надходження підсиленого сигналу на самописець Endim і на вхід пристрою оцифровки даних із подальшою обробкою у персональному комп'ютері. Для калібрування самописця застосовується підсилений сигнал синусоїдальної форми частотою 1 Гц від калібруатора. Оцифровка даних здійснюється двоканальним USB-осцилографом IRIS з частотою дискретизації 100 Гц, при цьому похибка вимірювань складала не більше 2% у будь-якому з досліджуваних діапазонів вхідного сигналу. USB-осцилограф дозволяє проводити вимірювання та запис сигналу протягом декількох десятків годин.

Термостимулятор (3), оснований на ефекті Пельтьє, забезпечує як режим охолодження, так і режим нагрівання стимульованої частини поверхні об'єкта (положення I і II перемикача К3 відповідно). Параметри імпульсу подразнення формуються реле часу та регулятором струму. За необхідності пристрій реєстрації може додатково фіксувати динаміку зміни температури на контактах термостимулятора (положення II перемикача К2).

Фотостимулятор (4) містить блок світлодіодів чотирьох кольорів: білого, синього ($\lambda = 470$ нм), зеленого ($\lambda = 540$ нм), червоного ($\lambda = 690$ нм). Для зменшення нагріву досліджуваного об'єкта під час фотостимуляції світлодіоди мають спеціальний інфрачервоний фільтр. Освітленість, створена діодами, регулюється силою струму в них, контролюється фотометром. Тривалість стимулу задається реле часу або при тривалій стимуляції в ручному режимі. Електростимулятор (5) забезпечує подачу на об'єкт електричного стимулу, амплітуда якого регулюється реостатом і вимірюється цифровим мікроамперметром, а тривалість формується реле часу.

Розроблена схема системи реєстрації є універсальною. Вона дозволяє проводити експериментальні дослідження біопотенціалів як в умовах окремого впливу на досліджуваний об'єкт холодової, теплової, фото- та електростимуляції, так і в умовах різноманітних комбінацій вказаних впливів. Обробка, аналіз і подальша візуалізація зареєстрованих у процесі експерименту

оцифрованих біопотенціалів проводяться оригінальними програмними засобами. Для поєднання USB-осцилографа з персональним комп'ютером розроблено універсальний драйвер пристрою. Окрема програма забезпечує автоматичне збереження у пам'яті отриманих у цифровому форматі через USB-порт ПК даних про динаміку зміни потенціалу у відповідних файлах формату *.dat.

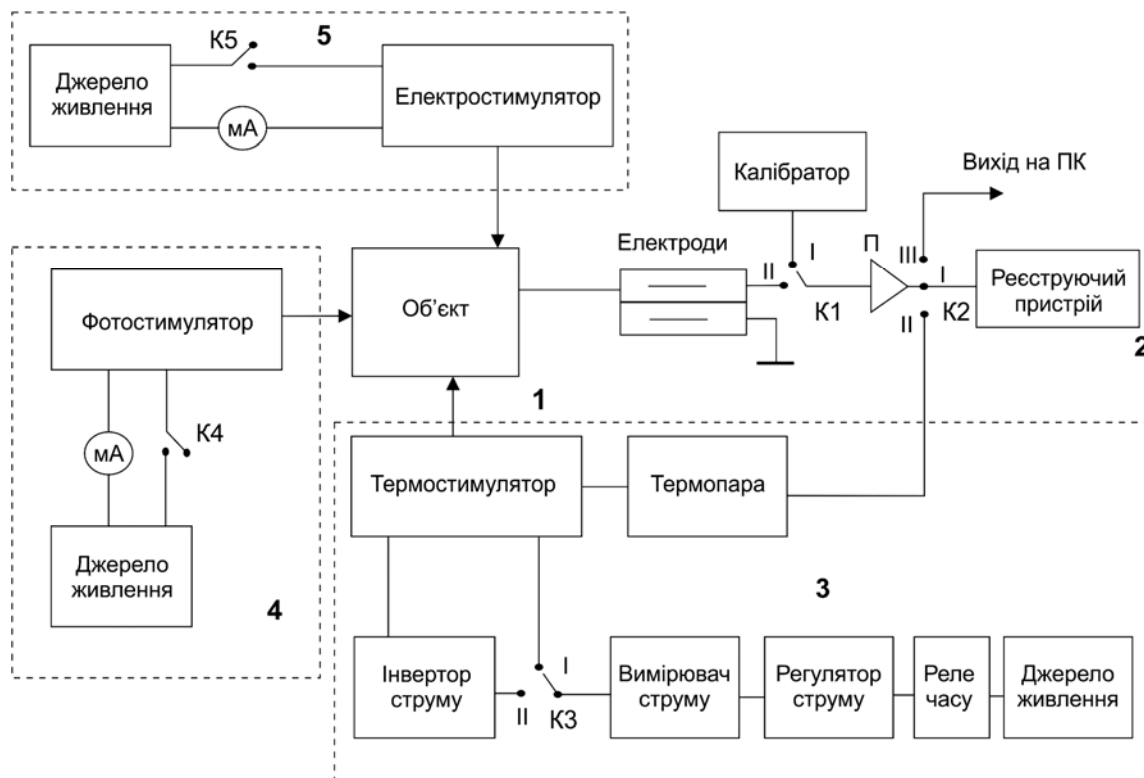


Рис. 1. Блок-схема системи реєстрації біоелектричних потенціалів:

1 – блок вимірювання, 2 – блок реєстрації, 3 – блок термостимуляції, 4 – блок фотостимуляції, 5 – блок електростимуляції, П – підсилювач, K1, K2, K3, K4, K5 – перемикачі

Клієнтська частина програмного забезпечення розроблена на базі візуального середовища програмування LabView (Ogren and Jones, 2006). У вікні клієнтської програми наводяться та кількісно аналізуються отримані дані. Програма також дозволяє визначати та зберігати у базі даних експерименту такі головні показники зареєстрованих сигналів як амплітуди піків холодних (теплотних або інших) потенціалів із відповідними часовими відмітками; відсоткові співвідношення амплітуд піків відведених потенціалів, що характеризують динаміку перебігу процесу; поточні налаштування часових і амплітудних параметрів для калібрування та кількісної оцінки отриманих сигналів і візуалізації шкал графічної залежності «потенціал – час».

Статистичний аналіз масивів отриманих даних та визначення параметрів математичної моделі проводиться з використанням математичного пакета Matlab.

Результати та їх обговорення

Випробування апаратного та програмного забезпечення розробленої автоматизованої системи реєстрації біоелектричних потенціалів проведена в експериментах із дослідження впливу холодних і теплових стимулів на

біоелектричну реакцію листя кукурудзи (Davies, 2004). При цьому здійснено як цифровий запис і програмну обробку зареєстрованих потенціалів, так і їх фіксацію на самописці для контролю та порівняння.

Запис біопотенціалів рослини у відповідь на ритмічне холодове подразнення («холодовий потенціал») без застосування згладжувального фільтра за даними з вікна клієнтської програми на ПК наведено на рис. 2 а. Підключення та налаштування програмно реалізованого фільтра зі змінними параметрами та згладжувального фільтра типу фільтра Баттерворта III порядку, які відсікають мережеві завади та випадкові високочастотні складові, дає змогу отримати більш чіткий та якісний сигнал (рис. 2 б, в), придатний для подальшої обробки.

Після налаштування фільтра запис електричних відповідей від електродів із поверхні рослини повторювали 15 разів для отримання заданої точності вимірів. За результатами окремих експериментів із вивчення теплового впливу, збережених у файлах бази даних, спеціальною програмою розробленого програмного комплексу розраховані необхідні значення та побудовано графік залежності відносної амплітуди потенціалу відповіді від інтервалу часу між першим і наступним тепловими стимулами

(рис. 3). Із часом відношення амплітуди послідовних відповідей до амплітуди першої відповіді на подразник значно зростає з поступовою стабілізацією на рівні 130%. Це свідчить про процес активації внутрішньоклітинних механізмів адаптації рослини до подразника. Стабілізація амплітуди під час стимуляції, ймовірно, пов'язана із значним (від 25 до 40 с) часом поновлення мембранного потенціалу після генерації попередньої відповіді.

Результати, отримані із застосуванням автоматизованого програмно-апаратного комплексу, у цілому добре узгоджуються з результатами попередніх експериментів

із реєстрації потенціалів листя кукурудзи під час термічної стимуляції, отриманими за допомогою лише аналогових пристроїв (Davies, 2004). Перевірка відповідності отриманих в експерименті та оброблених цифрових даних записам, одночасно зафіксованим самописцем, свідчить про високу точність роботи автоматизованої системи. Похибка, що накопичується через обмеження вимірального USB-пристрою та наявність зовнішніх завад, перебуває в допустимих межах (2–5 %) і практично не впливає на характеристики вихідного сигналу.

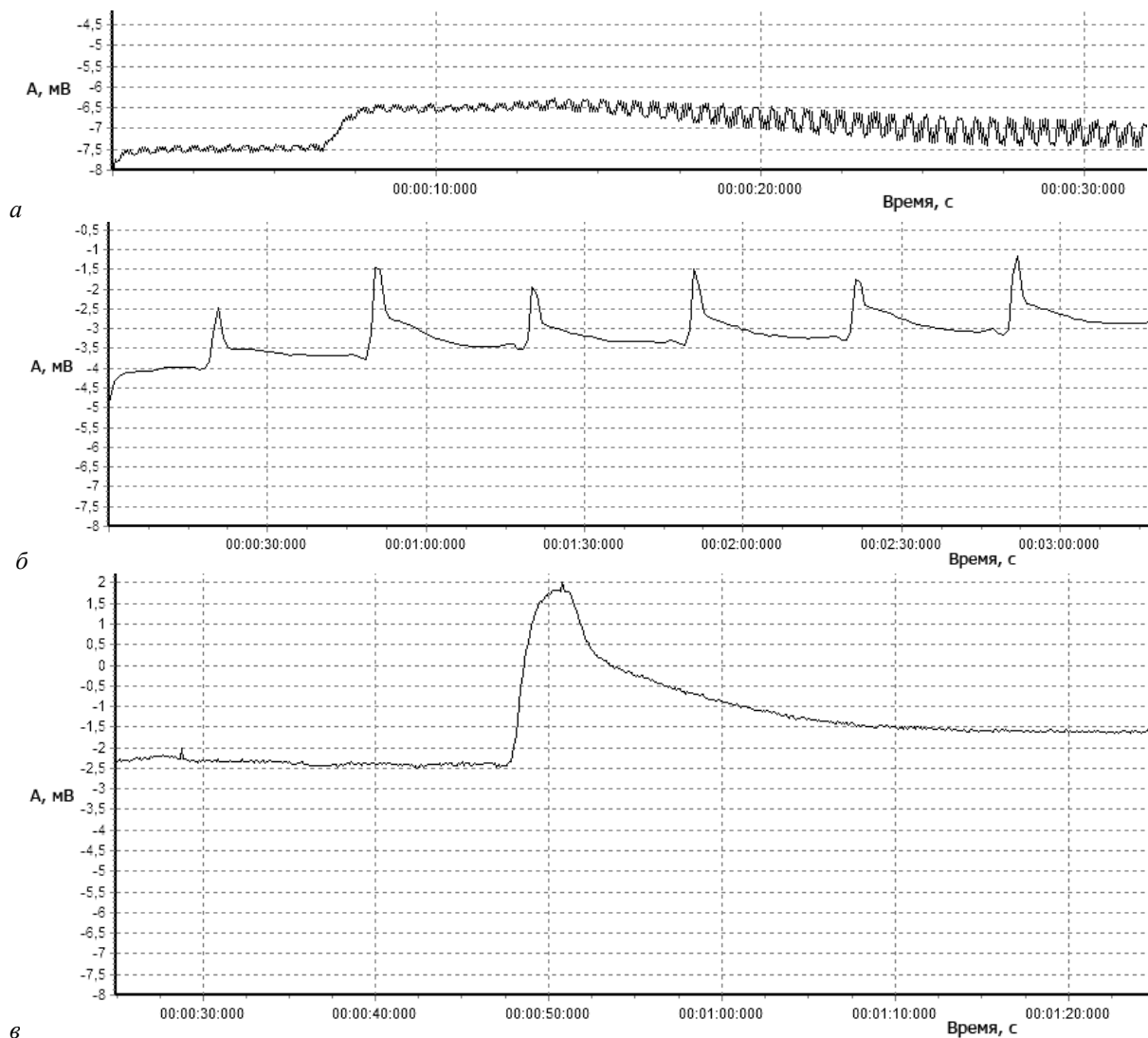


Рис. 2. Холодові потенціали під час ритмічної стимуляції:

а – без додаткової фільтрації сигналу, *б, в* – із застосуванням фільтрувальних засобів

Для аналізу можливих внутрішньоклітинних механізмів виникнення та динаміки зареєстрованих біоелектричних потенціалів розроблено модель клітини зі здатністю генерації активних електричних потенціалів. Для опису динаміки іонних струмів I_i та потенціалу на мембрані V_m на основі механізму Ходжкіна – Хакслі (Hodgkin and Huxley, 1952) запропоновано формулу:

$$I_i(V_m, t) = (V_m - E_i)g_i, \quad (1)$$

де E_i – потенціал рівноваги i -го іонного каналу, g_i – електрична провідність каналів, що визначаються за формулами:

$$g_i(V_m, t) = \bar{g}_i \varphi^\alpha x^\beta,$$

$$\varphi(V_m, t) = \frac{1}{\tau_\varphi} (\varphi_\infty - \varphi), \quad (2)$$

$$x(V_m, t) = \frac{1}{\tau_x} (x_\infty - x).$$

Функції $\varphi(t)$ та $x(t)$ описують швидкість реакції каналів та визначаються, як правило, методом сталого потенціалу на мембрані клітини. При цьому диференціальні рівняння (2) мають розв'язки:

$$\varphi(t) = \varphi_0 - [(\varphi_0 - \varphi_\infty)(1 - \exp(-t/\tau_\varphi))],$$

$$x(t) = x_0 - [(x_0 - x_\infty)(1 - \exp(-t/\tau_x))]. \quad (3)$$

Розроблене програмне забезпечення автоматизованої системи реєстрації потенціалів дозволяє визначати параметри моделі, що характеризують характер генерації потенціалу на мембрані клітини, у реальному часі у процесі експерименту із застосуванням апроксимації вхідних даних про динаміку змін електричного потенціалу.

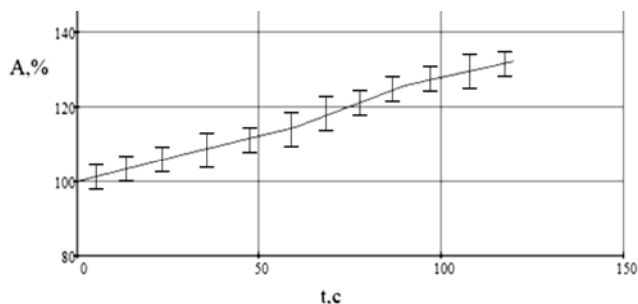


Рис. 3. Залежність амплітуди потенціалів листя кукурудзи від інтервалу часу між стимулами при ритмічній тепловій стимуляції:
по осі ординат – амплітуда стимулів
у відсотках до амплітуди першої відповіді

Сталі часу активації τ_φ та інактивації τ_x каналів для моделювання активності рослинної клітини обчислюються за експериментальними даними у середовищі математичного пакета Matlab, потім за формулами (2) розраховуються провідності іонних каналів активних клітин.

Для отриманих експериментальних залежностей провідності іонних каналів мають значення відповідно $g_1 = 32.455$ та $g_2 = 110.231$, які близькі до значень провідностей протонних каналів і каналів калію. Це достатньо достовірно вказує на походження зареєстрованих потенціалів. Періодичні осцилятивні відповіді, що спостерігалися в експериментах (рис. 2 а), є активною електричною відповіддю клітини на подразник потенціалами дії, в основі яких лежить взаємодія іонів H^+ та K^+ . Деяке відхилення розрахованих під час моделювання електричних провідностей від табличних значень для відповідних іонів спостерігається через наявність у клітині струмів інших типів, а також пасивного струму витоку іонів із клітини.

Висновки

Для підвищення ефективності методик електрофізіологічної діагностики стану та розвитку рослин під час безперервного прижиттєвого контролю показників їх фізіологічного стану актуальним є завдання комплексної автоматизації процесу реєстрації та обробки біопотенціалів із застосуванням сучасних комп'ютерних технологій. Розроблено універсальний апаратно-програмний комплекс реєстрації біоелектричних потенціалів на базі USB-пристрою з подальшою обробкою оцифрованих сигналів на ПК, який дозволяє проводити експериментальні дослідження як в умовах окремого впливу на

досліджуваний об'єкт холодової, теплової, фото- та електростимуляції, так і в умовах різноманітних комбінацій вказаних впливів. Оригінальні програмні засоби забезпечують фільтрацію від завад, візуалізацію, кількісний аналіз і збереження отриманих результатів у базі даних. Апробація апаратного та програмного забезпечення автоматизованої системи реєстрації біоелектричних потенціалів в експериментах із дослідження впливу холодкових і теплових стимулів на біоелектричну реакцію листя кукурудзи довела працездатність та високу точність розробленого вимірювального комплексу.

Засобами комплексної автоматизованої системи виконано реєстрацію та обробку біоелектричних потенціалів листя кукурудзи у відповідь на теплові стимули. За результатами кількісного аналізу динаміки отриманих потенціалів встановлено, що відношення амплітуди послідовних відповідей до амплітуди першої відповіді на подразник із часом значно зростає з поступовою стабілізацією на рівні 130%.

Для аналізу можливих внутрішньоклітинних механізмів виникнення та динаміки зареєстрованих біоелектричних потенціалів розроблено математичну модель клітини зі здатністю генерації активних електричних потенціалів. У результаті визначення параметрів моделі на базі отриманих експериментальних даних встановлено, що в основі електричної відповіді клітини лежить селективна зміна електричної провідності клітинної мембрани для іонів H^+ і K^+ . Таким чином показано зв'язок між потенціалами активності, що реєструвалися з поверхні рослини, та внутрішньоклітинними процесами.

Бібліографічні посилання

- Davies, E., 2004. New functions for electrical signals in plants. *New Phytol.* 161, 607–610.
- Davies, E., 1987. Action potentials as multifunctional signals in plants – a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ.* 10, 623–631.
- Eccles, J., 1966. *Physiology of synapses [Fiziologija sinapsov]*. Mir, Moscow (in Russian).
- Friesen, W.O., Friesen, J. A., 1994. *NeuroDynamix: Computer Models for Neurophysiology*. Oxford University Press, New York.
- Goldman, D.E., 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27, 37–60.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.
- Hoppensteadt, F.C., 1986. *An introduction to the mathematics of neurons*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hille, B., 2001. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Huguenard, J., McCormick, D.A., 1994. *Electrophysiology of the neuron: An interactive neuron*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Heldt, H.W., 1997. *Plant biochemistry & molecular biology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Koch, C., Segev, I., 1989. *Methods in neuronal modeling: From synapses to networks*. Bradford Book, The MIT Press., Cambridge, MA.
- Lysikov, V.N., 2001. Studying some features of maize genetics and developmental biology using electrophysiological tech-

- niques action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J. Exp. Bot.* 45(4), 463–469.
- Motsnyj, M.P., Elina, E.V., Vlasova, S.V., 2004. Issledovanie reakcii rastenij, vizvannoi ritmicheskoy stimulyaciei [The study plants responses induced by repetitive stimulation]. *Nauka ta Osvita, Odessa* 55, 37–38 (in Russian).
- Muyskens, M.A., Glass, S.V., Wietsma, T.W., Gray, T.M., Mark, A., 2007. Data acquisition in the chemistry laboratory using LabVIEW software. *J. Chem. Educ.* 73(12), 1112–1114.
- Ogren, P.J., Jones, T.P., Paul, J., 2006. Laboratory interfacing using the LabVIEW software package. *J. Chem. Educ.* 73(12), 1115–1116.
- Rosljakova, T.V., Molchan, O.V., Vasekina, A.V., Lazareva, E.M., Sokolik, A.I., Jurin, V.M., de Bur, A.H., Babakov, A.V., 2011. Soleustojchivost' jachmenja: Vzaimosvjaz' ekspressii izoform vakuoljarnogo Na^+/H^+ -antiportera s nakopleniem $^{22}Na^+$ [Salt tolerance of barley: The relationship isoform expression vacuolar Na^+/H^+ -antiporter with accumulation of $^{22}Na^+$]. *Fiziologija Rastenij* 58(1), 28–39 (in Russian).
- Roblin, G., 1985. Analysis of the variation potential induced by wounding in plants. *Plant Cell Physiol.* 26, 255–261.
- Rinzel, J., Ermentrout, G.B., 1989. Analysis of neural excitability and oscillations. MIT Press, Cambridge, MA.
- Stankovic, B., Witters, D.L., Zawadzki, T., Davies, E., 1998. Action potentials and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiol. Plantarum* 103, 51–58.
- Thiel, G., Homann, U., Plieth, C., 1997. Ion channel activity during the action potential in *Chara*: A new insight with new techniques. *J. Exp. Bot.* 48, 609–622.
- Thorsten, E.E., Rainer, M., Fromm, J., 2009. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant Cell Environ.* 32, 319–326.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 53, 247–273.

Надійшла до редколегії 12.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Serii Biologiya, ekologiya

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 630.5: 633.877

Лісівничо-таксаційний аналіз лісів Дніпропетровської області

С.А. Ситник¹, В.М. Ловинська¹, В.М. Величко²

¹Дніпропетровський державний аграрний університет, Дніпропетровськ, Україна

²Дніпропетровське обласне управління лісового та мисливського господарства

Наведено характеристику деревних насаджень лісів Дніпропетровської області, описано їх лісівничі особливості. Проаналізовано низку лісівничо-таксаційних показників деревостанів лісів Дніпропетровщини: розподіл за категоріями лісів, переважаючими породами, групами віку, поширення за типами лісу. Вказано на розбалансованість вікової структури лісових насаджень, на перевагу середньовікових та стиглих деревостанів. Наведено результати досліджень особливостей розподілу площ і запасів головних лісотвірних порід у різних у категоріях лісів. Обґрунтовано необхідність підтримання деревних насаджень лісових екосистем як таких, що мають значну екологічну й естетичну цінність.

Ключові слова: лісівничо-таксаційні показники деревостану; категорії лісів; тип лісу; вік деревостану; запас деревостану

Silvicultural and classificatory analysis of forests of Dnipropetrovsk region

S.A. Sytnik¹, V.M. Lovinska¹, V.M. Velichko²

¹Dnipropetrovsk State Agricultural University, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Regional department Forestry and Hunting Administration

The total forest area of Dnipropetrovsk Region is 198,600 ha, of which 90,800 ha, 45.7% of the total area, comes under the administration of the Forestry and Hunting Department of Dnipropetrovsk Region. 65,700 ha or 72.4% of the total surface of the area under the region's Forestry and Hunting Administration is actually covered by forest vegetation. The most prevalent types of forests in the territory of the Forestry and Hunting Department of Dnipropetrovsk Region (FHDDR) are SD₁H (dry pine-oak halogenic type), which takes up 13.1% of the forested area of Dnipropetrovsk region, D₁H (dry oak halogenic forest) – 11.6%, D₁BP (dry elm-maple-oak) – 10.7%, SB₁OP (dry oak-pine) – 7.6% D₂BP (mesophilous elm-maple-oak) – 7.8%, SD₁P (dry maple-pine-oak) – 6.5%. Forests of the region are classified under environmental, scientific, historical, cultural, recreational and health, protection (erosion control) designations. Forests classified as having conservation, scientific, historical and cultural significance cover an area of 13,410 ha (14.8%) of the area under Dnipropetrovsk Region's Forestry and Hunting Administration; recreational forests cover 45,841.5 ha (50.5%). One third of the forests under FHDDR are classified as protective forests. These are anti-erosion forests which cover an area of 31,478.5 ha (34.7%). Commercially exploitable forests do not exist in the region. According to forest regulations the total area protected by the Nature Reserve Fund of Ukraine subordinate to FHDDR is 12,952.6 ha. Objects of state importance are the Dnipro-Oril' Nature Reserve (3,759.4 ha), wildlife reserves (4,903.1 ha) and natural monuments (8,718.5 ha). Areas and sites of local importance include regional landscape parks (2,157.0 ha), wildlife reserves (1,730.0 ha), natural monuments (105.3 ha), park monuments of landscape architecture (208.0 ha), nature reserve boundaries (33.8 ha). The dominant species of conifer is the pine with a total stand area of 16,189.8 ha. The other hard-leaved types of tree are species of *Quercus* L. – 20,288.2 ha, *Robinia* L. – 17,639.9 ha, *Fraxinus* L. – 3,200.1 ha, *Acer* L. – 864.2 ha, *Ulmus* L. – 860.3 ha and *Gleditsia* L. – 172.9 ha. Soft-leaved species in the forests of Dnipropetrovsk region are represented by the following genera *Betula*, *Populus*, *Alnus*, *Tilia*, *Salix*. The predominant among the identified age groups of Dnipropetrovsk region are the middle-aged and mature stands which occupy

Дніпропетровський державний аграрний університет, вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ, 49600, Україна
Dnipropetrovsk State Agricultural University, Voroshylova Street, 25, Dnipropetrovsk, 49600, Ukraine
Tel.: +38050-944-84-02, +38066-559-54-63. E-mail: myrt74@mail.ru, glub@ukr.net

Дніпропетровське обласне управління лісового та мисливського господарства,
вул. Набережна Перемоги, 38, Дніпропетровськ, 49094, Україна
Dnipropetrovsk Regional Department of Forestry and Hunting Administration,
Naberezhnaya Pobedy Street, 38, Dnipropetrovsk, 49094, Ukraine
Tel.: +38067-649-89-46. E-mail: dnoulg_ohorona@dp.ukrtel.net

40.2% (26,392.5 ha) and 39.7% (26,076.1 ha) of the forest area respectively. The age structure of forests in Dnipropetrovsk region is very irregular, which indicates a great potential for further increase in the volume of reforestation. It is established that the largest area of the forest stands of environmental, scientific, historical and cultural significance is occupied by middle-aged (3,568.4 ha) and over mature (2,782.0 ha) stands with a total stock of 657.7 and 517.4 m³ per ha respectively. Stands of young-growth occupy the smallest area – 706.7 ha. Similarly in stands of recreational and health forests the largest area is occupied by middle-aged stands – 13,368.1 ha with a total stock of 2,550.8 m³ per ha. Middle aged trees occupy the largest area of protective forests – 9,456.0 ha (38.4%), of which the stands' stock is 1,782.0 m³ per ha.

Keywords: silvicultural; valuation characteristics of stand; the category of forests; forest type; stand age; stand stock

Вступ

Загальновідомим фактом є домінантна роль лісів у стабільності біосфери, тому особлива увага світової наукової спільноти спрямована на моніторинг стану лісових екосистем (Gold, 2006; Jung et al., 2013; James, 2013; O'Donoghue, 2013). Одним із ключових питань сьогодення залишається з'ясування ролі лісів у формуванні первинної продукції екосистем біосфери. При дослідженні таких складних питань першочерговим кроком є накопичення інформації про функціональні показники головних лісотвірних порід. Розробка нормативно-інформаційного забезпечення оцінки якісних та кількісних параметрів головних лісотвірних порід у деревостанах проводиться науковцями понад чверть століття (Madgwick, 1970; Davigneaud, 1971; Munro, 1973; Aldred, 1988; Bonan, 1992). Дослідження у цьому напрямі проводять у природних і штучних лісах різних географічних зон і континентів (Braumayer, 1998; Botkin, 1990; Broun, 1991; Bonan, 1992; Gold, 2006; Beets, 2011; Aakala, 2013; Korb, 2013).

На фоні екологізації досліджень у галузі лісового господарства України оцінка біопродуктивності лісів та визначення залежності даного показника від таксаційних характеристик деревостанів не лише дозволить вирішити екологічні та лісівничі питання регіонального та державного рівнів, а і надасть можливість внести свій вклад в інтеграцію держави до міжнародної спільноти. Виконання міжнародних зобов'язань у сфері лісового господарства щодо створення та ведення лісових кадастрів, лісової сертифікації потребує відповідної інформаційно-аналітичної підтримки.

Система лісгосподарського виробництва, що базується на засадах багатопільового використання лісових ресурсів, потребує достовірного нормативно-інформаційного забезпечення, за допомогою якого можна визначити ефективні інструменти щодо його ведення (James, 2013; Lakida, 1996, 2003). У сучасних умовах існує необхідність розробки нових екологічних підходів щодо стратегії та тактики ведення лісового господарства на принципах наближеного до природи лісівництва, яке повинно забезпечити раціональне використання лісових ресурсів, відтворення та охорону лісів. У виконанні прикладних завдань велика роль належить аналізу даних лісовпорядкування – джерелу інформації, яке характеризує стан лісового фонду. Особливо це важливо для степових районів України, де ліс – явище інтразональне, яке має переважно штучне походження.

Дослідження щодо комплексної характеристики лісів, складу головних і супутніх деревних порід, їх вікової структури та продуктивності деревостанів Дніпропетровської області відсутні, а оптимальне

ведення лісового господарства неможливе без аналізу сучасного стану деревних насаджень. Отже, мета цієї роботи – узагальнити лісівничо-таксаційні показники деревостанів лісового фонду, підпорядкованого Державному агентству лісових ресурсів України, що є у віданні Дніпропетровського обласного управління лісового та мисливського господарства (ДООУЛМГ).

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на території Дніпропетровської області, розташованій у південно-східній частині України, у басейні середньої та нижньої течії Дніпра (Gulchak, 2011). Територія області 31,97 тис. км², що складає 5,3% території держави. Протяжність території області з півночі на південь дорівнює 210 км, із заходу на схід – 340 км (Babichenko, 1982). Територія Дніпропетровської області характеризується хвилясто-рівнинним рельєфом. Правобережжя зайняте Придніпровською височиною із середніми висотами 100–150 м над рівнем моря. На крайньому півдні височина поступово переходить у Причорноморську низовину. Лівобережжя Дніпра зайняте Придніпровською низовиною, слабзорозчленованою рівниною, яку перетинають знижені долини річок Оріль і Самара. На крайньому південному сході області простягається Приазовська височина.

Значні відмінності у геоморфологічній структурі рельєфу зумовлюють розташування області в межах Північно-степової лісорослинної зони та зони Південного сухого степу за районуванням С.А. Генсірука (Hensiruk, 2002). Найбільша частина лісів зосереджена у північно-західній і центральній частині області. Лісові насадження природного походження в регіоні зосереджені на невеликих ділянках, розташовані, в основному, у заплавах і долинах річок Дніпро, Інгулець, Саксагань, Самара, Оріль, а також у ярах і балках.

