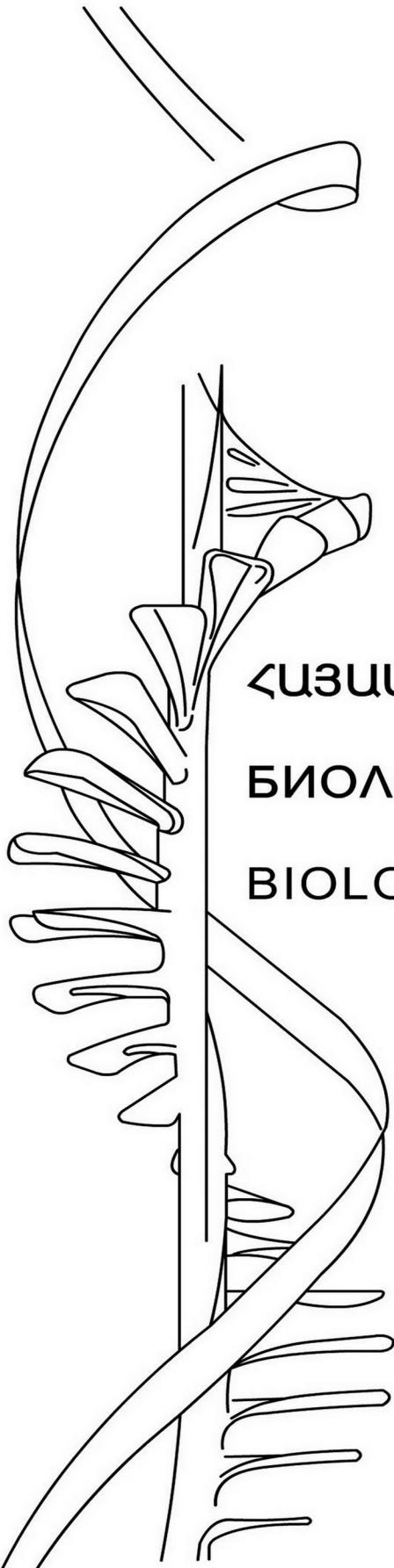


ISSN 0366-5119

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA



ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

2009

Լույս է տեսնում 1948 թվականից, հոդվածները հրատարակվում են հայերեն,
ռուսերեն կամ անգլերեն լեզուներով
Выходит с 1948 года, статьи публикуются на армянском, русском
или английском языках
Journal is published since 1948, the articles are published in Armenian,
Russian or English

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

Է.Ս.Գևորգյան (*գլխավոր խմբագիր*), Ռ.Մ.Հարությունյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*), Ա.Ս. Բոյաճյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*),
Ա.Հ. Եսայան (*պատասխանատու քարտուղար*), Գ.Ա. Գևորգյան, Ա.Հ. Թոշունյան,
Ռ.Հ. Հովհաննիսյան, Լ.Ռ. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան.

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՆՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Ծ.Մ. Ավագյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Է.Ց. Գաբրիելյան,
Ա.Ա. Գալոյան, Ս.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան, Կ.Գ. Ղարաբյոկյան,
Ս.Հ. Մովսիսյան, Կ.Ս. Պողոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ր.Մ. Արությունյան (*заместитель главного редактора*), Ա.Ս. Բояджян (*заместитель главного редактора*),
Ա.Գ. Եсаян (*ответственный секретарь*), Զ.Ա. Варданян, Դ.Ա. Գеворкян,
Տ.Խ. Майрапетян, Л.Р. Манвелян, Р.О. Оганесян, А.А. Трчунян

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ս.Մ. Ավակյան, Վ.Ս. Ակոպյան, Զ.Ի. Ակոպյան, Յ.Տ. Ալեքսանյան, Յ.Գ. Աֆրիկյան,
Յ.Ս. Գաբրիելյան, Ա.Ա. Գալոյան, Մ.Ա. Դավթյան, Կ.Գ. Կարաբեյան, Ս.Օ. Մովսեսյան,
Լ.Լ. Օսիպյան, Դ.Ա. Փանոսյան, Կ.Ս. Սոսիսյան.

THE EDITORIAL BOARD

Editor in chief: E.S. Gevorgyan, *Vice-editors:* R.M. Aroutiunian, A.S. Boyadjyan,
Secretary-in-charge: A.H. Yesayan, *Members of the Board:* G.A. Gevorgyan,
R.H. Hovanesyan, L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, A.H. Trchunyan,
Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

E.G. Afrikyan, Yu.T. Aleksanyan, Ts.M. Avakyan, M.A. Davtyan, E.Ts. Gabrielyan,
A.A. Galoyan, V.P. Hakobyan, Zh.I. Hakobyan, K.G. Karagiozyan, S.H. Movsesyan,
L.L. Osipyanyan, G.H. Panosyan, K.S. Poghosyan.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Փորձարարական և տեսական հոդվածներ

Խաչատրյան Տ.Ս., Թովուզյան Վ.Օ., Կարապետյան Բ.Ռ., Կիպրիյան Տ. Կ. Առնետների վնասված ողնուղեղի առանձին ինտերնեյրոնների հարուցված ակտիվության փոփոխության պաշտպանությունը յոդմեթիլատ 2-(դիմեթիլամինո) էթիլ N-(n-մետոքսիբենզոիլ)-DL-ֆենիլալանինի եթերով.....	6
Ազիմի-Մոթեմ Հ., Օսիպյան Լ.Լ. Տաքսոնոմիկ տեղեկություններ <i>Septoria</i> ցեղի մասին Իրանի որոշ դեկորատիվ բույսերի վրա.....	10
Վարդանյան Օ.Հ., Մացակյան Վ.Գ. ՀՀ Լոռու մարզի Գուգարքի տարածաշրջանի անտառի վերին գոտու փոփոխության դինամիկան վերջին 50 տարում.....	16
Ռայաթփանահ Ս., Նանագյուլյան Ս.Գ., Ալավի Ս.Ո. Յուղատու բույսերից ստացված <i>Macrophomina phaseolina</i> -ի որոշ իրանական իզոլյատների բլորատների, ջերմաստիճանի նկատմամբ զգայունությունը և պաթոգենությունը.....	23
Պարոնյան Ռ.Վ. Հիմնային լիզինի քայքայումը ալկոլոֆիլ <i>Bacillus sp.</i> A5 շտամով.....	27
Հովհաննիսյան Ռ.Լ. Նոր տեսակներ Հայաստանի ձկների հելմինթոֆաունայում.....	32
Քոլոյան Հ.Օ., Հովսեփյան Ա.Ս. <i>Brevibacterium flavum</i> HK-19A շտամ-արտադրիչով L-արգինինի կենսասինթեզի համար ֆերմենտացիայի պայմանների և ֆերմենտացման միջավայրի բաղադրամասերի օպտիմալացումը.....	38
Մամիկոնյան Թ.Հ., Ղուկասյան Գ.Ս. Կակտուսների փտախտ առաջացնող սնկեր.....	45
Ավետիսյան Ս.Ո. , Հովսեփյան Ա.Ս., Չախալյան Ա.Խ., Քելեշյան Ս.Ղ., Չիլ-Հակոբյան Լ.Ա., Սարգսյան Մ.Ա., Սադիյան Ա.Ս. <i>Bacillus Thuringiensis</i> –ի տարբեր սերովարների միջատասպան շտամներից մեկանին սինթեզող մուտանտների ստացումը	50
Գրիգորյան Ա.Վ., Անտոնյան Ա.Պ., Շահինյան Մ.Ա., Մանուկյան Գ.Ա., Կարապետյան Ա.Թ. Միլիմետրային տիրույթի էլեկտրամագնիսական ալիքների ազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների կոմպլեքսագոյացման վրա.....	57
Եսայան Ա.Հ., Հովհաննիսյան Ն.Ա., Գրիգորյան Կ.Վ., Դանիելյան Ա.Ս. Հայաստանում գենետիկորեն վերափոխված բույսերի ներմուծման հնարավոր ռիսկերը և դրանց գնահատումը.....	63
Մնացականյան Մ.Ռ. Ձիու արյան շիճուկի բուրբրիլիտիկնեսթերազի ֆերմենտի ներգործությամբ խժանաթթվի դիլատիկնային էսթերի հիդրոլիզի օանոմալ կինետիկան.....	71
Գյուլխանդանյան Ա.Գ. Կատիոնային պորֆիրինների կապումը արյան սպիտակուցների հետ.....	77
Գալստյան Մ.Հ., Հայրապետյան Է.Մ., Հարությունյան Ս.Ս., Թամոյան Ս.Զ. Հանքային մելիորանտների ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերի կիրառման տնտեսաէկոլոգիական արդյունավետությունը սմբուկի ցանքերում	82
(Համառոտ հաղորդումներ)	
Զիվանյան Կ.Ա., Ադամյան Ն.Վ. Թռչունների լյարդի սինուսոիդային բջիջների մասին.....	88

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

<i>Хачатрян Т.С., Топузян В.О., Карапетян И.Р., Киприян Т.К.</i> Протекция йод метилатом 2–(ди-метил-амино) этилового эфира N– (N–метоксibenзоил)–DL– фенилаланина изменений вызванной активности поврежденных травмой одиночных интернейронов спинного мозга крыс.....	6
<i>Азими-Мотем Х., Осипян Л.Л.</i> Таксономические сведения о роде <i>Septoria</i> на некоторых декоративных растениях Ирана.....	10
<i>Вардамян Ж.А., Мацакян В.Г.</i> Динамика изменение верхнего пояса лесов Гугарского района Лорийского марза за последние 50 лет.....	16
<i>Райатпана С., Нанагюлян С.Г., Алави С.В.</i> Хлоратная чувствительность, реакции на температуру и патогенность некоторых иранских изолятов <i>Macrophomina phaseolina</i> из масличнoсемянных растений.....	23
<i>Паронян Р.В.</i> Разложение щелочного лигнина алкалофильным штаммом <i>Bacillus sp.</i> A5.....	27
<i>Оганесян Р.Л.</i> Новые виды в гельминтофауне рыб Армении.....	32
<i>Колоян А.О., Овсепян А.С.</i> Оптимизация условий ферментации и состава ферментационной среды для биосинтеза L-аргинина штаммом – продуцентом <i>Brevibacterium flavum</i> НК-19А.....	38
<i>Мамиконян Т.О., Гукасян Г.С.</i> Грибы, вызывающие гниль некоторых видов кактусов.....	45
<i>Аветисян С.В., Овсепян А.С., Чахалян А.Х., Келешян С.К., Чил-Акопян Л.А., Саркисян, М. А., Сагиян А.С.</i> Получение меланинсинтезирующих мутантов у разных сероваров <i>Bacillus Thuringiensis</i>	50
<i>Григорян А.В., Антонян А.П., Шагинян М.А., Манукян Г.А., Карапетян А.Т.</i> Влияние нетепловых электромагнитных волн миллиметрового диапазона на комплексообразование лигандов с ДНК.....	57
<i>Есаян А.Г., Ованнисян Н.А., Григорян К.В., Даниелян А.М.</i> Возможные экологические риски и их оценка при интродукции генетически модифицированных растений в Армении	63
<i>Мнацаканян М.Р.</i> “Аномальная” кинетика гидролиза дихолиновогофира пробковой кислоты под действием лошадиной сывороточной бутирилхолинэстеразы.....	71
<i>Гюльханданян А. Г.</i> Связывание катионных порфиринов с белками крови.....	77
<i>Галстян М.А., Айрапетян Э.М., Арутюнян С.С., Тамоян С.Дж.</i> Экономико-экологическая эффективность применения органических удобрений на фоне природных мелиорантов в посевах баклажана.....	82

□Краткие сообщения□

<i>Дживанян К.А. , Адамян Н.В.</i> О синусоидальных клетках печени птиц.....	88
--	----

Правила для авторов

CONTENTS

•Experimental and Theoretical articles•

<i>Khachatryan T.S., Topuzyan V.O., Karapetyan I.R., Kipriyan T.K.</i> Iodmethylate 2 – (dimethylamino) ethyl N-(n-metoxymethyl) – DL fenilalanin protection of the changes of the evoked activity by trauma damaged spinal cord single interneurons in rats.....	6
<i>Azimi-Motem H., Osipyan L.L.</i> Taxonomic notes on the genus <i>Septoria</i> of several ornamental plants in Iran.....	10
<i>Vardanyan Zh.H., Macakyan B.G.</i> Changes in the dynamics in the top belt of the forests of Gughar district (Lori Marz) over the last 50 years.....	16
<i>Rayatpanah S., Nanagulyan S.G., Alavi I S.V.</i> Chlorate sensitivity, temperature responses and pathogenicity of some iranian isolates of <i>Macrophomina phaseolina</i> from oilseed plants.....	23
<i>Paronyan R.V.</i> Degradation of Alkaline Lignin by Alkalofil strain <i>Bacillus sp.</i> A5.....	27
<i>Hovhannisyan R.</i> New Species in Armenia Fish Helminthofauna.....	32
<i>Koloyan A.O., Hovsepian A.S.</i> Optimization of fermentation conditions and composition of the fermentation medium for biosynthesis of L-arginine by the strain-producer <i>Brevibacterium Flavum</i> HK-19A.....	38
<i>Mamikonyan T.H., Ghukasyan G.S.</i> The fungi causing rotting of cactus.....	45
<i>Avetisyan S.V., Hovsepian A.S., Chakhalyan A.KH., Keleshyan S.K., Chil-Hakibyan L.A., Sargsyan M.A., Saghyan A.S.</i> Obtaining of melanin-synthesizing mutants in insecticide strains of various serovars <i>Bacillus Thuringiensis</i>	50
<i>Grigoryan A.V., Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Manukian G.A., Karapetian A.T.</i> Influence on non-thermal electromagnetic waves of millimetric diapason on complex-formation of ligands with DNA.....	57
<i>Yesayan A.H., Hovhannisyan N.A., Grigoryan K.V., Danielian A.M.</i> Possible environmental risks of introduction of genetically modified plants in Armenia and assessment of those risks.....	63
<i>Mnatsakanyan M.R.</i> “Anomalous” kinetics of hydrolysis of suberic acid dicholine ester by horse blood serum butyrylcholinesterase	71
<i>Gyulkhandanyan A.G.</i> Binding of cationic porphyrins to blood proteins.....	77
<i>Galstyan M., Hayrapetyan E., Harutyunyan S., Tamoyan S.</i> Economic-ecological effectiveness of applying organic fertilizers on the background of mineral ameliorants in the crops of egg-plants.....	82

□Short communications□

<i>Jivanyan K. A., Adamyan N.V.</i> About sinusoidal cells of the birds’ liver.....	88
---	----

Guide to authors



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and Theoretical articles •

Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

ПРОТЕКЦИЯ ЙОДМЕТИЛАТОМ 2 – (ДИМЕТИЛАМИНО) ЭТИЛОВОГО ЭФИРА N – (N – МЕТОКСИБЕНЗОИЛ) – DL – ФЕНИЛАЛАНИНА ИЗМЕНЕНИЙ ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ ПОВРЕЖДЁННЫХ ТРАВМОЙ ОДИНОЧНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫС

Т.С. ХАЧАТРЯН¹, В.О. ТОПУЗЯН², И.Р. КАРАПЕТЯН²,
Т.К. КИПРИЯН¹

¹Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА,

²Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна НАН РА

Обсуждается вопрос применения йодметилата 2–(диметиламино) этилового эфира N–(n–метоксibenзоил)–DL–фенилаланина у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией спинного мозга. Полученные результаты свидетельствуют о стойком протекторном эффекте, оказываемым йодметилатом 2–(диметиламино) этилового эфира N–(n–метоксibenзоил)– DL–фенилаланина на вызванную активность одиночных интернейронов спинного мозга у крыс с левосторонней латеральной гемисекцией. Регистрация и анализ вызванной активности одиночных интернейронов спинного мозга проводили посредством специальных программ в режиме on-line.

Интернейроны – спинной мозг – вызванная активность – йодметилат 2–(диметиламино) этиловый эфир N–(n–метоксibenзоил)–DL– фенилаланина – гемисекция

Ուսումնասիրվել է յոդմեթիլատ 2–(դիմեթիլամինո) էթիլ N–(n–մետոքսիբենզոիլ)–DL–ֆենիլալանինի էթերի ազդեցությանը առնետների ողնուղեղի ձախակողմյան կիսահատման ժամանակ: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս յոդմեթիլատ 2–(դիմեթիլամինո) էթիլ N–(n–մետոքսիբենզոիլ)–DL–ֆենիլալանինի էթեր ստացող առնետների մոտ ողնուղեղի առանձին ինտերնեյրոնների հրահրված ակտիվության զգալի բարելավումը: Ողնուղեղի առանձին ինտերնեյրոնների հրահրված ակտիվության գրանցումը կատարված էր on-line ռեժիմում:

Բնտերնեյրոններ – ողնուղեղ – հրահրված ակտիվություն – յոդմեթիլատ-2–(դիմեթիլամինո) էթիլ-N–(n–մետոքսիբենզոիլ)-DL–ֆենիլալանինի էթեր – կիսահատում

In these series of investigations the issue of the use of iodmethylyate 2 – (dimethylamino) ethyl N – (n – metoxybenzoil) – DL – fenylalanin ester on rats with the left – side lateral hemisection of spinal cord is discussed. The obtained results show the strong, protective effect of iodmethylyate 2 – (dimethylamino) ethyl N – (n – metoxybenzoil) – DL – fenylalanin ester on rats spinal cord single interneurons evoked activity on animals with left – side lateral hemisection.

The recording and analysis of the evoked activity of single interneurons of spinal cord is done by means a special software in on – line mode.

*Spinal cord – evoked activity – iodmethylete 2 – (dimethylamino) ethyl
N – (n – metoxybenzoil) – DL – fenylalanin ester – hemisection*

Известно, что состояние восстановительных процессов при повреждении спинного мозга у млекопитающих при воздействии различных гормонов и ферментов является одним из актуальнейших вопросов современной биологии и медицины [1, 2]. В связи с отмеченным стойкость соматических и вегетативных нейрогенных нарушений является причиной инвалидизации большинства больных с поражением спинного мозга (СМ) и нарушением проводимости нервных импульсов [3]. В коррегировании последних немаловажна роль эфиров холина, в частности ацетилхолина (АХ), заслуживающего внимания с точки зрения особенностей его синтеза и биологической активности [4]. Согласно результатам исследований последних лет [6–8], холиновыми эфирами осуществляется ряд важнейших функций в организме человека и животных. Вместе с тем продолжают отсутствовать сведения относительно действия эфиров холина на интернейроны (ИН) СМ при латеральной его гемисекции.

Исходя из поиска оптимальных средств, стимулирующих и благоприятствующих росту волокон повреждённых путей СМ и с учётом вышеотмеченных особенностей холиновых эфиров, нами предпринята попытка исследовать действие одного из холиновых эфиров: йодметилата 2–(диметиламино) этилового эфира N-(n-метоксibenzoил)–DL–фенилаланина (ДЭФ), синтезированного в Институте тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна НАН РА под руководством д. х. н. Топузяна В. О., на одиночные ИН СМ крыс в норме и при его экспериментальных повреждениях типа гемисекции (ГМС).

Материал и методика. Эксперименты проведены на 30 белых крысах – самцах, массой 220–230 г в 3 подопытных группах по 10 экз.: 1. интактные животные; 2. животные с левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т8–Т9; 3. животные с левосторонней латеральной ГМС СМ на уровне Т8–Т9, получавшие в место повреждения СМ в течение 1 месяца ДЭФ в дозе 200 мкг/кг массы тела индивидуально. Оптимальная дозировка ДЭФ предпринята, исходя из токсичности данного препарата, с учётом интенсивности спинномозгового повреждения. Электрофизиологические эксперименты проводили после клинических наблюдений и дачи препарата подопытным животным. В ответ на раздражение седалищного нерва производили экстраклеточную регистрацию вызванной электрической активности (ВА) данного ИН. Отведение активности исследуемых ИН проводили стеклянными микроэлектродами с диаметром кончика 1–2 мкм, заполненными 2М раствором NaCl, в дорзовентральном направлении в сером веществе передних рогов поясничного отдела СМ в области ИН. Регистрацию ВА ИН проводили с помощью специально разработанной программы, обеспечивающей в режиме on–line селекцию спайков посредством амплитудной дискриминации спайков с последующим построением кумулятивной импульсной диаграммы для выбора необходимого режима записи одиночного ИН. Анализ полученных данных осуществляли по специально разработанному алгоритму [5].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены примеры кумулятивных (рис. 1, пункты 1–3, а, б) и суммированных (рис. 1, пункты 1–3, в) престимульных и постстимульных диаграмм ВА одиночного ИН СМ (глубина 1100 мкм) у intactных животных (пункт 1, а, б, в); у животных с ГМС СМ (глубина 1100 мкм, пункт 2, а, б, в); у животных с ГМС СМ, получавших ДЭФ в течение 1 мес в место повреждения СМ в дозе 200 мкг/кг индивидуально (глубина 1100 мкм, пункт 3, а, б, в).

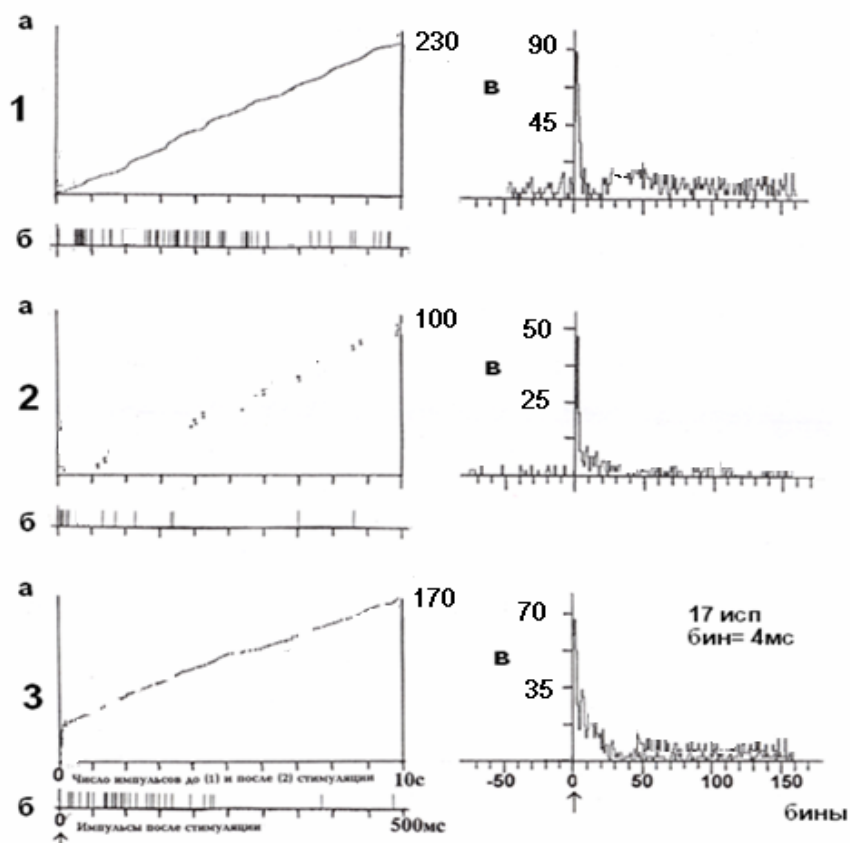


Рис. 1. Кумулятивные (а) и суммированные (в) пре- и постстимульные диаграммы внесеточной вызванной активности одиночного интернейрона (глубина 1100 мкм) дорсального рога спинного мозга крыс в норме (рис. 1, пункт 1 а, б, в); одиночного интернейрона (глубина 1100 мкм) дорсального рога спинного мозга крыс при его левосторонней латеральной гемисекции (рис. 1, пункт 2 а, б, в) и одиночного интернейрона (глубина 1100 мкм) дорсального рога спинного мозга у крыс, получавших в течение 1 мес ежедневно инъекции йодметилата 2-(диметиламино) этилового эфира N-(n-метоксибензоил)-DL-фенилаланина в место повреждения (рис. 1, пункт 3 а, б, в). На “а”: ордината – число импульсов до и после стимуляции нерва, абсцисса – время регистрации импульсного потока. На “б”: картина импульсного потока после стимуляции нерва в избранном интервале времени. На “в”: ордината – процент импульсов (в бинах) от числа проб, абсцисса – последовательность бинов

Как видно из рис., последствия спинномозгового повреждения проявляются в виде урежения вызванной пачечной активности одиночного ИН по сравнению с нормой.

Данный эффект хорошо виден на кумулятивной престоимой диаграмме (рис. 1, пункт 2, а), где имеет место уменьшение числа импульсов в пачке, и на престоимой части суммированной (17 исп.) диаграммы (рис. 1, пункт 2, в). Что касается постстимульного ответа ИН, очевидно также урежение вызванного импульсного потока (рис. 1, пункт 2, б). После введения ДЭФ у крыс с ГМС СМ происходит резкое учащение как престоимой, так и постстимульной активности ИН, сопровождающееся исчезновением пачечной активности (рис. 1, пункт 3, а, б, в) и приближающееся по своим показателям к картине ВА у интактных животных (рис. 1, пункт 1, а, б, в).

Анализируя проведенные исследования, можно прийти к выводу о том, что в целом имеется положительный эффект от применения ДЭФ при органических повреждениях СМ у крыс и наблюдается наличие стойких результатов. Проведенные эксперименты позволяют считать, что после ГМС СМ на уровне Т8–Т9 наблюдается картина постепенной нормализации нарушений опорно–локомоторных функций, и нагляднее всего это проявляется у крыс 3–й группы (в течение 18–20 дней). Таким образом, полученные результаты настоящего исследования свидетельствуют об эффективном действии ДЭФ на ВА одиночных ИН СМ при его органических повреждениях. Результаты ранее проведенных исследований действия холиновых производных [9–12], а также настоящие данные по изучению действия ДЭФ на ВА одиночных ИН поврежденного СМ позволяют заключить о протекторном действии ДЭФ в условиях ГМС СМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев А.С., Матинян Л. А, Хачатрян Т.С. Вестник МАНЭБ, 3, 142–145, 2004.
2. Андреев А.С., Хачатрян Т.С. Вестник МАНЭБ, 8, 7, 206–210, 2003.
3. Андреев А.С., Хачатрян Т.С. Вестник МАНЭБ, 12, 4, 207–209, 2007.
4. Мнджоян О. Л., Топузян В. О. Ж. Успехи химии, L, вып. 12, с. 2198–2211, 1981.
5. Хачатрян Т.С. Биолог. журн. Армении, 59, 3–4, 198–202, 2007.
6. Brown M., Davies I.M., Moffat C.F., Redshaw J., Craft J.A. J. Mar. Environ. Res., 3, № 57, pp. 155–169, 2004.
7. Di Venosa G., Hermida L., Battle A., Fukuda H., Defain M.V., Mamone L., Rodriguez L., MacRobert A., Casas A. J. Photochem. Photobiol., 1, № 92, pp. 1–9, 2008.
8. Eibl K.H., Lewis G.P., Betts K., Linberg K.A., Gandorfer A., Kampik A., Fisher S.K. J. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 3, № 48, pp. 1305–1311, 2007.
9. Grigoryan H.A., Hambardzumyan A.A., Mkrtchyan M.V., Topuzyan V.O., Halebyan G.P., Astryan R. J. Chem. Biol. Interact., 1, № 171, pp. 108–116, 2008.
10. Holmes–McNary M.Q., Cheng W.L., Mar M.H., Fussel S., Zeisel S. H. J. Am. J. Clin. Nutr., 4, № 64, , pp. 572–576, 1996.
11. Masson P., Froment M.T., Gillon E., Nachon F., Lockridge O., Schopfer L. M. J. Biochim. Biophys. Acta, 1, № 1774, pp. 16–34, 2007.
12. Rouleau P., Unq R.V., Lapointe N.P., Guertin P.A. J. Neurotrauma, 2, № 24, pp. 367–378, 2007.

Поступила 02.03.2009.



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Biolog. Journal of Armenia, 3 (61), 2009

TAXONOMIC NOTES ON THE GENUS *SEPTORIA* OF SEVERAL ORNAMENTAL PLANTS IN IRAN

H. AZIMI-MOTEM, L.L. OSIPYAN

Plant Pathology Department, Plant Pests & Diseases Research
Institute, Tehran, Iran, e-mail: ha_motem@yahoo.com

Department of Botany, Yerevan State University, e-mail: losipyan@ysu.am

Collections of ornamental plants (*Antirrhinum majus* L., *Cercis siliquastrum* L., *Chrysanthemum* sp., *Cornus sanguinea* L., *Digitalis* sp., *Gladiolus* sp., *Hedera helix* L., *Rosa* sp.) with leaf spot symptoms, and pycnidia signs from Mycological Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection, and new collections, collected from north of Iran (Caspian sea area), were studied to investigate the causal organisms. Studied materials belong to eight host species. Studies revealed that *Septoria antirrhini* Desm., *S. cercidis* Fr., *S. chrysanthemella* Sacc., *S. cornicola* Desm., *S. digitalidis* Pass., *S. gladioli* Pass., *S. hederæ* Desm., *S. rosae* Desm. respectively are the causal organisms on studied host plants. All collections are preserved in the Mycological Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection. The descriptions of Iranian samples of these species are given for the first time. One species (*S. rosae* Desm.) is new for Iranian mycoflora.

Fungi – Septoria – ornamental plants

Ուսումնասիրված է բժավորության ախտանշաններով և պիկնիդիալ սպորատվության հատկանիշներով 8 տեսակ ղեկորատիվ բույս (*Antirrhinum majus* L., *Cercis siliquastrum* L., *Chrysanthemum* sp., *Cornus sanguinea* L., *Digitalis* sp., *Gladiolus* sp., *Hedera helix* L., *Rosa* sp.) Իրանի Բույսերի Պաշտպանության Գիտահետազոտական Ինստիտուտի Սնկաբանական Հավաքածուից, ինչպես նաև այդ բույսերի նոր հավաքածուներ Իրանի հյուսիսից (Կասպից ծովի շրջան): Հետազոտված է պիկնիդիալ սպորատվության կառուցվածքը: Որոշված է 8 սեպտորիոզի հարուցիչ (*Septoria antirrhini* Desm., *S. cercidis* Fr., *S. chrysanthemella* Sacc., *S. cornicola* Desm., *S. digitalidis* Pass., *S. gladioli* Pass., *S. hederæ* Desm., *S. rosae* Desm.): Առաջին անգամ տրված են նկարագրություններ այս տեսակների Իրանի նմուշների համար: Տեսակներից մեկը՝ *S. rosae* Desm., նոր է Իրանի համար:

Մակեր - Septoria – ղեկորատիվ բույսեր

Изучены образцы восьми видов декоративных растений (*Antirrhinum majus* L., *Cercis siliquastrum* L., *Chrysanthemum* sp., *Cornus sanguinea* L., *Digitalis* sp., *Gladiolus* sp., *Hedera helix* L., *Rosa* sp.) из Микологической Коллекции Иранского Научно-исследовательского Института Защиты Растений, а также новые образцы этих растений, собранные на севере Ирана (область Каспийского моря) с симптомами пятнистости и признаками пикнидиального спороношения. Исследовано строение пикнидиального спороношения. Идентифицировано 8 видов возбудителей септориоза (*S. antirrhini* Desm.,

S. cercidis Fr., *S. chrysanthemella* Sacc., *S. cornicola* Desm., *S. digitalidis* Pass., *S. gladioli* Pass., *S. hederæ* Desm., *S. rosae* Desm.). Впервые даны описания иранских образцов этих видов. Один из видов (*S. rosae* Desm.) является новым для Ирана.

