

ISSN 2415-8860 (online)  
ISSN 0372-4123 (print)

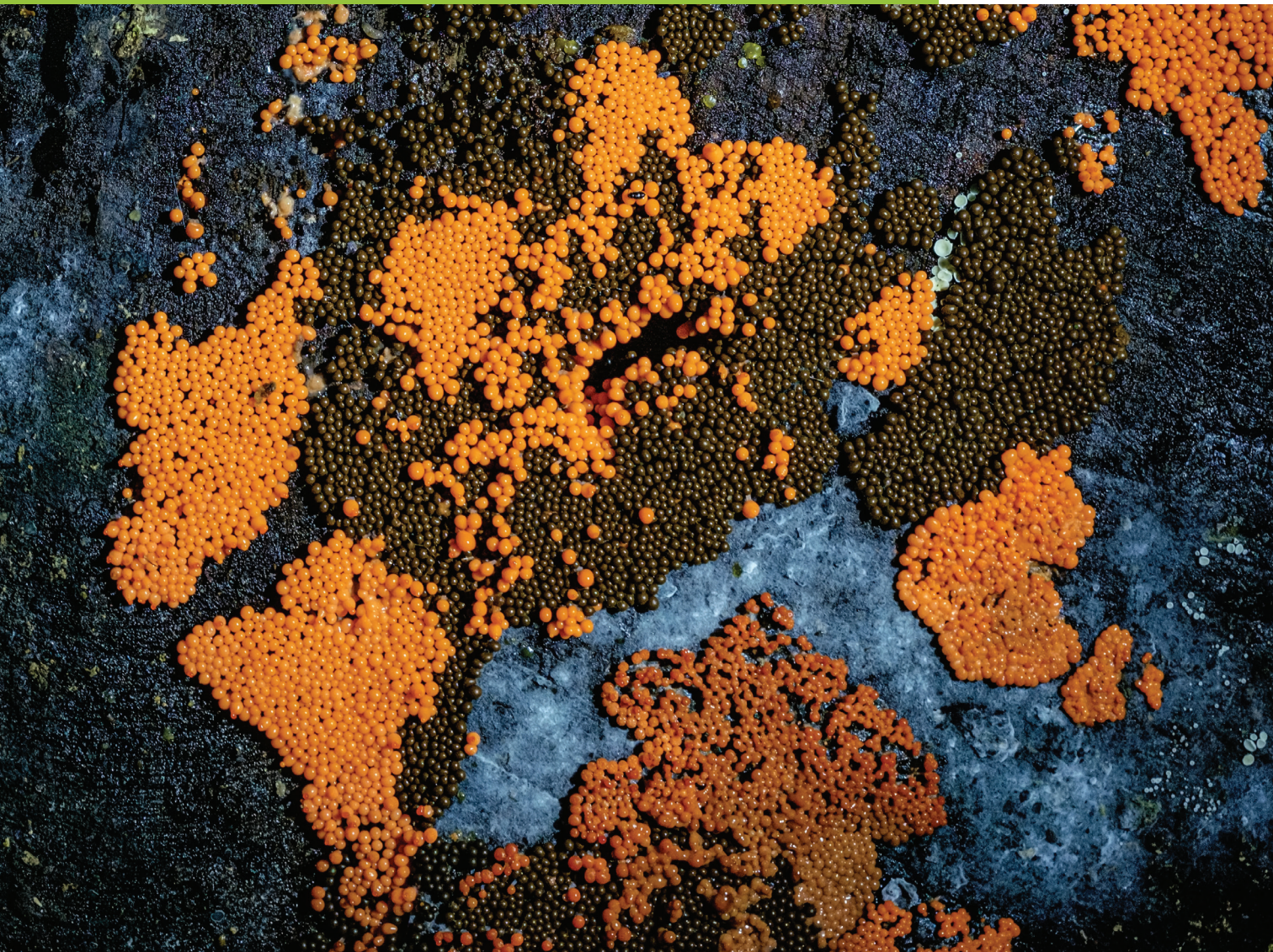


# UKRAINIAN BOTANICAL JOURNAL

*An international journal for botany & mycology*

УКРАЇНСЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ ЖУРНАЛ

2020 • 77 • 5



УКРАЇНСЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ ЖУРНАЛ публікує статті з усіх напрямів ботаніки та мікології, в тому числі із загальних питань, систематики, флористики, геоботаніки, екології, еволюційної біології, географії, історії флори та рослинності, а також морфології, анатомії, фізіології, біохімії, клітинної та молекулярної біології рослин і грибів. Статті, повідомлення та інші матеріали публікуються в таких основних розділах: *Загальні проблеми, огляди та дискусії, Систематика, флористика, географія рослин, Гриби і грибоподібні організми, Геоботаніка, екологія, охорона рослинного світу, Червона книга України, Флористичні знахідки, Мікологічні знахідки, Структурна ботаніка, Біотехнологія, фізіологія, біохімія, Клітинна та молекулярна біологія, Гербарна справа, Історія науки, Хроніка, Ювілейні дати, Втрати науки, Рецензії та новини літератури.*

Статті друкуються українською та англійською мовами

UKRAINIAN BOTANICAL JOURNAL is a scientific journal publishing articles and contributions on all aspects of botany and mycology, including general issues, taxonomy, floristics, vegetation science, ecology, evolutionary biology, geography, history of flora and vegetation as well as morphology, anatomy, physiology, biochemistry, cell and molecular biology of plants and fungi. Original articles, short communications and other contributions are published in sections *General Issues, Reviews and Discussions, Plant Taxonomy, Geography and Floristics, Fungi and Fungi-like Organisms, Vegetation Science, Ecology and Conservation, Red Data Book of Ukraine, Floristic Records, Mycological Records, Structural Botany, Biotechnology, Physiology and Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology, Herbarium Curation, History of Science, News and Views, Anniversary Dates, In Memoriam, Reviews and Notices of Publications.*

Publication languages: Ukrainian and English

#### РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Головний редактор – Сергій Л. МОСЯКІН

Заступники головного редактора – Ганна В. БОЙКО,  
Віра П. ГАЙОВА

Соломон П. ВАСЦЕР, Філіп ВЕРЛООВ (Бельгія),  
Василь П. ГЕЛЮТА, Зігматас ГУДЖИНСКАС (Литва),  
Яків П. ДІДУХ, Дмитро В. ДУБИНА,  
Олена К. ЗОЛОТАРЬОВА, Сергій Я. КОНДРАТЮК,  
Слізавета Л. КОРДЮМ, Ірина А. КОРОТЧЕНКО,  
Ірина В. КОСАКІВСЬКА, Кароль МАРГОЛЬД (Словаччина),  
Евіатар НЕВО (Ізраїль), Віктор І. ПАРФЬОНОВ (Білорусь),  
Пітер РЕЙВЕН (США), Марина М. СУХОМЛИН,  
Сусуму ТАКАМАЦУ (Японія), Микола М. ФЕДОРОНЧУК,  
Олександр Є. ХОДОСОВЦЕВ, Петро М. ЦАРЕНКО,  
Ілля І. ЧОРНЕЙ, Мирослав В. ШЕВЕРА,  
Наталія М. ШИЯН, Богдан ЯЦКОВЯК (Польща)  
Відповідальний секретар Марія Д. АЛЕЙНІКОВА

#### EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief – Sergei L. MOSYAKIN

Associate Editors – Ganna V. BOIKO  
Vera P. HAYOVA

Ilyia I. CHORNEY, Yakiv P. DIDUKH, Dmytro V. DUBYNA,  
Mykola M. FEDORONCHUK,  
Zigmantas GUDŽINSKAS (Lithuania), Vasyly P. HELUTA,  
Bogdan JACKOWIAK (Poland), Olexander E. KHODOSOVTSSEV,  
Sergey Y. KONDRATYUK, Elizabeth L. KORDYUM,  
Iryna A. KOROTCHENKO, Iryna V. KOSAKIVSKA,  
Karol MARHOLD (Slovakia), Eviatar NEVO (Israel),  
Victor I. PARFENOV (Belarus), Peter RAVEN (USA),  
Myroslav V. SHEVERA, Natalia M. SHYIAN,  
Maryna M. SUKHOMLYN, Susumu TAKAMATSU (Japan),  
Petro M. TSARENKO, Filip VERLOOVE (Belgium),  
Solomon P. WASSER, Olena K. ZOLOTAREVA  
Editorial Assistant – Mariya D. ALEINIKOVA

---

**На першій сторінці обкладинки:** *Trichia* sp. на корі *Fagus sylvatica*, Закарпаття  
Фото © Андрій Зубенко

**Front page:** *Trichia* sp. on bark of *Fagus sylvatica*, Transcarpathian Region  
Photo by © Andrew Zubenko

---

✉ Редакція "Українського ботанічного журналу"  
Інститут ботаніки НАН України  
вул. Терещенківська 2, Київ 01601, Україна

+380 44 235 4182  
[secretary\\_ubzh@ukr.net](mailto:secretary_ubzh@ukr.net)  
<https://ukrbotj.co.ua>

# УКРАЇНСЬКИЙ 2020 • 77 • 5 БОТАНІЧНИЙ ЖУРНАЛ UKRAINIAN BOTANICAL JOURNAL

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ • ЗАСНОВАНИЙ 1921 р. • SCIENTIFIC JOURNAL • PUBLISHED SINCE 1921

## З М І С Т

### **Червона книга України**

Мельник В.І., Баранський О.Р. Генезис та динаміка ареалу *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) в межах України . . . . . 349

### **Флористичні знахідки**

Бурлака М.Д. Єдина знахідка *Ophioglossum vulgatum* (*Ophioglossaceae*) у лісостеповій частині Житомирської області . . 363

### **Структурна ботаніка**

Царенко О.М., Цимбалюк З.М., Булах О.В., Ниценко Л.М. Морфологічні особливості квіток, пилкових зерен і плодів *Valeriana tuberosa* (*Valerianaceae*) . . . . . 369

### **Біотехнологія, фізіологія, біохімія**

Бойко С.М. Целюлази базидієвих грибів для розробки технологій біоконверсії клітковини . . . . . 378

Гош С.С., Дас М., Басу С., Адікарі Ю. Глюконеогенна фруктозо-1,6-бісфосфатаза зрілих спорокарпіїв звичайних видів водяних папоротей: часткове очищення та основна характеристика цього ферменту у *Marsilea minuta* (*Polypodiopsida*) . . 386

### **Клітинна та молекулярна біологія**

Хасанова А.Е., Мусасєв Н.А. Біоелектричні характеристики клітин *Chara fragilis* (*Characeae*) . . . . . 398

### **Ювілейні дати**

Пірко Я.В., Пірко Н.М., Калафат Л.О., Приваліхін С.М., Демкович А.Є., Білоножко Ю.О., Лихолат Ю.В., Бойко С.М., Бойко Г.В., Блюм Я.Б. Іван Іванович Коршиков (до 70-річчя від дня народження та 50-річчя наукової діяльності) . . 405

### **Втрати науки**

Кагало О.О., Марискевич О.Г., Канарський Ю.В., Кияк В.Г., Лобачевська О.Г., Шпаківська І.М. Світлій пам'яті Миколи Павловича Козловського (1956–2020) . . . . . 407

Ященко П.Т., Приндак В.П., Кагало О.О., Жижин М.П., Андрєєва О.О. Пам'яті вченої. Мілкіна Лідія Іванівна (1935–2020) . . . . . 409

## CONTENTS

### **Red Data Book of Ukraine**

Melnyk V.I., Baransky A.R. Genesis and dynamics of the range of *Daphne cneorum* (Thymelaceae) within Ukraine . . . . . 349

### **Floristic Records**

Burlaka M.D. A unique locality of *Ophioglossum vulgatum* (Ophioglossaceae) in forest-steppe part of Zhytomyr Region . . . . . 363

### **Structural Botany**

Tsarenko O.M., Tsymbalyuk Z.M., Bulakh O.V., Nitsenko L.M. Morphological peculiarities of flowers, pollen grains and fruits of *Valeriana tuberosa* (Valerianaceae) . . . . . 369

### **Biotechnology, Physiology and Biochemistry**

Boiko S.M. Cellulases of basidiomycetes for the development of cellulose bioconversion technologies . . . . . 378

Ghosh S.S., Das M., Basu S., Adhikari J. Gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase from the mature sporocarps of common aquatic ferns: partial purification and basic characterization of this enzyme from *Marsilea minuta* (Polypodiopsida) . . . . . 386

### **Cell Biology and Molecular Biology**

Hasanova A.E., Musayev N.A. Bioelectric characteristics of *Chara fragilis* (Characeae) cells . . . . . 398

### **Anniversary Dates**

Pirko Ya.V., Pirko N.M., Kalafat L.O., Pryvalikhin S.M., Demkovych A.Ye., Bilonozhko Yu.O., Lycholat Yu.V., Boiko S.M., Boiko G.V., Blume Ya.B. Ivan Ivanovych Korshykov (on the 70<sup>th</sup> anniversary of birth and 50<sup>th</sup> anniversary of scientific activity) . . . . . 405

### **In Memoriam**

Kagalo A.A., Maryshevych O.G., Kanarskyi Yu.V., Kyvak V.H., Lobachevska O.V., Shpakivska I.M. In memory of Mykola Pavlovych Kozlovsky (1956–2020) . . . . . 407

Yashchenko P.T., Pryndak V.P., Kagalo A.A., Zhyzhyn N.P., Andriieva O.O. In memory of Lidiya Ivanivna Milkina (1935–2020) . . . . . 409



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.05.349>

## Генезис та динаміка ареалу *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) в межах України

Віктор І. МЕЛЬНИК, Олександр Р. БАРАНСЬКИЙ

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України  
вул. Тимірязєвська 1, Київ 01014, Україна  
[melnykviktor6@gmail.com](mailto:melnykviktor6@gmail.com)  
[abaransky@ukr.net](mailto:abaransky@ukr.net)

Melnyk V.I., Baransky A.R. 2020. **Genesis and dynamics of the range of *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) within Ukraine.** *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 349–362.

M.M. Gryshko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine  
1 Tymiriazevska Str., Kyiv 01014, Ukraine

**Abstract.** A detailed study of the geographical distribution and populations status in historical aspects of *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*), a rare species in Europe, was conducted to establish the dynamics of its range in Ukraine. Analysis of phytogeographic and paleological data showed that this is a migratory relict species (*sensu* Szafer, 1975). As a tertiary relic, *D. sneorum* survived in the Volhynian-Podolian Upland. From this refugium, it migrated to the Polissya and Dnipro lowlands as well as the Dnipro and Lublin uplands in the interglacial and postglacial periods. The range of *D. sneorum* in Ukraine currently consists of two separate areas, Volhynian-Podolian and Dnipro fragments. The disjunction apparently arose as a result of inconsistency of the ecological conditions (acid soils on crystalline rocks) of the Ukrainian shield and physiological needs of the calcophilous species *D. sneorum*. In our opinion, the disjunctions between the Volhynian-Podolian, Belarus and Lublin parts of the range are of anthropogenic origin. Over the last century, an intensive degradation of populations and fragmentation of the range of *D. sneorum* took place in Ukraine. Anthropogenic pressure has led to regressive changes in the species range in the country. Due to low seed productivity, plant death is not compensated by replenishment and therefore in disturbed habitats populations of *D. sneorum* are completely eliminated. The species has apparently disappeared from the flora of Roztocze, Volhynian Upland and the Kremenets Mountains. Since the absolute protection regime is ineffective for *D. sneorum* populations, the need to develop conservation management for this species in natural habitats is emphasized.

**Keywords:** *Daphne sneorum*, habitat, population, protection, range, *Red Data Book of Ukraine*, relic, Ukraine

Submitted 10 December 2019. Published 31 October 2020

Мельник В.І., Баранський О.Р. 2020. **Генезис та динаміка ареалу *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) в межах України.** *Український ботанічний журнал*, 77(5): 349–362.

**Реферат.** Детальне вивчення географічного поширення та стану популяцій рідкісного виду флори Європи *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) в історичному аспекті від початку флористичних досліджень дозволило встановити динаміку його ареалу в нашій країні. Аналіз фітогеографічних та палеологічних даних показав, що цей вид є міграційним реліктом (в сенсі Szafer, 1975). Як третинний релікт *D. sneorum* зберігся на Волино-Подільській височині та з цього рефугіуму мігрував на Полісся та Придніпровську низовину і Придніпровську та Люблінську височини в міжльодовиковому та післяльодовиковому періодах. Українська частина ареалу *D. sneorum* складається з двох фрагментів – волино-подільського та придніпровського. Диз'юнкція, вочевидь, виникла в результаті невідповідності екологічних умов (кислі ґрунти на кристалічних породах) Українського щита фізіологічним потребам кальцієфільного виду *D. sneorum*. Диз'юнкції між волино-подільською, білоруською та люблінською частинами ареалу виду мають, на нашу думку, антропогенне походження. Протягом останнього сторіччя в Україні відбувається інтенсивна деградація популяцій та фрагментація ареалу *D. sneorum*. Антропогенне навантаження призвело до регресивних змін ареалу виду в країні. У зв'язку з низькою насінневою продуктивністю відмирання рослин не компенсується поповненням і в порушених місцезростаннях відбувається повна елімінація популяцій *D. sneorum*. Вид зник зі складу флори Розточчя, Волинської височини та Кременецьких гір. Оскільки абсолютний заповідний режим є неефективним для популяцій *D. sneorum*, наголошено на необхідності розробити заходи з охорони цього виду в природних місцезростаннях.

**Ключові слова:** *Daphne sneorum*, ареал, місцезростання, охорона, популяція, релікт, Україна, Червона книга України

© 2020 V.I. Melnyk, A.R. Baransky. Published by the M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

## Вступ

*Daphne sneorum* L. (*Thymelaceae*) – рідкісний вид флори України та всієї Європи, включений до Червоних книг України, Білорусі, Болгарії, Польщі, Росії, Хорватії та Чехії і Словаччини, національних Червоних списків Австрії, Боснії і Герцеговини, Німеччини, Румунії, Словенії, Угорщини, Чорногорії, Швейцарії, регіональних червоних списків Іспанії, Італії, Франції, а також був рекомендований для внесення до Європейського Червоного списку (Rote..., 1986; Landolt, 1991; Oltean et al., 1994; Rote..., 1996; Skoberne, 1996; Maglocký, 1999; European..., 2001; Przemyski, 2001; List..., 2002; Crvena..., 2005; Király, 2007; Kiseleva, 2008; Didukh, 2009; Dymytrova, 2011; Crvena..., 2013; Parfenov, Savchuk, 2015; Girón, García, 2018; Orsenigo, 2019).

У зв'язку з регресивними змінами ареалу *D. sneorum* під впливом антропогенних факторів актуальними завданнями є вивчення стану популяцій цього виду в межах всієї Європи. У наших попередніх публікаціях (Melnyk, 1986, 1994, 1995) описано умови місцезростань та стан популяцій *D. sneorum* в Україні. Метою даної роботи є висвітлення генезису та динаміки ареалу цього виду в межах нашої країни.

## Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були географічні популяції *D. sneorum* в Україні. Історію формування ареалу *D. sneorum* в Україні встановлювали за матеріалами фітогеографічного та палеоботанічного вивчення цього виду в межах всієї Європи. Детальний аналіз географічного поширення та умов місцезростань в історичному аспекті проведено на основі літературних, гербарних, архівних даних та матеріалів власних експедиційних досліджень (наведені у Переліку локалітетів). Моніторинг за станом популяцій виду в різних частинах ареалу в Україні проводився впродовж 1979–2019 рр. До наукового обігу залучено архівний документ, в якому наведені результати обліку популяцій *D. sneorum* у лісництвах Черкаського обласного управління лісового господарства і лісозаготівель у 1977 р.: "Директору ЦРБС член-кор. АН УССР тов. Гродзинскому А.М. Областное управление направляет материалы обследования насаждений с наличием кустарника волчегородника душистого (боровика)..." (особистий архів В.І. Мельника).

Фітоценотичні описи угруповань з участю *D. sneorum* проводились за методикою, прийнятою в східній Європі (Rabotnov, 1984). У статті огляд географічного поширення популяцій на території України здійснено за фізико-географічним районуванням (Marynych et al., 2003).

Латинські назви рослин подано за базою *Catalogue of Life: 2019 Annual Checklist* (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/>).

## Результати та обговорення

*Daphne sneorum* – рідкісний вид флори Європи, диз'юнктивний ареал якого охоплює як гірські масиви (Піренеї, Центральний Масив, Альпи, Апенніни, Юра, Вогези, Балкани, Карпати (за винятком Українських та Польських), П'єніни), так і рівнинні регіони Австрії, Франції (рівнина Ланди, височини в межах історичних областей Бургундія і Шампань), Німеччини (височини в межах федеральних земель Баварія, Баден-Вюртемберг, Ессен, Рейнланд-Пфальц), Румунії (Трансільванське плато), Словаччини (Загорська низовина), Польщі (Сандомирська низовина, Малопольська та Люблінська височини), України (Поліська низовина, Волино-Подільська і Придніпровська височини, Придніпровська низовина), Росії (Середньоросійська височина) (Aumonin, 1958, 1959; Meusel et al., 1978; Melnyk, 1986; Witschel, Seyboldt, 1986) (рис. 1).

У межах України розташовано два фрагменти ареалу *D. sneorum* – волино-подільський та придніпровський з диз'юнкцією в 350 км (рис. 2).

Ці фрагменти приурочені до областей приповерхневого залягання карбонатних порід – Волино-Подільської та Донецько-Дніпровської, між якими розміщений Український щит. На його кристалічних породах сформувались кислі ґрунти, які не відповідають екологічним потребам *D. sneorum* і є бар'єром для його географічного поширення (Melnyk, 1995). З огляду на це, логічно допустити, що обидва українські фрагменти ареалу *D. sneorum* не були з'єднаними між собою. В гербарних фондах майже відсутні зразки *D. sneorum* з Житомирського Полісся. У вітчизняних та зарубіжних гербаріях зафіксовано лише три зразки, зібрані на крайньому заході поліської частини Житомирської області на межі з Волинським Поліссям (див. Перелік локалітетів). Ще в 1852 р. були організовані спеціальні пошуки *D. sneorum* у лісах Житомирського лісництва

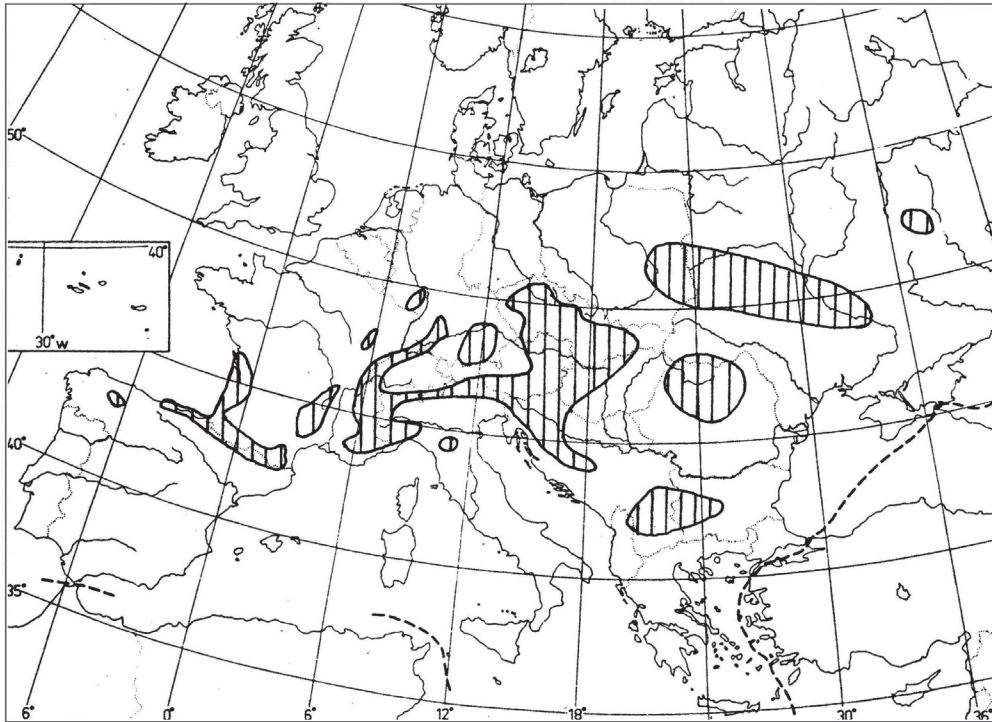


Рис. 1. Картохема ареалу *Daphne sneorum* (за даними Witschel, Seyboldt, 1986)  
 Fig. 1. A map of the range of *Daphne sneorum* (according to Witschel, Seyboldt, 1986)

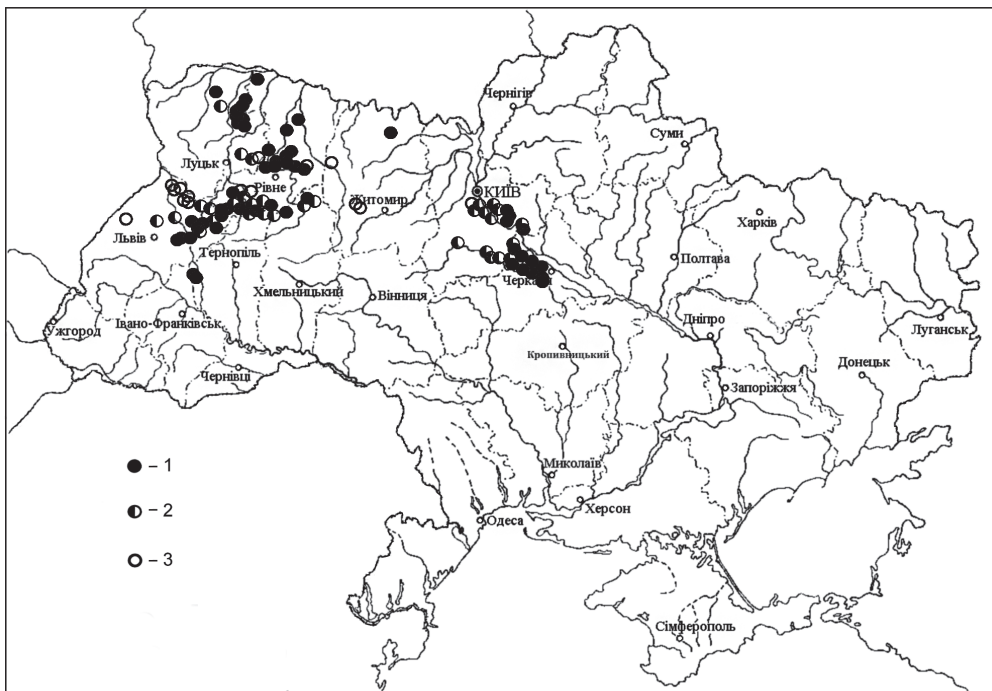


Рис. 2. Волино-подільський та придніпровський фрагменти ареалу *Daphne sneorum* в Україні: 1 – місцезнаходження, виявлені після 1950 р.; 2 – від 1900 до 1950 рр.; 3 – до 1900 р.  
 Fig. 2. The Volynian-Podolian and Dnieper fragments of the range of *Daphne sneorum* in Ukraine: 1 – localities reported after 1950; 2 – from 1900 to 1950; 3 – before 1900

(Hreve, 1855), які, однак, не мали успіху. До сьогодні *D. sneorum* у цьому регіоні не був виявлений. Зібрані нами детальні відомості з хорології *D. sneorum* дозволяють встановити поширення цього виду в обох українських фрагментах ареалу.

Волино-подільська частина ареалу *D. sneorum* займає простір від польсько-українського кордону до межі між Волинським та Житомирським Поліссям. Північна межа цього фрагменту ареалу *D. sneorum* проходить по лінії населених пунктів м. Камінь-Каширський Волинської обл.; смт Зарічне Рівненської обл.; с. Збраньки Овруцького р-ну Житомирської обл., далі повертає на південь до смт Городниця Новоград-Волинського р-ну та смт Биківка Романівського р-ну Житомирської обл.; міст Славути та Шепетівка Хмельницької обл.; міст Кременець і Бережани Тернопільської обл. Південна межа цього фрагменту ареалу проходить від м. Бережани до м. Золочева Львівської обл. та до м. Львова. Волино-подільська частина ареалу *D. sneorum* становить єдиний фрагмент ареалу з місцезнаходженнями на Люблінській височині в Польщі. Останні на сьогоднішній день вважаються зниклими (Przemyski ..., 2001).

Цілком можливо, що в минулому волино-подільські локалітети могли бути об'єднаними в єдину географічну популяцію з білоруськими місцезнаходженнями. В наш час у Білоруському Поліссі *D. sneorum* зростає в Лельчиському р-ні Гомельської обл. в околицях сіл Марківське, Глумовичі, Симовичі, Ветвиця (Parfenev, Savchuk, 2015). У минулому в цьому регіоні *D. sneorum* був більш широко поширеним, про що свідчить знахідка В. Бессера (Besser, 1832) поблизу м. Пінськ. Отже, на нашу думку, диз'юнкції між волино-подільською, білоруською і люблінською частинами ареалу мають антропогенне походження.

Придніпровський фрагмент ареалу *D. sneorum* розміщений на відстані 350 км від волино-подільського та охоплює Київську й Черкаську області. Географічне поширення цього виду в Придніпров'ї обмежене лінією населених пунктів с. Віта-Поштова смт Козин Києво-Святошинського р-ну; с. Трипілля Обухівського р-ну; міст Біла Церква та Богуслав Київської обл.; міст Корсунь-Шевченківський, Сміла та Черкаси Черкаської обл., далі на півдні нижньою течією річок Рось і Тясмин. На сході лінія цієї частини ареалу проходить поблизу сіл Свидівок, Михайлівка, Софіївка Черкаської обл. і далі вздовж лівої борової тераси Дніпра поблизу

с. Ліпляве Золотоніського р-ну Черкаської обл.; сіл Кийлів, Сошників і Старе Бориспільського р-ну Київської обл.

Умови місцезростань *D. sneorum* в Україні детально описані в наших попередніх публікаціях (Melnyk, 1995). Тут зауважимо, що його локалітети приурочені до соснових та дубово-соснових лісів Волино-Поділля, Полісся та Придніпров'я, буково-соснових лісів Розточчя та лучних степів Волино-Поділля.

Нами було виявлене нове місцезростання виду в дубовому лісі на Придніпровській височині. Воно розміщене за 4 км на північний захід від с. Руська Поляна в лісовому масиві Великий Черкаський бір у Черкаському військовому лісництві (Черкаський р-н Черкаської обл.). Місцезростання приурочене до супіщаних відкладів борової тераси Дніпра. Рельєф місцевості горбистий. Ґрунти – дерново-підзолисті, супіщані. Світлий дубовий ліс асоціації *Quercetum roboris pteridoso-herbosum* – розріджений (зімкненість крон 0,6%) та низькорослий – середня висота дерев 12 м, середній діаметр стовбурів 25 см. До складу деревостану окрім домінанта *Quercus robur* L. входять поодинокі дерева *Acer campestre* L., *A. platanoides* L., *Betula pendula* Roth, *Carpinus betulus* L., *Malus sylvestris* Mill., *Populus tremula* L., *Pyrus communis* L., *Tilia cordata* Mill. Розріджений підлісок утворений *Chamaecytisus ruthenicus* (Fisch. ex Wołoszcz.) Klásková, *Corylus avellana* L., *Frangula alnus* Mill. та *Euonymus verrucosa* Scop. Трав'яно-чагарниковий ярус добре розвинений, з проективним покриттям 90%. У ньому домінує *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (проективне покриття 40%), куртини якого чергуються з різнотрав'ям та чагарничками. До цього ярусу входять також *Ajuga genevensis* L., *Anthericum ramosum* L., *Betonica officinalis* L., *Carex leporina* L., *Clematis integrifolia* L., *Clinopodium vulgare* L., *Convallaria majalis* L., *Galium verum* L., *Pilosella officinarum* Vaill., *Hypericum perforatum* L., *Iris hungarica* Waldst. & Kit., *Jasione montana* L., *Luzula pilosa* (L.) Willd., *Melica nutans* L., *Origanum vulgare* L., *Peucedanum oreoselinum* (L.) Moench, *Thymus serpyllum* L., *Tragopogon ucrainicus* Artemczuk, *Trifolium alpestre* L., проективне покриття кожного з яких становить менше 1%. Проективне покриття *D. sneorum* – 5%. У цьому лісовому масиві на 100 м<sup>2</sup> припадає близько 30 куртин *D. sneorum*. Тут зростає ще два види з Червоної книги України (Didukh..., 2009) – *Iris arenaria* Waldst. & Kit. (наведений як *Iris peneticola* Klokov) і *Pulsatilla pratensis* Mill. Цілком можливо, що описаний



дубовий ліс є похідним від дубово-соснового. За свідченням місцевих жителів, у післявоєнні роки тут проводилась вирубка сосни, після чого дуб, який зростав у II ярусі, став домінантом угруповання. Розрідженість деревостану та невисокі показники його висоти та діаметра стовбурів свідчать, що екологічні умови не є оптимальними для його росту.

Подібні умови місцезростань *D. sneorum* відмічено в дубово-соснових та соснових лісах навколо цього невеликого осередку дубових лісів Великого Черкаського бору. Так, у 136 кв. Русько-Полянського лісництва місцезростання *D. sneorum* приурочене до світлого 100-річного соснового лісу *Pinetum pteridioso-herbosum*. Деревостан однарусний, повнота становить 0,7, середня висота дерев – 30 м, середній діаметр стовбурів – 45 см. У підросі переважають *Pinus sylvestris* L., *Acer platanoides*, *Betula pendula*, *Carpinus betulus*, *Populus tremula*. У підліску зростають *Berberis vulgaris* L., *Chamaecytisus ruthenicus*, *Crataegus monogyna* Jacq., *Euonymus europaeus* L., *Juniperus communis* L., *Rosa canina* L. Трав'яно-чагарничковий ярус добре розвинений, з проєктивним покриттям 90%. Тут домінує *Pteridium aquilinum* (проєктивне покриття 40%), куртини якого чергуються з різнотрав'ям та чагарничками. До складу цього ярусу входять також *Achillea millefolium* L., *Anthericum ramosum*, *Asparagus officinalis* L., *Betonica officinalis*, *Clematis integrifolia*, *Convallaria majalis*, *Pilosella officinarum*, *Genista tinctoria* L., *Iris hungarica*, *Koeleria glauca* (Spreng.) DC., *Origanum vulgare*, *Ornithogalum gussonei* Ten., *Peucedanum oreoselinum* (L.) Moench, *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce, *Pyrethrum corymbosum* (L.) Scop., *Pyrola rotundifolia* L., *Rubus saxatilis* L., *Sedum acre* L., *Stellaria holostea* L., *Thymus serpyllum*, *Tragopogon ucrainicus*, *Trifolium alpestre*. Із рідкісних видів, включених до Червоної книги України (2009), тут окрім *D. sneorum* зростають *Iris pineticola* (*I. arenaria*) та *Pulsatilla pratensis* Mill. На кожні 100 м<sup>2</sup> цього лісового масиву припадає близько 25 куртин *D. sneorum* з проєктивним покриттям останнього 3%.

Й.К. Пачоський (Paczoski, 1910), W. Szafer (1923), M. Koczwara (1926), J. Kornas (1948) відносили *D. sneorum* до третинних реліктів флори Волино-Поділля, W. Gajewski (1937), H. Walter (1974) – до льодовикових (гляціальних) реліктів флори Волино-Поділля та Придніпров'я. Ю.Д. Клеопов (Клеоров, 1928) вважав цей вид реліктом флори Придніпров'я, не зазначивши його віку.

Оскільки питання про реліктову природу та генезис ареалу *D. sneorum* в Україні є дискусійним, для з'ясування історії формування ареалу цього виду в межах нашої країни необхідно проаналізувати наявні ботаніко-географічні та палеоботанічні відомості щодо генезису ареалу виду з усієї Європи.

Значна кількість публікацій присвячена генезису середньоруської частини ареалу *D. sneorum*. Є.В. Вульф (Wulf, 1944) відносив *D. sneorum* (*D. julia* Kozo-Pol.) до третинних реліктів флори Середньоруської височини. Згідно з гіпотезою Б.М. Козо-Полянського (Kozo-Polianskiy, 1931), цей вид належить до так званих "знижених альпійців", які в період плейстоценових зледенінь спустились на Середньоруську височину з гір Центральної Європи.

Н.П. Виноградов і С.В. Голіцин (Vinogradov, Holitsyn, 1963) вказують, що *D. sneorum* не є альпійським видом, оскільки в горах Європи зростає в передгір'ях та нижніх поясах гір. Оскільки гірські локалітети *D. sneorum* розміщені на висоті 930–2280 м над р. м. (Hegi, 1925–1926; Aumonin, 1958; Witschel, Seybold, 1986), немає підстав вважати цей вид альпійським. Заперечуючи приналежність *D. sneorum* до "знижених альпійців", Н.П. Виноградов і С.В. Голіцин (Vinogradov, Holitsyn, 1963) не ставили під сумнів тезу Б.М. Козо-Полянського про *D. sneorum* як льодовиковий релікт. Вони вважали, що на Середньоруську височину цей вид проник під час дніпровського зледеніння, а в Придніпров'я – у в'юрмі. Г. Гроссет (Hrosset, 1964) відносив *D. sneorum* до реліктів флори соснових лісів післяльодовикового періоду.

Виявлення П.І. Дорофєєвим (Dorofeev, 1986) викопного насіння *D. sneorum* у відкладах верхнього пліоцену в околицях сіл Ичехмань і Мойсеево Тамбовської обл. Російської Федерації є важливою основою реконструкції науково-обґрунтованої історії ареалу виду в межах Східної Європи. Палеонтологічні рештки вказують, що цей вид є третинним реліктом флори Східної Європи, який пережив зледеніння на незайманих льодовиком підвищеннях у рельєфі. Викопне насіння *D. sneorum* також було виявлено П.І. Дорофєєвим (Dorofeev, 1986) у відкладах нижнього плейстоцену поблизу с. Мойсеево разом із викопними залишками *Betula humilis* Schrank, *Selaginella* sp. та інших льодовикових реліктів. Матеріали цих досліджень свідчать, що на Середньоруській височині *D. sneorum* є реліктом верхнього пліоцену, який у льодовиковому періоді

зростав у цьому регіоні разом з льодовиковими реліктами.