Область поділяється на 22 адміністративні райони. Характерний високий рівень урбанізації, міське населення складає 83,4%. Територіальна концентрація промисловості в області удвічі перевищує середній рівень по Україні. Перевага в господарському комплексі промислового виробництва зумовила значне техногенне навантаження на її територію, що зумовлює значний антропогенний вплив на біотичну складову екосистем, у тому числі на природні та штучні ліси. У структурі Дніпропетровського обласного управління лісового та мисливського господарства (ДООУЛМГ) функціонують 8 державних підприємств – лісгоспів: Васильківський, Верхньодніпровський, Дніпродзержинський, Дніпропетровський, Криворізький, Марганецький, Новомосковський і Павлоградський.

Польовими дослідженнями охоплено всі наявні категорії лісів, підпорядковані ДООУЛМГ. Матеріали

базового лісовпорядкування слугували основою для проведення таксаційних розрахунків (Gulchak, 2011). Визначення типів лісу здійснене на засадах типологічних основ Алексєєва-Погребняка. Встановлення категорій лісів проводили згідно з «Порядком поділу лісів на категорії та виділення особливо захисних лісових ділянок», затвердженим постановою Кабінету Міністрів № 733 від 16.05.2007 р. (The procedure, 1995). Видовий склад деревостанів визначали за N.A. Kohn (1986). Облік об'єктів і територій природно-заповідного фонду здійснено на основі аналізу рішень Дніпропетровського облвиконкому (Gulchak, 2011). Розподіл вікової структури лісостанів і розрахунок продуктивності деревостанів за запасом деревини проводили за загальноприйнятими у лісовій таксації методиками (Girs, 2005).

Результати та їх обговорення

Аналіз матеріалів лісовпорядкування дозволив установити, що загальна площа лісового фонду Дніпропетровської області становить 198,6 тис. га, у тому числі підпорядковано Дніпропетровському обласному управлінню лісового та мисливського

господарства – 90,8 тис. га (45,7% площі лісів області). Вкриті лісовою рослинністю ділянки займають площу 65,7 тис. га (72,4% загальної площі, з яких лісові культури – 57,3%, насадження природного походження – 15,0%, лісові розсадники та плантації – 0,6%).

Для визначення режиму користування та ефективного ведення лісового господарства необхідне встановлення функціонального призначення лісу, що визначається його належністю до певної категорії.

Вимоги до поділу лісів на категорії, умови та ознаки віднесення їх до категорій лісів, а також виділення особливо захисних лісових ділянок із режимом обмеженого користування наведені в «Порядку поділу лісів на категорії та виділення особливо захисних лісових ділянок». Результати розподілу лісів ДООУЛМГ за відповідними категоріями наведено у таблиці 1. Згідно з критеріями даного нормативного документа ліси області віднесені до категорій природоохоронних, наукових, лісів історико-культурного призначення, рекреаційно-оздоровчих і захисних лісів. Категорія лісів природоохоронного, наукового, історико-культурного призначення займає площу в 13 410,0 га (14,8% загальної площі лісового фонду ДООУЛМГ).

Таблиця 1

Розподіл площ лісового фонду Дніпропетровського ОУЛМГ за категоріями лісів

Категорія лісів	Загальна площа, га	Площа вкритих лісовою рослинністю, га
Ліси природоохоронного, наукового, історико-культурного призначення		
Природні заповідники	3 759,4	1 574,3
Заповідні лісові урочища	33,8	33,8
Пам'ятки природи	369,3	277,0
Заказники	6 633,1	5 663,3
Ліси історико-культурного призначення	26,5	20,3
Ліси наукового призначення, включаючи генетичні резервати	451,0	421,3
Регіональні ландшафтні парки (зона регульованої рекреації)	2 157,0	1 768,3
Усього	13 430,1	9 758,3
Рекреаційно-оздоровчі ліси		
Ліси у межах населених пунктів	9 692,7	7 009,3
Ліси I і II поясів зон санітарної охорони джерел водопостачання	4 694,0	2 885,9
Лісопаркова частина лісів зелених зон	26 324,7	17 559,4
Лісогосподарська частина лісів зелених зон	5 130,1	3 847,9
Усього	45 841,5	31 302,5
Захисні ліси		
Ліси протиерозійні	31 478,5	24 612,4

Особливе значення мають рекреаційно-оздоровчі ліси, які виконують рекреаційну, санітарно-гігієнічну та оздоровчу функцію, використовуються для відпочинку населення, туризму, занять спортом, санаторно-курортного лікування. Зелені насадження в межах населених пунктів і зелені зони навколо великих промислових міст та інших населених пунктів досить ефективно очищають повітря від пилу та газів, поліпшують мікроклімат прилеглої території, є невід'ємною частиною архітектурно-декоративного комплексу кожного населеного пункту. Ліси, віднесені до категорії рекреаційних лісів, що перебувають у віданні ДООУЛМГ, займають площу 45 841,5 га (50,5%).

Третина площі лісів Дніпропетровщини зайняті лісами, віднесеними до категорії захисних – 31 478,5 га

(34,7%). Переважно це протиерозійні ліси, що попереджають ерозію ґрунту, затримують твердий стік. Для області актуальним є поєднання лісорозведення. За земельним балансом площа поєднання лісових смуг становить 42 802,6 га. В умовах степової зони захисні лісові смуги істотно впливають на ефективність агроценозів і забезпечують стабільне екологічне середовище. На рисунку 1 показано відносний розподіл площ за категоріями лісів. Експлуатаційні ліси на території області відсутні. Рубки головного користування в лісах області заборонені, проводяться лише рубки формування та оздоровлення лісів, спрямовані на вирощування господарсько-цінних насаджень.

Проаналізувавши рішення органів Державного управління у сфері охорони навколишнього природного

середовища та Дніпропетровської обласної ради, встановили, що у віданні Дніпропетровського ДООУЛМГ перебуває 12 952,6 га об'єктів природно-заповідного фонду. Об'єкти загальнодержавного значення представлені природним заповідником «Дніпровсько-Орільський» (3 759,4 га), заказниками (4 903,1 га),

пам'ятками природи (8 718,5 га). Території та об'єкти місцевого значення сформовані регіональними ландшафтними парками (2 157,0 га), заказниками (1 730,0 га), пам'ятками природи (105,3 га), парками-пам'ятками садово-паркового мистецтва (208,0 га), заповідними урочищами (33,8 га).

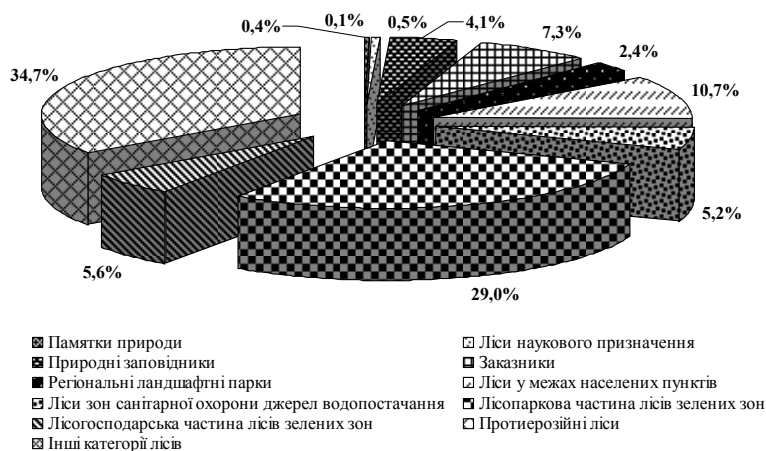


Рис. 1. Розподіл площ лісового фонду Дніпропетровського ДООУЛМГ за категоріями лісів

Ліси Дніпропетровщини сформовані типами лісу, класифікованими за принципами лісової типології Алексєєва-Погребняка. Найпоширенішими типами лісу є такі як С₁Г (суха судіброва галогенного типу) – 13,1% вкритих лісовою рослинністю площ, Д₁Г (сухий груд галогенного типу) – 11,6%, Д₁БКД (суха берестово-пакленова діброва) – 10,7%, В₁ДС (сухий дубово-сосновий субір) – 7,6%, Д₂БКД (свіжа берестово-пакленова діброва) – 7,8%, С₁КПД (суха пакленова судіброва) – 6,5%.

Сталість і стійкість лісових екосистем зумовлені їх біорізноманіттям. Аналіз видового складу головних деревних порід лісів досліджуваного регіону дозволив установити (рис. 2), що із хвойних порід переважаючою породою є *Pinus sylvestris* L., загальна площа насаджень якої становить 16 189,8 га. У незначній кількості із хвойних порід в лісах області представлені види роду *Picea* L. (1,1 га) та *Larix* Mill. (1,1 га).

Кількість видів і площа твердолистяних порід лісів Дніпропетровської області дещо більша – 42 925,6 га. Найбільше із даного типу порід представлено види роду *Quercus* L. (високо- та низькостовбурний) – 20 288,2 га,

Robinia L. – 17 639,9, *Fraxinus* L. – 3 200,1, *Acer* L. – 864,2, *Ulmus* L. – 860,3 та *Gleditsia* L. – 172,9 га.

М'яколистяні породи лісів Дніпропетровської області представлені видами родів *Betula*, *Populus*, *Alnus*, *Tilia*, *Salix*. Найбільшу площу із названих деревних порід із групи м'яколистяних займають види роду тополя – 4 013,6 га, друге місце посідають деревовидні верби – 679,4 га, у значно меншій кількості представлені рослини береза (34,1 га), осика (60,4 га) та вільха (26,5 га).

За даними вивчення видового різноманіття деревних порід, інші деревні породи (*Armeniaca vulgaris* L., *Phellodendron amurense* Rupr., *Prunus padus* L., *Juglans regia* L., *Sorbus aucuparia* L., *Pyrus communis* L., *Morus nigra* L., *Malus silvestris* Mill.) та чагарники (бузина, верби, глід, дерен, жимолость, карагана, ліщина, маслинка, обліпіха, скумпія, шипшина, ялівці) у регіоні досліджень займають відповідно площі 602,4 га та 1089,5 га.

Виявлені головні породи, що формують найбільші площі деревостанів області – *Quercus robur* L. (30,7%), *Robinia pseudoacacia* L. (26,9%), *Pinus sylvestris* L. (24,6%). Відносний розподіл їх площ у лісостанах державних підприємств ДООУЛМГ наведено на рисунку 3.

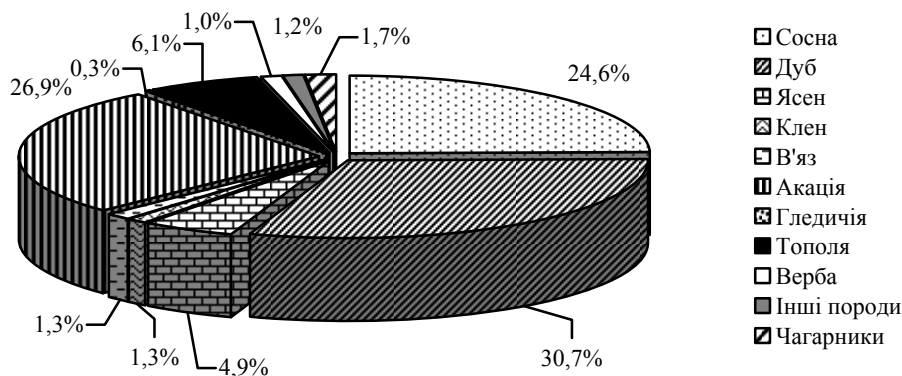


Рис. 2. Розподіл вкритих лісовою рослинністю лісових ділянок за переважаючими породами

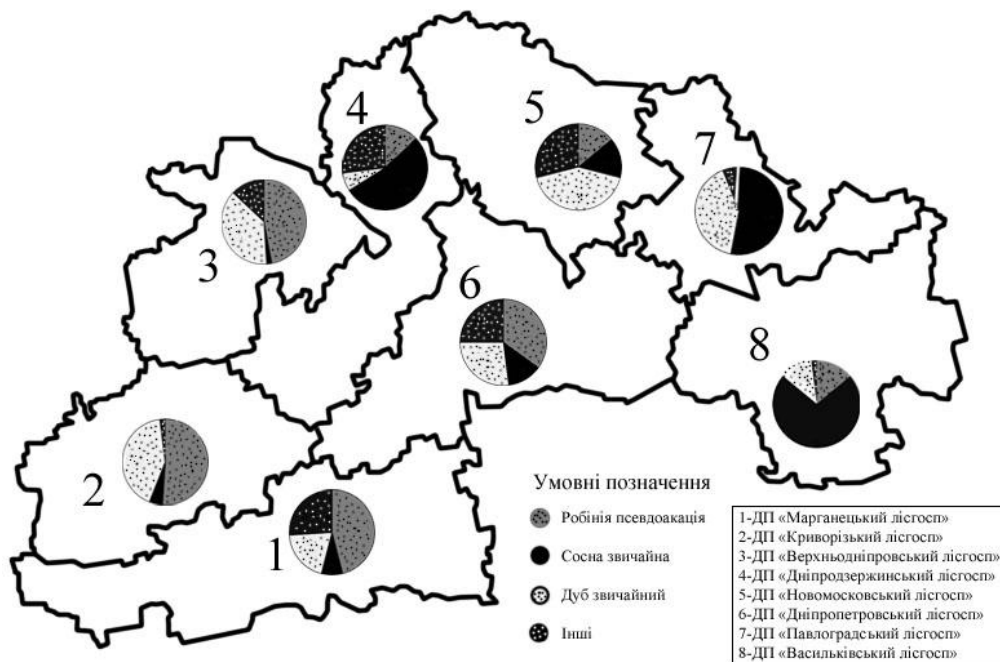


Рис. 3. Розподіл площ деревостанів головних лісотвірних порід за лісгоспами ДОУЛМГ

Сосна звичайна найбільше представлена у Васильківському лісгоспі (на 72% площі, вкритої лісовою рослинністю), найменше (2%) – у Верхньодніпровському лісгоспі. Найбільша площа, зайнята деревостанами дуба звичайного, представлена у ДП «Новомосковський лісгосп» (42%), найменша (7%) – у ДП «Криворізький лісгосп»; акації білої найбільше (51%) у Криворізькому, найменше (13%) – у Дніпродзержинському лісгоспі, а у Павлоградському лісгоспі дана порода взагалі відсутня.

Аналіз розподілу вкритих лісовою рослинністю площ Дніпропетровської області за віковими групами деревних порід дозволив установити наявність усіх вікових структур у лісах регіону: молодняків I та II класів, середньовікових, пристигаючих та стиглих (із перестійними) деревостанів. Середній вік хвойних деревостанів Дніпропетровської області становить 44 роки (зокрема, і для сосни), твердолистяних – 54 роки та м'яколистяних – 51 рік. Переважаючими з визначених груп є середньовікові та стиглі деревостани – 40,2% (26 392,5 га) та 39,7% (26 076,1 га) відповідно. Незначна частка (5,7 %) лісових площ зайнята пристигаючими деревостанами, а 14,4% (9 425,3 га) припадає на молодняки (рис. 4).

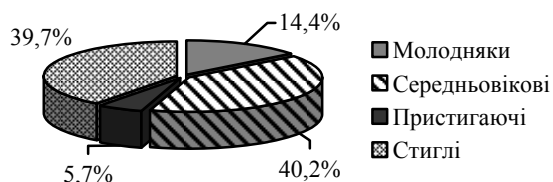


Рис. 4. Розподіл площ головних порід за групами віку

Вікова структура лісового фонду Дніпропетровської області досить нерівномірна, що вказує на потенційні можливості збільшення подальших обсягів відновлення лісових насаджень. Слід зазначити, що одним із

пріоритетних напрямів ведення лісового господарства Дніпропетровської області повинна стати робота над поліпшенням вікової структури деревостанів головних порід, зокрема, таких як сосна та дуб.

Вирішення таких прикладних питань як установлення форм господарства, стиглості лісу та віку рубки, вибір деревних порід для відтворення лісу, способів здійснення рубок догляду та їх інтенсивності, залежить від ступеня пізнання закономірностей росту та формування продуктивності деревостанів.

Важливим показником стану лісів, із погляду довгострокової перспективи їх використання, є вікова структура – розподіл насаджень лісів за групами віку та показники продуктивності. Нами здійснено розподіл площі, вкритої лісовою рослинністю, за віковими групами та проведено розрахунок загального запасу деревини відповідних груп віку в наявних категоріях лісів (табл. 2).

Площі лісів за категоріями розподілені таким чином: ліси природоохоронного, наукового, історико-культурного призначення – 9 758,3 га (14,9% площі, вкритої лісовою рослинністю), рекреаційно-оздоровчі – 31 302,5 га (47,7%), захисні – 24 612,4 га (37,4%).

Ґрунтуючись на тезі, що економічно найвигідніший рівномірний розподіл площ насаджень за групами віку, отримані результати дозволяють констатувати, що наявні всі вікові групи (молодняки, середньовікові, пристигаючі та стиглі), але наявний нерівномірний розподіл площ за цими групами.

Аналізуючи розподіл площ деревостанів лісів природоохоронного, наукового та історико-культурного призначення, встановили, що найбільшу площу займають середньовікові дерева – 3568,4 га (36,6%) зі загальним запасом деревостанів у 657,66 тис. м³. Зазначимо, що значну площу займають перестійні екземпляри – 2782,0 га (28,5%), запас деревостанів яких оцінено в 517,38 тис. м³.

**Розподіл площ, укритих лісовою рослинністю, за групами віку в розрізі категорій лісів
(чисельник – площа, га; знаменник – загальний запас деревостанів, тис. м³)**

Група віку	Ліси природоохоронного, наукового, історико-культурного призначення	Рекреаційно-оздоровчі ліси	Захисні ліси
Молодняки I вікової групи	<u>140,6</u> 3,1	<u>1 017,5</u> 27,8	<u>708,4</u> 24,4
Молодняки II вікової групи	<u>566,1</u> 58,5	<u>4 290,2</u> 462,8	<u>2 702,5</u> 248,8
Середньовікові	<u>3 568,4</u> 657,7	<u>13 368,1</u> 2 550,8	<u>9 456,0</u> 1 782,0
Пристиглі	<u>1 385,0</u> 316,3	<u>929,4</u> 128,2	<u>1 464,9</u> 279,9
Стиглі	<u>1 316,2</u> 247,4	<u>2 618,7</u> 408,1	<u>3 564,1</u> 594,8
Перестійні	<u>2 782,0</u> 517,4	<u>9 078,6</u> 1 845,4	<u>6 716,5</u> 1 211,5
Усього	<u>9 758,3</u> 1 800,3	<u>31 302,5</u> 5 423,1	<u>24 612,4</u> 4 141,5

Вікова група молодняків представлена незначно, вона займає найменшу площу – 706,7 га (7,24%), з яких на площі 140,6 га зростають молодняки I групи віку. Площа, зайнята молодняками II групи віку, вчетверо перевищує площу I групи – 566,1 га. Загальний запас деревостанів для вікової групи молодняків складає 61,61 тис. м³.

Пристиглі та стиглі деревостани в лісах природоохоронного, наукового та історико-культурного призначення займають майже однакові площі (1 385,0 та 1 316,2 га, відповідно), але характеризуються різним ступенем продуктивності, зумовленим відмінностями у значеннях запасу деревостанів. Група пристиглих деревостанів має більший запас (316,31 тис. м³), ніж стиглих (247,37 тис. м³).

У деревостанах лісів рекреаційно-оздоровчого призначення виявлено усі вікові групи деревних порід. Найбільшу площу деревостанів займають середньовікові дерева – 13 368,1 га (42,7%) зі загальним запасом деревостанів у 2 550,81 тис. м³. Третину площі займають перестійні дерева – 9 078,6 га (30,5%), продуктивність яких становить 1 845,38 тис. м³. Молодняки представлені на площі 5 307,7 га (16,9%), загальний запас їх деревостанів оцінено в 490,59 тис. м³. Стиглі деревостани функціонують на площі – 2 618,7 га (8,3%). Запас деревостанів для даної вікової групи становить 408,13 тис. м³.

Загальна площа захисних лісів дорівнює 24 612,4 га. На підставі обрахунку загального запасу деревини, продуктивність деревостанів цих лісів оцінено в 4 141,49 тис. м³. Найбільшу площу у захисних лісах займають середньовікові дерева – 9 456,0 га (38,4%), запас деревостанів яких становить 1 782,04 м³.

Вікова група молодняків представлена на незначній площі – 3 410,9 га (13,9%), з яких на площі 708,4 га зростають молодняки I групи віку. Площа, зайнята молодняками II групи віку, майже вчетверо перевищує площу I групи – 2 702,5 га. Запас деревостанів для цієї групи становить 273,23 тис. м³. Чверть площі захисних лісів (24,9 %) займають перестійні екземпляри, запас деревостанів яких оцінюється 1 211,52 тис. м³.

Висновки

Переважають ліси Дніпропетровщини належать до категорій рекреаційних (50,5%) і захисних (34,7%). Експлуатаційні ліси у досліджуваному регіоні відсутні. Лісові масиви Дніпропетровщини мають велике водоохоронне та ґрунтозахисне значення, виконують рекреаційні, санітарно-оздоровчі, гігієнічні, естетичні, природоохоронні функції. Основними типами лісів Дніпропетровської області є С₁Г (13,1%), Д₁Г (11,6%) та Д₁БКД (10,7%). Із хвойних порід переважаючою породою Дніпропетровської області є сосна звичайна (16 189,8 га), із твердолистяних – дуб (20 288,2 га) та акація (17 639,9 га). Вікова структура лісового фонду Дніпропетровської області досить нерівномірна, переважають середньовікові (40,2%) та стиглі (39,7%) вікові групи деревостанів. Незначна частка (5,7%) лісових площ зайнята пристигаючими деревостанами, 14,4% припадає на молодняки.

У лісах природоохоронного, наукового та історико-культурного призначення, рекреаційно-оздоровчих і захисних лісах найбільшу площу займають середньовікові деревостани, відносний розподіл яких дорівнює 36,6%, 42,7% та 38,4%, відповідно. В усіх аналізованих категоріях лісів виявлено недостатню представленість вікових груп молодняків та значні площі, зайняті перестійними деревами головних порід, що свідчить про відсутність оптимального розподілу вікової структури деревостанів і є підставою для проведення лісгосподарських заходів.

Бібліографічні посилання

- Aakala, T., Fraver, S., D'Amato, A.W., Palik, B.J., 2013. Influence of competition and age on tree growth in structurally complex old-growth forests in northern Minnesota, USA. For. Ecol. Manage. 308, 128–135.
- Aldred, A.H., Alemdag, I.S., 1988. Guidelines for forest biomass inventory. Inform. Rep. PI-X-77. Petawawa Nat. For. Inst., Can. For. Serv., 134.

- Babichenko, V.N. (ed.), 1982. Klimat Dnipropetrovska [Climate of Dnipropetrovsk]. Gidrometeoizdat (in Ukrainian).
- Beets, P.N., Brandon, A.M., Goulding, C.J., Kimberley, M.O., Paul, T.S.H., Searles, N., 2011. The inventory of carbon stock in New Zealand's post-1989 planted forest for reporting under the Kyoto protocol. *For. Ecol. Manage.* 262(6), 1119–1130.
- Bonan, G.B., 1992. Assimilation analysis of environmental factors and ecological processes in North American boreal forests. A system analysis of global boreal forests. Cambridge University Press, Cambridge. P. 404–427.
- Botkin, D.B., Simpson, L.G., 1990. Biomass of the North American boreal forest. *Biogeochemistry* 9(2), 161–174.
- Braymayer, A.I., Berg, B., Gower, S.T., Johnson, D., 1998. Carbon budget. Temperate conifer forests. Global change: Effects on coniferous forests and grasslands. *Repot* 56, 41–69.
- Broun, S., Gillespie, F., Ludo, A., 1991. Biomass of tropical forests of South and Southeast Asia. *Can. J. For. Res.* 21(4), 195–209.
- Davigneaud, P. (ed.), 1971. Productivity of forest ecosystems. Proc. Brussels Symp. Unesco and IBP 27–31 Oct. 1969. Paris, Unesco.
- Girs, A., Novak, B., Kashpor, S., 2005. Lisovporjadkuvannja [Forest management]. Handbook. 2-nd edition, Aristey, Kyiv (in Ukrainian).
- Gold, S., Korotkov, A., Volker, S., 2006. The development of European forest resources, 1950 to 2000. *Forest Policy Econ.* 8(2), 183–192.
- Gulchak, V.P. (ed.), 2011. The main provisions of forest organization and management of Dnipropetrovsk region [Osnovni polozhennja organizacii i rozvytku lisovogo gospodarstva Dnipropetrovs'koi oblasti]. Irpen (in Ukrainian).
- Hensiruk, S.A., 2002. Forests of Ukraine [Lisy Ukrai'ny]. Science Association Taras Shevchenko, USFU, Lviv (in Ukrainian).
- Instrukcija z vporjadkuvannja lisovogo fondu Ukrai'ny [Instruction of setup of Forest Fund Ukraine]. Ukrainian State Forest Project, Irpen, 2006 (in Ukrainian).
- Jung, J., Kim, S., Hong, S., Kim, K., Kim, E., Im, J., Heo, J., 2013. Effects of national forest inventory plot location error on forest carbon stock estimation using k-nearest neighbor algorithm. *ISPRS J. Photogramm.* 81, 82–92.
- Kohn, N.A. (ed.), 1986. Trees and shrubs cultivated in the Ukrainian SSR Reference book USSR [Derev'ja i kustarniki, kul'tiviruemye v Ukrainskoj SSR]. Naukova Dumka, Kyiv (in Russian).
- Korb, J.E., Fulé, P.Z., Wu, R., 2013. Variability of warm/dry mixed conifer forests in southwestern Colorado, USA: Implications for ecological restoration. *For. Ecol. Manage.* 304, 182–191.
- Lakida, P.I., 1996. Forest phytomass estimation for Ukraine. WP-96. Laxenburg, IIASA.
- Lakida, P.I., 2003. Phytomass of Ukrainian forests [Fitomasa lisiv Ukrai'ny]. Sbruch, Ternopil (in Ukrainian).
- Madgwick, H.A.I., 1970. Biomass and productivity models of forest canopies. Ecological studies: Analysis and synthesis. 4. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin. 1. Analysis of temperate forest ecosystems, 47–54.
- Munro, D.D., 1973. Forest growth models – a prognosis. Growth models for tree and stand simulation. Stockholm, 7–19.
- O'Donoghue, A., Shackleton, C.M., 2013. Current and potential carbon stocks of trees in urban parking lots in towns of the Eastern Cape, South Africa. *Urban For. Urban Gree.* 12(4), 443–449.
- Rohner, B., Bugmann, H., Bigler, C., 2013. Towards non-destructive estimation of tree age. *For. Ecol. Manage.* 304, 286–295.
- The procedure of division of forests on category and determination of protective forest areas [Porjadok podilu lisiv na kategorii ta vydilennja osoblyvo zahysnyh lisovyh diljanok] / Cabinet of Ministers of Ukraine from 27.07.1995 No 733. (in Ukrainian).
- Westfall, J.A., Morin, R.S., 2013. A cover-based method to assess forest characteristics using inventory data and GIS. *For. Ecol. Manage.* 298, 93–100.

Надійшла до редколегії 19.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 504.42(262.54):597.556.333.1

Особливості плодючості бичка кругляка (*Neogobius melanostomus*) за різних екологічних умов

М.Ю. Ткаченко

Таврійський державний агротехнологічний університет, Мелітополь, Україна

Наводиться порівняльний аналіз абсолютної та відносної плодючості бичка кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814)) з Каховського водосховища та Азовського моря. Абсолютна плодючість у морі склала 3 395, у водосховищі – 2 053 ооцити. Різниця за стадіями зрілості статевих продуктів між рибами з досліджуваних водойм – від 200 до 1 000 шт. Визначено залежність плодючості бичка кругляка від маси тіла, довжини та віку самиць. Кореляційний аналіз залежності плодючості від довжини особин у Каховському водосховищі склав 0,81, а в Азовському морі – 0,62. Такий розподіл відмічений залежно від маси риб: для Азовського моря – 0,63, для Каховського водосховища – 0,74. Наведений порівняльний аналіз показників плодючості в історичному розрізі показав відмінності між нашими та 40-річними даними: як для Азовського моря (в усі періоди), так і для Каховського водосховища. Різниця складає від 800 до 1 000 ооцитів у всіх розмірно-масових групах. Зменшення кількості ооцитів відмічене у риб із Каховського водосховища як за показниками абсолютної та відносної плодючості, так і за віковими групами.

Ключові слова: Азовське море; Каховське водосховище; бичок кругляк; відносна та абсолютна плодючість; ооцити

The specificities of round goby fecundity (*Neogobius melanostomus*) in different ecological conditions

M. Tkachenko

Tavria State Agrotechnological University, Melitopol, Ukraine

We conducted a comparative analysis of the absolute and relative fecundity of round goby (*Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814)) females in the Kakhovskyy Reservoir and the Azov Sea. We analysed the indicators of salinity, pH and oxygen levels in the waterbodies investigated. We determined the dependence of fertility of round gobies on body weight, length and age. This article presents the results of a comparative analysis with the works of other authors, including the results of a similar study conducted 40-years ago. We conducted cameral processing of the results by standard methodology. We counted the oocytes at varying stages of maturity. All oocytes were grouped by their diameter. We visually identified four groups of oocytes: 1700–2500 mkm – the large, mature oocytes (IV stage of maturity); 400–1200 mkm – light yellow oocytes, which are ripening (III stage); 100–300 mkm (II stage) whitish eggs, and the smallest (I stage) – up to 100 mkm. Stages II–IV were subjected to statistical processing. The differences between the indicators of fertility of fishes from saltwater and freshwater waterbodies show an increase in the relative and the absolute fecundity of fishes from the sea (saltwater) and decrease in the fecundity of the fishes in freshwater. The correlation analysis between the waterbodies and the length of the fishes showed 0.81 at the Kakhovskyy Reservoir and 0.62 in the Azov Sea. The correlation analysis between the same waterbodies and the weight of the fishes was 0.63 and 0.74 respectively. This could indicate that conditions for the fishes' existence were more favourable in the sea. The comparison analysis between our data and the 40-year old data for the Azov Sea depending on length and weight show a significant increase in oocyte numbers. This increase was noted for all size groups of fish. Nevertheless, the greatest differences were between fish in the Azov Sea (all data) and those in the Kakhovskyy Reservoir. These results should be studied in the context of the nutrition spectrum and calorific objects of the round goby in these water bodies. It would be interesting to analyse data on gobies of the Azov Sea according to gradation in salinity levels.