Грибы – Septoria – декоративные растения

The genus *Septoria* Sacc. belongs to Coelomycetes of Imperfect fungi with more than 3000 published names of species including many synonyms [1], although it's true, diversity range is estimated from 1000 [7] to 2000 [11]. It is one of the largest genera of plant pathogens, causing a range of disease symptoms including leaf and fruit spots in many agricultural crops, as well as horticultural and native plants [5]. This genus includes a group of fungi, which reproduce only asexually by producing hyaline sclerospores in flask shaped pycnidia.

In Iran the species of *Septoria* are poorly known and not yet intensively studied. Some species of *Septoria* were reported by Ershad, Esfandiari, Khabiri, Viennot-Bourgin, Scharif, Jorstad, Petrak as mycoflora of ornamental plants from Iran [2]. Most of these reports were done without any description. The present article describes the species of *Septoria* on ornamental plants studied by authors in 2008.

Materials and methods. Ornamental plants "with leaf spot symptoms and pycnidia signs from Mycological Collection of the Iranian Research Institute of Plant Protection" were examined. Studies were carried out on the basis of detailed macro- and microscopic observation of diseased tissues. Macroscopic features described from dried materials and microscopic features described from dried materials were dehydrated in moist chamber for 1-2 hours. Studied specimens were mounted, stained with acidified glycerol blue, potassium hydroxide (KOH) 5%, and erythrosin B-ammonia solution (0.5 g erythrosin B in 100 ml 10% aqueous NH₃) [4]. The investigations were done under an Olympus CH2 light microscope on normal settings (100-1000x). For each sample at least thirty pycnidia were measured. Length and width of about 50-100 conidia were measured for each sample, mean of them and variance were calculated. Numbers of septas for each conidia were studied. The microscopic observations and a comparison of their results with corresponding mycological studies [6, 12, 8, 9] led to a direct identification of the causing agents.

Descriptions were made for each collection by macroscopic and microscopic features including: symptoms of host explanation, pycnidia specifications including shape, color, wall and ostiole characterization, morphometric specification, and its position on host tissues; conidia and its ends shape, conidia length and width size, and septation.

Results. The descriptions of *Septoria* species by families of host plants, are brought below in alphabetical order.

Family Araliaceae
***Hedera helix* L.**

Septoria hederæ Desm.

Location: Bandar-Gaz (Gorgan), 1948

Leaf spots amphigenous, round or somewhat angular, pale brown, bordered by a narrow dark line. Pycnidia thick-walled, epiphyllous, 100-200 µm in diameter. Conidia filiform, 4-5 septate, straight to slightly curved, $24.4(20-35) \times 1.8(1-2)$ µm.

Notes: *Septoria hederæ* Desm. was originally described as having conidia $30-40 \times 1-2$ µm [9], Jorstad [6] described that with conidia $24-48 \times 1-2$ µm, and

Teterevnicova-Babayan [12] described it as having conidia $16-40 \times 1-2 \mu\text{m}$ and synonym with *S. insularies* Berk. and *S. desmazieri* Sacc. *Septoria hederae* Desm. was reported from Iran on *Hedera helix* L. by Esfandiari, 1946; Scharif & Ershad, 1966 without any descriptions [2]. Examined materials are closer to these descriptions for *Septoria hederae* Desm.

Hedera helix L. is native to most of Europe, the west coast of South America, western Asia, northern Africa and Australia. It is an evergreen climbing plant, growing to 20-30 m high where suitable surfaces (trees, cliffs, walls) are available, and also growing as ground cover where there are no vertical surfaces. It is widely cultivated as an ornamental plant in gardens and parks, forests and other natural areas. The flowers are produced from late summer until late autumn, individually small, in 3-5 cm diameter umbels, greenish-yellow, and very rich in nectar, an important late food source for bees and other insects; the fruit are small black berries ripening in late winter, and are an important food for many birds, though poisonous to humans.

Leaf spot of *Hedera helix* is caused by *Septoria hederae* Desm.

Family Asteraceae ***Chrysanthemum* sp.**

Septoria chrysanthemella Sacc.

Location: Shahi (Gorgan), 1968

Leaf spots round to irregular, grayish brown to dark brown with black indistinct margins, sometimes surrounded by a narrow yellow halo, vary in size from very small to large (2-9 mm), covering the leaf surface (epiphyllous). As the spots increase in size and become more abundant, the affected leaves turn yellow, die and persist on the plant. Pycnidia scattered on lesions, amphigenous, immersed to erumpent, globose to subglobose, $50-85 \mu\text{m}$ in diameter. Ostiole single, apical, $20-32 \mu\text{m}$. Conidia filiform, 4-6 septate, straight to slightly curved, $54.4(50-60) \times 1.8 (1.5-2) \mu\text{m}$.

Notes: Nine species of *Septoria* (*S. adanensis* Petr., *S. chrysanthemella* Sacc., *S. minima* Halsted., *S. obesa* Syd., *S. cercosporoides* Trail., *S. social* Pass., *S. chrysanthemi* Allesch., *S. macrosporia* Dearn., *S. rostrupii* Sacc.) were recognized by Paul & Singh [8] and Priest [9] on *Chrysanthemum*. *S. chrysanthemella* Sacc. reported from Iran on the *Chrysanthemum indicum* L. by Viennot-Bourgin et al., 1970 without any descriptions [2]. Conidial dimensions in examined materials are closer to descriptions for *Septoria chrysanthemella* Sacc. by Teterevnikova-Babayan [12], Jorstad [6] and Priest [9].

Chrysanthemum is one of the most important ornamental flower crops grown. It is used as garden and cut flowers. *Septoria* leaf spot disease of *Chrysanthemum* spp. has a wide geographical distribution, including the Asian, American and European regions, as well as the Iranian regions. The spotting of the foliage decreases the quality and stability of the cut flowers and tends to reduce the quantity and quality of the blooms.

Family Cornaceae ***Cornus sanguinea* L.**

Septoria cornicola Desm.

Location: Nowshahr (Mazandaran), 1974

Leaf spots hologenous, scattered to confluent, angular, dark brown with purplish margins, bordered by leaf veins, mostly 3-5 mm in diam, but reach up to 15 mm when confluent. Pycnidia scattered, amphigenous, globose, immersed, $50-100 \mu\text{m}$. Conidia cylindrical, substraight to curved, hyaline, 2-5 less distinct septate, $50 (40-65) \times 2.5 \mu\text{m}$.

Notes: Farr [3] examined a vast number of *Septoria* materials from *Cornus* spp. and provided a key for the identification of *Septoria* spp. on *Cornus* plants [10]. Teterovnikova-Babayan [12] described *Septoria cornicola* Desm. on *Cornus alba*, *C. sibirica*, *C. tatarica*, *Swida australis* as having conidia $50-70 \times 2-2.5 \mu\text{m}$. *Septoria cornicola* Desm. reported from Iran by Khabiri on *Cornus sanguinea* L. in 1958 without any description. Also this species reported from Iran by Jorstad in 1960 and Scharif & Ershad as *Septoria* sp. in 1966 on *Cornus australis* C.A.Mey. without any descriptions [2]. Examined materials are closer to descriptions for *Septoria cornicola* Desm.

Cornus sanguinea L. is a species of dogwood native to most of Europe and western Asia named Common Dogwood, occurring in Caspian Sea area. It is a medium to large deciduous shrub, with creamy white flowers. There are many garden cultivars of this plant. *Septoria* leaf spot, caused by the fungus *Septoria cornicola*, is a late-season disease of dogwood that causes little damage.

Family Fabaceae ***Cercis siliquastrum* L.**

Septoria cercidis Fr.

Location: Behshahr (Gorgan), 1948

Leaf spot of *Cercis siliquastrum* L. is caused by *Septoria cercidis* Fr. Spots are irregular, restricted by leaf vein and become partially angular in shape, light creamy with distinct reddish brown margins. Pycnidia dark brown submerged to erumpent, globose, $123 (110-140) \mu\text{m}$. Ostiole single $35-45 \mu\text{m}$. Conidia are hyaline, 1-3 septate, $17.4 (14-24) \times 2 \mu\text{m}$.

Notes: Two species of *Septoria* (*S. cercidis* Fr., *S. siliquastrum* Pass.) were recognized by Teterovnikova-Babayan [12] on *Cercis* sp. *S. cercidis* Fr. reported from Iran on the *Cercis siliquastrum* L. by Viennot-Bourgin et al., 1970 without any descriptions [2]. Conidial dimensions in examined materials are closer to descriptions for *Septoria cercidis* Fr. by Teterovnikova-Babayan [12].

Cercis siliquastrum L. is a small tree native to Western Asia, including Iran, Iraq, Israel, Jordan, Lebanon and Syria and Southern Europe including Albania, Bulgaria, France, Greece, Italy, Turkey and Yugoslavia. It is used as garden plant in most areas as well as in Iran. It has heart-shaped leaves, and in early spring it is covered with rosy-pink flowers, which appear before the leaves. It produces hard wood with an attractive grain. The flowers have an agreeably acidic bite, and are eaten in mixed salad.

Family Iridaceae ***Gladiolus* sp.**

Septoria gladioli Pass.

Location: Lahijan (Gilan), 1952

Spots hologenous, orbicular to irregular, dark green to brown, bounded by veins with purple margin. Pycnidia amphigenous, scattered on lesions, separate, immersed to erumpent, globose, black, $135 (90-150) \mu\text{m}$. Conidia hyaline, filiform, 1-5 septate, straight to slightly curved $35 (30-50) \times 3 \mu\text{m}$.

Notes: Teterovnikova-Babayan [12] described *Septoria gladioli* Pass. on *Gladiolus* sp. as having pycnidia $75-190 \mu\text{m}$, conidia $20-60 \times 2-4 \mu\text{m}$ with 1-5 septate, Paul & Singh [8] described it with pycnidia $90-150 \mu\text{m}$, conidia $25-60 \times 3-3.5 \mu\text{m}$, 1-4 septate, and Priest [9] described with pycnidia $130-180 \mu\text{m}$, conidia $45-55 \times 2.5-3 \mu\text{m}$, 3-5 septate. *Septoria gladioli* Pass. reported from Iran on *Gladiolus* sp. by Khabiri, 1952 without any descriptions [2]. Examined materials are closer to descriptions for *Septoria gladioli* Pass. by Teterovnikova-Babayan [12], Paul & Singh [8], and Priest [9].

Gladiolus is a genus of flowering plants native to South Africa. Common name for these plants is simply gladiolus. These flowers are variously colored, pink to reddish or light purple with white, contrasting markings, or white to cream or orange to red. Gladioli have been extensively hybridized and a wide range of ornamental flower colors are available from the many varieties. Leaf spot disease of *Gladiolus* spp. caused by *Septoria gladioli* Pass.

Family Rosaceae

Rosa sp.

Septoria rosae Desm.

Astara (Gilan), 2008

Leaf spots circular, light green or yellow, 0.5-1 mm in width. Later spots turn to purple or dark brown in the center, and then changed to necrotic with distinct light brown margins. Spots vary in size 1-5 mm, based on disease severity. The worm-like creamy-white spore tendrils that emerge from the dark pycnidia are very typical. The centers of the spots appeared to be white, due to fluffy masses of conidia that can pile up around the pycnidia. Symptoms lead to a premature leaf drop in the case of a severe infection. Pycnidia, immersed, epiphyllous, thin-walled, dark brown to black and separated on necrotic lesions, 165 (150-200) μm , conidia hyaline, straight but mostly slightly curved, 5-6 septate, 47 (35-66) $\times$ 2.5 μm .

Notes: Four species of *Septoria* reported on *Rosa* sp. (*S. rosae* Desm. conidia 70-90 $\times$ 3.5-4 μm ., *S. rosae* var. *sempervirentis* Durieu & Mont. conidia 30-50 $\times$ 2.5 μm , 3-4 septate., *S. rosae* Thum. conidia 50-60 $\times$ 2.5-3 μm , 4-5 septate., *S. rosarum* West. var. *leptosperma* Speg. conidia 30-50 $\times$ 1 μm) by Jorstad (1965), Teterevnikova-Babayan (1987), Singh (2003) and Priest (2006). Examined materials are closer to descriptions for *Septoria rosae* Desm. This is the new species for Iranian mycoflora.

Roses are not only popular ornamentals, but some of the wild species also used as food, cosmetics and even medicine. Rosa leaf spot disease, are caused by *Septoria rosae* Desm.

Family Scrophulariaceae

Antirrhinum majus L.

Septoria antirrhini Desm.

Location: Caspian sea area, 1958

Leaf spots hologenous, circular to elongate, small, 2-5 mm diam, pale brown to creamy with in center, and purplish-brown in margin. Pycnidia globose, dark brown to black, amphigenous, scattered, separate, immersed, slightly erumpt, 55 (45-80) μm . Ostiole single, apical, 20(15-25) μm . Conidia filiform, hyaline, straight to slightly curved, with round apex and truncate base, 1-2 septate, 20(12-32) $\times$ 2 (1.5-2.5) μm .

Notes: *Septoria antirrhini* Desm. was described from *Antirrhinum majus* L. with pycnidia 40-70 μm and conidia 15-20 $\times$ 1.5-2.5 μm and 1-2 septate by Teterevnikova-Babayan [12]. This species reported from Iran on the same host by Khabiri in 1958 without any descriptions [2]. Examined materials found to be long as 20 μm and width as 2 μm and closer to descriptions for *Septoria antirrhini* Desm. by Teterevnikova-Babayan [12], and Priest [9].

Antirrhinum majus L. is a species native to the Mediterranean region. It is a herbaceous perennial plant and often planted in gardens for its flowers.

Digitalis* sp.Septoria digitalidis* Pass.

Location: Gorgan, 1982

Leaf spots are 3.8 (2-6) mm in diam., circular to irregular, amphigenous, light creamy, necrotic, with distinct brown to black margins. Pycnidia are dark brown submerged to erumpent, globose, 62.5(60-70) μ m in diam. Conidia are hyaline, straight, 28.2 (25-33) $\times$ 1.1 (1-1.5) μ m.

Notes: Teterevnikova-Babayan [12] described *Septoria digitalidis* Pass. on *Digitalis ciliate*, *D. ferruginea*, *D. nervosa*, *D. grandiflora*, *D. purpurea*, *D. officinalis*, *Digitalis* sp. as having pycnidia 60-150 μ m and conidia 25-30 $\times$ 1.5 μ m. *Septoria digitalidis* Pass. reported from Iran by Esfandiari on *Digitalis* sp. in 1948 and by Petrak in 1949, Scharif & Ershad in 1966 on *Digitalis nervosa* Steud. without any descriptions [2]. Examined materials are closer to descriptions for *Septoria digitalidis* Pass. by Teterevnikova-Babayan [12].

Digitalis is a genus of about 20 species of herbaceous perennials, shrubs plants often grown as an ornamental plant due to its showy flowers. The genus is native to Europe, western and central Asia, and northwestern Africa. The flowers are produced on a tall spike, and vary in color with species, from purple to pink, white, and yellow.

REFERENCES

1. CABI Bioscience, CBS & Landcare Research. Index Fungorum. <http://www.indexfungorum.org>. 2006.
2. Ershad D. Fungi of Iran. Ministry of Agriculture, Plant Pests and Diseases Research Institute, Department of Botany, Publication N10, 227, 1977.
3. Farr D. F. *Septoria* species on *Cornus*. Mycologia 83, 5, 611-623, 1991.
4. Hawksworth D.L. and Cole M.S. Fungal Diversity 11, 87-97, 2002.
5. Holliday P. A. Dictionary of Plant Pathology. Cambridge University Press, Cambridge, 369, 1989.
6. Jorstad I. *Septoria* and septorioid fungi on Dicotyledones in Norway, Skr. Norske Vidensk.-Akad. Oslo Mat.-Naturvidensk. Kl., n. ser., 22, 1-110, 1965.
7. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. & Stalpers J.A. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi, 9th edn. CAB International, Wallingford. 655, 2001.
8. Paul Y.S. & Singh A. Indian *Septoria*. Pawan Kumar scientific publishers (India). 89, 2003.
9. Priest M.J. Fungi of Australia. Australian biological resource study, Canberra. 259, 2006.
10. Shin H.-D. & Sameva E.F. *Septoria* in Korea. National Institute Agricultural Science & Technology, Suwon, Korea. 183, 2004.
11. Sutton B.C. The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew. Surrey. 696, 1980.
12. Teterevnikova-Babayan D.N. The genus *Septoria* in USSR. 478, 1987.

Received 13.03.2009



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(61), 2009

ՀՀ ԼՈՐԻ ՄԱՐԶԻ ԳՈՒԳԱՐՔԻ ՏԱՐԱԾԱՇՐՋԱՆԻ ԱՆՏԱՌԻ ՎԵՐԻՆ ԳՈՏՈՒ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅԱՆ ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ՎԵՐՋԻՆ 50 ՏԱՐՈՒՄ

Ժ.Հ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ¹, Վ.Գ. ՄԱՅԱԿՅԱՆ²

¹ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտ, E-mail: botanyinst@sci.am

²Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ուսումնասիրվել է ՀՀ Լոռու մարզի Գուգարքի տարածաշրջանի բարձադիր գոտու անտառային ֆոնդի փոփոխության դինամիկան 1962-2008 թթ.: Պարզաբանված է, որ անտառի վերին գոտում վերջին տասնամյակի ընթացքում ի հայտ են եկել անթրոպոգեն նոսրուտներ (357,8 հա) և չվերականգնված հատված տարածքներ (411 հա):

Անտառածածկ տարածքի և պաշարի բաշխվածության դինամիկայի վերլուծությամբ բացահայտված է, որ հիմնական անտառկազմող տնտեսապես արժեքավոր ծառատեսակների՝ հաճարենու, կաղնու մոտ անցանկալի տեսա-կափոխությունը կրում է համատարած բնույթ, որն արդյունք է անթրոպոգեն տրանսգրեսիայի:

Անտառի վերին գոտի - անտառային ֆոնդ - անթրոպոգեն տրանսգրեսիա - հիմնական անտառկազմող ծառատեսակ

Изучена динамика изменения лесного фонда верхнего пояса Гугарского района Лорийского марза за 1962-2008 гг. Выяснено, что в верхнем поясе лесов в течение последних десятилетий образовались антропогенные редколесья (357,8 га) и невозобновленные лесосеки (411 га).

Выявлено, что нежелательное видоизменение основных лесообразующих хозяйственно-ценных древесных видов (дуб, бук) антропогенная трансгрессия имеет повсеместно распространенный характер, что является результатом антропогенной трансгрессии.

Верхний пояс леса - лесной фонд – антропогенная трансгрессия – основные лесообразующие древесные породы

The dynamics of the changes in the forest reserves in the top belt of Gugark district (Lori Marz) is studied for a period 1962-2008. It is elucidated that during the last decades anthropogenic sparses (357,8 ha) and unrenewable wood-cutting areas are formed.

The analysis of the dynamics of the wood-covered area and purveyance distribution shows, that unwanted alteration of the main wood-generated economically valuable arborous species (oak, beech) performs everywhere prevalent disposition, as a result of anthropogenic transgression.

Forest high belt - forest fund – anthropogen transgress – basic forest formation species

Անտառները Գուգարքի տարածաշրջանում տարածված են Փոքր Կովկաս լեռնահամակարգի Փամբակ, Բազում և Հալաբ լեռնաշղթաների տարբեր կողմնադրության լանջերին:

Անտառներն այստեղ զբաղեցնում են 25715 հա տարածք և գտնվում են Գուգարքի անտառտնտեսության տնօրինության տակ: Անտառային համակեցությունները հյուսիսարևելյից սահմանակից են Դսեղի անտառտնտեսությանը, արևելքից՝ Դիլիջան ազգային պարկին, արևմուտքից՝ Սպիտակի տարածաշրջանին, իսկ հարավից՝ Կոտայքի և Արագածոտնի մարզերին:

Գուգարքի անտառները տարածվում են ծովի մակարդակից 1100-2300 (2400) մ բարձրությունների վրա, ընդ որում մինչև 1200 մ բարձրության վրա տեղաբաշխված են անտառների ընդամենը 4,8 % (967,4 հա), իսկ 1201-1700՝ 37,8 % (7555 հա): Անտառների հիմնական զանգվածները գտնվում են անտառի վերին գոտում՝ 1700-ից բարձր՝ 57,4 % (11,4 հազ. հա), որտեղ և կենտրոնացված է բնափայտի պաշարի շուրջ 65 %-ը (մոտ 130 հազ. հա):

Տարածաշրջանը բնորոշվում է ջերմաստիճանային մեծ տատանումներով, որը միանգամայն օրինաչափ է և պայմանավորված է լանջերի դիրքադրությամբ և ծովի մակարդակից բարձրությամբ: Մինչև 1400 մ գերիշխում է բարեխառն տաք, 1400-1700 մ բարեխառն ցուրտ, իսկ 1700-ից բարձր՝ ցուրտ կլիման:

Անտառային վերին գոտին էկոլոգիական բարդ համակարգ է, որտեղ անտառների դենդրոբազմազանությունը, տարածվածությունը, ինչպես նաև առանձին տեսակների կենսաէկոլոգիական շատ առանձնահատկություններ անմիջականորեն պայմանավորված են էկոլոգիական տարբեր գործոնների հետ ունեցած բարդ փոխհարաբերություններով [4, 6, 7, 8]:

Բիոտիկ ու մարդածին գործոններն, ինչպես նաև անտառածման պայմանները խիստ ազդեցություն են թողնում այս գոտու անտառների արդյունավետության և ընդհանրապես, ամբողջ անտառային համակեցության զարգացման ընթացքի վրա: Ինչպես նշվում է մի շարք գրական աղբյուրներում անթրոպոգեն ճնշումները ունեն երկար տարիների պատմություն, որի ընթացքում մարդն իր անհեռատես գործունեությամբ նպաստել է անտառների դեգրադացմանը և դրանց ուղղաձիգ սահմանների կրճատմանը [2, 5, 8]:

Գուգարքի անտառային ֆոնդի 56%-ը (14381,5 հա) գտնվում է վերին գոտում, որտեղ անտառածածկ է 79,3%-ը (11412,6 հա):

Անտառային հողերի ոչ անտառածածկ մակերեսը 11% (1408,5 հա) կազմված է չմիակցված անտառային մշակույթներով, չվերականգնված հատված տարածքներով, կենսաբանական ու անթրոպոգեն նոսրուտներով:

Ոչ անտառային հողերից առավել տարածված են արոտավայրերն ու խոտհարքները (10,8 %):

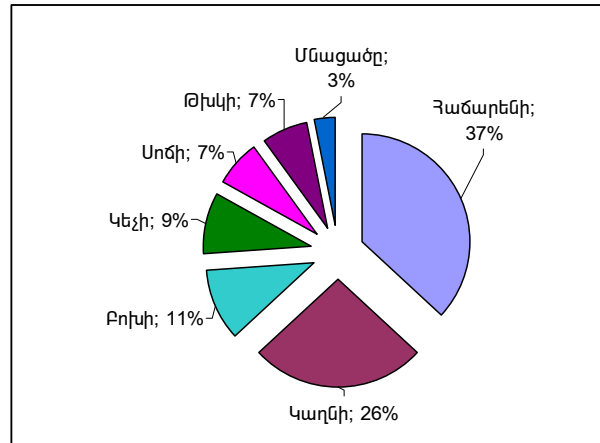
Հիմնական անտառկազմող ծառատեսակները, ինչպես և երկրի այլ անտառային շրջաններում, ներկայացնում են արևելյան հաճարենին (*Fagus orientalis*), այնուհետև խոշորառեչ կաղնին (*Quercus macranthera*), կովկասյան բոխին (*Carpinus betulus*) [3, 9]: Զգալի մասնակցություն ունեն նաև Լիտվինովի կեչին (*Betula litwinowii*), բարձրլեռնային թխկին (*Acer trautvetteri*), ինչպես նաև՝ թեղին (*Ulmus*), հացենին (*Fraxinus*), լորենին (*Tilia*), արոսենին (*Sorbus*) (Նկար 1):

Վերին գոտու ծառուտները որպես օրինաչափություն բնութագրվում են ցածր արդյունավետությամբ [6, 9, 10]: Այսպես, միջին բոնիտետային դասը կազմում է IV-ը, ընդ որում I բոնիտետի ծառուտները կազմում են 1,1%, II բոնի-տետինը՝ 1,6%, III բոնիտետինը՝ 28,6%, IV բոնիտետինը՝ 51%, V բոնիտետ-տինը՝ 18,8%:

Բարձր արտադրողականության ծառուտների հիմնական մասը գտնվում է անտառային վերին գոտու ստորին հատվածում՝ մինչև 1950 մ (Մարգահովիտ անտառապետություն քառ. 35, հատված 9, 1991 Անտառշինություն) և կազմված է գլխավորապես սոճուտներից, որոնց ընդհանուր մակերեսը (I և II բոնիտետ-տային դաս) կազմում է 359,4 հա:

Անտառային ֆոնդի հասակային կազմը ներկայացնում է հետևյալ պատկերը. երիտասարդներ՝ տարածքի 15,6 %, միջահասակներ՝ 11,2 %, հասունացողներ՝ 15,9 %, հասուն և գերհասուններ՝ 57,3 %: Այս գոտում ամենաարժեքավորը հաճարկուտներն են, սոճուտները և բարձրաբուն կաղնուտները, որոնց տեսակարար կշիռը կազմում է տարածքի շուրջ 60 %-ը:

Որպես կանոն անտառային ֆոնդի վիճակը մեծ չափով պայմանավորված է նաև մարդու տնտեսական գործունեությամբ: Վերջինս առավել մեծ մասշտաբներով դրսևորվել է հատկապես 1990-ական թվականներին՝ կապված հանրապետությունում տիրող էներգետիկ ճգնաժամի հետ:



Նկար 1. Վերին գոտու անտառային տարածքների բաշվածությունը ըստ անտառակազմող ծառատեսակների

Ելնելով դրանից, մեր կողմից փորձ է արվել կատարել համեմատական ուսումնասիրություններ՝ բացահայտելու Գուգարքի տարածաշրջանի անտառ-ների վերին սահմանի փոփոխության և կրճատման դինամիկան վերջին 50 տարվա ընթացքում: Այդ դինամիկայի վերլուծությամբ փորձել ենք երևան հանել վերջինիս քանակական ու որակական ցուցանիշները, որոնց արդյունք-ները բերված են թիվ 1 աղյուսակում: Վերին գոտու անտառային ֆոնդի վերլուծության ժամանակ մեր կողմից հիմնականում օգտագործվել են անտառկա-ռավարման պլանների 1962, 1992, և 2008 թթ. հաշվետվության նյութերը [1]:

Աղյուսակում բերված տվյալներից նկատվում է 1962 թ.-ից մինչև 2008 թ. ընդհանուր տարածքի աստիճանական ավելացում՝ 1992 թ.-ին այն կազմել է 1487 հա, իսկ 2008 թ.-ին՝ 1992 թ. համեմատությամբ՝ 1309,2 հա: 2796 հա տարբերությունը պայմանավորված է անտառմշակույթների անտառածածկ տարածքի փոխադրմամբ, Գուգարքի անտառտնտեսությանը նախկին սովխոզային անտառների միացումով, ինչպես նաև անտառների գույքագրման ժամանակ աշխարհատեղեկատվական համակարգով մակերեսների ճշգրտմամբ:

Հետազոտություններից պարզվում է, որ անտառածածկի տոկոսային հարաբերությունը 1962 թ. կազմում է 79%, 1992 թ. 84%, 2008 թ. 79%: Բերված տվյալներից նկատվում է նաև տեսակարար կշռի մինչև 5% նվազում: Հաշվի առնելով, որ սովխոզային անտառների ավելի քան 90% կազմել են անտառածածկ տարածքները, ուստի պետք է արձանագրել, որ տեսակարար կշռի 5% նվազման պատճառը անտառային էկոհամակարգերի վրա անթրոպոգեն ազդեցության հետևանքն է, մասնավորապես չկանոնակարգված (ապօրինի) հատումները, որի հետևանքով ի հայտ է գալիս մինչև 2008 թ. բացակայող այնպիսի ցուցանիշային տվյալներ, ինչպիսիք են՝ չվերականգնված հատատեղերը (411 հա) և անթրոպոգեն նոսրուտները (357,8 հա): Եթե կենսաբանական նոսրուտների նվազումը (1992 թ. դրությամբ 1962 թ. նկատմամբ) կազմում է 603 հա, ապա այն միանգամայն պետք է դիտել դեպի անտառածածկի փոխադրում, իսկ 2008 թ. 209 հա նվազման տարբերությունը ոչ այլ ինչ է, քան անտառների դեգրադացման ու խաթարման ցուցանիշ:

Ընդհանուր առմամբ, անօրինակ հատումներից տուժած տարածքների ընդհանուր մակերեսը կազմում է 2198,5 հա, որից 411 հա՝ չվերականգնվող, այսինքն, այն տարածքները, որտեղ թեկուզ և առկա մատղաշը անհուսալի է պատշաճ վերականգնման համար: Մնացած 1787,5 հա տարածքներում նկատվում է լրիվության կտրուկ անկում՝ 0,6-0,8 (0,9)-ից մինչև 0,3-0,5:

