


ТОРЯНИК В. М. , МІРОНЕЦЬ Л. П.

Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка,

Україна, 40002, м. Суми, вул. Роменська, 87, e-mail: toryanik_vn@ukr.net, mironets19@gmail.com

 toryanik_vn@ukr.net

МІНЛИВІСТЬ РИСУНКУ «СИВОЇ» ПЛЯМИ НА ЛИСТКУ *TRIFOLIUM REPENS* L. ЯК БІОІНДИКАТОР УМІСТУ У ҐРУНТІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ УГІДЬ НІТРАТНОГО АЗОТУ ТА ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Мета. Дослідити зв'язок між мінливістю рисунку «сивої» плями на листку *Trifolium repens* L. та вмістом у ґрунті нітратного азоту і важких металів на території сіножаті та пасовища. **Методи.** Збір листків проводився у 2019 р. з пробних ділянок у період масового цвітіння рослини. Ідентифікація рисунків «сивої» плями здійснювалася за методикою І. Т. Папонової та П. Я. Шварцмана з використанням таблиці Дж. Л. Брюейкера. Ґрунти досліджувалися на вміст нітратного азоту та важких металів згідно із рекомендованими методиками. **Результати.** У загальній вибірці рослин *T. repens*, зібраних із території сіножаті та пасовища, виявлено 8 фенотипів, генотипи яких сформовані серією з 7-ми алелей гена V. У вибірці з території сіножаті найчастіше траплявся фенотип О, у вибірці з території пасовища – фенотипи А^H та С, значно частіше, ніж на території сіножаті, – фенотип В^HС. На території сіножаті вищим було трапляння «диких» фенотипів, на території пасовища – «мутантних». На кожній із досліджених територій виявлені фенотипи, що не трапляються на іншій території: на території сіножаті – фенотип С у формі чотирилисника, на території пасовища – фенотипи В^HВ та Е. У ґрунті пасовища порівняно з ґрунтом сіножаті був значно вищий вміст нітратного азоту (майже у 4 рази), Fe (майже у 2,5 рази), Mn (в 1,6 рази), Zn (у 2,4 рази), Cu (в 1,8 рази), Pb (більше, ніж у 2 рази) та Cd (більше, ніж у 2 рази). **Висновки.** Встановлену кореляцію (від середньої сили до сильної) між частотою виявлених фенотипів *T. repens* за ознакою «рисунок «сивої» плями на листку» та вмістом у ґрунті сіножаті та пасовища нітратного азоту і важких металів слід оцінювати з обережністю, адже залежність між цими показниками хоча й достовірна, але вимагає подальших досліджень.

Ключові слова: *Trifolium repens* L., рисунок «сивої» плями на листку, поліморфізм, біоіндикатор, ґрунт, нітратний азот, важкі метали.

Можливість використання для біоіндикації стану антропогенно змінених територій морфогенетичного поліморфізму популяцій різних видів конюшини за ознакою «рисунок сивої плями на листку» розглядається в роботах багатьох дослідників [1–6]. Зокрема, в цих роботах вказується на те, що розміщення, розмір, форма «сивої» плями є дискретними, альтернативними варіаціями цієї ознаки, що відображають генотип особини, а частота їх появи – генетичні особливості популяції; що міжпопуляційні відмінності у спектрах фенотипів та варіабельності частот окремих фенотипів за такою ознакою пов'язані з відмінністю умов місць існування, з віком популяції, з антропогенним впливом на рослини; що поліморфізм за ознакою «сивої» плями на листках рослин у популяціях антропогенно змінених територій створюється природним доборою і мутаційним процесом, дія яких спрямована на підвищення частоти виникнення окремих комбінацій серії множинних алелей одного гена.

У цьому контексті, зважаючи на актуальність питання хімічного забруднення ґрунтів на територіях різного сільськогосподарського призначення, ми здійснили спробу встановити зв'язок між мінливістю рисунку «сивої» плями на листку *T. repens* та вмістом у ґрунті нітратного азоту та важких металів.