Keywords: the Azov Sea; Kakhovskyy reservoir; *Neogobius melanostomus*; round goby; absolute and relative fecundity; oocyte

Таврійський державний агротехнологічний університет, пр. Богдана Хмельницького, 18, 72312, Мелітополь, Україна
Tavria State Agrotechnological University, Khmelnytskyi Ave., 18, 72312, Melitopol, Ukraine
Tel.: +38097-821-05-71. E-mail: tkachenkomaria@mail.ru

Вступ

У зв'язку з поширенням бичка кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas, 1984)) за межі свого ареалу у водойми, що суттєво різняться за гідроекологічними умовами, виникає необхідність дослідження особливостей його плодючості. Воно є актуальним, зокрема, при розгляді механізмів мінливості та динаміки чисельності виду при зміні умов середовища. Вивчення біології виду доцільне в контексті розширення його ареалу та адаптації до мешкання в нових гідроекосистемах. У сучасних умовах бичок кругляк інтенсивно заселяє водойми Північної Америки та Європи: річки Детройт, Сент Клер, Великі Озера (США) (Nolte, 2011; Gutowsky and Fox, 2012), Шельда (Бельгія), Сава (Хорватія), Дунай (Болгарія, Хорватія) (Verreycken et al., 2011; Piria et al., 2011; Polačik et al., 2012), затоку Гданськ (Польща) (Sapota, 2012) та інші. Проводяться дослідження процесу поширення бичка в цих і суміжних водоймах, адже він є конкурентоспроможним відносно інших видів завдяки широкому діапазону пристосувальних можливостей. Особливо важливим є вивчення конкурентних взаємовідносин з іншими аборигенними видами у « водоймах-реципієнтах » (Ray and Corkum, 2001).

Бичок кругляк має відносно невисокі показники плодючості (2500–3500 шт.), яка коливається залежно від умов існування (Kulikova and Fandeyeva, 1975). У більшості праць відображене питання порівняння абсолютної індивідуальної плодючості декількох видів бичків (Mikhman, 1960), а також її залежність від маси та розмірів тіла самиці переважно морських акваторій Азово-Чорноморського басейну (Moskvin, 1940; Mikhman, 1963; Kovtun, 1977). На жаль, у них відсутній аналіз цього показника для прісноводних водойм. Тому за мету нашої роботи обрано дослідження мінливості плодючості бичка кругляка із прісних і морських водойм. Для її досягнення необхідно визначити абсолютну та відносну плодючість бичка кругляка за різних екологічних умов, різних вікових груп, установити залежність плодючості виду від розмірів та маси тіла самиць.

Матеріал і методи досліджень

До аналізу залучали особини із заток Азовського моря (Обитічна, Таганрозька, Білосарайська) та з Каховського водосховища (поблизу с. Скельки), які були відібрані упродовж травня – початку червня 2011–2012 рр. Для аналізу ястики фіксували у 70% розчині етилового спирту. Загалом проаналізовано 84 особини бичка кругляка, для яких проведено повний біологічний аналіз: визначали загальну промислову довжину (SL), вік і масу (загальна та маса тушки). Опрацьовано понад 100 тис. ооцитів. Стадії зрілості гонад визначали візуально за шестибальною шкалою. Відносна плодючість розрахована як для загальної маси особин, так і для маси тушки без внутрішніх органів. Такий підхід зумовлений тим, що, як свідчать деякі автори (Yoganzen, Zagorodnaya, 1951), це може дати хибні результати через наповненість кишечника їжею. У кожній порції визначали розміри 10–15 ікринок представлених розмірних

груп. Діаметр ооцитів вимірювали за допомогою окуляр-мікрометра на біокулярі МБС-10. До аналізу залучалися ікринки всіх груп, окрім найменшої – 0,05 мм. Статистична обробка проводилася за допомогою пакета аналізу Microsoft Excel 2010. Достовірність відмінностей вибірок визначали за критерієм Стюдента.

Результати та їх обговорення

Бичок кругляк належить до видів з асинхронним вітелогенезом, для яких характерний порційний тип ікротетання (Smirnov, 1986). За нашими даними, у ястках чітко відмічалися ооцити різних стадій зрілості, що властиво для даного виду, на чому наголошували також інші автори (Kulikova and Fandeyeva, 1975; Mikhman, 1963). За розмірами та зовнішнім виглядом ооцити були поділені на чотири групи: 1700–2500 мкм – крупні, зрілі ооцити (IV стадія зрілості), 400–1200 мкм – світло-жовті ооцити, що перебувають на стадії дозрівання (III стадія), 100–300 мкм (II стадія) білуваті ікринки, до 100 мкм – найчастіше прикріплені до стінок ястків, а також ті, що оточують більш зрілі ооцити (рис. 1).

Традиційно при аналізі плодючості використовують показники абсолютної та відносної плодючості, оскільки вони найчіткіше демонструють як загальну кількість ооцитів, так і стан особин в умовах їх існування. Порівняльний аналіз показників абсолютної плодючості показав суттєву відмінність у бичка різних водойм (рис. 2). Так, у особин з Азовського моря ці значення є більшими (3395 шт.), ніж у особин із Каховського водосховища (2053 шт.).

Оскільки бичок кругляк має порційний нерест, важливе визначення його абсолютної плодючості за стадіями зрілості. Рівень високої індивідуальної плодючості у риб із моря досягається за рахунок II стадії, яка складає 49%, III та IV стадій – 35% та 26% відповідно. У Каховському водосховищі також найбільше ооцитів II стадії зрілості (45%), III та IV стадії складають 41% та 32% відповідно (табл. 1).

За результатами дослідження встановлено залежність відносної плодючості від довжини тіла для риб з Азовського моря та Каховського водосховища (табл. 2). За даними деяких авторів (Nikol'skiy, 1974), відносна плодючість характеризує стан організму особин та якість статевих продуктів. Відносна плодючість досліджених особин показала дещо більші значення в Азовському морі порівняно з рибами з Каховського водосховища для більшості розмірних груп. На нашу думку, це може свідчити про сприятливіші умови існування в морі порівняно з водосховищем (табл. 2).

Вважається, що плодючість риб прямо пропорційна масі тіла самиці (Nikol'skiy, 1974). Залежність плодючості самок від маси тіла показала поступове збільшення плодючості у особин з обох водойм, але у особин з Азовського моря вона є більшою (рис. 3). Порівнюючи залежність плодючості бичка кругляка від довжини тіла особин, слід відзначити її поступове збільшення у кожній розмірній групі. Коефіцієнт кореляції у Каховському водосховищі склав 0,81, а в Азовському морі – 0,62. У Каховському водосховищі цей показник більш вирівняний, ніж у Азовському морі.

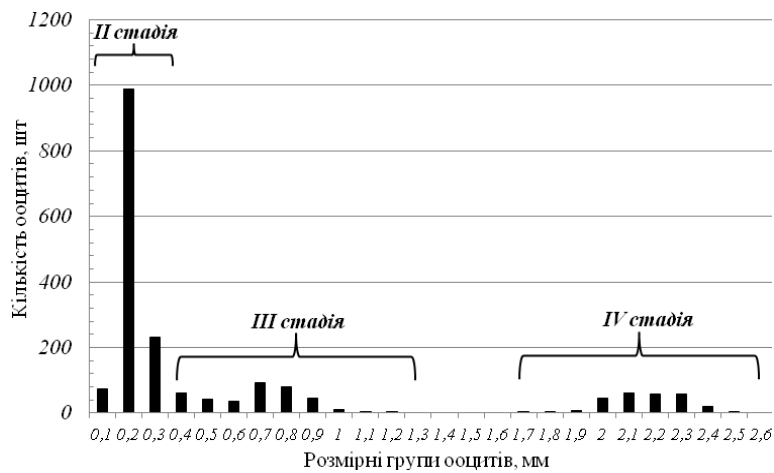


Рис. 1. Кількість ооцитів різних розмірних груп ($n = 86$) для кожної розмірної групи

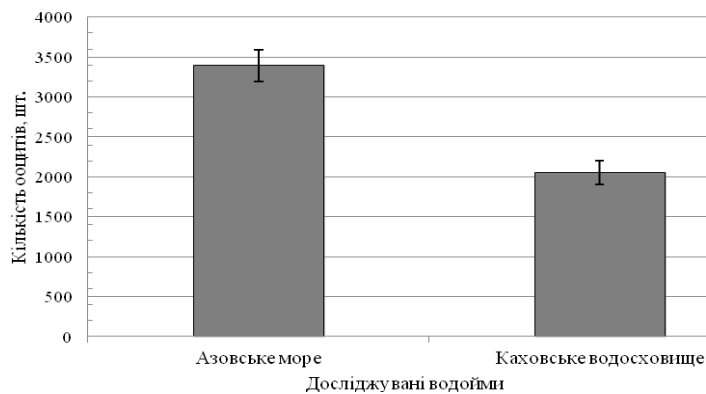


Рис. 2. Показники абсолютної плодючості бичка кругляка у досліджуваних водоймах ($n = 86$)

Таблиця 1

Абсолютна плодючість бичка кругляка за водоймами та стадіями зрілості

Стадія зрілості	Азовське море			Каховське водосховище			P
	n	$M \pm m$	Min – Max	n	$M \pm m$	Min – Max	
II	36	1675 ± 128	396–4218	48	934 ± 84	200–2096	<0,001
III	36	1183 ± 68	258–2689	46	847 ± 56	245–1988	<0,05
IV	15	873 ± 41	457–1363	32	652 ± 38	428–983	<0,05
сума	40	3395 ± 198	1000–6599	48	2053 ± 144	445–3965	>0,05

Таблиця 2

Відносна плодючість бичка кругляка за розмірними групами

Водойма	Розмірні групи	Кількість особин	Кількість ікринок на 1 г маси тіла (загальна)	Кількість ікринок на 1 г маси тіла (маса тушки)
Каховське водосховище $n = 31$	70–80	7	101,5 ± 5,1	126,6 ± 7,7
	80–90	17	121,3 ± 8,3	154 ± 10,4
	90–100	5	117,4 ± 12,2	152,9 ± 16,1
	100–110	2	89,1 ± 2,1	114,9 ± 3,9
Азовське море $n = 32$	70–80	3	148,3 ± 24,8	175,4 ± 33,1
	80–90	5	114,6 ± 21,5	135,6 ± 27,8
	90–100	14	137,5 ± 11,9	175,6 ± 15,0
	100–110	10	94,8 ± 9,7	120,2 ± 14,4

Залежність плодючості бичка від маси тіла особин також показала поступове збільшення, на що вказує лінія тренду. Коефіцієнт кореляції для Азовського моря склав 0,63, а для Каховського водосховища – 0,74 (рис. 4).

Аналіз абсолютної плодючості, за даними I.F. Kovtun (1977) та нашими, показав суттєву різницю між особинами з Азовського моря (в межах 316–1 346 ооцитів). Найменша різниця (табл. 3) зафіксована у розмірно-

му ряді 100–110 мм (відповідає віковій групі 2,0–2,5 року), а найбільша – 90–100 та 110–120 мм (1 346 та 1 341 шт., відповідає віковому діапазону 1,5–2,0 та 3,0–3,5 року, відповідно). Різниця між показниками плодючості особин із Каховського водосховища становила 247–934 ооцити. Найменші значення зафіксовані у розмірній групі до 70 мм (247 шт., відповідає 1,0–1,5 року), а найбільші – у розмірній групі 90–100 мм.

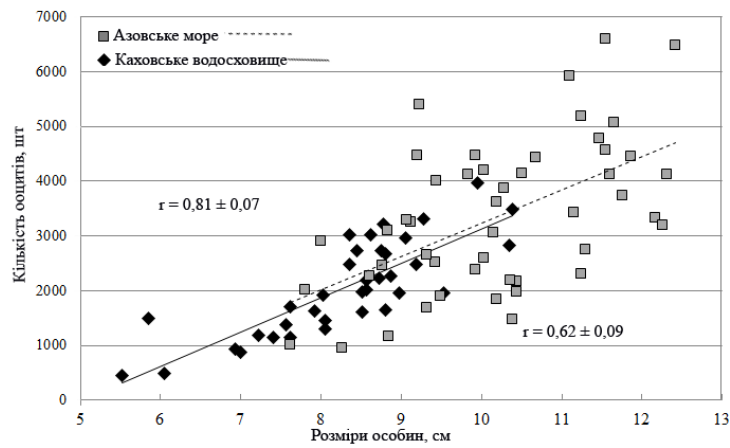


Рис. 3. Залежність плодючості бичка кругляка від розмірів тіла особин

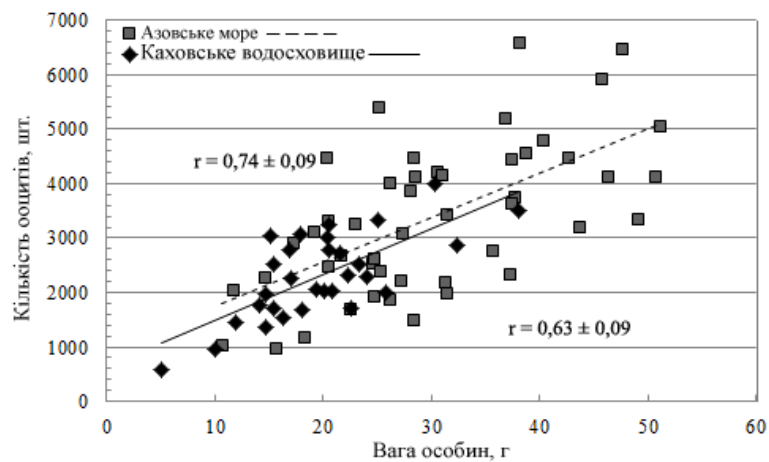


Рис. 4. Залежність плодючості бичка кругляка від маси тіла особин

Таблиця 3

Порівняльна характеристика плодючості бичка кругляка від довжини тіла самиць

Розмірна група, мм	Азовське море		Каховське водосховище
	I.F. Kovtun, 1966–1971 pp.	наші дані, 2011–2012 pp.	
< 70	–	–	852 ± 191
70–80	1090	2011 ± 500	1365 ± 103
80–90	1554	2026 ± 402	2386 ± 133
90–100	2033	3379 ± 295	2967 ± 344
100–110	2594	2910 ± 338	3159 ± 326
110–120	3089	4430 ± 356	–
120–130	3693	4310 ± 550	–
> 130	2005	–	–

Таблиця 4

Показники абсолютної плодючості бичка кругляка залежно від маси тіла самиць

Маса тіла, г	Азовське море			Каховське водосховище	
	I.F. Kovtun, 1966–1971 pp.	n	наші дані, 2011–2012 pp.	n	наші дані, 2011–2012 pp.
0–10	677	–	–	4	845 ± 246
10–15	1388	3	1800 ± 382	8	1333 ± 119
15–20	1579	4	2064 ± 559	9	2241 ± 202
20–25	1984	9	2791 ± 276	10	2416 ± 154
25–30	2498	10	3308 ± 403	2	2629
30–35	2706	5	3213 ± 470	2	3399
35–40	3222	8	4171 ± 481	1	3485
40–45	3438	3	4165 ± 484	–	–
45–50	3672	4	4982 ± 450	–	–
50–55	4280	2	4610	–	–

Характеризуючи середню кількість ооцитів у бичка кругляка залежно від маси тіла самиць, установили, що в сучасний період, порівняно з даними I.F. Kovtun (1977), в Азовському морі спостерігається збільшення цього показника на 500–900 ооцитів залежно від вагового проміжку (табл. 4). Так, найбільша різниця зафіксована між показниками у діапазоні 45–50 г (1310 ооцитів), найменша – у діапазоні 50–55 г (330 ооцитів). Порівняно з Каховським водосховищем значення абсолютної плодючості також дещо вищі, але їх різниця коливається від 50 до 693 ооцитів.

Колівання показників плодючості в особин з Азовського моря спостерігаються у більш зрілих особин

(45–55 г) порівняно з особинами з Каховського водосховища, де найменша різниця зафіксована в особин вагового проміжку 10–15 г, а найбільша – у більш зрілих особин (30–35 г).

Аналіз залежності плодючості від віку особин показав найбільшу відмінність у особин вікового діапазону 3,0–3,5 року (1545 шт.), найменшу – 1,0–1,5 року (45 шт.). Порівняно з Каховським водосховищем різниця склала 780–1134 ооцити. Найбільша різниця склала у віковому діапазоні 1,0–1,5 року (1134 шт.), найменша – 2,0–2,5 року (780 шт.) (табл. 5). Показник кореляції для особин із Каховського водосховища склав 0,5, а Азовського моря – 0,2.

Таблиця 5

Порівняльна характеристика плодючості самиць бичка кругляка різних вікових груп

Вікова група, років	Азовське море				Каховське водосховище
	I.F. Kovtun, 1966–1971 pp.	n	наші дані, 2011–2012 pp.	n	наші дані, 2011–2012 pp.
1+	2195	6	2240 ± 617	3	1061 ± 144
2+	3032	30	3378 ± 299	20	2252 ± 145
3+	2005	24	3550 ± 293	–	–

Щоб уникнути похибки у кількісному значенні плодючості різних за віком особин, доцільно порівняти плодючість риб однієї вікової групи (рис. 5). До аналізу залучені дворічні особини, оскільки для риб із коротким життєвим циклом вони найзручніші для порівняння, адже всі особини вступили до нерестової частини угруповання.

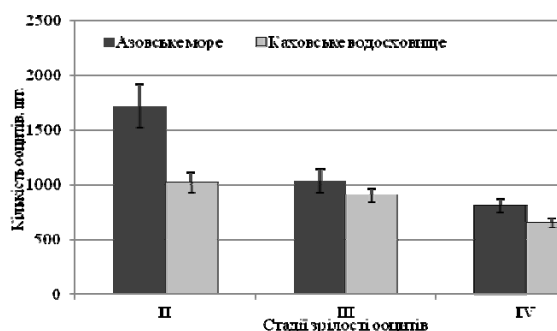


Рис. 5. Аналіз плодючості дворічних особин бичка кругляка за стадіями зрілості в Каховському водосховищі (n = 75) та Азовському морі (n = 51)

Слід відзначити суттєву різницю лише за кількістю ооцитів II стадії зрілості: в Азовському морі показник значно більший (48%). III та IV стадії також більші в морі, але загалом їх різниця не так виражена (29% та 23% відповідно). У Каховському водосховищі стадії зрілості розподілені рівномірніше. Кількість ооцитів II стадії зрілості склала 40%, III та IV – 35% та 25%, відповідно.

Висновки

У бичка кругляка в різних гідроекологічних умовах спостерігаються значні відмінності за показниками плодючості. Загальна абсолютна плодючість більша в особин з Азовського моря. Відносна плодючість також більша у риб із моря, що може свідчити про кращі умови

існування у морі та мати зв'язок з умовами живлення, калорійністю раціону. Встановлено позитивну кореляцію між розмірно-масовими показниками самиць і значеннями абсолютної плодючості для обох водойм. Порівняння даних 40-річної давнини із сучасними показало значне збільшення абсолютної плодючості в Азовському морі як за розмірно-масовими показниками, так і за віковими групами. Це може бути пов'язано зі зміною екологічних умов, які відбулися останнім часом в Азовському морі. Дослідження показників калорійності трофічної бази та спектра живлення виду в умовах цих водойм дадуть можливість детальніше пояснити різницю показників плодючості особин із прісних та морських водойм.

Бібліографічні посилання

- Gutowsky, L.F.G., Fox, M.G., 2012. Intra-population variability of life-history traits and growth during range expansion of the invasive round goby, *Neogobius melanostomus*. *Fisheries Manag. Ecol.* 19, 78–88.
- Koshelev, B.V., 1966. Nekotoryye osobennosti polovykh tsiklov u ryb s sinkhronnym i asinkhronnym rostom ootsitov v vodoyemakh razlichnykh shirot [Some features of sexual cycles in fish with synchronous and asynchronous oocyte growth in the reservoirs at different latitudes]. *Sevastopol*, 21–54 (in Russian).
- Kovtun, I.F., 1971. O plodovitosti bychka-kruglyaka *Gobius melanostomus* Pallas Azovskogo morya [About fertility round goby *Gobius melanostomus* Pallas from Azov Sea]. *Journal of Ichthyology* 1, 642–649 (in Russian).
- Kulikova, N.I., Fandeyeva, V.N., 1975. O portsiionnosti ikrometaniya azovskogo bychka-kruglyaka *Neogobius melanostomus* (Pallas) [The portioned spawning Azov round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas)]. *VNIRO* 96, 18–27 (in Russian).
- Mikhman, A.S., 1963. O plodovitosti azovskikh bychkov – kruglyaka i sirmana [The fertility Azov steers – sticks and sirman]. *AzNIIRKH* 6, 105–109 (in Russian).
- Moskvin, B.S., 1940. Nablyudeniya za razmnozheniyem nekotorykh vidov Gobiidae, Blennidae, Gobiosocidae v Chernom more [Observations of the breeding of some species Gobi-

- dae, Blennidae, Gobiosocidae in the Black Sea]. Novorossiysk 3, 25–40 (in Russian).
- Nikol'skiy, G.V., 1974. Teoriya dinamiki stada ryb kak biologicheskaya osnova ratsional'noy ekspluatatsii i vosproizvodstva rybnikh resursov [The dynamics theory became fish as the biological basis of rational exploitation and reproduction of fish resources]. Moscow (in Russian).
- Nolte, A.W., 2011. Dispersal in the course of invasion. Molecular ecology.
- Piria, M., Šprem, N., Jakovlić, I., 2011. First record of round goby, *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) in the Sava River, Croatia. Aquatic Invasions 6(1), 153–157.
- Poláčik, M., Janáč, M., Vassilev, M., Trichkova, T., 2012. Morphometric comparison of native and nonnative populations of round goby *Neogobius melanostomus* from the River Danube. Folia Zool. 61(1), 1–8.
- Ray, W.J., Corkum, L.D., (2001). Habitat and site affinity of the round goby. J. Great Lakes Res. 27(3), 329–334.
- Sapora, M.R., Mariuzs, R., 2012. *Neogobius melanostomus*. Invasive Alien Species Fact Sheet 11.
- Smirnov, A.I., 1986. Fauna Ukrainy. Ryby [Fauna of Ukraine. Fish]. Kyiv, 8 (in Russian).
- Verreycken, H., Breine, J.J., Snoeks, J., Belpaire, C., 2011. First record of the Round goby, *Neogobius melanostomus* (Actinopterygii: Perciformes: Gobiidae) in Belgium. Acta Ichthyologica et Piscatorial 41(2), 137–140.
- Yoganzen, B.G., Zagorodneva, D.S., 1951. Plodovitost' sibirskogo yel'tsa i faktory, yeye opredelyayushchiye [Fecundity of siberian dace and its determining factors]. Memoirs of the Tomsk State University 2, 117–140 (in Russian).

Надійшла до редколегії 12.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriiã Biologiã, ekologiã

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 502.743+595.78

Лускокрилі (Lepidoptera), які охороняються в Національному природному парку «Великий Луг»

К.К. Голобородько, В.О. Махіна

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено лускокрилих фауни національного природного парку «Великий Луг». Серед комплексу Lepidoptera 27 видів занесено до охоронних списків різного рівня: 11 видів – до списку МСОП, 17 – до Червоної книги України, 8 – до Європейського Червоного списку тварин і рослин, що перебувають під загрозою зникнення у світовому масштабі, 6 – до Червоної книги «Європейських денних метеликів». У комплексі видів, що охороняються на території НПП, представлені види із 5 надродин, 11 родин. Територія НПП «Великий Луг» повністю розташована в долині р. Дніпро, що дає змогу запровадити охоронний режим у широкому спектрі екосистем (степові, лучні, лісові, болотні, островні тощо). Саме строкатість умов існування дозволила тут сформуватись цікавому зоогеографічному комплексу, представленому 5 основними групами (палеарктична – 26%, понтоказахська – 26%, середземноморська – 22%, євросибірська – 15%, європейська – 11%). Цікавою виявилась екологічна структура: ксеротермофіли-1 – 46%, мезофіли-1 – 18%, ксеротермофіли-2 – 15%, мезофіли-2 – 11%, гігрофіли – 4%, убіквісти – 4%. Аналіз сучасних загроз існуванню лускокрилих у межах НПП показав наявність таких найважливіших факторів: абразія берегів Каховського водосховища, перевипас свійської худоби, рекреаційне навантаження та штучне лісорозведення.

Ключові слова: Lepidoptera; види лускокрилих з охоронним статусом; НПП «Великий Луг»

Protected species of butterflies (Lepidoptera) in the National Nature Park “Velyky Lug”

K. Goloborodko, V. Mahina

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Velyky Lug is a unique natural complex which has a large biogeographical, ecological, environmental, historical and recreational value. The National Nature Park “Velyky Lug” was only created as recently as 2006. The park is located in Zaporizhzhya region, 15–18 km south of the city Zaporizhzhya, within the limits of floodplain area of the Dnepr river, which broadens to a width of over 20 km between Bilen'ke and Vasilivka (north-eastern part of the Kakhovskoe reservoir). This enormous expansion of the floodplain (about 80,000 ha) which is situated between the Dnepr river and its tributary the Kins'ka was in historical times was called the Kin'ski Floodplain or Great Meadow. In modern times this territory is almost completely flooded by the waters of the Kakhovskoe reservoir. Remnants of natural habitats have been preserved along the river banks – in the form of little valleys and ravines which extend all the shore and also islands which appeared in 1956 when the reservoir was flooded. The overall area of the park “Velyky Lug” is 16,756 ha. Within the territory of the park “Velyky Lug” we have recorded 27 species of Lepidoptera which have various levels of conservation status. The taxonomical structure of the complex varies and included representatives of all basic families of moth and day butterflies which have species that are protected by law. In a taxonomical relation this complex is formed by the representatives of 11 families (Zygaenidae, Saturniidae, Sphingidae, Noctuidae, Arctiidae, Hesperidae, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae, Satyridae, Lycaenidae). Zoogeographical analysis of the species that are protected in the territory of the park can be classified into 5 basic groups (Palearctic – 26%, Pontokazach – 26%, Mediterranean – 22%, Eurosiberian – 15%, European – 11%). Analysis of the biotopic advantages of the protected Lepidoptera species present in the territory of the park showed representatives from all 6 ecological groups which are included in the Lepidoptera fauna of Central Europe. The ecological structure appears highly interesting: xerothermophilous-1 – 46%, mesophilous-1 – 18%, xerothermophilous-2 – 15%, mesophilous-2 – 11%, hygrophilous – 4%, ubiquitous – 4%. Analysis of modern threats to the existence of Lepidoptera within park area reveals the following factors: erosion of the shores of Kakhovskoe reservoir, overgrazing by live-stock, recreational overload and artificial afforestation. Most species (45%) that are

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, 49010, Дніпропетровськ, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin ave., 72, 49010, Dnipropetrovsk, Ukraine
Tel.: +38066-795-63-20. E-mail: goloborodko@ua.fm

protected in the territory of the park and included in the IUCN Red List have status of vulnerable (VU). *Hylis hypophaes* (Esper, [1793]) is the only species of conservation importance in the park which has expanded its range in Ukraine in the last 50 years. One of main terms of conditions for the survival of rare and vanishing species, including Lepidoptera, is creation of national red lists (for example, Red Book of Ukraine). 29% species of Lepidoptera, included in the Red Book of Ukraine have been recorded in the territory of the "Velyky Lug" park. Analysis of the categories of these species confirms that *Zygaena laeta* (Hübner, 1790) alone is classified as a vanishing species on the Ukrainian level, the others being classified as vulnerable (53%) and rare (41%). Among the species included in the Red Book of Ukraine, those for which the park has special significance on account of the stability and high numbers of their populations within the park are – *Acherontia atropos* (Linnaeus, 1758), *Zerynthia polyxena* ([Denis et Schiffermüller, 1775]) and *Plebeius pylaon* (Fisher von Waldheim, 1832).

Keywords: Lepidoptera; protected species of butterflies; National Nature Park "Velyky Lug"

Вступ

Великий Луг – унікальний природний комплекс, який має велике біогеографічне, екологічне, природоохоронне, історичне та рекреаційне значення. Тільки у 2006 р. у цій місцевості створено Національний природний парк «Великий Луг». Першочерговим завданням функціонування цього природоохоронного об'єкта є інвентаризація його біологічних ресурсів. Особливе місце серед біоти парку посідають представники ряду лускокрилих (Lepidoptera), адже вони відіграють провідну роль в існуванні місцевих фітоценозів, бо є активними запилювачами. Першочергову увагу серед комплексу видів лускокрилих слід приділити рідкісним і зникаючим видам, занесеним до охоронних списків різних рівнів (Porov, 1997; van Swaay and Warren, 1999).

Потрібно детально дослідити екологічні особливості місцевих популяцій таких видів. Давно відомо (Blab and Kudrna, 1982; Thomas, 1984; Kudrna, 1986), що індивідуальна форма охорони неефективна, необхідно охороняти цілі популяції разом з їх біотопами (Beneš and Konvička, 2002). Виявлення таких видів на території НПП і подальше дослідження їх біолого-екологічних особливостей – актуальне завдання для вирішення проблеми, мета нашого дослідження.

Незважаючи на унікальність і винятковість природного комплексу Великого Лугу, спеціалізовані дослідження лускокрилих тут почалися лише в новітній час. Перші фрагментарні відомості можна знайти у працях, що друкувались у другій половині ХХ ст. Дослідження лускокрилих почалося тільки перед самим будівництвом Каховської ГЕС. У першій половині 1950-х рр. на території природного комплексу Великий Луг проведено декілька експедицій під керівництвом відомого ентомолога С.І. Медведєва (Medvedev et al., 1952; Medvedev, 1953). В опублікованих ним працях містяться цікаві дані, у тому числі і про знахідки таких рідкісних видів, що зараз мають охоронний статус, як *Cucullia splendida* (Stoll, 1782) та *C. argentina* (Fabricius, 1787). У подальшому для Запорізької області наводяться декілька фауністичних праць (Pljushh et al., 1987; Zhakov et al., 1993), присвячених рідкісним і зникаючим видам (Zhakov and Kucenko, 1998; Suchkov and Tarusova, 2003; Petrochenko et al., 2005), але відомості про дослідження на території майбутнього парку в них відсутні. Навіть у загальноукраїнських зведеннях (Sytnik, 1988) також не міститься даних про лускокрилих фауни НПП «Великий Луг». Інформація про види, що мають охоронний статус, відсутня для території парку й у Червоній книзі України обох видань (1994, 2009).

Матеріал і методи досліджень

Загальна площа НПП «Великий Луг» становить 16 756 га, у тому числі 9 324 га земель, що надаються йому у постійне користування, та 7 432 га, що включаються до його складу без вилучення у землекористувачів (Василівська районна державна адміністрація, водний фонд) і на яких здійснюватиметься традиційна господарська діяльність із додержанням загальних вимог щодо охорони навколишнього природного середовища (www.grandmeadow.org.ua/index.php/default/). Територія НПП розташована в Запорізькій області за 15–18 км на південь від міста Запоріжжя, в межах заплавної тераси Дніпра, яка сильно розширюється і сягає понад 20 км по профілю «Біленьке – Василівка» (північно-східна частина Каховського водосховища) (рис. 1).