**Աղյուսակ 2. Անտառածածկ տարածքի և պաշարի բաշխվածության
դինամիկան ըստ գերակշռող ծառատեսակների**

Գերակշռող ծառատեսակ	1962 թ.		1992թ.		2008 թ.	
	մակերես, հա	պաշար, մ ³	մակերես, հա	պաշար, մ ³	մակերես, հա	պաշար, մ ³
հաճարենի	4654,6	784875	5055,9	933170	4290	773860
այդ թվում ա) հատումներով անցած	-	-	-	-	406	13260
կաղնի	2402,6	209522	2540,8	248450	2954,9	217768
այդ թվում ա) ցածրաբուն	-	-	548,8	22440	856,2	2260
բ) հատումներով անցած	-	-	-	-	802,2	6760
գ) անտառմշակույթ	-	-	15,3	470	21,5	638
բոխի	328,7	31355	765,6	84270	1293,2	91680
այդ թվում ա) ցածրաբուն	-	-	80,7	2400	116,1	7035
բ) հատումներով անցած	-	-	-	-	553	8450
սոճի	295,8	18366	789	60710	764,1	88785
այդ թվում ա) անտառմշակույթ	216,4	5410	683	37870	702,9	78545
կեչի	559,1	24166	791,8	46540	904,3	29260
այդ թվում ա) հատումներով	-	-	-	-	169,2	24940
բ) անտառմշակույթ	-	-	27,5	430	37,5	640
թելի	632,9	54755	190,8	18700	162,4	6100
այդ թվում ա) անտառմշակույթ	-	-	3	90	3	100
թխկի	286,9	19758	824,7	83070	846,5	79690
այդ թվում ա) հատումներով անցած	-	-	-	-	103,1	4700
բ) անտառմշակույթ	-	-	8,9	110	8,9	120
լոբենի	10	2100	76,1	13530	99,5	3620
այդ թվում ա) հատումներով անցած	-	-	-	-	96,3	3460
հացենի	-	-	67,4	7660	26,6	1990
այդ թվում ա) անտառմշակույթ	-	-	19	690	19	850
կաղամախի	-	-	-	-	71,1	1000
այդ թվում ա) հատումներով անցած	-	-	-	-	68,7	970
Ընդամենը	9170,6	1144897	11102,1	1496100	11412,6	1293753

Դրան հաջորդող պարտադիր գործընթացը (խնամքի հատումները), այսպես կոչված, «Նոր անտառային տնտեսվարությունը» խիստ ծախսատար է, միաժամանակ բավականին արդյունավետ: Մեր կարծիքով մի կողմից մեծ մակերեսներ ունենալն ու ցածր պաշարը խոսում են էքստենսիվ, հետևաբար՝ բացասական տնտեսության մասին:

Նվազում են հաճարենու և թելու մակերեսները: Հաճարենին 1962-1992 թթ. ընթացքում բավականին կայուն է դրսևորվել, այսպես եթե 1962 թ. դրությամբ նրա մակերեսը կազմել է 4654,6 հա, 168 մ³՝ 1 հա միջին պաշարով, ապա 1992 թ. դրությամբ այն, ի հաշիվ պաշարի կուտակման, և խառը ծառուտներում առաջնային դիրքեր գրավելով, ավելացնում է իր զբաղեցրած մակերեսը ևս 401 հա-ով: Վերջինիս վկայություն է 1 հա-ի վրա կուտակված պաշարը, որը կազմում է 184 մ³: Հետագայում, 1992 թ. հետո, անօրինական

հատումների պատճառով հաճաբենու տարածքները նվազել են 765 հա, որտեղ տարածքի մի մասը վեր է ածվել չվերականգնված հատատեղերի, իսկ մյուսը մասը ենթարկվել է այլ տեսակների ճնշմանը: Ընդհանուր տարածքի 406 հա, որոնք նախկինում ներկայացված էին որպես բարձր լրիվության ծառուտներ, ներկայումս այդ տարածքները հատումների հետևանքով հիմնականում 0,2-0,3 լրիվության անտառներ են: Ցավոք, 50 տարվա ընթացքում հաճաբենու արհեստական ծառուտներ գրեթե չեն ստեղծվել:

Թեղին հովանդական սնկային հիվանդության պատճառով արագ կորցրել է իր զբաղեցրած տարածքների մեծ մասը: Այսպես 1962-1992 թթ. նրա մակերեսը նվազել է 613 հա, որից հետո կայունության միտում է նկատվում: 2008 թ. 1992 թ. հետ համեմատած նվազումը կազմել է 28,4 հա: Մեր կողմից կատարած դիտարկումները (վերջին 2-3 տարվա ընթացքում) հաստատում են տվյալ հիվանդության կանգ առնելը և վերջին տարիների թեղիների չորացման դեպքեր չեն արձանագրվում:

Վերին գոտում ապօրինի հատումներից առավել շատ տուժել են կաղնուտները, որոնք կազմում են 802,2 հա:

Ըստ ծագման, մակերեսների մեծ մասը զբաղեցնում է բարձրաբուն կաղնին (71%): Ցածրաբուն կաղնին, նախկինի հետ համեմատած, ավելացել է 1,5 անգամ (856,2 հա): Նման անցանկալի երևույթը անթրոպոգեն տրանսգրեսիայի արդյունք է, որի հետևանքով հատված տարածքները վերականգնվել են բնաշիվային եղանակով:

Զգալի տարածություն է զբաղեցնում նաև բոխին: Վերջինիս տեսակարար կշիռը 1962 թ. սկսած անընդհատ աճում է: Այսպես, 1962 թ. այն ուներ 3.5%, 1992 թ. - 6.9%, 2008 թ. - 11,3%:

Գրեթե յուրաքանչյուր տարի առատ սերմ տալը, սերմերի չվնասվելը և չոչնչացվելը, բարձր ծյունակությունը, հեշտ տարածվելը, բնաշիվային բազմացման ունակությունը՝ մինչև գերհասուն տարիքը, երիտասարդ տարիքում համեմատաբար արագ աճը ինչպես նաև տնտեսական միջոցառումների բացակայությունը, նպաստում են բոխու զբաղեցրած տարածքների ընդարձակմանը:

Արդյունքում ձևավորվում են ոչ երկարակյաց ու ցածրաբժեք տնկարկներ: Այս տեսանկյունից առավել վտանգավոր ու անցանկալի տեսակ է հատկապես կաղամախին: Եթե մինչև 1992 թ. վերջինս բացակայում էր ընդհանրապես, ապա 1992-2008 թթ. ընկած ժամանակաշրջանում զբաղեցնում 71 հա: Բոլոր վայրերում կաղամախին ներկայացված է հատատեղերում, որտեղ նախկինում զբաղեցրել է երրորդ-չորրորդ տեղը ծառուտի կազմում: Այն փոխարինում է կաղնուն, հաճաբենուն ու անտառային բուսականության աճի համար ամենաբարենպաստ պայմաններ է ստեղծում: Միանգամից ի հայտ գալը պայմանավորված է համատարած հատումներով, որտեղ առկա են եղել կաղամախու հատուկենտ ծառեր (անգամ մեկ ծառ), այդ հատվածը անմիջապես պատվել է կաղամախու ծառախմբերով: Նմանատիպ երևույթ նկատվում է նաև Վանաձորի անտառպետության քառակուսի 32 հատված 2 (1991 թ. Անտառշինություն): Ընդհանրացնելով մեր կողմից կատարված հետազոտությունների արդյունքները, կարելի է եզրակացնել, որ անթրոպոգեն տրանսգրեսիայի արդյունքում անտառի վերին գոտում մեծ չափերի է հասնում հիմնական անտառկազմող ծառատեսակների անցանկալի տեսակափոխությունը:

Այսպես, բարձրաբուն կաղնուտներում ապօրինի հատումներից հետո, որտեղ սերմնային վերականգնումը գրեթե բացակայում է, տարածքի մեծ մասը վերականգնվել է բնաշիվային եղանակով, որի արդյունքում ձևավորվել է ցածր արտադրողականության ծառուտներ, իսկ բարձրաբուն կաղնուտների մնացած տարածքները արագորեն պատվել են երիտասարդ բոխուտներով:

Ի տարբերություն կաղնուտների, հաճարկուտների մեծ մասում, որտեղ ապօրինի հատումներից հետո մնացել են հատուկենտ սերմատու ծառեր, բնական վերականգնումը համեմատաբար բավարար է: Այստեղ առաջ է գալիս մեկ այլ խնդիր. հաճարկուտներում արածեցման արդյունքում ամեն տարի վնասվում է հաճարենու մատղաշը և երիտասարդ ծառերը, որի արդյունքում վերջիններս ստանում են թփանման տեսք, իսկ այն հատվածներում, որտեղ հաճարենին ընդհանրապես դուրս է մղվել, տարածքը անմիջապես պատվել է կաղամախու (երբեմն ուռենու) ու բոխու բարձր խտության ծառուտներով:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Գուգարքի անտառտնտեսության անտառկառավարման պլանների ու անտառտաքսացիոն նկարագրությունների նախնական տարբերակ, Երևան, 215 էջ, 2008.
2. *Абрамян А.Г.* Изв. (АН Арм ССР), биол. и с.-х. науки, 9, 9, с. 85-93, 1956.
3. *Абрамян А.Г.* Труды Ботан. ин-та АН Арм ССР, 12, с. 5-40, 1959.
4. *Варданян Ж.А.* Биолог. журн. Армении, 34, 7, с. 741-745, 1981.
5. *Варданян Ж.А.* Деревья и кустарники Армении в природе и культуре. Ереван, 2003.
6. *Гулисашили В.З.* Горное лесоводство. М.-Л., 1956.
7. *Гулисашили В.З.* Изв. Всес. Геогр. Общ., 90, 2, с. 158-163, 1958.
8. *Долуханов А.Г.* Пробл. бот., М.-Л., 8, с.196-208, 1966.
9. *Махатадзе Л.Б.* Тр. Кироваканск. ЛОС, 1, с.107-191, 1941.
10. *Махатадзе Л.Б., Урушадзе Т.Ф.* Субальпийские леса Кавказа. М., 1972.

Ստացվել է 12.06.2009



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and Theoretical articles •

Biolog. Journal of Armenia, 3 (61), 2009

CHLORATE SENSITIVITY, TEMPERATURE RESPONSES AND PATHOGENICITY OF SOME IRANIAN ISOLATES OF *MACROPHOMINA PHASEOLINA* FROM OILSEED PLANTS

S. RAYATPANAH^{1, 2}, S.G. NANAGULYAN², S.V. ALAVI¹

¹Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resource Researches Center
of Mazandaran, P. O. Box 48175-556, Sari, Iran. E-mail: rayat_s_ag@yahoo.com

²Department of Botany, Faculty of Biology, Y S U, Yerevan, Armenia

The species *Macrophomina phaseolina* is the principle pathogen species of oilseed plants in Northern Iran. The result of infection is charcoal root or collar rot. Twenty-seven isolates of *M. phaseolina* were collected from plant tissues of soybean (*Glycine max* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.) growing in different areas of Northern Iran during 2008. The chlorate sensitivity of each isolate was determined after subculturing on minimal medium containing 120 mM potassium chlorate. In general, sesame isolates were chlorate-resistant, whereas soybean and sunflower isolates were chlorate sensitive. The pathogenicity was tested at the seedling stage on three plant species. None of the isolates were pathogenic on maize and all three were pathogenic on soybean and sunflower. The optimum temperature for growth was 35° for all North Iranian isolates.

Pathogenicity - Chlorate phenotype - Temperature responses – Macrophomina phaseolina - charcoal rot

Macrophomina phaseolina-ն՝ ածխային փտման հարուցիչը, բույսերի կարելի վոր պաթոգեն է, հատկապես հյուսիսային Իրանում յուղատու բույսերի համար: Սոյայի (*Glycine max* L.), արևածաղկի (*Helianthus annuus* L.) և քնջութի (*Sesamum indicum* L.) հյուսվածքներից բաանյոթ իզոլյատները հավաքված են հյուսիսային Իրանի տարբեր շրջաններից 2008 թ.-ի ընթացքում: Յուրաքանչյուր իզոլյատի քլորատային զգայունությունը որոշված է 120 mM կալիումի քլորատ պարունակող մինիմալ միջավայրի վրա ինոկուլյացիայից հետո:

Սովորաբար քնջութից ստացված իզոլյատները դիմացկուն են քլորատների նկատմամբ, մինչդեռ սոյայից և արևածաղկից ստացված իզոլյատները զգայուն են: Պաթոգենության ստուգումը անց է կացվել երեք տեսակի բույսերի վրա՝ տնկիների փուլում: Իզոլյատներից ոչ մեկը պաթոգեն չէ եգիպտացորենի համար և բոլորը պաթոգեն են սոյայի և արևածաղկի համար: 35°-ը օպտիմալ է բոլոր ուսումնասիրված իզոլյատների աճի համար:

Պաթոգենություն – քլորատային ֆենոտիպ – ջերմաստիճանի նկատմամբ ռեակցիա - Macrophomina phaseolina - ածխային փտում

Macrophomina phaseolina – возбудитель угольной гнили является важным патогеном растений, особенно на масличнoсемянных в северном Иране. Растения-хозяева собраны из различных областей северного Ирана в течение 2008 года. Было выделено 27 изолятов *M. phaseolina* с тканей сои (*Glycine max* L.), подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и кунжута (*Sesamum indicum* L.).

Хлоратная чувствительность каждого изолята определена после инокулирования на минимальной среде, содержащей 120 мМ хлората калия. Обычно изоляты с кунжута устойчивы к хлоратам, тогда как изоляты с сои и подсолнечника чувствительны к хлоратам. Проверка патогенности проведена на стадии саженцев на трех видах растений. Ни один из изолятов не оказался патогенным для кукурузы, но все оказались патогенными для сои и подсолнечника. Для роста всех изученных изолятов оптимальной температурой является 35°.

*Патогенность – хлоратный фенотип – реакция на температуру –
Macrophomina phaseolina – угольная гниль*

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. is pathogen of a wide number of cultivated and wild species in warm, temperate and tropical regions of the world [5]. The fungus is a soil born pathogen, infecting about 500 plant species in more than 100 families throughout the world [7]. *M. phaseolina* is classified as a *Deuteromycetes* which shows two asexual sub-phases: one a mycelial phase and the other - a pycnidial phase [11]. The charcoal root rot (CRR) is an economically important disease of many crop plants in Asia, Africa, North and South America and some parts of Europe. The fungus is most widely distributed on soybean, sorghum, bean, cotton, corn. During 1994 the soybean yield loss due to charcoal rot in Argentina, Brazil, Canada, India, Paraguay and United States was 1.23 million metric tons [12, 13]. Despite having a wide host range, *Macrophomina* is a monotypic genus, although only one species is recognized within the genus. Great variability in morphology has been observed among isolates from different hosts [8, 9]. Many researchers have also found great variability in pathogenicity and in morphological characteristic among isolates from the same host [2]. The great variability of the fungus reflects its heterokaryotic character. The studies on nuclei of *M. phaseolina* affirmed that during hyphal fusion heterokaryosis could occur after mitotic segregation and recombination. This may explain the occurrence of cultural types or physiological races reported. Efforts to divide *M. phaseolina* into sub-species were unsuccessful mainly due to the extreme intra-specific variations in morphology and pathogenicity [3]. A recent study suggested the use of chlorate phenotypes (colony morphologies on media supplemented with 120 mM potassium chlorate) as a marker for identifying host-specific isolates of *M. phaseolina* [1, 10].

The present paper focuses on the assessment of chlorate sensitivity, temperature responses, and pathogenicity of Iranian isolates of *M. phaseolina* causing charcoal rot in soybean, sunflower and sesame.

Materials and methods. Isolation of the fungus. The samples were collected from the stems and roots of soybean, sunflower and sesame plants infected with *M. phaseolina* infection from Mazandaran Province in Northern Iran during vegetation season of 2008. Each root or stem was thoroughly washed and dried at room temperature. Infected tissues were sterilized in 0.8% NaOCl for 1 min and washed in sterile water for 2 min. The tissues were placed on potato dextrose agar (PDA). The Petri dishes were incubated at 28±1° in the darkness for 4 days. Pure cultures were developed by single microsclerotium culture and maintained on PDA at 28±1°. Twenty seven isolates were obtained.

Chlorate sensitivity test. The chlorate phenotype of *M. phaseolina* isolates was assessed on chlorate containing minimal medium described by Pearson et al. [8]. A 5 mm culture disc from 5-day old culture growing on PDA was placed in the center of 9 cm Petri dish containing minimal medium supplemented with 120 mM of potassium chlorate. One set of cultures was grown on minimal medium without potassium chlorate as control. The cultures were incubated at 30±1° for 6 days in the dark. Each isolate was replicated twice. The growth of each isolate was recorded for phenotype of colony.

Pathogenicity study. The pathogenicity of 27 isolates from the different areas was tested on three plant species: soybean (*Glycine max* L.) sunflower (*Helianthus annuus* L.) and maize (*Zea mays* L.), at the seedling stage. Seeds of commercial varieties were sterilized with 2% sodium hypochlorite for 4 min and rinsed twice in sterile tap water.

Seeds were placed on 6-day old colonies of each *Macrophomina* isolates, and were grown on PDA in 9 cm plates at 30° in the dark. Each treatment includes six seeds that arranged in two plates, it was replicated three times in a completely randomized block design. Plates were incubated at 28±1° in the dark, and 2 ml of sterile water was added to each plate to promote seed germination. Pathogenicity was recorded 6 days after seed inoculation using the severity assessment. The disease index was calculated by multiplying the number of seeds by the degree of disease severity [6].

Temperature responses. Growth rate (GR) of 27 isolates was recorded at 30°, 35° and 40°. Culture disks with 5 mm diameter cut from the edge of a 4-day old PDA culture of each isolates, grown at 28°, were transferred to the center of 9 cm Petri dishes with 10 ml of PDA and incubated in the dark at the three different temperatures. Each treatment was replicated three times in a completely randomize design [4]. The minor and major radii of the colonies were measured after 48 hrs.

Results and Discussion. Mycelial growth of *M. phaseolina* on chlorate medium was classified into three categories. Table 1 shows the growth response of *M. phaseolina* isolated from soybean, sesame and sunflower in Petri dishes on a defined medium containing 120 mM potassium chlorate. The rating scale used was to compare with growth on medium lacking chlorate. Three various growth patterns (feathery spreading growth, restricted growth and dense growth) were observed when the isolates were grown on the minimal medium containing 120 mM potassium chlorate: feathery and restricted of soybean and sunflower isolates, feathery and dense growth of sesame isolates (Table 1).

Table 1. Chlorate phenotypes of *Macrophomina phaseolina* isolates, obtained from different hosts.

Isolates code	Source	Collection site	Reaction to chlorate	Phenotype
Se. 1	Sesame	Behshar	Resistant	Dense
Se. 2	Sesame	Galoga	Sensitive	Feathery
Se. 3	Sesame	Neka	Resistant	Dense
Se. 4	Sesame	Sari	Sensitive	Feathery
Se. 5	Sesame	Neka	Sensitive	Feathery
Se. 6	Sesame	Sari	Sensitive	Feathery
So. 1	Soybean	Behshar	Sensitive	Feathery
So. 2	Soybean	Behshar	Sensitive	Feathery
So. 3	Soybean	Behshar	Sensitive	Feathery
So. 4	Soybean	Galoga	Sensitive	Feathery
So. 5	Soybean	Galoga	Sensitive	Feathery
So. 6	Soybean	Galoga	Sensitive	Feathery
So. 7	Soybean	Galoga	Sensitive	Restricted
So. 8	Soybean	Ghamemshar	Sensitive	Feathery
So. 9	Soybean	Ghamemshar	Sensitive	Feathery
So. 10	Soybean	Ghamemshar	Sensitive	Feathery
So. 11	Soybean	Goybar	Sensitive	Feathery
So. 12	Soybean	Goybar	Sensitive	Feathery
So. 13	Soybean	Goybar	Sensitive	Feathery
So. 14	Soybean	Neka	Sensitive	Feathery
So. 15	Soybean	Neka	Sensitive	Feathery
So. 16	Soybean	Sari	Sensitive	Feathery
So. 17	Soybean	Sari	Sensitive	Feathery
So. 18	Soybean	Sari	Sensitive	Feathery
So. 19	Soybean	Sari	Sensitive	Feathery
So. 20	Soybean	Sari	Sensitive	Feathery
Su. 1	Sunflower	Neka	Sensitive	Feathery

The restricted and feathery isolates were sensitive to chlorate, whereas dense isolates were resistant to chlorate. The host had significant effects on chlorate phenotype of *M. phaseolina* isolates. Among soybean isolates, feathery isolates were much more abundant than either restricted or dense isolates

whereas dense isolates predominated in sesame roots. Sclerotia production on chlorate medium by the sensitive isolates was very low when compared to resistant ones. Generally, isolates from sesame grew more rapidly on the medium containing chlorate than isolates from soybean or sunflower. All isolates had dense growth when they were grown on the minimal medium without chlorate and could not be differentiated.

In our investigation all soybean and sunflower isolates were not pathogenic on maize. Sunflower and soybean isolates were pathogenic on the both of them. The pathogenicity of isolates on soybean and sunflower shows that *M. phaseolina* from soybean and sunflower may be a potential pathogen on other crops in Northern Iran, especially under water stressed conditions. The pathogenicity test showed that soybean and sunflower plants are susceptible while maize plant is resistant to *Macrophomina* (Table 2).

Table 2. Pathogenicity of 24 isolates *M. phaseolina* on three plant species

Species	Name of Cultivars	Average
<i>Glycine max</i>	Willyams	28.56 A
<i>Helianthus annuus</i>	Shafagh	22.48 B
<i>Zea mays</i>	307	0 C

Moreover, repeatedly cultivation of susceptible plants such as soybean, sunflower and sesame are increased the density of sclerotium in the soil. Cultivation of resistant species such as maize and other cereals in crop rotation in northern Iran, enable to reduce soil infection and incidence of diseases. A temperature of 35° was optimal for all Mazandaranian isolates and no isolates growth at 40°.

REFERENCES

1. Das I.K., Fakrudin B., Arora D.K. Microbiological research, 1, p. 1-10, 2006.
2. Dhingra O.D., Sinclair J.B. Phytopathology, 76, p. 2000-2004, 1973.
3. Echavez-Badel R., Perdomo A. J. Agric. Univ. P. R., 75, p.419-421, 1991.
4. Gomez K.A., Gomez A.A. Statistical procedures for agricultural research. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc, New York, 1984.
5. Manici L.M., Cerato C., Caputo F. Pathogenic and biological variability of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. isolates in different areas of sunflower cultivation in Italy. Proc. Sunflower, 13th Conf., (Pisa, Italy), 1, p. 779-784, 1992.
6. Manici L.M., Caputo F., Cerato C. Plant Disease, 79, p. 834-838, 1995.
7. Mihali J.D., Taylor S.J. Can. J. Bot., 73, p. 1596-1603, 1995.
8. Pearson C.A.S., Leslie J.F., Schwenk F.W. Phytopathology, 76, p. 646-649, 1986.
9. Pearson C.A.S., Leslie J.F., Schwenk F.W. Plant Disease, 71, p. 828-831, 1987.
10. Su G., Suh S.O., Schneider R.W., Russin J.S. Phytopathology, 91, p. 120-126, 2001.
11. Reyes-Franco M.C., Hernandez-Delgado S., Beas-Fernandez R., Medin-Fernandez M., Simpson J., Mayek-Perez N. Phytopathology, 154, p. 447-453, 2006.
12. Wrather J.A. Plant Diseases, 79, p. 1076-1079, 1995.
13. Wrather J.A., Anderson T.R., Arsyad D.M., Gai J., Ploper L.D., Porta-Puglia A., Ram H.H., Yorinori J.T. Plant Diseases, 81, p. 107-110, 1997.

Received 12.06.2009



Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

РАЗЛОЖЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО ЛИГНИНА АЛКАЛОФИЛЬНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS SP. A5*

Р.В. ПАРОНЯН

Институт зоологии НАН РА
ЗАО “НИИ Биотехнологии”, Ереван

Из почвенного образца, взятого из бассейна оз. Севан (с. Еранос), выделен алкалофильный, лигнинолитический бациллярный штамм, обозначенный как *Bacillus sp. A5*, способный расти на синтетической среде (pH 10,5) с полученным из пшеничной соломы щелочным лигнином (1,2 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Исследовано разложение щелочного лигнина штаммом *Bacillus sp. A5* при двух значениях содержания лигнина в питательной среде - 0,5 и 1,25 г/л. Показано, что при содержании лигнина 0,5 г/л в среде разлагается 50 % лигнина, а при 1,25 г/л - 30 %.

*Пшеничная солома - лигнин - разложение - алкалофильный штамм -
Bacillus sp. A5*

Սևանա լճի ավազանից (գյուղ Երանոս) վերցված հողի նմուշից անջատված է ալկալոֆիլ, լիգնինոլիտիկ բացիլյային շտամ, որը անվանվել է *Bacillus sp. A5*: Շտամը աճում է սինթետիկ միջավայրում (pH 10,5), որը որպես ածխածնի և էներգիայի միակ աղբյուր պարունակում է ցորենի ծղոտից անջատված հիմնային լիգնին (1,2 գ/լ): Հետազոտված է հիմնային լիգնինի (0,5 և 1,25 գ/լ) քայքայումը սննդային միջավայրում *Bacillus sp. A5* շտամի ներգործությամբ: Ցույց է տրված, որ սննդային միջավայրում հիմնային լիգնինի 0,5 և 1,25 գ/լ պարունակության դեպքում վերջինիս քայքայման խորությունը կազմում է համապատասխանաբար 50 և 30 %:

*Ցորենի ծղոտ - լիգնին - քայքայում - ալկալոֆիլ շտամ -
Bacillus sp. A5*

Alkaliphilic, ligninolytic bacillary strain designated as *Bacillus sp. A5*, was isolated from the soil sample taken from Lake Sevan basin (Yeranos village). It is able to grow in the synthetic medium (pH 10.5) with isolated from wheat straw alkaline lignin (1.2 g/l), as sole source of carbon and energy.

Degradation of the alkaline lignin by *Bacillus sp. A5* strain was investigated at two values of lignin content in the nutrient medium: 0.5 and 1.25 g/l. It was shown that 50% of lignin was degraded, at lignin content 0.5 g/l in the medium, and 30 % of it - at that of 1,25 g/l.

Wheat straw - lignin - degradation - alkaliphilic strain - Bacillus sp. A5

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекают проблемы, связанные с глобальным потеплением и ожидаемым истощением ископаемых источников энергоносителей. В связи с этим биотехнологические процессы, направленные на снижение выбросов CO₂, основанные на разложении возобновляемых лигноцеллюлозных субстратов с получением биотоплива, представляют большой интерес [2,14]. Известно, что необходимой стадией в биоконверсии растительной биомассы является её предобработка с целью удаления лигнина, который является серьезным препятствием для эффективного ферментативного гидролиза целлюлозы. Предобработка может осуществляться механическими, химическими и биологическими методами [14]. Механические и химические методы обеспечивают удовлетворительную степень делигнификации, однако дороги и представляют определенную опасность для окружающей среды. В настоящее время внимание исследователей привлекают биологические методы делигнификации с использованием различных микроорганизмов: грибов [17], актиномицетов [13] и бактерий [6,7,11,16]. Предобработка с использованием микроорганизмов отличается высокой эффективностью, низкой стоимостью и экологической безопасностью. Первоначально исследования по биоделигнификации были направлены на использование грибов. Однако грибы не устойчивы к экстремальным условиям, вызванным лимитированием кислорода, высокими значениями температуры и pH. Бактерии отличаются устойчивостью к экстремальным условиям [12,15,18], биохимической многосторонностью и технологичностью в производственных условиях.

Среди наиболее значимых лигноцеллюлозных субстратов выделяется пшеничная солома, ежегодное мировое производство которой составляет свыше 1,4 млрд. т. [10]. Пшеничная солома сортов “Армянка – 60”, “Лютеценс”, “Вагаршапат” и “Безостая”, производимых в Армении, по нашим данным, содержит в среднем целлюлозы – 41,5 %, гемицеллюлозы – 28,4% и лигнина – 17,6 %.

Поскольку в делигнификации соломы с успехом применяется щелочная предобработка [17], представляет интерес биодегградация лигнина соломы с использованием алкалофильных микроорганизмов, что может повысить степень деградации лигнина. Однако деградация лигнина алкалофильными микроорганизмами пока мало исследована [12,15,18].

Цель настоящей работы – выделение из почвенных образцов алкалофильной лигнинолитической бактерии и исследование биоразложения щелочного лигнина, выделенного из пшеничной соломы.

Материал и методика. Из почвенного образца, взятого из бассейна оз. Севан (с. Еранос), непосредственным высевом на агаризованные среды и методом накопительных культур был выделен алкалофильный штамм, способный расти на синтетической среде (pH 10,5) со щелочным лигнином (1,25 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Штамм обозначен как *Bacillus sp.* A5.

Культивирование *Bacillus sp.* A5 проводили в 250 мл колбах Эрленмейера с 50 мл среды перемешиванием на лабораторной качалке (200 об/мин), при температуре 28-30⁰ и pH 10-11. Состав питательной среды (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 0,75; K₂HPO₄ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 0,2; NaCl - 2,0; Na₂CO₃ - 2,0; пептон - 0,05; дрожжевой экстракт - 0,05; лигнин - 0,5 и 1,25. Посевной материал выращивали на среде состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 0,75; K₂HPO₄ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 0,2; NaCl - 2,0; Na₂CO₃ - 2,0; пептон - 0,1; дрожжевой экстракт - 0,1; глюкоза - 5,0. Посевной материал добавляли к питательной среде (ПС) в количестве 5 мл.

Концентрацию биомассы определяли весовым методом. Культуральную жидкость (КЖ) фильтровали под вакуумом через микрофильтрационную мембрану марки МФФК-4. Мембрану с биомассой высушивали до постоянного веса при 105°.

Лигнин для использования в качестве источника углерода получали щелочной обработкой измельченной пшеничной соломы [4].

Содержание лигнина в КЖ определяли при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра СФ-46. Для этого использовали фильтрат КЖ. Анализ проводили следующим образом. Сначала соляной кислотой из фильтрата осаждали лигнин для освобождения от феноловых соединений, образующихся при разложении лигнина [7] и мешающих анализу. Для этого 1мл фильтрата переносили в пробирку, добавляли 1мл 1N HCl. Далее пробирку с раствором выдерживали в течение 10 мин в кипящей воде, в результате чего лигнин выпадал в осадок. Осадок лигнина отделяли от раствора вакуум-фильтрованием через мембранный фильтр марки МФФК-4, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции фильтрата, затем растворяли в 10 мл горячего раствора 1N NaOH. После растворения осадка и фильтрации фильтр промывали 10 мл 0,1N раствора NaOH. Полученный раствор лигнина и промывные воды переносили в мерную колбу объемом 50 мл и дистиллированной водой доводили до метки. Для калибровки использовали стандартный раствор щелочного лигнина, обработанный аналогичным способом.

Результаты и обсуждение. Штамм *Bacillus sp. A5*, выращенный на агаризованных средах Horikoshi [5] и модифицированной среде Horikoshi с лигнином (1,25 г/л) в качестве единственного источника углерода, характеризуется обильным ростом с желтым блестящим цветом. Культура представляет собой грамположительные, спорообразующие подвижные палочки. *Bacillus sp. A5* растет в интервале значений pH 7–11 и температур 22–42° с оптимальным ростом при pH 10,5 и 30°. Каталазный тест у штамма A5 положительный.