Абсолютно протилежними гіпотезі Б.М. Козо-Полянського про міграцію *D. sneorum* із заходу на схід є погляди К. Тролля (за Hegi, 1925–1926), згідно з якими *D. sneorum* мігрував зі сходу на захід уздовж течії Дунаю і проник на Баварське високогірне плато, захопивши окрім долини Дунаю лівобережну частину його басейну, та не проник у його правобережну частину.

Н. Gams (1930) відносив *D. sneorum* до реліктів третинних кедрових та секвоєвих лісів Альп. Згідно з Р. Jakucz (1961), *D. sneorum* є третинним реліктом флори Альп і Балкан, ценотично пов'язаним з угрупованнями *Orno-Ericion cornaeae* Horvat. М. Guşuleac (1932) відносив *D. sneorum* до третинних реліктів флори Південних Карпат (Трансільванія), а В. Zólyomi (1958) – до третинних реліктів флори гір Буда поблизу Будапешта. G. Pottier-Alapetite (1943) відносив *D. sneorum* до середземноморсько-гірських видів, в горах Юра він є реліктом рисс-вюрмського періоду. Це підтверджується наявністю викопних решток виду у вюрмських відкладах цього регіону. S. Muller (1997) відносив *D. sneorum* до реліктів бореального періоду флори регіону Бюгерланд (Північні Вогези).

Історія формування ареалу *D. sneorum* у межах всієї Європи розглянута в узагальнюючих роботах J. Aymonin (1958, 1959) та М. Witschel (1980, 1986). J. Aymonin відмічав, що *D. sneorum* є третинним реліктом флори Піренеїв, звідки відбулась його міграція на південний захід Франції, та Карпат, звідки він мігрував на рівнини Румунії та Польщі. М. Witschel вважав, що первинними осередками зростання *D. sneorum* є Піренеї, Південні Альпи, Балкани та Середньоруська височина, де він зберігся як третинний релікт, а в рівнинних регіонах Німеччини він є інтергляціальним реліктом.

Критичний аналіз ботаніко-географічних і палеонтологічних даних з різних частин ареалу *D. sneorum* показав, що під час зледеніння цей вид зберігся як третинний релікт у Піренеях, Альпах, на Балканах, у Південних Карпатах, на Волино-Подільській та Середньоруській височинах. У міжльодовиковий та післяльодовиковий період він проник із Піренеїв на південний захід Франції, з Альп та Карпат – на рівнини Середньої Європи, з Волино-Поділля – в Полісся та Придніпров'я, на Люблінську та Малопольську височини і Сандомирську котловину в Польщі (Aymonin, 1959; Melnyk, 1986,

1995; Witschel, Seybod, 1986; etc.). Таким чином, *D. sneorum* – це типовий міграційний релікт. Згідно до визначення W. Szafer (1975) під цим терміном розуміємо види, реліктові лише в деяких частинах ареалів. Отже, в Україні *D. sneorum* є третинним реліктом флори Волино-Подільської височини, який в міжльодовиковий та післяльодовиковий період мігрував на Полісся та в Придніпров'я.

Як високодекоративна рослина *D. sneorum* здавна використовується для букетів, що вплинуло на стан його популяцій та ареал. За свідченням W. Curtis (1795), *D. sneorum* був широко поширеним в околицях Відня та вже з XVI століття його квіти масово зривали та продавали на міських ринках. Оскільки при вириванні надземних квітконосних стебел легко висмикуються корені рослин, це вплинуло на стан популяцій. В околицях сучасного Відня популяції *D. sneorum* вже не трапляються, що є результатом багаторічної експлуатації його ресурсів в цьому регіоні.

Виривання на букети, викопування та перенесення рослин на присадибні ділянки, хижацьке винищення лісів, заміна природних лісів на штучні призвели до загибелі низки популяцій і регресивних змін в ареалі виду на території Німеччини, Польщі, Словаччини, Франції (Aymonin, 1981; Witschel, Seybold, 1986; Bednarz, Peret, 2003).

Розглянемо сучасний стан популяцій та зміни ареалу *D. sneorum* в Україні під впливом антропогенних факторів.

На Волинському Поліссі в межах сучасної Волинської області *D. sneorum* уперше було виявлено в околицях містечка Цумань (Ківерцівський р-н) (Vandas, 1886). Наявність цього виду тут у першій половині XX століття була підтверджена дослідженнями С. Мацко та Й. Панека (Мацко, 1935; Panek, 1939), після Другої світової війни *D. sneorum* тут вже не фіксували. В сусідньому Маневицькому р-ні *D. sneorum* уперше було гербаризовано в околицях смт Маневичі в 1916 р. (див. Перелік локалітетів...). За більш ніж сторічний період тут було виявлено близько десяти локалітетів, приурочених до дубово-соснового лісу, який в минулому столітті займав площу близько 2000 га в Борівському, Софіянівському та Черевахському лісництвах. Інтенсивні вирубки лісів в останні десятиріччя призвели до фрагментації цього лісового масиву на окремі ділянки. На сьогодні популяції *D. sneorum* трапляються тут майже виключно на природно-заповідних територіях. У більш північному Камінь-

Каширському р-ні зафіксовано лише два локалітети *D. sneorum* (див. Перелік локалітетів...).

У літературі є унікальні свідчення про стан популяцій *D. sneorum* у поліській частині Рівненської області в середині XIX століття. Зазначено, що *D. sneorum* трапляється "в лесах вблизи Ровна и далее на север и северо-западную часть Ровенского уезда в довольно значительном количестве" (Hreve, 1855: 395). Слід зауважити, що тодішній Рівненський повіт включав в себе не лише сучасний Рівненський, а й сучасні Костопільський, Березнівський р-ни. У другій половині XIX – на початку XX століття на території Рівненського р-ну були винищені майже всі ліси у зв'язку із розширенням площ сільськогосподарських угідь. Це не могло не вплинути на стан популяцій *D. sneorum*. За даними Й. Панека (Panek, 1931, 1939; Перелік локалітетів...) у першій половині XX століття на території сучасного Рівненського р-ну було зафіксовано лише чотири локалітети *D. sneorum*, і лише в одному з них – в околицях залізничної станції Любомирськ, де лишився невирубаний лісовий масив, вид ще траплявся доволі часто.

У північній частині колишнього Ровенського повіту на території сучасного Костопільського р-ну *D. sneorum* був більш поширеним (див. Перелік локалітетів...). Перед Другою світовою війною, за свідченням С. Мацко (Masco, 1935), у період квітання *D. sneorum* його букети масово продавали на залізничних станціях Волинського Полісся. За інформацією, отриманою від місцевих жителів, *D. sneorum* ще доволі часто знаходили в Костопільському р-ні в післявоєнні роки. За нашими спостереженнями в 1960–1970-х рр., *D. sneorum* зрідка траплявся в дубово-соснових лісах на північний захід від м. Костопіль – у Костопільському та Мащанському лісництвах. У результаті вирубок вікових дубово-соснових лісів і, відповідно, посилення освітленості, локуси *D. sneorum* дещо збільшувались і ще деякий час зростали на вирубках. Проте насадження лісових культур на місці зведених природних лісів і заростання вирубок призвели до повної елімінації останніх осередків зростання *D. sneorum* у Костопільському та Мащанському лісництвах (Melnyk, 1986; Melnyk, Varansky, 2006). Протягом багатьох років відбувається деградація колись чисельної популяції *D. sneorum* у ботанічному заказнику Суський. Тут популяція *D. sneorum* деградує разом із фітоценозом через інтенсивне

заростання чагарниками (Didukh, 1974; Rasevych, 2010).

У Житомирському Поліссі зафіксовано лише три локалітети *D. sneorum*, два з яких виявлені в XIX – першій половині XX століття (див. Перелік локалітетів...), ймовірно, вже зникли. В 1998 р. в околицях с. Збраньки Овруцького р-ну Житомирської обл. була виявлена лише одна особина цього виду (Orlov, 2005).

На Малому Поліссі *D. sneorum* спорадично поширений в усьому регіоні, де зафіксовано близько двадцяти його локалітетів. Як свідчать літературні та гербарні дані (див. Перелік локалітетів...), одним із найбільш значних осередків зростання цього виду були дубово-соснові ліси в околицях смт Смига Дубнівського та с. Буща Здолбунівського р-нів Рівненської обл. (див. Перелік локалітетів...). В останні десятиліття в Смизькому та Бущанському лісництвах нами фіксувались лише окремі ізольовані куртини *D. sneorum* (Melnyk, 1986). В околицях с. Баранне Радивилівського р-ну Рівненської обл. після вирубки соснового лісу та підготовки ґрунту плужними боронами на межі зникнення перебуває колись чисельна популяція (Batochenko, 2019).

На Волинській височині більша частина локалітетів *D. sneorum* була зафіксована в XIX столітті (див. Перелік локалітетів...). В XX столітті було виявлено лише два локалітети на крейдових відслоненнях Лисої та Квітучої останцевих гір поблизу с. Мала Мильча Дубнівського р-ну Рівненської обл. (Melnyk, 1986; Перелік локалітетів...). Обидві популяції були вкрай нечисельними і склались із двох (на горі Лиса) та трьох (на горі Квітуча) клонів площею 0,1–0,2 м<sup>2</sup>, в яких були представлені лише генеративні рослини. Видобуток крейди на горі Лиса та терасування степових схилів і посадка дерев на горі Квітуча призвели до елімінації цих унікальних популяцій. Тому є всі підстави константувати повне знищення географічної популяції виду на Волинській височині і формування нової антропогенно-похідної диз'юнкції в його ареалі.

На Подільській височині *D. sneorum* перебуває в дещо кращому стані. Його невеликі за площею популяції збереглися у Вороняках та Гологорах на останцевих горах Біла та Сипуха, Лиса, Жулицька, Макітра, Св'ята у Бродівському, Бузькому, Золочівському р-нах Львівської обл. та на горі Голиця в Бережанському р-ні Тернопільської обл. (див. Перелік локалітетів...). У той же час вид, очевидно, зник зі складу флори Кременецьких гір. М. Koczwara (1926)

зауважував, що *D. sneorum* був досить поширеним на теренах "Кременецької Волині". В іншій своїй праці він (Koczwara, 1930) наводить *D. sneorum* для соснового лісу поблизу г. Божа в околицях Кременця. В літературі та гербарних фондах відсутні вказівки про зростання цього виду в Кременецьких горах у роки після Другої світової війни.

*Daphne sneorum* зник також зі складу флори Розточчя. Для цього регіону наводили лише два локалітети виду – в околицях с. Завадів – сучасний Яворівський р-н Львівської обл. (Szafer, 1923) та в Страдчанському лісництві поблизу селища Івано-Франкове (Melnyk, 1995).

У 1970-х роках проводили облік популяцій *D. sneorum* у лісництвах Черкаського обласного управління лісового господарства та лісозаготівель. Було встановлено, що вид зростає на території Русько-Полянського, Дубіївського, Білоозерського, Дахнівського, Тясминського лісництв Черкаського держлісгоспу, Кумейського та Ясноозерського лісництв Корсунь-Шевченківського держлісгоспу та в Закревському лісництві Смілянського держлісгоспу. Найпоширенішим вид виявився в Русько-Полянському, Дубіївському та Білоозерському лісництвах, в яких сумарна площа лісових угруповань з участю *D. sneorum* становила 1119,2 га. При цьому площа куртин *D. sneorum* була від кількох квадратних метрів до однієї соті гектара.

За свідченнями Н.С. Антонюк (Antonyuk, 1982), у Білоозерському лісництві на площу 1 га в середньому припадало 700 куртин *D. sneorum*, у Русько-Полянському лісництві – 1500. Проективне покриття виду в трав'яно-чагарничковому ярусі досягло 10%. У Русько-Полянському заказнику та на прилеглих територіях у Білоозерському, Тясминському та Русько-Полянському лісництвах проективне покриття виду досягло 10–20%. На 10 м<sup>2</sup> припадало 2–5 особин виду (Temchenko et al., 1986).

У наш час за умов абсолютного заповідання в Русько-Полянському заказнику в місцезростаннях *D. sneorum* відбувається формування щільного підросту з *Carpinus betulus* і в результаті – деградація популяцій *D. sneorum* (Rasevych, 2010).

З огляду на катастрофічне усихання та вирубки соснових деревостанів Великого Черкаського бору відбувається деградація місцезростань та елімінація популяцій *D. sneorum*. Щоб оцінити масштаби цього явища, необхідно провести повторний облік лісових угруповань з участю *D. sneorum* у зазначених лісництвах.

Подібні процеси відбуваються і на Придніпровській низовині. В 1920-х роках у сосновому лісі в околицях с. Кийлів (Бориспільський р-н Київської обл.) "знайшов притулок невеликий реликтовий чагарник *D. sneorum*, який росте тут великими плямами" (Клеоров, Dubovuk, 1926: 44–45).

У дубово-соснових лісах Ржищівського військового лісгоспу в околицях сіл Сошників і Старе Бориспільського р-ну Київської обл. *D. sneorum* відрізнявся високими фітоценотичними показниками, його проективне покриття в трав'яно-чагарничковому ярусі досягло 60%. Популяція була представлена куртинами площею 10–200 м<sup>2</sup> (Melnyk, 1994). Моніторинг за станом популяції показав, що на початку нового тисячоліття в зв'язку із заростанням чагарником та інтенсивним формуванням підліску *D. sneorum* став тут рідкісним. Його участь у трав'яно-чагарничковому ярусі становить не більше 1%. Ще більш негативно на стан популяції цього виду впливають суцільні та вибіркові рубки, які згодом призведуть до повної елімінації популяції.

Загалом в Україні відбувається інтенсивна деградація популяцій та фрагментація ареалу *D. sneorum*. До регресивних змін призводять вирубування соснових і дубово-соснових лісів, заростання лісових місцезростань чагарниками, терасування степових схилів і насадження на них дерев, видобуток крейди та збір рослин на букети. В зв'язку з низькою насінневою продуктивністю *D. sneorum*, зумовленою недоброякісним пилком (Horb, 1988), відпад рослин не компенсується поновленням, що призводить до повної елімінації популяцій в антропогенно порушених місцезростаннях.

В Україні *D. sneorum* охороняють у Черемському природою заповіднику, в національних природних парках Дермансько-Острозький, Північне Поділля, в ботанічних заказниках загальнодержавного значення "Кругле Озеро", "Софіянівський", "Суничник" (Волинська обл.), "Суський" (Рівненська обл.), "Галицький" (Тернопільська обл.), "Лісники" (м. Київ), "Русько-Полянський" (Черкаська обл.). Необхідно організувати заказник у Бориспільському р-ні Київської області. Зважаючи на високу соціологічну цінність *D. sneorum*, який занесено до Червоних книг або національних червоних списків 15 країн Європи, його необхідно внести до Європейського червоного списку.

## Висновки

*Daphne sneorum* є третинним реліктом флори Волино-Подільської височини, який із цього рефугіуму мігрував на Поліську та Придніпровську низовину, Придніпровську та Люблінську височини в міжльодовиковий та післяльодовиковий періоди. Два українські фрагменти ареалу – волино-подільський та придніпровський розділені диз'юнкцією протяжністю 350 км природного походження. Наявність цієї диз'юнкції пов'язана з невідповідністю екологічних умов Житомирського Полісся фізіологічним потребам *D. sneorum*. Сформовані на кристалічних породах Українського щита кислі ґрунти є невідповідним субстратом для кальцієфільного виду *D. sneorum* і слугують екологічним бар'єром для його поширення.

Диз'юнкції між волино-подільською, польською та білоруською частинами ареалів утворились під впливом антропогенних факторів. Вирубки лісів, заростання лісових екотопів чагарниками та листяними деревами, терасування степових схилів та посадка на них дерев, видобуток крейди та збір рослин на букети призводять до деградації популяцій та фрагментації ареалу *D. sneorum* в Україні. Через низьку насінневу продуктивність відпад рослин не компенсується їхнім поновленням, що призводить до повної елімінації виду в антропогенно-порушених місцезростаннях. В останні десятиріччя вид зник зі складу флори Розточчя, Волинської височини та Кременецьких гір. У результаті цього у волино-подільській частині ареалу *D. sneorum* утворилася диз'юнкція, яка розділила його на поліський та подільський фрагменти.

З огляду на неефективність абсолютної заповідної охорони *D. sneorum* необхідно розробити та втілити в життя природоохоронний менеджмент популяцій. Як рідкісний вид флори Європи, внесений до Червоних книг або списків 15 країн, *D. sneorum* заслуговує на внесення до Європейського червоного списку.

## Подяки

Висловлюємо вдячність директору Ботанічного Інституту ім. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) д.б.н. проф. Д.В. Гельтману та аспіранту А. Льостріну за надані матеріали гербаріїв Російської Федерації, завідувачу кафедри ботаніки Чернівецького національного університету д.б.н. проф. І.І. Чорнею за ксерокопії рідкісних наукових публікацій, науковому співробітнику філіалу "Холодний

Яр" Національного історико-культурного заповідника "Чигирин" О.С. Галушці за допомогу в організації експедиційних досліджень у Черкаській області.

## Список посилань

- Antonyuk N.E. 1982. Lisy rívnynnoi chastyiny Ukrainy (Polissya, Lisostep). In: *Rídkisni roslyny flory Ukrainy v kulturi*. Kyiv: Naukova Dumka, pp. 6–51. [Антонюк Н.С. 1982. Ліси рівнинної частини України (Полісся, Лісостеп). В кн.: *Рідкісні рослини флори України в культурі*. Київ: Наукова думка, с. 6–51].
- Aumonin G. 1958. Quelques particularités de la répartition géographique de *Daphne sneorum* L. *Compte-rendu des Séances de la Société de Biogéographie*, 308: 82–88.
- Aumonin G. 1959. Essai d'une monographie ecologique du *Daphne sneorum*. *Revue Generale de otanique*, 784: 281–328.
- Aumonin G. 1981. Sur quelques espèces remarquable des complexes boisés de Bourgogne et leur situation de régression en Europe. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 128. *Actualités Botanique*, 3–4: 95–100.
- Barbarych A.I. 1955. Flora i roslynnist Polissya. In: *Narysy pro pryrodu ta silske hospodarstvo Ukrainського Polissya*. Kyiv: Vyd-vo KDU, pp. 269–319. [Барбарич А.І. 1955. Флора і рослинність Полісся Української РСР. В кн.: *Нариси про природу та сільське господарство Українського Полісся*. Київ: Вид-во КДУ, с. 269–319].
- Batochenko V.M. 2019. In: *Znakhidky roslyn i grybiv Chervonoï knyhy ta Bernskoi konventsii (Rezolutsia 6)*. Kyiv; Chernivci: Druk Art, pp. 24–39. [Баточенко В.М. 2019. Знахідки деяких видів флори, занесених до Червоної книги, на Волино-Поділлі та Закарпатті. В кн.: *Знахідки рослин і грибів Червоної книги та Бернської конверсії (Резолюція 6)*. Київ; Чернівці: Друк Арт, с. 24–39].
- Bednarz Z., Peret B. 2003. Nieznane stanowisko wawrzynka główkowego (*Daphne sneorum* L.) na Plaskowyżu Kolbuszowskim (południowo-wschodnia Polska). *Rocznik dendrologiczny*, 51: 47–50.
- Besser W. 1832. Bemerkungen über Herrn Professor Eichwald's naturhistorische Skizze von Lithauen, Volhynien und Podolien. In: *Beiblätter zur Flora oder allgemeinen botanischen Zeitung*, Bd. 2, 1–55 pp.
- Browicz K. 1968. Wawrzynek główkowy *Daphne sneorum* w Polsce. *Ochrona Przyrody*, 33: 51–68.
- Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske*. 2005. Urednici T. Nikolič, J. Topić. Zagreb: Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, 693 S.
- Crvena lista flore Federacije Bosne i Hercegovine*. 2013. Sarajevo: EU Greenway, 348 S.
- Curtis W. 1795. *Daphne sneorum*. *The Botanical magazine or Flower-Garden Displayed*, vol. 9. London: Printed by Stephen Couchman, p. 313.
- Didukh Ya.P. 1974. *Ukrainian Botanical Journal*, 26(2): 242–245. [Дідух Я.П. Сосновий ліс з участю вовчих ягід

- пахучих на півдні Волинського Полісся. *Український ботанічний журнал*, 26(2): 242–245].
- Didukh Ya.P. 2009. *Daphne sneorum*. In: *Chervona knyga Ukrainy. Roslynnyi svit*. Kyiv: Globalconsulting, p. 608. [Дідух Я.П. 2009. Вовче лико пахуче (боровик) *Daphne sneorum* L. В кн.: *Червона книга України. Рослинний світ*. Київ: Глобалконсалтинг, с. 608].
- Dorofeev P.I. 1986. *Botanicheskiy Zhurnal*, 71(1): 3–15. [Дорофеев П.И. 1986. О позднеплиоценовой флоре села Моисеево на юге Тамбовской области. *Ботанический журнал*, 71(1): 3–15].
- Dumytrava D. 2011. *Daphne sneorum*. In: *Red Book of the Republic of Bulgaria. Plants and Fungi*, vol. 1. Sofia: Bulgarian Academy of Sciences, pp. 41–42. [Димитрова Д. 2011. Ниско бяно дърво *Daphne sneorum* L. В кн.: *Червена книга на Република България. Растения и гъби*, т. 1. София: Българска Академия на Науките Министерство на околната среда и водите, с. 41–42].
- European National Red List of Threatened Vascular Plants. Project report and description of the corresponding database. 2001. Strasbourg, 56 pp.
- Gajewski W. 1937. *Elementy flory Polskiego Podola*. Warszawa: Nakladem Towarzystwa Naukowego Warszawskiego, 210 s.
- Gams H. 1930. Über Relictföhrenwälder und das Dolomitphänomen. *Veröffentlichungen des geobotanischen Institutes, Stiftung Rübél*, 6: 32–80.
- Girón J.G., García F.M. 2018. Threat and protection status analysis of the alpine flora of the Pyrenees. *Mediterranean Botany*, 39(2): 129–150.
- Guşuleac M. 1932. Zur Kenntnis der Felsvegetation des Gebirges der Bicaz-Klamm in den Östkarpaten. *Buletinul Facultăţii de Ştiinţe din Cernăuţi*, 6(1–2): 307–347.
- Hegi G. 1925–1926. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Bd. 5, Teil 2. München: Lehmann Verlag, pp. 716–719.
- Horb L.K. 1988. *Ochrana i obogashenie rastitelnogo mira*, 15: 86–89. [Горб Л.К. 1988. Развитие пыльцы и зародышевого мешка у *Daphne sneorum* L. *Охрана и обогащение растительного мира*, 15: 86–89].
- Hreve 1855. *Gazeta lesovodstva i okhoty*, 50: 395. [Греве 1855. Несколько слов о растении лавруши головчатой *Daphne sneorum* L. *Газета лесоводства и охоты*, 50: 395].
- Hrosset H.E. 1964. *Vyulleten MOIP*. 69(5): 86–102. [Гроссет Г.Э. 1964. Материалы по истории флоры и растительности I. Систематическое положение, экология и генезис ареала *Daphne julia* K.-Pol. (= *D. sneorum*). *Бюллетень МОИП*. 69(5): 86–102].
- Jakucz P. 1961. *Die phytozöologischen Verhältnisse der Flaumeichen-Buschwälder Südostmitteleuropas*. Budapest: Académai Kiado, 314 pp.
- Király G. (Ed.). 2007. *Vörös Lista. A magyarországi edényes flóra versélyezett fajai* [Red list of the vascular flora of Hungary]. Sopron: Sajat kiadás, 73 pp.
- Kiseleva K.V. 2008. *Daphne sneorum*. In: *Krasnaya kniha Rossijskoj Federatsii. Rasteniya i hriby*. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, pp. 521–522. [Киселева К.В. 2008. Волчегодник боровой *Daphne sneorum* L. В кн.: *Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы*. Москва: Тов-во научных изданий КМК, с. 521–522].
- Kleopov Yu.D. 1928. *Visnyk Kyivskogo botanichnogo sadu* 7: 74–77. [Клеопов Ю.Д. 1928. Про видову самостійність *Daphne julia* K.-Pol. *Вісник Київського ботанічного саду*, 7: 74–77].
- Kleopov Yu.D., Dubovyk M.V. 1926. *Ukrainian Botanical Journal*, 3: 44–45. [Клеопов Д.Ю., Дубовик М.В. 1926. Ботанічна екскурсія до кол. Переяславського повіту Полтавщини. *Український ботанічний журнал*, 3: 44–45].
- Koczwara M. 1926. Flora i wegetacia okolic Krzemieńca. *Ziema*, 11(6): 82–86.
- Koczwara M. 1930. Geobotaniczne stosunki Wołynia. *Rocznik Wołyński*, 1: 274–276.
- Kornas J. 1948. Wawczynki Polski. *Chrońmy Przyrodę Ojczyznę*, 4(11): 7–13.
- Kozo-Polianskiy B.M. 1931. *V strane zhyvykh iskopaemykh. Oчерк po istoriy hornykh borov na stepnoy ravnine*. Moscow: Uchpedgiz, 184 pp. [Козо-Полянський Б.М. 1931. *В стране живых ископаемых. Очерк по истории горных боров на степной равнине*. Москва: Учпедгиз, 184 с.].
- Landolt E. 1991. *Rote Liste Gebährdung der Forn and Blumenpflanzen in Schweiz*. Bern, 185 S.
- List of Protected Species in Montenegro (Appendix 9). 2002. In: *FAA Section 119. Biodiversity analysis for Serbia and Montenegro*, pp. 9-1–9-12. Available at: <http://www.brucebyersconsulting.com/wp-content/uploads/2011/11/Serbia-and-Montenegro-Biodiversity-Analysis-2002.pdf>
- Macko S.O. 1935. О некторых rzadczych gatunkach roślinnych na Wołyniu. *Kalendarz Ziem Wschodnich*, 1: 234–238.
- Maglocký Š. 1999. *Daphne sneorum* L. Lykovec voňavý. Lycopce vonný. In: *Červená kniha ohrozených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR. Vyšší rostliny*. Bratislava: Priroda, p. 126.
- Marynych O., Parkhomenko H., Petrenko O., Shyshchenko P. 2003. *Ukrainian Geographical Journal*, 1: 16–21. [Маринич О.М., Пархоменко Г.О., Петренко О.М., Шищенко П.Г. 2003. Удосконалена схема фізико-географічного районування України. *Український географічний журнал*, 1: 16–21].
- Melnyk V.I. 1986. *Botanical Journal*, 71(1): 52–57. [Мельник В.И. 1986. Распространение и современное состояние *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) на Украине. *Ботанический журнал*, 71(1): 52–57].
- Melnyk V.I. 1994. *Ukrainian Botanical Journal*, 51(2-3): 40–44. [Мельник В.И. 1994. Залишки корінних дубово-соснових лісів на Лівобережжі Середнього Придніпров'я. *Український ботанічний журнал*, 51(2–3): 40–44.].
- Melnyk V.I. 1995. *Ukrainian Botanical Journal*, 52(1): 38–48. [Мельник В.И. 1995. Фітоценотичний аналіз місцезростань *Daphne sneorum* (*Thymelaceae*) в Україні. *Український ботанічний журнал*, 52(1): 38–48.].

- Melnyk V.I., Baransky A.R. 2006. *Ukrainian Botanical Journal*, 63(3): 333–339. [Мельник В.І., Баранський О.Р. 2006. Нові місцезнаходження рідкісних видів флори Волинського Полісся. *Український ботанічний журнал*, 63(3): 333–339].
- Meusel H.E., Jager E., Rauschert S., Weinert E. 1978. *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora*. Bd 2. Jena: Gustav Fischer, 258 S.
- Motyka J. 1947. *Rozmieszczenie i ekologia roślin naczyniowych na północnej krawędzi zachodniego Podola*. Lublin: Nakładem Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, 400 s.
- Muller S. 1997. The post-glacial history of *Pulsatilla vernalis* and *Daphne cneorum* in Bitcherland inferred from the phytosociological study of their current habitats. *Global Ecology and Phytogeography Letters*, 6(2): 129–137.
- Oltean M., Neagrean G., Popescu A., Roman N., Dihoru G., Sanda V., Mihailescu S. 1994. *Lista Roşie a plantelor superioare din România. I*. Bucuresti: Inst. de biologie, studii, sinteze, documentaţii de ecologie, 1–52 pp.
- Orsenigo S., Adorni M., Alessandrini A., Armiraglio S., Castello M., Forte L., Gennai M., Magrini S., Medagli P., Montagnani C., Prosser F., Selvaggi A., Villani M., Viciani D., Wagenommer R.P., Fenu G. 2019. Global and regional IUCN Red List assessments: 7. *Italian Botanist*, 7: 107–124.
- Orlov O.O. 2005. *Ridkisini ta znykayuchi vydy sudynnykh roslyn Zhytomyrskoi oblasti*. Zhytomyr: Volyn, 295 pp. [Орлов О.О. 2005. *Рідкісні та зникаючі види судинних рослин Житомирської області*. Житомир: Волинь, 295 с.].
- Paczoski J. 1910. *Zapiski Novorossiyskogo obshchestva estestvoispytateley*, 34 (supplement): 1–430. [Пачоский И. 1910. Основные черты развития флоры юго-западной России. *Записки Новороссийского общества естествоиспытателей*, 34 (приложение): 1–430].
- Panek J. 1930. Roślinność okolic Równego. *Rocznik Wołyński*, 1: 57–79.
- Panek J. 1939. Roślinność stepowa i naskalna lessowego Wołynia. *Rocznik Wołyński*, 8: 57–79.
- Parfenov V.I., Savchuk S.S. 2015. Volcheyagodnik borovoy (volcheyagodnik pakhuchiy). In: *Krasnaya kniga Respubliki Belarus. Rasteniia*. 4<sup>th</sup> ed. Minsk: Belorusskaia entsyklopediia, p. 33. [Парфенов В.И., Савчук С.С. 2015. Волчегодник боровой (волчегодник пахучий). В кн.: *Красная книга Республики Беларусь. Растения*. 4-е изд. Минск: Белорусская энциклопедия, с. 33].
- Pottier-Alapetite G. 1943. *Recherches phytosociologique et historiques sur la végétation du Jura Central et sur les origines de la flore jurassienne*. Montpellier: S.I.G.M.A., Communication 81: 1–338.
- Przemyski A. 2001. *Daphne cneorum*. Wawrzynek główkowy In: *Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*. Kraków: Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, pp. 241–243.
- Rabotnov T.A. 1984. *Fitotsenologiya*. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Izd-vo Moskovskogo univ., 296 pp. [Работнов Т.А. 1984. *Фитоценология*. 2-е изд. Москва: Изд-во Московского ун-та, 296 с.].
- Rasevych V.V. 2010. *Natsionalnyi universytet "Kyievo-Mohylyanska Akademiya"*. *Naukovi zapysky*, 106: 51–55. [Расевич В.В. 2010. Фітоіндикаційна та синтаксономічна оцінка угруповань з участю *Daphne sneorum* L. *Національний університет "Києво-Могилянська Академія"*. *Наукові записки*, 106: 51–55].
- Rote Liste gefährdeter Pflanzen Deutschlands*. 1996. Eds G. Ludwig, M. Schnittler. Bonn: Band Godesberg, 744 pp.
- Rote Listen gefährdeter Pflanzen Österreichs*. 1986. Wien: Gessantleitung, 202 S.
- Skoberne P. 1996. *Rdeci seznam ogrozenih praprotnic in Semenk SR Slovenije*. Ljubljana: Zavod SR Slovenije za varstvo naravne in kulturne dediscine, 14 pp.
- Szafer W. 1923. Trzeciorzędne rośliny górskie na wale scytyjskim w ostoi podolsko-wołyńskiej. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1(4): 92–119.
- Szafer W. 1975. *General Plant Geography*. Warszawa: PWN, 430 pp.
- Temchenko A.M., Didukh Ya.P., Lyubchenko V.M. 1986. *Ukrainskyi botanichnyi zhurnal*, 43(3): 53–56. [Темченко А.М., Дідух Я.П. Любченко В.М. 1986. Фітоценотична характеристика *Daphne sneorum* (Thymeleaceae) у Придніпров'ї. *Український ботанічний журнал*, 43(3): 53–56].
- Vandas K. 1886. Ein Beitrag zur Kenntnis der Flora Wolhynien. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 34: 155–157, 192–195.
- Vinogradov N.P., Holitsyn S.V. 1963. К истории флоры snizhenykh alp Srednerusskoy vozvysshennosti. In: *Materialy po istorii flory i rastitelnosti SSSR*, vol. 4. Moscow; Leningrad: Izd-vo Acad.Nauk USSR, pp. 426–437. [Виноградов Н.П., Голицын С.В. 1963. К истории флоры сниженных альп Среднерусской возвышенности. В кн.: *Материалы по истории флоры и растительности СССР*, т. 4. Москва; Ленинград: Изд-во АН СССР, с. 426–437].
- Walter H. 1974. *Die Vegetation Osteuropas Nord- und Zentralasiens*. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 452 S.
- Witschel M. 1980. *Xerothermvegetation und dealpine Vegetationskomplexe in Südbaden*. Karlsruhe: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 212 S.
- Witschel M., Seybold S. 1986. Zur Ökologie, Verbreitung und Vergesellschaftung von *Daphne cneorum* L. in Baden-Württemberg, unter Berücksichtigung der zöologischen Verhältnisse in den anderen Teilarealen. *Jahreshefte der Gesellschaft für Naturkunde in Württemberg*, 141: 157–200.
- Wulf E.V. 1944. *Istoricheskaia geografiya rasteniy. Istorija flor zemnogo shara*. Moscow; Leningrad: Izd-vo Acad. Nauk USSR, 545 pp. [Вульф Е.В. 1944. *Историческая география растений. История флор Земного шара*. Москва; Ленинград: Изд-во АН СССР, 545 с.].
- Zólyomi B. 1958. Budapest és környékének természetes növénytakarója. In: *Budapest Természeti Képe*. Budapest: Akadémiai Kiadó, pp. 508–642.

Рекомендує до друку М.М. Федорончук

## Перелік локалітетів *Daphne sneorum* в Україні

### ПОЛІСЬКА НИЗОВИНА

#### Волинське Полісся

— **Волинська обл. Камінь-Каширський р-н:** ок. с. Верхи (за 7 км), на узліссі соснового лісу, 28.07.1949, Барбаричі (KW); ок. м. Камінь-Каширський, в дубово-сосновому лісі (Browicz, 1968). **Ківерцівський р-н:** Ківерцівське л-во (Masco, 1935); ок. смт Цумань, піщані сонячні галявини, звичайно (Vandas, 1886; Panek, 1931, 1939). **Маневицький р-н:** Городоцький лісгосп, Боровське л-во, кв. 21–22, уроч. Сунічник, піщані дюни покриті молодими розрідженими соснами сосновий ліс, 1990, Мельник (КВНА); Городоцький лісгосп, Троянівське л-во, в старому березово-сосновому лісі, ландшафтний заказник Кручене озеро, 07.1972, Андрієнко (KW); с. Замостя уроч. Дубовиця, дубово-сосновий ліс, 10.09.2002, Коніщук (KW); Маневичи, сосновий подрост на пешаній гряде, 1916, Ильинский (LECB); ок. смт Маневичі, дубово-сосновий ліс, 1983, Мельник (КВНА); ок. смт Маневичі, сосново-дубово-березовий ліс (Rasevych, 2010); 3 км на зх. від с. Софіянівка, розріджений вирубок ліс, 08.07.1949, Косець, det. Баранський (KW); ок. с. Софіянівка, сосновий ліс, 08.08.1949, Барбаричі (KW); 1985, Терлецький (KW); Софіянівське л-во, кв. 37–38, 20.07.1995, Баранський (КВНА); ок. с. Софіянівка, Софіянівський ботанічний заказник, кв. 9, 1993, Мельник (КВНА); 10.05.2005, Расевич (KW); Червахівське л-во, в старому березово-сосновому лісі, 07.1972, Андрієнко (KW); Червахівське л-во, березово-сосновий ліс, 05.06.1987, Мельник (КВНА); Червахівське л-во, зрілий сосновий ліс 1 бонітету, 14.07.1992, Баранський (КВНА); Черемський природний заповідник, урочище "Бір", сосновий ліс – зеленомоховий, галявина, 10.06.2003, Коніщук (KW).

— **Рівненська обл. Гошанський р-н:** с. Річиця, сосновий ліс, 1988, Помірник, Антонова (Рівненський краєзнавчий музей). **Костопільський р-н:** ок. Деражко, Горинське л-во, кв. 41, сосняк з грабом, 1990, Антонова (Рівненський краєзнавчий музей). **Костопільське л-во,** кв.: 26–29, 1993, Мельник; дюна вздовж лісової дороги між сс. Матіївка – Жалянка, сосново-дубовий ліс, 1994 Мельник, Баранський (КВНА); пн. ок. с. Матіївка, луки на місці вирубаних соснових лісів, деградуюча популяція, 1994, Мельник, Баранський (КВНА); Машанське л-во, кв. 5, грабово-дубово-сосновий ліс, 1993, Мельник (КВНА). **Рівненський р-н:** "в лесах вблизи г. Ровно и далее на северную и северо-западную части Ровенского уезда", 1855, Греве; Klewań, 1877, Sobkiewicz (KRA); Клеванський лісгосп, Олександрійське л-во, кв. 62, молодий березовий ліс на місці поруба сосни, 1981, Антонова (Рівненський краєзнавчий музей); st. Lubomirsk k. Równego (poleska część powiatu), las mieszany, często, 19.05.1927, Panek (LW); (Panek, 1931, 1939); Любомирськ, 1981, Антонова (Рівненський краєзнавчий музей); ок. с. Оржів (Panek, 1931, 1939); ок. с. Рубче (Panek, 1931, 1939); ок. с. Суськ, Суське л-во, сосновий ліс, 1981, Антонова (Рівненський краєзнавчий музей); 2005, Расевич (KW); ок. с. Суськ, вершина схилів правого берега р. Горинь, галявина серед насаджень сосни, 06.05.2002, Дідух (KW); ок. с. Суськ, крейдяні відслонення

на березі р. Горинь, 06.05.2002, Дідух (KW); (Rasevych, 2010); ок. с. Шубків (Panek, 1931, 1939). **Сарненський р-н:** (колишне) с. Погулянка (між смт. Степань Сарненського району і с. Золотолин (Костопільського району), сосновий ліс, 21.06.1957, Шиманська (LW); Сарненське л-во, 1985 [s. coll.] (Гербарій Східноєвропейського національного університету ім. Л. Українки).