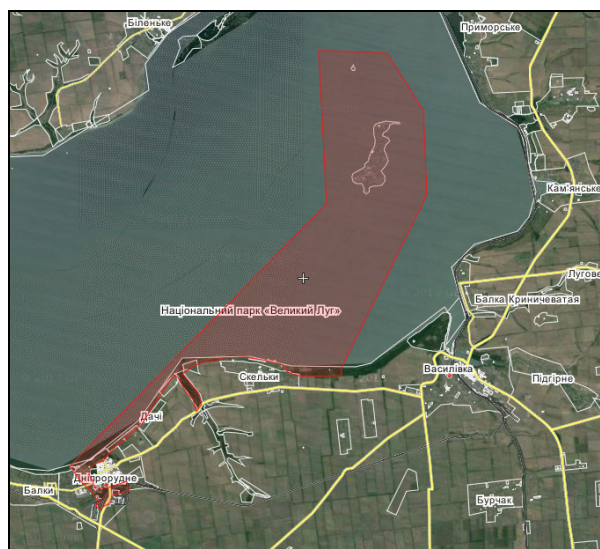


Рис. 1. Карта-схема сучасної території НПП «Великий Луг»

Це величезне розширення заплави (близько 80 тис. га), що між Дніпром і його притокою р. Кінська, здавна звалось «Кінські плавні» або «Великий Луг». Нині ця територія майже повністю затоплена водами Каховського водосховища. Залишки її природних комплексів збереглися уздовж берегової смуги – по балках, що простяглися уздовж усього узбережжя, і на островах, які утворилися 1956 р. після заповнення водосховища. Парк створено на базі регіонального ландшафтного парку «Панай», орнітологічного заказника загальнодержавного значення «Великі та Малі Кучугури», ландшафтного заказника загальнодержавного значення «Крутосхили Каховського водосховища».

Основним матеріалом були власні збори з території досліджень, що проводились протягом чотирьох останніх років. Окрім власних зборів оброблено матеріали ентомологічних фондів кафедри зоології та екології Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара. Польовими дослідженнями охоплено всі основні за розмірами та ступенем збереження екосистеми НПП «Великий Луг». Імаго булавовусих лускокрилих збирали методом маршрутного обліку (Descimon and Napolitano, 1990; Kuzjakın and Mazin, 1993). Імаго видів із нічною активністю збирали переважно на різні джерела світла, менше – на принади та методом ручного збирання. Основну частину матеріалу зібрано за загальноприйнятою методикою лову на світло. Джерело випромінювання (РВЛ-500 та ДРЛ-250) розташовували на відстані 1,0–1,5 м від поверхні ґрунту, позаду лампи закріплено білий екран (1,5 × 1,0 м), під екраном розміщували світле полотно (відбивач). Метеликів збирали з екрана відкритою морилкою. Також лускокрилих збирали вдень за допомогою ентомологічного сачка, вигодовували з гусені та виводили із зібраних лялечок.

Результати та їх обговорення

На території НПП «Великий Луг» зареєстровано 27 видів лускокрилих, які мають різний охоронний статус (табл. 1). Таксономічна структура комплексу доволі різноманітна, презентує всі основні родини вищих різновусих і булавовусих лускокрилих, у яких є види, що охороняються. У таксономічному відношенні цей комплекс утворений представниками п'ятих надродин (Zyganoidea, Bombycoidea, Noctuoidea, Hesperioidea, Papilionoidea) 11 родин (Zygaenidae, Saturniidae, Sphingidae, Noctuidae, Arctiidae, Hesperidae, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae, Satyridae, Lycaenidae). Найбільше представництво видів, як у цілому по степовій зоні Палеарктики, так і в Україні, належить синявцям (Lycaenidae).

Високе таксономічне різноманіття можна пояснити унікальним географічним положенням НПП, територія якого повністю розташована в азональних умовах долини р. Дніпро. Таке положення дає змогу проникати сюди різним зоогеографічним групам лускокрилих. Зоогеографічний аналіз видів, що охороняються на території НПП, дозволив виділити тут п'ять основних груп (рис. 2 а). У більшості видів палеарктичний або понтотказахський ареал. Специфічності цьому компоненту фауни додають так звані «північні» види, які становлять 52% (представники палеарктичної, євросибірської та європейської груп). Їх існування на цій території можливе лише завдяки наявності бореальних екосистем долини.

Завдяки своєму розташуванню на території парку презентовані майже всі варіанти екосистем, притаманні степовій зоні: степові, лучні, лісові та болотні. Наявність такого строкатого набору стацій зумовлює формування тут вельми різноманітного комплексу лускокрилих. Аналіз біотопічних переваг видів лускокрилих, що охороняються, показав присутність на території НПП представників усіх 6 екологічних угруповань, що виділяються для фауни лускокрилих Центральної Європи (Macek et al., 2007). У комплексі

видів, що охороняються (рис. 2 б), більшість належить до ксеротермофільних груп (ксеротермофіли-1 – види, які існують в умовах ксеротермних плакорних трав'яних біоценозів і на степових схилах давніх балкових систем, і ксеротермофіли-2 – види, які існують в умовах сусідства степових із чагарниковими формаціями та рідколіссями), що цілком відповідає географічній зоні, в якій розташовано НПП «Великий Луг».

Особливої уваги заслуговує комплекс мезофілів (мезофіли-1 – види, які існують у лучних екосистемах, і мезофіли-2 – види, які населяють лісові екосистеми), адже саме їх присутність у НПП підкреслює винятковість цієї території. Трофічно мезофіли пов'язані із лучною та деревною рослинністю, а отже перебувають в умовах екологічної невідповідності, через що стан їх популяцій можна розглядати як потенційно загрозливий. Лише одним видом представлена гідрофільна група (*A. metis*). В Україні цей вид відомий тільки з долин р. Дніпро та Дунай у межах степової зони. На території НПП реєструється в прибережних біотопах, у заростях верби білої (*Salix alba* Linnaeus, 1753), з якою трофічно пов'язана гусінь. Лише один вид (*P. machaon*) належить до убиквістів (евритопний вид, який завдяки широким трофічним зв'язкам імаго та гусені постійно спостерігається на всій території НПП).

Незважаючи на організацію НПП «Великий Луг», постійно залишається загроза існуванню на його території рідкісних і зникаючих видів лускокрилих. Умовно ризики можна поділити на дві групи: глобальні та регіональні. До першої групи належать глобальні кліматичні зміни. На сьогодні вже існують моделі розвитку ареалів більшості видів булавовусих лускокрилих Європи (Settele et al., 2008) за умов глобального потепління. Згідно з розрахунками, більшість бореальних видів лускокрилих, що охороняються в межах НПП, у найближчі 50 років можуть зникнути із цієї території, адже через потепління змушені будуть «відійти» на північ. Такий сценарій розглядається як можливий у першу чергу для таких видів як *M. quercus*, *S. celsia* та *N. xanthomelas*.

До другої групи належать проблеми, пов'язані з регуляцією діяльності людини на території НПП (рис. 3). Майже всі види антропогенного впливу пов'язані з небезпекою переважно для степових видів Lepidoptera. У першу чергу, це абразія берегів Каховського водосховища. За сучасними дослідженнями (Dascenko et al., 2011), швидкість абразії, залежно від складу гірських порід, становить 1,5–3,0 м/рік. Змінюються не лише висота та конфігурація берегів, втрачаються цілинні степові ділянки, які переробляються абразійними процесами, зникаючи назавжди. Така зміна ландшафту безпосередньо загрожує стаціям ксеротермних видів, популяції яких збереглися на схилах по лінії «с. Скельки – с. Маячка – с. Златопіль»: *Z. laeta*, *S. tessellum*, *C. chrysotheme*, *P. vicrama*, *P. bavius* та *P. pylaon*. Останніми роками у зв'язку з кризовими явищами в економіці України дещо зменшується вплив випасання свійської худоби, адже спостерігається тенденція зменшення її поголів'я. У результаті поступово рудеральні фітоценози починають заміщатись на степові, історично притаманні цій місцевості. Це дає змогу степовим видам збільшувати свою чисельність. Із організацією НПП значно знизилася рекреаційне навантаження, адже після зонування території

рекреація стала контрольованою. На сучасному етапі прямого впливу на чисельність місцевих популяцій рідкісних і зникаючих лускокрилих від рекреації не спостерігається. Іншим важливим наслідком запровад-

ження заповідного статусу на цій території можна вважати припинення штучного лісорозведення на степових ділянках схилів Каховського водосховища та великих балкових систем (Басанської та Маячанської).

Таблиця 1

Перелік видів лускокрилих фауни НПП «Великий Луг», занесених до Червоних списків різних рівнів

№	Назва виду	Категорія			
		Червона книга МСОП*	Червона книга України	Європейський Червоний список тварин і рослин, що перебувають під загрозою зникнення у світовому масштабі**	Червона книга «Європейських денних метеликів»
Zygaenidae Latreille, 1809					
1	<i>Zygaena laeta</i> (Hübner, 1790)		зникаючий		
Saturniidae Boisduval, 1834					
2	<i>Saturnia pyri</i> ([Denis et Schiffermüller, 1775])		вразливий	E	
Sphingidae Latreille, 1802					
3	<i>Acherontia atropos</i> (Linnaeus, 1758)		рідкісний		
4	<i>Marumba quercus</i> ([Denis et Schiffermüller, 1775])		рідкісний		
5	<i>Proserpinus proserpina</i> (Pallas, 1772)	DD	рідкісний	V	
6	<i>Hyles hyppophaes</i> (Esper, [1793])	DD		V	
7	<i>Hemaris tityus</i> (Linnaeus, 1758)		рідкісний		
Noctuidae Latreille, 1809					
8	<i>Catocala sponsa</i> (Linnaeus, 1767)		рідкісний		
9	<i>Stauropora celsia</i> (Linnaeus, 1758)		рідкісний		
10	<i>Periphanes delphinii</i> (Linnaeus, 1758)		вразливий		
Arctiidae Leach, 1815					
11	<i>Callimorpha dominula</i> (Linnaeus, 1758)		вразливий		
Hesperiidae Latreille, 1809					
12	<i>Syrictus tessellum</i> (Hübner, [1802])			K	
Papilionidae Latreille, 1802					
13	<i>Zerynthia polyxena</i> ([Denis et Schiffermüller, 1775])		вразливий	*	
14	<i>Papilio machaon</i> (Linnaeus, 1758)		вразливий		
15	<i>Iphiclidea podalirius</i> (Linnaeus, 1758)		вразливий		
Pieridae Duponchel, 1835					
16	<i>Colias chrysotheme</i> (Esper, [1777])	VU			SPEC3
Nymphalidae Swainson, 1827					
17	<i>Apatura metis</i> (Freyer, 1829)	NT		E	
18	<i>Nymphalis xanthomelas</i> (Esper, 1781)	VU			SPEC3
Satyridae Boisduval, 1833					
19	<i>Hipparchia statilinus</i> (Hufnagel, 1766)		рідкісний		
20	<i>Kirinia climene</i> (Esper, 1783)		вразливий		
Lycaenidae Leach, 1815					
21	<i>Glaucopsyche alexis</i> (Poda, 1761)	VU			SPEC3
22	<i>Maculinea arion</i> (Linnaeus, 1758)	EN		V	
23	<i>Pseudophilotes vicrama</i> (Moore, 1865)	VU			SPEC3
24	<i>P. bavius</i> (Eversmann, 1832)	EN	вразливий		SPEC3
25	<i>Scolitantides orion</i> (Pallas, 1771)	VU			SPEC3
26	<i>Plebeius pylaon</i> (Fisher von Waldheim, 1832)		вразливий		
27	<i>Plebejus argyrognomon</i> (Bergsträsser, 1779)	NT		*	
Усього		11	17	8	6

Примітки: * www.iucnredlist.org; ** www.ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/redlist/index_en.htm

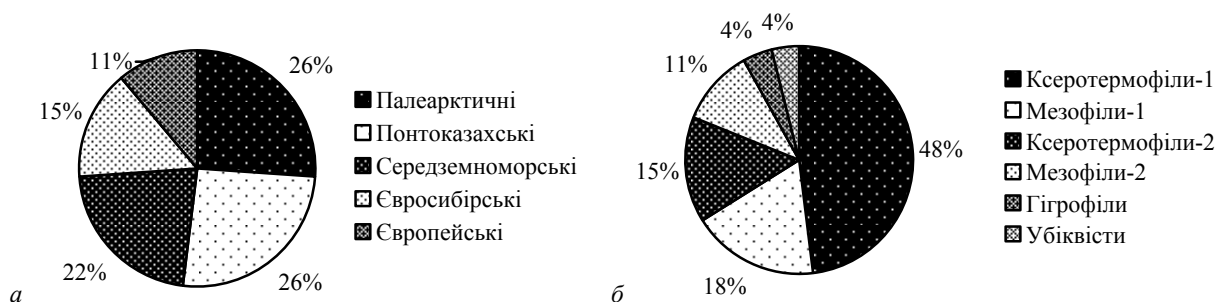


Рис. 2. Зоогеографічна (а) та екологічна (б) структури комплексу видів, що охороняються в НПП «Великий Луг»



Рис. 3. Карта-схема сучасних ризиків для популяцій *Lepidoptera*, що охороняються на території НПП «Великий Луг»

За сучасною оцінкою МСОП, серед 27 видів лускокрилих, що охороняються на території НПП «Великий Луг», найбільша небезпека загрожує двом: *M. arion* та *P. bavius*. У глобальному вимірі стан їх популяцій оцінюється статусом EN (види, що перебувають під загрозою зникнення). За нашими даними, обидва види трапляються щорічно. Занепокоєння місцева популяція *M. arion* не викликає, адже реєструється на всіх степових ділянках НПП, де є елементом субдомінантної групи комплексу *Lycaenidae*. *P. bavius* – один із найрідкісніших видів синявців української фауни, трапляється поодинокими особинами та лише на цілих степових ділянках. Більшість видів (45%), що охороняються на території НПП і занесені до Червоного списку МСОП, мають статус вразливих (VU). Видами, що перебувають у стані, близькому до загрозливого (NT), є *A. metis* і *P. argyrognomon*. Якщо перший трапляється спорадично, реєструючись у невеликих за площею фітоценозах, то другий є фоновим видом на території НПП. Два бражники (*P. proserpina* та *H. hyppophaes*) мають статус видів, для оцінки яких не вистачає даних (DD). Перший трапляється винятково на лучних ділянках, поодиноким. Обліпиховий бражник (*H. hyppophaes*) – єдиний вид комплексу лускокрилих території НПП, який за останні 50 років розширює свій ареал в Україні. Першу достовірну знахідку із Кримського п-ва зроблено в 1954 р., а вже починаючи із 1980-х цей вид реєструється на території Запорізької обл., у 1990-х рр. проникає до лісостепової, а згодом – і до лісової зони. Таке інтенсивне розселення, мабуть, можна пояснити активним використанням в озелененні та штучному лісорозведенні видів лохів (*Elaeagnus* Linnaeus, 1753), з якими трофічно пов'язана гусинь.

Однією з головних умов збереження рідкісних і зникаючих видів, у тому числі й лускокрилих, є складання національних Червоних списків (Червона книга України). 29% видів лускокрилих, занесених до Червоної книги України, зареєстровано на території НПП «Великий Луг». Аналіз категорій цих видів свідчить, що лише *Z. laeta* оцінюється в національному масштабі як зникаючий вид, решта мають категорії вразливого (53%) та рідкісного (41%). Серед занесених до Червоної книги України видів особливе значення через стійкість і чисельність популяції на території НПП мають *A. atropos*, *Z. polyxena* та *P. pylaon*.

Важливим інструментом для збереження біологічного та ландшафтного різноманіття на Європейському континенті є «Конвенція про охорону дикої флори і фауни та природних середовищ існування в Європі» (Берн, 1979). У 1996 році в Україні прийнято Закон про приєднання до Бернської конвенції (Ermolenko, 1999). На території НПП зареєстровано 2 (із 3) види різновусих лускокрилих, які перебувають під охороною Бернської конвенції (*H. hyppophaes* і *P. proserpina*) та 3 види булавовусих лускокрилих (*A. metis*, *Lycaena dispar rutila* (Werneburg, 1864) та *M. arion*).

Висновки

На території НПП «Великий Луг» зареєстровано 27 видів лускокрилих, занесених до охоронних списків різних категорій: 11 видів – до списку МСОП, 17 – до Червоної книги України, 8 – до Європейського Червоного списку тварин і рослин, що перебувають під загрозою зникнення у світовому масштабі, 6 – до

Червоної книги «Європейських денних метеликів». Таксономічна структура виявилась різноманітною: у комплексі видів, що охороняються на території НПП, представники 5 надродів, 11 родів. Територія НПП «Великий Луг» повністю розташована в долині р. Дніпро, що дає змогу запровадити охоронний режим у широкому спектрі екосистем (степові, лучні, лісові, болотяні, островні тощо). Саме строкатість умов існування дозволила тут сформуватись цікавому зоогеографічному комплексу, представленому 5 основними групами: палеарктична – 26%, понтоказахська – 26%, середземноморська – 22%, євросибірська – 15%, європейська – 11%. Цікавою виявилась екологічна структура: ксеротермофіли-1 – 46%, мезофіли-1 – 18%, ксеротермофіли-2 – 15%, мезофіли-2 – 11%, гігрофіли – 4%, убіквісти – 4%. Аналіз сучасних загроз існуванню лускокрилих у межах НПП показав наявність таких факторів: абразія берегів Каховського водосховища, перевипасання свійської худоби, рекреаційне навантаження та штучне лісорозведення.

Бібліографічні посилання

- Akimov, A.I. (ed.), 2009. Chervona knyha Ukrainy. Tvarynnij svit [Red book of Ukraine. Fauna]. Globalkonsalting, Kiev (in Ukrainian).
- Beneš, J., Konvička, M., 2002. Butterflies of the Czech Republic: Distribution and conservation I, II. SOM, Praha.
- Blab, J., Kudrna, O., 1982. Hilfsprogram für Schmetterlinge. Ökologie und Schutz von Tagfalter und Widderchen. Naturschutz Aktuell. 6, 1–135.
- Descimon, H., Napolitano, M., 1990. L'étude quantitative des populations de Papillons (Lepidoptera). Alexanor 16(7), 413–426.
- Dacenko, L.M., Molodychenko, V.V., Akimov, V.J., 2011. Geomorphological processes on the South coast of Kakhovskoe reservoir [Geomorfologichni procesy na pivdenomu uzbezhzhzi Kahov's'kogo vodoshovyshha]. Geologo-Mineralogichnyj Visnyk 1(25), 89–92 (in Ukrainian).
- Ermolenko, V., 1999. Opys ridsknyh vydiv metelykiv [Description of rare Lepidoptera species]. In: Bezhrebetni tvaryny Ukrainy pid ohoronoju Berns'koi konvencii / Pid red. I. Zagorodnjuka [Invertebrate animals of Ukraine, protected by the Bern Convention / Ed. by I. Zagorodniuk]. Kyiv, 33–46 (in Ukrainian).
- Kudrna, O., 1986. Butterflies of Europe. 8. Aspects of the Conservation of Butterflies in Europe. AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Kuzjak, A.P., Mazin, L.N., 1993. Marshrutnyj uchet imago bulavousykh cheshuekrylykh metodom vylova za edinicu vremeni [Route-calculation of the imago of day butterflies of the method of catch per unit time]. In: Vlianie antropogennykh faktorov na strukturu i funkcionirovanie jekosistem i ih otdel'nye komponenty [Influence of anthropogenic factors on the structure and functioning of ecosystems and their individual components]. Moscow, 61–66 (in Russian).
- Macek, J., Dvořák, J., Traxler, L., Červenka, V., 2007. Motýli a housenky střední Evropy. 1. Noční motýli. Academia, Praha.
- Medvedev, S.I., 1953. Osnovnye cherty jentomofauny rajona stroitel'stva Kahovskoj GJeS [The main features of the entomofauna of the construction area of Kahovskaja hydroelectric dam]. Zoological Journal 1(6), 1126–1140 (in Russian).
- Medvedev, S.I., Bozhko, M.P., Shapiro, D.S., 1952. O vlijanii oroshenija na jentomofaunu v rajone stroitel'stva Kahovskoj GJeS i Juzhno-ukrainskogo kanala [On the impact of irrigation on entomofauna in the area of construction of Kahovskaja hydroelectric dam and Juzhno-Ukrainskogo channel]. Zoological Journal 31(3), 347–368 (in Russian).
- Petrochenko, V.I., Shelegeda, V.I., Zhakov, O.V., Shelegeda, O.R., Korzun, S.A., 2005. Ridskni roslini, tvarini, gribi i lishajniki Zaporiz'koj oblasti [Rare plants, animals, fungi and lichens Zaporozhye region]. Zaporizhzhja (in Ukrainian).
- Pljushh, I.G., Budashkin, J.I., Zhakov, A.V., Mel'nychuk, B.V., 1987. Bulavousye cheshuekrylye (Lepidoptera, Rhopalocera) Zaporozhskoj oblasti USSR [Day butterflies of Zaporizhia region USSR]. Fauna i Biocenoticheskie Svjazi Nasekomyh Ukrainy [Fauna and Ecological Relations of Insects Ukraine]. Naukova Dumka, Kiev 37–40 (in Russian).
- Popov, S.G., 1997. Datasheets for Threatened butterflies in the Ukraine and the Moldova / Red Data Book of European Butterflies (Rhopalocera). Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern Convention). Part II. Nature and Environment. Council of Europe Publishing, Strasbourg, 77–193.
- Settele, J., Kudrna, O., Harpke, A., Kühn, I., van Swaay, C., Verovnik, R., Warren, M., Wiemers, M., Hanspach, J., Hickler, T., Kühn, E., van Halder, I., Veling, K., Vliegthart, A., Wynhoff, I., Schweiger, O., 2008. Climatic risk atlas of european butterflies. BioRisk 1 (Special Issue). Pensoft, Sofia, Moscow.
- Shherbak, M.M. (ed.), 1994. Chervona knyha Ukrainy. Tvarynnij svit [Red book of Ukraine. Fauna]. Ukrain's'ka Enciklopedija, Kiev (in Ukrainian).
- Suchkov, S.I., Tarusova, I.V., 2003. Novye svedenija o ridskix vidah nasekomyh Zaporozhskoj oblasti [New data on the rare species of insects of Zaporozhye region]. In: VI z'jizd Ukrain's'kogo entomologichnogo tovaristva [VI Congress of Ukrainian entomological society]. Bila Cerkva, 119 (in Russian).
- Sytnik, K.M. (ed.), 1988. Redkie i ischezajushhie rastenija i zhivotnye Ukrainy: Spravochnik [Rare and threatened plants and animals of Ukraine: A guide]. Naukova Dumka, Kiev (in Russian).
- Thomas, J.A., 1984. The conservation of butterflies in temperate countries: Past efforts and lessons for the future. The biology of butterflies. Symposium of the Royal Entomological Society 11. Academic Press, London 333–353.
- van Swaay, C.A.M., Warren, M.S., 1999. Red data book of european butterflies (Rhopalocera). Nature and environment series. No 99. Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Zhakov, A.V., Kucenko, A., 1998. Redkie cheshuekrylye (Lepidoptera) Zaporozhskoj oblasti [Rare butterflies (Lepidoptera) of the Zaporozhye area]. Zapovednoe Zaporozh'e [Reserved Zaporozhye]. Vol. 1, 100–110 (in Russian).
- Zhakov, A.V., Zakrevskij, A.A., Kryvoruchko, D.V., Pogodaev, V.A., 1993. K faune cheshuekrylykh ostrova Hortica [To the fauna butterflies of the island of Hortica]. Priroda o. Hortica [Nature of the island of Hortica]. Zaporozh'e, 72–77 (in Russian).

Надійшла до редколегії 28.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.

2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 612.82+577.352.56

Вплив синхронного та асинхронного сигналів від пірамідних нейронів на синхронізацію в мережах ГАМКергічних інтернейронів гіпокампа

С.О. Кочубей

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Дослідили вплив рівня стохастичності збуджувального синаптичного сигналу від пірамідних нейронів на генерацію коливань у мережах інтернейронів гіпокампа з шунтувальними ГАМКергічними синапсами. Використовували модифікацію математичної моделі мережі інтернейронів (Vida et al. 2006) і модель зовнішнього синаптичного сигналу з пуассонівським розподілом часового інтервалу між подіями. Повністю синхронізований синаптичний сигнал, коли кожний інтернейрон у мережі отримував струм з однаковою амплітудою та частотою, викликав у мережі коливання з високою синхронізацією ($k > 0,9$). Збільшення частоти синаптичного сигналу викликало відповідне збільшення частоти коливань у мережі. Поступове збільшення стохастичності синаптичного струму з 0,001 до 0,200 викликає зменшення синхронізації коливань у мережі інтернейронів з 0,89 до 0,11 при однаковій частоті сигналу (6 Гц). Частота коливань у мережі інтернейронів також зменшується з 55,6 до 35,7 Гц відповідно для рівня стохастичності 0,001 та 0,200 та частоти збудження 58 Гц. Зменшення частоти та синхронізації коливань у мережі може бути пояснено нездатністю шунтувальних ГАМКергічних синапсів синхронізувати роботу окремих інтернейронів при значному зростанні стохастичності зовнішнього збудження. Крім того, продемонстровано наявність діапазону частот вхідного сигналу 30–40 Гц, в межах якого відбувається значне зростання синхронізації коливань у мережі незалежно від ступеня стохастичності зовнішнього збудження.

Ключові слова: мережа інтернейронів; ГАМКергічні синапси; синхронізація; стохастичність; синаптичний сигнал

Influence of synchronous and asynchronous signals from pyramidal neurons on synchronization of GABAergic interneuronal networks on the hippocampus

S.O. Kochubey

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

We investigated the impact of the level of stochastic excitation of synaptic signals from pyramidal neurons on the generation of oscillations inside the interneuronal networks of the hippocampus with shunting GABAergic synapses. We used a modification of a mathematical model of the interneuronal networks (I. Vida, M. Bartos and P. Jonas, 2006) together with a model of external synaptic signalling with a Poisson distribution of time interval between events. We demonstrated that a completely synchronized synaptic signal when every interneuron in the network was impacted by an electric current with the same amplitude and frequency caused oscillations with a high level of synchronization ($k > 0,9$) in the network. The increase of synaptic signal frequency led to the respective increasing of oscillation frequency in the network. We demonstrated that a gradual increase of stochastic synaptic current from 0.001 to 0.200 causes reduction of synchronisation of oscillations in the interneuronal network from 0.89 to 0.11 with an equal signal frequency of 6 Hz. The frequency of oscillations in the interneuronal network also decreased from 55.6 to 35.7 Hz respectively for the levels of stochasticity 0.001 to 0.200 and the frequency of excitation of 58 Hz. Decrease of frequency and synchronization of oscillations in the network could be explained by the inability of shunting GABAergic synapses to synchronize the work of separate interneurons when there is significant increase in stochastic external excitation. Besides this, we demonstrated the existence of a range of frequencies of the incoming signal of 30–40 Hz in the network, of which a significant increase of synchronisation of oscillations in the network takes place regardless of the stages of external stochastic excitation.

Keywords: interneuronal network; GABAergic synapses; synchronization; stochastic; synaptic signal

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine
Tel.: +38067-776-69-10. E-mail: mollll@mail.ru

Вступ

Електричний ритм гіпокампа з гамма-частотою – низькоамплітудні, високочастотні (30–130 Гц (Kohling et al., 2000)) синхронні коливання, що пов'язують із такими когнітивними процесами як сприйняття (Engel et al., 2000), селективна увага (Fries et al., 2008; Van Der Werf et al., 2008) і формування пам'яті (Tallon-Baudry et al., 1997; Tallon-Baudry et al., 1998; Tallon-Baudry and Bertrand, 1999). Ослаблення гамма-ритму спостерігають у пацієнтів, хворих на шизофренію при втраті когнітивного контролю (Del Percio et al., 2006). Основним джерелом генерації цих коливань є активація під впливом синаптичного збудження з боку пірамідних нейронів (Vida et al., 2006; Jeong and Gutkin, 2007), інтернейронних мереж гіпокампа, які здатні генерувати синхронні осциляції як *in vivo* (Traub et al., 1996; Bibbig et al., 2007) так і *in vitro* (Chiappalone et al., 2007). На даний момент не існує чіткого розуміння механізмів генерації гамма-ритму та характеру впливу на нього складних синаптичних патернів із боку пірамідних нейронів. Відповідь на ці питання допоможе не лише зрозуміти теоретичні аспекти роботи нейронних мереж гіпокампа, а і відкрити механізми фармакологічного лікування когнітивних розладів (шизофренії та епілепсії) шляхом впливу на позасинаптичні ГАМК рецептори.

Головною складністю експериментального дослідження є неможливість у сучасних умовах поставити методику реєстрації мережевої активності нейронів мозку, у тому числі з використанням надсучасних методів оптогенетики. Динаміка збуджувального струму, який отримує кожний з інтернейронів мережі, визначається комбінацією великої кількості аферентних входів та ймовірності активації кожного із синапсів і величиною синаптичної провідності. Кожний корзинчастий інтернейрон отримує приблизно 5 000 збуджувальних синапсів (Matyas et al., 2004) від різних пірамідних клітин, які формують лише одиночний контакт з інтернейронами у 84,7% випадків (Sik et al., 1993). Також цей струм залежить від частоти збудження пірамідних нейронів, яка знаходиться в межах 3 Гц. Зважаючи на велику кількість входів та відсутність механізмів внутрішньої синхронізації між окремими пірамідними клітинами, частота збудження, котру отримує кожний з інтернейронів, може знаходитись у діапазоні 3–15 000 Гц. Нижній поріг оцінений, виходячи зі 100% внутрішньої кореляції між пірамідними нейронами, а верхній – із припущення, що активація пірамідних нейронів спонтанна. Отже, кожний інтернейрон у мережі отримує унікальний сигнал, що створює передумови для високої просторово-часової варіації, як для окремого нейрона, так і для мережі в цілому.

Ця стохастична мінливість достатньо складна для того щоб створювати численну кількість труднощів у процесі дослідження механізмів синхронізації в нейронних мережах. Це зумовлює необхідність застосування при вивченні процесів синхронізації різних спрощених математичних нейронних моделей, що описують передачу сигналів від пірамідних клітин до інтернейронів.

Дуже велике спрощення використане в дослідженнях Вонга (Traub et al., 1996; Wang and Buzsaki, 1996), в яких вхідний синаптичний сигнал змодельований за допомо-

гою постійного деполяризуючого струму, амплітуда якого змінювалась для різних інтернейронів у мережі. Величина просторової варіабельності не перевищувала 5%, але навіть незначні її зміни викликали різкий спад рівня синхронізації в мережі, що вказує на важливість мінливості сигналу, який надходить від пірамідних клітин. Складніша модель синаптичного струму реалізована за допомогою додавання до постійного струму білого шуму (Tiesinga and Jose, 2000). При цьому нейронна мережа демонструвала режими, в яких вона переходила до стану високої синхронізації. Але роль самого шуму в коливальних процесах не була досліджена.