Матеріали і методи

Збирання листків *T. repens* проводилося у травні-серпні 2019 р. у період масового цвітіння рослини на територіях сіножаті та пасовища села Житнє Роменського району Сумської області. На кожній території обстежувалися п'ять пробних ділянок із покриттям *T. repens* до 60 % розміром 5x5 м. Застосовувався метод випадкової вибірки з рослин через два-три кроки за рухом у заданому напрямку до кінця пробної ділянки з наступною зміною напрямку руху до тих пір, поки не буде зібрано не менше 150 лис-

тків [7]. Загалом із пробних ділянок обох територій було зібрано і проаналізовано 1500 листків. Для ідентифікації рисунків «сивої» плями використовувалася методика І. Т. Папонової (1982) та П. Я. Шварцмана (1986) [8] і таблиця Дж. Л. Брюбейкера [9]. Трапляння різних фенотипів розраховувалося як частка листків певного фенотипу у вибірці, зробленій із кожної території, та виражалася у відсотках.

Дослідження ґрунту здійснювалося згідно із рекомендованими методиками [10–12]. Пробовідбір ґрунту з територій дослідження проводився з кожної пробної ділянки у поліетиленові пакети по 800–900 г. Зразки ґрунту відбиралися на однаковій глибині (20 см). Відібрані зразки ґрунту аналізувалися у лабораторії Центру сучасних досліджень ґрунту ТОВ «СІЕЙТ». Масова частка нітратного азоту визначалася за «Методикою ДСТУ 26951-86. Ґрунти. Визначення нітратів фометричним методом». Масова частка рухомих форм важких металів визначалася за «Методикою ДСТУ ISO 14870-2005. Якість ґрунту. Екстрагування слідів елементів буферним розчином ДТРО (ISO 14870-2001, IDT) (вилучення)» та «Методикою ДСТУ ISO 22036-2014. Якість ґрунту. Визначення мікроелементів в екстрактах ґрунту з використанням атомно-емісійної спектроскопії індуктивно-зв'язаної плазми (ICP-AES) (визначення)».

Для оцінки лінійного зв'язку між частотою фенотипу *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листку та вмістом нітратного азоту і важких металів у ґрунті сіножаті та пасовища застосовувався параметричний коефіцієнт кореляції Пірсона [13, 14]. Статистичний аналіз ре-

зультатів дослідження проводився із застосуванням пакета програм MS Excel 2010 та програмних пакетів Statistica: Basis Statistic and Tables.

Результати та обговорення

Усього у загальній вибірці рослин *T. repens*, зібраних із території сіножаті, виявлено 6 фенотипів, зокрема й фенотип С з атиповою формою листка у вигляді чотирилисника, з території пасовища – 8 фенотипів: шість таких самих, як і на території сіножаті, і два оригінальних – В^{НВ} (повна пляма, висока, у центрі дугоподібно заглиблена до основи листка) та Е (низька трикутна пляма в основі) (рис. 1.).

За частотою переважаючим фенотипом на території сіножаті був фенотип О (52 %), на території пасовища – фенотип А^Н (25,6 %). На території сіножаті фенотип О (без плями) траплявся майже у 3 рази частіше, ніж на території пасовища. На території пасовища майже у 4 рази частіше, ніж на території сіножаті, траплявся фенотип А^Н (повна пляма, висока), майже у 3 рази частіше – фенотип В^{НС} (розірвана пляма, висока).

Генетичний склад загальної вибірки рослин *T. repens* був представлений генотипами, сформованими серією з 7-ми алелей: *v*, *V*, *V^H*, *V^B*, *V^{BH}*, *V^P*, *V^S*. Із них на території сіножаті виявлено 5: *v*, *V*, *V^H*, *V^{BH}*, *V^P*, на території пасовища – 7: *v*, *V*, *V^H*, *V^B*, *V^{BH}*, *V^P*, *V^S*.

На території сіножаті за частотою значно переважали «дикі» фенотипи (О і А – повна Λ-подібна пляма), на території пасовища удвічі більше було «мутантних» фенотипів (рис. 2).