#### Житомирське Полісся

— **Житомирська обл. Житомирський уезд,** на лугах между Житомиром и Ровно, 05.06.1862, Августинович (LE). **Новоград-Волинський р-н:** смт Городниця, 1855, Рогович (KW). **Овруцький р-н:** ок. с. Збраньки, на задернованому схилі лесового яру, 20.04.1998, Орлов (KW); (Orlov, 2005). **Романівський р-н:** ок. смт Биківка (Barbarych, 1955).

#### Мале Полісся

— **Львівська обл. Бродівський р-н:** Brody, 05.1850, [s.coll.] (LWS); 1874, Rehman (KRA); Wołyń, Bór sosnowy "Świdowiec" pod Brodamy, 06.1910, Wycieczka I. B. B. (LW, LWS, KRA, KRAM); 1910, Polanski (KRAM); z lasow sosnowych w Korsowie (с. Корсів), dużo, 08.1860 Gomolinski, det. Лазебна (LWS); ок. с. Лешнів, сосновий ліс, на піщаному ґрунті, 1937, Duda (LW); Станіславів під Бродами (Szafer, 1923). **Бузький р-н:** коло Торогова (с. Топорів), w sosnowych lasach, 1959, [s. coll.] (LWS). **Жовківський р-н:** між Жовквою і Замковим (Szafer, 1923). **Кам'янка-Бузький р-н:** Berbeki-Połonieczna pr. Kamionka Strumiłowa (м. Кам'янка-Бузька), in silvis, frequens, 05.1891, Błocki (LW). **Радехівський р-н:** Pawłów [Павлів], bór sosnowy, 1857, Rehman (KRAM); 1913, Elowicki (LW); Radwańce [Радванці], las sosnowy, 1861, Dzieduszycki det. Rehman (LWS); 05.1898, Tymrakiewicz (LWS); Radwańce, 1876, Schauer (LWS); 1888, Tyńiecki (LWS; LW); Ponołow pod Radziechovem, bór sosnowy, 1857, Rechmann (KRAM); 05.1913, Elonishi (LW).

— **Рівненська обл. Дубенський р-н:** Buszcza (с. Буща) koło Krzemieńca, las sosnowo dębowy na podłożu piaszczystym z podglebiem marglistym, [s. data], Motyka (LW); Smyga, 1923, Czeczott, Kozłowski (KRAM); Smyga (Szafer, 1923); Smyga koło Krzemieńca, las sosnowo dębowy na podłożu piaszczysto marglistym, 22.07.1936, Motyka (LW); lasy sosnowy m. Smyga a Buszcza; 1923, Pawłowski (KRA); Смигівське л-во, кв. 78, сосновий ліс, 30.05.1987, Мельник (KW); 18.05.2007, Орлов (KW); Смигівське л-во, 100-річний сосновий ліс, 30.06.1987, Мельник (КВНА). **Здолбунівський р-н:** с. Буща, сосново-дубовий ліс, на podłożu piaszczystym z podglebiem marglistym, [s. data], Motyka (LW); ок. с. Буща, підвищений серед Бушанського болота піщаний острів, вкритий сосновим лісом, 2001, Мельник, Баранський (КВНА). **Острозький р-н:** с. Батьківці, 1995, Баточенко (Рівненський краєзнавчий музей). **Радивилівський р-н:** ур. Баранне (ок. с. Баранне), 14.07.1984, [s. coll.], (KW); 1984, Андрієнко (Рівненський краєзнавчий музей); Крупецьке л-во, сосновий ліс (Rasevych, 2010); окол. с. Михайлівка, урочище Бараньє, 1977, Андрієнко, Прядко; Радивилівське л-во, сосновий ліс на крейді, 10.08.1972, Андрієнко (KW); Радивилівське л-во, кв. 86, в. 2, у розрідженому сосняку, багато, 17.05.2007, Орлов (KW).

— **Тернопільська обл. Шумський р-н:** Suraz, Malinów, las sosnowo dębowy na glebie bardzo płytkiej piaszczystej o podglebiu marglistym, 06.05.1939, Motyka (LW); с. Стіжок,



сосновий ліс, пісок, 24.05.1959, [s. coll.] (KW); в окол. с. Сураж (Motyka, 1947); на Wołyniu, на północ od Surazu, 1936, Mądalski (KRAM).

— **Хмельницька обл. Ізяславський р-н:** Плужнянське л-во, кв. 3, в сосновому лісі зеленомоховому, 26.05.1997, Андрієнко, Юглічек (KW). **Славутський р-н:** в сосновому лесу близ г. Славути, 05.1861, Тишецький, Рогович (KW); 22.05.1904, Ракочи (LW); [s. data], Цингер (LW); (Szafer, 1923). **Шепетівський р-н:** в Шепетівських лісах (Matuszewski, 1913); НПП Мале Полісся, уроч. Клиповецьке, 2016, Андрієнко-Малюк, Юглічек. **Шумський р-н:** ок. с. Сураж (Motyka, 1947).

#### РОЗТОЧЧЯ

— **Львівська обл. Яворівський р-н:** окол. с. Завадів (Szafer, 1923).

#### ВОЛИНСЬКА ВИСОЧИНА

— **Львівська обл. Сокальський р-н:** Borek – Poturzysca, rzadko (між сс. Бірки – Поториця), 05.1898, Dzieduszycki, Tyńiecki (LWS); Poturzysca, 1861, Dzieduszycki, Rehman (LW, LWS).

— **Рівненська обл. Дубенський р-н:** окр. г. Дубно, лес, на 13 км по Кременецком шоссе, 21.08.1899, Пуринг (LE); ок. с. Мала Мильча, степові схили Квітучої гори, на виходах крейди, 29.05.1987, Мельник (KWHNA); ок. с. Мала Мильча, степові схили Лисої гори, 29.05.1987, Мельник (KWHNA); Мильча – Нові Сади, Квітуча гора, 1987, Антонова (Рівненський краєзнавчий музей); гора перед с. Пирятин (Pieratyn), на схилі вкритому розрідженими соснами, грунт всіяний кусками крейди, 20.04.1895, Пачоський (LW). **Здолбунівський р-н:** Mizoch na Wołyniu, 1882, Rehman (KRA).

#### ПОДІЛЬСЬКА ВИСОЧИНА

— **Львівська обл. Бродівський р-н:** на wzgórzach kredowych pod Boratynem, 1858, Łobarzewski (LWS); с. Боратин, на крайнях схилах, разом з *Teucrium chamaedrys*, 1858, Лобачевський det. Лазебна (LWS); ок. с. Боратин, 15.05.1955, Шелест (KWHNA); Brody, на Makitrze, [s. date], Rehman, det. Sytschak (LW); окол. с. Гаї, лучно-степові схили г. Макітра, 25.07.1973, Мороз (KWHNA); 16.05.1987, Шумілова (KW); ок. с. Гаї-Суходільські, Лиса гора (Опока), сухі схили, 15.05.1955, Шелест (KWHNA); Lesznio koło Brodów, las sosnowy na podłożu piaszczystym, 22.07.1937, Duda (KW); г. Макітра (Koczwarą, 1926); 12.06.1980, Сікура, Антонюк (KWHNA); Pieniaki (с. Пеняки), w lasach sosnowych, [s. data], Trautvetter (LE); окол. с. Поникивиця, Лиса Гора, 15.05.1955, Шелест (KWHNA). **Буський р-н:** с. Ожидів, крейдяні відслонення Білої гори, 18.05.1958, Бойко (LWS). **Золочівський р-н:** Lysa Góra koło Gologór w Złoczowskiem, stepowa halawa na podłożu marglistym, 15.07.1935, Kazimirski (LW); г. Жулицька за с. Жуличі, 1891, Trusz (LW); 1925, Koczwarą (LWS); 25.04.1961, Малиновський, det. Кузярін (LWS); Wołyń, brzeg lasu na górze Żulickiej pod Złoczowem, 20.04.1911, J.B. (LW, LWS, KRA, KRAM); góra Zulicka za Zulicami, 1891, Trusz (LW); на południowych zboczach Zulickiej Góry, Zulich, kolo Zlochowa (Mądalski, 1933); Lysa, k. Złoczewa, 05.1929, Tuligłowicz (LWS); 05.1932, Trusz det. Шимкевич (LW); 22.05.1969, Попадчук (LW); на południowych zboczach Lysej Góry kolo

Zlochowa (Mądalski 1923, 1933, 1936); Łuka k. Złoczewa, na stoku głównego ramienia "Góry Łoskotowskiej", 15.07.1936, Kędzierski (KW); на stepach Łysej, Zulickiej, Świentej i Bialej Gory (Motyka, 1947); Свята гора під Білим Каменем (Koczwarą, 1926); с. Підлисса (с. Підлісся) біля Ожидова, на південних схилах Білої Гори, 07.05.1949, Мельничук (LWS); с. Підлисса, Біла гора, 25.04.1961, Малиновський det. Кузярін (LWS); 1961, Єрмаченко (LWS); 25.04.1961, Шевчук det. Кузярін (LWS); 2 км на сх. від с. Підлисса, північні схили г. Біла, рідко, 09.05.1985, Загальський (LW); 2 км на сх. від с. Підлисса, західний схил г. Біла, на суходільній луці, 23.04.2020, Кузярін (LWS); с. Підлисса, г. Біла, зах. схили, часто, 02.05.1986, Загальський (LW); с. Підлисса, Лиса гора, 25.04.1961, Єрмаченко, det. Кузярін (LWS); півд.-зх. схил г. Біла, 19.05.1982, Антонюк (KWHNA); західні схили г. Біла, часто, 1986, Загальський (LW); 2 км на сх. від с. Підлисса, зх. схил Білої гори, на суходільній луці, 23.04.2010, Кузярін (LWS); в 3 км юго-зап. с. Сасова, урочище "Сторожева гора", западні лугово-степніе склони на известняковій почве, 30.05.1987 Зеленчук (LW, MW); ок. с. Стінка, Гологори, Лиса гора, 09.05.1951, Іваницький (LWS); 20.05.1976, Кіш det. Лазебна (LWS); 20.05.1976, Лазебна (LWS); 02.06.1961, Заверуха, Смолко (KW); 31.05.1976, Гладкова, Виноградова (LE); Lackie Małe [с. Червоне] к. Złoczowa, Lysa Góra, 17.05.1937, Motyka, Radwański (LW); с. Червоне, Лиса гора, лучно-степові ділянки, 19.04.1955 Бухало (KW); 06.1968, Шеляг-Сосонко, Куковиця (KW); 06.1980, Зеленчук (LW); 02.05.1983, Кагало (LW); с. Червоне, Лиса гора, північні схили, часто, 14.05.1985, Загальський (LW); заповідник "Лиса Гора", 13.05.2005, Расевич (KW).

— **Тернопільська обл. Бережанський р-н:** ок. с. Демня, г. Голиця, лучно-степові угруповання на південних схилах, 1988, Кагало (LWKS); (Rasevych, 2010); ок. с. Гутисько, лучно-степова рослинність на схилах, 07.2002, Мельник, Баранський (KWHNA). **Кременецький р-н:** в сосновому лісі неподалік від гори Божої, 1930, Koczwarą (LW).

#### ПРИДНІПРОВСЬКА ВИСОЧИНА

— **Київська обл. Білоцерківський р-н:** ок. Белой Церкви, [s. data], Тишецький, Рогович (KW); 1886, Шмальгаузен). **Богуславський р-н:** ок. м. Богуслав (Клеоров, 1928); ок. с. Чайки, субір, 03.07.1929, Клеопов (KRAM); 1972, Карпенко (KW); сосновий ліс між сс. Чайки – Лютарі, 03.07.1929, Полонська (KW). **Києво-Святошинський р-н:** в сосновому лесу между дер. Витою и Козиним у Волчей Долине, Гагман, Rogowicz (LE, KW); 05.1880, Монтрезор (KW); 1886, Шмальгаузен (KW); Витяно-Трипольський лес, урочище "Волчья Долина", 15.05.1879, Монтрезор (KW); Витянское л-во, бл. Кушеватої долини, на порубях, 14.05.1923, Семенкевич (KW); вирубаний сосновий ліс за с. Віта Литовська, 03.06.1923, Клеопов (KW); біля Віти Литовської, 22 кв. Витянської лісової дачі, 1924, Стоянів; сосновий ліс за с. Віта Литовська, 25.05.1925, Дубовик (KW); Kosine, pow. Kijowski, 1877, Montresor (KRAM); з-к Лісники, кв. 25, сосново-дубовий ліс (Расевич, 2005); лісове господарство Конча-Заспа, ботанічний заказник "Лісники", та прилеглий території, 1992, Дідух, Чумак. **Обухівський р-н:** Триполіє (с. Трипілля), ур. "Кушова Долина", 29.07.1889, Монтрезор (KW).

— **Черкаська обл.** Канівський р-н: окол. с. Межирич, сосновий бір над р. Рось, 21.06.1849, Рогович det. Баранський (KW); 22.07.1972, Котов (KW). Черкаський р-н: с. Гута Межирицька, в Гутянському лісі, часто, 06.08.1937, Осадча (KW); Elisawetowka (с. Єлисаветівка) zwischen Kanew und Tscherkassy, 28.06.1844, Trautvetter (LE); окол. сіл Дубіївка та Софіївка (Гайова, Коротченко, 2013); Кечівське [Військове] л-во, Черкаський бір, кв. 100, старий сосново-дубовий ліс, 02.05.2005, Расевич (KW); ок. с. Михайлівка, в сосновому лісі, на вирубах, досить часто, вторинне цвітіння, 15.09.1931, Котов, Карнаух (KW); 1938, Клеопов (KW); 22.07.1972, Котов (KW); 18.07.1946, Гловацька (KWU); 31.05.1980, Любченко (KWU); 23.06.1982, Кузьменко (KWU); пд. ок. с. Михайлівка, по дорозі в с. Миронівка, бори та вирубки на правому березі р. Рось, 15.09.1931, Котов (KW); суборовий і боровий ліс Михайлівського л-ва, 1952, Деменчук (KWU); 03.07.1976, Довбиш, Зеленська (KWU); 22.05.2002, Левкович (KWU); Михайловський лес, песчаная терраса р. Рось, сосновий бор, 10.06.1973, Каракаш (MW); Михайлівський ліс, борова тераса, 23.06.1978, Бортняк (KWU); Михайлівське л-во Канівської лісомеліоративної станції, 1980, Любченко, Яценко; ок. с. Мошни, сосновий ліс, 19.07.1946, Вісюліна (KW); 19.07.1946, Гловацька (KWU); ок. с. Руська Поляна, в сосновому лісі, 22.04.1927, Клеопов (KW); Руськополянське л-во, кв. 103, сосновий ліс, у підліску, 15.06.1977, Антонюк (KWHNA), (Temchenko et al., 1986); ок. с. Руська-Поляна, Русько-Полянське л-во кв. 136, 17.05.2017, Мельник, Баранський, Шиндер (KWHNA); за 4 км на півн.-зах. від с. Руська-Поляна, Черкаське військове л-во, кв. 59, дубовий ліс, 17.05.2017, Мельник, Баранський, Шиндер (KWHNA); біля с. Свидівок, Черкаський ДЛГ, Свидівське л-во, в дубово-сосновому

лісі, часто, 28.09.1958, Гринь (KW); 23.07.1983, Вірченко (KWU); сосновий лес между Сосновкой (нині мікрорайон м. Черкаси) и с. Мошни, высота растений 22 см, полнота 0.4, 16.05.1963, [s. coll.] (MW); с. Софіївка, ур. Михайлівський ліс, свіжий субір, 27.04.1990, Бортняк, Войтюк (KWU); Черкаський бір, 1948, Левитська (KWHU); Черкаський бір, Білозерське і Русько-Полянське л-ва, кв.: 142, 239, 240, 9.06.1982, Удра (KW); лісництва Черкаського, Смілянського та Корсунь-Шевченківського лісгоспів (Антонюк, 1982). Смілянський р-н: distr. Czerkassy, in querceto-pinetus prope opp. Smiela, 06.19258.09.1927, Borysevicz (KW); 08.09.1927, Kleorow (KW); 1927, [s. coll.] (KRA); Смілянський бір (Клеопов, 1928).

#### ПРИДНІПРОВСЬКА НИЗОВИНА

— **Київська обл.** Бориспільський р-н: ок. с. Кийлів, сосновий ліс, багато, 15.06.1924, Дубовик, Клеопов (KW); мішаний ліс між с. Кийлів та болотом Карань, дуже часто, 16.04.1924, Дубовик, Клеопов (KW); (Клеоров, Dubovuk, 1926); Ржищівський військовий лісгосп, кв. 12, 17.05.2005, Расевич (KW); ок. с. Сошників, дубово-сосновий ліс, 25.06.1987, Мельник (KW); ок. с. Сошників, сосновий ліс, 17.05.2003, Мельник, Шевченко, Перегрим (KWHNA); ок. с. Сошників – Старе, дубово-сосновий ліс, 25.06.1987, Мельник (KWHNA); ок. с. Старе, у світлому сосновому лісі на борових пісках Дніпра, 15.10.1978, Бортняк, Войтюк (KWU).

— Черкаська обл., Канівський р-н: ок. залізничної станції Ліпляве, поруб соснового лісу, 12.09.1931, Котов (KW); окол. с. Ліпляве, Ліплявське л-во, дубово-сосновий ліс, 2017, Мельник (KWHNA).



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.05.363>

## Єдина знахідка *Ophioglossum vulgatum* (*Ophioglossaceae*) у лісостеповій частині Житомирської області

Марина Д. БУРЛАКА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська 2, Київ 01601, Україна  
[maryna.burlaka@gmail.com](mailto:maryna.burlaka@gmail.com)

Burlaka M.D. 2020. A unique locality of *Ophioglossum vulgatum* (*Ophioglossaceae*) in forest-steppe part of Zhytomyr Region. *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 363–368.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine  
2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

**Abstract.** A new population of a regionally threatened species *Ophioglossum vulgatum* is reported. It is the southernmost record of the species within Zhytomyr Region and the only one in its forest-steppe part. The population is comprised of four parts with overall area of about 16 m<sup>2</sup> and total number ca. 1000 specimens. A two-fold observation of the locality revealed fluctuation in number and density of specimens. The population is located within a settled area and is exposed to moderate anthropogenic pressure. Further monitoring is needed to detect population trend.

**Keywords:** distribution, forest-steppe, *Ophioglossaceae*, *Ophioglossum vulgatum*, population, threatened species, Ukraine, Zhytomyr Region

Submitted 09 July 2020. Published 31 October 2020

Бурлака М.Д. 2020. Єдина знахідка *Ophioglossum vulgatum* (*Ophioglossaceae*) у лісостеповій частині Житомирської області. *Український ботанічний журнал*, 77(5): 363–368.

**Реферат.** Виявлена нова популяція регіонально рідкісного виду *Ophioglossum vulgatum*. Це найпівденніша знахідка виду в Житомирській області та єдина в її лісостеповій частині. Популяція складається з чотирьох частин загальною площею понад 16 м<sup>2</sup> і чисельністю близько 1000 особин. Двократне обстеження з інтервалом у три роки виявило флуктуації кількості та щільності особин. Популяція розташована в межах населеного пункту та піддається помірному антропогенному навантаженню. Наголошено на необхідності подальшого моніторингу для встановлення популяційного тренду.

**Ключові слова:** Житомирська область, лісостепова зона, *Ophioglossaceae*, *Ophioglossum vulgatum*, популяція, поширення, Україна

### Вступ

*Ophioglossum vulgatum* L. – голарктичний вид з родини *Ophioglossaceae*, в Україні спорадично поширений у Карпатах і Поліссі, менше в Лісостепу і дуже рідко в степовій зоні та Гірському Криму (Chorik, 1978; Opredelitel..., 1987; Didukh, Protoporova, 2000; Parnikoza, Celka, 2016, 2018; Parnikoza et al., 2017).

*Ophioglossum vulgatum* здебільшого приурочений до лучних ділянок, лісових галявин, узлісь, країв боліт, чагарників (Parnikoza, 2010; Vasheka, Bezsmertna, 2012).

Як регіонально рідкісний вид охороняється на території 16 областей: Вінницької, Дніпропетровської, Житомирської, Закарпатської, Івано-Франківської, Київської, Луганської, Львівської,

Одеської, Полтавської, Рівненської, Сумської, Харківської, Херсонської, Чернівецької та Чернігівської, а також у межах м. Київ (Official..., 2012). Пропонувався до включення в наступне видання Червоної книги України (Parnikoza, Celka, 2018).

У травні 2016 р. нами було виявлено *O. vulgatum* у межах с. Мінківці Андрушівського р-ну Житомирської обл. на вологій луці поряд із озером і залізничним насипом. Ця популяція є найпівденнішою знахідкою в області та єдиною для її лісостепової частини (рис. 1). Найближчими з підтверджених протягом останніх 30 років локалітетів є популяції в Житомирському р-ні Житомирської обл. (близько 50 км від нової популяції) (Богунське л-во, ок. с. Барашівка, дубовий ліс різнотравний, 20.09.1992, О. Орлов (KW001044)) та ландшафтному заказнику "Ковалівський яр" (близько 90 км) поблизу м. Васильків Київської обл. (Parnikoza, Celka, 2016). Для Житомирської області нами знайдені вказівки всього для дев'яти місцезростань, значна частина яких датується кінцем XIX – початком XX століття і повторно не наводиться (Житомир, високо при Тетереві. Монтрезор, 1890 (KW, s.n.); Довбиський р-н, с. Биківка, 1982 (KW, s.n.); с. Биківка Мархлевського р-ну, вогка лука, 18.07.1932, А. Барбарич (KW, s.n.); с. Владин Мархлевського р-ну, лука вогка, 17.06.1932, А. Барбарич (KW, s.n.); Chopik, 1978; Orlov, 2005; Parnikoza, 2010; Parnikoza, Celka, 2016). Метою даного дослідження було охарактеризувати нове місцезростання та популяцію *O. vulgatum*.

## Матеріали та методи

Обстеження популяції проведено двічі: на початку травня 2016 р. та наприкінці квітня 2019 р. У 2016 р. здійснено повний підрахунок спороносних і вегетативних особин 1–3 частин популяції шляхом поділу популяційного поля на квадрати площею 1 м<sup>2</sup> та підрахунком особин у кожному з них. У випадку неповного заповнення квадрату вказується площа популяційного поля в межах квадрату. У 2019 р. проведено повторний огляд першої та третьої частин популяції із загальним підрахунком спороносних і вегетативних особин у межах кожної частини. За даними обстеження встановлено загальну площу популяції, чисельність і щільність особин. Статистичну обробку проведено з використанням програми MS Excel.



Рис. 1. Поширення *Ophioglossum vulgatum* у Житомирській області: 1 – знахідки до 1990 р.; 2 – після 1990 р.; 3 – нова знахідка; 4 – межа Полісся та Лісостепу

Fig. 1. Distribution map of *Ophioglossum vulgatum* in Zhytomyr Region: 1 – localities reported before 1990; 2 – localities reported after 1990; 3 – a new record; 4 – Polissya and Forest-Steppe border

Ценотичну характеристику подаємо за візуальним обстеженням рослинного покриву в липні 2020 р., оскільки на момент популяційних досліджень трав'яний покрив тільки відновлював вегетацію після весняних випалів. Назви таксонів наводимо за *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life* ([www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col))

## Результати та обговорення

Досліджена популяція *O. vulgatum* складається з чотирьох частин, які знаходяться на відстані 15–60 м одна від одної (рис. 2, А). Перша частина, площа якої 8,45 м<sup>2</sup>, розташована на відкритій луці на північному березі озера. Друга, площею 4,60 м<sup>2</sup>, знаходиться найближче до залізничного насипу під старим деревом *Salix alba* L., ґрунт щербенистий (каміння із насипу). Третя частина популяції займає територію

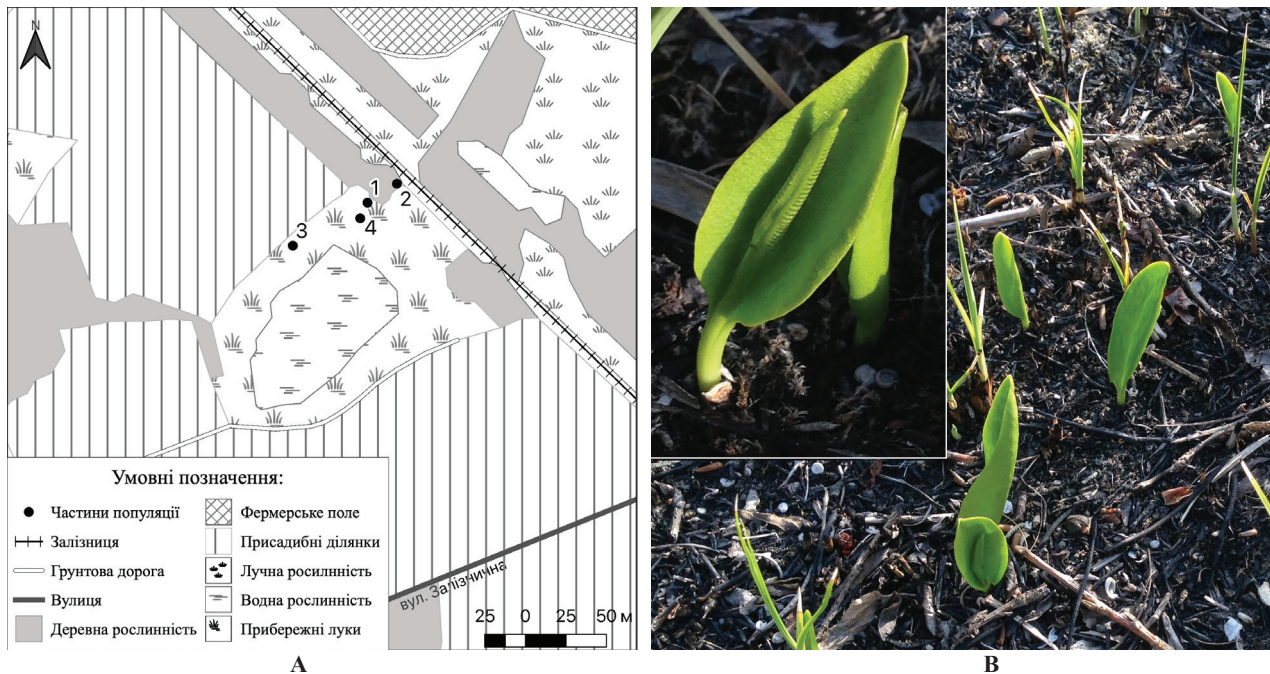


Рис. 2. Місцезростання *Ophioglossum vulgatum* у межах с. Мінківці. А: картосхема розташування частин популяції та типів рослинного покриву (2016 р.); В: особини *O. vulgatum* (27.04.2019)

Fig. 2. Location of *Ophioglossum vulgatum* within Minkivtsi village. A: schematic map of population parts and vegetation types (2016); B: individuals of *O. vulgatum* (27.04.2019)

3,45 м<sup>2</sup> між прибережною смугою з домінуванням *Typha latifolia* L. і присадибною ділянкою. Загальна площа популяційного поля в 2016 р. складала 16,4 м<sup>2</sup>, чисельність популяції – 912 особин. У 2019 р. було виявлено четверту частину популяції – між першою та озером, на території 1,3 × 0,5 м.

Травостій прибережної луки, в межах якої розташовані перша та четверта частини популяції, складається переважно з *Phalaris arundinacea* L., подекуди з домішками *Carex* sp., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (угруповання асоціації *Phalaridetum arundinaceae* Libbert 1931 союзу *Phalaridion arundinaceae* Корецькú 1961 порядку *Nasturtio-Glycerietalia Pignatti* 1953 класу *Phragmito-Magnocaricetea* Klika in Klika & Novák 1941). У місці розташування третьої частини домінують злаки. Окрім названих видів, у межах цих трьох частин присутні також *Iris pseudacorus* L., *Lysimachia vulgaris* L., *Stachys palustris* L., *Vicia cracca* L. У межах третьої частини популяції умови дещо сухіші, вона піддається більшому впливу випасання. Тут, окрім наведених видів, трапляються також *Erigeron annuus* (L.) Pers., *Argentina anserina* (L.) Rydb., *Cirsium arvense* (L.) Scop. (угруповання союзу *Deschampsion*

*cespitosaе* Horvatić 1930 порядку *Molinieta lia caeruleae* Koch 1926 класу *Molinio-Arrhenatheretea* Тх. 1937). Рослинний покрив у місці другої частини популяції подібний до умов першої, але розріджений та заростає *Rubus caesius* L. (угруповання союзу *Phalaridion arundinaceae* Корецькú 1961 порядку *Nasturtio-Glycerietalia Pignatti* 1953 класу *Phragmito-Magnocaricetea* Klika in Klika & Novák 1941).

На всій площі поширення особин травостій навесні випаюється. Третя частина популяції також підлягає випасанню. Поряд пролягає стежка, проте загалом антропогенне навантаження на популяцію помірне. Впродовж останніх 10 років на території дослідження за нашими спостереженнями відбувається зниження рівня ґрунтових вод, зменшення площі водного дзеркала озера до тимчасового повного його пересихання та відсутність в окремі роки весняного водопілля. Саме з цих причин протягом літа 2016 р. за допомогою моторизованої техніки було проведено розчищення та поглиблення озера з його південного боку. Берег озера з популяцією *O. vulgatum* не зазнав безпосереднього впливу. При повторному обстеженні популяції в 2019 р. суттєвих змін обводненості ділянки не виявлено.

Розташування особин у межах популяції нерівномірне, в певних місцях можна відмітити скупчення спороносних або вегетативних пагонів (рис. 2, В). Трапляються також ділянки, зайняті тільки вегетативними особинами (див. табл. 1). Щільність генеративних особин у 2016 р. коливалася в значних межах (від 0 до 68 особин/м<sup>2</sup>), у середньому 15,2 особин/м<sup>2</sup>. Загальна щільність особин також значно варіює (18,0–206,7 особин/м<sup>2</sup>), у середньому 71,9 особин/м<sup>2</sup> (2016 р.).

Найвищі популяційні показники властиві першій частині популяції. Як бачимо з табл. 1, її площа між обстеженнями практично не змінилась. Проте чисельність і щільність особин порівняно з 2016 р. зросла більше ніж удвічі (з 521 до 1284 особин та з 71,9 до 151,4 особин/м<sup>2</sup> відповідно). Зокрема, частина цієї ділянки у вигляді кола діаметром близько 1,4 м у 2019 р. була досить однорідною і мала надзвичайно високу щільність – 461 особина/м<sup>2</sup>. Зазначимо, що частка генеративних особин у цій частині популяції значно не змінилась (37–40%). За літературними даними цей показник є типовим. Наприклад, для лісових популяцій *O. vulgatum* на півночі Франції вказується 30–60% спороносних особин у популяціях (Muller, 2000); для півночі Польщі – 30–50% у лучних популяціях і їхня відсутність або незначна кількість на вирубках, у заболоченому лісі, а також на луках (Myśliwy, 2008); на півдні Польщі – 46% спороносних особин у популяції по краю гірського болота (Sitek et al., 2018).

Для другої та третьої частин популяції, поряд з меншою площею, характерна невелика кількість і, відповідно, щільність спороносних пагонів (5–7%, 2016 р.). Проте третя ділянка мала високу загальну щільність особин за рахунок вегетативних особин (83,4 особин/м<sup>2</sup>). Пригніченість другої частини популяції ми пов'язуємо зі специфічним для виду субстратом: зокрема, на цій ділянці він кам'янистий та багатий на відмерлу деревину. Окрім того, територія значну частину світлового дня затінена, спостерігається поширення пагонів *Rubus caesius*, а підвищення в напрямку залізничного насипу та скелетність ґрунту сприяють меншій затримці вологи.

За візуальним оглядом, площа та щільність другої частини популяції *O. vulgatum* у 2019 р. не змінилися, а третя частина суттєво зменшилася за обома показниками. При повторному обстеженні вона мала площу всього 0,1 м<sup>2</sup> і була представлена 9 особинами. Візуальних змін місцезростання третьої частини не виявлено. Ймовірно, зафіксоване скорочення

чисельності особин у цій частині є проявом флуктуації внаслідок особливостей онтогенезу *O. vulgatum*.

Отже, навіть при помірному антропогенному навантаженні в умовах населеного пункту в лісостеповій зоні вид може досягати високих значень чисельності та щільності популяції з типовим рівнем частки спороносних особин. У той самий час, випалювання та випасання, ймовірно, є надмірним навантаженням за подібних умов. З метою встановлення загальної тенденції змін у популяції необхідно продовжити моніторинг.

Насамкінець, пропонуємо розглянути питання охорони *O. vulgatum* і пропозиції науковців щодо внесення його до наступного видання Червоної книги України (Parnikoza, Celka, 2018). Вочевидь, значна кількість знахідок виду є застарілою і сучасний стан багатьох популяцій невідомий. Проте не слід вважати відсутність підтверджень давніх місцезростань як пряму ознаку зменшення чисельності виду, оскільки є причини такої ситуації, що прямо не пов'язані із загрозами для виду. Перш за все, це невеликі розміри особин, приурочених здебільшого до біотопів з досить густим та високим травостоєм. Відповідно, навіть за наявності вказівок на зростання виду в певному місці, виявити його не завжди просто. Окрім того, нещодавні публікації колег із сусідніх країн свідчать, що при детальному вивченні невеликих територій, за наявності сприятливих біотопів, вид нерідко виявляють одразу в декількох локалітетах (Myśliwy, 2008; Krivošej et al., 2013; Swacha et al., 2013; Kołodziej et al., 2015; Bogosavljević, Zlatković, 2018). Подібна ситуація і з новими знахідками в Україні, про що свідчать повідомлення А. Токарюк (Чернівецька обл.), В. Лої (Закарпаття), В. Гелюти (Волинь), І. Парнікози (Київська обл.) та ін. (див. Parnikoza, Celka, 2016). Тому, на нашу думку, для розуміння необхідності охорони виду в Україні потрібні цілеспрямовані пошуки у відомих локалітетах та сприятливих біотопах, їхня інвентаризація.

Гербарний зразок з дослідженої популяції *O. vulgatum* передано до гербарію Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (KW144368), фотоспостереження опубліковані на порталі UkrBIN (<http://www.ukrbin.com/showimages.php?category=132323&action=added&uid=552>).

Таблиця 1. Популяційні показники *Ophioglossum vulgatum* у 2016 та 2019 рр.\*Table 1. Population characteristics of *Ophioglossum vulgatum* in 2016 and 2019\*

Рік обстеження	Номер частини популяції	Номер ділянки	Площа популяційного поля на ділянці, м <sup>2</sup>	Кількість спороносних особин, од.	Кількість вегетативних особин, од.	Загальна кількість особин на ділянці, од.	Щільність спороносних особин, од./м <sup>2</sup>	Загальна щільність особин, од./м <sup>2</sup>	Частка спороносних особин, %	
2016	1	1	1,00	48	85	133	48,0	133,0	36,1	
		2	1,00	13	11	24	13,0	24,0	54,2	
		3	0,90	18	10	28	20,0	31,1	64,3	
		4	0,90	13	4	17	14,4	18,9	76,5	
		5	0,40	2	6	8	5,0	20,0	25,0	
		6	0,10	2	14	16	20,0	160,0	12,3	
		7	1,00	0	35	35	0,0	35,0	0,0	
		8	1,00	0	18	18	0,0	18,0	0,0	
		9	0,30	20	29	49	66,6	163,3	40,8	
		10	1,00	68	78	146	68,0	146,0	46,6	
		11	0,60	5	27	32	8,3	53,3	15,6	
		12	0,25	5	10	15	20,0	60,0	33,3	
		<b>Σ</b>	<b>8,45</b>	<b>194</b>	<b>327</b>	<b>521</b>	<b>23,62 ± 13,59*</b>	<b>71,89 ± 33,93*</b>	<b>37,24 ± 13,78*</b>	
	2	1	1,00	2	49	51	2,0	51,0	3,9	
		2	3,60	9	76	85	2,5	23,6	10,6	
		<b>Σ</b>	<b>4,60</b>	<b>11</b>	<b>125</b>	<b>136</b>	<b>2,25 ± 0,49*</b>	<b>37,31 ± 26,84*</b>	<b>7,25 ± 6,53*</b>	
	3	1	0,75	0	69	69	0,0	92,0	0,0	
		2	0,40	1	8	9	2,5	22,5	11,1	
		3	1,00	3	64	67	3,0	67,0	4,5	
		4	0,10	0	6	6	0,0	60,0	0,0	
		5	0,30	1	61	62	3,3	206,7	1,6	
		6	0,80	6	36	42	7,5	52,5	14,3	
		<b>Σ</b>	<b>3,35</b>	<b>11</b>	<b>244</b>	<b>255</b>	<b>2,72 ± 2,21*</b>	<b>83,44 ± 51,54*</b>	<b>5,25 ± 4,87*</b>	
	<b>Всього</b>			<b>16,40</b>	<b>216</b>	<b>696</b>	<b>912</b>	<b>0,0–68,0</b> <b>15,21 ± 9,27*</b>	<b>18,0–206,7</b> <b>71,90 ± 25,41*</b>	<b>0,0–76,5</b> <b>22,54 ± 10,30*</b>
	2019	1	1	1,90	46	152	198	24,2	104,2	23,2
			2	1,54	246	464	710	159,7	461,0	34,6
			3	1,00	45	34	79	45,0	79,0	57,0
			4	4,00	139	158	297	34,8	74,3	46,8
			<b>Σ</b>	<b>8,44</b>	<b>476</b>	<b>808</b>	<b>1284</b>	<b>65,93 ± 61,85*</b>	<b>179,62 ± 184,30*</b>	<b>40,41 ± 14,35*</b>
		3	1	0,10	3	6	9	30,0	90,0	33,3
		<b>Всього</b>			<b>8,54</b>	<b>479</b>	<b>814</b>	<b>1293</b>	<b>24,2–159,7</b> <b>58,74 ± 16,56*</b>	<b>74,3–461,0</b> <b>161,70 ± 46,18*</b>

\* Для показників щільності та частки особин подані середні (для окремих частин популяції) та узагальнені за рік значення (min-max/середнє)

\* For densities and portion parameters there are given average values for parts of population and summary values within specified years (min-max/average)

## Висновки

Виявлена популяція *Ophioglossum vulgatum* є найпівденнішою знахідкою в Житомирській області та єдиною для її лісостепової частини. Популяція розташована в межах населеного пункту та підлягає помірному антропогенному впливу (весняне випалювання, спорадичне випасання). Популяційні параметри за даними двократних спостережень значно флюктуують як у напрямку збільшення, так і зменшення. Для встановлення довготривалих тенденцій параметрів популяції необхідний подальший моніторинг. Отримана інформація доповнює відомості про поширення та особливості популяції *Ophioglossum vulgatum* в Україні.