Динамика накопления биомассы и разложения лигнина при его содержании в ПС 0,5 г/л приведена на рис.1.

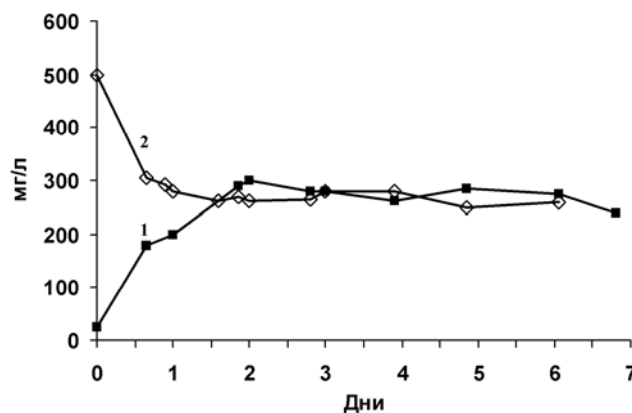


Рис. 1. Динамика разложения лигнина (2) и накопления биомассы (1):
Представлены средние значения результатов трех измерений.

Как видно из рисунка, после первого дня разложение лигнина значительно замедляется, а через 1,5 дня содержание лигнина в КЖ доходит до уровня, который до конца опыта практически не меняется. К концу второго дня культура переходит в стационарную фазу, а после шестого дня - в фазу отмирания. Соотношение биомасса/субстрат достигает значения 0,6. В этих условиях штамм *Bacillus sp. A5* разлагает 50% щелочного лигнина.

Штамм *Bacillus sp. (ITRC-S8)*, выделенный из отходов бумажной фабрики [7], разлагает 65,58 % крафт-лигнина (КЛ), при его содержании в ПС 500 мг/л⁻¹ вместе с 1 % глюкозы и 0,5 % пептона, в течение 144 ч при температуре 30⁰, pH 7,6 и перемешивании 120 об/мин. Однако в отсутствие глюкозы и пептона штамм не способен утилизировать КЛ. Можно полагать, что добавление глюкозы и пептона в ПС штамма *Bacillus sp. A5* повысит его эффективность, однако для сравнения со штаммом ITRC-S8 необходимо заменить в ПС штамма A5 щелочной лигнин на КЛ твердого отхода производства бумаги сульфатным методом [9].

В работах [12,18] сообщается о биодegradации лигнина пшеничной соломы алкалофильным, лигнинолитическим, неидентифицированным штаммом No 6. При температуре 37⁰ и pH 10,5 в течение 10 дней разлагается 49,84 % лигнина. Однако из приведенных данных неясно, какая часть лигнина разлагается микробиологически и какая химически, поскольку щелочная обработка пшеничной соломы один из методов выделения лигнина из соломы. Исходя из изложенного, проведение работ по биодegradации лигнина пшеничной соломы штаммом *Bacillus sp. A5* представляет интерес.

На рис.2 приведены динамика накопления биомассы при содержании лигнина в ПС 1,25 г/л, а также расчетная кривая разложения лигнина. Текущие концентрации лигнина рассчитаны с учетом литературных данных, согласно которым усредненное содержание углерода в биомассе микроорганизмов и в лигнине составляет 50 % и 62% соответственно [1,3]. В данном случае культура переходит в стационарную фазу к концу третьего дня. Соотношение биомасса/субстрат достигает значения 0,4. Это соответствует 30% разложенного лигнина, что на 20 % ниже, чем в случае содержания щелочного лигнина в ПС 0,5 г/л. Это может быть связано с неполноценностью ПС.

Очевидно, что на следующем этапе работы необходимо проводить оптимизацию ПС, выбор косубстратов и оптимальных условий ферментации.

Таким образом, из почвенного образца выделен алкалофильный, лигнинолитический бациллярный штамм, обозначенный нами *Bacillus sp. A5*. Штамм способен расти на синтетической среде (pH 10,5) со щелочным лигнином в качестве единственного источника углерода и энергии.

Исследовано разложение щелочного лигнина штаммом *Bacillus sp. A5* при двух значениях содержания лигнина в питательной среде: 0,5 и 1,25 г/л. Показано, что при содержании лигнина 0,5 г/л в среде разлагается 50 % лигнина, а при 1,25 г/л – 30 %. Соотношение биомасса /субстрат достигает значения 0,6 и 0,4 соответственно.

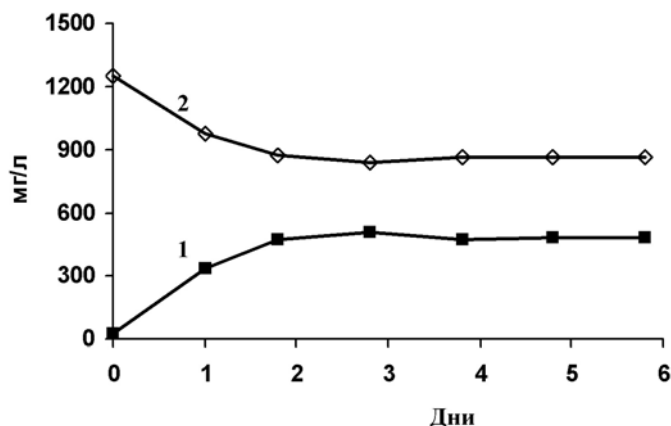


Рис. 2. Динамика накопления биомассы (1) и расчетная кривая разложения лигнина (2).

Автор выражает искреннюю благодарность кандидату биологических наук О. А. Паносянцу за ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние условий культивирования на активность продуцентов. Рига, «Зинатне», 37, 1980.
2. Дебабов В.Г. Биотехнология. 1, 3-14, 2008.
3. Никитин В.М., Оболенская А.В., Щеголев В.П. Химия древесины и целлюлозы. М., «Лесная промышленность», 443, 1978.
4. Роговин З.А. и Шорыгина Н.Н. Химия целлюлозы и ее спутников. М., «Лесная промышленность», 571, 1953.
5. Каталог культур микроорганизмов. Ереван, «Гитутюн», 204, 1996.
6. Abd-El salam H. E. and El-Hanafy A. A. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5, 1, 39 – 44, 2009.
7. Chandra R., Sing Sh., Reddy M.M. Kr., Patel D. K., Purohit H. J. and Kaplay A. J. Gen. Appl. Mikrobiol., 54, 399 – 407, 2008.
8. Donnison A.M., Brockelsby C.M., Morgan H.W, Daniel R.M. Biotechnology and Bioengineering. 33, 1495–1499, 1989.
9. <http://www.compuart.ru>
10. <http://www.csl.gov.uk/ienica/data/wheat.htm>
11. Kumar L., Rathore V., Srivastava H. Indian J. Exp Biol, 39, 6, 584–589, 2001.
12. Luo Y., Zhang I., Gong L., Guan X. Huan Jing Ke Xue, 22, 5, 95–98, 2001.
13. McCarthy A. J., FEMS Microbiology Letters, 46, 2, 145–163, 2006.
14. Szczodrak J. Biotechnology and Bioengineering. 32, 771–776, 1988.
15. Toky Noko. J. Biotechnology. 31, 93-98, 1993.
16. Yang J-s., Liu W., Ni J-r., Chinese J. Environ. Sci., 27, 5, 981-985, 2006.
17. Zayed G., Meyer O. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 551-555, 1999.
18. Zhang J., Gong L., Luo Y., Xu W., Ling J. Chinese J. Environ. Sci. 23, 1, 70-73, 2002.

Поступила 03.04.2009.



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and Theoretical articles •

Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

НОВЫЕ ВИДЫ В ГЕЛЬМИНТОФАУНЕ РЫБ АРМЕНИИ

Р.Л. ОГАНЕСЯН

Институт зоологии НАН РА

Из прудовых хозяйств Араратской равнины и озера Севан исследовано 1870 экз. карповых и лососевых рыб. Зарегистрировано 4 новых вида в гельминтофауне рыб Армении: *Eudiplozoon nipponicum* Goto, 1891 – на жабрах, метацеркарии трематод *Diplostomum rutili* Razmashkin, 1969 и *D. mergi* Dubois, 1932, паразитирующие в хрусталиках глаз рыб, и *Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919 – в кишечнике карпов. Для гельминтофауны Закавказья *E. nipponicum* отмечается впервые. Даются описание и оригинальные рисунки этих видов.

Гельминтофауна рыб – новые виды – карповые хозяйства – оз. Севан

Արարատյան հարթավայրի լճակային տնտեսություններից և Սևանա լճից հետազոտվել է ձկների 1870 նմուշ: Հայաստանի ձկների հելմինթոֆաունայում հայտնաբերվել է 4 նոր տեսակ. *Eudiplozoon nipponicum* Goto, 1891–խոիկների վրա, *Diplostomum rutili* Razmashkin, 1969 և *D. mergi* Dubois, 1932 տրեմատոդների մետացերկարիաներ, որոնք մակաբուծում են ձկների աչքերի ռապիդակում, առաջացնելով կուրություն, և *Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919 – ծածանների աղիներում: *E. Nipponicum*-ը նշվում է առաջին անգամ Անդրկովկասի հելմինթոֆաունայում: Տրված են այդ տեսակների նկարագրությունը և նկարները:

Ձկների հելմինթոֆաունա – նոր տեսակներ – լճակային տնտեսություններ – Սևանա լիճ

1870 fish specimens from pond farms of Ararat Valley and Lake Sevan have been investigated. 4 species of the helminthes are new for Armenian helminthofauna – *Monogenea Eudiplozoon nipponicum* Goto, 1891, parasite on gills, metacercariae of *Trematodes Diplostomum rutili* Razmashkin, 1969 and *D. mergi* Dubois, 1932, parasite on the crystalline lens and cause blindness, and *Cestoda - Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919 - in the intestine of carps. *E. nipponicum* is first registered in helminthofauna of Transcaucasus. Description and pictures of these species are given.

Fish helminthofauna – new species – carp farms – Lake Sevan

Рыбоводство является одной из важнейших отраслей животноводства, обеспечивающей население ценными диетическими белковыми продуктами питания. Одним из факторов, тормозящих развитие этой отрасли, являются инвазионные болезни рыб. Влияние гельминтов на популяции рыб обусловлено многими явлениями: гибелью рыб, нарушением их воспроизводства, задержкой роста и развития, снижением упитанности, ухудшением товарных и вкусовых качеств и т. д.[5].

Ниже приводится краткий обзор гельминтологических исследований рыб водоемов Армении.

Первые сведения о паразитофауне рыб оз. Севан связаны с 10-й Союзной гельминтологической экспедицией под руководством К.И. Скрябина в 1923 г. В 1933 г. Ю.А. Динником был обработан материал экспедиции, а также исследованы фиксированные экземпляры севанских сига. Им было установлено 9 видов гельминтов: Trematoda - *Allocreadium isoporum* Looss, 1984; Cestoda - *Caryophyllaeus armeniacus* Cholod., 1915, *Ligula intestinalis* Linne, 1758, *Ichthyotaenia neglectus* la Rue, 1911, *Ichthyotaenia* sp.; Nematoda - *Rhabdochona fortunatowi* sp.; Acanthocephala – *Neoechinorhynchus* sp., *Echinorhynchus sevani* sp., *Pomphorhynchus laevis* Muller, 1776. Данные по паразитофауне акклиматизированного в оз. Севан сига приводятся в работах И.А. Павловой в 1957г.: в оз. Севан у сига-ладоги обнаружено 4, а у чудского сига – 5 видов гельминтов. Метацеркарии трематод *Diplostomum spathaceum* Rud. (1819) и *D. clavatum* Nordmann (1832) были обнаружены у обоих подвидов на поверхности хрусталика и стекловидного тела глаза, а *Tetracotyle intermedia* Bughes (1928) - на поверхности сердца. Из скребней в кишечнике сига обнаружены *Pomphorhynchus laevis* Muller (1776) и *Metechinorhynchus baeri* Kostilew (1928). В 1963г. Т.А. Платоновой у форели и храмули в оз. Севан выявлено 10 видов гельминтов, т.е. еще 1 вид, помимо указанных Ю.А. Динником – нематода *Contracoecum squalii* Linstow, 1907.

Сотрудниками каф. зоологии ЕГУ проводилось изучение паразитофауны рыб естественных водоемов и прудовых хозяйств Араратской равнины. Метацеркарии трематод рода *Diplostomum* распространены во всех водоемах [2]. Цестоды *Bothriocephalus gowkongensis* и *Ligula intestinalis* зарегистрированы у рыб как в естественных водоемах, так и в прудовых хозяйствах. Общим паразитом для прудовых хозяйств и естественных водоемов является представитель класса моногеней *Dactylogyrus extensus* [3]. Были выявлены следующие виды моногеней: *Dactylogyrus cornu* (Linstow, 1878) - у армянской густеры, *D. sphyrna* (Linstow, 1878) - у густеры и плотвы, *D. yamansaensis* (Osmanov, 1958) - у карпа [4]. Изучалась паразитофауна рыб оз. Севан и некоторых естественных водоемов и водотоков Армении. Автором отмечается 21 вид гельминтов рыб, 5 из них впервые для фауны Армении [1]. Нами выявлен видовой состав гельминтов рыб карповых хозяйств Араратской равнины, впервые изучена сезонная динамика инвазированности рыб гельминтами, установлены основные гельминтозы рыб этих хозяйств, выявлены пути циркуляции гельминтов рыб в Араратском регионе, дана гельминтологическая оценка карповых хозяйств [6, 7].

Целью работы являлось выявление ихтиогельминтофауны прудовых хозяйств Араратской равнины и оз. Севан.

Материал и методика. Исследования проводили в 4-х прудовых карповых хозяйствах Араратского и Армавирского марзов и оз. Севан. Методом полных гельминтологических вскрытий по И.Е. Быховской-Павловской (1969г.) обследовано 1870 экз. 9-ти видов карповых и лососевых рыб. Из хозяйств обследовано 1297 экз. *Cyprinus carpio*, 132 экз. *Hypophthalmichthys molitrix*, 111 экз. *Ctenopharyngodon idella*, *Rutilus rutilus* - 12 экз.

Из оз. Севан обследовано 318 экз. рыб: лососевых – *Coregonus lavaretus sevanicus* -142 экз.; карповых – *Carassius carassius* - 85 экз., *Varicorhinus capoeta sevangi* - 73 экз., *Barbus lacerta goktschaicus* -18 экз. Гельминты были обнаружены в кишечнике, полости тела, на жабрах и в хрусталиках глаз рыб. После изъятия из органов рыб их промывали в воде и фиксировали в соответствующих растворах в зависимости от их систематического положения. Для определения видовой принадлежности их подвергали камеральной обработке по общепринятым методикам И.Е. Быховской-Павловской, 1969, 1985, А.А. Шигина, 1986, С.О. Мовсисяна, 1981, А.В. Гусева, 1983. Моногеней фиксировали в 4%-ом растворе формалина, затем заключали в глицерин-желатин. Извлечение личинок трематод, обнаруженных в хрусталиках глаз, производили механически. Их без фиксации в спирте окрашивали уксуснокислым кармином и просветляли в гвоздичном масле. Определение вида личинок диплостом проводили по табл. Шигина [8]. Для этого под микроскопом с окуляр-микрометром измеряли длину и ширину личинки, ротовой и брюшной присосок, органа Брандеса и др. Цестод и скребней фиксировали в 70°-ном спирте, окрашивали квасцовым кармином с последующей дифференцировкой в подкисленном спирте и проводкой через спиртовый ряд (для обезвоживания), затем просветляли в гвоздичном масле, акантоцефал - в молочной кислоте. Нематод без окраски фиксировали в жидкости Барбагалло, просветляли в молочной кислоте с глицерином. Определение гельминтов проводили по "Определителю паразитов пресноводных рыб фауны СССР" (1962, 1985, 1987гг.).

Результаты и обсуждение. Нами было обнаружено 12 видов гельминтов рыб: Monogenea - *Eudiplozoon nipponicum* Goto, 1891, *Dactylogyrus vastator* Nibelin, 1924, *Dactylogyrus extensus* Muller et Van Cleave, 1932; Trematoda - *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819), *Diplostomum rutili* Razmashkin, 1961, *Diplostomum paraspachaceum* Shigin, 1965 и *Diplostomum mergi* Dubois, 1932; Cestoda - *Bothriocephalus acheilognathi* Yeh, 1955, *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) и *Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919; Nematoda - *Rhabdochona fortunatowi*, *Acanthocephala* - *Metechinorhynchus baeri*. 4 вида гельминтов отмечаются впервые для фауны Армении: 1 вид моногеней, 2 вида трематод и 1 вид цестод. Ниже приведены данные о месте обнаружения, локализации, распространении гельминтов, их описание и оригинальные рисунки.

1. *Eudiplozoon nipponicum* Goto, 1891 (рис. 1).

Для фауны Закавказья отмечается впервые.

Хозяин и место обнаружения: карп, прудовые хозяйства Араратской равнины.

Локализация: жабры.

Распространение: бассейны рр. Амур, Днепр, Обь, Черного, Каспийского морей и рыбхозы Ленинградской обл., Беларуси, Молдовы, Украины, Казахстана и т.д.

Описание вида. Тело гельминта сращено двумя особями крест-на-крест и четко подразделяется на переднюю часть, лежащую спереди от места сращения, и заднюю, лежащую кзади от этого места. Длина тела равна 4,2 мм. Передняя часть тела - 2,4 мм длины, задняя - 1,6 мм. Задняя часть делится на 3 участка. Передний конец имеет крупно выраженные складки. Средний участок образует расширение, имеющее вентральные складки.

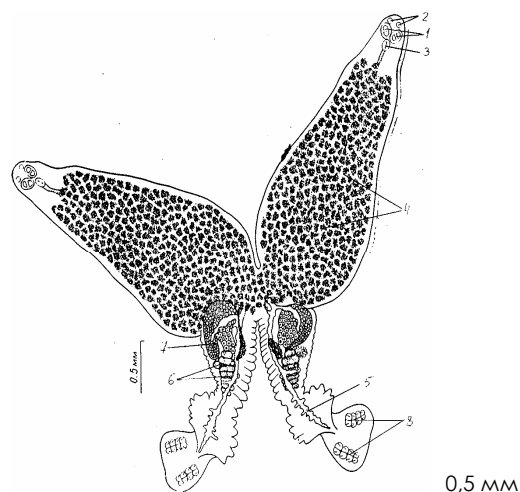


Рис. 1. *Eudiplozoon nipponicum* Goto, 1891

Обозначения: 1. присоски, 2. железистые образования, 3. глотка, 4. желточные клетки, 5. кишечник, 6. матка, 7. семенники, 8. прикрепительные клапаны.

Задний участок снабжен небольшими прикрепительными клапанами и крючьями. Присоски ротовой воронки округлые, крупные. Глотка заметно меньше присосок. Кишка трубковидная, находится в задней части тела, в области расширения она образует выросты. Гонады расположены в переднем участке задней части тела. Семенник извитой, лентовидный.

2. Метацицеркарии *Diplostomum rutili* Razmashkin, 1969 (рис. 2).

Хозяева: карп, толстолобик, белый амур, храмуля, карась, усач, сиг, форель.

Место обнаружения: прудовые хозяйства Араратской равнины, оз. Севан.

Локализация: глаза (хрусталики).

Распространение: басс. Азовского, Черного и Каспийского морей, водоемы Ленинградской обл., Прибалтики, Азербайджана, Грузии, Средней Азии и т.д.

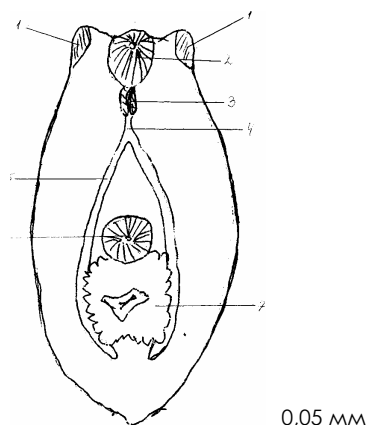


Рис. 2. *Diplostomum rutili* Razmashkin, 1969

Обозначения: 1. латеральные лопасти, 2. ротовая присоска, 3. фаринкс, 4. пищевод, 5. кишечные ветви, 6. брюшная присоска, 7. орган Брандеса.

Описание вида. Тело овальной формы, 0,38 мм длины и 0,21 мм ширины. Передний конец тела трехлопастной. Латеральные лопасти переднего конца образуют сильно выступающие уховидные выросты, достигающие уровня медианной лопасти. Размеры ротовой присоски - 0,050 мм х 0,040 мм. Префаринкс не выражен, фаринкс примыкает к ротовой присоске, его размеры - 0,032 х 0,021 мм. Пищевод и фаринкс почти одинаковой длины. Ветви кишечника, постепенно расходясь, огибают с боков орган Брандеса и слепо заканчиваются в заднем конце тела. Брюшная присоска находится в начале второй половины тела, ее размеры - 0,044 х 0,050 мм. Орган Брандеса плотно прилегает к брюшной присоске, его размеры - 0,092 х 0,102 мм. Его медианная щель имеет крестообразную форму.

3. *Метацеркарии* *Diplostomum mergi* Dubois, 1932 (рис. 3).

Хозяева: карп, толстолобик, белый амур, храмуля, карась, усач.

Место обнаружения: прудовые хозяйства Араратской равнины, оз. Севан.

Локализация: глаза (хрусталики).

Распространение: водоемы Ленинградской обл., Карелии, Прибалтики, Беларуси, Азербайджана, бассейны Азовского, Черного и Каспийского морей и т.д.

Описание вида. Тело удлинено-овальной формы, задняя часть немного шире передней. Длина тела составляет 0,410 мм, ширина - 0,160 мм. Передний конец тела трехлопастной. Медианную лопасть образует ротовая присоска, размеры которой равны 0,045 х 0,040 мм. Имеется короткий префаринкс. Размеры фаринкса - 0,030 х 0,020 мм. Пищевод чуть короче фаринкса. Кишечные ветви, расходясь постепенно, огибают с боков брюшную присоску и орган Брандеса, слепо заканчиваются в заднем конце тела. Брюшная присоска крупнее ротовой, размеры ее - 0,050 х 0,050 мм, расположена в середине тела. Орган Брандеса округлый, сзади прилегает к брюшной присоске. Размеры органа Брандеса - 0,08 х 0,08 мм, медианная щель его имеет боковые выросты.

Последние 2 вида патогенны, замедляют рост и развитие рыб, вызывают паразитическую катаракту и слепоту и могут стать причиной их гибели [8].

4. *Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919 (рис. 4).

Хозяин и место обнаружения: карп, прудовые хозяйства Араратской равнины.

Локализация: кишечник.

Распространение: водоемы Беларуси, Украины, Карелии, Ленинградской обл., Казахстана, бассейны рр. Волги, Куры, в Южном Каспии.

Описание вида. Тело ленточного червя нерасчлененное, белое, длина тела - 12,5 мм, ширина - 1,5 мм. Головной конец веерообразно расширен, с глубокими фестонами. Шейного сужения нет. Желточники начинаются на некотором расстоянии от головного расширения, несколько позади них начинаются семенники, и те, и другие тянутся до яичника. Семенников и желточников много. Длина сумки цирруса - 1,6-1,8 мм, а цирруса - 1,0 мм. Яичник двулопастной, Н-образный. Имеются постовариальная группа желточных фолликулов и маленький семяприемник. Матка расположена в задней четверти тела, имеет вид извитой трубки. Петли матки многочисленны, не заходят вперед сумки цирруса. Размеры яиц - 0,06-0,07 х 0,03-0,04 мм.

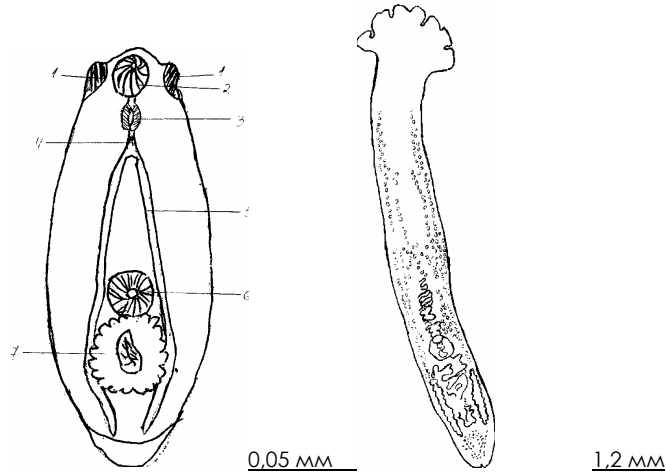


Рис. 3. *Diplostomum mergi* Dubois, 1932
Обозначения: см. рис. 2.

Рис. 4. *Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919

Обозначения: 1. головной конец, 2. желточники, 3. семенники, 4. яичник, 5. петли матки, 6. сумка цирруса

Таким образом, 4 вида гельминтов рыб отмечаются впервые для фауны Армении: 1 вид моногеней, 2 вида трематод и 1 вид цестод. На жабрах карпов прудовых хозяйств обнаружены моногеней *Eudiplozoon pirronicum* Goto, 1891. Этот вид регистрируется впервые в гельминтофауне Закавказья. В хрусталиках глаз всех видов рыб прудовых хозяйств и оз. Севан найдены метацеркарии трематод *Diplostomum rutili* Razmashkin, 1969 и *D. mergi* Dubois, 1932. Эти виды вызывают катаракту и слепоту рыб [8]. В кишечнике карпов прудовых хозяйств обнаружены цестоды *Caryophyllaeus fimbriceps* Annenkova-Chlopina, 1919.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартанян Л.К. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1993.
2. Григорян Дж.А., Вартанян Л.К. Ученые записки ЕГУ, 1, 107-111, 1980.
3. Григорян Дж.А., Погосян С.Б. Биолог. журн. Армении, 35, 10, 884-889, 1983.
4. Григорян Дж. А. Биолог. журн. Армении, 38, 6, 541-545, 1985.
5. Давыдов О.Н. Рыба и болезни человека. Киев, 80 с., 1999.
6. Оганесян Р.Л. Мат.-лы Межд. конф. "Проблемы соврем. Паразитологии" и III съезда Паразитол. Общ-ва РАН, С.-Петербург, 2, 38-41, 2003.
7. Оганесян Р.Л. Паразитология, С.-Петербург, 38, 1, 88-93, 2004.
8. Шигин А.А. Трематоды фауны СССР. Род *Diplostomum*. Метацеркарии. М., Наука, 256 с., 1986.

Поступила 20.03.2009.



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАЦИИ И СОСТАВА ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА L-АРГИНИНА ШТАММОМ – ПРОДУЦЕНТОМ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* НК-19А

А.О. КОЛОЯН, А.С. ОВСЕПЯН

ЗАО “НИИ Биотехнологии” МЭ РА

Изучено влияние условий ферментации и различных концентраций компонентов ферментационной среды на процесс биосинтеза L-аргинина у полученного нами ранее штамма-продуцента *Brevibacterium flavum* НК-19А. Показано, что выход аргинина существенно зависит от влияния исследованных факторов. В результате оптимизации состава ферментационной среды и условий культивирования штамма-продуцента *Br. flavum* НК-19А выход L-аргинина удалось повысить на 96 %.

Brevibacterium flavum – L-аргинин – штамм-продуцент – оптимизация – ферментация

Ուսումնասիրվել է նախկինում մեր կողմից ստացված *Brevibacterium flavum* НК-19А շտամի ֆերմենտացման պայմանների և ֆերմենտացման միջավայրի բաղադրիչների տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը L-արգինինի կենսասինթեզի վրա: Ցույց է տրվել, որ արգինինի ելունքը էապես կախված է հետազոտվող գործոնների ազդեցությունից: *Br. flavum* НК-19А շտամ-արտադրիչի աճեցման պայմանների և ֆերմենտացման միջավայրի օպտիմալացման արդյունքում հաջողվել է 96%-ով բարձրացնել L-արգինինի ելունքը:

Brevibacterium flavum – L-արգինին – շտամ-արտադրիչ – օպտիմալացում – ֆերմենտացում

The influence of fermentation conditions and different concentrations of the fermentation medium components on the process of L-arginine biosynthesis in the strain-producer *Brevibacterium flavum* НК-19А obtained by us earlier has been investigated. It was shown that the arginine yield essentially depends on the investigated factors. The optimization of the fermentation medium composition and cultivation conditions of the strain-producer *Br. flavum* НК-19А resulted in 96% increase of L-arginine yield.

Brevibacterium flavum – L-arginine – strain-producer – optimization – fermentation

В медицине, фармакологии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве (особенно в животноводстве) с каждым годом возрастает потребность в различных биологически активных соединениях, в том числе аминокислотах.

Аргинин входит в состав многих терапевтических препаратов и противовирусных средств. Применяется в кардиологии и иммунологии, поскольку является источником образования окиси азота (NO) – мощного сосудорасширяющего фактора и нейромедиатора, замедляет рост доброкачественных и злокачественных опухолей, способствует заживлению ран, регулирует выработку гормонов, полезен при заболеваниях почек, играет существенную роль в лечении или предотвращении цирроза печени и т.д. Аргинин широко применяется также в сельском хозяйстве. Его добавление к кормам, наряду с лизином и метионином, способствует быстрому росту животных, повышает яйценоскость кур. Соли аргинина используются для сохранения пищевых продуктов.

Крупномасштабное получение L-аргинина основано на микробиологическом способе его производства. Сконструирован несущий ключевые гены биосинтеза L-аргинина рекомбинантный штамм-продуцент *Escherichia coli*, который за 80-90 ч ферментации продуцирует до 40 г/л L-аргинина [1], и *Serratia marcescens*, синтезирующий до 96 г/л L-аргинина за 168 ч ферментации [8].

Лучшие штаммы-продуценты, полученные “традиционными” генетико-селекционными методами из бактерий *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum*, синтезируют до 36 г/л L-аргинина за 96 ч ферментации [7, 12]. Поэтому задача получения более активных штаммов-продуцентов у коринеформных бактерий, которые по своим технологическим параметрам предпочтительнее в производстве, продолжает оставаться актуальной.

Ранее мы сообщали о получении штамма-продуцента *Br. flavum* НК-19А, синтезирующего при колбочной ферментации 13 г/л L-аргинина [4].

В настоящей работе приведены результаты исследований по подбору оптимального состава ферментационной среды и условий колбочной ферментации штамма *Br. flavum* НК-19А, обеспечивающих значительное повышение выхода L-аргинина.