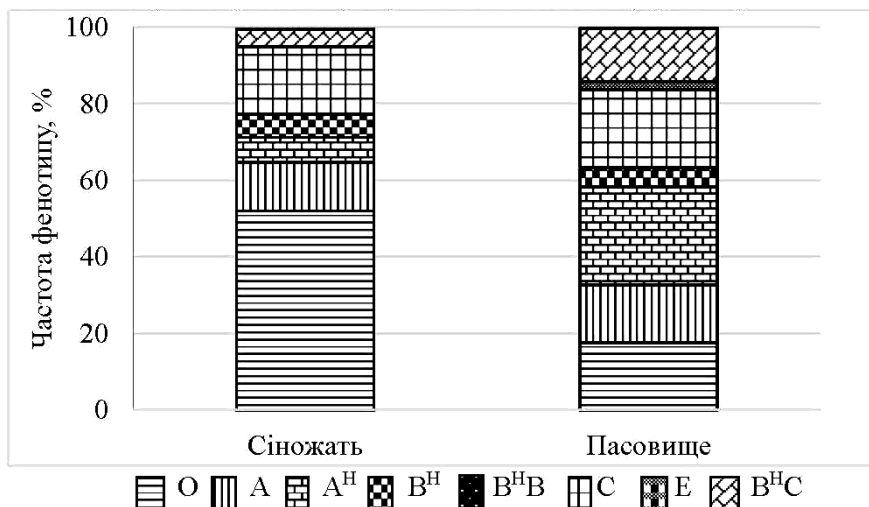


Рис. 1. Частота різних фенотипів *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листку, зібраних на території сіножаті та пасовища.

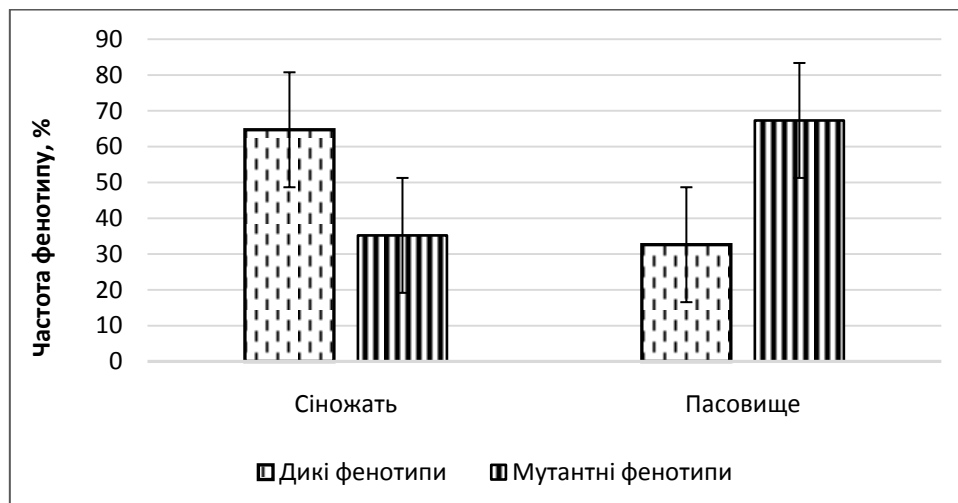


Рис. 2. Співвідношення частоти «диких» та «мутантних» фенотипів *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листку, зібраних на території сіножаті та пасовища.

Серед «диких» фенотипів на території сіножаті у 4 рази частіше фіксувався фенотип О, на території пасовища частота «дикого» фенотипу О була лише дещо вищою за частоту «дикого» фенотипу А.

Результати дослідження умісту нітратного азоту та важких металів у ґрунті сіножаті та пасовища представлені у табл. 1.

Із даних табл. 1 видно, що уміст нітратного азоту у ґрунті сіножаті та пасовища був значно (приблизно у 42 та 11 разів) нижчим від гранично допустимої концентрації (ГДК) [15]. Водночас у ґрунті пасовища уміст нітратного азоту і більшості рухомих форм важких металів був значно вищим, ніж у ґрунті сіножаті. Це, ймовірно, пояснюється підкисленням ґрунту пасовища нітрат-іонами, що містяться в екскрементах тварин, що регулярно випасаються на цій території.