## Список посилань

- Bogosavljević S., Zlatković B. 2018. Report on the new floristic data from Serbia II. *Biologica Nyssana*, 9(2): 63–75.
- Chopik V.I. 1978. *Redkie i ischezayushchie rasteniya Ukrainy: Spravochnik*. Kiev: Naukova Dumka, 216 pp. [Чопик В.И. 1978. *Редкие и исчезающие растения Украины: Справочник*. Киев: Наукова думка. 216 с.]
- Didukh Ya.P., Protopopova V.V. 2000. *Ophioglossum vulgatum*. In: Didukh Ya.P., Plyuta P.G., Protopopova V.V., Ermolenko V.M., Korotchenko I.A., Karkutsiev G.M., Burda R.I. *Ecoflora of Ukraine*, vol. 1. Ed. Ya.P. Didukh. Kyiv: Phytosociocentre, 584 pp. [Дідух Я.П., Коротченко І.А., Фіцайло Т.В., Бурда Р.І., Мойсієнко І.І., Пашкевич Н.А., Якушенко Д.М., Шевера М.В. 2000. *Екофлора України*, т. 1. Відпов. ред. Я.П. Дідух. Київ: Фітосоціоцентр, 584 с.]
- Kołodziej Z., Bilański P., Pająk M. 2015. New localities of adder's-tongue *Ophioglossum vulgatum* on the Kolbuszowa Plateau. *Chrońmy Przyrodę Ojczyznę*, 71(6): 467–469.
- Krivošej Z., Prodanović D., Lazarević P., Vasić P. 2013. *Ophioglossum vulgatum* L. (*Ophioglossaceae*) – in the flora of Kosovo and Metohija (Serbia). *Natura Montenegrina*, 12: 395–404.
- Muller S. 2000. Assessing occurrence and habitat of *Ophioglossum vulgatum* L. and other *Ophioglossaceae* in European forests. Significance for nature conservation. *Biodiversity and Conservation*, 9(5): 673–681. <https://doi.org/10.1023/A:1008996613350>
- Myśliwy M. 2008. Characterization of selected *Ophioglossum vulgatum* L. stations in northern-western Poland. *Natura Montenegrina*, 7(2): 231–244.
- Official lists of regional rare plants of administrative territories of Ukraine (reference book)*. 2012. Ed. T.L. Andrienko, M.M. Peregrym. Kyiv: Alterpress, 148 pp. [Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України (довідкове видання). 2012. Укладачі: Т.Л. Андрієнко, М.М. Перегрим. Київ: Альтерпрес, 148 с.]
- Opređelitel' vysshikh rasteniy Ukrainy*. 1987. Kiev: Naukova Dumka, 548 pp. [Определитель высших растений Украины. 1987. Киев: Наукова думка, 548 с.]
- Orlov O.O. 2005. *Rare and threatened species of vascular plants of Zhytomyr region*. Zhytomyr: Volyn, PP Ruta, 296 pp. [Орлов О.О. 2005. *Рідкісні та зникаючі види судинних рослин Житомирської області*. Житомир: Волинь, ПП Рута, 296 с.]
- Parnikoza I.Yu. 2010. Current state of *Ophioglossaceae* species populations of Ukraine. *Nature Reserves in Ukraine*, 16(1): 22–27. [Парнікоза І.Ю. 2010. Сучасний стан популяцій видів *Ophioglossaceae* флори України. *Заповідна справа в Україні*, 16(1): 22–27.]
- Parnikoza I., Celka Z. 2016–onward. Vuzhachka zvychayna (*Ophioglossum vulgatum* L.) v Ukraini. In: *An Archive of the Ophioglossaceae in Ukraine*. Available at: <https://www.myslenedrevo.com.ua/uk/Sci/Nature/archiv-ophioglossaceae-ukraine/ophioglossum-vulgatum.html> (Accessed 10.04.2020). [Парнікоза І., Целька З. 2016–продовжуване. Вужачка звичайна (*Ophioglossum vulgatum* L.) в Україні. В: *Архів знахідок представників вужачкових папоротей Ophioglossaceae в Україні*].
- Parnikoza I., Celka Z. 2018. In: *The Plant Kingdom in the Red Data Book of Ukraine: Implementing the Global Strategy for Plant Conservation: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference (25–28 June 2018, Kherson, Ukraine)*. Kherson: Publishing House Vyshemirskiy V.S., pp. 71–75. [Парнікоза І., Целька З. 2018. Обґрунтування включення *Ophioglossum vulgatum* L. та *Botrychium simplex* E. Hitchc. до Червоної книги України. В зб.: *Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин: Матеріали V Міжнародної конференції (25–28 червня 2018 р., Херсон, Україна)*. Херсон: книжкове вид-во ФОП Вишемирський В.С., с. 71–75.]
- Parnikoza I., Chernyshenko M., Celka Z. 2017. *Ophioglossaceae (Psilotopsida)* in Ukraine. *Biodiversity: Research and Conservation*, 48: 25–47. <https://doi.org/10.1515/biorc-2017-0009>
- Sitek E., Nowak B., Gajewski Z. 2018. Nowe stanowisko *Ophioglossum vulgatum* (*Ophioglossaceae*) w Beskidzie Sądeckim: New locality of *Ophioglossum vulgatum* (*Ophioglossaceae*) in the Beskid Sądecki Mountains. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica*, 25(2): 10–17.
- Swacha G., Czarniecka M., Kaçki Z. 2013. *Ophioglossum vulgatum* L. in Lower Silesia: distribution, level of threat and occurrence in plant communities. *Acta Botanica Silesiaca*, 9: 75–96.
- Vasheka O.V., Bezsmertna O.O. 2012. *Fern altas of Ukrainian flora*. Kyiv: Palyvoda A.V., 160 pp. [Вашека О.В., Безсмертна О.О. 2012. *Атлас папоротей флори України*. Київ: Паливода А.В., 160 с.]

Рекомендує до друку І.А. Коротченко





<https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.05.369>

## Морфологічні особливості квіток, пилкових зерен і плодів *Valeriana tuberosa* (Valerianaceae)

Ольга М. ЦАРЕНКО, Зоя М. ЦИМБАЛЮК, Олена В. БУЛАХ, Людмила М. НИЦЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська 2, Київ 01601, Україна

Tsarenko O.M., Tsybalyuk Z.M., Bulakh O.V., Nitsenko L.M. 2020. **Morphological peculiarities of flowers, pollen grains and fruits of *Valeriana tuberosa* (Valerianaceae).** *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 369–377.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

[tsarenko\\_olga@ukr.net](mailto:tsarenko_olga@ukr.net)

[palynology@ukr.net](mailto:palynology@ukr.net)

[anemone@ukr.net](mailto:anemone@ukr.net)

**Abstract.** The results of the study of flowers, pollen grains and fruits of *Valeriana tuberosa* (sect. *Tuberosae*, Valerianaceae) are presented. Materials of the National Herbarium of the M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine (KW) were studied. The morphological structures of flowers, pollen grains and fruits were examined using both light microscopy and scanning electron microscopy; detailed descriptions of the elements of the flower, pollen grains and fruits were made and their specific features were established. The morphological features of the inflorescence, bracteoles, and the elements of the hermaphrodite flowers have been clarified. The pollen grains of *V. tuberosa* are 3-colpate, suboblate to subprolate (P/E = 0.85–1.33), medium- or large-sized. Their outline in equatorial view is elliptic, rarely circular, in polar view slightly trilobate or trilobate. Exine sculpture is echinate-microechinate with verrucae. The known and new carpological features are specified. In particular, papillate growth of periclinal walls of exocarp with stroke-shaped, jet and warty cuticular formations of the surface were noted the first time; details of exocarp stomatal system were revealed; features of trichomes and their cuticular structure on fruit wall are described. The obtained data are important additional characters for identification of the species and for the issues of taxonomy and phylogeny.

**Keywords:** exine sculpture, flower, fruit, microstructure, pollen grains, scanning electron microscopy

Submitted 12 May 2020. Published 31 October 2020

Царенко О.М., Цимбалюк З.М., Булах О.В., Ниценко Л.М. 2020. **Морфологічні особливості квіток, пилкових зерен і плодів *Valeriana tuberosa* (Valerianaceae).** *Український ботанічний журнал*, 77(5): 369–377.

**Реферат.** Представлено результати дослідження квіток, пилкових зерен і плодів *Valeriana tuberosa* (секція *Tuberosae*, Valerianaceae). За допомогою світлової та сканувальної електронної мікроскопії були досліджені морфологічні особливості квіток, пилкових зерен і плодів, складені їхні детальні описи та встановлені специфічні ознаки. Уточнено морфологічні ознаки суцвіття, приквітничків та елементів двостатевих квіток. Встановлено, що пилкові зерна *V. tuberosa* 3-борозні, сплющено-сфероїдальні або майже еліпсоїдальні за формою (П/Е = 0,85–1,33), середніх та великих розмірів, в обрисі з екватора еліптичні, зрідка округлі, в обрисі з полюса слабко 3-лопатеві або 3-лопатеві. Скульптура екзини шипувато-шипикувата з бородавками. Уточнено відомі та виявлено нові ознаки плодів. Уперше відзначено сосочкоподібні папілозні вирости периклінальних стінок екзокарпа зі штрихоподібними, струменястими та бородавчастими кутикулярними утворами поверхні, виявлено особливості продихового апарату екзокарпу, описано особливості трихом, кутикулярної структури плодів. Отримані дані є важливим джерелом додаткових ознак при ідентифікації виду та подальшого їхнього використання у вирішенні питань таксономії та філогенії.

**Ключові слова:** квітка, мікроструктура, пилкові зерна, плід, сканувальний електронний мікроскоп, скульптура екзини

## Вступ

Рід *Valeriana* L. (*Valerianaceae* Batsch) представлений у світовій флорі близько 200 видами, які поширені у Європі, центральних і північних частинах Азії, у Північній та Південній Америці та Північній Африці (Grubov, 1958; Katina, 1961, 1987; Ockendon, 1976; Voroshilov, 1978; Takhtajan, 1987, 2009; Gorbunov, 2002). Для флори України наведено десять видів роду (Mosyakin, Fedoronchuk, 1999), одним із яких є *V. tuberosa* L. Загальний ареал виду охоплює південні та центральні території Європи, Середземноморський регіон, Середню Азію та Північну Африку (Grubov, 1958; Katina, 1961, 1987; Ockendon, 1976; Voroshilov, 1978; Gorbunov, 2002). В Україні *V. tuberosa* поширений на півдні Лісостепу, в Степу та Криму (східна частина), типові його місця зростання включають степові та солонцеві луки, пасовища, береги водойм, галявини лісових масивів, рівнини та пасовища низьких гір, кам'яністі схили (Katina, 1961, 1987).

*Valeriana tuberosa* заслугове на особливу увагу, оскільки включений до Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи (МСОП) (Rankou et al., 2015) із наданням статусу LC та до списків регіонально рідкісних рослин Дніпропетровської, Запорізької, Харківської, Полтавської областей України (Andrienko, Peregrum, 2012). Популяції цього виду у вищезазначених областях є малочисельними, рослини мають вузьку екологічну амплітуду, слабку конкурентоздатність порівняно з іншими видами в угрупованнях та знаходяться під надмірним рекреаційним навантаженням (туризм, розвиток інфраструктури та урбанізація), тому потребують охорони (Andrienko, Peregrum, 2012). Як і більшість представників роду, *V. tuberosa* широко використовується в народній медицині завдяки численним біологічним властивостям, однак в останні роки не допускається збір його рослин як лікарської сировини (Minarchenko, Tymchenko, 2002). На нашу думку, для запобігання знищенню виду потрібна чітка його діагностика.

*Valeriana tuberosa* – єдиний вид флори України, що належить до секції *Tuberosae* (Hoesck) Grub. роду *Valeriana*, унікальною рисою представників якої є наявність підземних яйцеподібних або майже кулястих кореневих бульб. Діагностичними критеріями секції є також наявність головчастого суцвіття, трубчастого віночка з вузьким відгином та плодами з потовщеними краями (облямівкою) і щетинистим

опушенням з боків (Grubov, 1958; Katina, 1961; Ockendon, 1976; Voroshilov, 1978; Gorbunov, 2002). *Valeriana tuberosa* – це багаторічна рослина з голим стеблом 12–50 см завв., з цілісними прикореневими листками, ліроподібними, пірчаторозсіченими стебловими листками з лінійними бічними сегментами, щільним головчастим суцвіттям, яке під час плодоношення розростається, із трикутно-ланцетними, великими або іноді з поодинокими війками, приквітничками; віночок квітки світло-рожевий, 4–6 мм завд. (Grubov, 1958; Katina, 1961; 1987; Ockendon, 1976; Voroshilov, 1978; Gorbunov, 2002).

Морфологічні ознаки квітки в межах роду *Valeriana* визнавались досить подібними, тому критерії структури її елементів майже не використовувались для вирішення спірних питань таксономії роду. Морфологічні ознаки плодів рідко залучалися для діагнозів та обмежено використовувалися в ключах при визначенні видів роду, іноді враховувалися форма, розміри та опушення плодів (Grubov, 1958; Katina, 1961, 1987; Ockendon, 1976; Voroshilov, 1978). Існує низка публікацій, присвячених дослідженню карпологічних особливостей видів роду *Valeriana*, метою яких було виявлення діагностичних критеріїв для цілей таксономії та філогенії (Voroshilov, 1978; Gorbunov, 1978, 2002, 2014; Jacobs et al., 2010; Vakulenko et al., 2016). Паліноморфологічні особливості *V. tuberosa* досліджували з використанням світлового мікроскопу (Pyltsevoiy analiz, 1950; Kupriyanova, Aleshina, 1978) та сканувального електронного мікроскопу (Clarke, Jones, 1977; Diez, 1984).

З огляду на вищезазначене, метою нашої роботи було дослідити морфологічні ознаки квіток, пилкових зерен і плодів *V. tuberosa* та уточнити особливості їхньої будови, систематизувати та надати детальну характеристику, виявити додаткові критерії для точнішої ідентифікації та подальшого використання цих ознак у вирішенні питань таксономії та філогенії.

## Матеріали та методи

Для дослідження квіток, пилкових зерен і плодів був використаний матеріал з Національного гербарію Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (KW). Етикетки гербарних зразків цитуються мовою оригіналу, за необхідності наведені уточнення щодо сучасних назв адміністративних

регіонів. Морфологічні особливості квіток та плодів досліджували під бінокулярним МБС-9. Плоди також вивчали під сканувальним електронним мікроскопом (SEM, JEOL JSM-6060 LA), зразки яких фіксували на столиках та напилювали шаром золота. Описи проводили з використанням термінології, узагальненої в літературі (Fedorov, Artyushenko, 1975; Barthlott, 1981; Artyushenko, Fedorov, 1986; Plisko, 2000; Zuman et al., 2004). Для складання описів плодів залучені також рекомендації М.М. Кадена та С.А. Смирнкової (Kaden, Smirnova, 1974). У мікроморфологічних дослідженнях екзодерми зосереджували увагу на загальних обрисах клітин у парадермальній площині, формі зовнішніх периклінальних стінок клітин, звивистості антиклінальних стінок клітин та структурних особливостях кутикулярних утворів їхньої поверхні. Виміри розмірів елементів плодів (довжина та ширина тіла плоду, ширина облямівки, довжина волосків і чубка, розмір папіл) виконано з використанням програми AxioVision Rel.4.8. Виміри розмірів суцвіть, приквітничків та елементів квіток (довжина та ширина віночка оцвітини і зав'язі маточки, довжина тичинок, стовпчика та приймочки) – за допомогою масштабної лінійки бінокуляра МБС-9. Пилкові зерна вивчали з використанням світлового мікроскопу (СМ, Biolar ×700) та SEM. Для дослідження під СМ матеріал попередньо обробляли за загальноприйнятим ацетолізним методом (Erdtman, 1952). Для встановлення розмірів у 20 пилкових зерен кожного зразка вимірювали полярну вісь (П), екваторіальний діаметр (Е) і товщину екзими, у 10 пилкових зерен – діаметр апокольпуму, діаметр мезокольпуму, ширину борозни та окантовки. Постійні препарати пилкових зерен передані на зберігання в паліотеку Національного гербарію України КВ-Р (Bezusko, Tymbalyuk, 2011). Для дослідження під сканувальним електронним мікроскопом сухі пилкові зерна фіксували 96%-м етанолом та напилювали шаром золота за стандартною методикою (Tymbalyuk et al., 2018, 2019a, b). Виміри розмірів шипів та шипиків проводили з використанням програми AxioVision Rel.4.8.2. Описували пилкові зерна за термінологією Punt et al. (2007) та Halbritter et al. (2018).

**Досліджені зразки квітки:** 1. Сталинская [Донецька] обл., Володарський р-н, с. Назарівка, заповідник "Каменные могилы". 05.V 1953. Собр. Колесников, опр. Кузнецова (KW, s.n.). 2. Каменська [Тернопільська] обл., Чортківський р-н, Чортківський лісгосп, ур. "Нагольне", кв. № 93, галявина в

байрачному дубовому лісі. 20.IV 1954. Доброчаєва (KW, s.n.). 3. [Харківська обл.] Окр. с. Борки, Змиєвського уезда, степные склоны, у опушки леса по верховьям балки "Глубокой". 06.V 1923. Котов (KW, s.n.). 4. Миколаївська обл., Первомайський р-н, граніти на лівому березі р. Південний Буг, між Южноукраїнським та селищем Бузьким. 05.04.1990. Крицька, Деркач (KW00105685). 5. Україна, Луганська обл., Лутугинський р-н, між с. Шовкова Протока та с. Волнухіне, степові схили по лівому березі р. Луганчик. 29.04.2003. Перегрим (034281, KW, s.n.).

**Досліджені зразки пилкових зерен:** 1. Ворошиловградская [Луганська] область, Меловской район, заповідник "Стрелецкая степь", плато. 02.V 1955. 3. Сарычева (KW, s.n.). 2. Донецька обл., Володарський р-н, окол. с. Назарівка, "Кам'яні могили", у степу, звичайно. 29.IV 2013. В.П. Коломійчук (KW00107777). 3. Herbar de Georges Desplantes. À Flavigny sur Ozerain (Côte-d'Or). France. Côte-d'Or: Gevrey, plateau de château Renard. Calciare – alt. 320 mm. Mai 1930. G. Desplantes (KW, s.n.).

**Досліджені зразки плодів:** 1. Distr. Melitopol, Новотроїцький район, уч. 64, окр. с. Ново-Михайловки, Сладкий под. 15.V 1928. Левина Н.с.: *V. tuberosa* 09.IV 1952. Катина (KW, s.n.). 2. Сталинская [Донецька] обл., Буденовський район, заповідник "Хомутовская степь". 25.V 1956. Ф. Гринь (KW, s.n.). 3. Ворошиловградская [Луганська] обл., Меловской район, х. Ежачий, заповідник "Стрелецкая степь". 06.V 1953. Г. Кузнецова (KW, s.n.).

## Результати та обговорення

За результатами опрацювання літератури та власних досліджень морфологічних ознак нами складені уточнені характеристики суцвіття, приквітничків та елементів двостатевих квіток *V. tuberosa*. Суцвіття щільне, напівкулясте чи кулясте, 0,8–4,5 × 1,0–5,5 см, при плодах розростається і подовжується в пухку, китицеподібну волоть, гілки якої розсіяно опушені короткими щетинистими волосками. При основі суцвіття наявні листки обгортки, які супротивні, голі, майже до основи розсічені на п'ять вузьких лопатей, центральна з них найдовша, 5–8 мм. Приквітнички 1–2 × 0,5–0,75 мм, супротивні, плівчасті, трикутно-ланцетні, при основі розширені, на верхівці загострені, коротші за квітку та плід, голі або з поодинокими війками і залозками по

краях. Чашечка з 8–11 опушеними остями, які під час цвітіння загорнуті всередину. Віночок рожевий, після закінчення цвітіння опадає,  $4,5\text{--}6,0 \times 2\text{--}3$  мм, голий, за формою вузький, трубчастолійкоподібний, при основі з невеликою опуклістю з одного боку, де розміщені нектароносні клітини, на верхівці з вузьким відгином, діаметр якого близько 2 мм, з п'ятьма овальними лопатями,  $1\text{--}2 \times 0,7\text{--}1$  мм. Лопаті майже рівні між собою. Свого часу на цю особливість для видів роду вказував Ю.М. Горбунов (Gorbunov, 2002: 106), на відміну від раніше наведених в літературі даних щодо неправильно п'ятилопатевого відгину віночка (Grubov, 1958; Katina, 1961, 1987; Voroshilov, 1978). Тичинок три, прикріплені до основи трубочки віночка,  $5\text{--}6(6,5)$  мм завд., за довжиною дещо перевищують віночок, з тонкими тичинковими нитками та широкоеліпсоїдальними пиляками, які прикріплені до ниток посередині (рухливі),  $0,5\text{--}0,7$  мм завд. Зав'язь маточки  $2\text{--}4 \times 0,5\text{--}1,0$  мм, видовженояйцеподібна, плоска, ребриста, її верхівка з декількома остями (8–11 од.), загорнутими всередину, зав'язь по гранях, інколи і по ребрах густо опушена жорсткими волосками ( $0,1\text{--}0,3$  мм завд., при плодах подовжуються); стовпчик ниткоподібний,  $4\text{--}6$  мм завд., за довжиною він дорівнює віночку; приймочка трилопатева.

За результатами дослідження складено характеристику пилоквих зерен *V. tuberosa* (рис. 1, А–D, рис. 2, А–D).

**СМ.** Пилкові зерна 3-борозні, сплющено-сфероїдальні або майже еліпсоїдальні за формою ( $P/E = 0,85\text{--}1,33$ ), в обрисі з полюса слабко 3-лопатеві або 3-лопатеві, з екватора еліптичні, зрідка округлі (рис. 2, А–D); середніх або великих розмірів,  $P = 39,9\text{--}61,18$  мкм,  $E = 35,9\text{--}51,87$  мкм. Борозни середньої довжини,  $4,0\text{--}10,6$  мкм завш., з хвилястими краями, загостреними або притупленими кінцями та тонкою окантовкою,  $0,6\text{--}1,0$  мкм, що оточує борозну (рис. 2, В, D). Борозні мембрани гранулярні. Ширина мезокольпумів  $29,3\text{--}33,2$  мкм, діаметр апокольпумів  $11,9\text{--}22,6$  мкм. Екзина  $2,7\text{--}4,0$  мкм завт. Покрив дуже тонкий, у 1,5 раза тонший за стовпчиковий шар. Стовпчики чіткі. Скульптура екзини чітка, шипувата, шипи по краю зерна мало помітні.

**СЕМ.** Скульптура екзини шипувато-шипикувата (рис. 1, С, D). Шипи і шипики подібні за формою, з рівними або опуклими краями і гострою верхівкою. Шипи  $0,9\text{--}1,1$  мкм завв.,  $0,8\text{--}1,1$  мкм при основі, розташовані рідко; шипики  $0,2\text{--}0,3$  мкм завв.,  $0,3\text{--}0,4$  мкм при основі, більш чисельні; поверхня

між шипами шершава з рідко розташованими перфораціями. Борозні мембрани гранулярні (рис. 1, С).

А.М. Покровська (Pyltsevoy analiz, 1950), досліджуючи пилкові зерна *V. tuberosa*, відзначала, що вони мають характерну будову, яка відрізняє їх від таких у будь-якої іншої трав'яної рослини. Дослідниця надала схематичний рисунок пилоквих зерен *V. tuberosa*, який цілком узгоджується з нашими спостереженнями, за винятком типу апертур, які на рисунку показано як 3-борозно-орові з виразною округлою орою. Однак отримані нами дані та дослідження інших авторів (Clark, Jones, 1977; Kupriyanova, Aleshina, 1978; Diez, 1984) доводять, що тип апертур у *V. tuberosa* 3-борозний.

Отримані розміри пилоквих зерен *V. tuberosa* ми порівняли з такими з літературних джерел. Розміри пилку наведені як  $P = E = 56\text{--}59(60)$  мкм (Pyltsevoy analiz, 1950) як  $P = (54,0)55,2\text{--}57,6$  мкм,  $E = 58,8\text{--}61,2$  мкм (Kupriyanova, Aleshina, 1978), як  $P = 40\text{--}54$  мкм,  $E = 43\text{--}53$  мкм (Clark, 1977) та як  $P = 30\text{--}52$  мкм,  $E = 20\text{--}44$  мкм (Diez, 1984). За даними А.М. Покровської (Pyltsevoy analiz, 1950) і Л.А. Купріянової та Л.А. Альшиної (Kupriyanova, Aleshina, 1978), пилкові зерна мали більші розміри порівняно з такими, які наводили інші автори (Clark, 1977; Diez, 1984). Дослідження трьох зразків показали, що для *V. tuberosa* ( $39,9\text{--}61,18 \times 35,9\text{--}51,87$  мкм) характерні пилкові зерна середніх та великих розмірів. Можливо, деякі відмінності у розмірах пов'язані з різною методикою приготування препаратів і незначною вибіркою зразків. У пилку *V. tuberosa* висота шипів більш-менш дорівнює їхній ширині при основі, що добре спостерігається на СЕМ мікрофотографіях та узгоджується з даними інших дослідників (Clark, Jones, 1977).

На підставі порівняльного аналізу паліноморфологічних особливостей *V. tuberosa*, отриманих раніше (Pyltsevoy analiz, 1950; Clark, Jones, 1977; Kupriyanova, Aleshina, 1978; Diez, 1984), ми уточнили тип апертур, розмір пилоквих зерен та шипів, їхню форму та наявність шипиків і бородавок.

В ході критичного опрацювання літературних даних нами з'ясовано, що морфологічні особливості плодів представників роду *Valeriana* мають важливе значення для діагностики видів (Gorbunov, 1978, 2002, 2014; Vakulenko et al., 2016). Плід *V. tuberosa* (агредула) нижній, сухий, нерозкривний, із здерев'янілим ендокарпом, утворений трьома плодолистками, з яких один фертильний, подібний до плодів більшості

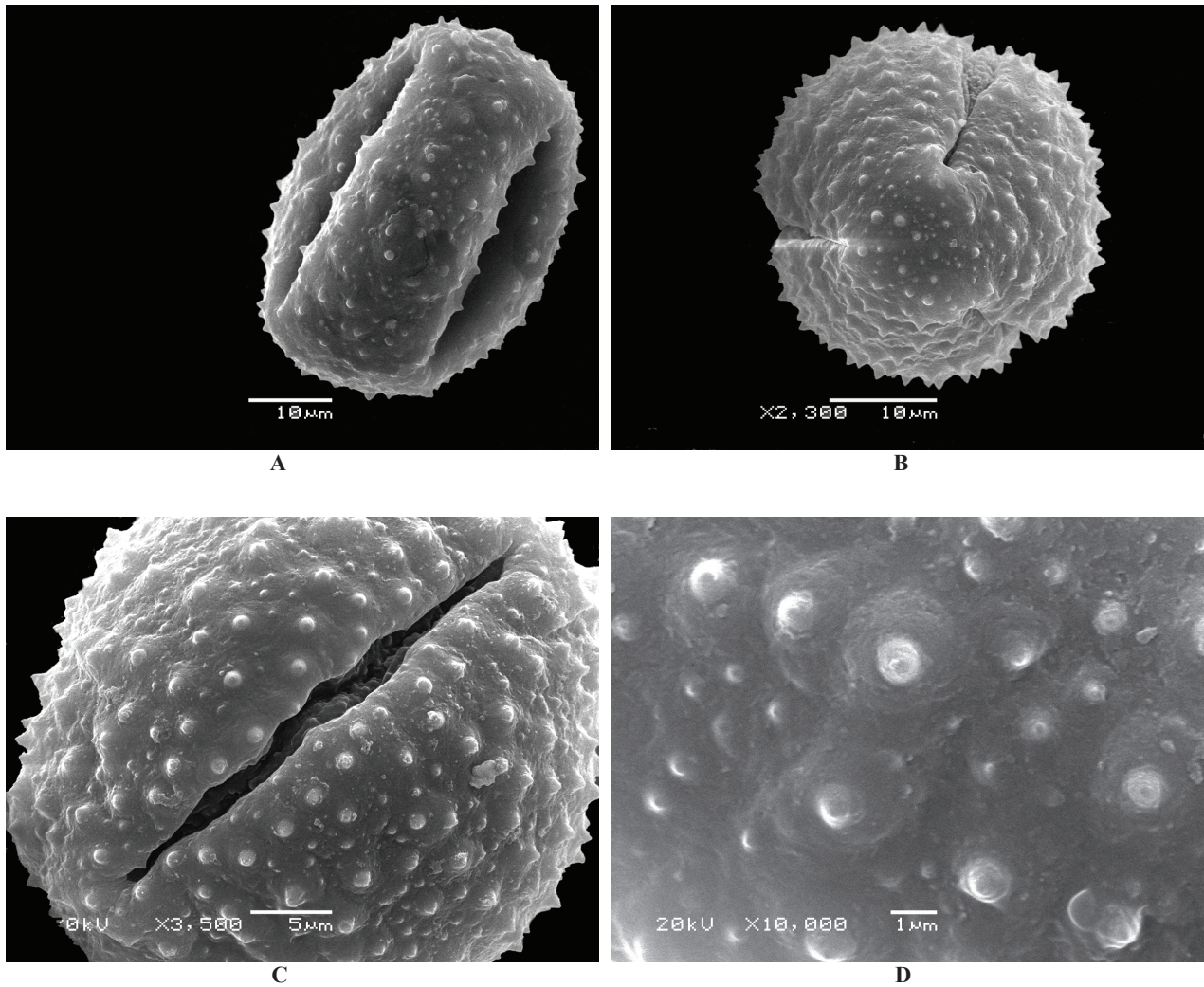


Рис. 1. Пилкові зерна *Valeriana tuberosa* (сканувальний електронний мікроскоп). А: вигляд з екватора; В: вигляд з полюса; С: борозна; D: скульптура екзини

Fig. 1. Pollen grains of *Valeriana tuberosa* (scanning electron microscopy). A: equatorial view; B: polar view; C: colpus; D: exine sculpture

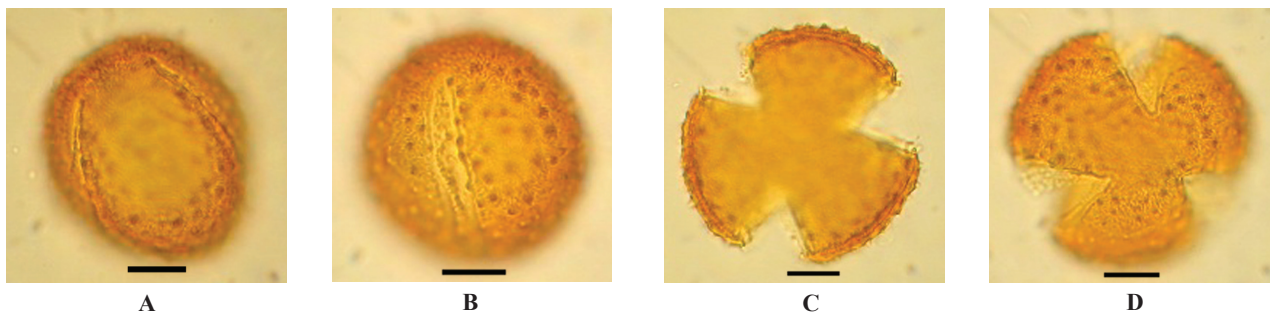


Рис. 2. Пилкові зерна *Valeriana tuberosa* (світловий мікроскоп). А, В: вигляд з екватора; В: борозна; С, D: вигляд з полюса. Масштабна лінійка: 10 мкм

Fig. 2. Pollen grains of *Valeriana tuberosa* (light microscopy). A, B: equatorial view; B: colpus; C, D: polar view. Scale bars: 10 μm

видів роду (Katina, 1961; Grubov, 1958; Plisko, 2000; Gorbunov, 1978, 2002). За зовнішньою формою він дещо сплюснутий, здебільшого видовженойцеподібний, 3,4–4,6 мм завд., 1,2–1,8 мм завш., за кольором тьмяно-коричневий. Верхівка плоду видовжена, основа заокруглена та дещо розширена, з ледь помітним заглибленням посередині, де розміщений карпоподіум з базальним плодовим рубчиком (рис. 3, А). На верхівці плоду розташована летючка, яка утворилася внаслідок розростання чашечки та перетворення її на білий пірчастий утвір – чубок, схожий на папус, з декількома довгими товстими шкірястими остями та численними волосоподібними виростами. Ці ості зросли між собою біля основи у вигляді плівчастої корони (рис. 3, В). У недозрілих плодів, як і у маточок квіток, ості з білими довгими м'якими волосками згорнуті донизу та розгортаються лише після дозрівання. На нижній поверхні плоду розташовано три ребра – центральне пряме, по боках від нього по одному дугоподібно зігнутому, на верхній – одне пряме. З обох боків плоду розвинена облямівка – виріст до 0,5 мм завш., він заповнений паренхімною тканиною з поздовжнім судинним пучком.

Поверхня плоду з верхнього та нижнього боків (за виключенням облямівки) опушена між ребрами, а інколи і по ребрах простими відстовбурченими жорсткими довгими (до 0,3–0,4 мм) стрічкоподібними, сплюсненими або трубчастими від основи та округлими на верхівці волосками (рис. 3, А–С, F).

Чубок 3,7–6,9 мм завд., з 8–11 остями. Ості опушені довгими стрічкоподібними, часто перекрученими, звивистими волосками. Рубчик округлий, білуватий, базальний (рис. 3, А, В).

Слід зазначити, що в літературних джерелах щодо роду *Valeriana* ми не знайшли інформації про мікроморфологічні особливості для плодів *V. tuberosa* (Grubov, 1958; Katina, 1961; Ockendon, 1976; Gorbunov, 1978, 2002, 2014; Voroshilov, 1978). Використання СЕМ у нашому дослідженні дозволило виявити суттєві ознаки мікроструктури поверхні плоду цього виду та вперше скласти її детальну характеристику. Поверхня плоду горбкувата, межі між клітинами чіткі; на ребрах та міжреберних ділянках клітини екзокарпію розташовані вздовж поздовжньої осі; на ребрах клітини довгасті, з опуклими зовнішніми периклінальними стінками, на міжреберних ділянках вони округлі, кутасті, з опуклими периклінальними стінками, з бородавчастими або штрихоподібними кутикулярними утворами. Антиклінальні стінки

прямі, округлі або хвилясті, деякі клітини екзокарпію мають сосочкоподібно видовжені утвори або представлені папілами до 30–40 мкм завв. На міжреберних ділянках розташовані продихи, замикаючі клітини яких мають гладеньку кутикулярну структуру поверхні та оточені радіально розміщеними п'ятьма-шістьма бічними клітинами, кутикулярна структура яких переважно струменястого типу, продихові щілини паралельні поздовжній осі плоду (рис. 3, D). Поверхня волосків має бородавчасті, штрихоподібні або видовжені утвори кутикули (рис. 3, F).

Таким чином, у результаті детального аналізу морфологічних особливостей суцвіття, елементів двостатевих квіток, пилкових зерен і плодів нами уточнено відомі літературні дані та для пилкових зерен і плодів виявлено нові специфічні ознаки *V. tuberosa*.

Уточнено тип апертур та розмір пилкових зерен *V. tuberosa*. Детальніший аналіз елементів скульптури екзини пилкових зерен з використанням СЕМ дозволив уточнити розмір і форму шипів та наявність шипиків і бородавок.

За допомогою СЕМ виявлено нові мікроморфологічні ознаки плодів, зокрема, вперше відзначено сосочкоподібні папілозні вирости периклінальних стінок екзокарпу з штрихоподібними, струменястими та бородавчастими кутикулярними утворами поверхні, описано особливості волосків, якими опушені плоди, специфіку кутикулярної структури їхньої поверхні та особливості продихового апарату екзокарпу.

## Висновки

За результатами аналізу комплексного морфологічного дослідження квіток, пилкових зерен і плодів *V. tuberosa*, складено їхні детальні характеристики, уточнено відомі та виявлено нові морфологічні особливості, які є важливими додатковими ознаками для точнішої ідентифікації виду та для їхнього подальшого використання у вирішенні питань таксономії та філогенії.