Найбільш деталізований опис зовнішнього сигналу використаний у роботі (Maex and De Schutter, 2003): кожний нейрон отримував пресинаптичний струм від цілої популяції аферентних волокон. Спектр потужності вхідного сигналу мав універсальний розподіл і частота спайків варіювалась у діапазоні 50–1 280 спайків/с. У результаті продемонстровано, що частотний діапазон активності нейронної мережі не залежав від кількості вхідних волокон. Важливість фільтрувальних властивостей мережі в селективному відборі інформації, закодovаних у популяції нейронів, продемонстрована у праці (Akam and Kullmann, 2010).

Незважаючи на важливість структури вхідного сигналу в процесах синхронізації мережі інтернейронів, досі не було здійснено систематичних досліджень для зрозуміння того, як різні параметри зовнішнього збуджувального синаптичного струму впливають на амплітуду та частоту синхронізації мережі.

У наших попередніх роботах отримано залежність між частотою зовнішнього збуджувального стохастичного сигналу, частотою та синхронізацією в мережі. Продemonстрована можливість роботи нейронної мережі з шунтувальними синапсами як нелінійного частотного модулятора, що перетворює широкий діапазон частот зовнішнього стохастичного сигналу з пірамідних нейронів у вузький діапазон гамма-ритму (30–130 Гц). Також нами продемонстрована наявність «частотного вікна» – діапазону вхідної частоти синаптичного збудження, лише в межах якого мережа інтернейронів здатна згенерувати синхронізовані коливання (Kochubei et al., 2011). Але питання залежності синхронізації коливань у мережі інтернейронів від ступеня стохастичності вхідного сигналу залишилося відкритим.

Мета цієї роботи – за допомогою модельних досліджень встановити роль впливу синхронного та асинхронного сигналів від пірамідних нейронів на ступінь синхронізації електричних коливань у мережах ГАМКергічних інтернейронів гіпокампа.

Матеріал і методи досліджень

Аналіз біофізичних механізмів впливу синхронних і асинхронних зовнішніх електричних коливань на синхронізацію власних коливань у мережі інтернейронів проводили за допомогою математичного моделювання у спеціалізованому середовищі Neuron v 7.0 (Hines and Carnevale, 1997). Модель інтернейронної мережі гіпокампа основана на раніше опублікованій моделі

Бартоша та Йонаса (Vida et al., 2006). Вона мала кільцеву структуру з $n = 200$ окремих циліндричних інтернейронів діаметром і довжиною $L_{sc} = D_{sc} = 61,8$ мкм (рис. 1 а), що визначало площу поверхні $S \approx 12\,000$ мкм², відповідно до загальної сомато-дендритної площі інтернейрона пацюка (Turner, 1984).

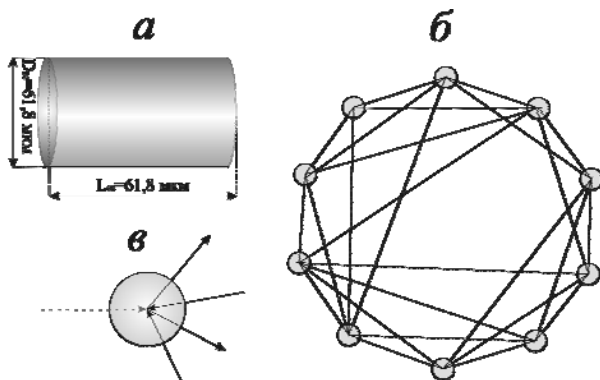


Рис. 1. Архітектура нейронної мережі:

а – циліндрична модель поодинокого інтернейрона, б – модель нейронної мережі з $n = 200$ нейронів (А), з'єднаних шунтувальними ГАМКергічними синапсами, в – напрямки входних та вихідних синаптичних контактів усередині мережі (суцільні стрілки) та зовнішнього збуджувального сигналу (пунктирна стрілка)

Кожний інтернейрон був випадковим чином з'єднаний із субпопуляцією зі 100 його найближчих сусідів (по 50 нейронів в обидва напрямки уздовж кільцевої моделі (рис. 1 б)) з імовірністю $p = M_{syn}/100 = 0,57$, де M_{syn} – середня кількість синаптичних входів до одного нейрона усередині мережі (Wang and Buzsaki, 1996). Така щільність зв'язків відповідає анатомічним даним щодо кількості синаптичних контактів в області сомат для парвальбумін-чутливих інтернейронів зони СА₁ гіпокампа (Sik et al., 1995; Gulyas et al., 1999).

Електрична динаміка інтернейронів описана за допомогою рівняння:

$$C_m \frac{dV}{dt} = -I_{Na} - I_K - I_L - I_{syn} + I_{app} \quad (1)$$

де $C_m = 1$ мкФ/см² – питома мембранна ємність, V – мембранний потенціал, I_{Na} та I_K – швидкі потенціал-залежні іонні струми натрієвих і калієвих каналів відповідно, I_L – неспецифічний струм витоку, I_{app} – зовнішній збуджувальний струм, I_{syn} – синаптичний струм зв'язків між інтернейронами усередині мережі. Кінетики та максимальні провідності іонних струмів модифіковані з механізму Ходжкіна – Хакслі (Hodgkin and Huxley, 1990), що дозволяло змодельовати поведінку височастотних гіпокампальних інтернейронів (Bartos et al., 2002).

Модель синапсу описана рівнянням:

$$I_{syn}(t) = G_m (\exp(-t/\theta_1) - \exp(-t/\theta_2)) \cdot (V(t) - E_0) \quad (2)$$

де $V(t)$ – мембранний потенціал, E_0 – рівноважний потенціал, G_m – максимальна синаптична провідність, θ_1 та θ_2 – часові константи активації та деактивації відповідно. Синапси між інтернейронами всередині мережі мали провідність $G_m = 0,5$ нСм та часові константи $\theta_1 =$

$0,16$ мс та $\theta_2 = 1,2$ мс (Bartos et al., 2001). Відносились до шунтувальних: синаптичний потенціал $E_0 = -59,0$ мВ знаходився в діапазоні між потенціалом спокою $E_{rest} = -64,6$ мВ і порогом генерації ПД $E_{tr} = -56,8$ мВ, що дозволяло значно поліпшити здатність мережі генерувати синхронні коливання (Vida et al., 2006). Збуджувальні синапси від пірамідних нейронів мали параметри $\theta_1 = 0,5$ мс та $\theta_2 = 5,0$ мс, $E_0 = 0$ мВ.

Кожний окремий інтернейрон отримував зовнішній незалежний збуджувальний струм від пірамідних клітин зони СА₁ (рис. 1 в). Він моделювався у вигляді стохастичного сигналу з пуасонівським розподілом часового інтервалу t_{syn} між подіями, що характеризувався середньою частотою f_{syn} та середньою постсинаптичною провідністю G_{syn} . Пуасонівський розподіл розраховували для часового інтервалу:

$$\Delta t = \left[\frac{1000}{f_{syn}} (1 - \alpha); \frac{1000}{f_{syn}} (1 + \alpha) \right] \text{ і } \tilde{n} \quad (3)$$

де α – змінний параметр, що визначав ступінь стохастичності вхідного сигналу.

У результаті моделювання мережеву динаміку представляли за допомогою растрограми – графік, по осі ординат якого відкладається порядковий номер нейрона в мережі, а по осі абсцис – час генерації ПД цим нейроном. Обробку даних проводили за допомогою додаткового програмного забезпечення, розробленого в математичному пакеті Matlab v7.0. Розраховували середню частоту коливань в мережі f_{net} , а також їх коефіцієнт синхронізації k . При обчисленні коефіцієнта синхронізації використовували крос-кореляцію для пар i та j нейронів із подальшим усередненням для усіх пар (Kochubei, 2009). Подальшу візуалізацію та аналіз усіх експериментальних даних проводили в математичному пакеті OriginPro v 8.0.

Результати та їх обговорення

У першій частині експерименту дослідили вплив на мережу інтернейронів повністю синхронізованого зовнішнього збуджувального струму. Для цього обрали параметр $\alpha = 0$, а згідно з (3) часовий інтервал $\Delta t = 0$. Отже, не існувало пуасонівського розподілу частоти у вхідному сигналі, і кожен інтернейрон у мережі отримував тотожний сигнал з однаковою частотою f_{syn} . Частоту збуджувального струму f_{syn} змінювали в діапазоні від 2 до 52 Гц із кроком у 4 Гц, кожного разу розраховували частоту та синхронізацію коливань у мережі, у результаті будували відповідні графіки залежностей (рис. 2 а та б відповідно).

Виходячи з отриманих результатів, можемо стверджувати, що при збільшенні частоти зовнішнього сигналу, частота коливань у мережі f_{net} монотонно зростає в межах 1,9–50,7 Гц (рис. 2 а), але її значення приблизно на 10% менші, ніж у зовнішньої частоти f_{syn} , що зумовлено шунтувальними ГАМКергічними зв'язками всередині мережі. Синхронізація коливань k , навпаки, зменшується з ростом частоти зовнішнього сигналу f_{syn} (рис. 2 б), але залишається в межах 0,98–0,92, що відповідає високосинхронізованим коливанням. Зменшення синхронізації коливань зумовлене тим, що

збільшення частоти викликало відповідне зростання загального збуджувального струму, що отримували інтернейрони мережі. При цьому мережа нейронів, працюючи як частотно-амплітудний модулятор (Kochubei et al., 2011), менше здатна до генерації синхронних коливань, навіть під впливом повністю синхронного збуджувального сигналу.

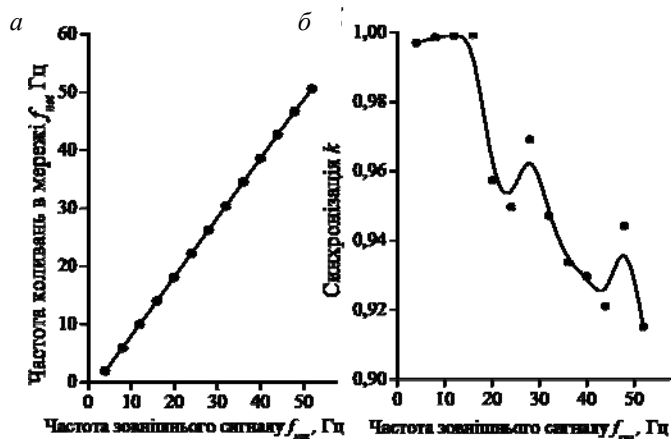


Рис. 2. Залежність частоти f_{net} (а) та синхронізації k (б) коливань у мережі інтернейронів від частоти зовнішнього збуджувального синаптичного струму f_{syn}

У наступній серії експериментів досліджували вплив асинхронного вхідного сигналу на коливання в мережі інтернейронів. Змінювали параметр α в межах 0,01–0,40, тим самим збільшували асинхронність вхідного струму. Для кожного значення α проводили серію модельних експериментів, змінюючи частоту вхідного сигналу f_{syn} в межах 2–58 Гц із кроком 2 Гц, кожного разу розраховували частоту f_{net} і синхронізацію k коливань у мережі інтернейронів.

Частота коливань у мережі інтернейронів (рис. 3 а), як і в попередній серії експериментів (рис. 2 а), також зростала зі збільшенням частоти синаптичного струму f_{syn} . Також, як і у випадку із синхронізованим синаптичним струмом, частота коливань в мережі f_{net} завжди залишалася меншою за частоту збудження f_{syn} . Але зі збільшенням параметра α , тобто зі зростанням рівня стохастичності синаптичного сигналу, відбувалося зростання різниці частот f_{net} та f_{syn} . При однаковій частоті зовнішнього сигналу (58 Гц) спостерігали поступове зменшення частоти коливань у мережі зі зростанням стохастичності сигналу (табл. 1).

Синхронізація коливань k у мережі поступово зменшувалась зі зростанням рівня стохастичності α та частотою f_{syn} зовнішніх коливань (рис. 3 б). Максимально синхронізовані коливання ($k = 0,89$) спостерігалися при частоті синаптичного збудження $f_{syn} = 6$ Гц і рівні стохастичності $\alpha = 0,001$. Для тієї ж частоти f_{syn} із подальшим зростанням параметра α рівень синхронізації стрімко зменшувався (табл. 2).

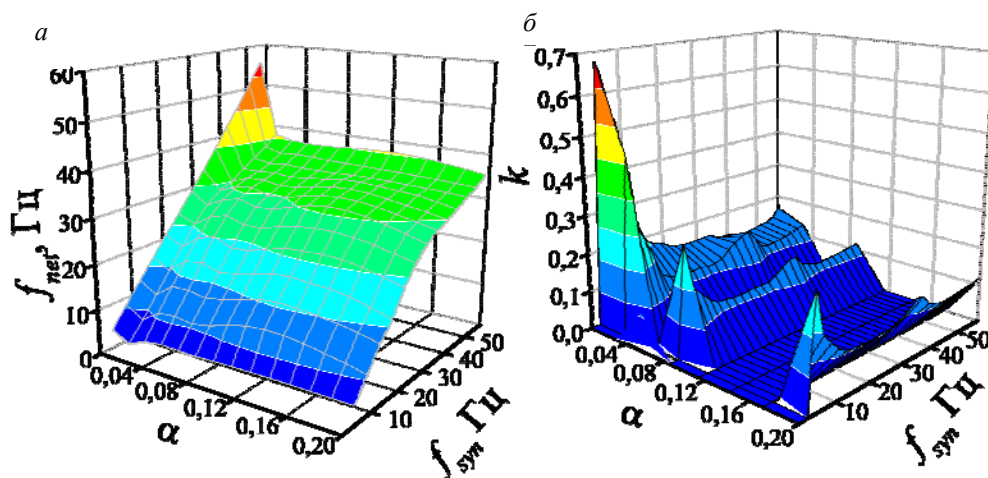


Рис. 3. Залежності частоти f_{net} (а) та синхронізації k (б) коливань у мережі інтернейронів від частоти f_{syn} і ступеня стохастичності α зовнішнього збуджувального синаптичного струму

Таблиця 1

Зменшення частоти коливань у мережі інтернейронів
зі збільшенням рівня стохастичності сигналу α при однаковій зовнішній частоті $f_{syn} = 58$ Гц

Ступінь стохастичності α	0,001	0,005	0,02	0,03	0,06	0,20
Частота в мережі f_{net} , Гц	55,64	40,04	39,97	37,47	37,01	35,76

Таблиця 2

Зменшення синхронізації коливань k у мережі інтернейронів
зі збільшенням рівня стохастичності сигналу α при однаковій зовнішній частоті $f_{syn} = 6$ Гц

Ступінь стохастичності α	0,001	0,005	0,01	0,02	0,03	0,06	0,10	0,20
Синхронізація коливань k	0,89	0,74	0,48	0,43	0,28	0,25	0,17	0,10

Також зробили порівняльний аналіз залежності рівня синхронізації k від частоти синаптичного сигналу f_{syn} для різних ступенів стохастичності α (рис. 4).

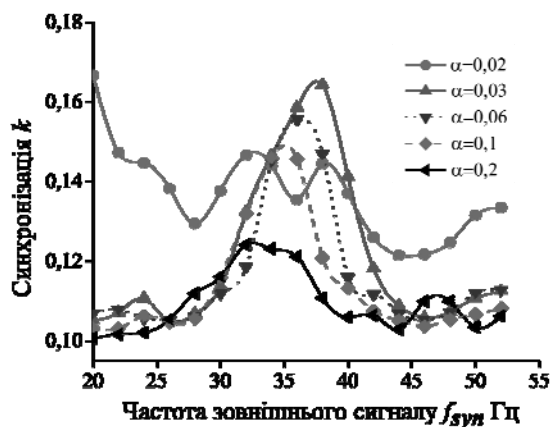


Рис. 4. Залежність синхронізації k коливань у мережі інтернейронів від частоти f_{syn} зовнішнього збуджувального синаптичного сигналу для різних рівнів α його стохастичності

Незалежно від рівня стохастичності сигналу α спостерігалось різке зростання синхронізації коливань у мережі в діапазоні частот f_{syn} 30–40 Гц, що підтверджує теорію щодо існування «частотного вікна» для вхідного збуджувального сигналу, у межах якого мережа здатна генерувати більш високосинхронізовані коливання (Kochubey et al., 2011). Коливання в мережі в цьому діапазоні вхідних частот знаходились також у межах 30–40 Гц, що відповідає початку діапазону гамма-ритму.

У результаті проведеного модельного дослідження спостерігали загальне зменшення синхронізації та частоти коливань у мережі інтернейронів при збільшенні рівня стохастичності зовнішнього збуджувального синаптичного сигналу, що їх викликає. Збільшення рівня стохастичності зумовлювало виникнення різниці у наборах вхідних сигналів, що отримував кожний інтернейрон, порівняно з випадком, коли зовнішній сигнал був повністю синхронізований (рис. 1). Це, у свою чергу, викликало виникнення різниці у власній частоті та фазі генерації коливань у кожному окремому інтернейроні в мережі. При слабкій стохастичності зовнішнього сигналу ($\alpha = 0,001$ – $0,010$), шунтувальні ГАМКергічні зв'язки всередині мережі здатні були синхронізувати генерацію в межах усієї популяції нейронів, рівень синхронізації коливань залишався в межах $k = 0,50$ – $0,89$. Але подальше зростання стохастичності зовнішнього синаптичного сигналу ($\alpha > 0,1$) спричинювало зрив синхронізації коливань ($k < 0,5$, рис. 4 а) на фоні подальшого зростання їх частоти (рис. 4 б). Шунтувальні ГАМКергічні зв'язки між інтернейронами здатні були синхронізувати окремі частини мережі, але не її роботу в цілому.

Висновки

Під впливом синаптичного збудження з боку пірамідних нейронів мережі інтернейронів гіпокампа з шунтувальними ГАМКергічними синапсами здатні генерувати синхронні коливання. За допомогою математичної моделі

дослідили зв'язок між параметрами синаптичного сигналу від пірамідних нейронів та сигналом у мережі інтернейронів. Збільшення ступеня стохастичності синаптичного збудження викликало поступове зменшення синхронізації та частоти коливань у мережі. Продемонстрували наявність «частотного вікна» в діапазоні вхідних частот, у межах якого відбувається різке зростання синхронізації коливань у мережі.

Отримані результати демонструють здатність мережі інтернейронів генерувати стійкі синхронізовані коливання за наявності неоднорідності у збуджувальному сигналі, а отримані залежності між ступенем стохастичності та рівнем синхронізації коливань у мережі можуть бути використані у подальших дослідженнях.

Бібліографічні посилання

- Akam, T., Kullmann, D.M., 2010. Oscillations and filtering networks support flexible routing of information. *Neuron* 67(2), 308–320.
- Bartos, M., Vida, I., Frotscher, M., Geiger, J.R., Jonas, P., 2001. Rapid signaling at inhibitory synapses in a dentate gyrus interneuron network. *J. Neurosci.* 21(8), 2687–2698.
- Bartos, M., Vida, I., Frotscher, M., Meyer, A., Monyer, H., Geiger, J.R., Jonas, P., 2002. Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(20), 13222–13227.
- Bibbig, A., Middleton, S., Racca, C., Gillies, M.J., Garner, H., Lebeau, F.E., Davies, C.H., Whittington, M.A., 2007. Beta rhythms (15–20 Hz) generated by nonreciprocal communication in hippocampus. *J. Neurophysiol.* 97(4), 2812–2823.
- Chiappalone, M., Vato, A., Berdondini, L., Koudelka-Hep, M., Martinoia, S., 2007. Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. *Int. J. Neural. Syst.* 17(2), 87–103.
- Del Percio, C., Le Pera, D., Arendt-Nielsen, L., Babiloni, C., Brancucci, A., Chen, A.C., De Armas, L., Miliucci, R., Restuccia, D., Valeriani, M., Rossini, P.M., 2006. Distraction affects frontal alpha rhythms related to expectancy of pain: An EEG study. *Neuroimage* 31(3), 1268–1277.
- Engel, D., Endermann, U., Frahm, C., Heinemann, U., Draguhn, A., 2000. Acute effects of gamma-vinyl-GABA on low-magnesium evoked epileptiform activity *in vitro*. *Epilepsy Res.* 40(2–3), 99–107.
- Fries, P., Scheeringa, R., Oostenveld, R., 2008. Finding gamma. *Neuron* 58(3), 303–305.
- Gulyas, A.I., Megias, M., Emri, Z., Freund, T.F., 1999. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 19(22), 10082–10097.
- Hines, M.L., Carnevale, N.T., 1997. The NEURON simulation environment. *Neural Comput.* 9(6), 1179–1209.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1990. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. *Bull Math Biol* 52(1–2), 25–71; discussion 25–23.
- Jeong, H.Y., Gutkin, B., 2007. Synchrony of neuronal oscillations controlled by GABAergic reversal potentials. *Neural Comput.* 19(3), 706–729.
- Kochubey, S.O., 2009. Features of synchronization coefficient calculation in neural networks [Osobennosti rascheta koeficienta sinhronizacii nejronnyh setej] *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 17(5), 55–62.

- Kochubey, S., Semyanov, A., Savtchenko, L., 2011. Network with shunting synapses as a non-linear frequency modulator. *Neural Netw.* 24(5), 407–416.
- Kohling, R., Vreugdenhil, M., Bracci, E., Jefferys, J.G., 2000. Ictal epileptiform activity is facilitated by hippocampal GABAA receptor-mediated oscillations. *J. Neurosci.* 20(18), 6820–6829.
- Maex, R., De Schutter, E., 2003. Resonant synchronization in heterogeneous networks of inhibitory neurons. *J. Neurosci.* 23(33), 10503–10514.
- Matyas, F., Freund, T.F., Gulyas, A.I., 2004. Convergence of excitatory and inhibitory inputs onto CCK-containing basket cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 19(5), 1243–1256.
- Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., Buzsaki, G., 1995. Hippocampal CA1 interneurons: An *in vivo* intracellular labeling study. *J. Neurosci.* 15(10), 6651–6665.
- Sik, A., Tamamaki, N., Freund, T.F., 1993. Complete axon arborization of a single CA3 pyramidal cell in the rat hippocampus, and its relationship with postsynaptic parvalbumin-containing interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 5(12), 1719–1728.
- Tallon-Baudry, C., Bertrand, O., 1999. Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation. *Trends Cogn. Sci.* 3(4), 151–162.
- Tallon-Baudry, C., Bertrand, O., Delpuech, C., Pernier, J., 1997. Oscillatory gamma-band (30–70 Hz) activity induced by a visual search task in humans. *J. Neurosci.* 17(2), 722–734.
- Tallon-Baudry, C., Bertrand, O., Peronnet, F., Pernier, J., 1998. Induced gamma-band activity during the delay of a visual short-term memory task in humans. *J. Neurosci.* 18(11), 4244–4254.
- Tiesinga, P.H., Jose, J.V., 2000. Synchronous clusters in a noisy inhibitory neural network. *J. Comput. Neurosci.* 9(1), 49–65.
- Traub, R.D., Whittington, M.A., Colling, S.B., Buzsaki, G., Jefferys, J.G., 1996. Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus *in vitro* and *in vivo*. *J. Physiol.* 493(2), 471–484.
- Turner, D.A., 1984. Segmental cable evaluation of somatic transients in hippocampal neurons (CA1, CA3, and dentate). *Biophys. J.* 46(1), 73–84.
- Van Der Werf, J., Jensen, O., Fries, P., Medendorp, W.P., 2008. Gamma-band activity in human posterior parietal cortex encodes the motor goal during delayed prosaccades and antisaccades. *J. Neurosci.* 28(34), 8397–8405.
- Vida, I., Bartos, M., Jonas, P., 2006. Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. *Neuron* 49(1), 107–117.
- Wang, X.J., Buzsaki, G., 1996. Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J. Neurosci.* 16(20), 6402–6413.

Надійшла до редколегії 01.12.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 632.62

Вредоносность нематоды *Longidorus leptcephalus* на ягодных культурах в условиях вегетационного опыта

Е.А. Рогожин

Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

Проведена оценка вредоносности нематоды *Longidorus leptcephalus* при ее различной численности на растениях земляники садовой (*Fragaria ananassa*) и ежевики сизой (*Rubus caesius*) в условиях вегетационного опыта. Растения земляники проявляли признаки оставания в росте относительно контрольных вариантов при средней численности *L. leptcephalus* 80 экз./100 г почвы, в то время как гибель 50% растений наблюдалась при 600 экз./100 г почвы. На растениях ежевики значительный эффект угнетения роста наблюдался при средней численности нематод в ризосфере 500 экз./100 г почвы, при этом гибели растений отмечено не было.

Ключевые слова: вредители ежевики; вредители земляники; фитопатогенные нематоды; *Longidorus leptcephalus*; Longidoridae; Dorylaimida

Pathogenicity of the nematode *Longidorus leptcephalus* towards berry plants in vegetative environments

Е.А. Rogozhin

Center of Parasitology A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Evaluation of the pathogenicity of the nematode *Longidorus leptcephalus* measured by the variation in its numbers on strawberry (*Fragaria ananassa*) and blackberry (*Rubus caesius*) plants in vegetative environments was carried out. As a result we demonstrated that strawberry plants developed symptoms of backwardness in their growth relative to controls with an average number of 80 individual nematodes per 100 g of soil and 50% plant death for strawberries was recorded at a level of 600 nematodes per 100 g of plant rhizosphere. On blackberry plants a significant effect of growth-inhibition was found at a level of 500 individuals per 100 g of soil, but plant death was not registered.

Keywords: blackberry pathogen; strawberry pathogen; phytopathogenic nematode; *Longidorus leptcephalus*; Longidoridae; Dorylaimida

Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Ленинский проспект, 33, 119071, Москва, Россия
Center of Parasitology A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution Russian Academy of Sciences,
Leninsky prospect, 33, 119071, Moscow, Russia. Tel.: +7963-697-57-97. E-mail: globodera@gmail.com

Введение

Достаточно большой спектр представителей стилетных и копьеносных нематод из отрядов Aphelenchida, Tylenchida и Dorylaimida способен развиваться на ягодных культурах и причинять им вред. Из числа паразитов корневой системы отмечены нематоды семейств Meloidogynidae, Hoplolaimidae, Pratylenchidae, Telotylenchidae, Criconematidae, Hemicycliophoridae, Longidoridae и Trichodoridae (Kirjanova and Krall, 1971). Одними из наиболее опасных вредителей ягодных культур являются эктопаразитические почвенные нематоды семейства Longidoridae (отряд Dorylaimida). Представители этого семейства – существенные вредители корневой системы растений. Они имеют широкий спектр растений-хозяев и большую продолжительность жизни. Лонгидориды и связанные с ними вирусы распространены фактически повсеместно. Они обнаружены на всех континентах и встречаются в естественных и трансформированных экосистемах. Данные нематоды паразитируют на всех сельскохозяйственных культурах: зерновых, овощных, плодовоягодных, кормовых, декоративных, технических, эфиромасличных и лесных. Известно много фактов гибели растений от лонгидорид. Лонгидориды вызывают некротизацию и гибель отдельных корневых участков, в результате их питания образуются галлы. При этом рост надземных частей растений угнетается, они становятся хлоротичными и могут увядать. Молодые растения нередко погибают, при этом на полях можно наблюдать очаги «выпадов». Кроме того, некоторые из известных видов лонгидорид являются переносчиками опасных вирусных болезней растений (Husainov, 2012). Главный ущерб растениям от лонгидорид связан с их ослаблением и общим снижением вегетативной массы, что в конечном итоге существенным образом влияет на урожайность и качество продукции.

Одним из наиболее экономически значимых видов из данного семейства является *L. leptocephalus*. Его биология практически не изучена. Размножение происходит партеногенетически, самцы встречаются крайне редко. Является полифагом, питается на растениях более чем 12 семейств (Sturhan, 1963; Evans and Pande, 1972; Cooke, 1973; Liskova and Brown, 1995, 1997; Kumari and Decraemer, 2007). В России вид обнаружен в Московской (Tomilin, 1991), Рязанской, Тамбовской и Белгородской (Prihodko, 1988) областях.

В связи с этим цель нашего исследования – оценить степень вредоносности нематоды *L. leptocephalus* на двух ягодных культурах – землянике садовой и ежевике сизой – в условиях вегетационного опыта.

Материал и методы исследований

Для оценки вредоносности использовали нематод, выделенных из ризосферы ивы (*Salix fragilis*) в пойме реки Ока близ города Щурово Московской области. В качестве ягодных культур использовали землянику садовую (*Fragaria ananassa* var sp.) и ежевику сизую (*Rubus caesius*). Для вегетационного опыта использовали пластиковые горшки объемом 2 л. Почву стерилизовали

в паровом стерилизаторе («Фармстандарт», Россия) при температуре 132 °C 1,2 атм. в течение 1 ч. Затем добавляли речного песка и специального подкормочного грунта («TerraVita», Италия). Таким образом, субстрат состоял из 80% пропаренной почвы, 10% песка и 10% подкормочного грунта. Землянику укореняли путем отведения усов от материнских растений, предварительно проверенных на отсутствие патогенов и вредителей.

В фазу «формирования розетки листьев – до начала цветения» в хорошо увлажненную почву близ основания нарастающих молодых листьев обычной пипеткой вносили, соответственно, по 20, 30 и 40 экз. нематод с двух сторон. Опыт включал 4 варианта и контроль. Каждый опыт проводился в 4-кратной повторности. Уход за растениями заключался в регулярном поливе в поддоны отстоявшейся водопроводной водой, а также защитных мероприятиях в виде двукратной обработки растений инсектицидом Децис, КЭ (25 г/л), с целью исключения возможного угнетения и гибели растений от других патогенов и вредителей.

Оценку степени вредоносности при заданной численности проводили визуально по характерным симптомам угнетения растений через 10 дней после внесения нематод в почву близ растений, пока численность фитопаразита не начала увеличиваться. Влияние нематод на продуктивность растений оценивали по количеству цветоносов (цветение продолжается 1,0–1,5 мес.) и средней массе ягод с одного растения. Влияние на урожайность (рост ягод продолжается 2,5 мес.) оценивали через 45 дней путем подсчета имеющейся на тот период численности патогена.

Результаты и их обсуждение

В вариантах при численности 20 и 30 экз./100 г почвы соответственно какие-либо признаки угнетения растений земляники не наблюдались. При численности 40 экз./100 г почвы имело место незначительное подавление растений, которое выражалось в замедлении роста. По истечении одного месяца с начала вегетации начиналось значительное угнетение растений, которое выражалось в замедлении роста, карликовости и небольшой деформации листовых пластинок (рис.). Данные симптомы имели место при численности более 400 экз./100 г почвы. Сильно ослабленные растения земляники не давали усов. Урожайность ягод снижалась в среднем на 30% по сравнению с контролем. Гибели растений при этом не наблюдалось. При увеличении численности в среднем до 600 экз./100 г почвы отмечалась 50% гибель растений. Растения в контрольных вариантах имели буйный рост, хорошее ягодообразование и наличие усов.