Результати вивчення кореляційного зв'язку між фенотипом *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листку та умістом нітратного азоту і важких металів у ґрунті сіножаті та пасовища представлені у табл. 2.

За даними табл. 2 спостерігається прямий кореляційний зв'язок середньої сили між частотою «дикого» фенотипу О та умістом у ґрунті Феруму, Цинку та Купруму. Аналогічний характер кореляції встановлений і для «дикого» фенотипу А та умісту у ґрунті Цинку, однак протилежний за знаком щодо умісту Хрому. Водночас між частотою «дикого» фенотипу А та умістом у ґрунті Мангану встановлена пряма сильна кореляція. Між частотою «мутантних» фенотипів та умістом у ґрунті нітратного азоту, Феруму, Мангану, Цинку та Купруму встановлена зворотна помітна та сильна кореляція, а між умістом у ґрунті Хрому, Плюмбуму та Кадмію – пряма (переважно сильна) кореляція.

Таблиця 1. Уміст (мг/кг) нітратного азоту та важких металів у ґрунті сіножаті та пасовища

Елемент	ГДК	Сіножать	Пасовище
Нітратний азот	130	3,1	11,7
Ферум, Fe	–	31,7	79,1
Манган, Mn	5	2	3,2
Цинк, Zn	23	2	4,8
Купрум, Cu	3	0,67	1,19
Хром, Cr	6	0,01	0,01
Плюмбум, Pb	2	0,43	1,0
Кадмій, Cd	0,7	0,026	0,056

Таблиця 2. Кореляційний зв'язок між фенотипом *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листку та умістом нітратного азоту і важких металів у ґрунті

Фенотип	Значення коефіцієнта кореляції, r						
	Нітратний азот	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cd
O	-	0,67	-	0,42	0,40	-	-
A	-	-	0,86	0,44	-	-	-
A ^H	-0,69	-	-0,50	-0,63	-0,71	0,91	0,89
B ^H	-0,66	-	-	-0,57	-0,58	0,41	0,44
B ^H B	-	-	-	-	-	0,79	0,79
C	-0,74	-0,45	-0,62	-0,68	-0,78	0,90	0,91
B ^H C	-0,49	-0,45	-0,53	-0,44	-0,51	0,79	0,70
Атипична форма C	-	-0,41	-	-	-0,41	0,67	-
E	-	-	-	-	-	-	0,79

Примітки: * «-» – $0 < r < 0,1$ або $0,1 < r < 0,4$ – зв'язок відсутній або зв'язок слабкий; $0,4 < r < 0,7$ – зв'язок помітний (або суттєвий, або середньої сили); $0,7 < r < 0,99$ – зв'язок сильний; $r < 0$ – зв'язок зворотний; коефіцієнт кореляції вірогідний за $p < 0,05$.

Зазначимо, що отримані нами результати кореляційного аналізу узгоджуються з даними Г. Г. Соколової та Г. Т. Камалтдинової, які, вивчаючи морфогенетичний поліморфізм листків конюшини повзучої на антропогенно змінених територіях, встановили середнього рівня позитивний зв'язок між вмістом цинку і генотипом vv (фенотип O) ($r = +0,44$), цинку і генотипом VV (фенотип A) ($r = +0,34$) та середнього рівня негативний зв'язок між вмістом міді і генотипом V^{BH}V^P (фенотип B^HC) ($r = -0,35$) [4].

Висновки

Локальні популяції *T. repens* сіножаті та пасовища відрізняються за кількістю фенотипів, що свідчить про різний ступінь їх морфогенети-

чного поліморфізму за рисунком «сивої» плями на листку. Встановлений кореляційний зв'язок між частотою виявлених фенотипів та умістом у ґрунті досліджених територій нітратного азоту та важких металів слід оцінювати з обережністю, адже залежність між цими показниками хоча й достовірна, але вимагає подальших досліджень. Лише тоді можна буде зрозуміти, чи можна використовувати ознаку «рисунок «сивої» плями на листку *T. repens*» як фенотиповий біоіндикатор умісту у ґрунті сільськогосподарських угідь нітратного азоту та важких металів.