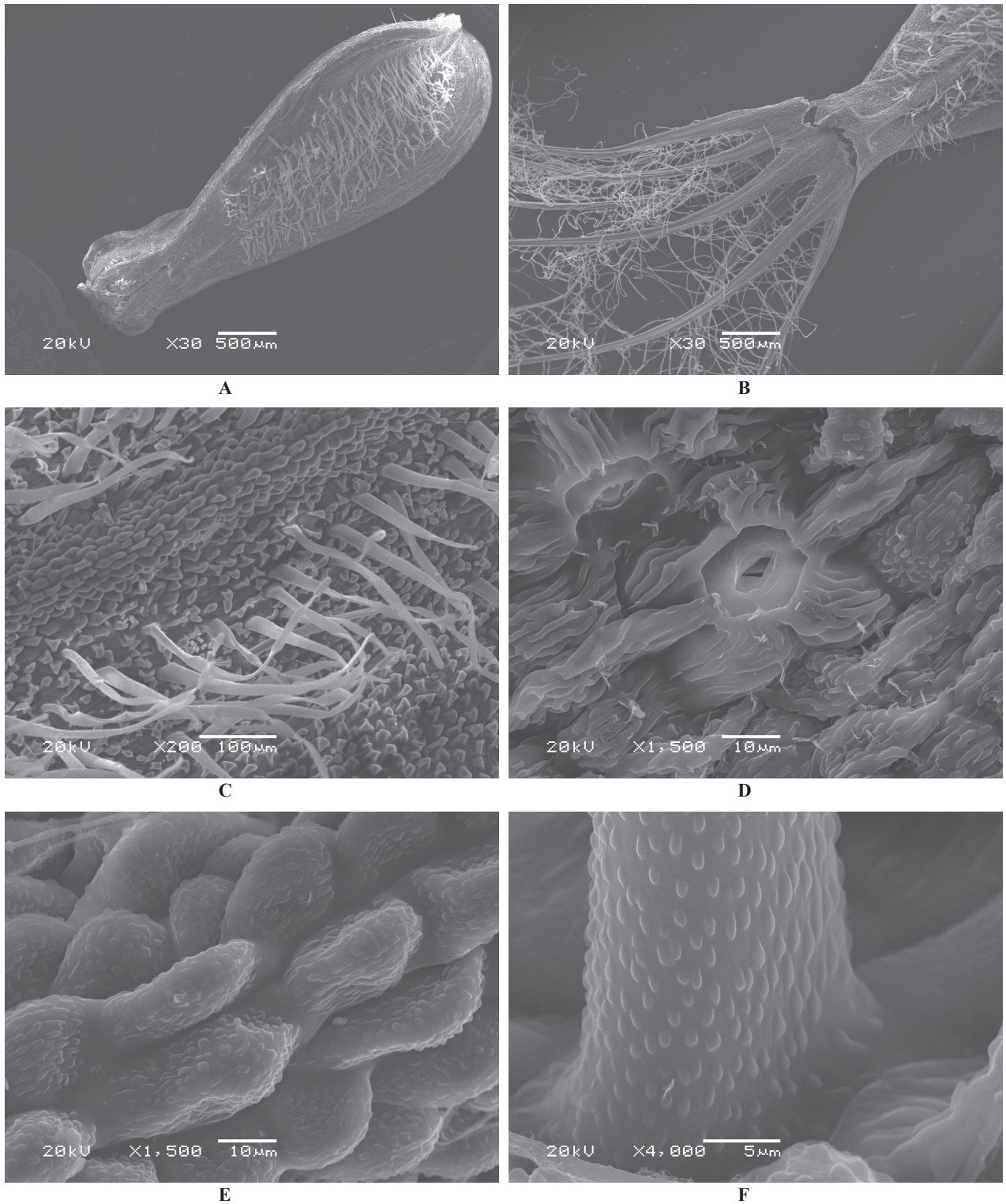


Рис. 3. Плоди *Valeriana tuberosa* (SEM). А: загальний вигляд; В: чубок; С: фрагмент поверхні з волосками; D: фрагмент поверхні з продином; Е: окремі клітини поверхні; F: поверхня волоска

Fig. 3. Fruits of *Valeriana tuberosa* (SEM). A: general view; B: pappus-like calyx; C: fragment of the surface with hairs; D: fragment of the surface with stoma; E: individual surface cells; F: surface of the hair

## Список послань

- Andrienko T.L., Peregrym M.M. 2012. *Official lists of regional rare plants of administrative territories of Ukraine (reference book)*. Kyiv: Alterpress, 148 pp. [Андрієнко Т.Л., Перегрим М.М. 2012. *Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України (довідкове видання)*. Київ: Альтерпрес, 148 с.].
- Artyushenko Z.T., Fedorov Al.A. 1986. *Atlas po opisatelnoy morfologii vysshikh rasteniy: Plod*. Leningrad: Nauka, 392 pp. [Артюшенко З.Т., Федоров Ал.А. 1986. *Атлас по описательной морфологии высших растений: Плод*. Ленинград: Наука, 392 с.].
- Barthlott W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany*, 1(3): 345–355.
- Bezusko L.G., Tsybalyuk Z.M. 2011. Palynothesca of the M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine. In: *Herbaria of Ukraine. Index Herbariorum Ucrainicum*. Ed. N.M. Shiyan. Kyiv: Alterpress, pp. 138–141. [Безузько Л.Г., Цимбалюк З.М. 2011. Палінотека Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. В кн.: *Гербарії України. Index Herbariorum Ucrainicum*. Ред. Н.М. Шиян. Київ: Альтерпрес, с. 138–141].
- Clarke G.C.S., Jones M.R. 1977. The Northwest European Pollen Flora: 16. *Valerianaceae*. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 24: 155–179. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(77\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0034-6667(77)90038-0)
- Diez M.J. 1984. Contribucion al atlas palinologico de Andalucia Occidental. V. *Valerianaceae*. *Anales de la Asociacion de Palinologos de Lengua Española (A.P.L.E.)*, 1: 49–58.
- Erdtman G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms*. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 539 pp.
- Fedorov Al.A., Artyushenko Z.T. 1975. *Atlas po opisatelnoi morfologii vysshikh rasteniy. Tsvetok*. Leningrad: Nauka, 350 pp. [Федоров Ал.А., Артюшенко З.Т. 1975. *Атлас по описательной морфологии высших растений. Цветок*. Ленинград: Наука, 350 с.].
- Gorbunov Yu.N. 1978. *Vyulleten Glavnogo botanicheskogo sada AN SSSR*, 108: 30–37. [Горбунов Ю.Н. 1978. Морфология плодов кавказских видов валерианы. *Бюллетень Главного ботанического сада АН СССР*, 108: 30–37].
- Gorbunov Yu.N. 2002. *Valeriany flory Rossii i sopredelnykh gosudarstv: Morfologiya, sistematika, perspektivy ispolzovaniya*. Moscow: Nauka, 207 pp. [Горбунов Ю.Н. 2002. *Валерианы флоры России и сопредельных государств: Морфология, систематика, перспективы использования*. Москва: Наука, 207 с.].
- Gorbunov Yu.N. 2014. *Karpologiya vidov roda Valeriana L. flory Rossii i sopredelnykh stran. Memorialnyi kadenovskiy sbornik*. Eds L.I. Lotova, A.K. Timonin. Moscow: MAKS Press, 248 pp. [Горбунов Ю.Н. 2014. *Карпология видов рода Valeriana L. флоры России и сопредельных стран. Мемориальный каденовский сборник*. Ред. Л.И. Лотова, А.К. Тимонин. Москва: МАКС Пресс, 248 с.].
- Grubov V.I. 1958. *Valeriana L*. In: *Flora URSS*, vol. 23. Moscow; Leningrad: Editio Acad. Sci. URSS, pp. 594–640. [Грубов В.И. 1958. *Valeriana L*. В кн.: *Флора СССР*, т. 23. Москва; Ленинград: Изд-во АН СССР, с. 594–640].
- Halbritter H., Ulrich S., Grímsson F., Weber M., Zetter R., Hesse M., Buchner R., Svojtka M., Frosch-Radivo A. 2018. *Illustrated Pollen Terminology*. Ed. 2. Cham, Switzerland: Springer International Publishing. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6>
- Jacobs B., Bell Ch., Smets E. 2010. Fruits and seeds of the *Valeriana* clade (*Dipsacales*): diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences*, 171(4): 421–434. <http://doi.org/10.1086/651243>
- Kaden N.N., Smirnova S.A. 1974. *K metodike sostavleniya karpologicheskikh opisaniy. Sostavlenie opredelitelnykh rasteniy po plodam i semenam*. Kiev: Naukova Dumka, pp. 54–67. [Каден Н.Н., Смирнова С.А. 1974. *К методике составления карпологических описаний. Составление определителей растений по плодам и семенам*. Киев: Наукова думка, с. 54–67].
- Katina Z.F. 1961. *Valeriana L*. In: *Flora URSS*, vol. 10. Kyiv: Editio Acad. Sci. URSS, pp. 314–337. [Катина З.Ф. 1961. *Valeriana L*. В кн.: *Флора УРСР*, т. 10. Київ: Вид-во АН УРСР, с. 314–337].
- Katina Z.F. 1987. *Valeriana L*. In: *Opredelitel vysshikh rasteniy Ukrainy*. Kiev: Naukova Dumka, pp. 251. [Катина З.Ф. 1987. *Valeriana L*. В кн.: *Определитель высших растений Украины*. Киев: Наукова думка, с. 251].
- Kupriyanova L.A., Aleshina L.A. 1978. *Pylytsa dvudolnykh rasteniy flory evropeyskoy chasti SSSR. Lamiaceae – Zygophyllaceae*. Leningrad: Nauka, 184 pp. [Куприянова Л.А., Алешина Л.А. 1978. *Пыльца двудольных растений флоры европейской части СССР. Lamiaceae – Zygophyllaceae*. Ленинград: Наука, 184 с.].
- Minarchenko V.M., Tymchenko I.A. 2002. *Atlas likarskykh roslyn Ukrainy (khorolohiya, resursy ta okhorona)*. Kyiv: Phytosociocentr, 172 pp. [Мінарченко В.М., Тимченко І.А. 2002. *Атлас лікарських рослин України (хорологія, ресурси та охорона)*. Київ: Фітосоціоцентр, 172 с.].
- Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. 1999. *Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist*. Kiev, xxiii + 345 pp.
- Ockendon D.J. 1976. *Valeriana L*. In: *Flora Europaea*, vol. 4. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 52–56.
- Plisko M.A. 2000. *Caprifoliaceae*. In: *Anatomia seminum comparativa. Dicotyledones. Rosidae II*, vol. 6. Ed. A.L. Takhtajan. St. Petersburg: Nauka, pp. 367–383. [Плиско М.А. 2000. *Caprifoliaceae*. В кн.: *Сравнительная анатомия семян. Двудольные. Rosidae II*, т. 6. Ред. А.Л. Тахтаджян. СПб: Наука, с. 367–383].
- Punt W., Hoen P.P., Blackmore S., Nilsson S., Le Thomas A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review*



- of *Palaeobotany and Palynology*, 143: 1–81. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>
- Pylytsevoy analiz*. 1950. Ed. A.N. Pokrovskaya. Moscow: Gos. izd-vo geol. lit., 571 pp. [*Пыльцевой анализ*. 1950. Гл. ред. А.Н. Покровская. Москва: Гос. изд-во геол. л-ры, 571 с.]
- Rankou H., Ouhammou A., Taleb M., Martin G. 2015. *Valeriana tuberosa*. The IUCN Red List of Threatened Species, e.T53785801A53798747. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T53785801A53798747.en>
- Takhtajan A.L. 1987. *Sistema magnoliofitov*. Leningrad: Nauka, 439 pp. [Тахтаджян А.Л. 1987. Система магнолиофитов. Ленинград: Наука, 439 с.]
- Takhtajan A. 2009. *Flowering Plants*. Ed. 2. New York: Springer-Verlag, 871 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9609-9>
- Tsybalyuk Z.M., Bezusko L.G., Mosyakin S.L., Nitsenko L.M. 2019a. *Ukrainian Botanical Journal*, 76(1): 9–23. [Цимбалюк З.М., Безусько Л.Г., Мосякін С.Л., Ниценко Л.М. 2019а. Паліноморфологія видів роду *Dipsacus* (*Dipsacaceae*) флори України: значення для цілей систематики та спорово-пилкового аналізу. *Український ботанічний журнал*, 76(1): 9–23]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj76.01.009>
- Tsybalyuk Z.M., Bezusko L.G., Nitsenko L.M. 2018. *Ukrainian Botanical Journal*, 75(3): 248–259. [Цимбалюк З.М., Безусько Л.Г., Ниценко Л.М. 2018. Паліноморфологічні особливості видів роду *Knautia* (*Dipsacaceae*) флори України: оцінка для цілей систематики та спорово-пилкового аналізу. *Український ботанічний журнал*, 75(3): 248–259]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.03.248>
- Tsybalyuk Z.M., Mosyakin S.L., Nitsenko L.M. 2019b. Taxonomic significance of pollen morphology in *Succisa* and *Succisella*. *Biodiversity Research and Conservation*, 55: 1–6. <https://doi.org/10.2478/biorc-2019-0010>
- Vakulenko T.B., Loya V.V., Kayutkina T.M. 2016. In: *Vital issues of the carpatian flora research: Retrospective and present state*. Uzhhorod, pp. 18–19. [Вакуленко Т.Б., Лоя В.В., Каюткіна Т.М. 2016. Діагностичне значення карпологічних ознак деяких видів роду *Valeriana* L. У зб.: *Vital issues of the carpatian flora research: Retrospective and present state* (Ужгород, 8–9 грудня 2016 р.). Ужгород, с. 18–19].
- Voroshilov V.N. 1978. *Valeriana* L. In: *Flora Evropeyskoy chasti SSSR*, vol. 3. Leningrad: Nauka, pp. 32–36. [Ворошилов В.Н. 1978. *Valeriana* L. В кн.: *Флора Европейской части СССР*, т. 3. Ленинград: Наука, с. 32–36].
- Zyman S.M., Mosyakin S.L., Bulakh O.V. 2004. *Illustrated guide to the morphology of flowering plants*. Uzhhorod: Medium, 156 pp. [Зиман С.М., Мосякін С.Л., Булах О.В. 2004. *Ілюстрований довідник з морфології квіткових рослин*. Ужгород: Медіум, 156 с.]

Рекомендує до друку М.М. Федорончук



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.05.378>

## Целюлази базидієвих грибів для розробки технологій біоконверсії клітковини

Сергій М. БОЙКО

ДУ "Інститут еволюційної екології НАН України"  
вул. Академіка Лебедєва 37, Київ 03143, Україна  
[bsmbio@gmail.com](mailto:bsmbio@gmail.com)

Boiko S.M. 2020. Cellulases of basidiomycetes for the development of cellulose bioconversion technologies. *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 378–385.

Institute for Evolutionary Ecology, National Academy of Sciences of Ukraine  
37 Acad. Lebedeva Str., Kyiv 03143, Ukraine

**Abstract.** Basidiomycetes cultures were screened for the ability to actively express the cellulases complex. Nutrient media with various forms of sugars were used. From 22 cultures of macromycetes (14 species), a group of six cultures with high level activities of extracellular (Il-11 *I. lacteus* – 70 IU, FvV *F. velutipes* – 78 IU, Pe-1 *P. eryngii* – 87 IU, Ps-1 *L. sulphureus* – 83 IU, Mg *M. giganteus* – 74 IU) and intracellular (Sc-51 *S. commune* – 102 IU) cellulase complex was selected. Cultures of the species exhibit notable differences in the expression of enzymes, which indicates a significant influence of genetic factors on the process of producer selection. Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases isozymes for most fungi had a molecular weight of 55 kDa and above, except for *S. commune*, which had more variability of conformation and weight 12–55 kDa. The culture of Il-11 *I. lacteus* on media with Avicel and filter paper had the highest activity, its endo- and exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases activities ranged 37–39 IU/mL and 18–20 IU/mL, respectively. The culture of *S. commune* Sc-51 is able to accumulate a significant amount of intracellular cellulases, but the production of culture fluid with high viscosity complicates technological manipulations and increases processing time. The obtained data allowed us to isolate an Il-11 *I. lacteus* culture with stable expression and high activity of the cellulases complex at different carbon sources.

**Keywords:** Basidiomycota, cellulases, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, expression

Submitted 23 May 2020. Published 31 October 2020

Бойко С.М. 2020. Целюлази базидієвих грибів для розробки технологій біоконверсії клітковини. *Український ботанічний журнал*, 77(5): 378–385.

**Реферат.** Проведено скринінг культур базидієвих грибів на здатність до активної експресії целюлазного комплексу. Культивування відбувалось на поживних середовищах із вмістом цукрів різних форм. З 22 штамів макроміцетів (14 видів) було виділено групу з шести культур, що мали високі показники активності позаклітинного (*Irpex lacteus* Il-11 – 70 IU, *Flammulina velutipes* FvV – 78 IU, *Pleurotus eryngii* Pe-1 – 87 IU, *Laetiporus sulphureus* Ps-1 – 83 IU, *Meripilus giganteus* Mg – 74 IU) та внутрішньоклітинного (*Schizophyllum commune* Sc-51 – 102 IU) комплексу целюлаз. Встановлено, що культури одного виду мають значні відмінності у процесах експресії ензимів, що свідчить про суттєвий вплив генетичного фактору – це потрібно враховувати при доборі продуцента. Ізоферменти ендо-1,4- $\beta$ -D-глюканази для більшості грибів мали молекулярну масу від 55 kDa і вище, окрім культур *S. commune*, для яких характерна більша варіабельність форм та маса 12–55 kDa. На середовищах із вмістом мікрокристалічної целюлози Avicel і фільтрувальним папером найбільшу активність мала культура *I. lacteus* Il-11, її ендо- та екзоглюканазна активності становили 37–39 IU/мл та 18–20 IU/мл відповідно. Культура *S. commune* Sc-51 здатна накопичувати значну кількість внутрішньоклітинних целюлаз, однак утворення культуральної рідини з високою в'язкістю суттєво ускладнює та збільшує тривалість технологічних маніпуляцій. Отримані дані дозволили виділити перспективний продуцент – культуру *I. lacteus* Il-11, що демонструє стабільну експресію та високу активність целюлазного комплексу за різних джерел вуглецю.

**Ключові слова:** Basidiomycota, експресія, ендо-1,4- $\beta$ -D-глюканаза, екзо-1,4- $\beta$ -D-глюканаза, целюлази

## Вступ

Целюлоза – головний полімерний компонент рослинної стінки клітини, є найпоширенішим полісахаридом та важливим поновлюваним ресурсом. Її хімічний склад є простим, складається із залишків D-глюкози, пов'язаних  $\beta$ -1,4-глікозидними зв'язками. Перетворення лігноцелюлозної біомаси є багатоетапним процесом, що включає попередню обробку (механічну, хімічну або біологічну), ферментативний гідроліз, процес бродіння. На рис. 1 представлені шляхи отримання різних біотехнологічних продуктів з лігноцелюлозної біомаси.

Постійно зростаючі витрати на викопне паливо та парниковий ефект вимагають пошуку альтернативних дешевших та більш екологічно безпечних біопаливних ресурсів (Himmel et al., 2007; Gaurav et al., 2017). Один з потенційних методів виробництва біоетанолу полягає у використанні лігноцелюлозної біомаси, яку попередньо перетворюють на прості цукри (Sharma et al., 2018). Такий ферментативний гідроліз є ефективним та економічним методом і крім рН, температури, залежить від субстрату й активності ферментів (Wyman, 1999).

Існує ринковий попит на целюлази, адже витрати на цей клас ферментів суттєво впливають на виробництво етанолу (40–49% від чистої продукції) (Hahn-Hagerdal et al., 2006). На сьогодні комерційні целюлази виробляються переважно з

грибів *Aspergillus* sp. і *Trichoderma* sp. (*Ascomycota*) (Singhania et al., 2010).

Базидіоміцети здатні синтезувати ферменти, які каталізують розпад складних біополімерів – целюлозу, геміцелюлозу, лігнін, пектинові речовини (Floudas et al., 2012). Здатність до продукування целюлазних комплексів вищими базидіальними грибами у значній мірі пов'язана з генетичною (штамовою) різноманітністю, а експресія в основному індукується наявним субстратом (Xiao et al., 2013; Voiko, 2018). Інформація про властивості ферментних систем базидіальних грибів дає можливість розглядати останні як складову частину комплексного біотехнологічного процесу.

Метою дослідження було проведення скринінгу культур певних базидієвих грибів на здатність до активного синтезу целюлаз та визначення штамів з високим потенціалом експресії целюлазного комплексу.

## Матеріали та методи

**Об'єкти досліджень.** Для первинного скринінгу використовували 22 культури базидієвих грибів 14 видів, які зберігаються в колекції культур грибів Інституту еволюційної екології НАН України (A-7 – *Auricularia auricula* Underw.; Cs-1 – *Coriolus sinuosus* Bondartsev & Singer; Fvv – *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer; Gl – *Ganoderma lucidum* (Curtis)

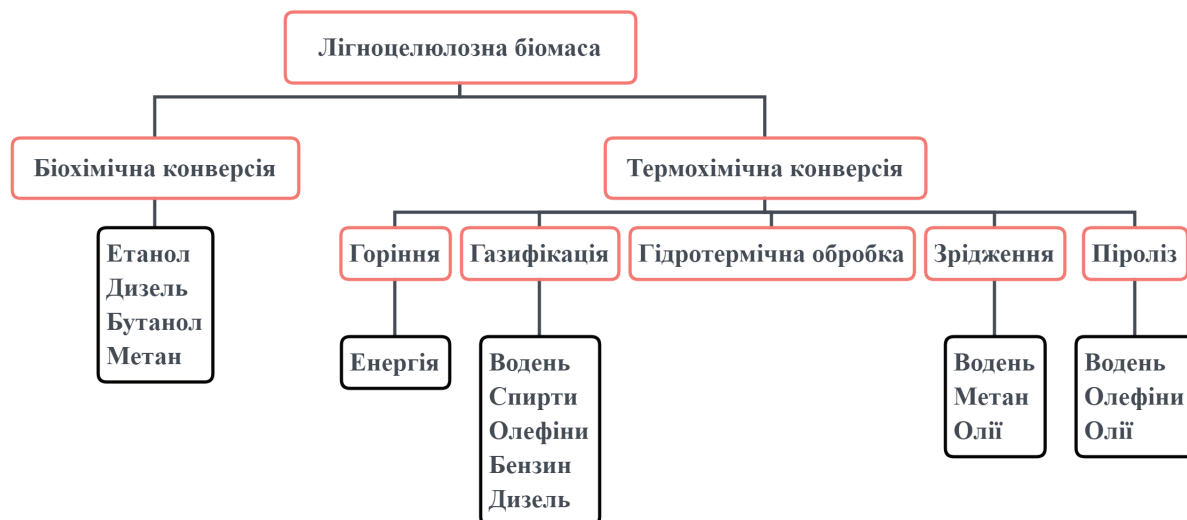


Рис. 1. Термомеханічна та біохімічна переробка лігноцелюлозної біомаси в різні біотехнологічні продукти

Fig. 1. Thermomechanical and biochemical processing of lignocellulosic biomass into various biotechnological products

P.Karst.; Il-11, Il-15, Il-20 – *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.; Ps-1 – *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill; Mg – *Meripilus giganteus* P.Karst.; Pe-1 – *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél.; Po-3, Po-5, P191 – *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm; Rs-1 – *Ramaria stricta* Quél.; Sc-51, Sc-51-5, Sc-89 – *Schizophyllum commune* Fr.; Sh1-4 – *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.; Tk-1, Tv-13, Tvсв – *Trametes versicolor* (L.) Lloyd; Tb-33 – *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden).

**Підготовка інокулята.** Культури вирощували на агаризованому поживному середовищі такого складу (г/л): агар – 9, глюкоза – 5, крохмаль – 5, пептон – 3. Після 7 денного культивування отриманий міцелій використовували для інокуляції рідкого поживного середовища.

**Культивування базидіоміцетів.** Гриби культивували в стаціонарних умовах на рідких середовищах. Використовували поживні середовища такого складу (г/л):

1) модифіковане глюкозо-пептонне середовище (№ 1):  $K_2HPO_4$  – 0,4;  $KH_2PO_4$  – 0,6;  $MgSO_4 \times H_2O$  – 0,5;  $ZnSO_4 \times H_2O$  – 0,001;  $CaCl_2$  – 0,05; пептон – 3, глюкоза – 3; Na-карбоксиметилцелюлоза – 3;

2) модифіковане середовище Чапека (№ 2):  $NaNO_3$  – 2,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $KCl$  – 0,5;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,01; фільтрувальний папір – 8,0.

Поживне середовище розливали по 25 мл у конічні колби об'ємом 100 мл, кислотність доводили до pH 5,0, температура культивування становила 28 °C.

**Визначення вмісту білків.** Концентрацію білків визначали спектрофотометричним методом на приладі Ulab-131UV з використанням формули:  $C_{\text{мг/мл}} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$ , де  $A_{280}$  – оптична густина розчину при  $\lambda = 280$  нм,  $A_{260}$  – оптична густина розчину при  $\lambda = 260$  нм (Stoscheck, 1990).

**Визначення активності целюлаз.** Активність ферментів целюлозолітичного комплексу визначали по відношенню до таких субстратів: загальна целюлозолітична активність (FP) – фільтрувальний папір (Whatman № 1, щільність 80 г/м<sup>2</sup>), ендо-1,4-β-D-глюканазна активність (endo-) – Na-карбоксиметилцелюлоза, екзо-1,4-β-D-глюканазна активність (exo-) – мікрокристалічна целюлоза Avicel PH-101 (Eveleigh et al., 2009). Склад реакційних сумішей при визначенні ферментативної активності та умови проведення реакцій відповідали рекомендаціям IUPAC (Ghose, 1987) та загальноприйнятим методикам (Eveleigh et al., 2009). За одиницю ферментативної активності (international units – IU) приймали утворення 1 мкмоль

редуючих цукрів (для полімерних субстратів) протягом 1 хв за температури 40 °C при додаванні 1 мл культурального фільтрату. Залишки редуруючих вуглеводів визначали методом Сомоджи-Нельсона (Somogyi, 1952), питому ферментативну активність (specific international units – spIU) – відношенням загальної ферментативної активності до вмісту білків у культуральному фільтраті.

#### **Електрофорез ферментних препаратів.**

Електрофоретичне розділення ферментної суміші целюлаз здійснювали у 11,25%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) з використанням трис-гліцинової буферної системи (pH 8,3). Для детекції ендо-1,4-β-D-глюканаз після електрофорезу гель, що містив Na-КМЦ, витримували впродовж 30 хв у 0,1 М ацетатному буфері за температури 50 °C. Надалі його забарвлювали, використовуючи 0,1% розчин Конго червоний. Для встановлення молекулярної маси білків використовували набір PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas – Thermo Scientific). Гель-документування здійснювали за допомогою системи AlphaImager 2200 (Alpha Innotech).

**Статистична обробка.** Всі експерименти мали трикратну повторність. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням дисперсійного аналізу та методу порівняння середніх.

## **Результати та обговорення**

Дослідження росту базидіоміцетів за наявності в середовищі целюлози або простих цукрів не привели науковців до єдиної думки відносно індуктивного або конститутивного механізмів синтезу целюлаз. Речовини, що виконують функції індукторів, регулюють швидкість синтезу "індукованих" ферментів, а швидкість синтезу "конститутивних" ферментів не залежить від наявності індукторів у живильному середовищі. Вірогідним індуктором біосинтезу целюлаз у грибів може бути целобіоза – продукт розкладання нерозчинного субстрату, що містить β-1,4-глюкозидний зв'язок. Припускають, що у вищих базидіоміцетів постійно існує деяка "базова" активність целюлаз, яка забезпечує початковий гідроліз целюлози в середовищі з появою невеликої кількості розчинних продуктів. Унаслідок цього процесу утворюється необхідна початкова кількість целобіози (або інших низькомолекулярних сполук, що мають β-глікозидний зв'язок), достатня для початку індукованого біосинтезу. Зважаючи на це,

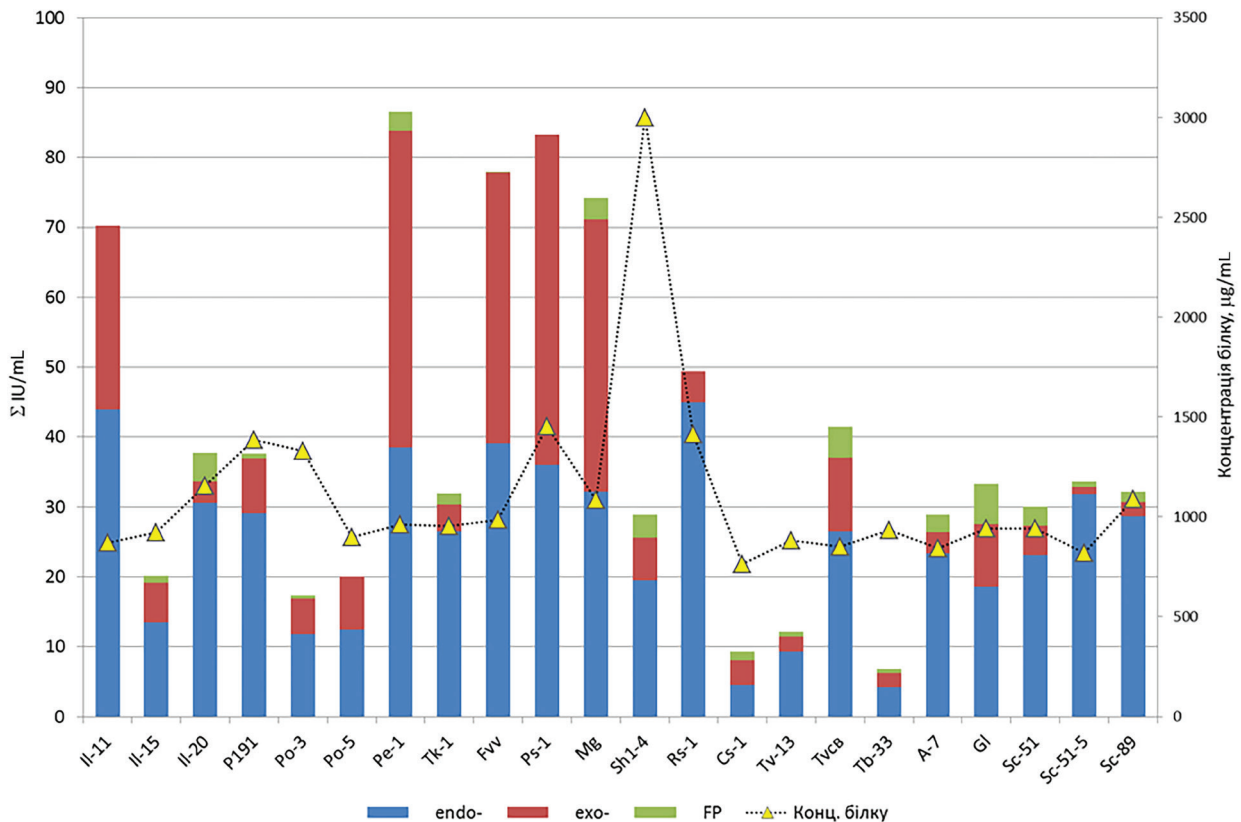


Рис. 2. Сумарна активність позаклітинних целюлаз культур базидієвих грибів. Тут і далі на рисунках позначено: "endo-": ендо-1,4-β-D-глюканазна активність; "exo-": екзо-1,4-β-D-глюканазна активність; "FP": загальна целюлозолітична активність

A-7 – *Auricularia auricula*; Cs-1 – *Coriolus sinuosus*; Fvv – *Flammulina velutipes*; G1 – *Ganoderma lucidum*; Il-11, Il-15, Il-20 – *Irpex lacteus*; Ps-1 – *Laetiporus sulphureus*; Mg – *Meripilus giganteus*; Pe-1 – *Pleurotus eryngii*; Po-3, Po-5, P191 – *Pleurotus ostreatus*; Rs-1 – *Ramaria stricta*; Sc-51, Sc-51-5, Sc-89 – *Schizophyllum commune*; Sh1-4 – *Stereum hirsutum*; Tk-1, Tv-13, Tvcv – *Trametes versicolor*; Tb-33 – *Trichaptum bifforme*

Fig. 2. A graph of extracellular cellulase activity of basidiomycetes ("endo-": endo-1,4-β-D-glucanase activity; "exo-": exo-1,4-β-D-glucanase activity; "FP": total cellulase activity)

до складу поживних середовищ було включено як прості цукри, так і полімерні форми (Ha et al., 2011).

Первинний скринінг культур на здатність до синтезу комплексу целюлаз проводили на середовищі № 1 протягом 10 діб. Усі сапротрофні гриби утворювали добре розвинений поверхневий і занурений міцелій та синтезували позаклітинні целюлази (рис. 2).

Серед дослідних культур було виділено групу із дуже високими сумарними показниками активності ферментів, а саме: *I. lacteus* (Il-11 – 70 IU), *F. velutipes* (Fvv – 78 IU), *P. eryngii* (Pe-1 – 87 IU), *M. giganteus* (Mg – 74 IU), *L. sulphureus* (Ps-1 – 83 IU). Висока активність кожного ензиму комплексу целюлаз дозволяє грибу швидше та ефективніше гідролізувати природні полімери та отримувати вуглеводи.

При цьому звертає на себе увагу помірний рівень концентрації білка в межах 900–1080 µg/mL (окрім Ps-1 *L. sulphureus* – 1450 µg/mL), що в цілому свідчить про високий рівень питомої целюлазної активності. Можна відзначити, що культури одного виду мають значні відмінності в процесах експресії ензимів, а це свідчить про суттєвий вплив генетичного фактора, тому необхідно це враховувати під час добору продуцента. Найвно це проілюстровано на рис. 3. Спостерігається візуальна різниця патернів у представників виду *I. lacteus* та *T. versicolor*. Для більшості дослідних грибів ізоферменти ендо-1,4-β-D-глюканази мають молекулярну масу від 55 kDa і вище, окрім представників *S. commune*,

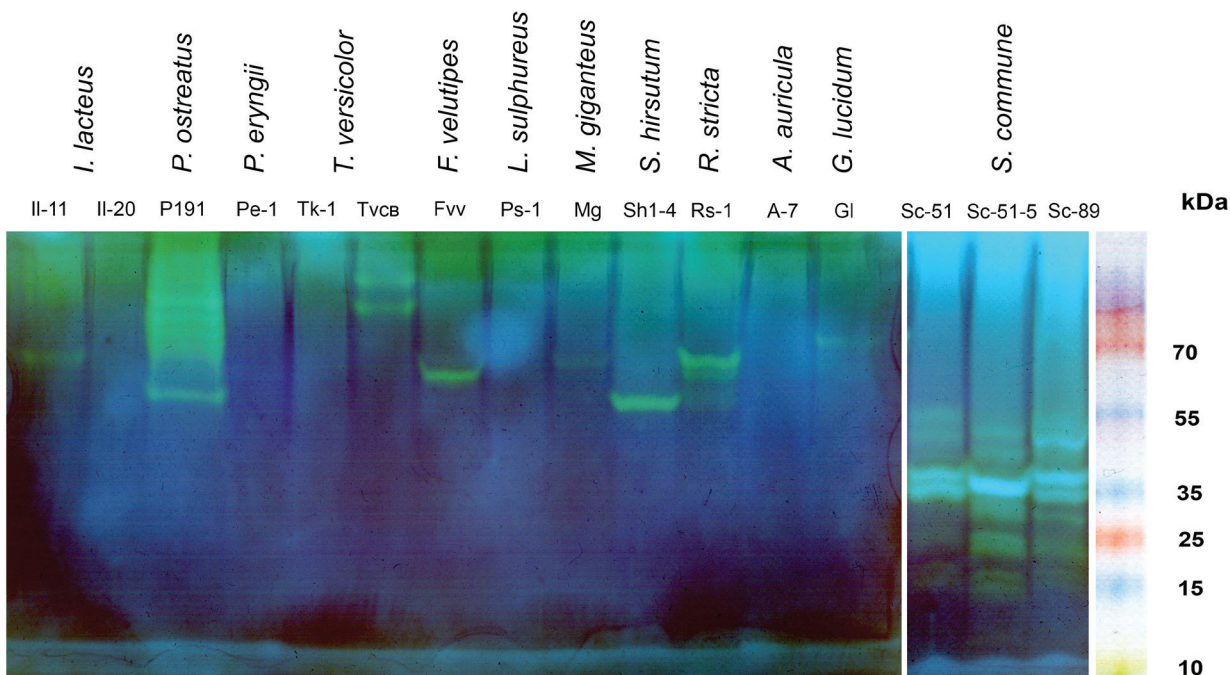


Рис. 3. Електрофореграма позаклітинних ендо-1,4-β-D-глюканаз культур базидіальних грибів  
 Fig. 3. The electrophoregram of extracellular endo-1,4-β-D-glucanases of basidiomycetes

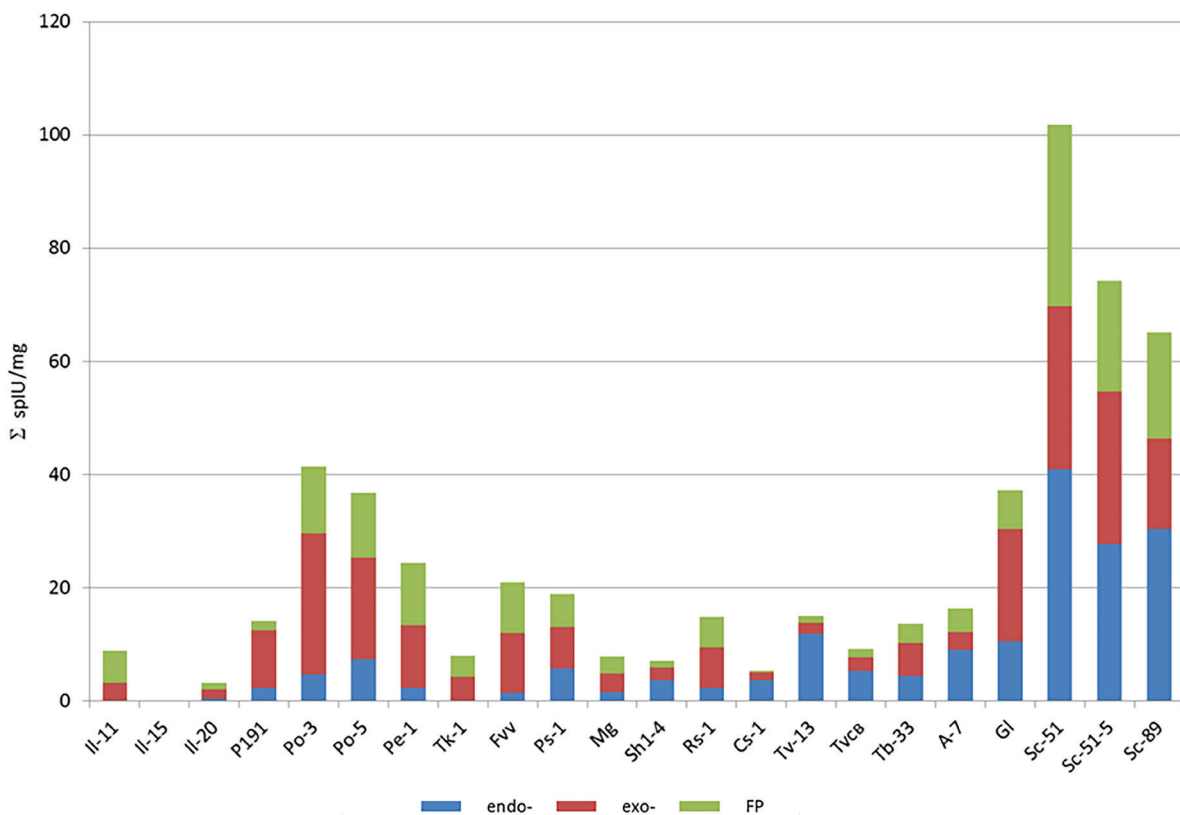


Рис. 4. Питома активність внутрішньоклітинних целюлаз культур базидіальних грибів  
 Fig. 4. Specific activity of intracellular cellulases of basidiomycetes

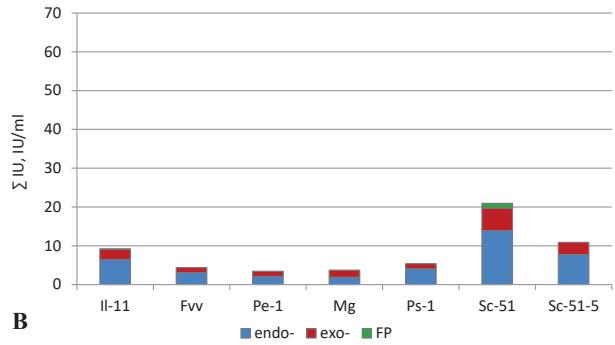
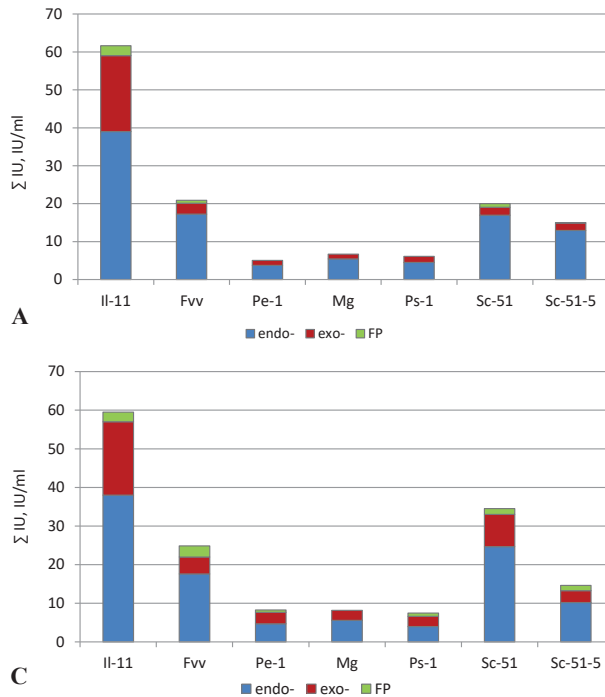


Рис. 5. Активність позаклітинних целюлаз базидієвих грибів за різних джерел вуглецю (А: мікрокристалічна целюлоза Avicel; В: висівки пшениці; С: фільтрувальний папір)

Fig. 5. The activity of extracellular cellulases of basidiomycetes at various carbon sources in the nutrient medium (A: Avicel; B: bran; C: filter paper)

які відрізняються варіабельністю ізоформ і масою 12–55 kDa.