Материал и методика. В работе использован штамм *Br. flavum* НК-19А, аукоотрофный по изолейцину, чувствительный к D-серину и резистентный к аналогам - гидроксамату аргинина и тиазолаланину (ile^+ , D-ser^s , ArgHx^r , TA^r). Оптимизацию состава синтетической ферментационной среды проводили по факторам роста (изолейцин, тиамин, биотин) и по основным компонентам среды (аммоний серноокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный, магний серноокислый). С этой целью в ферментационной среде в определенных пределах варьировали концентрации указанных компонентов, а также изменяли условия проведения ферментации - pH среды, аэрацию и температуру. Результат оценивали по количеству синтезируемого аргинина в конце ферментации.

Для культивирования штаммов использовали жидкий и агаризованный мясо-пептонный бульон (МПБ, МПА) и минимальную среду Гловера следующего состава, %: NH_4Cl – 0,5; NH_4NO_3 – 0,1; Na_2SO_4 – 0,2; K_2HPO_4 – 0,3; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; агар-“Difco” – 1,6; глюкоза – 0,8; биотин – 100 мкг/л; тиамин – 100 мкг/л; L-изолейцин – 40 мкг/мл. Для выращивания посевного материала использовали МПБ.

В качестве исходной ферментационной среды для определения аргинин-продуцирующей способности штамма использовали среду следующего состава, %: сахароза – 15,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,5; KH_2PO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001;

$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; CaCO_3 – 5,0; тиамин – 300 мкг/л; биотин – 300 мкг/л; L-изолейцин – 200 мкг/мл.

Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 14 мл ферментационной среды и 1 мл посевного материала на качалке со скоростью вращения 220-240 об/мин, при температуре 30° в течение 72 ч.

Скорость растворения кислорода определяли по описанной методике [2].

Содержание аргинина в культуральной жидкости (КЖ) определяли бумажной хроматографией в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:1) или колориметрически по модифицированному методу Сакагучи [10].

Количественное определение сахара в КЖ проводили по методу Бертрана [3].

Полученные результаты обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Полученный нами ранее штамм-продуцент *Br. flavum* НК-19А синтезировал в исходной среде до 13 г/л аргинина [4]. Однако известно, что для выявления потенциальной синтезирующей способности продуцентов необходимо провести подбор оптимальных концентраций компонентов среды и условий ферментации [6].

С целью выбора уровня аэрации для колбочной ферментации на качалке исследовали зависимость выхода L-аргинина от объема заполнения колб исходной ферментационной средой. Результаты эксперимента приведены в табл. 1.

Как видно из табл.1, наибольшее количество синтезируемого аргинина наблюдается при объеме ферментационной среды 15 мл.

Количество синтезируемого продукта зависит также от pH ферментационной среды. В процессе интенсивного биосинтеза аргинина наблюдается значительное подкисление среды, что отрицательно влияет на выход аргинина. Для поддержания нужного оптимума pH в процессе ферментации в среду добавляется мел. В табл. 2 приведены данные, показывающие зависимость выхода аргинина от концентрации добавляемого мела.

Полученные результаты показывают, что оптимальной концентрацией мела для поддержания pH среды в течение всего процесса ферментации является 5 %. Параллельно варьировали pH среды в интервале 7,0–8,0 с шагом варьирования 0,2. Наибольший выход аргинина наблюдался при исходном pH ферментационной среды 7,6.

Таблица 1. Влияние уровня аэрации на выход L-аргинина у штамма *Br. flavum* НК-19А
n = 8

Количество ферментационной среды в колбах, мл	Выход L-аргинина, г/л	Скорость растворения кислорода, г O ₂ (л · ч)
10	9,5 ± 0,51	2,2
15	13,0 ± 0,7	1,9
20	11,7 ± 0,63	1,5
25	9,1 ± 0,49	1,2
30	6,8 ± 0,36	1,0

Таблица 2. Зависимость накопления L-аргинина от концентрации мела в ферментационной среде
n=10

Концентрация мела, %	Выход L-аргинина, г/л	pH ферм. среды до ферментации	pH ферм. среды после ферментации
1	5,25 ± 0,28	7,6	5,1
3	10,9 ± 0,58	7,6	6,0
5	13,0 ± 0,7	7,6	7,1
6	12,5 ± 0,67	7,6	7,1

Не менее важное значение для биосинтеза аргинина имеет температурный режим процесса ферментации. Эксперименты по определению оптимальных температурных условий показали, что выход продукта больше, когда ферментация проводится при 31°. Изменение температурного режима как в сторону повышения, так и понижения приводит к снижению активности синтеза аргинина, поэтому в дальнейшем ферментации проводились при 31°.

Поскольку штамм *Br. flavum HK19A* является ауксотрофом по изолейцину, одним из важнейших компонентов питательной среды для ферментации является L-изолейцин, который добавляется в среду для обеспечения роста продуцента. Результаты, свидетельствующие о зависимости синтеза аргинина от концентрации L-изолейцина в среде, приведены в табл.3 и на рис.1.

Как видно из табл. 3 и рис. 1 оптимальная концентрация L-изолейцина составляет 300 мкг/мл. Понижение или повышение этой концентрации приводит к спаду активности синтеза аргинина.

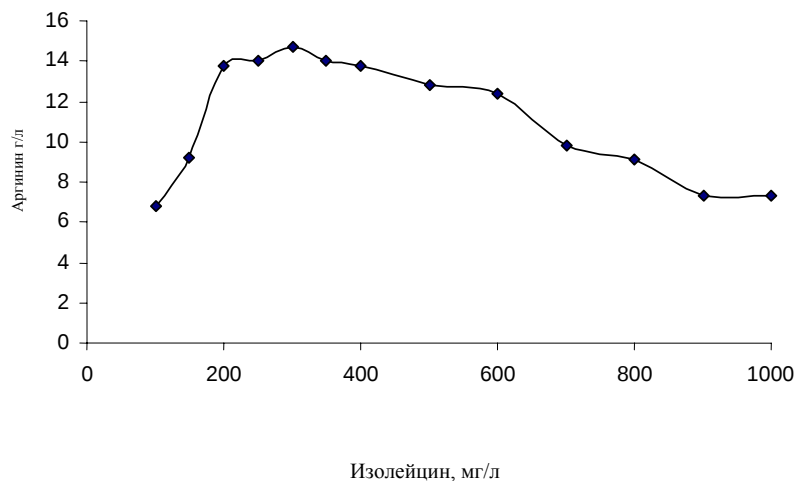


Рис. 1. Зависимость накопления L-аргинина от концентрации L-изолейцина в ферментационной среде.

Таблица 3. Зависимость накопления L-аргинина от концентрации L-изолейцина в ферментационной среде
n = 8

Концентрация L-изолейцина, мкг/мл	Выход L-аргинина, г/л	Остаточный сахар, %
100	6,8 ± 0,36	6,4
150	9,2 ± 0,49	4,1
200	13,8 ± 0,74	2,1
250	14,0 ± 0,75	1,6
300	14,7 ± 0,79	0,4
350	14,0 ± 0,75	0,2
400	13,8 ± 0,74	0
500	12,8 ± 0,68	0
600	12,4 ± 0,66	0
700	9,8 ± 0,52	0
800	9,1 ± 0,49	0
900	7,3 ± 0,39	0
1000	7,3 ± 0,39	0

Важным фактором для биосинтеза аргинина является также наличие в ферментационной среде оптимального количества биотина. Известно, что при низких концентрациях биотина повышается проницаемость клеточной стенки по отношению к внутриклеточной глутаминовой кислоте, что приводит к снижению уровня синтеза аргинина из-за уменьшения пула предшественника. Кроме того, биотин стимулирует активность фосфоэнолпируваткарбоксилазы – фермента, имеющего важное значение для биосинтеза глутаминовой кислоты, а следовательно, и для аргинина [9, 11]. Поэтому наличие в среде биотина в сравнительно высокой концентрации является необходимым. В специальных экспериментах были определены оптимальные концентрации биотина и тиамин, который также является ростовым фактором. Результаты представлены на рис. 2, на котором видно, что наиболее высокий уровень накопления аргинина наблюдается при содержании в ферментационной среде по 500 мкг/л витаминов.

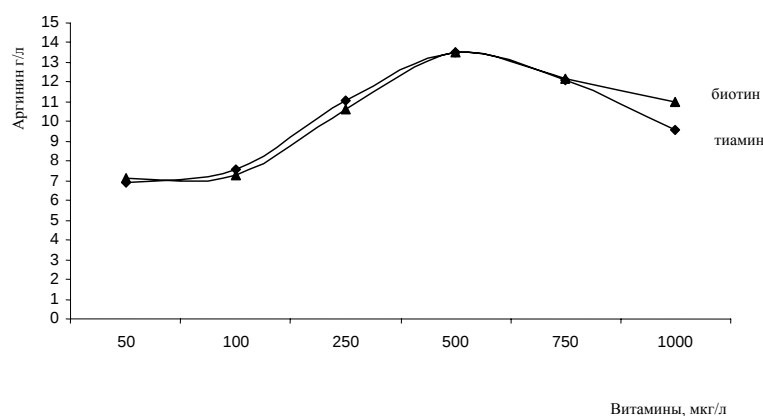


Рис. 2. Зависимость накопления L-аргинина от концентрации витаминов (тиамина и биотина) в ферментационной среде.

С учетом полученных результатов в дальнейшей работе по оптимизации ферментационной среды была использована синтетическая среда, содержащая, %: сахарозу – 15,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,5; KH_2PO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; CaCO_3 – 5,0; а также L-изолейцин – 300 мкг/мл; тиамин – 500 мкг/л; биотин – 500 мкг/л. Результаты экспериментов по подбору концентрации солей (аммоний сернокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный, магний сернокислый) приведены в табл. 4.

Как показывают полученные результаты, наибольший выход продукта обеспечивается при содержании в ферментационной среде, %: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,5, KH_2PO_4 – 0,3 и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1. Выход аргинина в ферментационной среде, содержащей вышеуказанные концентрации этих солей, составил 17,2 г/л.

Из литературы известно, что для синтеза многих аминокислот коринеформными бактериями немаловажную роль играют ионы металлов, в частности ионы цинка [13]. Учитывая этот факт, в ферментационную среду был добавлен ZnSO_4 в концентрации 0,01%, что привело к повышению биосинтеза аргинина.

Таблица 4. Зависимость синтеза L-аргинина от концентрации солей, %, n = 7

Аммоний сернокислый ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), %	L-аргинин, г/л	Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4), %	L-аргинин, г/л	Магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), %	L-аргинин, г/л
3,0	9,2 ± 0,49	0,1	12,2 ± 0,65	0,1	15,9 ± 0,85
4,0	12,0 ± 0,64	0,2	13,2 ± 0,71	0,2	15,5 ± 0,83
4,5	15,5 ± 0,83	0,3	16,0 ± 0,86	0,3	14,2 ± 0,76
5,0	15,5 ± 0,83	0,4	15,5 ± 0,83	0,4	13,8 ± 0,74
5,5	16,2 ± 0,87	0,5	15,1 ± 0,81	0,5	11,2 ± 0,60
6,0	13,8 ± 0,74	0,75	11,5 ± 0,61	0,75	10,0 ± 0,53
–	–	1,0	7,5 ± 0,40	1,0	8,9 ± 0,47

Как известно, наличие в ферментационной среде некоторых органических кислот (уксусная, молочная, лимонная) положительно влияет на выход конечного продукта [5]. Повышение накопления аргинина наблюдалось при добавлении в ферментационную среду натрия уксуснокислого, концентрацию которого варьировали в пределах от 0,1–0,5%. Наибольший эффект наблюдался при концентрации 0,4%. Одновременное добавление ZnSO_4 – 0,01% и натрия уксуснокислого – 0,4% в ферментационную среду привело к повышению активности синтеза аргинина штаммом-продуцентом *Br. flavum* НК-19А до 22 г/л.

Исследования, проведенные нами ранее на штамме-продуценте аргинина *E. coli* LGE28, показали, что добавление в ферментационную среду рыбной пасты и дрожжевого экстракта приводит к повышению аргинин-продуцирующей способности этого штамма [1]. Исходя из этого, в разработанную нами синтетическую ферментационную среду добавляли рыбную пасту и дрожжевой экстракт в различных концентрациях. Все испытываемые концентрации последних приводили к повышению выхода конечного продукта. Оптимальной ферментационной средой, обеспечившей наибольший синтез аргинина (25,5 г/л), оказалась среда с добавлением рыбной пасты – 1,2% (табл. 5).

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволили подобрать состав ферментационной среды, а также условия проведения ферментации, обеспечивающие повышение выхода аргинина у штамма-продуцента *Br. flavum* НК-19А на 96 % по сравнению с исходным синтезом.

Таблица 5. Зависимость выхода L-аргинина от концентрации дрожжевого экстракта и рыбной пасты, n = 8

Дрожжевой экстракт, %	Выход L-аргинина, г/л	Рыбная паста, %	Выход L-аргинина, г/л
0	17,2 ± 0,92	0	17,2 ± 0,92
0,2	18,4 ± 0,99	0,7	23,1 ± 1,24
0,4	20,2 ± 1,08	1,2	25,5 ± 1,37
0,6	19,8 ± 1,06	1,5	23,4 ± 1,26

Предлагаемая нами ферментационная среда для биосинтеза L-аргинина имеет следующий состав, %: сахароза – 15,0; (NH₄)₂SO₄ – 5,5; KH₂PO₄ – 0,3; рыбная паста – 1,2; MgSO₄ · 7H₂O – 0,1; FeSO₄×7H₂O – 0,001; MnSO₄×5H₂O – 0,001; CaCO₃ – 5,0; а также L-изолейцин – 300 мкг/мл; тиамин – 500 мкг/л; биотин – 500 мкг/л; pH среды – 7,6. Продолжительность ферментации – 72 ч, температура – 31°, скорость растворения кислорода 1,9 г O₂ (л · ч).

ЛИТЕРАТУРА

1. Պետրոսյան Պ.Կ., Սևոյան Գ.Գ., Հովսեփյան Ա.Ա., Սարգսյան Վ.Ա., Ջուրաբյան Ա.Ա., Բրուտյան Դ.Ա., Թովմասյան Գ.Գ. ՀՀ Արտոնագիր 29А, 1995.
2. Бабурин Л.А., Швинка Ю.Э., Виестур В.Э. Микробиологическая промышленность, 3, с.1, 1980.
3. Губен–Вейль. Методы органической химии, 2, М., Госхимиздат, с. 987, 1963.
4. Колоян А.О. Биолог. журн. Армении, 58, 1-2, с. 29-33, 2006.
5. Тхруни Ф.Н. Деп. в Арм НИИНТИ, N2, Ар-97, 1997.
6. Фадеева С.Е., Ясиновский В.Г. Биотехнология, 5, с.14-22, 2002.
7. Akashi K., Nakamura Y., Tsuchida T., Yoshii H., Ikeda S. Patent FR 2490674, 1982.
8. Chibata I., Kisumi M., Takagi T. Japan Patent 692 A, 1983.
9. Enei H., Shibai H., Hirose Y. Annu. Repts. Ferment. Processes., 5, p. 79-100, 1982.
10. Rosenberg H. Ennor A.H., Morrison J.F. Biochem J., 63, p.153-159, 1956.
11. Shio I., Otsuka s., Takanashi M. J. Biochem., 51, p. 56, 1962.
12. Tsuchida T., Ohtsuka N., Takeuchi H., Uctihori H. Japan Patent 2 186995 A., 1990.
13. Yoshinaga F., Yoshinara Y., Okumura S., Katsuya T. J. Gen. Appl. Microbiol., 13, p. 25, 1967.

Поступила 01.04.2009.



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

ГРИБЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГНИЛЬ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ КАКТУСОВ

Т.О. МАМИКОНЯН, Г.С. ГУКАСЯН

Институт ботаники НАН РА

Показано, что при использовании посадочного материала с зараженных материнских растений кактусов происходит передача инфекции новому потомству. Рекомендуется проводить систематические микологические исследования посадочного материала, а также профилактические мероприятия против грибной инфекции.

Корневая гниль – кактусы – потомство

Ցույց է տրվել, որ վարակված կակտուսների մայր բույսերից տնկանյութի կիրառման դեպքում վարակը փոխանցվում է նոր սերնդին: Խորհուրդ է տրվում կատարել տնկանյութի սխտեմատիկ միկոլոգիական ուսումնասիրություններ, ինչպես նաև նախապահպանական միջոցառումներ սնկային վարակի դեմ:

Մրմատային փտախտ - կակտուսներ – սերունդ

It was shown that by using the planting material from infected motherly plants of cactuses transfer of infection to new posterity takes place. It is recommended to carry out systematic micological investigation of planting material and also profilactical arrangement against fungal infection.

Infected motherly plants – cactuses – posterity

В Армении культивирование кактусов в условиях закрытого грунта имеет широкое распространение. При этом нередко создаются оптимальные условия, ослабляющие растения и активизирующие деятельность микроорганизмов. Высокая влажность воздуха, переувлажнение субстрата, перепады температуры, плохая проветриваемость теплиц, недостаток солнечного освещения – все это может привести к возникновению различных грибных заболеваний кактусов – корневой гнили, увяданию, пятнистости и др.

Большую опасность для кактусов представляет гриб *Phytophthora cactorum* (Leb. et Conh.) Schroet, вызывающий гниль корневой шейки [1, 4, 5].

В ходе создания коллекции кактусов в оранжерее Ереванского ботанического сада проводились специальные исследования по поражаемости их микромицетами [2]. Установлено, что корневую гниль и усыхание кактусов вызывали грибы из родов *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*. Одновременно из корневых шеек растений выделялись грибы из родов *Alternaria*, *Ulocladium*.

С целью обеспечения успешного вегетативного и семенного размножения кактусов в дальнейшем продолжались работы по выявлению и передаче гнили корневой шейки материнского растения деткам, плодам, семенам.

Материал и методика. Объектом исследований служили образцы пораженных гнилью кактусов *Echinofossulocactus pookerii* Backba (загнившая корневая шейка), *Tephrocactus articulatum* var. *ovatus* (Pfeiff.) Backba (детки с загнившего кактуса) и *Opuntia leucotricha* DC (загнившие членистые стебли, плоды, семена).

Для выделения микромицетов из больного растения *E. pookerii* с наружными признаками поражения промывали их водопроводной, затем стерильной водой, обсушивали фильтровальной бумагой, протирали спиртом и обжигали на спиртовке. Скальпелем вырезали одинаковые по размеру диски диаметром 5 мм. Готовили диски следующих образцов: I – из пограничной зоны пораженной части, II – на расстоянии 0,5 см от зоны поражения, III, IV, V – соответственно на расстоянии 1,5, 5,5 и 10 см. Опытные образцы помещали в чашки Петри на питательную среду Чапека и во влажную камеру на фильтровальную бумагу при температуре 26⁰. Эксперименты проводили в пятикратной повторности.

Микологический анализ *Tephrocactus articulatum* var. *ovatus* и его деток, а также стебли, плодов и семян *O. leucotricha* проводили методом накопления культуры [3].

В дальнейшем проводили регулярное микроскопирование развивающихся грибов.

Результаты и обсуждение. Исследованием заготовленных из загнившего кактуса дисков *E. pookerii* было идентифицировано 4 вида микромицетов (табл. 1).

Таблица 1. Грибы, выделенные из образцов *E. pookerii* на разных расстояниях от очага поражения

Образцы дисков	Выделенные виды грибов
Очаг поражения (I)	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Ulocadium consortiale</i> <i>U. oudemansii</i>
На расстоянии 0,5 см от очага поражения (II)	<i>F. oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> <i>A. alternata</i> <i>U. consortiale</i>
На расстоянии 1,5 см от очага поражения (III)	<i>F. oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> <i>A. alternata</i> <i>U. consortiale</i> стерильный мицелий
На расстоянии 5,5 см от очага поражения (IV)	<i>U. consortiale</i>
На расстоянии 10 см от очага поражения (V)	–

Данные табл. 1 показывают, что в непосредственной близости от очага поражения в образцах I, II, III обнаруживается смешанная инфекция *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. var. *orthoceras* (Appl. et Wr.) Bilai + *A. alternata* (Fr.) Keissler + *U. consortiale* (Thum.) Simmons + *U. oudemanssii* Simmons. При этом среди грибов наиболее часто встречался *F. oxysporum* var. *orthoceras*, который в данном случае был основным возбудителем гнили.

На пораженном грибом диске образовался розовато-бледный мицелий. В меньших количествах обнаруживались виды из родов *Alternaria* и *Ulocadium*. При удалении от очага поражения в тканях образца IV (на расстоянии 5,5) *F. oxysporum* var. *orthoceras* не обнаруживался, однако улокладнозная инфекция сохранялась по-прежнему.

При удаленности от очага поражения на расстоянии 10 см грибная инфекция на дисках не обнаруживалась.

В процессе эксперимента нами обрезалась и удалялась пораженная часть растения, а здоровая верхушка изолировалась, обрабатывалась порошком молотой серы и высаживалась для укоренения.

Со временем в первый и второй годы на растениях, полученных от укорененных верхушек, начинали проявляться симптомы заражения корневой гнилью.

Идентификация грибов позволила выделить *F. oxysporum* var. *orthoceras*, что указывает на его агрессивное участие в поражении корневой гнилью изучаемого кактуса.

Можно полагать, что в данном случае возбудитель болезни попадает через проводящие сосуды в «здоровую» часть растения, т.е. имеет место процесс диффузного заражения ткани. Вначале инфекция носит скрытый характер, и на первый взгляд растение кажется здоровым. Постепенно происходит накопление инфекции, болезнь четко проявляется, приводя растение к загниванию, а в некоторых случаях даже к гибели.

Исследования возбудителей корневой гнили *Tephrocactus articulatus* var. *ovatus*, а также его деток показали, что возбудителем болезни является смешанная инфекция грибов *A. alternata* + *U. atrum* Preuss + *U. consortiale* + *F. oxyporum* (Schlecht) Snyd. et Hans + *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. (табл. 2).

Таблица 2. Грибы, выявленные из разных органов кактуса *Tephrocactus articulatus* var. *ovatus*

Виды грибов	Материнское растение	Детки
<i>Alternaria alternata</i>	+	+
<i>Ulocadium atrum</i>	+	+
<i>Ulocadium consortiale</i>	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	-
<i>Phytophthora cactorum</i>	+	-

Из выявленных грибов чаще всего выделялся вид *A. alternata*, который в данном случае оказался первичным патогеном, вызывающим гниль корневой шейки кактуса.

Сопутствующими ему видами оказались *U. atrum* и *U. Consortiale*. Эти виды образовывали на пораженном органе бархатистый мицелий от серого до темно-оливкового цвета. В меньших количествах встречался *F. oxysporum*. Инфекция *P. cactorum* проявлялась в единичных случаях.

Наблюдения показали, что несмотря на то что многие дочерние детки не имели внешних симптомов поражения, они содержали смешанную грибную инфекцию, что подтверждалось во время идентификации из них грибов.

Это указывает на то, что инфекция передается от материнского растения его потомству. При этом, по-видимому, заражение происходит в процессе транспорта метаболитов из больных материнских растений в формирующиеся молодые детки, в результате чего в них происходят патологические изменения.

Таким образом, можно констатировать, что зараженное корневой гнилью материнское растение кактуса представляет собой источник инфекции для потомства при вегетативном размножении.

При выделении грибной инфекции из загнившей опунции, ее плодов и семян получены следующие результаты (табл. 3).

Таблица 3. Грибы, выявленные из разных органов кактуса *Opuntia leucotricha*

Виды грибов	Материнское растение	Плоды	Семена
<i>Phytophthora cactorum</i>	+	+	+
<i>Alternaria alternata</i>	+	+	-
<i>Ulocadium consortiale</i>	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	+	+
Стерильный мицелий	+	+	+

Материнское растение начинало загнивать с корневой шейки, на основании стебля образовывался беловато-сероватый конидиальный налет гриба *P. cactorum*, который явился первичным патогеном корневой гнили кактуса.

В меньшей степени паразитическое действие оказывали сопутствующие фитофторе грибы из родов *Alternaria*, *Ulocadium*, которые образовывали оливково-черный бархатистый налет на корневой шейке растения. Таким образом, смешанная инфекция корневой гнили *Opuntia leucotricha* проявлялась следующим образом: *P. Cactorum* + *A. alternata* + *U. consortiale* + стерильный мицелий.

Следует отметить, что *C. cladosporioides* был выделен лишь из загнивших плодов и семян кактуса и не был зафиксирован на корневой шейке материнского растения.

Часто наблюдалась верхушечная гниль, загнивала верхушка членистого стебля. Гниль распространялась в область прикрепления плода, вследствие чего происходило его загнивание. В дальнейшем мякоть плодов разлагалась и инфекция переходила на семена. Быстрому течению распространения гнили способствовали нарушения условий содержания кактусов – переувлажнение почвы.

В ходе эксперимента в некоторых случаях плоды удалялись от пораженного гнилью материнского растения еще до того, как начиналось их загнивание. Визуально вначале они не имели признаков поражения и оставлялись с целью дозревания семян. На первый взгляд они казались здоровыми. Микроскопический же анализ тканей плодов показал наличие в нем мицелия гриба. Со временем плод начинал чернеть, покрывался беловато-серым плотным хлопьевидным мицелием *P. cactorum* и в итоге загнивал.

Семена из таких плодов также несли в себе мицелий гриба, плохо всходили, всходы были шуплыми, недоразвитыми, в то время как семена с плодов здорового материнского растения легко всходили, давали нормальные, здоровые проростки.

Таким образом, при фитопатологическом исследовании трех видов кактусов, пораженных гнилью корневой шейки, была выявлена смешанная инфекция, которую представляли 8 видов грибов из 5 родов.

Можно констатировать, что основным возбудителям корневой гнили изученных кактусов *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *A. alternata*, *P. cactorum* сопутствуют грибы *U. atrum*, *U. consortiale*, *U. Oudemansii*, *F. oxysporum*, *C. cladosporioides*. В зависимости от видовой принадлежности кактусов при смешанной инфекции качественный состав основных и сопутствующих видов менялся. При этом весьма важное значение имели условия их содержания, которые влияли на активность того или иного гриба.

Исследования показали, что у *E. pookerii* на некотором расстоянии (до 10 см) от очага поражения со временем имеет место заражение здоровых тканей растения, что, возможно, происходит диффузным путем.

Наблюдаемый нами совместный рост *A. alternata* и *U. Consortiale* указывает на то, что, видимо, биохимическая среда, созданная этими грибами, стимулирует рост фузариозной или фитотфоровой инфекции. Вероятно, при совместном развитии грибов на одном и том же субстрате участки ткани кактуса, ослабленные в результате поражения одним из видов грибов (по нашим наблюдениям *A. Alternata* и грибы из рода *Ulocladium*), являются наиболее доступными для развития таких видов грибов как *F. oxysporum* или *P. cactorum*.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что при поражении гнилью материнского растения кактусов, независимо от их пораженного органа, инфекция переходит к потомству (деткам, плодам, семенам), что нужно учитывать в практике при разведении указанных видов кактусов.

Вместе с тем, необходимо систематически проводить микологический контроль визуально здоровых верхушек кактусов, а также профилактические мероприятия против грибной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глезеров О.Р. Цветоводство, 5, с. 38, 1989.
2. Гукасян Г.С. Некоторые данные о микромицетах кактусов в Ереванском ботаническом саду. Деп. АрмНИИНТИ. Ереван. (На арм. яз.), с. 17-20, 1997.
3. Методы экспериментальной микологии, Киев, Наукова думка, с. 239, 1973.
4. Мосеева Г. Защита растений, 3, с. 17, 1967.
5. Новотельнова Н.С., Пыстина К.А. Корневая и прикорневая гниль культурных растений, вызываемая низшими грибами. (Диагностика болезни в условиях Нечерноземья), Л., с. 78, 1978.

Поступила 10.04.2009.



Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ МУТАНТОВ У ИНСЕКТИЦИДНЫХ ШТАММОВ РАЗНЫХ СЕРОВАРОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

С.В. АВЕТИСЯН¹, А.С. ОВСЕПЯН¹, А.Х. ЧАХАЛЯН¹, С.К. КЕЛЕШЯН¹,
Л.А. ЧИЛ-АКОПЯН¹, М. А. САРКИСЯН², А.С. САГИЯН¹

¹ЗАО “НИИ Биотехнологии” МЭ РА

²Научный центр земледелия и защиты растений НАН РА

У штаммов *Bacillus thuringiensis* разных сероваров, отличающихся спектром инсектицидного действия, методом химического мутагенеза получена коллекция мутантов, синтезирующих водорастворимый меланин. Отобраны мутанты, характеризующиеся высоким уровнем синтеза меланина. Показано повышение инсектицидной активности у меланинсинтезирующих мутантов, что является следствием фотопротекторного свойства пигмента, защищающего споры и кристаллы инсектицидных штаммов от разрушающего действия УФ-облучения и инсоляции.

Bacillus thuringiensis — мутант – меланин – инсектицидная активность

Bacillus thuringiensis-ի միջատասպան ազդեցության տարբեր սպեկտրով սերովարներին պատկանող շտամներից քիմիական մուտագենեզի եղանակով ստացվել է ջրալուծ մելանին սինթեզող մուտանտների հավաքածու: Ընտրվել են բարձր ակտիվությամբ մելանին սինթեզող շտամներ: Ցույց է տրվել, մելանին սինթեզող մուտանտների միջատասպան ակտիվության ավելի բարձր է, ինչը կապված է պիգմենտի ֆոտոպաշտպանիչ, այսինքն ՌԻՄ-ճառագայթման և արևի ճառագայթների քայքայիչ ազդեցությունից միջատասպան շտամների սպորները և բյուրեղները պաշտպանելու հատկության հետ:

Bacillus thuringiensis – մուտանտ – մելանին – միջատասպան ակտիվություն

A collection of water-soluble melanin-synthesizing mutants of *B. thuringiensis* strains that belong to various serovars and have different insecticide action spectra have been obtained by chemical mutagenesis. Mutants that showed high level of melanin synthesis have been selected. The insecticide activity of melanin-synthesizing mutants was shown to be increased as a result of photoprotective property of the pigment protecting spores and crystals of insecticidal strains from destructive action of UV-radiation and insolation.

Bacillus thuringiensis – mutant – melanin – insecticide activity

Многочисленные исследования последних лет, направленные на изучение свойств и структуры меланинов, подтверждают их важное практическое значение в медицине, косметологии и сельском хозяйстве [4,14,17,19]. Однако объектами исследований преимущественно являются

синтетические водорастворимые меланины, поскольку выделение меланина из природных объектов сложно и связано с большими затратами.

К тому же, эти меланины не растворяются в воде, что затрудняет их широкое практическое применение. В связи с этим, разработка эффективного способа получения природного водорастворимого меланина продолжает оставаться актуальной задачей.