References

1. Valiev R.R., Yakovleva O.M. Comparative characteristics of hereditary polymorphism based on «white» marking on leaf of plants in *T. repens* populations in the city of Ufa and some areas of the Republic of Bashkortostan. *Vestn. Bashkir. Un.* 2008. V. 13, № 2. P. 273–276. [in Russian] / Валиев Р.Р., Яковлева О.М. Сравнительная характеристика наследственного полиморфизма по признаку «седого» пятна на листьях растений в популяциях *T. repens* на территории г. Уфы и некоторых районов республики Башкортостан. *Вестн. Башкир. ун-та.* 2008. Т. 13, № 2. С. 273–276.
2. Gorshkova T.A. Evaluation of the possibility of using creeping clover (*Trifolium repens* L.) for bioindication of anthropogenic environmental exposure. *News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.* 2012. Vol. 14, № 1. P. 69–73. [in Russian] / Горшкова Т.А. Оценка возможности использования клевера ползучего (*Trifolium repens* L.) для биоиндикации антропогенного нарушения среды. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2012. Т. 14, № 1. С. 69–73.
3. Levitsky S.N. Genetic polymorphism in the populations of *Trifolium repens*, growing under conditions of different anthropogenic load areas. *Basic research.* 2013. № 4 (part 1). P. 108–111. [in Russian] / Левицкий С.Н. Генетический полиморфизм в популяциях *Trifolium repens*, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки территорий. *Фундаментальные исследования.* 2013. № 4 (часть 1). С. 108–111. URL: www.rae.ru/fs/section=content&op=show_article&article_id=10000319.
4. Sokolova G.G., Kamaltdinova G.T. Morphogenetic polymorphism of clover leaves creeping. *News AltGU.* 2010. № 3 (part 1). P. 48–51. [in Russian] / Соколова Г.Г., Камалтдинова Г.Т. Морфогенетический полиморфизм листьев клевера ползучего. *Известия АлтГУ.* 2010. № 3 (часть 1). С. 48–51. URL: <http://izvestia.asu.ru/2010/3-1/bios/TheNewsOfASU-2010-3-1-bios-10>.

5. Khokh A.N., Lozinskaya O.V., Melnov S.B. Environmental quality assessment using meadow clover (*Trifolium pratense*). *Bulletin of Polesye State University. A series of natural sciences*. 2011. № 2. P. 3–7. [in Russian] / Хох А.Н., Лозинская О.В., Мельнов С.Б. Оценка качества среды с использованием клевера лугового (*Trifolium pratense*). *Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук*. 2011. № 2. С. 3–7.
6. Toryanik V.N., Mironets L.P. Morfogenetic polymorphism of *T. repens* in the pattern of white marking on a leaf on the territory of the city of Sumy with a different anthropogenic load. 2019. Vol. 25. P. 92–96. doi: 10.7124/FEEO.v.25.1145.
7. Dosphehov B.A. Methods of field experience (with the basics of statistical processing of research results). Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p. [in Russian] / Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
8. Shvartsman P.Ya. Field practice in genetics with the basics of breeding. M: The Enlightenment, 1986. 111 p. [in Russian] / Шварцман П.Я. Полевая практика по генетике с основами селекции. М.: Просвещение, 1986. 111 с.
9. Brewbaker J. L. V-leaf Markings of White Clover. *J. Hered.* 1955. Vol. XLVI, № 3. P. 115–125.
10. HOST 12071-2014 Hrunty. Otbor, upakovka, transportyrovanye y khraneny obratzov. [in Russian] / Грунты. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200116021> (дата звернення: 20.04.2019).
11. Dyshko V.N., Dyshko V.V., Romanenko P.V., Studenkova N.V. Methods of agrochemical studies of soils and plants: a training manual. Smolensk: FSBEI NPE «Smolensk State Agricultural Academy», 2014. 197 p. [in Russian] / Дышко В.Н., Дышко В.В., Романенко П.В., Студенкова Н.В. Методики агрохимических исследований почв и растений: учебно-практическое пособие. Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. 197 с.
12. Yakist' gruntu. Vyznachennia vmistu rukhomykh spoluk marhantsiu (tsynku, kadmiu, zaliza, kobal'tu, midi, nikeliu, khromu, svyntsiu) v grunty v bufernyi amoniyno-atsetatnyi vytyazhysi z pH 4,8 metodom atomno-absorbtsiynoi spektrofotometrii: DSTU 4770.1–9:2007. [in Ukraine] / Якість ґрунту. Визначення вмісту рухомих сполук марганцю (цинку, кадмію, заліза, кобальту, міді, нікелю, хрому, свинцю) в ґрунті в буферній амонійно-ацетатній витяжці з pH 4,8 методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії: ДСТУ 4770.1–9:2007.
13. Avdeev V.I. Modern methods of biometrics in the study of plants: a textbook. Orenburg: Publishing Center OGAU, 2015. 130 p. [in Russian] / Авдеев В.И. Современные методы биометрии в исследовании растений: учебное пособие. Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2015. 130 с.
14. Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Biometrics. Part II Group comparison and communication analysis: a textbook. Kharkiv: Publishing house «Morning», 2007. P. 50–61 [in Ukraine] / Атраментова Л.О., Утевська О.М. Біометрія. Ч. II Порівняння груп і аналіз зв'язку: підручник. Харків: Видавництво «Ранок», 2007. С. 50–61.
15. Zhovinsky E.Y., Kuraeva I.V. Geochemistry of heavy metals in soils of Ukraine. K.: Science opinion, 2002. 213 p. [in Ukraine] / Жовинский Э.Я., Кураева И.В. Геохимия тяжелых металлов в почвах Украины. К.: Наук. думка, 2002. 213 с.