Растения ежевики проявляли большую устойчивость к патогенности нематод, чем земляника садовая. Угнетение растений не наблюдалось ни в одном из вариантов с заданной численностью нематод. Значительное ингибирование роста растений начиналось только при численности нематод в ризосфере 500 экз./100 г почвы. Растения отставали в росте, листья имели хлоротичный вид. Однако гибели растений ни в одном из вариантов не наблюдалось.



Рис. Вредоносность *L. leptocephalus* на растениях земляники садовой:
слева – контроль, справа – пораженный куст

Согласно литературным данным по изучению вредоносности нематод рода *Longidorus*, вид *L. elongatus* в условиях вегетационного опыта при плотности популяции нематод в 65 экз./100 г почвы вызывал 50–80% потери урожая для некоторых зерновых культур (Semkina, 1976). В опытах В.Л. Филенко (Filenko, 1984), при численности нематод данного вида в 10 экз./100 г почвы и больше происходило угнетение растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) со снижением массы корнеплодов в среднем на 16%. При численности *L. elongatus* 170 экз./100 г почвы рост растений земляники приостанавливается, а при большей численности растения полностью погибают (Sturhan, 1960). В ризосфере корней земляники на плантациях Болгарии, помимо комплекса галловых и корневых мигрирующих нематод, обнаружено два представителя рода *Longidorus*: *L. coespiticola* и *L. elongatus* (Samaliev and Mohamedova, 2011). Из распространенных в нашей стране видов лонгидорусов вредоносность на культурных растениях отмечена также для *L. profundorum* и *L. vineicola* (Husainov, 2012).

Партеногенетический вид *L. leptocephalus* имеет широкое распространение на территории Европейской части, как и *L. elongatus* (Husainov, 2012). В научной литературе недостаточно данных о вредоносности этого вида на различных сельскохозяйственных культурах. За рубежом *L. leptocephalus* вместе с *L. attenuatus* и *L. elongatus* причиняет значительный ущерб посевам сахарной свеклы (Cooke, 1973), а также приводит к снижению урожайности картофеля (Evans, 1974).

Особое значение для защиты растений, особенно при получении элитных сортов, имеет способность *L. leptocephalus* к распространению фитовирусов. Этот вид способен переносить английский штамм кольцевой пятнистости малины (*Raspberry ringspot virus*, RRSV) (Valdez, 1972). Данный вирус является одним из наиболее вредоносных заболеваний малины. Проявляется в виде кольчатости, хлороза жилок, мозаичности листьев и карликовости. Из хозяйственно значимых растений поражаются малина, земляника, крыжовник, красная смородина, вишня и виноград. В целом, спектр растений

хозяев насчитывает представителей 10 различных семейств (Harris et al., 2002). Вирус переносится многими лонгидоридами (*L. caespiticola*, *L. elongatus*, *L. leptocephalus*, *L. macrosoma*, *Paralongidorus maximus*, *Xiphinema brevicollum*, *X. diversicaudatum*). Вирусные частицы могут сохраняться в нематode *L. elongatus* на протяжении двух месяцев (Murant and Lister, 1967).

Выводы

Данных по численности нематод *L. leptocephalus*, а также показателей степени угнетенности растений и средней массы ягод, полученных только в условиях вегетационных опытов, явно недостаточно, так как в естественных условиях при достижении высоких критических значений численности популяции может происходить ее саморегуляция, а также снижение численности за счет влияния естественных внешних и внутривидовых факторов при развитии на растении-хозяине.

Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 11-04-01514-а).

Библиографические ссылки

- Cooke, D.A., 1973. The effect of plant parasitic nematodes, rainfall and other factors on docking disorder of sugar beet. *Plant Pathology* 22(4), 161–170.
- Evans, K., 1975. Nematode problems in the ley-arable rotation experiment, Woburn. In: Jones, F.G.W. *Nematology Department. Report Rothamsted Experimental Station for 1974*. 1, 184–185.
- Evans, K., Pande, L.U., 1972. Needle nematodes at Woburn. In: Jones, F.G.W., *Nematology Department. Report Rothamsted Experimental Station for 1971*. 1, 175.
- Filenko, V.L., 1984. *Jekologo-biologicheskie osobennosti Longidorus elongatus pri parazitirovanii na saharnoj svekle* [Ecological and biological features of *Longidorus elongatus*

- when parasitizing on sugar beet]. Avtoref. diss. ... kand. biol. science. Moscow.
- Harris, A., Gibbs, A.J., Gibbs, M.J., 2002. Nepoviruses and their diagnosis in plants: A novel polymerase chain reaction diagnostic test for nepoviruses in nursery stock. Dept. of agriculture, fisheries and forestry. Biosecurity Australia.
- Husainov, R.V., 2012. Glava 6. Jektoparaziticheskie nematody kornevoj sistemy rastenij otrjadov Dorylaimida i Triplonchida [Chapter 6. Ectoparasitic nematodes root system of plants from orders Dorylaimida and Triplonchida]. In: Fitoparaziticheskie nematody Rossii. Pod red. Zinov'eva, S.V., Chizhov, V.N. [Plant parasitic nematodes of Russia. Ed. Zinoviev, S.V., Chizhov, V.N.]. KMK, Moscow 308–380.
- Kirjanova, E.S., Krall, J.L., 1971. Paraziticheskie nematody rastenij i mery bor'by s nimi [Plant parasitic nematodes and their control]. Nauka, Leningrad 2.
- Kumari, S., Decraemer, W., 2007. The genius *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) from Bohemia and South Moravia in the rhizosphere of fruit orchards and vineyards. *Helminthologia* 44(4), 193–203.
- Liskova, M., Brown, D.J.F., 1995. The occurrence and distribution of *Longidorus leptcephalus* (Nematoda: Dorylaimida) in the Slovak Republic with comment on the putative “large” and “small” forms. *Nematologia Mediterranea* 23(3), 315–320.
- Liskova, M., Brown, D.J.F., 1997. Some data on Longidoridae (Nematoda) in the soil of forest stands in Slovakia. *Folia Dendrologica* 1–2, 137–144.
- Murant, A.F., Lister, R.M., 1967. Seed-transmission in the ecology of nematode-borne viruses. *Ann. Appl. Biol.* 59(1), 63–76.
- Prihodko, J.N., 1988. Biologicheskie aspekty obosnovanija protivonematodnyh meroprijatij v pitomnikah i molodyh sadah jabloni v uslovijah srednej polosy RSFSR [Biological aspects of nematode control activities in nurseries and young orchards of apple trees in the middle zone of the Russia]. Avtoref. diss. ... kand. agricult. science. NIZISNP, Moscow.
- Samaliev, H.Y., Mohamedova, M., 2011. Plant parasitic nematodes associated with strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) in Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.* 17(6), 730–735.
- Semkina, A.I., 1976. Vlijanie nematody *Longidorus elongatus* (Nematoda: Longidoridae) na urozhaj nekotoryh sel'skohozhajstvennyh kul'tur [Effect of nematodes *Longidorus elongatus* (Nematoda: Longidoridae) on the yield of some agricultural crops]. Tez. dokl. i soobshh. VIII Vsesojuznogo soveshhanija po nematodnym boleznam s.-h. kul'tur [Proc. of reports and posts. VIII All-Union Conference on nematode diseases of agricultural cultures]. Shtiinca, Kishinev, 28–29.
- Sturhan, D., von Krosigk, C., 1960. Nematoden an Erdbeeren in Bayern. *Planzenschutz* 12(5), 78–80.
- Sturhan, D., 1963. Beitrag zur Systematic der Gattung *Longidorus*. *Nematologica* 9(1), 131–142.
- Tomilin, A.A., 1991. Nepo-virusy i ih perenoschiki nematody-longidoridy na jagodnyh kul'turah v Evropejskoj chasti SSSR i mery bor'by s nimi [Nepo viruses and their vectors – nematodes of the Longidoridae family – on berry crops in the European part of the USSR and their control]. Avtoref. diss. ... kand. agricult. science. Moscow.
- Valdez, R.B., 1972. Transmission of raspberry ringspot virus by *Longidorus caespiticola*, *L. leptcephalus* and *X. diversicaudatum* and of arabis mosaic virus by *L. caespiticola* and *X. diversicaudatum*. *Ann. Appl. Biol.* 71, 229–234.

Надійшла до редколегії 03.12.2013



УДК 577.1:638.138(045)

Белково-липидный состав пыльцы березы бородавчатой (*Betula verrucosa*) и ее антиоксидантная активность в зависимости от места произрастания

Т.В. Шевцова¹, Е.Г. Гаркавая¹, Я. Бриндза², Т.С. Брюзгина³, В.А. Гроза¹

¹Національний авіаційний університет, Київ, Україна

²Словацкій аграрний університет, Нітра, Словачка Республіка

³Національний медичний університет імені А.А. Богомольця, Київ, Україна

Исследованы белковый и липидный состав и биологическая активность 10 образцов пыльцы *Betula verrucosa* Ehrh. из разных мест произрастания на территории Украины и Словакии. Определено содержание белков (17,9–25,6%) и 8 жирных кислот (с числом углеродных атомов от 14 до 20) в составе липидов. Выявлено преобладание ненасыщенных жирных кислот (58,6%) с доминированием пальмитиновой (33,9%), олеиновой (29,5%) и линолевой (27,8%). Оценена общая антиоксидантная активность водных, этаноловых и метаноловых экстрактов пыльцы березы бородавчатой с использованием свободного стабильного радикала дифенилпикрилгидразила колориметрически в реакции *in vitro*. Установлены статистически достоверные различия между образцами как внутри украинских и словацких генотипов, так и между ними. Рассматриваются факторы влияния на вариации белково-липидного состава пыльцы и ее биологической активности.

Ключевые слова: пыльца; белок; жирнокислотный состав липидов; общая антиоксидантная активность; радикал ДФПГ

Protein-lipid composition of silver birch (*Betula verrucosa*) pollen and its antioxidant activity depending on habitat

T. Shevtsova¹, E. Garkava¹, J. Brindza², T. Brjuzgina³, V. Groza¹

¹National Aviation University, Kiev, Ukraine

²Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic

³Bogomolets National Medical University, Kiev, Ukraine

Pollen has various effects on the human body. In order to study and compare the biological activity of the mature pollen grains of *Betula verrucosa* Ehrh. we investigated the protein-lipid composition and total antioxidant activity (TAA) of 10 samples from different habitats in the territory of Ukraine and the Slovak Republic. The collection sites are near highways and apartment blocks, as well as a nature reserve, forest and botanical garden. The protein content was determined by the Kjeldahl method. A chromatographic analysis of fatty acids from lipids was performed using a "Cvet 500" gas chromatograph, equipped with a flame-ionization detector in the isothermal mode. The bioactivity of aqueous, ethanol and methanol extracts of pollen grains was evaluated by the DPPH free radical scavenging method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) by means spectrophotometry *in vitro*. The protein content of the pollen of *B. verrucosa* ranged from 17.9% to 25.6%, depending on the habitat. Unsaturated fatty acids were found in higher amounts than saturated fatty acids. The profile of fatty acids indicates a higher content of palmitic (33.9%), oleic (29.5%) and linoleic (27.8%) acids and a low content of arachidonic (0.4%) and pentadecanoic

¹Національний авіаційний університет, пр. Космонавта Комарова, 1, 03680, Київ, Україна
National Aviation University, Kosmonavta Komarova ave. 1, 03680, Kiev, Ukraine
Tel.: +38097-801-02-50. E-mail: shevtsovat@ukr.net, immunolog@ukr.net

²Словацкій аграрний університет, Інститут охорони біорізноманітності та біологічної безпеки,
Триєда А. Глінку 2, 949 76, Нітра, Словачія
Slovak University of Agriculture, Institute of Biodiversity Conservation and Biosafety, Trieda A. Hlinku 2, 949 76, Nitra, Slovakia
Tel.: +42137-641-47-87. E-mail: Jan.Brindza@uniag.sk

³Національний медичний університет імені А.А. Богомольця, пр. Перемоги, 34, Київ, Україна
Bogomolets National Medical University, Pobeda avenue, 34, Kiev, Ukraine. Tel.: +38044-454-49-17

(0.8%) acids. We also established that silver birch pollen is characterized by high antioxidant activity. The measured value of TAA for aqueous pollen extracts was within 74.8–85.5%. For the ethanol extracts it was quantified within 60.3–95.0% and for the methanol extracts – 46.1–92.6%. The Tukey test was used to determine the differences between the means at a level of $P < 0.05$. A strong correlation coefficient (0.70) was defined between the protein content and the TAA of aqueous extracts. In general, the Ukrainian and Slovak samples of pollen differ in the fatty acid composition of lipids and aqueous and ethanol TAA extracts. Pollen of *B. verrucosa* should be used for diagnostic, therapeutic and prophylactic purposes as close as possible to the place of origin.

Keywords: pollen; protein; fatty acid composition of lipids; total antioxidant activity; DPPH radical

Введение

Ценность пыльцы состоит не только в обеспечении репродукции растений. Основываясь на современных знаниях, пыльца – источник энергии и питательных веществ. Определенное качественное и количественное содержание органических и неорганических соединений показывает, что пыльца представляет собой сложную и разнообразную биохимическую систему. Биохимические исследования природной пыльцы, то есть пыльцы, полученной при ручном сборе цветов, подтверждают, что пыльцевые зерна имеют очень богатый состав по сравнению с другими клетками растительного организма. В настоящее время растет интерес к использованию пыльцы в различных областях, особенно в области медицины и косметологии, благодаря не только ее высокой калорийности и питательной ценности, но и содержанию природных соединений с антибактериальными и другими эффектами (Brovarskij and Brindza, 2010). К предполагаемым и хорошо подтвержденным биологическим свойствам пыльцы принадлежат антибиотическое, антиоксидантное, противовоспалительное, гиполипидемическое (антисклеротическое), антипростатическое, антигепатотоксическое, а также антидотное (после интоксикации сильными токсинами) и антианемическое действия. В последние годы обнаружены и изучены (в основном в испытаниях на животных) другие свойства пыльцы: иммунорегулирующие, иммуносупрессивные, антиаллергенные, противоопухолевые, антиангиогенные (подавляет рост новых кровеносных сосудов), обезболивающие при действии на нервную систему и мочевыводящие пути, а также замедление старения человеческого тела (Kedzia and Holderna-Kedzia, 2012).

Различия в питательной ценности предопределяют специфичность химического состава пыльцевых зерен каждого из видов растений. Также биохимический состав пыльцы зависит и от условий произрастания растений (почвенные и климатические условия, особенно во время роста и созревания пыльцы в пыльниках) и физиологической степени зрелости пыльцы (Brovarskij and Brindza, 2010). В процессе развития и созревания в пыльце происходит ряд цитохимических изменений. Ее биологическая ценность зависит от продолжительности и способа хранения, в течение которых может произойти нежелательное изменение биохимического состава. В значительной степени верно и то, что содержание химических веществ богаче в пыльце энтомофильных растений по сравнению с пыльцой анемофильных. В последние годы биохимические исследования проводятся чаще с пчелиной пыльцой, то есть пыльцой, собранной и обработанной пчелами (Brovarskij and Brindza, 2010).

Береза бородавчатая (*Betula verrucosa* Ehrh., син. *B. pendula* Roth.) принадлежит к ветроопыляемым растениям. Ее пыльца – частый объект научных исследова-

ний, посвященных изучению аллергенных свойств, моделированию для прогнозирования распространения пыльцы, созданию рекомбинантных аллергенов и экологической оценки состояния урбанизированных территорий (палиноиндикация) (Emilson et al., 1996; EI-Ghazaly et al., 1999; Cotos-Yáñez et al., 2004; Mothes and Valenta, 2004; Dzjuba, 2006; Pomes, 2008; Puc, 2012). Но человек с древнейших времен использовал пыльцу растений в своем рационе, и только с середины XIX века пыльца в воздухе была признана вредной для здоровья многих людей (Stanley and Linskens, 1974).

Пыльца березы – природный концентрат витаминов, микроэлементов и фитонцидов, благодаря чему является ценным продуктом питания и лечебным средством (Mironenko, 2002). Danikov (1993) обобщил многовековой опыт официальной и народной медицины. В книге «Дерево жизни. Все о целебных свойствах березы» он описывает целебные свойства березовой пыльцы. Это исключительно сильное целебное средство, регулирующее функции пищеварительного тракта, психическое состояние, помогающее при сильном истощении, эффективное при анемии и простатите. Пыльца березы – прекрасный антибиотик, обладающий способностью останавливать развитие многих микроорганизмов, с трудом поддающихся уничтожению и являющихся возбудителями многих кишечных заболеваний. Пыльца – известное косметическое средство. Экстракт соцветий березы содержит вещества с тромбопластической активностью. В эксперименте на животных он проявляет кровоостанавливающее действие и рассматривается как перспективное гемостатическое средство. Настойку мужских (тычиночных соцветий) применяют при заболеваниях сердца, язвенной болезни желудка, гастритах, экземах, фурункулезе и анемии (Kucik and Zuzuk, 2001). Предсезонное употребление меда с березовой пыльцой чувствительными к ней пациентами рассматривается как дополнительный метод лечения аллергических заболеваний (Saarinen et al., 2011).

Для конкретного использования пыльцы должен быть оценен состав биологически активных компонентов. Антиоксидантная активность – один из способов оценки биологической активности (Lubsandorzhieva, 2009; Graikou et al., 2011; Pascoal et al., 2014). Интерес в определении антиоксидантной активности различных веществ растительного происхождения увеличивается (Brovarskij and Brindza, 2010). Антиоксидантами являются витамины E, C, каротиноиды, флавоноиды и другие вещества фенольной природы (Antal, 2010; Sen et al., 2011). Зачастую определяют общую антиоксидантную активность (ОАА) при совместном действии составных вещества. Согласно Campos et al. (2003), антиоксидантная активность пыльцы в значительной степени – результат действия фенольных соединений и флавоноидов, которые обладают способностью поглощать сво-

бодные радикалы (хотя и другие составляющие, такие как белки и витамины, могут также усиливать это свойство). Другие внешние факторы (растворитель, используемый для экстракции, продолжительность экстракции и методы хранения пыльцы) играют важную роль в регистрации биологической активности (Chantarudee et al., 2012). Сильная антиоксидантная активность, наблюдаемая *in vitro*, не может адекватно проявляться в условиях *in vivo* (Campos et al., 2003; Brovarskij and Brindza, 2010).

Методы определения антиоксидантной активности подразделяются на две большие группы: (1) основанные на ликвидации радикалов и (2) основанные на оценке окислительно-восстановительных свойств веществ (Brovarskij and Brindza, 2010). К первой группе относится метод с использованием стабильного радикала ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), который рассматривается как одна из основных методик оценки антирадикальной активности продуктов пчеловодства (Campos et al., 2003; Lee et al., 2009; LeBlanc et al., 2009; Brovarskij and Brindza, 2010; Basuny et al., 2013). Метод основан на учете передачи электронов от антиоксиданта свободному радикалу ДФПГ, который при этом изменяет свою окраску с фиолетовой на желтую, что фиксируется спектрофотометрически (Saeheng et al., 2012).

С целью определения биологической активности зрелой пыльцы *B. verrucosa* Ehrh. исследованы содержание белков и жирнокислотный состав липидов, определена общая антиоксидантная активность водных, этаноловых и метаноловых экстрактов пыльцы из различных мест произрастания. Ранее авторы сообщали о частично проведенных исследованиях антиоксидантной активности пыльцы березы бородавчатой (Shevcova et al., 2012). Исследование было расширено.

Материал и методы исследований

Растительный материал

Пыльца *B. verrucosa* Ehrh. заготовлена на территории Украины до начала пыления в период с 18 по 24 апреля 2011 г. и на территории Словакии в период с 15 по 21 апреля 2013 г. Выбор мест заготовки пыльцы березы бородавчатой основывался на подборе различных условий роста деревьев, степени антропогенной нагрузки, принадлежности к различным «чернобыльским зонам» на территории Украины, а также относительно близком расположении друг от друга для возможности заготовки образцов пыльцы в период цветения березы бородавчатой. Всего заготовлено 7 украинских образцов пыльцы и 3 словацких: BV1 – г. Киев (пыльца собрана с берез, растущих в парковой зоне); BV2a и BV2b – г. Переяслав-Хмельницкий Киевской обл., расположен на расстоянии 112 км на юго-запад от г. Киев (образец BV2a заготовлен на территории жилого массива вблизи автомобильных дорог; образец BV2b – на территории Музея народной архитектуры и быта под открытым небом как контрольный); BV3 – с. Хоцьки Киевской обл. в 120 км юго-западнее г. Киев (пыльца собрана с берез, растущих на отдельных полянах в лесу; также считали контрольным образцом); BV4 – пгт. Иванков Киевской обл., относящийся к III чернобыльской зоне согласно данным

Министерства по вопросам чрезвычайных ситуаций и защите населения от последствий Чернобыльской катастрофы Украины (2008) и находится в 80 км северо-западнее г. Киев (пыльца собрана с берез, растущих возле автомобильных дорог и жилых домов); BV5 – г. Кузнецовск Ривненской обл., относящийся к IV чернобыльской зоне, расположен на расстоянии 339 км к западу от г. Киев (пыльца собрана с берез, растущих возле леса вблизи автомобильной трассы). На территории города функционирует Ривненская атомная электростанция; BV6 – аэродром «Бородянка» 2 км к северу от пгт. Бородянка Киевской обл., также относится к IV чернобыльской зоне, расположен на расстоянии 30 км на северо-запад г. Киев (пыльца собрана с берез, растущих возле аэродрома). Словацкие образцы пыльцы заготовлены в г. Нитра, Нитранский край: BV7 – пыльца собрана с березы, растущей возле автомобильной дороги; BV8 – пыльца собрана с березы на территории Ботанического сада Словацкого аграрного университета; BV9 – пыльца собрана с берез на территории жилого массива вблизи автомобильных дорог.

Пыльцу сушили при комнатной температуре в тени и сохраняли в морозильной камере при температуре -7°C .

Определение состава белков

Для исследования состава белков образцы пыльцы были направлены в экологическую лабораторию EL spol. s r.o., Spišská Nová Ves, Словакия. Их содержание определяли по общепринятому методу Кьельдаля. Результаты представлены в форме $x \pm Sx$.

Определение жирнокислотного состава липидов

Исследование проводили в Институте проблем патологии при Национальном медицинском университете имени А.А. Богомольца. Жирнокислотный состав липидов определяли методом газожидкостной хроматографии (Gubs'kyj et al., 2005). Навеску пыльцы березы бородавчатой 0,3–0,5 г переносили в мерную пробирку объемом 10 мл и заливали экстрагирующей смесью. Общие липиды тканей экстрагировали 5 мл хлороформ-метаноловой смесью в соотношении 2 : 1 и выдерживали 30 мин в холодильнике. Для лучшего распределения фаз добавляли 1 мл дистиллированной воды. Далее отбирали хлороформную нижнюю фазу пипеткой Пастера. Для полной реакции этап экстракции повторяли дважды. Объединенные хлороформные экстракты концентрировали выпариванием к объему одной капли под струей газообразного азота при температуре 45°C на водяной бане. Для проведения гидролиза и метилирования высших жирных кислот липидов тканей к сухому осадку липидов добавляли 5 мл 1% H_2SO_4 в метаноле. Раствор переносили в стеклянную ампулу емкостью 10 мл. После запайки проводили гидролиз и метилирование в термостате при температуре 85°C в течение 20 мин. Экстракцию этилированных жирных кислот проводили дважды гексан-эфирной смесью в соотношении 1 : 1 в количестве 5 мл. Для разделения фаз добавляли 1 мл дистиллированной воды. Отбирали верхнюю фазу пипеткой Пастера. Объединенные экстракты упаривали досуха в токе азота при температуре 45°C на водяной бане. Сухой осадок растворяли в 40–50 мкл чистого гексана и вводили в испаритель хроматографа серии «Цвет-

500» в количестве 5 мкл. Для определения спектра жирных кислот липидов использовали стеклянную колонку (3,0 м x 0,3 см), заполненную фазой 5% полиэтиленгликоль сукцината на хромотоне N-AW-HMDS (зернирование 0,125–0,160 мм) при температурах: колонки – 190 °C, испарителя – 250 °C, при затратах азота и водорода – 35 мл/мин, воздуха – 200 мм/ч.

Количественную оценку спектра жирных кислот липидов проводили методом нормирования путем измерения площади пиков этилированных производных жирных кислот и определения их состава в процентах (%). Ошибка определения составляет 10%.

Определение общей антиоксидантной активности

Исследование проводили в Институте сохранения биоразнообразия и биологической безопасности при Словацком аграрном университете в Нитре. Общую антиоксидантную активность пыльцы оценивали по уровню свободных радикалов, после реакции ДФПГ ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,33$), 0,025 г растворенного в 100 мл метанола, с образцом пыльцы березы бородавчатой по модифицированной методике Y.-T. Kao (Kao et al., 2011). Для приготовления экстрактов использовали три растворителя: дистиллированную воду комнатной температуры, 100% метанол и 70% этанол. Такие концентрации метанола и этанола были выбраны в результате анализа информации из литературных источников (Carpes et al., 2007; LeBlanc et al., 2009; Agadzhanjan et al., 2009). Пыльцу каждого образца (5 г) растворяли в 100 мл растворителя в течение 2 ч перемешиванием на механической мешалке Kavalier LT-2. Время оптимальной экстракции было подобрано путем серии экспериментов. После экстракции и фильтрации экстракта, надосадочную жидкость в количестве 0,1 мл смешивали с рабочим раствором ДФПГ в количестве 3,9 мл и измеряли кинетику реакции фотокolorиметрическим методом на спектрофотометре серии «Genesys 20», модель 4001/4. Метаноловый раствор ДФПГ имеет интенсивное фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при длине волны 515 нм. В результате реакции фиолетовая окраска переходит в светло-желтую. Результат фиксировали через 10 мин протекания реакции в темноте. Процент общей антиоксидантной активности (ОАА) рассчитывали по следующей формуле: $OAA = [(контроль - образец) / контроль] \cdot 100\%$.

Все измерения ОАА проводили в пятикратной повторности. Математическую обработку результатов измерений осуществляли по общепринятым методикам (Urbah, 1963). При анализе данных использовали методы дисперсионного анализа (ANOVA), а для оценки значимых различий между средними значениями (сравнение значений) на уровне $P < 0,05$ использовали тест Тьюки.

Результаты и их обсуждение

Пыльцевые зерна, из-за своих биологических функций, состоят из широкого спектра молекул. Они варьируют от очень устойчивого биополимера спорополенина, в значительной степени неизвестного по составу и структуре, до флавоноидов, пигментов и наполняющих клетку внутри белков, липидов, углеводов и нуклеино-

вых кислот (Schulte et al., 2008). Пыльца особенно богата легкоусвояемым белком и незаменимыми аминокислотами. Содержание белка определяется генотипом и меняется в зависимости от видов растений (Campos et al., 2008; Özler et al., 2009). Также содержание белка в пыльце одного вида может отличаться в зависимости от погоды, почвы и других факторов окружающей среды (табл. 1 и 2). Типичный диапазон содержания белка в пыльце, собранной вручную и пчелами, составляет 7,5–35,0%, хотя было определено содержание белка и более 40% (Bogdanov, 2004; Brovanskij and Brindza, 2010). Пыльцевая аллергия обусловлена белками или гликопротеинами, присутствующими в пыльцевой стенке и цитоплазме. Белки пыльцы сохраняются в слоях пыльцевой стенки (экзине и интине) (El-Ghazaly et al., 1995, 1999; Özler et al., 2009).

Таблица 1

Содержание белка (%) в пыльце *Betula verrucosa* Ehrh.

BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9
23,8 ± 1,0	21,5 ± 1,0	25,1 ± 1,0	22,6 ± 1,0	23,1 ± 1,0	25,6 ± 1,0	21,8 ± 1,0	17,8 ± 1,0	24,4 ± 1,0	21,2 ± 1,0

Примечание: коэффициент вариации равен в среднем 8%.

Таблица 2

Сравнение результатов определения белка (%) в пыльце *Betula verrucosa* Ehrh. с литературными данными

Источник	Среднее
Наши результаты, 2013	22,70 ± 2,28
Přidal, 2003	23,02
Özler et al., 2009	7,73
Норма для сухой пыльцы пчелиной (Campos et al., 2008)	10–40

Содержание белка в пыльце *B. verrucosa* варьирует в пределах 17,85–25,62% в зависимости от места произрастания. Данные соответствуют литературным и норме для пыльцы пчелиной. Меньше всего белка определено в образце из Словакии, который заготовлен вблизи автомобильной дороги в городе (BV7), а больше всего – в образце пыльцы из Украины, который также заготовлен вблизи автомобильной трассы, но возле леса (BV5).

Качество белка пыльцы зависит от количества незаменимых аминокислот (Nicolson and Human, 2013). Özler et al. (2009) провел сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в пыльце *B. pendula*, в том числе, заготовленной в г. Анкара (Турция) в 2000 и 2008 гг. В целом он определил 21 аминокислоту. Примечательным в полученных результатах является то, что нет четкой тенденции снижения или увеличения количества аминокислотного состава со временем в различных видах. Содержание свободных аминокислот свежих и сохраненных пылевых зерен показывает уникальные изменения в каждом виде (Özler et al., 2009).

Процессы прорастания пыльцы и роста пыльцевой трубки обеспечиваются активизацией многих биохимических процессов, в том числе и липидного обмена, поскольку липиды и составляющие их жирные кислоты служат важным источником энергии. После попадания пыльцы на рыльце пестика жирные кислоты (ЖК) выполняют субстратную или энергетическую роль, а также

принимают участие в синтезе веществ, обеспечивающих рост пылевой трубки. У березы процесс цветения опережает формирование вегетативной сферы, поэтому фертильность пыльцы и способность ее к прорастанию в значительной мере зависят от состояния мембран и их сохранения (Vetchinnikova et al., 2012). Липиды являются основными компонентами эскины пыльцы (D'Amatol et al., 2007). Липиды играют важную роль как в формировании устойчивости растений к низким температурам, так и в соответствующих реакциях растений на биотический стресс (Lavtova et al., 2012). Способность клеток адаптироваться к низким температурам связывают с возможностью синтезировать *de novo* ненасыщенные жирные кислоты, в том числе линоленовую, которая повышает текучесть липидного бислоя и предотвращает фазовое разделение липидов под действием низких температур (Graskova et al., 2011; Vetchinnikova et al., 2012).

В зрелой пыльце *Betula* L. содержание суммарных липидов варьирует от 32 до 52 мг/г сухого вещества. По составу суммарные липиды пыльцы представлены как нейтральными (запасными) липидами, так и полярными (фосфо- и гликолипидами), которые являются структурной основой мембран (Vetchinnikova et al., 2012). В суммарных липидах образцов пыльцы березы бородавчатой выявлено 8 компонентов с числом углеродных атомов от 14 до 20, представленных как насыщенными, так и ненасыщенными жирными кислотами (ЖК). Среди насыщенных ЖК преобладает пальмитиновая, среди ненасыщенных – олеиновая и линолевая кислоты (табл. 3). Преобладание этих ЖК также характерно для пчелиной пыльцы, так как олеиновая и пальмитиновая кислоты играют важную роль в питании пчелы, а линолевая обладает антимикробной и противогрибковой активностью (Brovarskij and Brindza, 2010; Nicolson and Human, 2013).