Ранее нами методом химического мутагенеза был получен мутант *B.thuringiensis K1(BTGK1)*, синтезирующий темно-коричневый водорастворимый пигмент, который легко выделяется из культуральной жидкости (КЖ) по разработанной в НИИ биотехнологии методике [1]. Результаты изучения физико-химических характеристик – инфракрасных и электронно-парамагнитных резонансных спектров и специфических качественных реакций свидетельствовали о меланиновой природе пигмента [2,12], а изучение биологической активности показало, что бактериальный меланин уже в малых дозах (0,03 – 0,06%) является биостимулятором многих овоще-бахчевых культур, значительно повышает их урожайность и может быть успешно использован в качестве биоудобрения [3,13,20].

Меланинсинтезирующий мутант BTGK1 был получен на основе штамма *B. thuringiensis subsp. galleriae 69-6 (BTG69-6)*, который является промышленным штаммом и используется для производства бактериальных инсектицидов. Совмещение в одном штамме двух полезных свойств – инсектицидного и меланинсинтезирующего позволило нам решить задачу стабилизации препарата на основе штамма BTG69-6, поскольку известно, что споры и кристаллы *B. thuringiensis* высокочувствительны к ультрафиолетовому облучению и солнечным лучам и в полевых условиях быстро теряют инсектицидную активность [15, 23], а меланины, продуцируемые микроорганизмами, являются природными фотопротекторами и защищают клеточные компоненты, в том числе споры и кристаллы, от УФ-повреждений и отрицательного действия солнечных лучей [16, 18, 21, 22]. В результате удлиняется время действия и следовательно биологическая эффективность препаратов на основе инсектицидных штаммов.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилось получение и изучение меланинсинтезирующих мутантов у штаммов *B. thuringiensis* других сероваров, отличающихся спектром энтомоцидного действия [6]. Способность таких штаммов к одновременному синтезу двух биологически активных веществ - меланина и инсектицидных токсинов в одном производственном процессе, несомненно, обеспечит высокий уровень эффективности их использования.

Материал и методика. В работе использована коллекция музейных культур НИИ Биотехнологии, включающая 73 штамма *B. thuringiensis* (22 серовара), которые были получены из Биологического института сибирского отделения АН СССР, Бердского химического завода и Всесоюзного института защиты растений, а также штаммы BTG69-6 и BTGK1 для сравнительного изучения меланинсинтезирующей и инсектицидной активности новых мутантов.

Для культивирования штаммов использовали мясопептонный бульон и мясопептонный агар.

КЖ с целью определения вирулентности исследуемых штаммов получали ферментацией в среде следующего состава, %: БВК – 3,0; мука пшеничная – 1,2; отруби пшеничные – 0,3; NaCl – 0,2; CaCl₂ – 0,05. Ферментацию проводили при температуре 30° в течение 48 ч на качалке со скоростью вращения 220 об/мин.

Посевным материалом служили культуры, выращенные на среде: мясная вода – 100 мл; пептон – 10 г; дрожжевой экстракт – 1 г; NaCl – 5 г; агар-агар – 20 г, вода водопроводная – до 1 л.

Для оценки споро-кристаллообразования полученные КЖ изучали микроскопированием в световом фазово-контрастном микроскопе (БИОЛАМ ЛОМО). Подсчет титра спор осуществляли в счетной камере Горяева.

Биологическую (инсектицидную, энтомоцидную) активность исследуемых штаммов по отношению к гусеницам златогузки (*Euproctis chrysorrhoea* L.) и непарного шелкопряда (*Ocneria dispar*) разных возрастов определяли по формуле Аббата [10], а также по значениям ЛК₅₀ на тутовом шелкопряде (*Bombyx mori*) (ТШ) и златогузке [7,11]. Гусеницы златогузки были собраны в селе Туджур области Арагацотн РА. Гусеницы тутового шелкопряда были выращены из грены, полученной из Грузинского сельскохозяйственного института (кафедра шелководства).

Лабораторные испытания для определения инсектицидности штаммов проводили вскармливанием гусениц ТШ тузовыми, а гусениц златогузки дубовыми листьями, обработанными культуральной жидкостью, полученной ферментацией исследуемых штаммов. При полевых испытаниях дубовые деревья высотой 2,5-3,0 м (деляночный опыт) обрабатывали рабочими суспензиями исходных и мутантных штаммов. Плотность златогузки находилась в пределах экономического порога вредоносности вредителя [9]. Обработку проводили ранцевым опрыскивателем марки АО-2. Расход рабочей суспензии на каждое дерево составлял 3-4 л. Для определения эффективности опрыскивания проводили учет вредителей через 3, 7, 10, 12 сут. Учитывали живые гусеницы на 12-ти погонных метрах в разных местах кроны.

Мутагенизацию культур проводили 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином (НГ) фирмы Serva по известной методике [8]. Обработку мутагеном в конечной концентрации 1000 мкг/мл проводили при 30° в течение 60 мин в фосфатном буфере (0,66 мМ Na₂HPO₄ + 6,43 мМ KН₂PO₄, pH 6,0).

Для определения меланинсинтезирующей активности проводили ферментацию в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 50-70 мл разработанной нами среды следующего состава, %: пшеничные отруби – 1,5; гидролизат рыбной муки – 4; NaCl – 0,2 и CaCl₂ – 0,05, на качалке со скоростью вращения 220 об/мин, при температуре 37° в течение 72 ч. В качестве посевного материала для ферментации использовали суспензии клеток культур, полученные методом смыва со скошенного мясопептонного агара после выращивания штаммов в течение 48 ч.

Уровень пигментообразования оценивали по интенсивности окрашивания ростовой среды спектральным методом (длина волны 315 нм). В качестве контроля использовали водный раствор (pH 9,0) синтетического меланина (Sigma).

Статистическую обработку полученных данных проводили по Берстейну [5].

Результаты и обсуждение. С целью отбора наиболее перспективных для получения новых высокоактивных меланиногенных и одновременно инсектицидных продуцентов были исследованы 73 штамма *B. thuringiensis* (22 серовара) с разным спектром инсектицидного действия. По признаку наибольшей эффективности спорокристаллообразования были отобраны 17 штаммов разных сероваров *B. thuringiensis* со следующей характеристикой: количество свободных спор – 80-90%; количество кристаллов разных размеров – более 100%; неспорулирующие вегетативные клетки и спорующие клетки с кристаллами–10-20 %. Развитие культур – типичное для *B. thuringiensis*.

Для определения инсектицидной активности отобранных штаммов в лабораторных условиях культуральную жидкость испытывали на гусеницах златогузки разных возрастов. Общая численность вредителей в каждом варианте составляла 30 особей, по 10 в каждой из трех повторностей. Учет количества живых и погибших гусениц проводили на 5-е и 8-е сутки после обработки. Биологическую эффективность определяли по проценту погибших особей. Результаты опытов представлены в табл.1.

Таблица 1. Биологическая эффективность исследованных штаммов *B. thuringiensis*

Серовар	Штамм	Гибель гусениц златогузки по возрастам, % (с поправкой на контроль)					
		I возраст		II возраст		III возраст	
		по дням					
		5	8	5	8	5	8
<i>thuringiensis</i>	98	77	100	90	90	83	83
<i>kurstaki</i>	Z-52	100	100	85	95	92	96
	HD-1	100	100	73	90	84	88
<i>sotto</i>	49-3	77	100	66	66	54	62
	1131	93	100	60	90	56	64
<i>galleriae</i>	69-6	90	93	78	80	64	68
	K ₁	94	94	90	92	77	88
<i>darmstadiensis</i>	805	89	100	30	50	25	46
	844-3	92	100	50	50	35	35
	1075	82	90	24	28	22	22
Не идентифицированы*	Э ₁	86	93	90	95	64	68
	17M	100	100	88	88	63	71
	44P	100	100	78	80	66	72
	Φ	85	90	16	80	36	84
	21a	100	100	80	88	84	95
	8δ	76	76	70	78	83	87
	34t	83	86	80	85	73	76

* - серовар не определен

На основании результатов, приведенных в табл.1, для дальнейших исследований были отобраны штаммы *B. thuringiensis* Z-52, HD-1(*kurstaki*) и 21a (не идентифицирован).

Энтомоцидная активность этих штаммов дополнительно была проверена методом Кербера [7] – определением летальной концентрации, вызывающей гибель 50% особей (ЛК₅₀). Испытывались КЖ штаммов без разведения и их четыре последовательные десятикратные разведения. Для сравнения в экспериментах использовали также продуцент меланина BTGK1 и его исходный штамм *B. thuringiensis* 69-6 (табл.2). Эксперименты проводили на гусеницах ТШ третьего возраста и златогузки III-IV возрастов в трех повторностях (30 особей для каждого разведения). Учет погибших гусениц проводили в соответствии с динамикой развития вида насекомого: тутового шелкопряда – через 1, 2 и 3 сут; златогузки – через 3, 6 и 8 сут. По полученным данным была рассчитана ЛК₅₀ (табл.2).

На основании сравнительного анализа приведенных в табл. 2 данных, подтверждающих высокую биологическую активность мутантов *B. thuringiensis* Z-52, HD-1 и 21a против гусениц ТШ и златогузки, эти штаммы были отобраны для получения на их основе пигментообразующих мутантов.

Таблица 2. Инсектицидная активность штаммов против гусениц тутового шелкопряда и златогузки

Штамм <i>B.thuringiensis</i>	Титр, млрд. спор/мл	Инсектицидная активность. ЛК ₅₀ спор/мл					
		Гусеницы тутового шелкопряда III возраста			Гусеницы златогузки III-IV возрастов		
		Учет по дням					
		1	2	3	3	6	8
69-6	4,0	6,8 · 10 ⁷	1,4 · 10 ⁷	4,3 · 10 ⁶	3,6 · 10 ⁷	1,8 · 10 ⁷	6,3 · 10 ⁶
K _I	5,6	1,3 · 10 ⁸	2,1 · 10 ⁷	3,9 · 10 ⁶	3,6 · 10 ⁷	1,3 · 10 ⁷	4,5 · 10 ⁶
Z-52	5,1	1,0 · 10 ⁸	2,0 · 10 ⁷	3,2 · 10 ⁶	1,4 · 10 ⁷	5,7 · 10 ⁶	2,6 · 10 ⁶
HD-1	5,5	8,7 · 10 ⁷	2,4 · 10 ⁷	3,2 · 10 ⁶	6,2 · 10 ⁷	1,7 · 10 ⁷	3,0 · 10 ⁶
21a	5,1	5,9 · 10 ⁷	8,7 · 10 ⁶	2,8 · 10 ⁶	2,3 · 10 ⁷	4,0 · 10 ⁶	2,6 · 10 ⁶

Всего было получено 253 НГ-индуцированных пигментообразующих мутанта.

Полученные мутанты были проверены на меланинсинтезирующую активность. Для этого была проведена количественная оценка содержания меланина в КЖ, полученной ферментацией испытуемых штаммов описанным выше способом. Результаты опытов приведены в табл. 3. По результатам проверки были отобраны мутанты штаммов *B. thuringiensis* Z-52 и 21a. Мутанты были обозначены: Z5, Z11, Z27, a8, a16.

Таблица 3. Меланинсинтезирующая активность пигментных мутантов *B. thuringiensis*

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	№ мутанта	Меланин, г/л
21a	a 8	$5,7 \pm 0,16$
	a 16	$5,8 \pm 0,14$
Z-52	5	$5,9 \pm 0,22$
	11	$6,0 \pm 0,16$
	27	$5,8 \pm 0,13$
K1	контроль	$6,0 \pm 0,16$

Для определения вирулентности отобранных меланинсинтезирующих мутантов были проведены испытания в полевых условиях. С этой целью из бактериальной биомассы каждого штамма разведением водопроводной водой была получена рабочая суспензия с ориентировочным титром $4,0-5,0 \cdot 10^8$ спор/мл. Испытания проводили на гусеницах златогузки II-III возрастов и на непарном шелкопряде I-III возрастов. Вирулентность оценивали по проценту гибели насекомых. Результаты опытов в полевых условиях приведены в табл. 4.

Как видно из результатов табл. 4, вирулентность меланиногенных мутантов *B. thuringiensis* по отношению к златогузке в сравнении с исходным штаммом не только не уменьшилась, но и заметно возросла. Повышение инсектицидной активности наблюдалось и в случае испытания бактериальных суспензий на гусеницах непарного шелкопряда I - III возрастов. В то же время микроскопический анализ количества спор и формы кристаллов у исходных штаммов и пигментообразующих мутантов не выявил существенных различий.

Таблица 4. Сравнительная вирулентность исходных штаммов *B. thuringiensis* и их меланиногенных мутантов по отношению к гусеницам златогузки

Штамм <i>B. thuringiensis</i>		Титр рабочей суспензии, спор/мл	Гибель вредителя по дням учета, % (с поправкой на контроль)			
			3	7	10	12
<i>galleriae</i> 69-6	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	30,2	48,4	67,3	68,2
	<i>KI</i> pig ⁺	$4,2 \cdot 10^8$	32,1	53,1	74,4	76,0
<i>kurstaki</i> Z-52	исходный	$4,8 \cdot 10^8$	34,7	55,4	70,6	73,1
	<i>Z11</i> pig ⁺	$5,0 \cdot 10^8$	36,4	58,2	78,5	81,0
Не идентифицирован <i>21a</i>	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	32,4	50,2	65,6	70,6
	<i>a8</i> pig ⁺	$4,6 \cdot 10^8$	34,3	51,7	67,7	72,1

Культуры всех мутантов содержали характерные для исходных штаммов коротковатые палочки в цепочках из двух-трех клеток, содержащих 90-95% оформленных спор и крупные кристаллы неопределенной формы.

Таким образом, хотя синтез меланина исследованными штаммами *B. thuringiensis* не влияет на характер и уровень споро- и кристаллообразования, вирулентность их заметно повышается. Эти результаты коррелируют с имеющимися в литературе данными: пигмент защищает споры и кристаллы от разрушительного воздействия солнечных лучей, тем самым удлиняя время проявления их инсектицидной активности [16, 18, 21, 22].

Очевидным преимуществом полученных нами высокоактивных меланинсинтезирующих инсектицидных штаммов является также то, что на их основе может быть организовано рентабельное безотходное производство. Биомасса, полученная в результате ферментации этих штаммов, может быть основой экологически чистого инсектицидного препарата для борьбы с разными вредителями сельского хозяйства, а культуральная жидкость – источником для выделения биологически активного бактериального меланина. Использование описанных и подобных штаммов может способствовать решению целого ряда важных для сельского хозяйства задач, таких как замена химических средств борьбы с вредителями сельского хозяйства экологически чистыми биопрепаратами с широким спектром действия, повышение биологической эффективности инсектицидных препаратов, разработка нового биостимулятора растений на основе меланина и т.д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Հովսեփյան Ա., Աղաջանյան Ա., Կարաբեկով Բ., Սաղիյան Ա., Չախալյան Ա., Քելեշյան Ա., Չիլ-Հակոբյան Լ., Հովհաննիսյան Գ., Միքայելյան Ն., Ավետիսյան Ս. ՀՀ Արտոնագիր N 1385 A2, 2003.
2. Агаджанян А.Е. Биотехнология, 2, с.63-67, 2005.
3. Азарян К.Г., Петросян М.П., Агаджанян Дж.А., Попов Ю.Г. Известия ГАУА, 5, с. 5-8, 2005.

4. *Барабой В.А.* Успехи современной биологии 121, с. 36-46, 2001.
5. *Бернштейн А.* Справочник статистических решений. М., Статистика, с.162, 1968.
6. *Бурцева Л.И., Штерншис М.В., Калмыкова Г.В.* Патология насекомых: структурные и функциональные аспекты. Под ред. В.В. Глупова: М., с.124, 2001.
7. *Лескова А.Я., Рыбина Л.М., Строева И.А.* Методические указания. Л., с. 21, 1984.
8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. Под ред. С.И. Алиханяна, "Мир", М., 1976.
9. *Рогачева А.Я.* Экономические пороги вредоносности главнейших вредных видов насекомых и клещей. М.: Агропромиздат, с. 22. 1986.
10. *Трубникова И.В.* Применение бактериальных препаратов против вредителей сельскохозяйственных культур (рекомендации). М., Агропромиздат, с.6, 1989.
11. *Чил-Акопян Л.А., Хлистовский Е.Д., Адамян М.О., Киносян М.А.* Биолог. журн. Армении, 49, 1-2, с. 57-61, 1996.
12. *Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S., Asaturian R.A., Vardanyan A.A. Saghiyan A.S.* Pigment Cell Research, 18, 2. p 130-135, 2005.
13. *Azaryan K.G., Petrosyan M.T., Popov Yu.G., Martirosyan G.S.* Bulletin of Armenian Agricultural Academy, 4, 7-10, 2004.
14. *Berliner D.L., Erwin R.L., McGee D.R.* US Patent 5, 817, 631, 1998.
15. *Blanco, M.G.M.; Wong, L.J.G.; Padilla, C.R.; Martinez, H.Q.* J. Am. Mosq. Control Assoc., 18, p. 352-358, 2002.
16. *Chen Y., Deng Y., Wang J., Cai J. and Ren G.* J.Gen.Appl.Microbiol., 50, p.183-188, 2004.
17. *Colin C, N'Guyen Q.L.* US Patent 5,925,363,1999.
18. *Gislayne T. Vilas-Bôas; Laurival A. Vilas-Bôas; Veridiana T. Braz; Halha O. Saridakis; Clelton A. Santos; Olívia M. N. Arantes, Braz. J. Microbiol. 36, 3, p. 271-274, 2005.*
19. *Kamei H., Koide T., Hashimoto Y., Kojima T., Umeda T, Hasegawa.* Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 12, 6, p.405-409, 1997.
20. *Popov Yu.G. Azaryan K.G., Petrosyan M.T., Aghadjanyan J.A., Shcherbakova K.N.* Revue de Citology et de biologie vegetable – Le Botaniste, 28 (s.i.), p. 252-259, 2005.
21. *Ruan L., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y., Shen P.* Systematic and Applied Microbiology, 27, 3, p. 286-289, 2004.
22. *Saxena D., Ben-Dov E., Manasherob R., Barak Z, Boussiba S.and Zaritsky A.* Current Microbiology, 44, p 25-30, 2002.
23. *Toma, L.; Severini, F.; Bella, A.; Romi, R.* J. Am. Mosq. Control Assoc., 19, p. 424-429, 2003.

Поступила 03.05.2009.



Биолог. журн. Армении, 3 (61), 2009

ВЛИЯНИЕ НЕТЕПЛОВЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ЛИГАНДОВ С ДНК

А.В.ГРИГОРЯН¹, А.П.АНТОНЯН², М.А.ШАГИНЯН²,
Г.А.МАНУКЯН¹, А.Т.КАРАПЕТЯН¹

¹Ереванский государственный университет архитектуры и строительства, кафедра физики, E.mail: akaretyan@ysuac.am

²Ереванский госуниверситет, биологический факультет, кафедра биофизики, E.mail: biophys_dep@mail.ru

Исследовано взаимодействие бромистого этидия (БЭ) и Hoechst 33258 (H33258) с ДНК при различных ионных силах раствора под влиянием нетепловых когерентных электромагнитных волн ММ диапазона (ММ ЭМВ). Обнаружено, что параметры плавления облученных образцов комплексов БЭ-ДНК и H33258-ДНК претерпевают значительные изменения по сравнению с необлученными.

ДНК – БЭ - Hoechst 33258 - ММ ЭМВ - температура плавления - ширина интервала плавления

Հետազոտվել է ԴՆԹ-ի հետ էթիդիումի բրոմիդ (ԷԲ) և Hoechst 33258 (H33258) լիգանդների փոխազդեցությունը լուծույթի տարբեր իոնական ուժերի պայմաններում միլիմետրային տիրույթի էլեկտրամագնիսական ալիքների ազդեցության ներքո: Հայտնաբերվել է, որ ԷԲ-ԴՆԹ և H33258-ԴՆԹ կոմպլեքսների ճառագայթված նմուշների հալման պարամետրերը չճառագայթված նմուշների համեմատ զգալիորեն փոփոխվել են:

ԴՆԹ - ԷԲ - Hoechst 33258 - ՄՄ էՄՄ - հալման ջերմաստիճան - հալման միջակայքի լայնություն

The study of ethidium bromide (EtBr) and Hoechst 33258 (H33258) binding to DNA at different ionic strengths of solution under the influence of non-thermal coherent electromagnetic waves of MM range (MM EMW) is carried out. It is revealed that the melting parameters of the irradiated samples of DNA-EtBr as well as DNA-H33258 undergo significant changes as compared to unirradiated samples.

DNA – EtBr - Hoechst 33258 – MM EMW – melting temperature – melting interval

В настоящее время интенсивно изучается воздействие нетепловых электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биологические объекты. Одним из наиболее важных выводов таких исследований является то, что в этой области частот резонансные спектры воды и тканей организма человека идентичны. Такое подобие резонансных крайне высоких частот (КВЧ) органов человека и воды указывает на единую физическую природу взаимодействия ММ ЭМВ с молекулярной водной структурой в этих объектах [5].

При этом показано, что при малых пороговых уровнях мощности падающих электромагнитных волн существуют узкие полосы частот резонансного взаимодействия, связанные с внутренними естественными волновыми процессами в данных средах. Это указывает на то, что величина резонансных пиков определяется двумя факторами – структурным порядком молекулярной водной среды и уровнем интенсивности осцилляций водных молекул, или уровнем их возбуждения, который зависит от температуры. Вне этих частот и уровней мощностей глубинные области водных и биологических сред недоступны для волн КВЧ.

Поскольку структурные и функциональные особенности биологических макромолекул связаны со средой, в которой они находятся, ММ ЭМВ в водных средах могут влиять и на молекулярные процессы с участием биологических макромолекул. В частности, степень гидратации ДНК имеет существенное значение при взаимодействии с лигандами, поскольку одним из факторов, стабилизирующих комплексы, является гидрофобный перенос молекул лиганда из свободного состояния в связанное [1, 6, 8]. Изменение структуры гидратной оболочки ДНК, вызванное ММ ЭМВ, может играть значительную роль в процессе комплексообразования классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ) и в случае внешне связывающегося соединения Hoechst 33258 (H33258) с ДНК.

Целью данной работы явилось исследование влияния ММ ЭМВ на термодинамические параметры комплексов ДНК с БЭ и H33258 при разных ионных силах.

Материал и методика. В работе были использованы следующие препараты: ДНК тимуса теленка фирмы “Sigma” (США), H33258 фирмы “Sigma” (США), бромистый этидий – БЭ, “Serva” (Германия), HCl, NaOH (ос.ч.), ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации использованных препаратов были определены абсорбционным методом с использованием следующих коэффициентов экстинкции: ДНК тимуса теленка - $\varepsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, БЭ - $\varepsilon_{480}=5850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Hoechst 33258 - $\varepsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Исследования проводили при ионных силах $\mu = 0,002; 0,01; 0,02; 0,05$ и $0,1 \text{ M Na}^+$.

Плавление ДНК и ее комплексов с лигандами осуществлялось на спектрофотометре PVE UNICAM-SP8-100 (Англия). Растворы препаратов помещали в 1 см кварцевые кюветы с герметически закрытыми тефлоновыми крышками и помещали в термостатируемые ячейки спектрофотометра. Нагрев осуществляли с помощью температурного контролера SPX 876 Series 2 (Англия) с постоянной скоростью 0,25 град./мин. Данные поглощения образцов выводили на программируемый микрокалькулятор Hewlett Packard 97S I/O (США). Измерения каждого образца проводили пятикратно, после чего данные усредняли. Экспериментальная ошибка не превышала 10-15 %. Кривые плавления комплексов получали, как описано в [10].

Облучение проводили в специальном стеклянном сосуде. Толщина облучаемого слоя раствора ≈ 1 мм. Для облучения применяли источник сверхчастотных сигналов Г4-142. Стабильность частоты сигнала генератора составляет $\pm 0,05 \%$, а отклонение частоты выходного сигнала в режиме непрерывной генерации не превышает 6 МГц. Облучение образцов проводили при комнатной температуре, плотность потока мощности в месте нахождения образца при частоте 64,5 ГГц составляла $\approx 50 \text{ мВт/см}^2$.

Для выявления влияния ММ ЭМВ на комплексообразование ДНК с лигандами водно-солевые растворы с разными ионными силами в течение 90 мин были облучены ММ ЭМВ с частотой 64,5 ГГц, после чего приготавливали комплексы. ДНК-лиганд комплексы в соответствующих растворах также были облучены ММ ЭМВ с той же частотой, после чего проводили плавление.

Во всех опытах одновременно с облученными образцами были получены кривые плавления необлученных образцов. Значения температуры (T_m), ширины интервала плавления (ΔT) ДНК и ее комплексов с лигандами, приготовленных в заранее облученных водно-солевых растворах, в пределах ошибки эксперимента совпадали с аналогичными параметрами образцов, полученных при облучении водно-солевых растворов комплексов ДНК с лигандами.

Результаты и обсуждение. Известно, что в образовании комплексов различных низкомолекулярных веществ с ДНК важную роль играют связанные с функциональными группами ДНК и лиганда молекулы воды [6,8]. Поэтому изменения состояния воды могут играть важную роль при взаимодействии ДНК с различными соединениями. Известно, что облучение воды и водно-солевых растворов ММ ЭМВ резонансными для нее частотами приводит к изменению ее структурированности [2,5], следовательно можно полагать, что эти волны могут влиять на термостабильность комплексов ДНК с лигандами. Для подтверждения этих предположений нами получены кривые плавления комплексов БЭ и Н33258 с ДНК при разных ионных силах раствора и при одном экспериментально выбранном наиболее оптимальном соотношении лиганд/ДНК=0,04.

Из кривых плавления необлученных и облученных ДНК и ее комплексов с лигандами определены температура T_m и ширина интервала плавления ΔT , с помощью которых получены значения δT_m и $\delta \Delta T$ при различных ионных силах μ ($\delta T_m = T_m - T_0$, где T_m – температура плавления комплексов ДНК-лиганд, T_0 – аналогичный параметр чистой ДНК; $\delta \Delta T = \Delta T - \Delta T_0$, где ΔT и ΔT_0 – ширина интервала плавления комплексов и чистой ДНК соответственно). На рис. 1 приведены зависимости δT_m (а) и $\delta \Delta T$ (б) комплексов ДНК с Н33258 от ионной силы раствора - μ . Как видно из приведенного рисунка, ход кривой зависимости δT_m от μ облученных комплексов (кр. 2) не отличается от хода кривой аналогичной зависимости, полученной для необлученных препаратов (кр. 1): они монотонно уменьшаются до $\mu \approx 4 \cdot 10^{-2}$ М Na^+ и дальнейшее увеличение концентрации соли не влияет на значения δT_m . Облучение водно-солевых растворов приводит к возрастанию T_m ДНК и ее комплексов с Н33258 по сравнению с величинами аналогичного параметра необлученных образцов (табл. 1), что является следствием стабилизации образцов под воздействием облучения.

Таблица 1. Значения T_m и ΔT облученных и необлученных ДНК и ее комплексов с Н33258 при различных ионных силах раствора.

μ_{Na^+}	ДНК				ДНК-EtBr			
	Необлученные		Облученные		Необлученные		Облученные	
	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT
0.002	51.5	13.2	58,5	15.7	57.5	23.3	62.5	26
0.01	63	13.5	66.8	14	68.5	12.5	70	15
0.02	69	14.5	70.9	14.8	70	14.8	71.6	16.2
0.05	76.8	14.9	78.2	13.7	78.1	12.6	78.6	12.8
0.1	82.5	13	82.9	13	84	10	85.5	10

Этот факт может быть обусловлен тем, что облучение водно-солевых растворов в отсутствие и присутствии ДНК-лиганд комплексов практически одинаково влияет на структуру воды. Возрастание T_m облученных образцов, по всей вероятности, обусловлено увеличением структурированности воды в локальном окружении ДНК и ее комплексов с Н33258.

Это приводит к увеличению размеров гидратной оболочки макромолекулы, что в свою очередь приводит к возрастанию стабилизирующего влияния НЗ3258 на двухцепочечную (дц) структуру ДНК. На это указывает и тот факт, что $\delta\Delta T$ становится отрицательным только при ионных силах 0,05 и 0,1 М Na^+ в случае облученных образцов, в то время как для необлученных образцов значения $\delta\Delta T$ отрицательны в интервале изменения $0,01 \leq \mu \leq 0,1$ М Na^+ . Ранее нами было показано, что $\delta\Delta T$ комплексов ДНК с НЗ3258 имеет отрицательные значения в интервале изменения $0,01 \leq \mu \leq 0,02$ М Na^+ [11]. В этих условиях НЗ3258 предпочтительнее связывается с АТ последовательностями в малом желобке ДНК, дополнительно стабилизируют АТ-богатые участки, вследствие чего ΔT комплексов уменьшается [11].

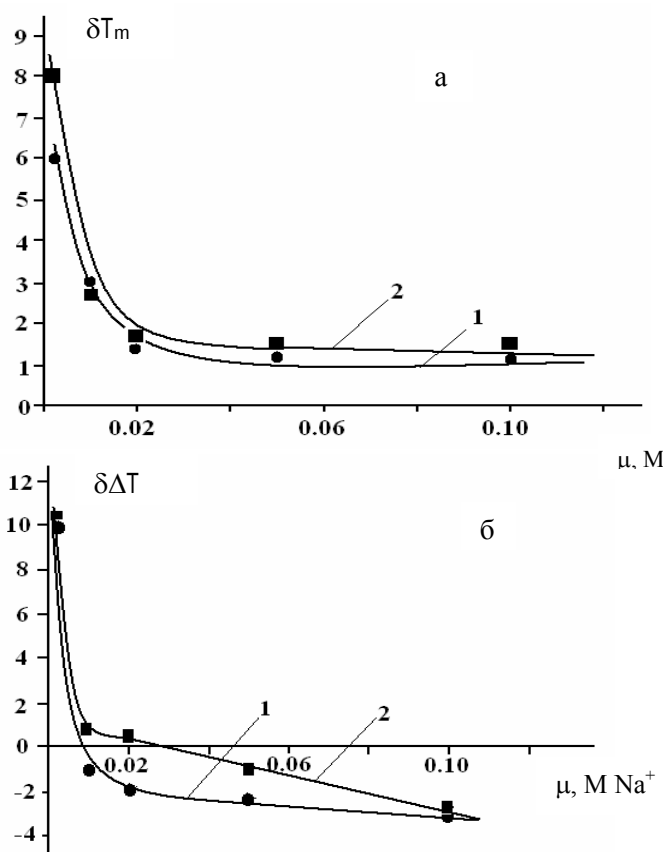


Рис.1. Зависимости δT_m (а) и $\delta \Delta T$ (б) комплексов ДНК с НЗ3258 от μ .
Кр. 1 соответствуют необлученным, кр. 2 – облученным образцам.
Концентрации ДНК- $5 \cdot 10^{-5}$ М. НЗ3258- $2 \cdot 10^{-6}$ г= (1/25) рН=6.9.