Враховуючи можливу перспективу застосування культур у біотехнологічних процесах, було досліджено рівень накопичення внутрішньоклітинних целюлаз. Попередньо за низьких температур проводили гомогенізацію промитого міцелію та водне екстрагування білків із подальшим очищенням від залишків міцелію методом високошвидкісного центрифугування (3000 g). Отримані екстракти було перевірено на активність внутрішньоклітинних целюлаз (рис. 4). Встановлено, що загалом рівень їхньої активності поступався рівню позаклітинних (див. рис. 2). Однак для культур *P. ostreatus* Po-3, Po-5, *G. lucidum* G1 він був вищим, а для культур *S. commune* Sc-51 (102 IU/мг), Sc-51-5 (73 IU/мг), Sc-89 (64 IU/мг) – значно вищим за активності позаклітинних форм. Якщо у позаклітинних целюлаз у більшості превалювала активність ендо-1,4-β-D-глюканаз, то для внутрішньоклітинних целюлаз – активність екзо-1,4-β-D-глюканаз. Звертає увагу більш збалансована активність різних целюлаз у представників *S. commune* (рис. 4).

З досліджених нами 22 культур макроміцетів було виділено групу з шести культур з високими показниками позаклітинного (Il-11 – *I. lacteus*; Fvv –

*F. velutipes*; Pe-1 – *P. eryngii*; Ps-1 – *L. sulphureus*; Mg – *M. giganteus*) та внутрішньоклітинного (Sc-51 – *S. commune*) комплексу целюлаз. Надалі ці культури вирощували на середовищі № 2 з додаванням різних джерел вуглецю (мікрокристалічна целюлоза Avicel, висівки пшениці, фільтрувальний папір) з метою оцінки стабільності синтетичної діяльності (рис. 5).

За активністю целюлаз вирізнялася серед інших культура *I. lacteus* Il-11, її ендо- та екзоглюканазна активності становили 37–39 IU/мл і 18–20 IU/мл відповідно на середовищах з Avicel і фільтрувальним папером (рис. 5 A, C). Слід зазначити, що культура *I. lacteus* Il-11 порівняно з іншими дослідними культурами швидко деструктувала фільтрувальний папір, що свідчить про інтенсивну експресію целюлаз.

Невисока загалом активність целюлаз на середовищі з висівками зумовлена, на нашу думку, високим вмістом лігніну, який захищає клітковину від дії ферментів, і для руйнації якого необхідна активність додаткових ферментних систем (Jorgensen et al., 2007; Padhiar et al., 2010). Відповідно до роботи (Zhu et al., 2016), гриб *Schizophillum commune* має в своєму генетичному арсеналі подібні ферментні системи, що ми і спостерігаємо у вигляді найбільшої сумарної активності целюлаз (рис. 5, B).

## Висновки

Таким чином, з шести культур базидіальних грибів можна виділити дві (П-11 *I. lacteus* та Sc-51 *S. commune*), які спроможні синтезувати комплекс целюлаз на високому рівні. Культура *S. commune* Sc-51 здатна накопичувати значну кількість внутрішньоклітинних целюлаз, що робить її привабливою для застосування в технологічних процесах, однак утворення культуральної рідини з високою в'язкістю суттєво ускладнює технологічні маніпуляції та збільшує тривалість їхнього проведення.

Виділені нами штами показують значення активності целюлаз, які не поступаються активностям комерційних культур *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, а іноді й перевищують їх (Juhasz et al., 2004; Kang et al., 2004). Подальша оптимізація режиму культивування надасть можливість значно збільшити рівень експресії целюлаз загалом.

Культура *I. lacteus* П-11 демонструє стабільну експресію та високу активність целюлазного комплексу за різних джерел вуглецю, що дає можливість розглядати її як перспективний продуцент.

## Список посилань

- Boiko S.M. 2018. Pool of endoglucanase genes in *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (*Basidiomycetes*) on the territory of Ukraine. *Acta Biologica Szegediensis*, 62(1): 53–59. <https://doi.org/10.14232/abs.2018.1.53-59>
- Eveleigh D.E., Mandels M., Andreotti R., Roche C. 2009. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2: 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>
- Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R.A., Henrissat B., Martinez A.T., Otilar R., Spatafora J.W., Yadav J.S., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P.M., de Vries R.P., Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Gyrecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J. A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kües U., Kumar T.K.A., Kuo A., LaButti K., Larrondo L.F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D.J., Morgenstern I., Morin E., Murat C., Nagy L.G., Nolan M., Ohm R.A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Duecas F.J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J.C., St. John F., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D.C., Martin F., Cullen D., Grigoriev I.V., Hibbett D.S. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 336(6089): 1715–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Gaurav N., Sivasankari S., Kiran G.S., Ninawe A., Selvin J. 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73: 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>
- Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activity. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2): 257–268.
- Ha S.J., Galazka J.M., Kim S.R., Choi J.H., Yang X., Seo J.H., Glass N.L., Cate J.H.D., Jin Y.S. 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2): 504–509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010456108>
- Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Liden G., Zacchi G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12): 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>
- Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., Foust T.D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813): 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Jorgensen H., Kristensen J.B., Felby C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1: 119–134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Juhasz T., Szengyel Z., Szijártó N., Réczey K. 2004. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116(2): 201–211. <https://doi.org/10.1385/abab:113:1-3:201>
- Kang S.W., Park Y.S., Lee J.S., Hong S.I., Kim S.W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91(2): 153–156. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00172-x](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00172-x)
- Padhiar A., Albert S., Nagadesi P.K., Arya A. 2010. Lignin degradation by *Flavodon flavus* (Klotzsch.) Ryv. and *Schizophyllum commune* Fr. on *Mangifera indica* and *Syzygium cumini* woods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30(2): 129–139. <https://doi.org/10.1080/02773810903207770>
- Sharma D., Sud A., Bansal S., Mahajan R., Sharma B.M., Chauhan R.S., Goel G. 2018. Endocellulase production by *Cotyledonia pannosa* and its application in saccharification of wheat bran to bioethanol. *BioEnergy Research*, 11(2): 219–227. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9890-z>
- Singhania R.R., Sukumaran R.K., Patel A.K., Larroche C., Pandey A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7): 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 70(6): 17–23.
- Stoscheck C.M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50–69.



- Wyman C.E. 1999. Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*, 24: 189–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.24.1.189>
- Xiao L.P., Shi Z.J., Bai Y.Y., Wang W., Zhang X.M., Sun R.C. 2013. Biodegradation of lignocellulose by white-rot fungi: structural characterization of water-soluble hemicelluloses. *BioEnergy Research*. 6: 1154–1164. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9302-y>
- Zhu N., Liu J., Yang J., Lin Y., Yang Y., Ji L., Li M., Yuan H. 2016. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*, 9: 42. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0461-x>

Рекомендує до друку М.М. Сухомлин

# Gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase from the mature sporocarps of common aquatic ferns: partial purification and basic characterization of this enzyme from *Marsilea minuta* (*Polypodiopsida*)

Shankha Shubhra GHOSH<sup>1</sup>, Madhushri DAS<sup>2</sup>, Sautrik BASU<sup>1\*</sup>, Jukta ADHIKARI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Post Graduate Department of Botany, Barasat Government College  
Barasat 700124, West Bengal, India

<sup>2</sup>Department of Botany, Hiralal Mazumdar Memorial College for Women  
Dakshineswar, Kolkata 700 035, West Bengal, India

\*[basusautrik@yahoo.co.in](mailto:basusautrik@yahoo.co.in)

---

Ghosh S.S., Das M., Basu S., Adhikari J. 2020. **Gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase from the mature sporocarps of common aquatic ferns: partial purification and basic characterization of this enzyme from *Marsilea minuta* (*Polypodiopsida*).** *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 386–397.

**Abstract.** The present communication reports substantial activity of gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase; EC 3.1.3.11) in three common heterosporous aquatic ferns (*Marsilea minuta*, *Salvinia natans*, and *Azolla pinnata*) and also describes a protocol for its partial purification from mature sporocarps of *Marsilea minuta*. The cytosolic FBPase, obtained from *Marsilea minuta*, *Salvinia natans*, and *Azolla pinnata* was recognized as gluconeogenic enzyme due to its drastic catabolic inactivation in presence of externally administered glucose and its insensitivity towards photosynthetic light illumination. Cytosolic gluconeogenic FBPase was partially purified from mature sporocarps of *Marsilea minuta* to about 22-fold over homogenate following low-speed centrifugation (11, 400 × g), 30–80% ammonium sulfate fractionation followed by subsequent chromatography using matrices like CM-Cellulose, Sephadex G-200, and Ultrogel AcA 34. The profile of partially purified FBPase in PAGE under non-denaturing condition was recorded. The enzyme activity increased linearly with respect to protein concentration to about 100 µg and with respect to time up to 75 minutes. Temperature optimum was found at 35 °C. The effect of substrate concentration and kinetic analyses for FBPase were carried out using D-fructose-1,6-bisphosphate (D-FBP, the substrate) in the range of 0.0 to 1.0 mM at an interval of 0.1 mM concentration. The  $K_m$  value for D-FBP of FBPase was 0.06129 mM and  $V_{max}$  was 4525 nmole P<sub>i</sub> released (mg)<sup>-1</sup> protein h<sup>-1</sup> as determined by nonlinear regression kinetics using Prism 8 software (Graph Pad). The enzyme was functional in a constricted pH range of 7.0 to 8.0, giving maxima at pH 7.5. This cytosolic enzyme was significantly stimulated by Mg<sup>2+</sup> and strongly inhibited by Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>.

**Keywords:** aquatic fern, enzyme purification and characterization, FBPase, gluconeogenesis, sporocarp

Submitted 01 June 2020. Published 31 October 2020

Гош С.С.<sup>1</sup>, Дас М.<sup>2</sup>, Басу С.<sup>1</sup>, Адікарі Ю.<sup>1</sup> 2020. Глюконеогенна фруктозо-1,6-бісфосфатаза зрілих спорокарпів звичайних видів водяних папоротей: часткове очищення та основна характеристика цього ферменту у *Marsilea minuta* (*Polypodiopsida*). *Український ботанічний журнал*, 77(5): 386–397.

<sup>1</sup>Кафедра ботаніки, Державний коледж м. Барасат  
Барасат 700124, Західна Бенгалія, Індія

<sup>2</sup>Кафедра ботаніки, Меморіальний жіночий коледж Хіралал Мазумдар  
Дакшинесвар, Колката 700 035, Західна Бенгалія, Індія

**Реферат.** У статті повідомляється про значну активність глюконеогенної фруктозо-1,6-бісфосфатази (ФБФ-аза; КФ 3.1.3.11) у трьох звичайних видів гетероспорових водяних папоротей (*Marsilea minuta*, *Salvinia natans* і *Azolla pinnata*). Крім того, наводиться протокол часткового очищення цього ферменту із зрілих спорокарпів *Marsilea minuta*. Цитозольна ФБФ-аза, отримана з *Marsilea minuta*, *Salvinia natans* та *Azolla pinnata*, визнана глюконеогенним ферментом завдяки різкій катаболічній інактивації за наявності зовнішньої введеної глюкози та нечутливості до фотосинтетичного освітлення. Цитозольна глюконеогенна ФБФ-аза із зрілих спорокарпів *Marsilea minuta* була частково очищена до приблизно 22-кратного рівня гомогенатом після низькошвидкісного центрифугування (11400 × g), фракціонування 30–80% сульфатом амонію і подальшого хроматографічного розділення на СМ-целюлозі, Sephadex G-200 та Ultrogel AcA 34. Реєстрували профіль частково очищеної ФБФ-ази шляхом електрофорезу у нативних умовах в поліакриламідному гелі (PAGE). Активність ферменту лінійно зростала щодо концентрації білка приблизно до 100 мг упродовж періоду до 75 хвилин. Температурний оптимум встановлено при 35 °С. Для визначення впливу концентрації субстрату і кінетичного аналізу використовували D-фруктозо-1,6-бісфосфат (D-ФБФ, субстрат) у діапазоні 0,0–1,0 мМ з інтервалом 0,1 мМ концентрації. Значення  $K_m$  для D-ФБФ ФБФ-ази становило 0,06129 мМ, а  $V_{max}$  – 4525 nmole P<sub>i</sub> виділеного білка h<sup>-1</sup> (mg)<sup>-1</sup>, що визначали за допомогою нелінійної регресії з використанням програм Prism 8 (Graph Pad). Дія ферменту відбувалась у звуженому діапазоні рН від 7–8, а максимальні показники отримано при рН 7,5. Встановлено, що Mg<sup>2+</sup> значною мірою стимулює, а Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> і Zn<sup>2+</sup> – інгібують активність цього цитозольного ферменту.

**Ключові слова:** водяна папороть, глюконеогенез, очищення та характеристика ферментів, ФБФ-аза, спорокарп

## List of abbreviations

BSA – bovine serum albumin; СМ – carboxymethyl; EDTA – ethylene diaminetetraacetate; F-6-P – fructose-6-phosphate; FBP – fructose-1,6-bisphosphate; FBPase – fructose-1,6-bisphosphatase; g – gravitational field;  $K_m$  – michaelis constant; OD – optical density; PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis; P<sub>i</sub> – inorganic phosphate;  $V_{max}$  – maximum velocity.

## Introduction

Aquatic ferns bear specialized and unique reproductive structures known as ‘sporocarps’. These are sclerified seed-like propagules whose morphological nature has been variously interpreted. It is now generally agreed that these specialized, stomatiferous foliar units are modified leaflets with two reflexed and connate segments, each bearing a number of elongate sori following the veins (Kramer, 1990). The young immature sporocarps are green, leathery and photosynthetic, while on maturation they become non-photosynthetic, blackish brown in colour and eventually break down as a result of disintegration of the indusial and the sporangial walls releasing the spores to the external environment. These unique desiccation tolerant structures have been extensively studied from various angles like morphology, anatomy,

physiology, cytology, phytoremediation, environmental biology, phylogeny, antioxidant activity, etc. over a period of several decades (Bierhorst, 1971; Bold et al., 1987; Gifford, Foster, 1987; Raubeson et al., 1994; Rothwell, Stockey, 1994; Nagalingum et al., 2006; Sood et al., 2012; Arokiyaraj et al., 2018). However, a thorough biochemical analysis of this specialized structure during its development has not been conducted adequately. There is a dearth of information regarding the biochemical aspects of sporocarp maturation and sprouting. It has been reported earlier that adequate glucose concentration is the central parameter in living organisms for optimization and fulfilment of all metabolic events either directly or indirectly (Eckstein et al., 2012). In plants this sugar is available in all parts basically via photosynthesis in leaves followed by phloem translocation. It has also been observed that under certain physiological conditions, the requisite concentration of glucose is provided via non-photosynthetic pathway like gluconeogenesis. The conversion of immature fern sporocarps into mature and senescent ones involves a definite loss of photosynthetic activity which in turn indicates the possible occurrence of gluconeogenic pathway and the concomitant involvement of the gluconeogenic marker enzyme, fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase).

Fructose-1,6-bisphosphatase is a ubiquitous enzyme which catalyzes the hydrolytic dephosphorylation of D-fructose-1,6-bisphosphate (Fru-1,6-P<sub>2</sub>) to D-fructose-

6-phosphate and inorganic phosphate. Two isoforms of FBPase has been recognized for more than five decades. The first one is associated with the photosynthetic plastids and is involved in the reductive carbon assimilation cycle of photosynthesis. The second is located in the cytoplasm, which is involved in both gluconeogenesis and sucrose synthesis (Zimmerman et al., 1978; Stitt, Heldt, 1985). Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase is primarily associated with the regulation of gluconeogenesis in non-photosynthetic tissues like mature fern sporocarps. The occurrence of gluconeogenic FBPase is widespread in living organisms vacillating from bacteria to highly structured plants and animals. Several workers have studied this ancestral gluconeogenic enzyme from a wide number of microbial, plant and animal genera with diverse phylogenetic significance (Kobr, Beevers, 1971; Yu, 1989; Botha, Turpin, 1990; Jardon et al., 2008; Dey et al., 2014). However, perusal of available literature clearly reveals a serious information gap regarding the existence of this enzyme in vascular cryptogams, particularly in non-green senescent sporocarps of common aquatic ferns like *Marsilea* sp., *Salvinia* sp., and *Azolla* sp. Taking all the above facts into consideration the present investigation was aimed towards detection, partial purification and characterization of this ancestral gluconeogenic enzyme from three common heterosporous water ferns belonging to *Marsileaceae* and *Salviniaceae*.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

D-fructose-1,6-bisphosphate (di-sodium salt), D-fructose-6-phosphate (di-sodium salt), D-glucose-6-phosphate (di-sodium salt), D-galactose-6-phosphate (Gal-6-P, di-sodium salt), D-fructose-6-phosphate (F-6-P, di-sodium salt), D-mannose-6-phosphate (M-6-P, di-sodium salt), bovine serum albumin (BSA), were obtained from SRL (Mumbai, India). 2-Mercaptoethanol (ME), ammonium molybdate, acetic acid, ammonium sulphate, ammonium chloride, copper chloride, potassium chloride, tris(hydroxymethyl)aminomethane, trichloroacetic acid (TCA), dipotassium hydrogen phosphate, magnesium chloride, hydrochloric acid, sodium chloride, sulphuric acid, zinc chloride were purchased from E Merck India Ltd. (Mumbai, India). 2-Glycerophosphate was obtained from BDH, England. Coomassie Brilliant Blue (R-250 and G-250), Ultrogel AcA 34 (U8878) were obtained from Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri,

USA. Sephadex G-200 was obtained from Amersham Pharmacia Biotech marketed by SRL, Mumbai, India. Ascorbic acid, sodium bicarbonate, ammonium sulfate and ammonium chloride were procured from SRL (Mumbai, India). CM-Cellulose column matrix was purchased from Genei, Bangalore, India. Manganese chloride, dialysis membrane, etc. were obtained from Hi Media Laboratories Ltd. (Mumbai, India). Mercuric chloride and calcium chloride were obtained from Qualigens Fine Chemicals (Mumbai, India). All other chemicals used were of analytical grade and acquired from renowned Indian companies.

### Plant material

Sporocarps of *Marsilea minuta* L., *Salvinia natans* L., and *Azolla pinnata* R.Br. were collected in different seasons from different ponds and paddy fields of Bongaon (23°4' N, 88°49' E) and Hasnabad (22.5°7' N, 88.9°1' E), 24-Parganas (N), WB, India in fresh condition and kept under -20 °C in the laboratory until use. Specimens were identified using standard taxonomic literature and herbarium specimens available at Central National Herbarium (CAL). Voucher specimens were deposited in the Departmental herbarium of Barasat Govt. College.

### Isolation of fructose-1,6-bisphosphatase

In order to assay the enzyme (FBPase), and for detecting its activity in the sporocarps of the experimental samples separately at the initial phase of our work, the enzyme was isolated according to the following steps. The experimental material (about 10 gms) were collected and washed thrice with chilled distilled water and homogenized in a pre-cooled mortar and pestle in two volumes of the extraction buffer [50 mM tris-acetate (pH 7.5) containing 0.2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (ME)]. Neutral sea-sand was used in the mortar during the process of extraction. This homogenate was filtered to eliminate sand, unbroken cells and cellular debris. The resultant residue was discarded and the filtrate (homogenate) was collected. Half of the total volume of the filtrate was centrifuged at 11, 400  $\times$  g for 30 minutes in a Remi C 24 Plus cold centrifuge and the pellet was discarded. The supernatant (low-speed supernatant fraction) thus obtained was dialyzed overnight against the same buffer solution used for homogenization. On completion of dialysis, the low-speed supernatant was recovered from the dialysis bag and used for the preliminary assay.

### Assay of fructose-1,6-bisphosphatase

A simple assay method of fructose-1,6-bisphosphatase was designed during the course of the present investigation in our laboratory, based on the method of Biswas et al. (1981). The typical incubation mixture restricted 100 mM tris-acetate buffer (pH 7.5), 5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM fructose-1,6-bisphosphate (FBP), 0.1 mM EDTA, and an appropriate protein aliquot (50–200  $\mu g$ ) in a total volume of 1.0 mL. 0.2 mM fructose-6-phosphate (F-6-P) substituted FBP in each set of assay which served as control against non-specific phosphatases. Zero minute controls for both FBP and F-6-P, where the protein of the incubation mixture was destroyed by 0.25 mL of 20% chilled trichloroacetic acid (TCA) prior to the addition of substrate, served as double check against prying inorganic phosphate (if any). In totalling to these sets, an appropriate blank (minus enzyme) was also maintained. The enzyme incubation was carried out at 37 °C for 1 hour. After 1 hour of first (enzyme) incubation, the reaction was finished by the procedure applied for zero minute control. Therefore, in an assay set, there were six tubes, i.e., one blank, one zero minute control and one experimental tubes for each set (i.e., FBP set and F-6-P set). Afterwards, the amount of inorganic phosphate released on hydrolysis from the substrate(s) by the enzyme action was estimated according to the procedure of Chen et al. (1956) with slight modifications (Adhikari et al., 1987). 3.0 mL of a reagent ( $P_i$ -reagent) and 3.0 mL  $H_2O$  were added to the reaction mixture (total volume thus became 7.25 mL) and incubated at 37 °C for 1 hour. The  $P_i$ -reagent was prepared immediately before use by adding  $H_2SO_4$  (6N), ascorbic acid (10 % w/v), ice-cold ammonium molybdate (2.5 % w/v) and  $H_2O$  in 1:1:1:2 ratios in that order. After incubation, the blue colour developed was measured at 820 nm in a Systronics-106 spectrophotometer. The free inorganic phosphate was estimated with the help of a standard curve prepared from different known quantities (0–100  $\mu g$ ) of phosphorous ( $K_2HPO_4$  was used as the source). The enzyme-dependent release of inorganic phosphate was considered by subtracting the second corrected value (experimental tube – zero minute tube of ‘FBP set’) from the first corrected value (experimental tube – zero minute tube of ‘F-6-P set’). Protein was estimated by the method of Bradford (1976) with minor modifications using BSA as standard. A standard curve could thus be obtained and using that, the protein content of the experimental samples were estimated. As 1 mole of inorganic phosphate was hydrolyzed from one mole of

FBP, mole number of inorganic phosphate quantified was equal to the number of FBP hydrolyzed at C-1 position.

### Catabolic inactivation by externally administered glucose

In set I, sporocarps of *Marsilea minuta*, *Salvinia natans*, and *Azolla pinnata* were washed with distilled water and then two similar batches were designed, each containing 2 gms of fresh tissue for each individual genus. These experimental materials belonging to each batch were than kept in two different petri plates over moist filter paper (soaked thoroughly with distilled water). The experimental sets were maintained in presence of 5% glucose (at 24–26 °C) and control sets were also maintained parallel without glucose under similar temperature regimes. This treatment was carried out for 7 days and rotational light / dark condition was maintained identically for both the sets (experimental & control). After completion of the treatment, respective homogenate (s) of the tissues were prepared independently from both the sets (materials placed separately in presence of 0% and 5% glucose). FB Pase assay was carried out following the procedure described in the previous section.

### Influence under photosynthetic light

In set II, *Marsilea minuta*, *Salvinia natans*, and *Azolla pinnata* were washed with distilled water and then two similar batches were designed, each containing 2 gms of fresh tissue. These materials of each batch and for each genera were then maintained in two different petri plates over moist filter paper (soaked thoroughly with distilled water). One of these investigational sets were placed under alternate light/dark condition (8 hours light, 16 hours dark) for 7 days and the control set was maintained under complete darkness for 7 days. Subsequent to 7 days of treatment, respective homogenate (s) of the tissues were prepared independently from both the batches. FB Pase assay was carried out following the procedure described earlier.

### Partial purification of FB Pase (from the sporocarps of *Marsilea minuta*)

10 gms of mature *Marsilea* sporocarps were washed with chilled distilled water twice and the partial purification of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from this sample was carried out following the steps as mentioned below (all the steps were carried out under 0 to 4 °C).

## Homogenate

Water-washed sporocarps of *Marsilea minuta* was homogenized in a mortar and pestle with 2-volumes of 50 mM tris-acetate (pH 7.5) buffer containing 0.2 mM ME in presence of a little amount of washed sand. This homogenate was filtered to eliminate the sand, unbroken cells and cellular debris. The resultant residue was discarded and the filtrate (homogenate) collected.

## Low speed supernatant

The resultant homogenate was centrifuged at  $11,400 \times g$  for 30 minutes in a Remi C-24 Plus cold centrifuge. On completion of centrifugation, the pellet was discarded and the supernatant fraction was collected from the centrifuge tubes and pooled together.

## Ammonium sulphate fractionation

The low-speed supernatant fraction obtained from the preceding step was then made 30–80% saturated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  by adding requisite amount of solid salt slowly with constant rousing (by using a Remi magnetic-stirrer). Then it was kept at  $0^\circ\text{C}$  for 30 minutes and then centrifuged at  $11,400 \times g$  for 30 minutes using Remi C-24 Plus cold centrifuge. The resultant pellet thus obtained after this centrifugation was dissolved in minimal volume of 50 mM tris-acetate (pH 7.5) buffer having 0.2 mM ME and dialyzed overnight against the same buffer (at least 1000 volumes) for complete removal of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . On completion of dialysis, the 30–80 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraction was recovered from the dialysis bag.

## Cation exchange column chromatography through CM-cellulose

The 30–80% ammonium sulphate (dialyzed) fraction obtained from the earlier step were loaded onto a column ( $0.8 \times 10.9$  cm) of CM-cellulose [before this experimentation, commercially available CM-cellulose was flooded with 300–400 volumes of glass-distilled water over-night at room-temperature for complete swelling of gel beads. The excess water was then poured out and the column material equilibrated earlier with 50 mM tris-acetate buffer (pH 7.5) having 0.2 mM ME] pre-equilibrated with 50 mM tris-acetate buffer (pH 7.5) containing 0.2 mM ME. Proteins were eluted with the same buffer with KCl gradient (0.0 to 0.5 M) in fractions of 4.0 mL at a flow rate of 20 minutes per tube. Fifteen such fractions were collected. Fractions containing fructose-1,6-bisphosphatase activities were pooled collectively and this preparation was stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

## Gel filtration through Sephadex G-200

Active CM-cellulose fractions were pooled together and column chromatography was carried out through Sephadex G-200 ( $0.8 \times 14.0$  cm). Proteins were eluted with the 50 mM tris-acetate buffer (pH 7.5) having 0.2 mM ME in fractions of 3.0 mL at a flow rate of 25 minutes per tube. Eighteen such fractions were collected. The FBPase active Sephadex G-200 fractions were pooled together and molecular sieve chromatogram was made through UltrogelAcA 34 column.

## Molecular sieve chromatography through UltrogelAcA 34

Active Sephadex G-200 fractions were pooled together and column chromatography was carried out through UltrogelAcA 34 column ( $0.8 \times 9.5$  cm). Proteins were eluted with the same buffer in fractions of 2.5 mL at a flow rate of 15 minutes per tube. Fifteen such fractions were collected. The FBPase active fractions obtained from UltrogelAcA 34 were pooled together and used as the enzyme preparation for biochemical characterization of FBPase.

## Characterization of FBPase

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed under native conditions following the method of Bollag et al. (1996) with minor modifications. All other experiments were carried out following conventional methods of enzymology.

## Kinetic analysis

The  $K_m$  value for D-FBP of FBPase was 0.2215 mM and  $V_{max}$  was 7663 nmole  $\text{P}_i$  released  $(\text{mg})^{-1}$  protein  $\text{h}^{-1}$  as determined by nonlinear regression kinetics using Prism 8 software (Graph Pad). All experiments were repeated thrice and results were expressed as means  $\pm$  SE of three replicates.

## Results

### Screening of FBPase

Both young (green) and mature (brownish black) sporocarps of *Marsilea minuta*, *Salvinia natans*, and *Azolla pinnata* were screened separately for the presence of FBPase. In the young sporocarps of all the experimental samples, the specific activity of FBPase was relatively lower than the mature sporocarps obtained from the same source (Table 1).

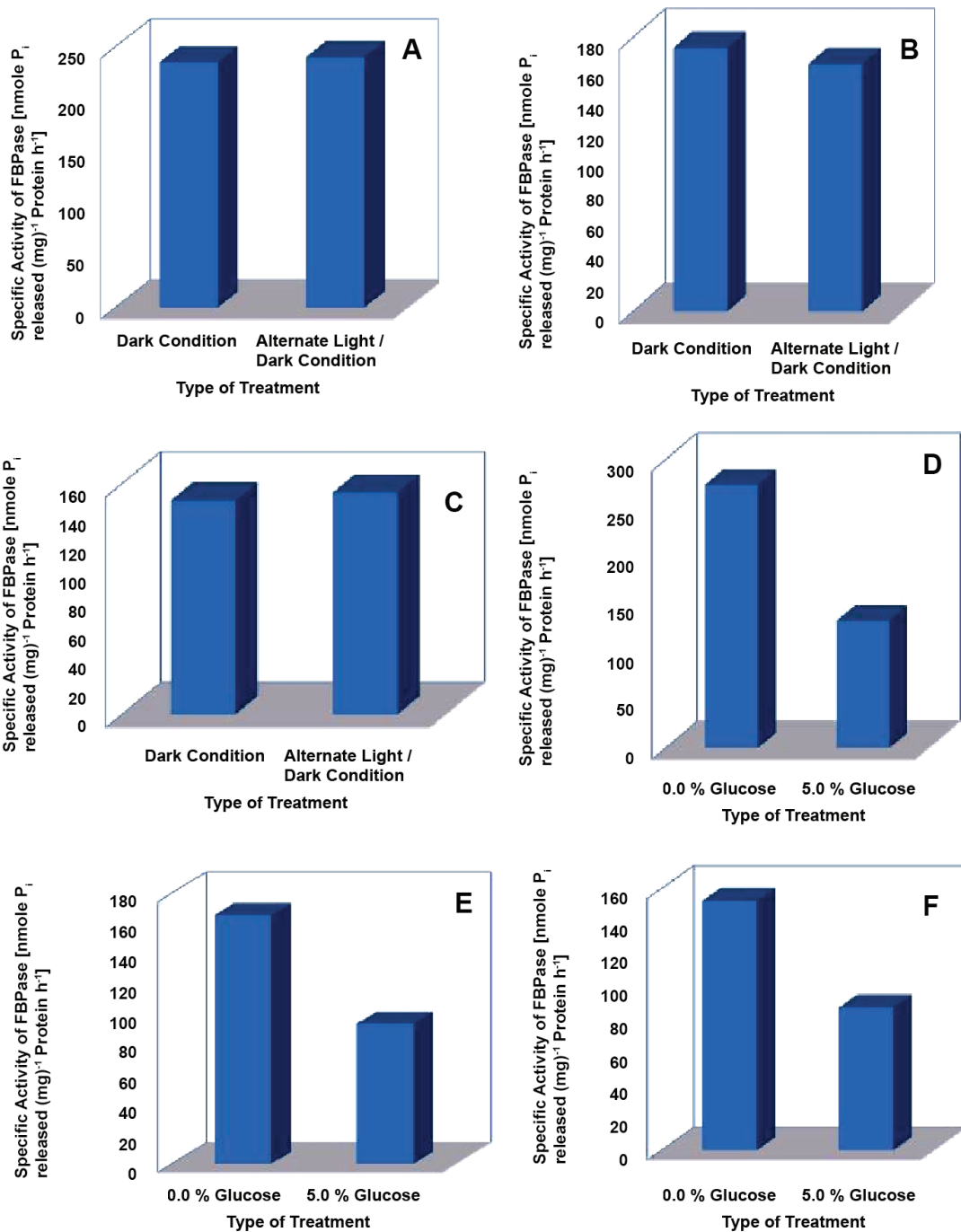


Fig. 1. A–C: uninfluenced activity of FBPase under photosynthetic light illumination for 7 days in *Marsilea minuta* (A), *Salvinia natans* (B), and *Azolla pinnata* (C); D–F: catabolic inactivation of FBPase activity by externally administered glucose (5%) for 7 days in *Marsilea minuta* (D), *Salvinia natans* (E), and *Azolla pinnata* (F)

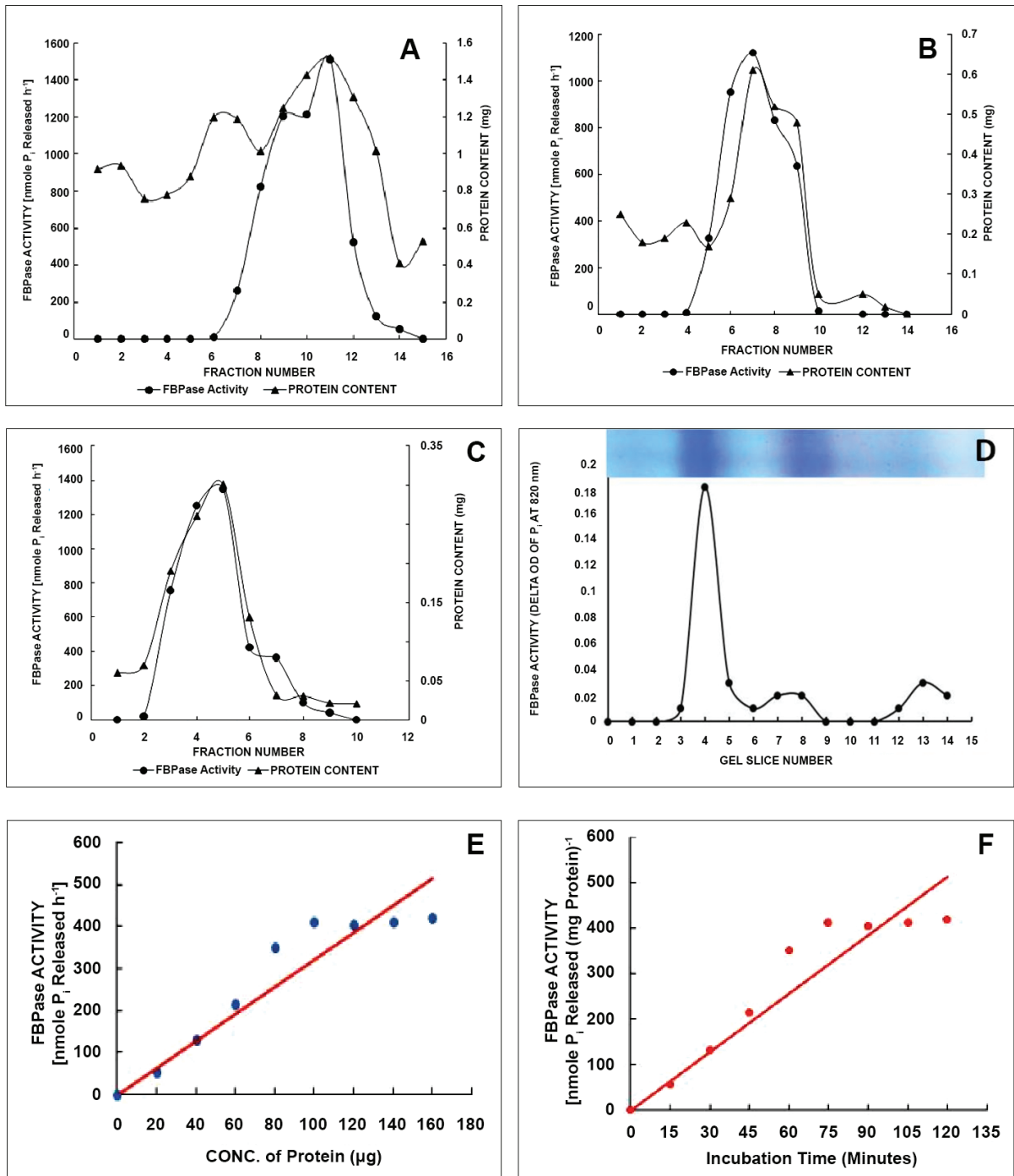


Fig. 2. A–C: elution profiles of FBpase and protein contents through CM-cellulose column (A), Sephadex G-200 column (B), and Ultrogel AcA34 column (C); D: Native PAGE profile with corresponding FBpase activity; E: effect of protein concentration on FBpase activity; F: effect of incubation time on FBpase activity



**Table 1. Activity of fructose-1,6-bisphosphatase from young and mature sporocarps of common aquatic ferns from low-speed supernatant fraction (11, 400 × g) [Results are mean ± SE, n = 3]**

Plant	Plant part	Growth stage of sporocarps and collection period	Specific activity of FBPase (nmole P <sub>i</sub> released (mg) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>Azolla pinnata</i>	Sporocarps	Young ( June 2019)	28.16 ± 4.21
		Mature (September 2019)	159.45 ± 25.77
<i>Marsilea minuta</i>	Sporocarps	Young (November 2019)	122.36 ± 18.05
		Mature (February 2019)	210.16 ± 31.44
<i>Salvinia natans</i>	Sporocarps	Young (December 2019)	71.22 ± 8.46
		Mature (March 2019)	176.31 ± 22.52

### Identification of gluconeogenic FBPase

The activity of such FBPase in mature sporocarps remained unaltered under alternative light/dark conditions (Fig. 1, A–C) but, it was subdued under the presence of externally administered glucose for all the investigated genera (Fig. 1, D–F).