Таблица 3

Жирнокислотный состав липидов (%) пыльцы *Betula verrucosa* Ehrh.

Название ЖК	BV1	BV2a	BV2b	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9	$\bar{x} \pm S_x$ BV1–BV6	$\bar{x} \pm S_x$ BV7–BV9	$\bar{x} \pm S_x$ BV1–BV9
Миристиновая, C _{14:0}	2,9	2,4	1,7	1,8	1,8	1,4	2,1	3,0	1,9	6,5	2,0 ± 0,5	3,8 ± 2,4	2,6 ± 1,5
Пентадекановая, C _{15:0}	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	1,5	0,7	3,3	0,3 ± 0,1	1,8 ± 1,3	0,8 ± 1,0
Пальмитиновая, C _{16:0}	36,3	34,6	32,4	34,4	32,0	31,5	32,7	34,8	37,6	32,7	33,4 ± 1,7	35,0 ± 2,5	33,9 ± 2,0
Стеариновая, C _{18:0}	4,8	4,9	4,6	3,6	4,2	4,2	4,5	3,0	3,8	3,9	4,4 ± 0,4	3,6 ± 0,5	4,2 ± 0,6
Олеиновая, C _{18:1}	25,6	24,4	26,8	27,4	28,8	25,6	34,4	38,8	30,0	32,7	27,6 ± 3,3	33,8 ± 4,5	29,5 ± 4,6
Линолевая, C _{18:2}	28,6	31,6	32,9	30,8	31,5	35,6	24,5	17,9	25,2	19,6	30,8 ± 3,5	20,9 ± 3,8	27,8 ± 5,9
Линоленовая, C _{18:3}	1,2	1,2	0,7	1,4	1,1	1,1	1,2	0,5	0,4	0,7	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,3
Арахидоновая, C _{20:4}	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,6	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Σ НЖК	44,3	42,1	39,1	40,1	38,3	37,4	39,6	42,3	44,0	46,4	40,1 ± 2,4	44,2 ± 2,1	41,4 ± 2,9
Σ ННЖК	55,7	57,4	60,8	59,9	61,7	62,6	60,4	57,7	55,9	53,6	59,8 ± 2,4	55,7 ± 2,1	58,6 ± 3,0
Σ ПНЖК	30,1	33,0	34,0	32,5	32,9	37,0	26,0	18,9	25,9	20,9	32,2 ± 3,4	21,9 ± 3,6	29,1 ± 6,0

Примечание: Σ НЖК – сумма насыщенных жирных кислот, Σ ННЖК – сумма ненасыщенных жирных кислот, Σ ПНЖК – сумма полиненасыщенных жирных кислот; $\bar{x} \pm S_x$ – среднее значение ± стандартное отклонение

Vetchinnikova et al. (2012) получила аналогичные результаты по преобладанию среди насыщенных ЖК пальмитиновой кислоты, а среди ненасыщенных – линолевой. Из таблицы 3 также видно, что содержание ненасыщенных ЖК (58,6 ± 2,95) преобладает над содержанием насыщенных ЖК (41,4 ± 2,93).

Среди украинских образцов пыльцы березы бородавчатой наиболее высокая вариабельность содержания установлена для линолевой (24,5–35,6%) и олеиновой (24,4–34,4%) кислот, наименьшая – для пентадекановой и арахидоновой кислот (0,2–0,4%). Наибольшие значения вариабельности характеризуют образцы BV6–BV5 и BV2a–BV6, наименьшие – BV2a–BV2b. Среди словацких образцов пыльцы березы бородавчатой наиболее высокая вариабельность содержания также установлена для олеиновой (30,0–38,8%) и линолевой (17,9–25,2%) кислот, наименьшая – для линоленовой (0,4–0,7%) и арахидоновой (0,3–0,6%). Наибольшие значения вариабельности у образцов BV8–BV7 и BV7–BV8, наименьшие – BV8–BV9. Значительная разница в жирнокислотном составе украинской и словацкой пыльцы отмечена для средних значений насыщенных кислот (миристиновой и пентадекановой) с преобладанием содержания в словацких образцах пыльцы березы бородавчатой, стеариновой – в украинских. Из ненасыщенных олеиновой больше в словацкой пыльце, а линолевой – в украин-

ской, из полиненасыщенных линоленовой кислоты больше в украинской пыльце, арахидоновой почти одинаково (см. табл. 3). В целом образцы украинской пыльцы *B. verrucosa* имеют больше полиненасыщенных жирных кислот, чем словацкие. По результатам жирнокислотного состава липидов, как и белков, отличается образец BV5, который имеет наивысшие показатели Σ ННЖК и Σ ПНЖК, а BV7 – низкое содержание ПНЖК.

Олеиновая кислота в дальнейшем может приводить к изменениям функционального состояния мембран растения, поскольку является субстратом для синтеза линолевой и линоленовой ЖК (Los', 2005). Длинноцепочечные ненасыщенные ЖК в пыльце, линолевая и линоленовая, служат предшественниками для биосинтеза ряда гормонов растений – фитопростанов (D'Amatol et al., 2007; Kapustin et al., 2013). Наибольшее количество фитопростаноидов *F₁* (32 мкг/г) найдено в свежей пыльце березы белой (*Betula alba* L.). В период прорастания в почках древесных растений (тополь, береза, лиственница) содержание простагландинов увеличивается, что может свидетельствовать об их участии в ростовых процессах растений. Уровень эндогенных простагландинов увеличивается в различных условиях, связанных с повышением генерации свободных радикалов (биотический и абиотический стрессы). Скорее всего, под действием стресса происходит образование активных форм кислорода, кото-

рые вызывают процессы неэнзиматического окисления линоленовой и других ненасыщенных жирных кислот и образование фитопростанов (Filipcova et al., 2011).

Антиоксидантная способность пыльцы естественно очень высока (Brovarskij and Brindza, 2010), что характерно и для пыльцы *B. verrucosa* (табл. 4). Исходя из полученных результатов и литературных данных, пыльца березы бородавчатой имеет антиоксиданты в своем составе.

Считается, что антирадикальная способность пыльцы уменьшается со временем (Brovarskij and Brindza, 2010). Исследования ОАА для словацких образцов проводились через месяц после сбора и хранения пыльцы, для украинских образцов – через год. Результаты по ОАА в целом высоки. Значения ОАА для водных экстрактов колеблются в пределах 74,8–85,5%, для этаноловых – 60,3–95,0%, для метаноловых – 46,1–92,6%. Самая большая разница в полученных значениях ОАА наблюдается для метаноловых экстрактов пыльцы, наименьшая – для водных экстрактов. В целом результаты для водных экстрактов ОАА наиболее стабильны. Согласно тесту средних Тьюки образцы поделены на пять групп, которые достоверно отличаются между собой (см. табл. 4). Наивысшая ОАА водных экстрактов пыльцы принадлежит двум контрольным образцам BV2b и BV3 (из музея и леса) и BV4 и BV5 (пыльца деревьев,

растущих возле автомобильной дороги в жилом районе и возле прилесной автомобильной трассы). Значения ОАА водных и этаноловых экстрактов украинских образцов достоверно отличаются от словацких. ОАА водных экстрактов украинских образцов пыльцы березы бородавчатой больше, чем словацких, в случае этаноловых – наоборот. Исходя из этих данных, можно предположить, что вещества, которые обеспечивают антиоксидантную активность пыльцы березы бородавчатой, отличаются по своей природе, а условия произрастания влияют на их синтез. Свободные радикалы могут поглощать белки (Campos et al., 2003). Образец пыльцы березы бородавчатой с наибольшим содержанием белков (BV5) имеет наибольшее значение ОАА среди водных экстрактов, образец с наименьшим содержанием белков (BV7) – наименьшее. Коэффициент корреляции между содержанием белка и ОАА водных экстрактов пыльцы березы бородавчатой составляет 0,70, для этаноловых и метаноловых экстрактов всего лишь –0,26 и –0,22 соответственно. Можно предположить, что водорастворимые белки в пыльце *B. verrucosa* участвуют в защитной системе пыльцы. Украинские и словацкие образцы пыльцы березы бородавчатой отличаются и по жирнокислотному составу липидов, что обсуждалось выше.

Таблица 4

Общая антиоксидантная активность (%) водных, этаноловых и метаноловых экстрактов пыльцы *Betula verrucosa* Ehrh.

Образцы	Водный экстракт		Этаноловый экстракт		Метаноловый экстракт	
	$\bar{x} \pm S_x$	$V, \%$	$\bar{x} \pm S_x$	$V, \%$	$\bar{x} \pm S_x$	$V, \%$
BV1	81,9 ^{ab} ± 0,67	0,82	64,6 ^d ± 1,95	3,02	46,1 ^e ± 0,84	1,81
BV2a	80,5 ^b ± 0,90	1,11	67,9 ^d ± 1,04	1,53	74,7 ^c ± 0,65	0,87
BV2b	84,1 ^a ± 1,78	2,12	70,8 ^d ± 2,06	2,91	79,4 ^b ± 0,66	0,83
BV3	84,1 ^a ± 1,07	1,28	60,3 ^e ± 3,18	5,27	51,4 ^d ± 0,97	1,88
BV4	85,5 ^a ± 0,93	1,08	75,1 ^c ± 1,16	1,54	92,6 ^a ± 0,67	0,72
BV5	84,7 ^a ± 0,72	0,85	84,9 ^b ± 0,89	1,05	92,4 ^a ± 0,57	0,61
BV6	82,7 ^{ab} ± 2,43	2,94	69,3 ^d ± 2,60	3,76	78,8 ^b ± 0,57	0,72
BV7	74,8 ^d ± 0,43	0,57	95,0 ^a ± 0,28	0,29	91,6 ^a ± 0,43	0,47
BV8	78,4 ^{bc} ± 1,10	1,40	95,0 ^a ± 3,34	3,51	72,0 ^c ± 4,33	6,01
BV9	78,1 ^{bc} ± 0,57	0,74	95,4 ^a ± 0,51	0,53	91,5 ^a ± 0,39	0,43

Примечание: $\bar{x} \pm S_x$ – среднее значение ± стандартное отклонение, V – коэффициент вариации (%), а, b, c, ... – ранжирование средних значений согласно тесту средних Тьюки ($P < 0,05$); одинаковые буквы в пределах колонки указывают на недостоверную разницу между средними значениями.

Следовательно, химический состав индивидуален и зависит от вида растений. В случае пыльцы *B. verrucosa*, собранной искусственно, она имеет характеристики одного источника, стабильный состав, определенную степень чистоты и зрелости. Влияние географического и климатического факторов следует исключить для всех украинских образцов между собой и всех словацких. Места сбора пыльцы березы бородавчатой в Украине расположены в пределах 49° 54' – 51° 27' с. ш., значения метеорологических показателей почти не отличались на протяжении исследуемого периода. Город Нитра на территории Словацкой республики находится на 48° 18' с. ш., но погодные условия более мягкие по сравнению с украинскими местами сбора. Это отображается на дате начала цветения. Не исключено влияние эдафического фактора и фактора времени. Только свежая пыльца имеет оптимальную биологическую активность (Bogdanov, 2004). Разные методы анализа и лаборатории также мо-

гут повлиять на полученные данные (Nicolson and Human, 2013). Но в наибольшей степени, авторы считают, влияет местонахождение вида, которое определяет совокупность условий абиотической и биотической среды. При анализе данных выбросов в атмосферный воздух от стационарных и передвижных источников исследуемых пунктов в загрязнении окружающей среды отмечена лидирующая роль автотранспорта. Образцы пыльцы березы бородавчатой BV2a, BV4, BV5, BV7, BV9 заготовлены с учетом влияния этого фактора. Можно отметить, что нет четкой зависимости между полученными результатами. Среди образцов пыльцы из Украины выделяется образец BV5 (г. Кузнецовск Ривненской обл.) от всех остальных из Киевской области. Все словацкие образцы пыльцы соответственно отличаются от украинских, что подтверждено отличиями в жирнокислотном составе липидов и разницей ОАА водных и этаноловых экстрактов.

Выводы

В 10 образцах пыльцы *B. verrucosa* из разных мест произрастания отмечено наибольшее содержание пальмитиновой, линолевой и олеиновой кислот, характерно преобладание ненасыщенных жирных кислот. Исследование общей антиоксидантной активности водных, этаноловых и метаноловых экстрактов показало, что пыльца березы бородавчатой является хорошим поглотителем ДФПГ *in vitro*. Водные вытяжки пыльцы березы бородавчатой наиболее стабильны. Вариации химического состава пыльцы отражают различия в условиях окружающей среды в ходе созревания растений.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта «26220220180 Строительство научно-исследовательского центра «Агробиотех»» при финансовой поддержке Европейского фонда регионального развития – Оперативная программа по исследованиям и развитию. Экспериментальные исследования реализованы в лабораториях Научного центра сохранения агробиоразнообразия и его использования Факультета агробиологии и продовольственных ресурсов при Словацком аграрном университете в г. Нитра.

Библиографические ссылки

- Agadzhanjan, V.S., Ligaj, L.V., Mucueva, S.H., 2009. Izuchenie himicheskogo sostava summarnoj kompozicii antioksidantov, poluchennoj iz mjakoti tykvy obyknovЕННОj (*Cucurbita pepo* L.). *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija* (prilozhenie «Farmaceuticheskie nauki») 6, 3.
- Antal, D.S., 2010. Medicinal plants with antioxidant properties from Banat region (Romania): A rich pool for the discovery of multi-target phytochemicals active in free-radical related disorders. *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie* 17(1), 14–22.
- Basuny, A.M., Arafat, S.M., Soliman, H.M., 2013. Chemical analysis of olive and palm pollen: Antioxidant and antimicrobial activation properties. *Herald Journal of Agriculture and Food Science Research* 2(3), 91–97.
- Bogdanov, S., 2004. Quality and Standards of Pollen and Beeswax. *Apiacta* 38, 334–341.
- Brovaskij, V., Brindza, J., 2010. Včelí obnôžkový peľ. FOP I. S., Maidachenko.
- Campos, M.G.R., Bogdanov, S., Bicudo de Almeida-Muradian, L., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., Ferreira, F., 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2), 156–163.
- Carpes, S.T., Begnini, R., de Alencar, S.M., Masson, M.L., 2007. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras 31(6), 1818–1825.
- Carpes, S.T., Mourão, G.B., de Alencar, S.M., Masson, M.L., 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Braz. J. Food Technol.* 12(3), 220–229.
- Chantarudee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., Chanchao, C., 2012. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 45–57.
- Cotos-Yáñez, R.T., Rodríguez-Rajo, F.J., Jato, M.V., 2004. Short-term prediction of *Betula* airborne pollen concentration in Vigo (NW Spain) using logistic additive models and partially linear models. *Int. J. Biometeorol.* 48, 179–185.
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., van Cauwenberge, P., 2007. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62, 976–990.
- Dannikov, N.I., 1993. *Derevo zhizni. Vse o celebnyh svojstvah berezy*. Labirint, Moscow.
- Dzjuba, O.F., 2006. Izuchenie pyl'cy iz poverhnostnyh prob dlja ocenki kachestva okruzhajushhej sredy. *Neftegazovaja Geologija. Teorija i praktika* 1, 1–18.
- El-Ghazaly, G., Moate, R., Cresti, M., Walles, B., Takahashi, Y., Ferreira, F., Obermeyer, G., 1999. Localization and release of allergens from tapetum and pollen grains of *Betula pendula*. *Protoplasma* 208, 37–46.
- El-Ghazaly, G., Takahashi, Y., Nilsson, S., Grafström, E., Berggren, B., 1995. Orbicules in *Betula pendula* and their possible role in allergy. *Grana* 34, 300–304.
- Emilson, A., Berggren, B., Svensson, A., Takahashi, Y., Scheynius, A., 1996. Localization of the major allergen Bet v 1 in birch pollen by confocal laser scanning microscopy. *Grana* 35, 199–203.
- Filipcova, G.G., Lapkovskaja, E.M., Jurin, V.M., 2011. Rol' prostanoidov v reguljacii fiziologicheskikh processov v rastenijah. *Trudy BGU* 6(2), 59–65.
- Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotiroudis, G., Chondrogianni, N., Gonos, E., Chinou, I., 2011. Chemical analysis of Greek pollen – Antioxidant, antimicrobial and protease activation properties. *Chem. Cent. J.* 5, 33–42.
- Graskova, I.A., Dudareva, L.V., Zhivet'ev, M.A., Stolbikova, A.V., Sokolova N.A., Vojnikov, V.K., 2011. Dinamika sezonnyh izmenenij zhirkokislotojnogo sostava, stepeni nenasyshhennosti zhirnyh kislot i aktivnosti acil-lipidnyh saturaz v tkanjah nekotoryh lekarstvennyh rastenij, proizrastajushhih v uslovijah Predbajkal'ja. *Himija Rastitel'nogo Syr'ja* 4, 223–230.
- Gub's'kyj, J.I., Janic'ka, L.V., Brjuzgina, T.S., 2005. Zhirkokyslotnyj sklad lipidiv golovnogo mozku shhuriv pry toksychnomu urazhenii 1,2-dyhloretanom ta vvedennja nikotynamidu. *Suchasni Problemy Toksykologii* 1, 19–22.
- Kao, Y.-T., Lu, M.-J., Chen, A.C., 2011. Preliminary analyses of phenolic compounds and antioxidant activities in tea pollen extracts. *J. Food Drug Anal.* 19(4), 470–477.
- Kapustyn, M.A., Radevych, V.S., Kurchenko, V.P., Pashkovskij, F.S., Lahvych, F.A., 2013. Poluchenye klatratov beta-cykloodekstryna s synteticheskimi fitoprostanojdami. *Mezhdunar. nauchn. konf. "Byologicheski aktivnye veshhestva rastenij – izuchenye i ispol'zovanie"*. Minsk 106–107 (in Russian).
- Kedzia, B., Holderna-Kedzia, E., 2012. Nowe badania nad biologicznymi wlasciwosciami pyłku kwiatowego. *Postepy Fitoterapii* 1, 48–54.
- Kucik, R.V., Zuzuk, B. M., 2001. Bereza borodavchataja (Bereza povislaja). *Analiticheskij obzor. Provizor* 10, 21–25.
- Lavrova, V.V., Sysoeva, M.I., Matveeva, E.M., 2012. Zhirkokyslotnyj sostav lipidov list'ev kartofelja v uslovijah periodicheskoj i dlitel'noj gipoterмии. *Trudy Karel'skogo Nauchnogo Centra RAN* 2, 91–96.
- LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T., 2009. Antioxidant activity of Sonoran desert bee pollen. *Food Chem.* 115, 1299–1305.
- Lee, K.H., Kim, A.J., Choi, E.M., 2009. Antioxidant and anti-inflammatory activity of pine pollen extract *in vitro*. *Phytother. Res.* 23, 41–48.

- Los', D.A., 2005. Molekuljarnye mehanizmy holodoustojchivosti rastenij. Vestnik RAN 75(4), 90–95.
- Lubsandorzhieva, P.B., 2009. Soderzhanie biologicheski aktivnyh veshhestv v nekotoryh rastenijah Zabajkal'ja i ih antioksidantnaja aktivnost'. Himija Rastitel'nogo Syr'ja 3, 133–137.
- Mironenko, T., 2002. Derevo zhizni. AiF Zdorov'e.
- Nicolson, S.W., Human, H., 2013. Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae). Apidologie 44(2), 144–152.
- Özler, H., Pehlivan, S., Bayrak, F., 2009. Analysis of free amino acid and total protein content in pollen of some allergenic taxa. Asian J. Plant Sci. 8, 308–312.
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., Estevinho, L.M., 2014. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Food Chem. Toxicol. 63, 233–239.
- Pomés, A., 2008. Allergen structures and biologic functions: The cutting edge of allergy research. Curr. Allergy Asthma Rep. 8, 425–432.
- Přidal, A., 2003. Včelí produkty – cvičení. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno.
- Puc, M., 2012. Artificial neural network model of the relationship between *Betula* pollen and meteorological factors in Szczecin (Poland). Int. J. Biometeorol. 56, 395–401.
- Radiologichnyj stan terytorij, vidnesenyh do zon radioaktivnogo zabrudnennja (u rozrizi rajoniv), 2008. Ministerstvo Ukrainy z pytan' nadzvychajnyh sytuacij ta u spravah zahystu naselennja vid naslidkiv Chornobyl's'koi katastrofy. TOV «Intelektual'ni Systemy GEO», Kyiv.
- Saarinén, K., Jantunen, J., Haahtela, T., 2011. Birch pollen honey for birch pollen allergy – A randomized controlled pilot study. Int. Arch. Allergy Immunol. 155, 160–166.
- Saeheng, S., Wongnawa, M., Purintavaragul, C., 2012. Chemical constituents and antioxidant activity of *Borussus flabellifer*, *Elaeis guineensis*, *Mimosa diplotricha* and *Mimosa pigra*. Medicinal Chemistry & Drug Discovery 3(1), 52–57.
- Schulte, F., Lingott, J., Panne, U., Kneipp, J., 2008. Chemical characterization and classification of pollen. Anal. Chem. 80, 9551–9556.
- Sen, S., Chakraborty, R., 2011. The role of antioxidants in human health. Oxidative stress: Diagnostics, prevention and therapy, American Chemical Society, Washington, DC.
- Stanley, R.G., Linskens, H.F., 1974. Pollen. Biology, biochemistry, management. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Urbah, V.J., 1963. Matematicheskaja statistika dlja biologov i medikov. Izd. AN SSSR, Moscow.
- Vetchinnikova, L.V., Serebrjakova, O.S., Il'ina, M.K., 2012. Zhirnokislотноj sostav lipidov pyl'cy osnovnyh predstavitelej roda *Betula* L. Trudy Karel'skogo Nauchnogo Centra RAN 2, 56–62.

Надійшла до редколегії 02.12.2013



УДК 577.391:612.8

The multipotent role of metallothionein in the nervous system

G.A. Ushakova, Y.P. Kovalchuk

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

We provide a commentary on current experimental and theoretical advances and frame our consideration in terms of the possible functions of MT I+II in the nervous system. Metallothioneins (MT) are a family of small cysteine rich proteins, which since their discovery in 1957 have been implicated in a range of roles including toxic metal detoxification, protection against oxidative stress, and as a metallochaperone involved in the homeostasis of both zinc and copper. The most well studied member of the family is the mammalian metallothionein, which consists of two domains: a β -domain with 9 cysteine residues and an α -domain with 11 cysteine residues. Despite over half a century of research, the exact functions of MT in the nervous system are still unknown. Our studies have shown that the distribution of MT-I+II in the brain after prolonged intoxication, inhalation of 0.1% $CdCl_2$ for 1 hour twice a week over 19 weeks, is dependent on the part of the brain. The metallothionein level declines more than 4 times in the hippocampus 3 weeks after continuous intoxication of 0.1% $CdCl_2$. The level of MT-I+II in the cerebral cortex decreased by 1.5 times compared with the control group and did not change significantly in the cerebellum and thalamus/hypothalamus. The results of an experimental model of postoperative pain indicated that injection with MT-II prevents the development of postoperative hyperalgesia in response to mild alteration of physiological activity. Activation of locomotory and exploratory activity, and decrease of anxiety in rats under MT-II treatment at 100 μ g/rat manifests itself on the 4th day after surgery. Our experimental data indicate the multipotent function of MT I+II in the rat brain both as a metal detoxifier and as an inhibitor of postoperative pain.

Keywords: cadmium; zinc; metallothionein; brain; postoperative pain

Мультипотентна роль металотіонеїну в нервовій системі

Г.О. Ушакова, Ю.П. Ковальчук

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Наведено коментар про сьогоденні експериментальні та теоретичні досягнення в рамках розуміння можливих функцій MT I+II в нервовій системі. Металотіонеїни (MT) – родина невеликих протеїнів, збагачених на цистеїн. Із моменту їх відкриття в 1957 році для цих протеїнів визначено функції різного діапазону, включаючи детоксикацію металів, захист від окислювального стресу, і як металочапериони вони беруть участь у гомеостазі цинку та міді. Найкраще вивчені металотіонеїни ссавців, які складаються з двох доменів: α -області з 11 залишками цистеїну та β -домену з 9 залишками цистеїну. Незважаючи на понад півстоліття досліджень, точні функції MT у нервовій системі донині невідомі. Наші дослідження показали, що розподіл MT I+II у мозку після тривалої інтоксикації (вдихання 0,1% $CdCl_2$ протягом години двічі на тиждень упродовж 19 тижнів) залежав від відділів мозку. Рівень металотіонеїну знижується більше ніж учетверо в гіпокампі через 3 тижні після безперервної інтоксикації 0,1% $CdCl_2$. Рівень MT I+II у корі головного мозку знизився в 1,5 раза порівняно з контрольною групою, але не було значних змін у мозочку і таламусі / гіпоталамусі. Завдяки експериментальній моделі післяопераційного болю, отримані результати показали, що ін'єкції з MT II запобігають розвитку післяопераційної гіперчутливості до болю відповідно до зміни фізіологічної активності. Активізація рухової активності та зниження занепокоєння при застосуванні MT II у дозі 100 мкг/щура вже визначалася на четверту добу після операції. Отримані експериментальні дані свідчать про мультипотентність функцій MT I+II у мозку щурів: як детоксиканта, так і як інгібітора післяопераційного болю.

Ключові слова: кадмій; цинк; металотіонеїн; мозок; післяопераційний біль

Introduction

The first health effect of cadmium (*Cd*) was lung damage, reported in workers already in the 1930's, while bone effects and proteinuria were reported in the 1940's. After World War II, a bone disease with fractures and severe pain, the itai-itai disease, a form of *Cd*-induced renal osteomalacia, were identified in Japan (Kazantzis, 2004). Subsequently, the toxicokinetics and toxicodynamics of *Cd* were described including its binding to the protein metallothionein. *Cd* is classified as a human carcinogen causing tumors of the lung, prostate, and other tissues. Human activity has markedly increased the distribution of *Cd* in the global environment. Food is the major source of *Cd* exposure for the general population, and cigarette smoking significantly adds to the burden of *Cd* on the body. Occupational exposures are mainly from *Cd* fume inhalation, the cadmium-nickel battery industry, electroplating, and paint pigments (Liu et al., 2007).

In search of the component which is responsible for the natural accumulation of cadmium in the kidneys of mammals, in 1957 Margoshes and Vallee discovered metallothioneins (Margoshes and Vallee, 1957). This family of low-proteins is localized in the cytoplasm and nucleus. Today, many results about metal-binding proteins have been obtained, but these data are still not enough to fully understand the molecular mechanism of participation of these proteins in normal and damaging factors. International warnings of health risks from cadmium pollution were issued in the 1970's (Nordberg et al., 1975). WHO, 1992, identified renal dysfunction as the critical effect and a crude quantitative evaluation was presented (Groten et al., 1994). In the 1990's population groups in China exposed to *Cd* via rice were studied and new information on skeletal, renal and reproductive toxicity of *Cd* was obtained in the ChinaCad project. There was a decrease in Bone Mineral Density (BMD), an increased prevalence of fractures and an increased urinary content of marker proteins of renal dysfunction among persons with long term exposure to *Cd*. The development of such biomarkers can be seen as a result of applied 'proteomics' research. Variations in metallothionein gene expression were related to development of renal dysfunction, supporting the usefulness of this 'genomic' approach. The ongoing rapid development of 'genomics' and 'proteomics' technologies will improve possibilities for molecular epidemiology studies in the future, providing even a better basis for preventive action. In many countries, *Cd* exposures are now under better control than in the past. The target for the 21st century is to achieve a totally acceptable exposure situation without adverse health effects from *Cd*. More details about cadmium and health in the 21st century are presented in the review by Nordberg (2004).

Metallothionein gene expression is transcriptionally regulated by dietary zinc too (as by cadmium) and thus could serve as an assessment parameter based on zinc-dependent function. Zinc status is difficult to evaluate in humans. Sullivan and Cousins used semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to establish that MT mRNA is increased in a human monocytic cell line by addition of zinc to the medium (Sullivan and Cousins, 1997). The RT-PCR data show

that there was a significant increase in monocyte MT mRNA in subjects within 6 d of zinc supplementation, which remained elevated at d 15 of supplementation. In contrast, plasma zinc was greater at d 6 of zinc supplementation, but by d 15 of supplementation, while still elevated, was close to control levels. These data suggest that monocyte MT mRNA levels respond to zinc supplementation and that the response could serve as a more useful assessment variable than plasma zinc for the measurement of zinc status in humans.

Materials and methods

Two different experiments were performed using adult Wistar rats weighting 250–280 g. Animals were kept in the animal house under standard conditions with consumption of water and food ad lib during whole experimental period. All experimental protocols and handling of the animals were approved by the local authorities (Dnipropetrovsk, Ukraine).

The model of long-lasting intoxication with cadmium was induced by inhalation of 0.1% $CdCl_2$ dispersed in air during 19 weeks, twice a week, 1-h-long sessions ($n = 7$). The control animals ($n = 7$) were in the same condition without inhalation.

The experimental model of postoperative pain was developed due to Brennan (Brennan et al., 1996). Operated rats were anaesthetized with ether. The plantar aspect of the hindpaw was prepared in a sterile manner with iodine solution. A 1 cm longitudinal incision was made with a SM65 blade through the skin and fascia of the plantar aspect of the foot, starting 0.5 cm from the proximal edge of the heel and extending towards the toes. After haemostasis with gentle pressure, the skin was apposed with 2 mattress sutures of 3 nylon on an FS-2 needle. The wound site was covered with iodine solution and a mixture of polymixin B and neomycin ointment. After surgery, the animals were allowed to recover in the cages. The study has been approved by animal protection authorities. Wistar rats were divided into 4 groups: 1 – control, without any treatment ($n = 8$); 2 – incision ($n = 8$); 3 – injection by 0.2 ml physiological solution containing 48 µg MT-I+II per animal during 2 days after incision ($n = 8$); 4 – injection by 100 µg MT-I+II per animal during 2 days after incision ($n = 6$).

Behavioural testing was performed by the open field test (Koob et al., 2006).

Isolated different brain parts were homogenized in 10-times volume of buffer containing 25 mM tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.2 mM PMSF and 0.01 M mercaptoethanol. All procedures were performed at +4 °C. The homogenates were centrifuged at 100 000 g during 60 minutes. Supernatants were used to analyse the MT-I+II with solid phase competition immuno-enzyme analysis with monospecific polyclonal antisera against MT-I+II (DAKO, Denmark) and highly purified MT-I+II (Sigma) as a marker. Optical density was measured with the help of Anthos-2010 absorbance reader (Anthos Labtec Instruments, Austria).

Statistical analysis was performed using Statistica software (version 5, StatSoft, Tulsa, OK, USA). The two-

tailed nonparametric Kolmogorov-Smirnov test and parametric Student's t-test were used to assess the differences between samples ($P < 0,05$ was considered to indicate statistical significance).