С другой стороны, было показано, что при $\mu \leq 0,002$ М Na^+ специфичность НЗ3258 к АТ последовательностям не проявляется и возможным способом связывания становится интеркаляция: в ходе плавления лиганд перераспределяется с расплавленных участков на двухспиральные, увеличивая ΔT [7].

Аналогичные исследования проведены и при взаимодействии БЭ с ДНК. На рис. 2 приведены зависимости δT_m (а) и $\delta \Delta T$ (б) комплексов ДНК с БЭ от μ , а соответствующие экспериментальные значения T_m и ΔT представлены в табл. 2.

Сравнение приведенных данных в табл. 1 и 2 показывает, что в случае комплексов ДНК с Н33258 при облучении δT_m возрастает, а в случае БЭ - δT_m уменьшается. Этот факт, вероятнее всего, обусловлен тем, что в случае Н33258 одним из стабилизирующих дц-структуру ДНК факторов являются водородные связи, образованные между нуклеотидными основаниями и молекулами лиганда [9]. При облучении степень гидратированности ДНК увеличивается и молекулы воды конкурируют с молекулами лиганда при образовании водородных связей с нуклеотидными парами, вследствие чего Н33258 предпочтительнее связывается интеркаляционным способом. В случае же связывания БЭ с ДНК увеличение степени гидратированности макромолекулы при облучении приводит к уменьшению энтропии комплексов, поскольку основным способом связывания лиганда с ДНК является интеркаляция. Вследствие этого переход из спирального в клубкообразное состояние облученных комплексов становится более предпочтительным с термодинамической точки зрения, из-за чего и δT_m уменьшается (рис. 1, а). Величина $\delta \Delta T$ при облучении комплексов ДНК с БЭ практически не меняется (кр. 2, рис. 2, б), в то время как в случае чистой ДНК этот параметр резко уменьшается в интервале изменения $0,002 \leq \mu \leq 0,04$ М Na^+ (кр. 1, рис. 2, б) и претерпевает небольшое изменение при дальнейшем увеличении ионной силы раствора ($\mu > 0,04$ М Na^+). Ранее было показано, что $\delta \Delta T$ необлученных комплексов ДНК с БЭ уменьшается при увеличении ионной силы раствора [9, 10].

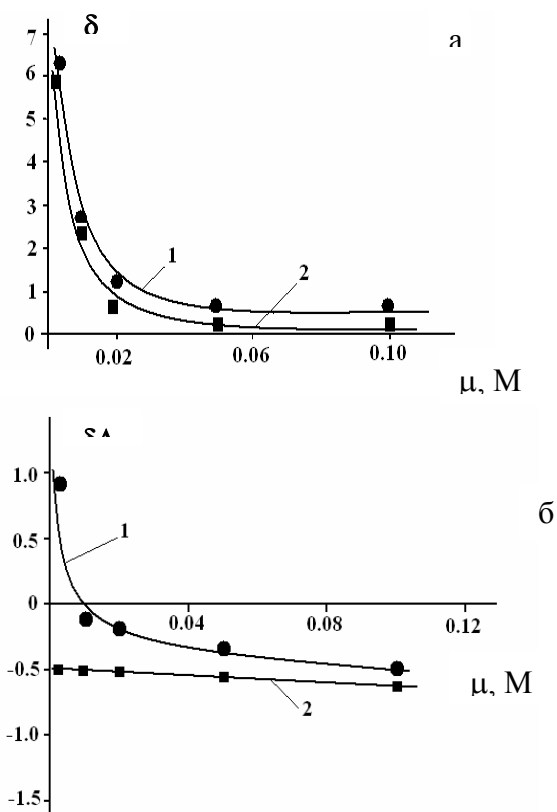


Рис. 2. Зависимости δT_m (а) и $\delta \Delta T$ (б) комплексов ДНК с БЭ от μ . Кр.1 соответствует необлученным, кр. 2 – облученным образцам.

Этот факт обусловлен тем, что при низких ионных силах спираль ДНК более раскручена и расстояние между плоскостями пар оснований больше, чем при высоких ионных силах [3,4].

Вследствие этого лиганд стабилизирует дц-структуру, вклиниваясь между парами оснований двухспиральной ДНК. При облучении в указанном интервале изменения ионной силы раствора степень гидратированности молекулы ДНК увеличивается, что и приводит к независимости интервала плавления комплексов от изменения ионной силы раствора.

Таблица 2. Значения T_m и ΔT облученных и необлученных ДНК и ее комплексов с БЭ при различных ионных силах раствора.

μ_{Na+}	ДНК				ДНК-EtBr			
	Необлученные		Облученные		Необлученные		Облученные	
	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT	T_m	ΔT
0.002	52.1	13.2	58,5	13.1	55.3	25.1	61.2	24.6
0.01	63.9	13.5	66.8	13.3	65.2	24.8	67.6	24.3
0.02	69.8	14.5	70.9	14.3	72.2	18.5	73.0	18.0
0.05	77.1	14.9	78.2	14.6	79.1	12.9	79.3	12.3
0.1	81.9	13	82.9	12.6	82.6	12.2	83.7	11.6

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что облучение водно-солевых растворов комплексов ДНК с лигандами приводит к существенным изменениям структуры воды, что в свою очередь приводит к значительным изменениям термодинамических характеристик ДНК-лиганд комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян Ю.С., Акопян С.Н., Казарян Р.С., Калантарян В.П., Симонян Г.С., Хачатрян А.Б., Антонян А.П., Варdevанян П.О. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника, 11, с. 64-68, 2006.
2. Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Киселев В.В. Биомедицина и радиоэлектроника, 4, с.13-29, 1998.
3. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. "Мир": М., 584, 1987.
4. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия, 3, М., "Мир", 1985.
5. Петросян В.И., Сеницин Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В. Биомедицинская радиоэлектроника, N5-6, с. 62-114, 2001.
6. Chaires J.B. Biopolymers, 44, 201-215, 1998.
7. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. J.Biomol. Struct. Dyn., 14, 2, 275-283, 1996.
8. Lane A.N., Jenkins T.C. Q. Rev. Biophys., 33, 3, 255-306, 2000.
9. Parkinson J.A., Barber J., Douglas K., Rosamond J., Sharples D. Biochemistry, 29, 0181-10190, 1990.
10. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. Exp. And Mol. Med., 33, 4. 205-208, 2001.
11. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetyan A.T. J.Biomol. Struct. Dyn., 25, 6, 641-646, 2008.

Поступила 29.06.2009.



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Biolog. Journal of Armenia, 3 (61), 2009

POSSIBLE ENVIRONMENTAL RISKS OF INTRODUCTION OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS IN ARMENIA AND ASSESSMENT OF THOSE RISKS

A.H. YESAYAN¹, N.A. HOVHANNISYAN¹, K.V. GRIGORYAN¹,
A.M. DANIELIAN²

¹Department of Ecology and Nature Protection, Faculty of Biology, Y S U, Armenia
²UNEP GEF Crop Wild Relatives Project in Armenia

The article focuses on description of general environmental risk of invasion of new habitants, possible non-target effects of Genetically modified plants and potential introgression of transgenes into crop wild relatives' populations and approaches for assessment of those risks suitable for Armenia.

Genetically modified organisms – risk assessment - crop wild relatives

Հոդվածում նկարագրված են գենետիկորեն վերափոխված բույսերի տարածման, ոչ նպատակային օրգանիզմների վրա նրանց ազդեցության և մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցների պոպուլյացիաների մեջ տրանսգենների ներմուծման հիմնական էկոլոգիական ռիսկերը և Հայաստանում դրանց գնահատման համար կիրառելի մոտեցումները:

*Գենետիկորեն վերափոխված օրգանիզմներ – ռիսկի գնահատում –
մշակաբույսերի վայրի ցեղակիցներ*

В статье представлены основные экологические риски распространения генетически модифицированных растений, их влияние на нецелевые организмы, интрогрессии трансгенов в популяции диких сородичей культурных растений и применимые в условиях Армении подходы для их оценки.

*Генетически модифицированные организмы – оценка риска –дикие
сородичи культурных растений*

The national and worldwide importance of biosafety in Armenia is conditioned by a number of factors, particularly, due to the diversity of altitudes, climatic zones and landscapes found in Armenia, the country hosts a surprisingly high diversity of plants and animals, including many endemic, relict and rare species. Armenia is considered one of the most important centers for agrobiodiversity in the world, and represents a relatively large area supporting wild relatives of crops and agricultural varieties. For example, the “Erebuni Reserve”, located not far from Yerevan City, is the only reserve of wild cereals in the world and is a unique habitat of wild wheat such as *Triticum araratikum*, *T.boeoticum*, *T.urartu*, *Secale vavilovii*, *Hordeum spontaneum* and others.

Agricultural species are of particular importance. Armenia is especially rich in apricot, grape, peaches, apples, plums, pears, pomegranates, quinces, figs, walnuts and other fruits. Agroecological conditions also permit the cultivation of many varieties of vegetables, including tomato, pepper, eggplant, cabbage, potato, cucumber, carrot, pumpkin, bean, garden radish, parsley, basil, coriander, mint, fennel, estragon, cress, cauliflower, lettuce, water melon, melon and peas. Winter wheat and spring barley are the dominant cereals. Maize is mainly grown for feed, in mountainous area cultivation of rye and oats is limited. Alfalfa, sainfoin, clover, amaranth, feed beet and vetch are grown as feed crops, while of industrial crops, only a small amount of tobacco is cultivated.

Agriculture is an important factor in many nations' economies because of the jobs and incomes it provides and because it is often an important source of hard currency. In Armenia the system of agricultural food products, which, being one of the most important sectors of the economy, has a crucial role in the improvement of the Armenia's overall social and economic situation and ensuring its food products' safety, also became part of these processes. During the recent years, the agricultural food products system has provided about 35% of the country's gross domestic product, including approximately 25% accounting for agriculture (Haykazyan and Pretty, 2006).

The safe use of biotechnology should be ensured, especially in developing countries where the genetically modified organisms (GMOs) and their products are used sometimes without choice. Now in Armenia we face similar problems. The biosafety-related activities in Armenia started in 1993 when the National Assembly ratified the Convention on Biological Diversity.

Review of the current situation shows that for effective implementation of biosafety in Armenia there is need to put in place national biosafety regulations and guidelines in accordance with Cartagena protocol. Those regulations and guidelines should emphasize and regulate the safe transfer of GMOs and their products from the country of origin to Armenia, safe handling and use of GMOs and products of the import; safe movement of GMOs through transit. The scientific risk analysis plays an important role for effective implementation of described activities.

Current status of GMOs production in the world. GMOs are the organisms that have been altered by using modern biotechnology in a way to either increase or decrease a certain characteristics. It can add a desired or undesired effect to an organism. The first GM plants were commercialized 13 years ago in 1996 in the USA. As a result of the consistent and substantial economic, environmental and welfare benefits offered by biotech crops, millions of small and resource-poor farmers around the world continued to plant more hectares of biotech crops in 2008, the thirteenth year of commercialization (James, 2008). Apparently in 2008, the total global area of biotech crops continued to grow strongly reaching 125 million hectares, up from 114.3 million hectares in 2007.

The biotech soybean continued to be the principal biotech crop in 2008, occupying 65.8 million hectares or 53% of global biotech area, followed by biotech maize (37.3 million hectares or 30%), biotech cotton (15.5 million hectares or 12%) and biotech canola (5.9 million hectares or 5% of the global biotech crop area).

Nowadays great diversity of traits and genetically engineered organisms (plants, animals and micro-organisms) are under development. Most promising in terms of expected profits are pharmaceutical traits (enzymes, vaccines, etc.), industrial products especially Agro-fuels but also other products (e.g. starch from amylopectin producing potatoes, etc.).

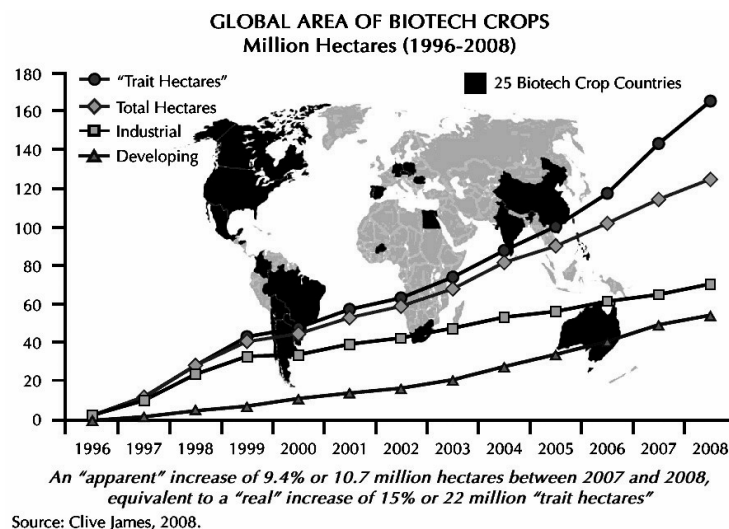


Fig.1. The global trend from the first year of production in 1996 up to 2008.

These are very important developments given that biotech crops can contribute to some of the major challenges facing global society, including: food security, high price of food, sustainability, alleviation of poverty and hunger, and help mitigate some of the challenges associated with climate change. However, deliberate or inadvertent releases of GMOs into the environment could have negative ecological effects under certain circumstances.

Potential environmental effects of introduction of GM plants in Armenia. In spite of the fact that Armenia is characterised by sufficient scientific and industrial capacity in the field of biotechnology, the biotechnological research that is carried out in the country in the field of agriculture mainly relates to the selection of cultivated plants and their accelerated reproduction, but not in the field of development of genetically modified plants. So, from this point of view Armenia can be classified as only GM crops importing country. For Armenia the main risks can be characterised as environmental and socio-economic in general. Taking into account that the small territory of Armenia is characterised with rich wild and crop plant biodiversity including endemics, relict plants, crop wild relatives (*Triticum*, *Aegilops*, *Hordeum*, *Secale* etc.) of economic importance, the assessment of the risk of potential environmental effects of GMOs is of particular significance.

The potential environmental risks of GM crops for Armenia are presented in Fig. 2. All these risks are interlinked directly or indirectly.

Risk assessment has a long tradition in regulating human activities with the aim to minimize or avoid risk to human health and the environment. Examples can be found in the production of medical products, chemistry or nuclear power.

Risk assessment methodology for GMOs has evolved over the last several years. At a conceptual level, the methodology has been adapted from the existing paradigm for environmental risk assessment, which was developed for chemicals and other types of environmental stressors. According to the European regulations, the safety of GMOs has to be assessed prior to releases into the environment and placing on the market. The approach is described in more detail in Directive #2001/18/EC on the deliberate release of GMOs into the environment, which was adopted in April 2001 and repealed Directive #90/220/EEC in October 2002.

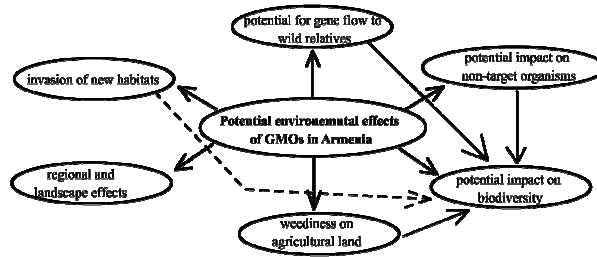


Fig. 2. Potential environmental risks of deliberate release of GMOs in Armenia

Common understanding regarding the conceptual basis for risk assessment is a challenge. There is considerable variation among risk assessment frameworks for GMOs regarding the steps or components of risk assessment. In general, the entire process of risk assessment, combined with risk management and risk communication is referred to risk analysis (Fig. 3).

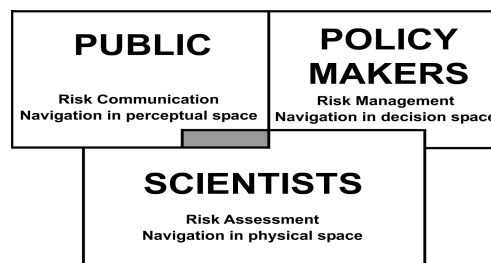


Fig. 3. Risk analysis consists of three interconnected components- risk assessment, risk management and risk communication

Environmental risk assessment is defined by Directive #2001/18/EC as the evaluation of risks to human health and the environment, whether direct or indirect, immediate or delayed, which may pose experimental deliberate release or deliberate release by placing GMOs on the market.

The risk assessment is the science and process of estimating risk. It's implemented by scientists. The objective of environmental risk assessment, according to the European legislation, is to identify and evaluate potential adverse effects of a GMOs and to elucidate if there is a need for risk management and suitable measures to be taken. Risk management is the process of considering alternative courses of action, and selecting the most appropriate option after integrating the results of risk assessment with engineering, social, economic, and political concerns in order to make a decision. Risk communication is the interactive exchange of information and opinions throughout the risk analysis among risk assessors, risk managers, consumers, feed and food businesses, academic community and other interested parties.

Risk assessment traditionally consisting of four steps: hazard identification, exposure assessment, effects characterization, and risk characterization (Fig. 4).

Hazard identification is very important process scoping and framing the following risk assessment process. It focuses on identification of stressor and development of an analysis strategy, including risk hypotheses.

Exposure is an important topic and an important term used a lot in risk assessment. It means contact or co-occurrence between the transgenic, transgene product and GMO as a stressor, typically it is considered as a primary stressor and an ecological entity, receptor of that. The risk can be quantified by combining hazard (H) and exposure (E) (Poppy, 2004).

The effects characterization is the characterization of the potential consequences of exposure, if it occurs. The fourth step is the most important step when risk assessor combine knowledge and if it is possible to combine exposure that is given and adverse effects that can happen, than it is possible to talk about the risk, and only than risk assessor can start thinking about risk characterization. The risk can be presented as a characteristic of a situation or action wherein two or more outcomes are possible, the particular outcome that will occur is unknown and at least one of the possibilities is undesired (Covello and Merkhofer, 1993).

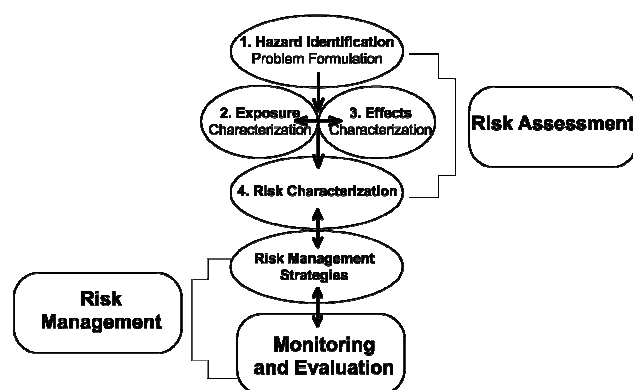


Fig. 4. Key steps of risk assessment of potential environmental effects of GMOs and interconnection between risk assessment and risk management

The principal approach to assess the safety of GMOs is largely accepted. First of all risk assessment should be science-based and carried out to ensure a very high scientific standard. For every GMO the risk assessment is done on a case by case basis and in a stepwise manner. This means that for example each GM plant is tested first in the laboratory then on a small scale in a field trial, followed by a large-scale field trial before authorization for placing on the market can be requested. The following step can only be carried out if the preceding step has shown that the GMO does not pose any risk to the environment.

Approaches for environmental risk assessment suitable for Armenia.

Armenia is in the process of initiation of the biosafety-related activities and has not high labour facilities, therefore the risk assessment should be developed appropriately, sound to medium costs requirements.

For assessment of the possible risks of invasion of new habitants and risks of weediness on agricultural lands the ability of GM plant to reproduce under the climatic and environmental conditions in the release area have to be assessed (Fig. 5). It is known that if the GM plant is able to reproduce in the release area, than there is a risk for invasion and its establishment in natural habitats (Kjer et al, 1990; Traxler, 2001).

For risk assessment firstly the information on evolutionary history, morphology, life history traits, and vegetative reproduction is needed. In this case, the assessment should be based on available information. If the literary data and/or results of analysis show that the GM plant has the potential to sexually reproduce or propagate vegetatively, and establish in natural habitats in the region of the release, than the fitness of the plant needs to be tested (Kjer et al, 1990).

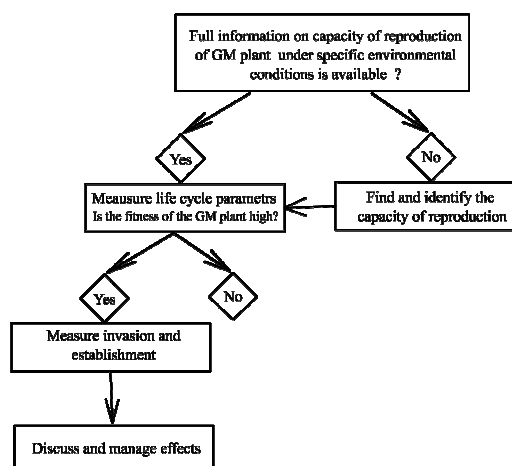


Fig.5. Key steps of risk assessment of possible invasion of new habitats by GMOs

During testing different environmental conditions of the area of release should be tested, including conditions which may have been removed by inserted trait, in order to identify the type of environmental conditions giving “no fitness advantages” to conditions eventually resulting in “improved fitness”. The growth stage of GM plant most susceptible to the stressor needs to be found. If fitness of GM plants is improved at a level occurring in any recipient environment then the plant needs to be tested in full-life-cycle experiments under relevant field conditions.

The selection of field localities relevant for the experiments is primarily dependent on the plant species and on the inserted trait. In Armenia it is difficult to carry out full-life-cycle experiments of GM plants, tests of critical stages need to be supplemented by modelling of seed dispersal, habitat invasion and reproductive success using representative data and estimation on life-cycle parameters. The results obtained should be discussed and managed, the conclusion on assessment should be developed and possible adverse effects for small regional level formulated.

To identify possible non-target effects of GM plants the species groups which are likely to be exposed to new plant compounds or altered performance of the transgenic plant should be found (Figure 6). To such groups of organisms the other plant species, pollinators, detritivores, herbivores and predators can be concerned. On Figure 6 the model for risk assessment of GM plants on non-target organisms is presented. This model is called functional model and was developed by the group of scientists from Brazil, Vietnam and East Africa within the project which was financially supported by the Swiss Agency for Development and Cooperation (Nelson K., Banker C., 2007), and which is used in our Laboratory at the Yerevan State University with small modifications.

In dependence of the GM plant species and ecological conditions of the area of release, species, exposure conditions, and end-point have to be chosen. As direct effects of GM plants on non-target organisms, the toxic effects on other plants, herbivores, pollinators, detritivores and microorganisms have to be assessed. The exposure analyses have to be carried out. As indirect effects, the food-chain effects should be assessed in terms removal of food for higher trophic levels. The methodology and types test systems depend on mode of action and expression of the trait and on the distribution and species specificity of toxic compounds.

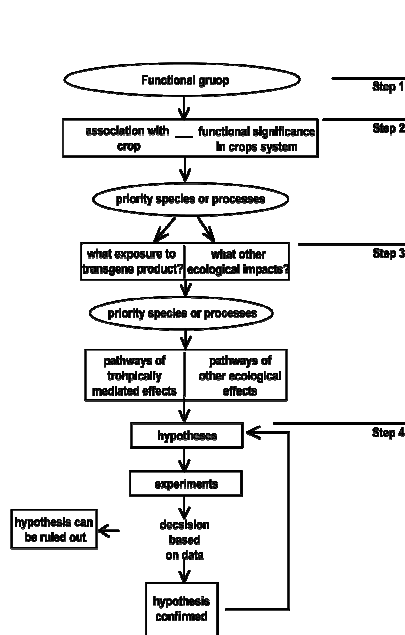


Fig. 6. Key steps of functional model for assessment of possible non-target effects of GMOs

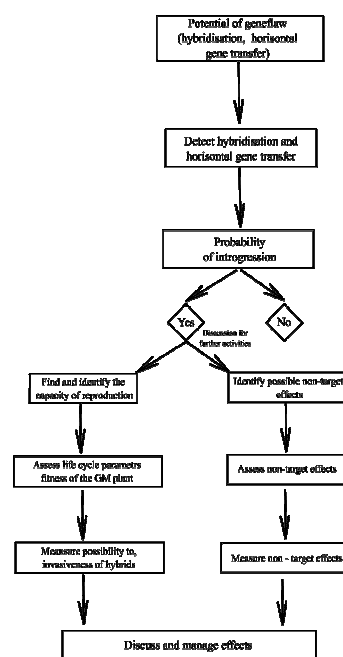


Fig. 7. Key steps of assessment of potential gene flow of GMOs

The test has to be performed for different functional groups of organisms, but also if there are problems with labour and costs, as for Armenia, it should be possible to choose key functional groups of organisms. If any non-target effect of GM plants on specific groups of organisms is identified than the non-target effects in the field have to be measured. For evaluation of non-target effects comparative tests of the population development for those taxa, which have proved sensitive, should be made. The sampling should be adjusted to the species of interest and supplementary also other species of the same functional group. Then the results should be discussed and managed by risk management working group.

For detection of potential introgression of transgenes into wild populations, (i.e. gene flow) the assessment of hybridisation potential with any naturally occurring plant is needed. This can be done by a literature study or, if no data exist, by simple hybridisation experiments with plants from closely related taxa (Figure 7). The measurements of hybridisation rates, assumed selective advantage of inserted gene, and fitness measurements of parent plants, hybrid plants, and plants from the first and second back-cross generations have to be carried out. Prior to these activities, the assessment of gene flow presence of receptive stigmas of sexually compatible cultivars, traditional cultivars, land races, wild and weedy relatives within the viable pollen transmission range have to be evaluated. The flowering phenology, viable pollen movement distance determined by pollination mechanism and viability of the pollen, pollination mechanism, means of pollination in wild and weedy related species and other parameters have to be assessed.

If hybrids are formed and hybrid plant that has the inserted gene has a fitness advantage over an otherwise similar plant without the inserted gene, than further investigations are needed.

This discussion should include considerations on invasiveness into the new ecosystems and possible effects on other organisms. In order to predict whether the inserted gene will be introgressed into the naturally occurring plants, it is necessary to describe and assess the direction of the selective forces operating on the inserted gene in the natural plant population.

Additionally, it is necessary to take into account whether the transgene can be introgressed into another organism by horizontal gene transfer and the effect of such an introgression. There may be unwanted consequences of horizontal gene transfer to another organism. Such consequences may be assessed verbally if no data are available.

Finally it is very important to compare conventional cropping system and GM cropping systems in some general points: differences (for example herbicide application), ecological effects (wildlife effects, effects on non-target organisms). These could be done by application literary data and public participatory methods. All the results obtained have to reported and discussed, for further development and decision making.

REFERENCES

1. *Covello V. T., Merkhofer M. W.*, Risk Assessment Methods: Approaches for Assessing Health and Environmental Risk, Plenum Press, New York, 1–7, 1993.
2. FAO, The State of Food and Agriculture 2003–2004: Agricultural Biotechnology: Meeting the Needs of the Poor? Rome, 194 p., 2004.
3. *James C.* Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA Brief No. 39. ISAAA: Ithaca, NY. 2008.
4. *Haykazyan Vardan, Pretty Jules*, Sustainability in Armenia: New Challenges for the Agricultural Sector, University of Essex, UK, 31 p., 2006.
5. *Kjer Christian, Damgaard Christian*, Risk Assessment of Genetically Modified Higher Plants (GMHP), NERI Technical Report, n0 303, Denmark, 35 p., 1990.
6. *Nelson Kristen C., Banker Michael J.* Problem formulation and options assessment handbook. A guide to the PFOA process and how to integrate it into environmental risk assessment (ERA) of genetically modified organisms (GMOs), A publication of ERA project, Minnesota, 252 p., 2007.
7. *Traxler Andreas, Heissenberger Andreas et al.*, Ecological monitoring of genwtically modified organisms, Riegelnik, Austria, 87 p., 2001.
8. *Tollens Eric, Demont Matty, Swennen Rony*, Agrobiotechnology in developing countries, Outlook on Agriculture, 4, 231–238, 2004.

Received 20.07.2009



• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and Theoretical articles •

Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

“АНОМАЛЬНАЯ” КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА ДИХОЛИНОВОГО ЭФИРА ПРОБКОВОЙ КИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛОШАДИНОЙ СЫВОРОТОЧНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

М.Р. МНАЦАКАНЯН

ЗАО “НИИ Биотехнологии” МЭ РА

Исследован ферментативный гидролиз дихолинового эфира пробковой кислоты (DChE_6) под действием бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (BChE_h). Установлено, что в системе $\text{BChE}_h + \text{DChE}_6$ на первой стадии гидролиза накопление пробковой кислоты (DK_6), в отличие от $\text{BChE}_h + \text{DChE}_8$ (сыворотки крови человека) + DChE_8 (дихолиновый эфир себадиновой кислоты), происходит исключительно вследствие нарушения отношений между DChE_6 и монохолиновым эфиром пробковой кислоты (MChE_6). Показано, что вопреки сильной разнице реакционных способностей DChE_6 и MChE_6 (приблизительно в 450 раз) в течение первой стадии $\sim 40\%$ DChE_6 превращается в DK_6 . Предложен возможный механизм, объясняющий данный тип нарушения конкурентности.

Бутирилхолинэстераза – дихолиновый эфир пробковой кислоты – кинетика гидролиза – нарушение конкурентности

Ուսումնասիրվել է խցանաթթվի դիխոլինային էսթերի (ԴԽԷ_6) ֆերմենտային հիդրոլիզը ձիու արյան շիճուկի բուրիրիլխոլինէսթերազի (ԲԽԷ_h) ազդեցությամբ: Հաստատված է, որ $\text{ԴԽԷ}_6 + \text{ԲԽԷ}_h$ համակարգում հիդրոլիզի առաջին փուլում խցանաթթվի կուտակումը, ի տարբերություն ԴԽԷ_8 (սեբացինաթթվի դիխոլինային էսթեր) + ԲԽԷ_h (մարդու արյան շիճուկի բուրիրիլխոլինէսթերազ) համակարգի, տեղի է ունենում բացառապես ԴԽԷ_6 -ի և խցանաթթվի մոնոխոլինային էսթերի (ՄԽԷ_6) միջև հարաբերության խախտման հետևանքով: Ցույց է տրված, որ չնայած ԴԽԷ_6 -ի և ՄԽԷ_6 -ի ռեակցիոնունակության մեծ տարբերությանը (գրեթե 450 անգամ), ռեակցիայի առաջին փուլում ԴԽԷ_6 -ի մոտ 40%-ը վեր է ածվում խցանաթթվի: Առաջարկված է հնարավոր մեխանիզմ, որը բացատրում է մրցակցության խախտման այս տիպը:

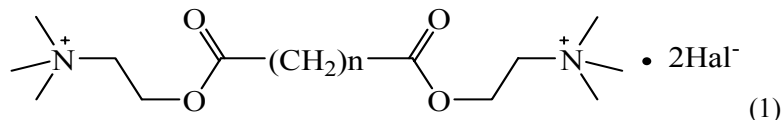
Բուրիրիլխոլինէսթերազ - խցանաթթվի դիխոլինային էսթեր – հիդրոլիզի կինետիկա - մրցակցության խախտում

The enzymatic hydrolysis of suberic acid dicholine ester (DChE_6) by horse blood serum butyrylcholinesterase (BChE_h) has been studied. It was found out that in contrast to BChE_{hum} (human serum butyrylcholinesterase) + DChE_8 (sebatic acid dicholine ester) system, the accumulation of suberic acid (DA_6) in the $\text{BChE}_h + \text{DChE}_6$ system during the first stage of hydrolysis occurs exclusively as a result of the disturbance of the ratio between DChE_6 and suberic acid monocholine ester (MChE_6). It was shown that despite of the strong difference of reactivities of DChE_6 and MChE_6 (approximately 450 times) approximately 40% of DChE_6 is converted into DA_6 during the first stage. A possible mechanism explaining this type of the disturbance of competitiveness was proposed.