### Partial purification of FBPase from the mature sporocarps of *Marsilea minuta*

This enzyme was partially purified from the mature sporocarps of *Marsilea minuta* to about 22-fold and with about 71% yield over homogenate following low-speed centrifugation (11, 400 × g), 30–80 % ammonium sulfate fractionation followed by subsequent chromatography using matrices like CM-cellulose, Sephadex G-200 and Ultrogel AcA 34 as detailed earlier in the methods section (Table 2). The general blueprint of elution profile of cytosolic FBPase and proteins are presented in Fig. 2, A–C.

### Characterization of FBPase

The Partially purified FBPase profile was identified in PAGE under non-dissociating condition. Two major bands were marked in the native PAGE profile, out of which the first major protein band was found to coincide with the enzyme activity (Fig. 2, D). This partially purified enzyme exhibited variable activity in absence

of different assay components (Table 3). The enzyme activity increased linearly with respect to protein concentration to about 100 µg (Fig. 2, E) and with respect to time up to 75 min (Fig. 2, F). Temperature optimum was found at 35 °C (Fig. 3, A). The effect of substrate concentration and kinetic analyses for FBPase were carried out using D-fructose-1,6-phosphate (D-FBP, the substrate) in the range of 0.0 to 1.0 mM at an interval of 0.1 mM. The  $K_m$  value for D-FBP of FBPase was 0.06129 mM and  $V_{max}$  was 4525 nmole P<sub>i</sub> released (mg)<sup>-1</sup> Protein h<sup>-1</sup> as determined by nonlinear regression kinetics using Prism 8 software (Graph Pad) (Fig. 3, C). This FBPase specifically utilized fructose-1,6-bisphosphatase as its exclusive substrate. No other phosphorylated sugar could replace it (Table 4). The enzyme was functional in a confined pH 7–8 giving maxima at pH 7.5 using tris-HCl buffer in experiments (Fig. 3, B). This cytosolic enzyme was significantly stimulated by Mg<sup>2+</sup> and highly subdued by Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> (Fig. 3, D).

### Discussion

The reproductive structures of heterosporous ferns although referred collectively under a common term ‘sporocarp’, each structure is unique to their respective genera and are strikingly different from each other. The difference lies in terms of gross morphology, anatomy, time of maturation and mechanism of dispersal. Previous

**Table 2. Partial purification of gluconeogenic FBPase from non-photosynthetic sporocarps of *Marsilea minuta* [Results are mean ± SE, n = 3]**

Fraction	Total protein (mg)	Specific activity [nmole P <sub>i</sub> released (mg) <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup> ]	Total activity [nmole P <sub>i</sub> released h <sup>-1</sup> ]	Yield (%)	Fold purification (Fold)
Homogenate fraction	27.08 ± 2.46	176.90 ± 16.11	4790.45 ± 6.48	100.00 ± 2.14	1.00 ± 0.03
11, 400 × g supernatant fraction	22.83 ± 2.13	201.32 ± 30.34	4596.13 ± 4.11	95.94 ± 3.06	1.13 ± 0.04
30–80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction	18.75 ± 3.86	237.05 ± 26.71	4444.68 ± 12.34	92.78 ± 7.16	1.34 ± 0.11
CM-cellulose fraction	3.93 ± 6.42	1106.15 ± 5.43	4347.16 ± 6.73	90.74 ± 5.49	6.25 ± 0.43
Sephadex G-200 fraction	2.06 ± 5.09	1706.42 ± 2.11	3515.22 ± 1.26	73.37 ± 4.88	9.64 ± 1.31
UltrogelAcA 34 fraction	0.85±0.13	4035.16±1.50	3429.88±32.14	71.59±2.73	22.18±1.14

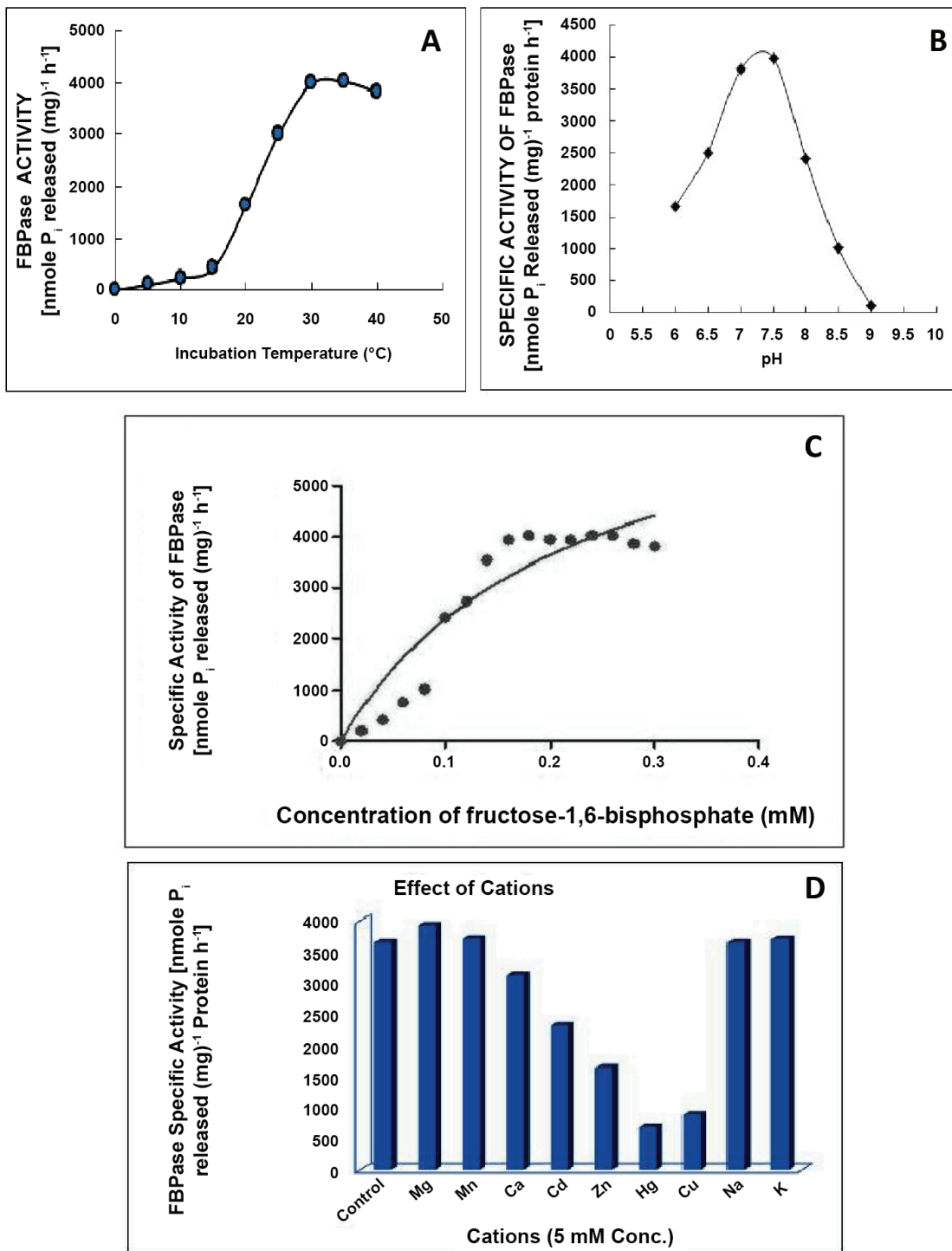


Fig. 3. A: effect of incubation temperature on FBPase activity; B: pH sensitivity of partially purified cytosolic FBPase; C: effect of substrate concentration on FBPase activity; D: effect of some monovalent and divalent cations on cytosolic FBPase activity

**Table 3. Effect of different assay components on FBPase activity [Results are mean  $\pm$  SE, n = 3]**

Sl. No.	Condition	Specific activity [nmole P <sub>i</sub> released (mg) <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup> ]	An average activity (%)
1	Complete set	3853.46 $\pm$ 234.11	100.00
2	Minus substrate (FBP)	0.00	0.00
3	Minus buffer	3326.05 $\pm$ 187.19	86.31
4	Minus MgCl <sub>2</sub>	3642.85 $\pm$ 206.15	94.53
5	Minus EDTA	3516.31 $\pm$ 188.32	91.25
6	Heat killed enzyme	0.00	0.00

reports are also indicative of the fact that because of the striking overall morphological differences among the spore-bearing structures, the two heterosporous fern families *Marsileaceae* and *Salviniaceae* are not considered to be related closely (Bower, 1928; Eames, 1936; Tryon, Tryon, 1982). In the present investigation the activity of cytosolic FBPase was found to vary considerably among the three aquatic ferns screened. The activity varied considerably according to the growth stage of the collected sporocarps. Young and immature sporocarps exhibited a low enzyme titre value while maximum activity was recorded in mature sporocarps which were about to dehisce. Out of the three species scanned, highest activity was recorded in mature sporocarps of *Marsilea* followed by *Salvinia* and *Azolla*, respectively (Table 1) and this may be due to genotypic and physiological differences and other accompanying environmental factors.

The elevated activity of this enzyme in senescent sporocarps in comparison with their juvenile counterparts (Table 1) raises a very pertinent question regarding its actual physiological significance, which is yet to be conclusively resolved. A possible explanation of this phenomenon can be given from a biochemical point of view. Fern sporocarps are unusual modified reproductive structures that are reported to be highly desiccation tolerant [some are known to be viable 40 years after being collected (Bierhorst, 1971; Johnson, 1985)]. These structures have thick, sclerenchymatous walls that provide adequate protection against dryness and mechanical damage by insect herbivores. During maturation and before dispersal the sporocarp has to cope up with internal stress from the turgor developed. Just prior to spore dispersal the shielding coat of the sporocarp breaks down due to its prolonged acquaintance with water or a scratchy surface. Hydration changes the internal components and a gelatinous frame of pectin (i.e., the sorophore) comes out from the sporocarp.

**Table 4. Substrate specificity on FBPase activity [Results are mean  $\pm$  SE, n = 3]**

Substrate	Concentration (mM)	Specific activity [nmole P <sub>i</sub> released (mg) <sup>-1</sup> protein h <sup>-1</sup> ]	An average activity (%)
D-fructose-1,6-bisphosphate	0.2	3942.17 $\pm$ 187.76	100.00
D-glucose-6-P	0.2	0.00	0.00
D-fructose-6-P	0.2	0.00	0.00
D-galactose-6-P	0.2	0.00	0.00
D-Mannose-6-P	0.2	0.00	0.00

Sprouting of sporocarps is dependent largely on the heterosachharide pectin, which besides providing mechanical strength and protection also helps the cells to cope up with the stress. Unequivocally, it is known that adequate glucose concentration is the central parameter of all living organisms for optimization of biological balance and for successful fulfillment of all metabolic events either directly or indirectly (Eckstein et al., 2012). It is also well established that under certain physiological conditions, the required concentration of glucose can be provided by non-photosynthetic pathway like gluconeogenesis. Since very little is known regarding the principal pathways of carbohydrate metabolism in fern sporocarps, the possibility of a gluconeogenic pathway in senescent fern sporocarps cannot be ruled out. Enzymatic studies on aquatic ferns have been conducted partially and discretely by Soltis and Soltis (1986), but their findings did not throw any light regarding the source of carbohydrates or sugars that are essentially required for growth and development of fern sporocarps, particularly at that time when the concerned vegetative mother plant becomes senescent and its photosynthetic efficiency and solute translocation remain on a low-level.

The present work accords with the pilot indication for the unique presence of the gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase for the first time in sporocarps of three heterosporous water ferns followed by its partial purification from mature sporocarps of *Marsilea minuta*. The results obtained in the present investigation reinvents the primordial nature of this protein in aquatic fern system. The persistence of this enzyme in vascular cryptogams and its alliance with the process of gluconeogenesis can clearly be proved through its catabolic suppression by glucose and simultaneously its lack of response under any light activation which is strongly evident in photosynthetic form of this enzyme (Fig. 1, A–F).

Previous reports dealing with the characterization of cytosolic FBPase have elucidated that the enzyme

has a high affinity for its substrate (FBP), neutral pH optima, is inhibited by AMP and glucose and is also strongly stimulated by  $Mg^{+2}$  (Kobr, Beevers, 1971; Dey et al., 2014). The rudimentary characters of this enzyme illustrated in the present study are also comparable to other genera (Kobr, Beevers, 1971; Botha, Turpin, 1990; Jardon et al., 2008; Say, Fuchs, 2010; Yu, 1989). The preeminent activity of this FB Pase in mature sporocarps in comparison with the young developing sporocarps (Table 1) nurtures a fundamental question regarding its physiological connotation, which is yet to be conclusively resolved. Is it a 'safe-guard' metabolic strategy for maintenance of the reserve carbohydrate pool during the stressful sprouting phase? In order to provide a satisfactory answer, further work may be carried out with the aid of radio isotope study, gene expression and proteomic analysis.

## Conclusion

The present communication thus reports substantial activity of gluconeogenic FB Pase in senescent spore bearing structures of three common heterosporous aquatic ferns. This ancient cytosolic enzyme (purified partially from *Marsilea minuta* sporocarps) was recognized as a gluconeogenic enzyme, due to its drastic inactivation in presence of glucose and its insensitivity towards photosynthetic light illumination. The results obtained in the present study also reveal the fact that a gluconeogenic pathway is operative in senescent sporocarps of *Marsilea minuta*, which may be regarded as a metabolic protective strategy adopted by the aquatic ferns for maintenance of the reserve carbohydrate pool during the stressful sprouting phase.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors are indebted to DBT, Govt. of West Bengal, India, for a partial financial support (Project No.: 118/10/BT (Estt)/1P-4/2013 dated 15.02.2017) to carry out this work. They are also thankful to Prof. Debesh Roy, Principal, Barasat Govt. College for his continuous help and encouragement.

## References

- Adhikari J., Majumder A., Bhaduri T.J., DasGupta S., Majumder A.L. 1987. Chloroplast as a locale of L-myoinositol-1-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 85(3): 611–614.
- Arokiyaraj S., Bharanidharan R., Agastian P., Shin H. 2018. Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial mechanism of action from *Marsilea minuta* leaf hexane: methanol extract. *Chemistry Central Journal*, 12(1): 1–11.
- Bierhorst D.W. 1971. *Morphology of vascular plants*. New York: MacMillan, 137 pp.
- Biswas T., Adhikari J., Choudhuri R.B., Majumder A.L. 1981. Fructose-1,6-bisphosphatase & myo-inositol synthase: A phylogenetic search. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 18(6): 442–444.
- Bold H.C., Alexopoulos C.J., Delevoryas T. 1987. *Morphology of plants and fungi*. 5<sup>th</sup> ed. Harpercollins College: Harper & Row, 912 pp.
- Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. 1996. *Protein methods*. New York: Wiley-Liss, 415 pp.
- Botha F.C., Turpin D.H. 1990. Fructose 1,6-bisphosphatase in the green algae *Selenastrum minutum*. I. Evidence for the presence of isoenzymes. *Plant Physiology*, 93(4): 1460–1465.
- Bower F.O. 1928. *The ferns*, vol. 3. Cambridge: Cambridge University Press, 359 pp.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. 1956. Microdetermination of phosphorous. *Analytical Chemistry*, 28(11): 1756–1758.
- Dey A., Lahiri A., Basak A., Adhikari J. 2014. Characterization of gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase in the senescent thalli of an alga *Cladophora bengalensis* Martens. *Indian Journal of Plant Physiology*, 19: 8–13.
- Eames A.J. 1936. *Morphology of vascular plants*. New York: McGraw-Hill, 433 pp.
- Eckstein A., Zięba P., Gabryś H. 2012. Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(1): 90–101.
- Gifford E.M., Foster A.S. 1987. *Morphology and evolution of vascular plants*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: W.H. Freeman and Company, pp. 306–313.
- Jardon R., Gancedo C., Flores C.L. 2008. The gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase is dispensable for growth of the yeast *Yarrowia lipolytica* in gluconeogenic substrates. *Eukaryotic Cell*, 7(10): 1742–1749.
- Johnson D.M. 1985. New records for longevity of *Marsilea* sporocarps. *American Fern Journal*, 75: 30–31.
- Kobr M.J., Beevers H. 1971. Gluconeogenesis in the castor bean endosperm. I. Changes in glycolytic intermediates. *Plant Physiology*, 47(1): 48–52.

- Kramer K.U. 1990. *Marsileaceae*. In: Kramer K.U., Green P.S. (eds). *Pteridophytes and Gymnosperms. The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 1. Berlin; Heidelberg: Springer, pp. 180–183.
- Nagalingum N.S., Schneider H., Pryer K.M. 2006. Comparative morphology of reproductive structures in heterosporous water ferns and a re-evaluation of the sporocarp. *International Journal of Plant Sciences*, 167(4): 805–815.
- Raubeson L.A., Stein D.B., Conant D.S. 1994. Insights into fern evolution from mapping chloroplast genomes. *American Journal of Botany*, 81(6): 123.
- Rothwell G.W., Stockey R.A. 1994. The role of *Hydropteris pinnata* gen. et sp. nov. in reconstructing the cladistics of heterosporous ferns. *American Journal of Botany*, 81(4): 479–492.
- Say R.A., Fuchs G. 2010. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. *Nature*, 464 (7291): 1077–1081.
- Soltis D.E., Soltis P.S. 1986. Active enzymes from megaspores of *Marsilea* and *Regnellidium*. *American Fern Journal*, 76(1): 17–20.
- Sood A., Uniyal P.L., Prasanna R., Ahluwalia A.S. 2012. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. *Ambio*, 41(2): 122–137.
- Stitt M., Heldt H.W. 1985. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. *Planta*, 164(2): 179–188.
- Tryon R.M., Tryon A.F. 1982. *Ferns and allied plants, with special reference to tropical America*. New York: Springer, 857 pp.
- Yu S. 1989. Partial purification of fructose 1,6-bisphosphatase from the marine macro alga *Bryopsis corticulans* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25: 608–612.
- Zimmermann G., Kelly G.J., Latzko E. 1978. Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 253(17): 5952–5956.

Recommended for publication by O.K. Zolotareva



## Bioelectric characteristics of *Chara fragilis* (*Characeae*) cells

Aynur E. HASANOVA<sup>1</sup>, Nagi A. MUSAYEV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences  
40 Badamdar Highway, Baku AZ1004, Azerbaijan  
[ahasanova89@gmail.com](mailto:ahasanova89@gmail.com)

<sup>2</sup>Department of Biophysics and Molecular Biology, Baku State University  
23 Academic Zahid Khalilov Str., Baku AZ1148, Azerbaijan  
[nagi.musayev@hotmail.com](mailto:nagi.musayev@hotmail.com)

Hasanova A.E., Musayev N.A. 2020. **Bioelectric characteristics of *Chara fragilis* (*Characeae*) cells.** *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 398–404.

**Abstract.** For the first time the data on the distribution of the potential ( $\varphi_m$ ) and resistance ( $R_m$ ) in the plasma membrane and cell wall ( $R_0$ ) of *Chara fragilis* cells were obtained using the Hogg method by the number of *C. fragilis* cells in standard conditions. The Hogg method allows simultaneous measurement of electrophysiological parameters, such as  $\varphi_m$  and  $R_m$ . The stationary values of the membrane potential and resistance varied in a rather wide range:  $-90\ldots-300$  mV and  $1.0\text{--}32.6$  Ohm $\cdot$ m<sup>2</sup>, respectively. The average values of  $\varphi_m$  were  $-183.0 \pm 4.9$  mV,  $R_m$   $-9.0 \pm 1.2$  Ohm $\cdot$ m<sup>2</sup>. Using standard modifiers of membrane transport, the electrogenic activity of the cells was differentiated into two types: K<sup>+</sup>-channels and H<sup>+</sup>-membrane pumps. The activation ranges of the K<sup>+</sup>-inward rectifying channels and K<sup>+</sup>-outward rectifying channels are  $-130\ldots-50$  and  $-300\ldots-162$  mV, respectively. The cytosolic activity of K<sup>+</sup>-ions was 61.6 mmol/L. Since in our research, *C. fragilis* cells were studied for the first time, their electrogenic activity and ionic conductivity were tested using ammonium metavanadate (VO<sub>5</sub><sup>-</sup>) – a proton pump inhibitor and tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>) – a universal blocker of K<sup>+</sup>-channels of plasma membranes. *Chara fragilis* cells can be recommended as a test object for establishing the mechanisms of changes in plasma membrane transport under exogenous stress factors influence.

**Keywords:** *Chara fragilis*, H<sup>+</sup>-pumps, K<sup>+</sup>-channels, membrane potential, membrane resistance, plasmalemma, TEA<sup>+</sup>-iodide, vanadate

Submitted 23 December 2019. Published 31 October 2020

Хасанова А.Е.<sup>1</sup>, Мусаяєв Н.А.<sup>2</sup> 2020. **Біоелектричні характеристики клітин *Chara fragilis* (*Characeae*).** *Український ботанічний журнал*, 77(5): 398–404.

<sup>1</sup>Інститут ботаніки, Національна академія наук Азербайджана  
Бадамдарське шосе, 40 Баку AZ1004, Азербайджан

<sup>2</sup>Відділ біофізики та молекулярної біології, Бакинський державний університет  
вул. Академіка Західа Халілова, 23, Баку AZ1148, Азербайджан

**Реферат.** За допомогою методу Хогга вперше отримані дані з розподілу потенціалу ( $\varphi_m$ ) та опору ( $R_m$ ) плазматичної мембрани та клітинної стінки ( $R_0$ ) клітин *Chara fragilis* у стандартних умовах за кількістю клітин *C. fragilis*. Метод Хогга дозволяє одночасно вимірювати електрофізіологічні параметри  $\varphi_m$  і  $R_m$ . Стационарні значення мембранного потенціалу та опору варіювали в досить широкому діапазоні:  $-90\ldots-300$  мВ та  $1,0\ldots32,6$  Ом $\cdot$ м<sup>2</sup>, відповідно. Середнє значення  $\varphi_m$  становило  $-183,0 \pm 4,9$  мВ,  $R_m$   $-9,0 \pm 1,2$  Ом $\cdot$ м<sup>2</sup>. Із застосуванням стандартних модифікаторів мембранного транспорту здійснена диференціація електрогенної активності клітин на два типи: K<sup>+</sup>-каналів та H<sup>+</sup>-мембранних насосів. Діапазони активації K<sup>+</sup>-каналів внутрішнього та зовнішнього випрямлення становили  $-130\ldots-50$  та  $-300\ldots-162$  мВ відповідно, цитозольна активність K<sup>+</sup>-іонів – 61,6 ммоль/л. Оскільки в наших дослідженнях клітини *C. fragilis* використовувалися вперше, перевірялася їхня електрогенна активність та іонна провідність з використанням метаванадату амонію (VO<sub>5</sub><sup>-</sup>) – інгібітора протонної помпи та тетраетиламонію (TEA<sup>+</sup>) – універсального блокатора K<sup>+</sup>-каналів плазматичних мембран. Клітини *C. fragilis* можуть бути рекомендовані як тест-об'єкт для встановлення механізмів зміни мембранного транспорту в плазматичній мембрані під впливом екзогенних чинників та стресових факторів.

**Ключові слова:** *Chara fragilis*, H<sup>+</sup>-насоси, K<sup>+</sup>-канали, ванадат, мембранний опір, мембранний потенціал, плазмалема, TEA<sup>+</sup>-йодид

© 2020 A.E. Hasanova, N.A. Musayev. Published by the M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

## Introduction

Experimental studies of *Chara* algae contributed to establishing the components and kinetic characteristics of primary active transport in the plasma membrane of plant cells (Yurin et al., 1991; Véry, Sentenac, 2003; Volkov, 2006), and to revealing the mechanisms of modification of membrane transport by a number of xenobiotics, pharmacological agents, etc. (Musayev et al., 2009; Musayev, 2012). The application of *Chara* algae as a test object is not restricted to the study of cellular mechanisms of the above listed exogenous stimuli action. Isolated *Chara* cells are a very promising tool for detecting adaptive reactions during the modification of membrane transport in the plasma membrane under stress (Demidchik, 2012). To this end, the involvement of new objects with different electrochemical and kinetic characteristics could stimulate identifying meaningful patterns of the response of isolated cells and plants in general to exogenous stimuli. This paper describes the bioelectric parameters of the cells of *Chara fragilis* Desvaux, which we first introduced into the electrophysiological practice. Using specific modifiers of the transport properties of the plasma membrane, the components of the primary active transport and electrogenic activity of *C. fragilis* cells were identified.

The use of vanadate, an inhibitor of H<sup>+</sup>-pumps (Opritov, 2000; Larskaya, Zabotin, 2001), could provide valuable information about the possible interactions of the two components of the ion transport system in the plasma membrane of plant cells – H<sup>+</sup>-pumps and K<sup>+</sup>-channels. Such studies are especially important for cells of freshwater alga *C. fragilis*, since so far there is insufficient information about transport properties of the plasma membrane of these cells (Hasanova et al., 2017). Thereby this work is devoted to the study of the electrogenic and diffusion properties of the plasma membrane of *C. fragilis* under the influence of different concentrations of ammonium vanadate. The aim of the work is to monitor the state of K<sup>+</sup>-channels at inhibition of the electrogenic transport implemented by the H<sup>+</sup>-pumps of the plasmalemma.

The established facts indicate a close relationship between the two main components of the ion transport system of the plasma membrane, can be used in constructing a general theory of the interaction of xenobiotics with biological membranes. The high sensitivity of *C. fragilis* cells to low concentrations of the inhibitor can be used for express diagnostics of the ion transport system of plant cells.

## Materials and methods

The object of the study was the alga *Chara fragilis* found in a small pond, a collector of sewage from a number of mountain springs, on the territory of "Katib Bulagy" in the Tovuz Region of the Azerbaijan Republic. *Chara fragilis* belongs to the family *Characeae* Ag. emend. Hollerb. of the *Charophyceae* class. Taxonomic position of the alga was identified by its anatomical and morphological characteristics using the *Guide to Fresh-Water Algae of the USSR* (Gollerbach, Krasavina, 1983), with the kind support of the algologists of the Institute of Botany, National Academy of Sciences of Azerbaijan.

The length of mature internodal cells of *C. fragilis* reached 6–11 cm with 0.3–1.0 mm diameter. Due to the large size, the internodal cells of *C. fragilis* may be used for several days in the microelectrode assays. The mineral composition of the "Katib Bulagy" water was determined by atomic absorption spectroscopy AAS-1 spectrophotometer company Bruker, Germany, corresponded to the mineral composition of artificial pond water (APW), containing 0.1 M K<sup>+</sup>, 1 M Na<sup>+</sup>, 0.4 M Ca<sup>2+</sup>, 0.3 M Mg<sup>2+</sup>-cations and Cl<sup>-</sup>, HCO<sup>3-</sup>, NO<sup>3-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-anions at pH 6.9–7.2 (Hasanova et al., 2017). Plants harvested from the "Katib Bulagy" pond were well adapted to laboratory conditions. Plants were grown on APW, in aquariums with 0.3 × 0.4 × 0.5 m dimension under room light conditions (with intensity 6 W/m<sup>2</sup>) 12–14 hours per day. The optimal temperature ranges for growing *C. fragilis* was 18–23 °C. Increasing the temperature of growing medium to 30 °C and higher was lethal for the plants.

The cells no longer than 20 mm in length were used in the experiments to ensure the high accuracy of membrane resistance measurement. This value corresponded to the length of the second cell from the top of the *C. fragilis* plants. The day before the experiments, an intranodal cell of *C. fragilis*, second from the top, was separated from neighbor internodes and placed in Petri dish with a standard nutrient medium. It was necessary for an accurate assessment of the direction of fluxes and gradients of electrochemical potentials. To measure the main electrophysiological parameters (the membrane resistance R<sub>m</sub>, the potential φ<sub>m</sub> of the plasma and vacuolar membranes) we used the two-electrode Hogg method (Hogg et al., 1968) developed for cells having a cylindrical shape. The Hogg method made it possible to simultaneously register the membrane potential φ<sub>m</sub> and resistance R<sub>m</sub> in algal cells for many hours. The direct current pulses with a density of 10<sup>-4</sup>

A/m<sup>2</sup> in a duration of 2–3 seconds was transmitted through one microelectrode introduced into the center of the cell. Values  $\varphi_m$  and the electrotonic potential  $\Delta U$  generated by passing a direct current through the cell was recorded via the second microelectrode. We also carried out a measurement of the current passing through the middle of the experimental cell. The numerical value of the current was determined by the voltage drop at the etalon resistance, connected in series with the experimental cell in the current circuit.  $R_m$  of cells is calculated by the formula

$$R_m = \frac{\Delta U}{I} \pi dl,$$

where I – current transmitted through the middle of the cell, l, d – length and diameter of the experimental cell.

APW was used as a solvent in the preparation of working solutions of inhibitors and blockers. Cells were treated with inhibitors or blockers in the measuring chamber during measurement, not in Petri dishes. The growth medium (APW) or working solution was regularly introduced into the corresponding part of the measuring chamber using thin (1.5 mm diameter) silicone tubes (inflow tube), and then removed using these tubes (outflow duct). To treat cells with APW modifiers in the measuring chamber, they were replaced with appropriate solutions.

Statistical processing of experimental results was carried out according to the laws of variation statistics (Lakin, 1990) using of computer programs Excel-2016 and SigmaPlot 12.0.

## Results

### Statistical analysis of the electrophysiological parameters of *Chara fragilis* cells under standard conditions

Since the *C. fragilis* cells were first introduced by us in the practice of electrophysiological research, we needed to conduct a statistical analysis of the distribution of electrophysiological parameters by the number of cells in standard conditions. It was found that the stationary values of  $\varphi_m$  and  $R_m$  varied in a rather wide range: –90...–300 mV and 1.0–32.6 Ohm·m<sup>2</sup>, respectively. The average value of  $\varphi_m$  was  $-183.0 \pm 4.9$  mV. The sample size m of the experimental material was 106. The distribution of  $\varphi_m$  obeyed to the Gauss – Moivre – Laplace law of normal distribution. The value of the membrane

resistance, which is calculated from the resistance level of the cell membrane, was  $9.0 \pm 1.2$  Ohm·m<sup>2</sup> (m = 45). The distribution of the set of values of  $R_m$  did not obey the law of normal distribution. The distribution curve compresses on the right. The majority of cells were characterized by less resistance (more conductivity).

Upon contact of the measuring microelectrode tip with the cell membrane under standard environmental conditions, a signal was recorded which value was  $\varphi_0 = -30.0 \pm 2.5$  mV (m = 28). It represents the potential of the cell membrane relative to the environment, and this value is commonly called the potential of the cell wall. By passing current through the cell with a current microelectrode, on the cell wall a voltage drop was recorded  $\Delta U_0$ , by which the value of its resistance  $R_0 = 3.8 \pm 0.7$  Ohm·m<sup>2</sup> (m = 28) was calculated.

The number of classes was determined by the formula proposed by Brooks and Caruzer and amounted 10. The sample size m of the experimental material was 106, the class interval i = 21 mV. Therefore, we presented the variational series  $\varphi_m$  as a distribution of the total volume between 11 classes (Fig. 1). The variational series of  $\varphi_m$ , represented as a histogram, had a maximum at –174 mV.

The estimation of this value, according to our empirical data, yielded  $\chi^2 = 16.75$ . And the theoretical value of critical value for the 0.5% significance level was 16.75, i.e.  $\chi^2 = \chi^2_{kr}$ . This means that the distribution of  $\varphi_m$  in classes corresponds to the normal distribution.

The reached stationary levels of  $\varphi_m$  and  $R_m$  under standard conditions were stable for several hours. Spontaneous transitions of  $\varphi_m$ ,  $R_m$  to other levels were not detected.

Similar calculations were made for the membrane resistance. The distributions of the empirical and theoretical frequencies sharply differed among themselves. The distribution of the set of values of  $R_m$  did not obey the law of normal distribution. There was no correlation between  $\varphi_m$  and  $R_m$ . The correlation coefficient between these values was  $r = -0.019878$ . In the total set of cells, proportion of cells with increased conductivity dominated.

### Electrogenic activity and conductivity of plasma membrane in *Chara fragilis* cells under influence of vanadate

The next step in our research was testing the limits of the electrogenic activity of the H<sup>+</sup>-pumps and the conductivity of K<sup>+</sup>-channels of the plasma membrane using the appropriate modifiers. The electrogenic composing of the membrane potential was determined using vanadate,



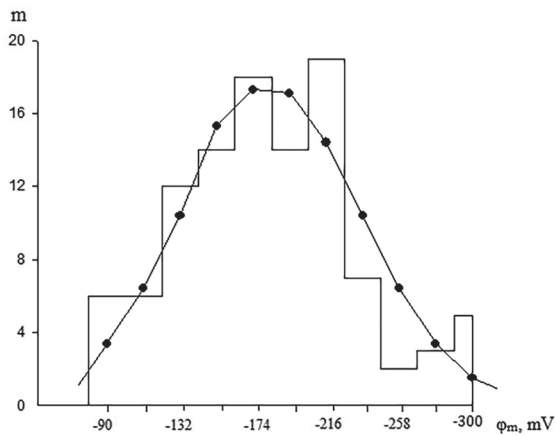


Fig. 1. Histogram of the membrane potential  $\varphi_m$  distribution of the *Chara fragilis* by the number of cells (m). The figure shows the theoretical frequencies calculated from the variation statistics of the dotted variants. A continuous line shows the calculated normal distribution

a common inhibitor of  $H^+$ -pumps of plasmalemma. The minimum concentration of the inhibitor, which caused a noticeable depolarization of the plasmalemma, was  $10^{-5}$  M. An increase of its concentration in the medium up to  $10^{-3}$  M, led to the depolarization of the plasmalemma to 80–100 mV within 30–60 min (Fig. 2).

In 89% of the cells of the total population,  $VO_3^-$ -induced depolarization of the plasma membrane was accompanied by a monotonic decrease of the  $R_m$ . The relative decrease in  $R_m$  in these cells under the influence of a  $10^{-4}$  M inhibitor for 33–30 minutes was 33%, but under the influence of the most effective concentration of the inhibitor  $10^{-3}$  M was 14% (Fig. 2).

The removal of the inhibitor from the solution of artificial pond water was accompanied by the restoration of the  $\varphi_m$ ,  $R_m$  values in the investigated cells. However,  $\varphi_m$ , as a rule, was restored to levels exceeding the initial level on 36 mV. On the contrary, under normal environmental conditions after inhibitory treatment, the final  $R_m$  levels of of the investigated cells processing were 7–8% lower than the initial values (Fig. 2).