Results and discussion

The structure and nomenclature of metallothioneins (MTs)

Metallothioneins consisting of 61–62 amino acids without aromatic amino acids and histidine, cysteine residues are 25–30%. The molecular weight of these proteins is 6.5–7.0 kDa. MTs show a considerable level of polymorphism while they possessed an exceptional number of homology, which shows a high conservative primary

structure. Metallothioneins have been identified in many organisms: fungi, plants, spiders, animals, including humans (Simpkins, 2000). Using the method of polymerase chain reaction (PCR) the gene sequence of MT was isolated. This gene has two introns (575 and 602 bp) and three exons (22, 77 and 78 bp) (Fig. 1).

In humans, the MT genes are tightly clustered in the q13 region of chromosome 16 (West et al., 1990), consisting of 7 functional MT-I genes (MT-1A, -B, -E, -F, -G, -H and -X) and a single gene encoding each of the other MT isoforms, namely MT-II (the MT-2A gene), MT-III and MT-IV. High metallothionein conservative structure in the evolution and wide distribution shows the importance of fundamental physiological functions, despite the fact that the nature of MT is still discussed.

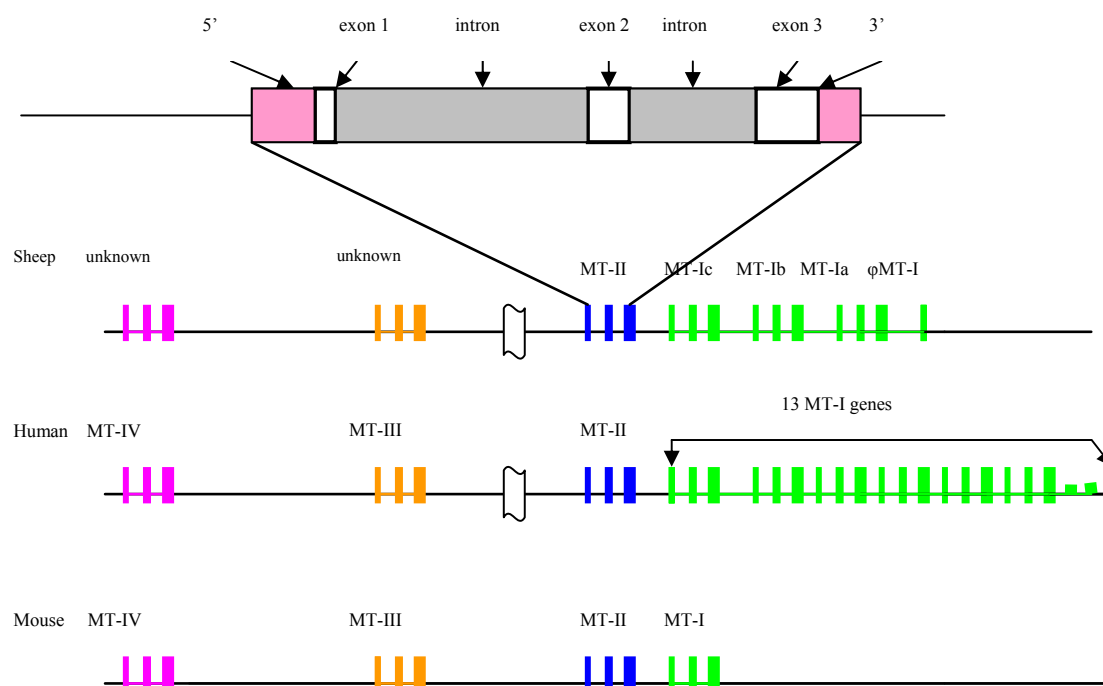


Fig. 1. Metallothionein genes distribution in mammals

Metallothionein domains of different origins, exhibiting distinct, highly conserved cysteine positions, show differences in metal-cysteine coordination and reactivity. Munoz et al. (2000) showed the possible influence of (1) the position of the cysteine residues and (2) the steric and electrostatic effects of neighboring amino acids on the folding and stability of MT clusters have been examined with the native lobster beta C and beta N domains, each having nine cysteines and binding three M^{2+} ions, and a modified domain beta C $\rightarrow$ N, in which the cysteines of the C-terminal domain are relocated so they are spaced as in the N-terminal domain. Each has been synthesized and characterized by UV, CD, ^{113}Cd NMR, and ^1H NMR spectroscopies. The synthetic native domains (Cd_3 beta C and Cd_3 beta N) displayed spectroscopic properties, metal-binding affinities, and kinetic reactivity similar to those of the holo protein. In contrast, the modified Cd_3 beta C $\rightarrow$ N domain was unusually reactive and, in the presence of Chelex, a metal-ion chelating resin, was converted to a $\text{Cd}_3(\text{beta C} \rightarrow \text{N})_2$ dimer. These differ-

ences in structure and reactivity demonstrate that the requirements for formation of a stable type-B, Cd_3S_9 , beta cluster are more stringent than simply the sequential positions of the cysteines along the peptide chain and include specific interactions with neighboring amino acids. Molecular mechanics calculations suggest that changes of even a single amino acid in lobster Cd_3 beta N toward lobster Cd_3 beta C $\rightarrow$ N or in mammalian MT1 or MT2 toward Cd_3 beta-MT3 (GIF) can destabilize their structures. Now many studies are being conducted to understand the mechanism of metal binding MT which is important to know the exact structure of the active site of this protein.

There are two main types of metallothioneins isoform: MT-I and MT-II. They differ in amino acid composition and are separated by DEAE-ion exchange chromatography or gel-penetrating HPLC. Separation of DNA gives us information that there are two types or more genes for metallothioneins that can be presented as iso-MT, which were identified in tissue extracts (Danielyan et al., 2007). For to-

day, there are four known MT isoforms: MT-I, MT-II – in epithelial tissues (skin, intestinal mucosa, liver), MT-III – in the brain, MT-IV – epithelium of tongue, gastrointestinal tract (Quaife et al., 1994). More than 17 subtypes of metallothioneins have been selected by chromatography, but only ten of them supposedly "function" in the human body (Vasak and Hasler, 2000).

The biosynthesis of metallothionein is controlled by complex processes. One of these processes – the action of metals. Apparently, copper and other metals with zinc replacing existing microtubules can promote the genes of this protein. The other process is a control diet. When the dietary supply of zinc and copper is increased enough to induction the MT occurred (primarily in liver and intestine), metallothionein is synthesized quickly and resists the toxic effects of zinc (detoxication). It is generally accepted that the expression of MT-I/II proteins is highly inducible in response to a range of stimuli, including metals, hormones, cytokines, oxidative agents, inflammation and stress. Mt-1 and Mt-2 genes are co-ordinately regulated in mice by metals and glucocorticoids. Metal induced synthesis is mediated through the action of short cis-acting DNA sequences known as metal responsive elements (MREs), which are present in the promoter region of all mammalian MT genes (Radtko et al., 1993), and is mediated mainly by metal response element-binding transcription factor (MTF-1), a zinc sensitive trans-acting factor (Andrews, 2000).

Metallothioneins are relatively rapidly degrading proteins. Twenty-four hours is enough to reduce the pool of MT-bound zinc to insignificant levels. It is known that cadmium and zinc-binding (2 : 1) MT is 3.5 half-day period. Zn-MT is more resistant to degradation, rather than Cd-MT. Foremost is the lysosomal degradation of MT (Bremner, 1987).

The role of metallothioneins in the nervous system

The previous studies have suggested that zinc deficiency may decrease, whereas the addition of zinc or cadmium can increase the expression of metallothionein in the brain, as well as MT-I mRNA and MT-III mRNA in the hippocampus, more stress can provoke even greater increase in the expression of these proteins. Chen et al. (2005) studied the effects of different doses of zinc on the expression of metallothionein isoforms in the hippocampus of stressed rats. In the zinc deficiency group, plasma zinc content was decreased, while in zinc complementarity group it was slightly increased. On the one hand, the expressions of metallothionein in the brain and MT-1 mRNA, MT-3 mRNA in the hippocampus were downregulated in zinc deficiency group, however, their expressions were evidently enhanced in stressed zinc deficiency group. On the other hand, inductions of metallothionein and its mRNAs in zinc complementarity group were increased, furthermore, the stressed zinc complementarity group has a more significant yield of metallothionein and its mRNAs. In addition, the levels of plasma cortisol, IL-6, IL-1 and NO were increased clearly in the zinc deficiency group and stressed zinc deficiency group. These results suggested that zinc deficiency may decrease while zinc complementarities increase the expressions of metallothionein in the brain and MT-1 mRNA, MT-3 mRNA in the hippocampus. Moreover, stress can increase their expressions dramatically. The impairment of stress on the body

may be involved with the nutrition status of zinc, and zinc deficiency can lower the body's resistivity to stress.

In the brain, the main source of expression of MT-I+II are astrocytes (Aschner et al., 2002). Choroids plexus epithelial cells, endothelial cells and membranes can also produce this protein. Recent data show that in physiologically normal conditions, MT-I+II is distributed both inside and outside the cell (protecting neurons) in low concentration, its level increases during postnatal development and during the induction of metal ions (Ushakova and Kruchinenko, 2009).

However, our studies have shown the distribution of MT-I+II in the brain after prolonged intoxication, inhalation by 0.1% CdCl₂ 1 h twice a week for 19 weeks is dependent on the part of the brain. These results do not show a sharp increase in the expression of MT-I+II in the studied brain regions (Fig. 2).

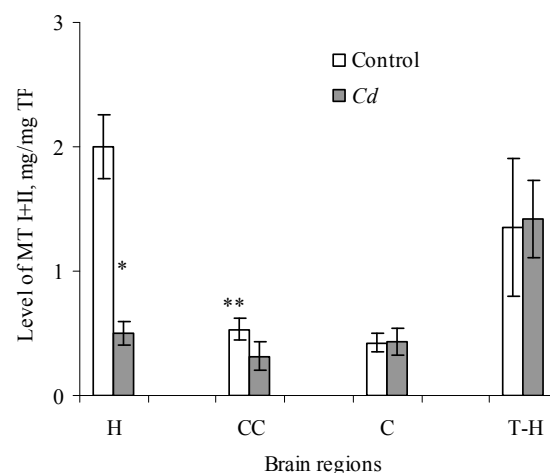


Fig. 2. The distribution of metallothionein-I+II in various brain regions of rats under normal conditions and after prolonged cadmium intoxication, inhalation of 0.1% CdCl₂ during 1 h twice a week for 19 weeks: H – hippocampus, CC – cerebral cortex, C – cerebellum, T-H – thalamus/hypothalamus, TP – total protein; n = 7, * – P < 0.001, ** – P < 0.05

The metallothionein level declines by more than 4 times in the hippocampus 3 weeks after continuous intoxication of 0.1% CdCl₂. The level of MT-I+II in the cerebral cortex decreased 1.5 times compared with the control group and did not change significantly in the cerebellum and thalamus/hypothalamus. The data obtained suggest that long-term cadmium intoxication may overwhelm the biosynthetic resources of MT-I+II or lead to a reorganization of the protective mechanisms in astrocytes depending on the structure of the brain. Further detailed study of the morphology of astrocytes and the distribution of astrocyte-specific proteins, along with other metal-binding proteins, will provide an opportunity to understand the phenomenon of reducing the expression of MT-I+II in the hippocampus after chronic cadmium intoxication.

During last decade many results highlight the important role of MT-I/II in coping with brain damage. Many studies have clearly demonstrated a similar essential role in coping with damage elicited by kainic acid induced seizures, the gliotoxin 6-aminonicotinamide, 6-hydroxydopamine, mutated Cu,Zn-superoxide dismutase, multiple sclerosis models, traumatic brain injury (Giralt et al., 2002), and transgenic

IL-6-induced neuropathology. The overall results obtained in these studies are compatible with a role of MT-I/II in decreasing oxidative stress, inflammation and apoptosis in the CNS, which is in accordance with the results in other tissues (Ushakova and Kruchinenko, 2009). It is worth noting again that besides being potent antioxidant proteins, MT-I/II are induced by oxidative stress (Andrews, 2000), MT induction in response to amyloid plaques/production has been demonstrated in three different mouse models of Alzheimer disease, and thus there are suitable models for analyzing the putative neuroprotective role of MTs.

In our study we assessed the physiological and biochemical changes that develop in response to noxious peripheral stimulation after incision (postoperative pain) under metallothionein-II effect.

The mechanical sensitivity of a surgical incision is the most important property that provides both peripheral and central pathways of pain mechanisms. Damage to peripheral tissue and injury to nerves typically produce persistent pain and hyperalgesia. The peripheral component is believed to be associated with peripheral inflammation due to different substances released in response to surgical trauma. That is connected with activation of second messenger systems and triggering of the immune system. The central pathways of pain are induced by sensitization of dorsal horn neurons by noxious stimuli. Today we have a good characterized mechanism of neuron sensitization under pain condition, the role of specific receptors, there is a molecular structure, type of agonists and antagonists (Yajima et al., 2005). However,

if the peripheral inflammation caused by surgical incision plays a crucial role in postoperative pain, it is logical to speculate that synthesis induction (or additional injection) of the endogenous agent that provides antiinflammation reaction is one of the alternative ways to decrease pain without strong and prolonged treatment by direct receptors blockader to avoid the development of drug tolerance.

Following this line, our interest was focused on mammalian metallothioneins (MTs), cystein-rich small metal-binding proteins that are induced not only by heavy metals (*Zn*, *Cd*) and other divalent cations (*Ca*, *Mg*, *Mn*) but also by specific agents as catecholamines, glucocorticoids, interleukin-6, glucagon, tumor necrosis factor, acute phase response agents (Di Silvestro and Joseph, 1995). Many indicated agents take part in the peripheral and central pathways of postoperative pain.

In our study the experimental model of postoperative pain was developed due to Brennan (Brennan et al., 1996). During the time of the experiment time all animals were kept with a normal food and water intake. The weight of the control animals and rats before surgery was on average 324 ± 25 g. There was a small significant decrease in weight during the first 3 days after incision (283 ± 16 , $P < 0.05$) for rats without additional treatment. The weight of the rats that obtained MT-treatment after surgery did not change compared with the control animals during the whole studied postoperative period.

The tests of locomotion, exploration activity and anxiety provide us with the indicators of underlying pain. Over the 6 days of testing the control rats (1) showed an unchanged level of locomotion, exploration and anxiety (Fig. 3).

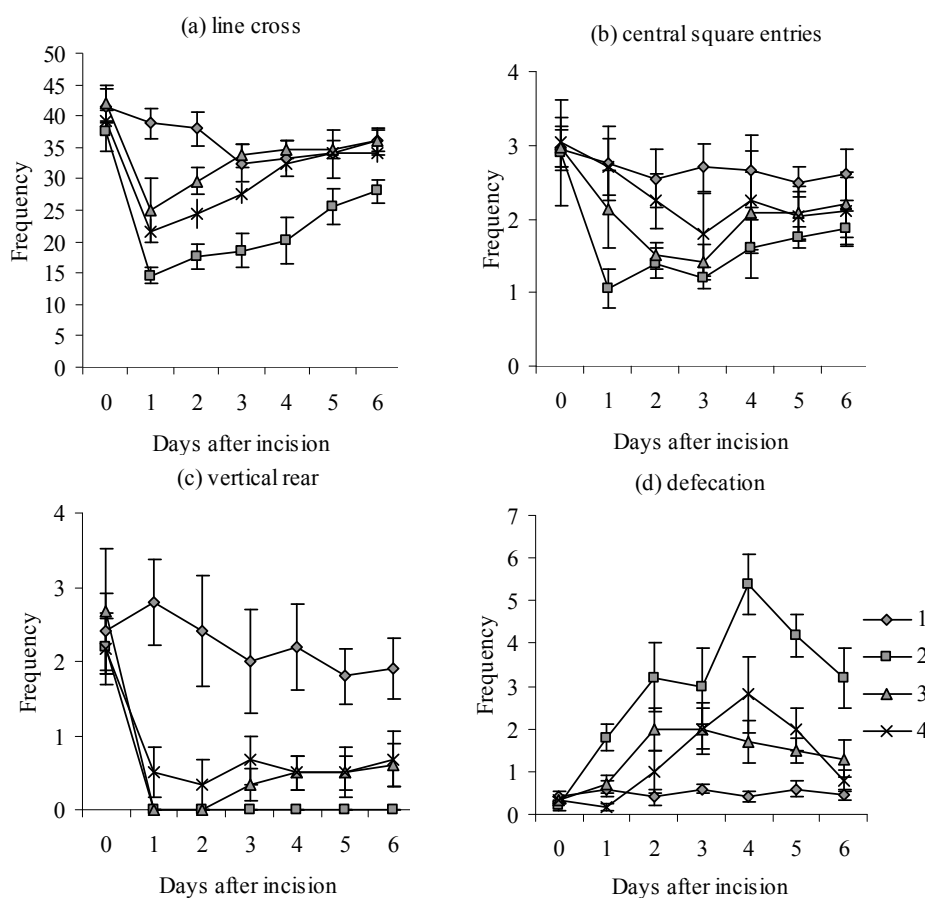


Fig. 3. Frequency of physiological activity of rats in the open field test:

1 – control, without any treatment ($n = 8$); 2 – incision ($n = 8$); 3 – injection by 0.2 ml physiological solution containing $48 \mu\text{g}$ MT-I+II per animal during 2 days after incision ($n = 8$); 4 – injection by $100 \mu\text{g}$ MT-I+II per animal during 2 days after incision ($n = 6$)

The highest significant difference was found for the all tests for rats (2) on day 1 after surgery. During next 5 days locomotive activity including frequency of line cross and central square entries returned gradually, however, the control level was not yet reached at day 6 after incision. The open field test revealed a high increase of anxiety during 6 days after surgery. The frequency of defecation was elevated to 3–5 times during week after incision. Injection of MT-II in the dose 48 µg/rat twice per day during 2 days after incision induced better recovery of locomotion of treated rats compared with the operated animals but there was not so much exploration activity and anxiety after incision. Much better results were shown for the rats under MT-II treatment at a dose of 100 µg/rat twice per day during 2 days after incision. The results obtained indicate that injection by MT-II prevents postoperative hyperalgesia according to mild alteration of all studied physiological tests. Moreover, we can see that recovery of locomotion and exploration activity, and decrease of anxiety under MT-II treatment by 100 µg/rat was already evidence by day 4 after surgery.

Many cellular events recognized by the system are believed to be the central event in the initiation of algesia after surgical procedure, in which activation of NMDA receptors plays the key role. Previously it was believed that zinc inhibits NMDA receptors at two independent sites: 1) low-affinity inside zinc-binding site induces the voltage-dependent inhibition of NMDA-receptors; 2) high-affinity outside zinc-binding site promotes the voltage-independent inhibition. Later data suggest that tyrosine kinase Src potentiates NMDA-receptors currents by reducing the tonic inhibition of receptors composed of NR1 and NR2A subunits by extracellular zinc (Vander Jagt et al., 2009). The data obtained in our study link two modulator sites of NMDA receptors. Metallothioneins can help to regulate the zinc donation to provide efficiency of NMDA inhibition.

Conclusion

The protective role of metallothioneins against *Cd* toxicity can change the level and character of MT distribution in the different brain regions subject to acute or chronic *Cd* poisoning.

Other proposed functions of MT, such as maintaining essential metal (zinc) homeostasis, regulating gene expression, tissue regeneration and inhibition of postoperative pain could contribute to protection by MT of the nervous system and the whole organism.

References

- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59, 95–104.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K., Haque, M.E., Fujita, N., Ogawa, N., 2002. Aggravation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain. *Neurosci. Lett.* 327, 61–65.
- Aschner, M., Sonnewald, U., Tan, K.H., 2002. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol.* 12, 475–481.
- Bremner, L., 1987. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52, 81–107.
- Brennan, T.J., Vandermeulen, E.P., Gebhart, G.F., 1996. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 64(3), 493–521.
- Chen, W.Q., Cheng, Y.Y., Li, S.T., Wang, D.L., Yu, Z., Hong, Y., 2005. Effects of zinc on the expression of metallothionein isoforms in hippocampus of stressed rats. *Wei Sheng Yan Jiu* 34(2), 201–204.
- Danielyan, L., Tolstonog, G., Traub, P., Salvetter, J., Gleiter, C.H., Reisig, D., Gebhardt, R., Buniatian, G.H., 2007. Colocalization of glial fibrillary acidic protein, metallothionein, and MHC II in human, rat, NOD/SCID, and nude mouse skin keratinocytes and fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 127(3), 555–563.
- DiSilvestro, R.A., Joseph, E., 1995. An acute phase response does not elevate rat heart metallothionein levels, nor inhibit adriamycin toxicity. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 88(1), 107–114.
- Giralt, M., Penkowa, M., Lago, N., Molinero, A., Hidalgo, J., 2002. Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp. Neurol.* 173, 114–128.
- Groten, J.P., Koeman, J.H., van Nesselrooij, J.H., 1994. Comparison of renal toxicity after long-term oral administration of cadmium chloride and cadmium-metallothionein in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 23, 544–552.
- Kazantzis, G., 2004. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *Biomaterials* 17(5), 493–498.
- Koob, A.O., Cirillo, J., Babbs, C.F., 2006. A novel open field activity detector to determine spatial and temporal movement of laboratory animals after injury and disease. *J. Neurosci. Methods* 157(2), 330–336.
- Liu, J., Goyer, R.A., Waalkes, M.P., 2007. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D., ed. *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons* 7, 931–979.
- Margoshes, M., Vallee, B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1813–1814.
- Munoz, A., Petering, D.H., Shaw, C.F., 2000. Structure-reactivity relationships among metallothionein three-metal domains: Role of non-cysteine amino acid residues in lobster metallothionein and human metallothionein-3. *Inorg. Chem.* 39(26), 6114–6123.
- Nordberg, G.F., 2004. Cadmium and health in the 21st century – historical remarks and trends for the future. *Biomaterials* 17, 485–489.
- Nordberg, G.F., Goyer, R., Nordberg, M., 1975. Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. *Arch. Pathol.* 99, 192–197.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P., Palmiter, R.D., 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33, 7250–7259.
- Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z., Schaffner, W., 1993. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* 12, 1355–1362.
- Simpkins, C.O., 2000. Metallothionein in human disease. *Cell. Mol. Biol.* 46(11), 465–488.
- Sullivan, V.K., Cousins, R.J., 1997. Competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction shows that dietary zinc supplementation in humans increases monocyte metallothionein mRNA levels. *J. Nutr.* 127(5), 694–698.
- Ushakova, G.A., Kruchinenko, O.A., 2008. Effect of chronic intoxication with cadmium on the level of metallothionein in the rat hippocampus. *Neirofiziolgiya / Neurophysiology* 40(5–6), 426–428.
- Ushakova, G.A., Kruchinenko, O.A., 2009. Peculiarities of the molecular structure and functions of metallothioneins in the central nervous system. *Neirofiziolgiya / Neurophysiology* 41(5), 355–364.

- Vander Jagt, T.A., Connor, J.A., Weiss, J.H., Shuttleworth, C.W., 2009. Intracellular Zn^{2+} increases contribute to the progression of excitotoxic Ca^{2+} increases in apical dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience* 159(1), 104–114.
- Vasak, M., Hasler, D.W., 2000. Metallothioneins: New functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 177–183.
- West, A.K., Stallings, R., Hildebrand, C.E., Chiu, R., Karin, M., Richards, R.I., 1990. Human metallothionein genes: Structure of the functional locus at 16q13. *Genomics* 8, 513–518.
- Yajima, H., Sato, J., Giron, R., Nakamura, R., Mizumura, K., 2005. Inhibitory, facilitatory, and excitatory effects of ATP and purinergic receptor agonists on the activity of rat cutaneous nociceptors *in vitro*. *Neurosci. Res.* 51(4), 405–416.

Надійшла до редколегії 19.11.2013



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologîâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

Зміст

Деркач К.В., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Молитва О.А., Калугина В.С., Панасенко М.Г., Печорна С.С. Оцінка здатності до прямої регенерації у ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер	59
Пахомов О.Є., Василюк О.М., Замєсова Т.А. Вплив іонів Ni на активність аспаратамінотрансферази в листках <i>Glechoma hederacea</i> в умовах рийної діяльності ссавців	64
Чернетченко Д.В., Моцний М.П., Боцьва Н.П., Єліна О.В., Мілих М.М. Автоматизована система реєстрації біоелектричних потенціалів	70
Ситник С.А., Ловинська В.М., Величко В.М. Лісівничо-таксаційний аналіз лісів Дніпропетровської області	76
Ткаченко М.Ю. Особливості плодючості бичка кругляка (<i>Neogobius melanostomus</i>) за різних екологічних умов ..	83
Голобородько К.К., Махіна В.О. Лускокрилі (Lepidoptera), які охороняються в Національному природному парку «Великий Луг»	89
Кочубей С.О. Вплив синхронного та асинхронного сигналів від пірамідних нейронів на синхронізацію в мережах ГАМКергічних інтернейронів гіпокампа	95
Рогожин Е.А. Вредоносность нематоды <i>Longidorus leptcephalus</i> на ягодных культурах в условиях вегетационного опыта	101
Шевцова Т.В., Гаркавая Е.Г., Бриндза Я., Брюзгина Т.С., Гроза В.А. Белково-липидный состав пыльцы березы бородавчатой (<i>Betula verrucosa</i>) и ее антиоксидантная активность в зависимости от места произрастания	105
Ушакова Г.О., Ковальчук Ю.П. Мультипотентна роль металотіонеїну в нервовій системі	113

Content

Derkach K.V., Abraimova O.E., Satarova T.M., Molitva O.A., Kalugina V.S., Panasenko M.G., Pechorna S.S. Evaluation of the capacity for direct regeneration of maize inbreds of the Lancaster selection group	59
Pakhomov A.Y., Vasilyuk O.M., Zamesova T.A. Effect of Ni on aspartataminotransferase activity in <i>Glechoma hederacea</i> leaves subject to digging function by mammals	64
Chernetchenko D.V., Motsnyj M.P., Botsva N.P., Elina O.V., Milykh M.M. Automated experiment for registration of bioelectrical potentials	70
Sytnik S.A., Lovinska V.M., Velichko V.M. Silvicultural and classificatory analysis of forests of Dnipropetrovsk region	76
Tkachenko M. The specificities of round goby fecundity (<i>Neogobius melanostomus</i>) in different ecological conditions ..	83
Goloborodko K., Mahina V. Protected species of butterflies (Lepidoptera) in the National Nature Park “Velyky Lug”	89
Kochubey S.O. Influence of synchronous and asynchronous signals from pyramidal neurons on synchronization of GABAergic interneuronal networks on the hippocampus	95
Rogozhin E.A. Pathogenicity of the nematode <i>Longodorus leptcephalus</i> towards berry plants in vegetative environments	101
Shevtsova T., Garkava E., Brindza J., Brjuzgina T., Groza V. Protein-lipid composition of silver birch (<i>Betula verrucosa</i>) pollen and its antioxidant activity depending on habitat	105
Ushakova G.A., Kovalchuk Y.P. The multipotent role of metallothionein in the nervous system	113

Друкується за рішенням вченої ради Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара
згідно з планом видань на 2013 рік

Редакційна колегія (Editorial Board)

Голова редакційної колегії:

Пахомов Олександр Євгенович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, декан ф-ту біології екології та медицини; д-р біол. наук, проф.

Заступники голови редакційної колегії:

Wasser Solomon P. – University of Haifa, Institute of Evolution, International Centre for Biotechnology and Biodiversity of Fungi, Haifa, Israel; Dr., Prof.;

Tchounwou Paul B. – Jackson State University, College of Science, Engineering & Technology, NIH-RCMI Center for Environmental Health, Associate Dean & Presidential Distinguished Professor, Jackson, USA; Sc. D.;

Fedak George – Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Eastern Cereal and Oilseed Research Centre (ECORC), Canada; Dr., Prof.

Науковий секретар редакційної колегії:

Бригадиренко Віктор Васильович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, доцент каф. зоології та екології; канд. біол. наук, доц.

Члени редакційної колегії:

Bedő Zoltán – Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary; D. Sc.;

Balázsy Sándor – Bessenyei György College, Hungary; Prof.;

Barabasz Wieslaw – Agricultural University of Krakow, Department of Microbiology; Dr hab., Prof.;

Demberel Shirchin – The Mongolian Academy of Agricultural Science, Project Director of LAB Research, Mongolia; Sc. D, Prof.;

Kozytska S. – Institut fuer Molekulare Infektionsbiologie, Universitaet Wuerzburg, Deutschland; Dr.;

Kuschik Peter – Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Department of Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany; Dr.;

Pierzynowski Stefan G. – Lund University, Dept of Biology, Lund, Sweden; PhD, Prof.;

Vološčuk Ivan – Technická univerzita vo Zvolene, Fakulta Ekologie a Environmentalistiky, Slovak Republic; Prof., DrSc.;

Вінніков Альберт Іванович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. мікробіології, вірусології та біотехнології; д-р біол. наук, проф.;

Гаско Віктор Якович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. зоології та екології; канд. біол. наук, доц.;

Джебуадзе Юрій Юліанович – Інститут проблем екології та еволюції ім. О. М. Северцова РАН, заступник директора; академік РАН, д-р біол. наук;

Лихолат Юрій Васильович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. фізіології та інтродукції рослин; д-р біол. наук, проф.;

Мицик Леонід Павлович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. геоботаніки, ґрунтознавства та екології; д-р біол. наук, проф.;

Недзвецький Віктор Станіславович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.;

Сатарова Тетяна Миколаївна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. мікробіології, вірусології та біотехнології; д-р біол. наук, проф.;

Севериновська Олена Вікторівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. фізіології людини та тварин; д-р біол. наук., проф.;

Семенченко Віталій Павлович – ГНПО «НПЦ НАН Білорусі по біоресурсам», заступник генерального директора з наукової роботи, завідувач лабораторії гідробіології; член-кор. НАН Білорусі, д-р біол. наук.;

Травяєв Анатолій Павлович – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, проф. каф. геоботаніки, ґрунтознавства та екології; член-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.;

Федоненко Олена Вікторівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. загальної біології та водних біоресурсів; д-р біол. наук, проф.;

Штеменко Наталія Іванівна – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, завідувач каф. біофізики та біохімії; д-р біол. наук, проф.

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія

Заснований у 1993 р.

Том 21(2)

Українською, російською та англійською мовами

Свідоцтво державної реєстрації серія КВ № 7898 від 17.09.2003 р.

Редактор В.Д. Маловик
Оригінал-макет виготовив В.В. Бригадиренко

Підписано до друку 25.12.2013. Формат 60×84 ¹/₁₆. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 9,3. Ум. фарбовідб. 9,3. Обл.-вид. арк. 9,3. Тираж 100 пр. Вид. № 1594. Замовлене

Свідоцтво державної реєстрації № ДК – 289 від 21.12.2000 р.

Видавництво Дніпропетровського університету,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010