TORYANIK V.M., MIRONETS L.P.

Sumy State Pedagogical University named after A.S. Makarenko,
Ukraine, 40002, Sumy, Romenskaya str., 87, e-mail: toryanik_vn@ukr.net, mironets19@gmail.com

CHANGEABILITY IN THE PATTERN OF WHITE MARKING ON A LEAF OF *TRIFOLIUM REPENS* L. IS A BIOINDICATOR OF PRESENCE IN SOIL OF AGRICULTURAL LANDS OF NITRATE NITROGEN AND HEAVY METALS

Aim. Conduct research between the variability of the pattern of white marking on a leaf of *Trifolium repens* L. and the content of nitrate nitrogen and heavy metals in soil of hayfield and pasture. **Methods.** Collection of leaflets was carried out in 2019 during the period of mass flowering of plant. Identification of drawings of white marking on a leaf was carried out according to the method of IT. Paponova and P.Ya. Schwartzman, using the tables of J. L. Briubecker. Soils were tested for nitrate nitrogen and heavy metals in accordance with recommended methods. **Results.** In the total sample of *T. repens* L. collected from territories of the hayfield and pasture, detected 8 phenotypes, formed by a series of 7 alleles of gen V. In the sample from the territory of the hayfield, the phenotype O was most often found, in the sample from the territory of the pasture - the phenotypes of A^H and C, much more often than in the territory of the hayfields – the phenotype of the B^HC. In the hayfield, the frequency of «wild» phenotypes was higher, in the grassland – «mutant» phenotypes. In each of the studied territories unique phenotypes were detected: on the territory of hayfield – phenotype C in the form of a four-leaf, on the territory of the pasture – phenotypes of B^HB and E. Pasture soil had a significantly higher content of nitrate nitrogen (almost 4 times), Fe (almost 2.5 times), Mn (1.6 times), Zn (2.4 times), Cu (1.8 times), Pb (more than 2 times) and Cd (more than 2 times) compared to soil of hayfield. **Conclusions.** A correlation was found between the frequency of *T. repens* phenotypes detected in the pattern of white markings on the leaf and the presence in soil of hayfield and pasture of nitric nitrogen and heavy metals. However, it should be evaluated with caution, as the relationship between these indicators is although probable, but requires further investigation.

Ключові слова: *Trifolium repens* L., white marking on a leaf, bioindicator, soil, nitrate nitrogen, heavy metals.