### Electrophysiological analysis of changes in the kinetics of $\varphi_m$ and $R_m$ in *Chara fragilis* cells under the influence of tetraethyl ammonium

To test the electrogenic activity of *C. fragilis* cells while reducing the shunt load of  $H^+$ -pumps of plasma membrane, we used in our measurements iodide salt of tetraethyl ammonium ( $TEA^+$ ) – a blocker of all types of  $K^+$ -channels. The minimum concentration of the blocker that caused the primary bioelectric response of the cells

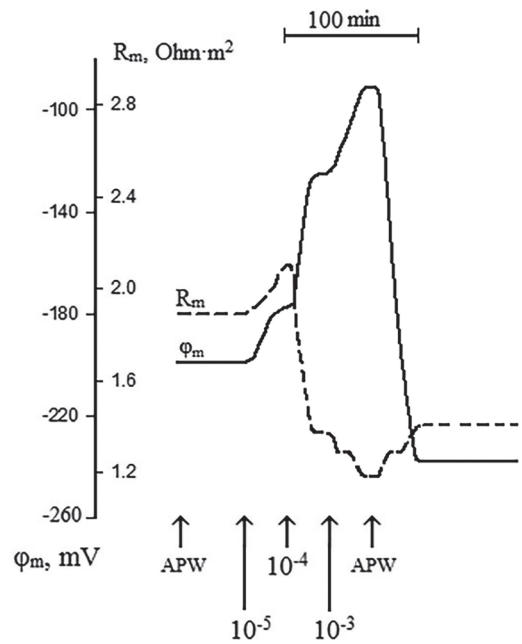


Fig. 2. The potential  $\varphi_m$  and resistance  $R_m$  of the plasma membrane of *Chara fragilis* cells in the presence of vanadate. The arrows indicate the moments of the appropriate concentrations (molar) addition in the nutrient medium (APW). Cell size: length 7.1 mm, diameter 0.325 mm

was  $10^{-7}$  M in the medium. The electrophysiological reaction of the plasma membrane of *C. fragilis* was rather complicated in the presence of different blocker concentration in the medium (Fig. 3).

### $K^+$ -characteristics of *Chara fragilis* cells

The dependences of  $\varphi_m$  and  $R_m$  on the  $K^+$ -concentration in the medium were illustrated by three-phase curves (Fig. 4). The first phase of the dependence in the range of  $\varphi_m$   $-300 \dots -165$  mV probably shows the activation of  $K^+$ -channels of inward rectification (KCIR), and the third phase in the range of  $\varphi_m$   $-120 \dots -50$  mV –  $K^+$ -outward rectifying channels (KCOR). The second phase can probably be called a transition phase, because presumably the partial inactivation of the  $K^+$ -inward rectifying channels and activation of the  $K^+$ -outward rectifying channels occur in this phase.

For the other *Chara* species, the  $K^+$ -equilibrium potential in a medium with  $10^{-4}$  M  $K^+$  corresponded to the boundary range of the activation for two kinds of  $K^+$ -channels. According to it,  $\varphi_m$  for *C. fragilis* is  $-162$  mV (Fig. 4). In view of this value, the intracellular activity of  $K^+$ -ions ( $a_{K^+}$ ) can be calculated from the Nernst formula, which was 61.6 mmol/L.

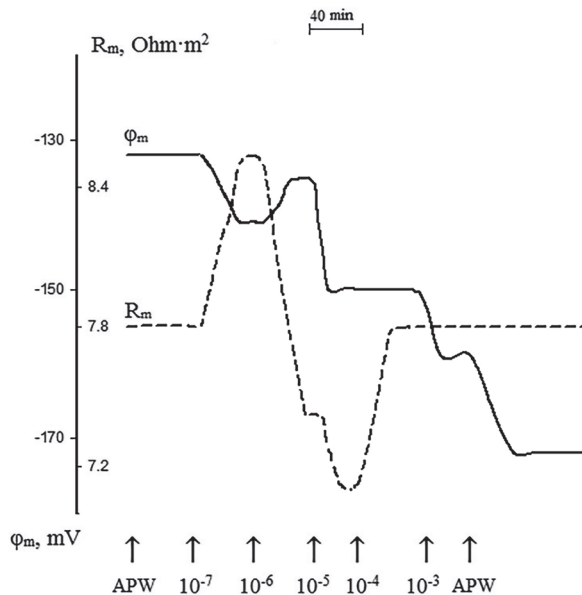


Fig. 3. Changes of the potential  $\phi_m$  and resistance  $R_m$  of the plasma membrane of the *Chara fragilis* cells with a progressive increase in TEA<sup>+</sup>-iodide concentration  $10^{-7}$ – $10^{-3}$  M in the nutrient medium. The arrows indicate the moments of the appropriate concentrations (molar) addition in the nutrient medium (APW). Cell size: length 10.6 mm, diameter 0.45 mm

## Discussion

The established ranges of  $\phi_m$  reflecting the conductivity states of the two types of K<sup>+</sup>-channels are consistent with the analogous parameters of other species of *Characeae*: *Nitella flexilis* (Musayev et al., 2008; Musayev, 2012), *Chara gymnophylla* (Sokolik, Yurin, 1986; Musayev, Ismailov, 2007) and *Nitellopsis obtusa* (Musayev, 2012). For these cells, the measured K<sup>+</sup>-equilibrium potential in a medium with  $10^{-4}$  M K<sup>+</sup>-corresponded to the boundary of the activation ranges for two kinds of K<sup>+</sup>-channels. According to this position,  $\phi_k$  for *Chara fragilis* is  $-162$  mV (Fig. 4). In view of this value, the intracellular activity of K<sup>+</sup>-ions ( $a_k$ ) can be calculated from the Nernst formula, which was 61.6 mmol/L. The obtained value of  $a_k$  is much lower than in *Nitellopsis optusa* cells (Musayev, 2012). However, it is comparable to the value of  $a_k$  established for another species of *Chara* – *C. gymnophylla* (70 mmol/L) (Musayev, Ismailov, 2005).

The electrogenic composing of the membrane potential was determined using vanadate – a common inhibitor of H<sup>+</sup>-pumps of plasmalemma. The inhibitor has been most effective in concentration  $10^{-3}$  M. The addition of an inhibitor at this concentration to the standard medium caused depolarization of the plasma membrane by  $-170$ ... $-180$  mV in cells with the initial

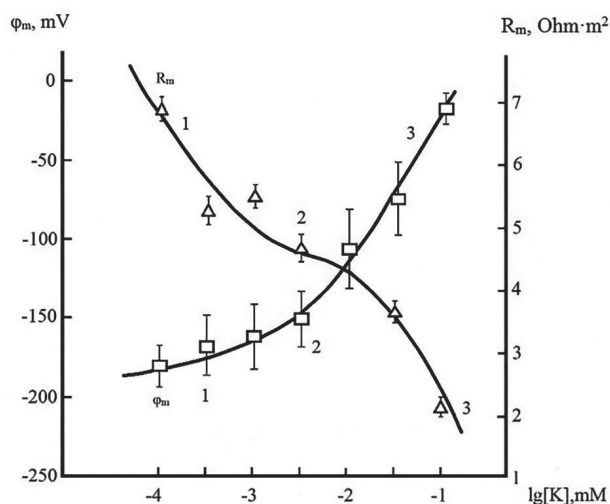


Fig. 4. Dependence of stationary values of  $\phi_m$  and  $R_m$  of the PM of *Chara fragilis* cells on the concentration of KCl in the APW. The marks 1, 2, 3 on the curves indicate the particular phases of change of the corresponding values. Each point reflects the average of the measured values of  $\phi_m$  and  $R_m$  for 9–10 cells. Vertical lines indicate the standard deviation of the mean of  $\phi_m$  and  $R_m$

$\phi_m = -250$  mV (Fig. 2). This indicates a significant contribution of H<sup>+</sup>-pumps to the electrogenic activity of the plasma membrane of *C. fragilis*. The decrease  $R_m$  on the background of progressive depolarization of the plasma membrane represents the massive activation of K<sup>+</sup>-outward rectifying channels, that was also found in *C. gymnophylla* cells (Musayev et al., 2008).

For testing the electrogenic activity of *C. fragilis* with a decrease in the shunt load of H<sup>+</sup>-pumps of plasma membrane, we used iodide salt of tetraethyl ammonium (TEA<sup>+</sup>) – a blocker of all types of K<sup>+</sup>-channels (Yurin et al., 1991). The minimum concentration of the blocker that caused the primary bioelectric response in the cells was  $10^{-7}$  M. The electrophysiological reaction of *C. fragilis* plasma membrane was rather complicated in the presence of different blocker concentration in the medium (Fig. 3). When analyzing the kinetics of the electrophysiological reaction, it is necessary to consider the multifacetedness of the blocking action of TEA<sup>+</sup>. In the cells of *Nitella flexilis* (Vysotskaya et al., 2005) and *C. gymnophylla* (Musayev, Vorobev, 1983), TEA<sup>+</sup>-blocking of K<sup>+</sup>-channels led to stimulation of the H<sup>+</sup>-pump of the plasma membrane and reduction of its integral resistance. Earlier, we also observed changes in the structural-polarization state in the cells of *Nitellopsis obtusa* under the influence of the blocker (Musayev, Vorobev, 1983).

The distribution of the potential and resistance by the number of cells indicates that a significant part of the total number is composed of cells with high electrogenic activity.

## Conclusion

Based on the results reported in this study, it can be proposed that the interstitial cells of *Chara fragilis* with stable electrophysiological parameters can serve as a new promising object for the investigation of the membranotropic actions of exogenous stimuli, including xenobiotics, nanoparticles, phytoprotectors, pharmacological agents, etc. Established dependencies of the resistance and potential of the plasma membrane on the concentration of  $K^+$  in the medium made it possible to identify the ranges of the membrane potential within which the  $K^+$ -channels of the inward or outward rectification are in the conducting state. Inhibitory analysis allowed to determine the proportion of the electrogenic component in the total membrane potential. Accordingly, the differentiation of the membrane potential into  $K^+$ -channels and  $H^+$ -pumps was implemented. Significant values of the potential and resistance of the cell membrane allow the using of isolated *C. fragilis* cells for studying the ion-exchange properties of the plant cell membranes.

## References

- Demidchik V.V. 2012. Membrane mechanisms of regulation of the activity of calcium ions in the cytoplasm of cells of higher plants. *Proceedings of the BSU. Series Physiological, biochemical and molecular basis of biosystems*, 7(1): 99–105. [Демидчик В.В. 2012. Мембранные механизмы регуляции активности ионов кальция в цитоплазме клеток высших растений. – *Труды БГУ. Серия Физиологические, биохимические и молекулярные основы биосистем*, 7(1): 99–105].
- Gollerbach V.I., Krasavina L.K. 1983. *Key to freshwater algae of the USSR*. Leningrad: Nauka, 185 pp. [Голлербах В.И., Красавина Л.К. 1983. *Определитель пресноводных водорослей СССР*. Ленинград: Наука, 185 с.].
- Hasanova A., Najafaliyeva Sh., Aliyeva P., Musayev N. 2017. *Chara fragilis* cells – a new object for electrophysiology research. *Journal of Baku Engineering University – Chemistry and Biology*, 1(2): 176–182.
- Hogg J., Williams E.J., Jhonston R.I. 1968. *A simplified method for measuring membrane resistances Nitella translucens*. *Biochemistry et Biophysics Acta*, 150: 1–518.
- Lakin G.F. 1990. *Biometrics*. Moscow: Visshaya Shkola, 352 pp. [Лакин Г.Ф. 1990. *Биометрия*. Москва: Высшая школа, 352 с.].
- Larskaya I.A., Zabotin A.I. 2001. The study of changes in the activity of the proton pump of the plasmalemma during low-temperature hardening of winter wheat seedlings. *Bulletin of the Bashkir University*, 2: 87–90. [Ларская И.А., Заботин А.И. 2001. Исследование изменения активности протонной помпы плазмалеммы при низкотемпературном закаливании проростков озимой пшеницы. *Вестник Башкирского университета*, 2: 87–90].
- Musayev N.A., Vorobev L.N. 1983. The state of the  $K^+$ -channels of the membranes of plant cells and the regulation of their photoelectric activity. *Izvestiya AN AzSSR. Series Biological Sciences*, 3: 91–101. [Мусаев Н.А., Воробьев Л.Н. 1983. Состояние  $K^+$ -каналов мембран растительных клеток и регулирование их фотоэлектрической активности. *Известия АН АЗССР. Серия биологические науки*, 3: 91–101].
- Musayev N.A., Ismailov E.R. 2005. Bioelectric characteristics of *Chara gymnophylla* cells. *Izvestiya NAS of Azerbaijan. Series Biological Sciences*, 3–4: 196–214. [Мусаев Н.А., Исмаилов Э.Р. 2005. Биоэлектрические характеристики клеток *Chara gymnophylla*. *Известия НАН Азербайджана. Серия биологические науки*, 3–4: 196–214].
- Musayev N.A., Ismailov E.R. 2007. Bioelectrical properties of *Chara gymnophylla* plasmamembrana during interaction with cobalt ( $Co^{2+}$ ). *Ecoloji*, 63: 1–6.
- Musayev N.A., Yurin V.M., Sokolik A.I., Ismailov E.R. 2008. Electrogenic activity of the plasma membrane of *Chara gymnophylla* cells when  $K^+$ -channels are blocked by tetraethylammonium. *Bulletin of Belarus State University*, 2(2): 46–49. [Мусаев Н.А., Юрин В.М., Соколик А.И., Исмаилов Э.Р. 2008. Электрогенная активность плазматической мембраны клеток *Chara gymnophylla* при блокировании  $K^+$ -каналов тетраэтиламмонием. *Вестник Белорусского государственного университета*, 2(2): 46–49.].
- Musayev N.A., Yurin V.M., Sokolik A.I. 2009. Potential, resistance and electric capacity of the plasma membrane of *Nitellopsis obtusa* cells under the action of diethylstilbestrol. *Trudy Belaruskogo gosudarstvennogo universita. Series Physiological, Biochemical and Molecular Foundations of the Functioning of Biosystems*, 4(1): 74–78. [Мусаев Н.А., Юрин В.М., Соколик А.И. 2009. Потенциал, сопротивление и электрическая ёмкость плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa* при действии диэтилстилбестрола. *Труды Белорусского государственного университета. Серия Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*, 4(1): 74–78].
- Musayev N.A. 2012. *Biophysical mechanisms for modifying the transport properties of the plasma membrane of plant cells*: Dr. Sci. Diss. Baku, Institute of Botany, 334 pp. [Мусаев Н.А. 2012. *Биофизические механизмы модификации транспортных свойств плазматической мембраны растительных клеток*: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.02. Баку, Институт ботаники, 334 с.].
- Opritov V.A. 2000.  $H^+$ -ATPase of the plasma membrane is the main electrogenic system of higher plants. *Biology*, 6(2):

- 28–32. [Опритов В.А. 2000. H<sup>+</sup>-АТФаза плазматической мембраны – основная электрогенная система высших растений. *Биология*, 6(2): 28–32].
- Sokolik A.I., Yurin V.M. 1986. Potassium channels in plasmalemma of *Nitella* cells at rest. *Journal of Membran Biology*, 89(1): 9–22.
- Véry A., Sentenac H. 2003. Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup>-transport in higher plants. *Journal of Annual Review of Plant Biology*, 54: 575–603.
- Volkov G.A. 2006. *Plant Electrophysiology: Theory and methods*. New York: Springer-Verlag, 264 pp.
- Vysotskaya J.V., Sokolik A.I., Yurin V.M. 2005. The interaction of ion transport mechanisms on the plasma membrane of plant cells: potassium channels and a hydrogen pump. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya*, 2: 50–54. [Высоцкая Ж.В., Соколик А.И., Юрин В.М. 2005. Взаимодействие механизмов ионного транспорта на плазматической мембране растительных клеток: калиевые каналы и электрогенная водородная помпа. *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*, 2: 50–54].
- Yurin V.M., Sokolik A.I., Kudryashov A.P. 1991. *Regulation of ion transport across plant cell membranes*. Minsk: Nauka i tekhnika, 272 pp. [Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. 1991. *Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток*. Минск: Наука и техника, 272 с.].

Recommended for publication by I.V. Kosakivska



## Іван Іванович КОРШИКОВ

(до 70-річчя від дня народження та 50-річчя наукової діяльності)



4 вересня 2020 року виповнилося 70 років відомому українському вченому, доктору біологічних наук, професору І.І. Коршикову.

Народився Іван Іванович в с. Прудентове Приазовського району Запорізької області. Після школи в 1967 р. вступив до Кримського сільськогосподарського інституту ім. М.І. Калініна, який закінчив у 1972 р., отримавши диплом вченого-агронома з відзнакою. Дипломну роботу виконував у Всесоюзному НДІ виноградарства і виноробства "Магарач" (м. Ялта). Півтора роки працював у дослідному господарстві Українського НДІ зрошувального садівництва (м. Мелітополь). У 1973 р. Іван Іванович розпочав працювати у відділі фізіології стійкості рослин Донецького ботанічного саду АН УРСР, тут у 1975 р. вступив до аспірантури. Кандидатську дисертацію на тему "Фитотоксичность фенольных ингредиентов загрязнения окружающей среды" захистив у Вільнюському університеті ім. В. Капсукаса (Литва) у 1981 р. Після цього працював на посаді старшого наукового співробітника відділу фізіології стійкості рослин, який очолив у 1990 р. Докторську дисертацію на тему "Адаптація рослин до умов техногенно забрудненого середовища" захистив у Київському національному університеті ім. Т.Г. Шевченка у 1994 р. На посаді завідуючого відділом, який згодом (у 1997 р.) був перейменований у відділ промислової ботаніки та популяційної генетики, І.І. Коршиков працював до 2014 р. 3 липня

2015 року і донині він очолює Донецький ботанічний сад НАН України, а одночасно з березня 2016 року є директором Криворізького ботанічного саду НАН України.

Усьє період своєї наукової кар'єри Іван Іванович розвиває такий науковий напрям, як промислова ботаніка. Ці дослідження були спрямовані на вивчення впливу техногенного середовища на рослини та їх використання для індикації його стану і надання рекомендацій щодо його оптимізації. Вони проводились на різних рівнях – фізіолого-біохімічному, молекулярно-генетичному, популяційному і фітоценотичному, а їхні результати викладені в 470 наукових працях. Серед них близько 60 статей надруковані у провідних фахових періодичних виданнях, які належать до міжнародної науково-метричної бази *Scopus*, 6 монографій та 20 патентів.

У галузі промислової ботаніки дослідження в першу чергу були орієнтовані на вивчення стійкості та адаптації рослин до викидів промислових підприємств, вихлопних газів автотранспорту при поселенні рослин на докорінно техногенно порушених землях та відвалах вугільних шахт, залізрудних кар'єрів, содового виробництва. І.І. Коршикову одному з перших вдалося довести, що аерополітанти пошкоджують листя рослин не тільки внаслідок прямої дії, але й опосередковано через активацію процесів перекисного окислення ліпідів у їхніх клітинах. Ним були визначені стійкі види деревних рослин для озеленення територій і санітарно-захисних зон металургійних комбінатів, коксохімічних і хімічних заводів Донбасу та рекультиватії териконів і відвалів содового виробництва.

І.І. Коршиков є відомим фахівцем з експериментальної ботаніки, перш за все завдяки вивченню внутрішньо- і міжвидової мінливості та її ролі у збереженні і відновленні популяційного різноманіття деревних рослин. Ще в середині 80-х років ХХ століття він одним з перших почав використовувати метод електрофоретичного ізоферментного

аналізу як маркерної системи для визначення генотипу рослин. Перші його дослідження були присвячені з'ясуванню питань змін рівнів мінливості популяцій сосни звичайної (*Pinus sylvestris*), які деградує від пошкоджуючого впливу емісії великих хімічних комбінатів, втрат генетичного різноманіття в інтродукційних популяціях і відмінностей мікропопуляційної структури рослин, що стихійно колонізують промислові відвали.

Упродовж 10 років разом з аспірантами та учнями І.І. Коршиков проводив дослідження популяційно-генетичного різноманіття пралісів видів родини *Pinaceae* в Українських Карпатах, а також його відновлення в насінневому потомстві. Було встановлено, що реліктові карпатські популяції *Pinus sylvestris* мають нижчий рівень мінливості порівняно з лісостеповими та степовими популяціями Лівобережної України. Найнижчий рівень мінливості був встановлений для сосни кедрової європейської (*Pinus cembra*), яка росте на верхній межі поширення лісів у Карпатах. Було виявлено, що острівні популяції ялини звичайної (*Picea abies*) у Поліссі мало відрізняються за рівнем гетерозиготності від популяцій Карпат, структура яких диференційована за висотним профілем, як і сосни кримської (*Pinus pallasiana*) у Гірському Криму. Детально було досліджено популяційно-генетичне різноманіття трьох видів роду *Pinus* та п'яти видів роду *Juniperus* Гірського Криму.

Важливим практичним результатом стало дослідження І.І. Коршиковим генетичних особливостей плюсових дерев *Pinus sylvestris* та їхнього насінневого потомства, а також дерев інших видів хвойних, що відзначаються високою репродуктивною здатністю повноцінного насіння з підвищеним рівнем гетерозиготності. І.І. Коршиков одним з перших в Україні почав використовувати точні методи в геносистематиці рослин і показав, що *Pinus cretacea* і *P. kochiana* не є самостійними видами, а у високогір'ях Карпат відсутній такий вид, як *Picea montana*.

Особливу увагу І.І. Коршиков приділяє формуванню окремих мікропопуляцій рослин, які колонізують промислові відвали різних рудовидобувних підприємств (на прикладі *Pinus sylvestris* і *P. pallasiana*, що самостійно заселяють залізрудні відвали Криворіжжя, а перший вид – ще й відвали содового виробництва). Вченим показано, що ці мікропопуляції знаходяться у врівноваженому стані за рівнем гетерозиготності, мало поступаються корінним популяціям з їхнього природного ареалу.

Результатом цих досліджень стало розроблення та патентування методів сприяння розвитку деревної і трав'яної рослинності на промислових відвалах. Завдяки вивченню біології росту й розвитку окремих видів рослин були розроблені та впроваджені на площі 150 га способи пилопригнічення промислових пустель Криворіжжя – хвостосховищ залізрудних комбінатів, що дозволило отримати значний як соціальний, так і економічний ефекти.

І.І. Коршиков був і є керівником багатьох наукових тем у галузі промислової ботаніки. Упродовж своєї наукової діяльності він проводив пошук параметрів рослин (від цитогенетичних до морфометричних), чутливих до впливу техногенно забрудненого середовища для використання в біоіндикаційних цілях його стану. В останні роки під його керівництвом проводиться вивчення урбанодендрофлори промислових міст Донбасу та Правобережного степового Придніпров'я для використання рослин в оптимізації міського середовища. За результатами цих досліджень підготовлено рукопис колективної монографії "Деревні рослини в умовах промислових міст Степу".

Іван Іванович Коршиков підготував двох докторів та 19 кандидатів наук за спеціальностями: молекулярна генетика; генетика; цитологія, клітинна біологія і гістологія; фізіологія рослин; ботаніка; екологія.

Ювіляр є лауреатом премії імені В.Я. Юр'єва, нагороджений відзнаками НАН України: "За підготовку наукової зміни", "Пам'ятною відзнакою на честь 100-річчя Національної академії наук України", "За наукові досягнення", а також грамотами Президії НАН України, Донецької обласної і міської рад.

Наукові праці І.І. Коршикова використовуються в навчальному процесі біологічних факультетів провідних університетів України. Незважаючи на непередбачені вимушені зміни місця роботи, Іван Іванович повний наснаги й творчих задумів, він продовжує їх реалізовувати в наукових дослідженнях, одночасно керуючи двома ботанічними установами НАН України.

Щиро вітаємо Івана Івановича з ювілеєм, бажаємо доброго здоров'я та нових наукових здобутків!

Я.В. ПІРКО, Н.М. ПІРКО, Л.О. КАЛАФАТ,  
С.М. ПРИВАЛІХІН, А.Є. ДЕМКОВИЧ,  
Ю.О. БІЛОНОЖКО, Ю.В. ЛИХОЛАТ, С.М. БОЙКО,  
Г.В. БОЙКО, Я.Б. БЛЮМ



Світлій пам'яті  
Миколи Павловича КОЗЛОВСЬКОГО  
(28.10.1956 – 24.05.2020)



24 травня 2020 року, після тяжкої хвороби, на 64 році життя, відійшов у Вічність відомий український учений-еколог, організатор науки, фахівець у галузі екології угруповань фітонематод та індикації екологічного стану лісових екосистем, директор Інституту екології Карпат НАН України, доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України Микола Павлович Козловський.

Народився М.П. Козловський 28 жовтня 1956 р. в с. Лобачівка Горохівського р-ну Волинської обл. Після завершення навчання на біологічному факультеті Львівського державного університету імені Івана Франка (1974–1979 рр.) він розпочав свою професійну діяльність у відділі біогеоценології Львівського відділення Інституту ботаніки АН України ім. М.Г. Холодного (від 1991 р. – Інститут екології Карпат НАН України). Кандидатську дисертацію на тему "Нематодні комплекси грабових дібров верхів'я басейну Дністра та їх біогеоценотична роль" захистив у 1988 р. під керівництвом члена-кореспондента НАН України М.А. Голубця. Вчене звання старшого наукового співробітника за спеціальністю "екологія" М.П. Козловський отримав у 2000 р. Докторську

дисертацію під назвою "Біоіндикаційні властивості фітонематодних угруповань наземних екосистем Карпатського регіону" захистив у 2007 р., звання члена-кореспондента НАН України йому було надано в 2018 р. В Інституті екології Карпат НАН України Микола Павлович пройшов шлях від інженера до директора, на посаді якого був затверджений в 2010 р.

Наукову діяльність М.П. Козловський розпочав з дослідження екологічної ролі маловивченої групи ґрунтових організмів – фітонематод у функціонуванні лісових екосистем. Його кандидатська дисертація була першою роботою в колишньому СРСР з вивчення цієї групи тварин, яку він захистив за спеціальністю "екологія". Цим дослідженням вчений присвятив всю свою наукову діяльність, й започаткував новий напрям – "екологія угруповань фітонематод".

М.П. Козловський встановив загальні закономірності формування нематодних угруповань у первинних екосистемах висотних поясів рослинності Українських Карпат і визначив основні риси структурних змін цих угруповань у вторинних біогеоценозах. Він також розробив схему участі нематодних угруповань у споживанні енергії в екосистемі. На основі досліджень споживання енергії трофічними групами ґрунтових нематод у первинних екосистемах лісового, субальпійського та альпійського поясів рослинності вивчив загальну закономірність цього процесу, що стало основою для розроблення методики оцінки змін функціональної організації ґрунтових нематод у вторинних екосистемах. Істотна різниця у функціональній організації угруповань ґрунтових нематод первинних і вторинних екосистем дозволила розробити класифікацію їхніх комплексів за функціональними ознаками. Дослідженнями вченого було показано, що ця закономірність також загалом властива для угруповань ґрунтових безхребетних тварин у первинних і вторинних біогеоценозах, що надало можливість використовувати ґрунтові нематоди в якості біоіндикаторів функціональної організації

угруповань ґрунтових безхребетних у наземних екосистемах.

Використання біоіндикаційних властивостей нематодних угруповань дало змогу ідентифікувати екосистеми первинного та вторинного типів і з'ясувати відмінності функціональної організації угруповань безхребетних ґрунту у вторинних екосистемах порівняно з первинними, охарактеризувати санітарний стан вторинних лісових і гірських агроекосистем. На основі цих досліджень обґрунтовано способи збереження природного різноманіття фітонематод і штучного регулювання структурно-функціональної організації фітонематодних угруповань з метою формування нефітопатогенних комплексів у лісових екосистемах, підвищення їхньої стійкості та продуктивності.

До нашого часу роботи М.П. Козловського з вивчення біоіндикаційних властивостей фітонематодних угруповань наземних екосистем не мають аналогів в Україні та за кордоном. Під його керівництвом було захищено 5 кандидатських дисертацій.

Результати досліджень М.П. Козловського мають також практичний аспект. Так, зокрема, він уперше встановив, що на гірських територіях у вторинних ялинових лісах формуються фітопатогенні ґрунтові нематодні комплекси, які негативно впливають на кореневу систему ялини європейської та є однією з причин погіршення її санітарного стану, а в окремих випадках і всихання. Вчасно проведені біоіндикаційні дослідження структури нематодних угруповань ґрунту дають можливість оцінити сучасний санітарний стан ялиників і передбачити перспективи їхнього подальшого розвитку на основі постійного моніторингу цього процесу. Схожа ситуація має місце й на Поліссі, де проведені дослідження всихаючих масивів соснових лісів і встановлена роль активізації аборигенних видів нематод у цих процесах під впливом кліматичних чинників, зокрема кількості опадів. Окрім цього, на території Сколівських Бескидів (Українські Карпати) у 1999 р. вченим уперше було виявлено поширення золотистої картопляної нематоди, що призвело до введення державного карантину на вирощування картоплі та запроваджено заходи щодо елімінації цих паразитичних організмів.

М.П. Козловський був керівником і виконавцем трьох міжнародних наукових проєктів. Під його керівництвом і за безпосередньої участі був виконаний перший в Україні спільний українсько-німецький проєкт "Трансформаційні процеси в регіоні верхів'я Дністра" під егідою ЮНЕСКО (1996–2008 рр.) й успішно завершений написанням колективної монографії "Transformation processes in the Western Ukraine" (2008).

Вчений є автором 180 наукових праць, у т.ч. монографії "Фітонематоди наземних екосистем Карпатського регіону" (2009), та співавтором 5 колективних монографій: "Антропогенні зміни біогеоценотичного покриву в Карпатському регіоні", "Екологічна ситуація на північно-східному макросхилі Українських Карпат", "Екологічний потенціал наземних екосистем", "Экология и фауна почвенных беспозвоночных Вольно-Подолья", "Концептуальні засади сталого розвитку гірського регіону".

М.П. Козловський був членом секції "Рационального природокористування" Комітету з Державних премій України в галузі науки і техніки, членом Бюро Виконкому Західного наукового центру НАН України та МОН України й головою секції "Екології, загальної біології та охорони природи", головним редактором наукового щорічного збірника Інституту екології Карпат НАН України "Наукові основи збереження біотичної різноманітності", членом редколегій низки інших періодичних наукових видань, членом Президії Лісівничої академії наук України.

Невблаганна хвороба перервала його життєвий шлях на злеті наукової творчості та науково-організаційних здобутків. Пам'ять про Миколу Павловича, талановитого вченого, принципового керівника, вірного товариша завжди буде жити в серцях його колег і друзів.

О.О. КАГАЛО, О.Г. МАРИСКЕВИЧ,  
Ю.В. КАНАРСЬКИЙ, В.Г. КИЯК,  
О.Г. ЛОБАЧЕВСЬКА, І.М. ШПАКІВСЬКА



**Пам'яті вченої**  
**МІЛКІНА Лідія Іванівна**  
**(18.12.1935 – 09.03.2020)**



9 березня 2020 року відійшла у Вічність доктор біологічних наук, колишній провідний науковий співробітник відділу охорони природних екосистем Інституту екології Карпат НАН України Лідія Іванівна Мілкіна.

Звичайно, час – поняття одномірне, і відхід з цього світу людей старшого віку явище закономірне, але з втратою людини погоджуватися завжди важко. Тим більше, коли перестає битися серце вченої, яка багато зробила для науки, присвятивши своє життя справі охорони природи Карпат, впровадила свої наукові розробки у практику. Померла людина високо освічена, яка добре знала свою справу і творчо підходила до вирішення наукових проблем.

Народилася Лідія Іванівна в с. Пестравка (тепер Самарської обл., РФ). Потім жила в с. Шушенському (Красноярський край, РФ), навчалася на біолого-грунтового факультеті Іркутського університету (РФ, 1954–1957). За сімейними обставинами (чоловік – офіцер) перевелася на біологічний факультет Львівського університету, який закінчила в 1961 р. за спеціальністю "ботаніка" та працювала в його науково-дослідному секторі протягом 1965–1968 рр. Від 1968 р. – у відділі експериментальної екології та біоценології Інституту ботаніки АН УРСР, який 1969 р. був переведений до Львівського державного природознавчого музею АН УРСР. У 1970 р. була затверджена на посаді молодшого наукового співробітника новоствореного відділу охорони природних екосистем Державного природознавчого

музею АН УРСР (Львів), який очолив д.б.н. Степан Михайлович Стойко. У цьому відділі, який після реорганізації Музею належав спочатку до Львівського відділення Інституту ботаніки АН УРСР (1974–1991), а від 1991 р. є у складі Інституту екології Карпат НАН України, Лідія Іванівна працювала безперервно, пройшовши шлях від молодшого до провідного наукового співробітника.

Влітку 1972 р. Л.І. Мілкіна захистила кандидатську дисертацію на тему "Растительный покров центральной части Украинских Карпат и некоторые вопросы его восстановления и охраны". Розвиваючи цей науковий напрям, вона здійснила багато польових досліджень, зібравши величезний масив даних щодо фітоценотичної структури лісів Передкарпаття, зробила теоретичні узагальнення, що стало основою докторської дисертації під назвою "Коренные леса северо-восточного макросклона Украинских Карпат (фитоценотическая структура, распространение, экологические основы восстановления и охраны)", яку вчена успішно захистила в грудні 1988 р. Наступного 1989 р. її було переведено на посаду провідного наукового співробітника відділу охорони природних екосистем, на якій вона працювала до виходу на пенсію.

Вивчаючи лісову рослинність північно-східного макросхилу Українських Карпат, Л.І. Мілкіна розглядала та опрацьовувала широкий спектр наукових проблем за такими напрямками, як фітоценологія, індикаційна геоботаніка, реконструктивне геоботанічне картування, екологія лісової рослинності; розвивала теоретичні засади заповідної справи й удосконалення мережі природоохоронних територій. Вона зробила вагомий внесок у визначення закономірностей формування корінного рослинного покриву Українських Карпат залежно від геологічної будови, клімату та едафічних чинників. Це сприяло опрацюванню функціональної класифікації заповідних об'єктів живої та неживої природи, розширенню мережі природно-заповідного фонду Передкарпаття.

Від 1973 р. у відділі охорони природних екосистем розпочалося активне вивчення рослинності Карпатського заповідника, зокрема Чорногірського його масиву. Л.І. Мілкіна продовжила вивчати об'єкти

Івано-Франківської області, концентруючись на екосистемах заповідника. Вона активно працювала в природоохоронних експедиціях, з екосистемних позицій детально досліджуючи рослинність долини річки Погорілець та аналізуючи біогеоценотичну репрезентативність заповідника.

Л.І. Мілкіна є співавтором низки монографій, опублікованих колективом науковців відділу охорони природних екосистем, зокрема: "Охорона природи Українських Карпат та прилеглих територій" (1980); "Флора і рослинність Карпатського заповідника" (1982); "Методика крупномасштабного реконструктивного геоботаничного картирования" (1984); "Украинские Карпаты: Природа" (1988); "Природа Карпатського національного парку" (1993); "Раритетні фітоценози західних регіонів України (Регіональна "Зелена книга")" (1997); "Раритетний фітогенофонд Західних регіонів України (созологічна оцінка й наукові засади охорони)" (2004).

Лідія Іванівна багато уваги приділяла теоретичним питанням заповідної справи, що відображено в її публікаціях, зокрема: "Географические основы заповедного дела" (1975. *Известия Всесоюзного географического общества*, 107(6): 485–495) та "Стан і завдання охорони рослинного світу Українських Карпат" (1975. *Вісник АН УРСР*, 1: 96–102).

Працюючи щороку в карпатських лісах, Л.І. Мілкіна виявила багато нових місць виростання рідкісних видів рослин, наприклад: *Syringa josikaea*

Jacq., *Pinus cembra* L., *Saxifraga luteo-viridis* Shott & Kotschy.

Співпрацюючи довгі роки у відділі охорони природних екосистем, ми високо цінували науково-освітній рівень Лідії Іванівни, відчували твердість її характеру та поважали за прямоту у висловлюваннях.

Після виходу на пенсію Лідія Іванівна продовжила наукову діяльність, зосередившись на вивченні рослинності Національного природного парку "Сколівські Бескиди", була членом науково-технічної ради парку. На засіданнях ради вона завжди займала активну позицію щодо охорони природних екосистем, у т.ч. підтримувала доцільність активного збереження рідкісних рослинних угруповань та локалітетів раритетних видів флори.

За матеріалами досліджень останніх років під керівництвом Л.І. Мілкіної та за її участі опубліковано книги: "Ліси Національного природного парку «Сколівські Бескиди»" (2006); "Національний природний парк «Сколівські Бескиди»" (2008); "Національний природний парк "Сколівські Бескиди". Раритетний фітогенофонд" (2011).

Колеги та учні щиро сумують з приводу смерті Лідії Іванівни Мілкіної. Світла пам'ять про неї, наукові досягнення та вагомий її внесок у справу охорони природи Передкарпаття та Бескидів назавжди залишаться в наших серцях.

П.Т. ЯЩЕНКО, В.П. ПРИНДАК, О.О. КАГАЛО,  
М.П. ЖИЖИН, О.О. АНДРЕЄВА

---

**Український ботанічний журнал. 2020 • 77 • 5.** Національна академія наук України. Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного. Науковий журнал. Заснований у 1921 р. Виходить один раз на два місяці (українською, англійською та російською мовами). Головний редактор С.Л. Мосякін

Затверджено до друку вченою радою Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
(протокол №13 від 13 жовтня 2020 року)

Реєстраційне свідоцтво серії КВ № 12179-1063ПР від 11.01.2007 р.

Редактор *О.В. Пилипенко*  
Технічний редактор *О.Є. Бондаренко*  
Комп'ютерна верстка *Д.С. Решетников*

---

Формат 84×108/16. Ум.-друк. арк. 9,0. Обл.-вид. арк. 11,5. Тираж 176 прим. Зам. №

---

Віддруковано ВД "Академперіодика" НАН України  
вул. Терещенківська, 4, Київ 01004  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 544 від 27.07.2001