Butyrylcholinesterase – suberic acid dicholine ester – kinetics of hydrolysis disturbance of competitiveness

Известно, что болезнь Альцгеймера тесно связана с соотношением активности холинацетилтрансферазы, ацетихолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в пресинаптических ганглиях мозга. Один из путей лечения этой болезни основан на применении антихолинэстеразных препаратов, имеющих различное сродство к ацетилхолинэстеразе (АХЭ, НФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразе (БХЭ, НФ 3.1.1.8) – *такрин*, *ривастигмин*, *галантамин*, *донепезил* [10, 13, 16]. В связи с этим наблюдается новый всплеск особого внимания к холинэстеразам (ХЭ) и, в частности, к БХЭ. Научные исследования последних лет направлены как к поиску новых высоко-специфичных обратимых ингибиторов холинэстеразного катализа, так и изучению активных центров и механизмов каталитического действия упомянутых ферментов [12, 19].

Дихолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот (ДХЭ),



которые являются физиологически активными веществами (из них дихолиновый эфир янтарной кислоты □ дитилин широко применяется в хирургической практике в качестве анестезирующего препарата [5, 6, 9, 15]), одновременно являются прекрасными объектами для исследования каталитических свойств БХЭ, корреляций типа структура – биологическая активность [14].

До публикаций последних лет [7, 11] считалось, что независимо от длины полиметиленовой цепи в кислотном фрагменте молекулы ДХЭ реакция холинэстеразного гидролиза этих субстратов протекает двухстадийным механизмом, без нарушения чисто конкурентных отношений. При этом в течение первой стадии гидролиза под действием фермента расщепляется только одна из эфирных связей, в результате чего образуются монохолиновый эфир (МХЭ) и холин. Вторая стадия реакции - гидролиз МХЭ (он начинается только после практически полного исчерпания ДХЭ в реакционной среде), в результате которого образуется дикарбоновая кислота (ДК) и холин [2, 3, 14, 17].

Однако в недавних наших работах [7, 8, 11] было показано, что ферментативный гидролиз ДХЭ высших дикарбоновых кислот, начиная с пробковой кислоты ($n \leq 6$), под действием БХЭ сыворотки крови человека (БХЭ_ч) протекает с существенными отклонениями от вышеописанного механизма. Накопление дикарбоновой кислоты наблюдается не только после полного исчерпания ДХЭ, но также протекает параллельно гидролизу ДХЭ в течение первой стадии [8]. В этой же работе показано, что при гидролизе ДХЭ себациновой кислоты (ДХЭ₈) “преждевременное” образование ДК происходит по двум механизмам параллельно: по механизму конкурирующих субстратов (механизм - А) и ранее неизвестному механизму (механизм - Б), который предполагает нарушение конкурентности между молекулами субстратов ДХЭ и МХЭ. Суть нарушения конкурентности заключается в том, что некоторая доля молекул монохолинового эфира себациновой кислоты (МХЭ₈), образующаяся в активном центре фермента (в результате гидролиза ДХЭ₈), гидролизуется, не “успевая” покинуть его.

В настоящей работе показано, что при ферментативном гидролизе ДХЭ пробковой кислоты (ДХЭ₆) под действием БХЭ сыворотки крови лошади (БХЭ_л) “преждевременное” образование пробковой кислоты протекает при полном отсутствии механизма А, и накопление ДК на первой стадии гидролиза ДХЭ протекает исключительно по механизму Б, т.е. только вследствие нарушения конкурентных отношений между ДХЭ₆ и (МХЭ₆).

Материал и методика. Скорость ферментативного гидролиза ДХЭ₆ определяли методом прямого потенциометрического титрования образующихся при гидролизе кислотных продуктов в реакционной среде, содержащей $4 \cdot 10^{-3}$ М фосфатного буфера на приборе pH-stat марки “Radiometer Analytical TitrLab854”. Определения проводили в термостатируемой ячейке прибора при $25 \pm 0.1^\circ$ и pH 7.0 ± 0.05 . Начальная концентрация субстрата в реакционной среде составляла $2 \cdot 10^{-4} \div 2 \cdot 10^{-3}$ М. В качестве титранта использован 0.1 М раствор NaOH. Препарат БХЭ_д с удельной активностью 100 Е/мг производства РФ. Дихолиновый эфир пробковой кислоты синтезирован согласно описанной методике [2, 5, 6, 14].

Наличие в реакционной среде дикарбоновой кислоты на разных этапах реакции определяли качественно методом тонкослойной хроматографии с использованием подвижной фазы бензол - метиловый спирт - уксусная кислота, с соотношением объемов 45:8:4 соответственно и проявителя – бромкрезолового пурпурного.

Результаты и обсуждение. Кинетика полного ферментативного гидролиза ДХЭ₆. На рис.1 показана зависимость накопления “кислотного продукта” (рассчитанная исходя из расхода количества титранта – NaOH) в течение реакции холинэстеразного гидролиза ДХЭ₆ при его начальной концентрации, равной $3.0 \cdot 10^{-4}$ М. Здесь под “кислотным продуктом” подразумеваются как МХЭ₆, так и ДК₆, кислотные группы которых при данных значениях pH титруются одинаково и следовательно неразличимы. Согласно полученной кривой, на которой имеется выраженный излом, реакция протекает в две стадии, что в общих чертах согласуется с наблюдаемой картиной, характерной для сукцинилдихолина и других членов ряда [18]. Сначала накопление кислотного продукта в реакционной среде происходит монотонно, практически с постоянной скоростью. Линейное нарастание концентрации продукта наблюдается до накопления его определенного количества, равного приблизительно $4.2 \cdot 10^{-4}$ М, при достижении которого кинетика реакции меняется, что выражается в резком снижении скорости реакции гидролиза и отклонении зависимости от линейности. Учитывая низкую скорость реакции гидролиза МХЭ₆, для проведения эксперимента в приемлемом временном интервале в реакционную систему добавлено дополнительное количество фермента (в двадцать раз превышающее начальное количество, что, безусловно, учтено в расчетах кинетических параметров и построении теоретической кривой).

Далее, как показано на рис. 1, кр. а, скорость реакции монотонно убывает и по достижении кислотного продукта, равного ожидаемому теоретическому количеству (два эквивалента на 1 М ДХЭ₆), скорость реакции приближается к нулю.

Таким образом, общая картина кинетического поведения гидролиза ДХЭ₆ соответствует ранее описанному ферментативному гидролизу ДХЭ. Однако концентрация кислотного продукта в конце первой стадии ферментативного гидролиза, т.е. до момента отклонения зависимости от практически линейной, значительно больше ожидаемого $3 \cdot 10^{-4}$ М и равна $\sim 4.2 \cdot 10^{-4}$ М.

Результаты хроматографического анализа реакционной смеси гидролиза ДХЭ₆ показали наличие возрастающего количества дикарбоновой кислоты практически в течение всей реакции.

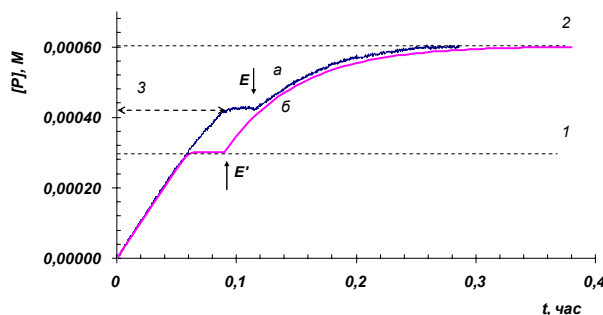


Рис 1. Зависимость накопления кислотного продукта в реакции ферментативного гидролиза субстрата, при $[ДХЭ_6]_0 = 3 \cdot 10^{-4}$ М, под действием БХЭ от времени (*a*– экспериментальная и *b*– расчетная). Пунктирными линиями 1 и 2 указано ожидаемое количество кислотного продукта в конце первой и второй стадии реакции, а пунктирной линией 3– наблюдаемое в эксперименте количество кислотного продукта в конце первой стадии (остальные условия эксперимента в тексте).

Определение константы ингибирования (K_i) холина. Значение K_i для холина определяли исходя из предположения о конкурентном типе ингибирования реакции гидролиза МХЭ₆ и соответственно использовали известное уравнение (2)

$$V_{(МХЭ)} = \frac{V_{\max(МХЭ)}}{1 + \frac{K_m(МХЭ)}{[МХЭ]} \left(1 + \frac{[холин]}{K_i} \right)}, \quad [2]$$

где $V_{(МХЭ)}$ – наблюдаемая начальная скорость реакции гидролиза МХЭ₆ в присутствии холина, $V_{\max(МХЭ)}$ – максимальная скорость реакции гидролиза МХЭ₆, $K_m(МХЭ)$ – константа Михаэлиса, K_i – константа ингибирования холина, $[холин]$ – концентрация холина в реакционной смеси.

Начальные скорости реакции гидролиза МХЭ₆ определяли по данным второй стадии ферментативного гидролиза ДХЭ₆. В экспериментах начальная концентрация МХЭ₆ составляла $2.0 \cdot 10^{-4}$, $3.3 \cdot 10^{-4}$ и $2.0 \cdot 10^{-3}$ М, а полученные значения K_i равны $(0.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$, $(1.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$ и $(1.2 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$ М соответственно. Для дальнейших расчетов использовано среднее значение полученных данных, составляющее $(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ М.

Расчет теоретических кривых двухстадийного ферментативного гидролиза ДХЭ₆. Для построения расчетных кинетических зависимостей реакции ферментативного гидролиза ДХЭ₆ нами использованы как данные, приведенные выше, так и ранее опубликованные результаты исследований индивидуальных соединений ДХЭ₆ и МХЭ₆ [1]. Ниже приведены значения K_m и $V_{\max}$ для ДХЭ₆ и МХЭ₆ и K_i холина, примененные для расчетов; значение $K_m(ДХЭ_6)$ равно $(0.89 \pm 0.04) \cdot 10^{-6}$ М; $K_m(МХЭ_6)$ равно $(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ М; соотношение $V_{\max(ДХЭ_6)}/V_{\max(МХЭ_6)}$ равно 4.5; значение K_i холина равно $(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ М.

Расчеты суммарной скорости ферментативной реакции гидролиза конкурирующих субстратов проводили по уравнению (3) [4]:

$$V = V_{(МХЭ)} + V_{(ДХЭ)}, \quad (3)$$

где V – скорость суммарной реакции для смеси, содержащей МХЭ₆ и ДХЭ₆, $V_{(МХЭ)}$ и $V_{(ДХЭ)}$ скорости превращений МХЭ₆ и ДХЭ₆ в реакционной смеси субстратов, выражаемые уравнениями (4) и (5):

$$V_{(MXЭ)} = \frac{V_{\max(MXЭ)}}{1 + \frac{K_{m(MXЭ)}}{[MXЭ]} \cdot \left(1 + \frac{[DXЭ]}{K_{m(DXЭ)}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[холин]}{K_i}\right)}, \quad (4)$$

$$V_{(DXЭ)} = \frac{V_{\max(DXЭ)}}{1 + \frac{K_{m(DXЭ)}}{[DXЭ]} \cdot \left(1 + \frac{[MXЭ]}{K_{m(MXЭ)}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[холин]}{K_i}\right)}, \quad (5)$$

$K_{m(MXЭ)}$ и $K_{m(DXЭ)}$ – константы Михаэлиса $MXЭ_6$ и $DXЭ_6$ соответственно, K_i – константа ингибирования холина, $V_{\max(MXЭ)}$ и $V_{\max(DXЭ)}$ – максимальные скорости реакций гидролиза, $[P]$, $[MXЭ]$ и $[DXЭ]$ – концентрации холина, $MXЭ_6$ и $DXЭ_6$ соответственно. При этом, как свидетельствуют приведенные уравнения, сделано предположение об отсутствии нарушений конкурентности между $DXЭ_6$, $MXЭ_6$ и холином.

Для получения доступной проверки зависимости концентрации продукта $[P]$ от времени t применен численный метод. Расчеты проведены с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. Для получения кривой $[P] = f(t)$ взяты промежутки времени $\Delta t = \text{const}$, а их число составляет не менее 80 точек.

Наложение теоретической и экспериментальной кривых накопления кислотного продукта в зависимости от времени для полного (по двум сложноэфирным связям) ферментативного гидролиза $DXЭ_6$ показано на рис. 1. Как видно из приведенного рис., начальный участок теоретической кривой тесно ложится на экспериментальную кривую. Однако теоретическая кривая изламывается значительно раньше экспериментальной. Как и следовало ожидать, излом на теоретической кривой соответствует точке $[P] \approx 3.0 \cdot 10^{-4}$ М (исходная концентрация $DXЭ_6$), что является следствием большой разницы в реакционных способностях $DXЭ_6$ и $MXЭ_6$ (соотношение $V_{\max(DXЭ_6)}/K_{m(DXЭ_6)}$ в 450 раза больше, чем соответствующая величина для $MXЭ_6$). В этой точке, согласно проведенным расчетам, $DXЭ_6$ в реакционной среде должен быть полностью исчерпан, а концентрация $MXЭ_6$ максимальна и соответствует исходной концентрации $DXЭ_6$. Из того же рис. видно, что теоретическая кривая, описывающая вторую стадию, вполне приемлемо воспроизводит экспериментальную зависимость. Эти результаты подтверждают, что использованные нами для расчетов кинетические параметры достаточно хорошо описывают течение реакции в тех участках, где соблюдаются чисто конкурентные отношения между реагирующими веществами.

Из приведенных данных очевидно также, что нарушение конкурентности наблюдается на первой стадии реакции. Нами была рассчитана кривая $[P] = f(t)$ для первой стадии формально допуская, что $[DXЭ_6]_0 = 4.2 \cdot 10^{-4}$ М, что соответствует концентрации продукта на экспериментальной кривой в точке излома. Согласно полученным результатам, теоретическая зависимость вполне удовлетворительно описывает эксперимент. Этот результат указывает на то, что нарушение конкурентности не оказывает существенного влияния на кинетику реакции и отражается на количестве образующихся кислотных продуктов. Рассмотрение материального баланса реагирующих веществ и их качественного состава показывает, что дополнительный прирост кислотного продукта на первой стадии обусловлен образованием DK_6 .

Для объяснения совокупности полученных данных нами сделано предположение, что комплекс Михаэлиса $[EuDXЭ_6]$ после гидролиза одной из эфирных связей переходит в комплекс $[EuMXЭ_6 \text{ и } холин]$, который частично распадается или образуя свободный фермент, $MXЭ_6$ и холин, или свободный фермент, DK_6 и холин. Именно второй путь распада и приводит

к нарушению конкурентных отношений между ДХЭ₆ и МХЭ₆. В данном случае, исходя из концентрации в точке излома экспериментальной кривой, можно сделать предположение, что приблизительно 0.4 часть [EuДХЭ₆ихолин] комплексов приводит к образованию ДК₆.

Таким образом, предложенную нами упрощенную схему первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ₆ можно представить следующим образом (схема 1), где взаимопревращение комплексов Михаэлиса включено в большие квадратные скобки.

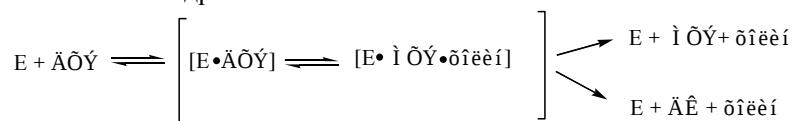


Схема 1. Вероятная схема механизма первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ₆ под действием БХЭ_л (Е – фермент).

Автор выражает благодарность проф. Алебяну Г.П. и Папосяну А.О. за обсуждение и ценные советы при работе над статьей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алебян Г.П. Автореф. канд. дисс., Ленинград, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова АН СССР, 135 с., 1978.
2. Алебян Г.П., Григорян Н.А., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А. Биоорганическая химия, 3, 1266-1272, 1977.
3. Алебян Г.П., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А. Биотехнология, 1, 80-85, 1999.
4. Диксон М., Уэбб Э., Ферменты, М., Мир, 1966 [Dixon M., Webb E. Enzymes. 2nd edn Longmans Green, London, 1964].
5. Дитилин и опыт его клинического применения. Под ред. Мнджояна А. Л. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 251 с., 1957.
6. Машиковский М.Д. Лекарственные средства, 2, М., "Новая Волна", 2002.
7. Мнацаканян М.Р., Акопян Л.М., Саркисян Ж.В., Самокиш В.А., Алебян Г.П. Биолог. журн. Армении, 59, 3-4, 239-247, 2007.
8. Мнацаканян М.Р., Папосян А.О., Самокиш В.А., Алебян Г.П. Хим. ж. Армении, 62, 1-2, 188-200, 2009.
9. Brucke F. Pharmacological revues, 8, 256-335, 1956.
10. Giacobini E. Neurochemical research, 28, 3-4, 515-522, 2003.
11. Grygoryan H., Halebyan G., Lefebvre B., Brasme B., Masson P. Biochimica et Biophysica Acta, 1784, 1818-1824, 2008.
12. Law K.-Sh, Acey R. A., Smith C.R., Benton D.A., Soroushian S., Eckenrod B., Stedman R., Kantardjieff K.A., Nakayama N. Biochemical and Biophysical Research Communications, 355, 2, 371-378, 2007.
13. Martinez A., Castro A. Expert Opinion on Investigational Drugs, 15, 1-15, 2006.
14. Masson P., Legrand P., Bartels C.F., Froment M.-Th., Schopfer L.M., Lockridge O. Biochemistry, 36, 2266-2277, 1997.
15. Naguib M., Samarkandi A., El-Din M.E., Abdullah K., Khaled M. Alharby S.W. Anesth. Analg., 102, 151-155, 2006.
16. Nordberg A., Svensson A.L. Drug Safety, 19, 465-480, 1998.
17. Tsuji F.J., Foldes F.F. Fed. Proc. 12, 374, 1953.
18. Whittaker V.P. and Wijesundera S. Biochem. J., 52, 475-479, 1952.
19. Xu Y., Colletier J.-P., Weik M., Jiang H., Moulton J., Silman I., Sussman J.L. Biophysical Journal, 95, 2500-2511, 2008.

Поступила 07.05.2009.



Biolog. Journal of Armenia, 3 (61), 2009

BINDING OF CATIONIC PORPHYRINS TO BLOOD PROTEINS

A. G. GYULKHANDANYAN

Yerevan State University, Department of Biophysics

It is shown, that various porphyrins bind in different ways to the proteins depending on a structure of lateral functional groups. It is found, that the porphyrin binding ability of bovine serum albumin (BSA) is considerably (1,5 times) greater than that of hu-man serum albumin (HSA). Also it turned out that the porphyrin binding ability of hemoglobin is 2 times greater than the ability of HSA.

Blood proteins – cationic porphyrins – binding constants

Показано, что в зависимости от строения боковых функциональных групп разные порфирины по-разному связываются с белками. Определено, что порфирин-связывающая способность у бычьего сывороточного альбумина (БСА) значительно выше (в 1,5 раза), чем у человеческого СА (ЧСА). Оказалось также, что порфирин связывающая способность гемоглобина в 2 раза выше, чем у ЧСА.

Белки крови – катионные порфирины – константы связывания

Ցույց է տրված, որ կողմնային ֆունկցիոնալ խմբերի կառուցվածքից կախված զանազան պորֆիրինները տարբեր ձևով են կապվում սպիտակուցների հետ: Հայտնաբերվել է, որ ցուլի շիճուկային ալբումինի մոտ կապման ունակությունը զգալիորեն ավելի բարձր է (1,5 անգամ) մարդու շիճուկային ալբումինից: Պարզվել է նաև, որ հեմոգլոբինի հետ պորֆիրինի կապման ունակությունը մոտ 2 անգամ բարձր է մարդու շիճուկային ալբումինի համեմատ:

Արյան սպիտակուցներ – կատիոնային պորֆիրիններ – կապման հաստատուններ

Photosensitizers (PS), in particular porphyrins, are widely used in photodynamic therapy of tumours (PDT) [3, 6]. The photosensitizer, which selectively accumulate in a tumor, at PDT is injected into the patient and after excitation by light promotes generation of reactive oxygen species, which damage the components of cells and tissues, that finally adduces to the destruction of cells by necrosis and/or apoptosis [6, 10]. The high selectivity has been reached especially for cationic porphyrins which have been successfully used for destruction of tumors in vivo [9]. The proteins of blood can serve as carriers of medicines, which facilitate a selective delivery of porphyrins to areas of tumors. The affinity of serum albumin (SA), hemoglobin, lipoproteins of high and low density for porphyrins indicates the important role of these proteins as endogenous carriers of photosensitizers administered for PDT [5, 8, 11]. In connection with the above-stated, the investigation of binding and transfer of cationic porphyrins to proteins is of a great importance for PDT of tumors.

Materials and methods. BSA, BSA fatty acids free (BSA FAF), HSA fatty acids free (HSA FAF), human hemoglobin (HH) and cytochrome C were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA). Water-soluble cationic porphyrins and metalloporphyrins have been synthesized at the Yerevan State Medical University according to the methods described in work [2]. All other reagents were of analytical grade.

The absorbance spectra were recorded on a Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Japan) in 0,5 centimeter quartz cell. In analyzed cell the concentration of porphyrins was constant ($5 \cdot 10^{-6}$ M), and the concentration of proteins was changed ($5 \cdot 10^{-7}$ - $2,5 \cdot 10^{-4}$ M) with their addition via Hamilton Co. Microliter Syringe (USA). The research of porphyrin-protein binding was carried out by defining the binding constant K via analyzing the reduction of absorption of a Soret band due to addition of a solution of protein to the solution of porphyrin. It is described by the following modified relation of Kapp et al. [7]:

$$A_0/A - A = 1/fK[C_{\text{prot}}] + 1/f \quad (1)$$

where A_0 and A are the porphyrin solution absorbances in the absence and presence of the protein, respectively. In the plot of a adsorption isotherm $A_0/A - A$ (ordinate) vs $1/[C_{\text{prot}}]$ (abscissa), $1/f$ is obtained from the intercept on the $A_0/A - A$ axis, corresponding to $1/[C_{\text{prot}}] = 0$.

At definition of the values A_0 and A of the absorption intensity we used the spectra processing software, namely "Spectra Manager for Spectra Analysis, Version 1.53.00, JASCO Corporation, 2000 ". This software corrects the value of absorption intensity A in view of spectra asymmetry and deviation from a base (zero) line. The value of K was defined according to relation of Kapp (1). The results of experiments have been processed statistically by using the criterion of Student.

Results and Discussion. Investigations of interactions of a proteins with ligands at simulative conditions, starting from simple two-componential systems, such as monomers of porphyrins and proteins are of of special importance for definition of porphyrin-protein binding constants. However even such seemingly simple systems can be transformed during experiment into the multicomponential systems by dimerization and polymerizations (aggregation) of proteins (especially at their higher concentrations), thus corrupting the results of constants and quantity of places of ligand binding to protein. In spectrophotometric analysis one of the basic criteria for presence of two-componential system in a solution is the formation of isosbestic points (the general point of spectral curves crossing) [1]. To obtain correct values of binding constants of protein-ligand pair, the titration of a porphyrin solution with increasing concentration of proteins, by tracing the formation of isosbestic points for spectral curves was investigated.

From Fig. 1A one can see, that results of the titration process of a porphyrin solution can be divided on two parts: the first group of the spectral curves of solutions, obtained via titration of porphyrin by solution of BSA up to a ratio protein : porphyrin = 2,5:1 and, the second group of spectral curves having significant shift of absorption peak of a Soret band (on 6-8 nanometers) and obtained via titration of porphyrin by solution of BSA up to a ratio protein : porphyrin = 40:1 ($[C_{\text{prot}}] = 2 \cdot 10^{-4}$ M). From Fig. 1A it follows, that in the first group of spectral curves the isosbestic point is observed (the top five curves) whereas spectral curves of the second group do not pass through the isosbestic point. Hence, for the correct definition of a binding constant (K) it is necessary to titrate up to that concentration of a protein at which curves of spectra still pass through the isosbestic point.

The interaction of 8 porphyrins and metalloporphyrins with 4 different blood proteins, and also with cytochrome C has been investigated according to

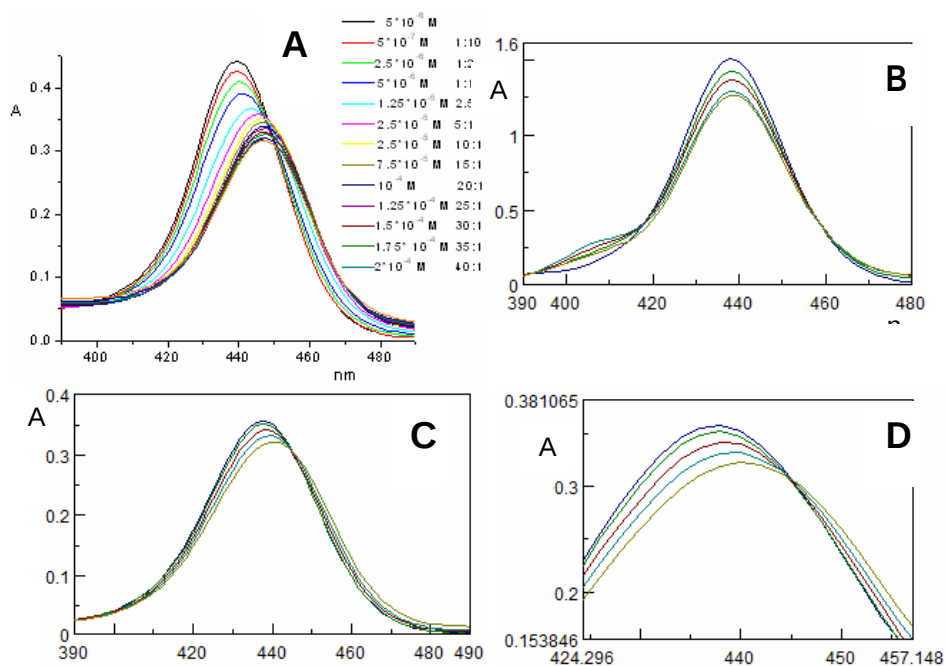


Fig.1. Absorption spectra of porphyrins solutions ($5 \cdot 10^{-6}$ M in 0,01 M phosphate buffer pH 7,2) at their titration by proteins solutions. A – titration of Zn-TOE4PyP by BSA solution; B – titration of Zn-TBut4PyP by HH solution; C - titration of Zn-TBut4PyP by BSA FAF solution; D – the same like in C with magnification of isosbestic point spectral region.

this criterion. In Fig. 1B and 1C the absorption spectra of some porphyrins at their titration rather low concentration of various proteins (a ratio of protein : porphyrin = 0,5:1; 0,75:1; 1:1; 1,75:1; 2,5:1) are presented. The observed spectra on the presence of isosbestic points for all porphyrins and proteins were investigated.

For determination of a binding constants K according to relation of Kapp (1) the adsorption isotherms in coordinates A_0/A_0-A vs $1/[C_{\text{prot}}]$ have been plotted (Fig. 2).

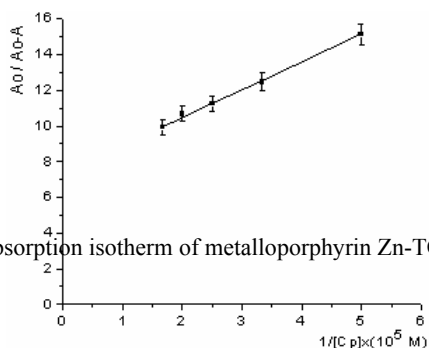


Fig.2. Absorption isotherm of metalloporphyrin Zn-TOE4PyP to BSA

The results of definition of binding constants (K) for 8 porphyrins and metalloporphyrins with 5 various proteins are presented in the table, where we also present the values $K_{\text{aver}} = \sum K/8$ for each protein, which reflects the average connecting ability of the given protein to cationic porphyrins.

From the table follows, that the porphyrin binding ability of BSA and fatty acids free BSA are practically identical and are considerably higher (1,5 times) than that of HSA. Also it turned out that the binding ability of hemoglobin is 2 times higher, than the ability of HSA. High affinity to cationic porphyrins was displayed by cytochrome C (2-3 times higher than BSA). Because of a positive charge and lipophilic properties the cationic porphyrins can be localized with high probability in mitochondrion owing to a negative charge of an internal part of mitochondrion membranes; such arrangement of porphyrins can testify that mitochondrion are the primary place of cells destruction at PDT [10].

Table. The binding constants (K) of porphyrins and metalloporphyrins with various proteins

	Porphyrins and metalloporphyrins	BSA ($K \cdot 10^{-5} \text{ M}$)	BSA Fatty Acids Free ($K \cdot 10^{-5} \text{ M}$)	HSA Fatty Acids Free ($K \cdot 10^{-5} \text{ M}$)	Human Hemoglobin ($K \cdot 10^{-5} \text{ M}$)	Cytochrome C ($K \cdot 10^{-5} \text{ M}$)
1.	TOE4PyP	$4,10 \pm 0,29$	$2,60 \pm 0,19$	$1,55 \pm 0,11$	$3,36 \pm 0,23$	$8,18 \pm 0,49$
2.	Zn-TOE4PyP	$2,60 \pm 0,16$	$2,65 \pm 0,15$	$3,00 \pm 0,21$	$4,82 \pm 0,31$	$7,47 \pm 0,39$
3.	TBut4PyP	$3,13 \pm 0,20$	$4,71 \pm 0,29$	$3,10 \pm 0,21$	$2,99 \pm 0,19$	$7,84 \pm 0,43$
4.	Zn-TBut4PyP	$3,80 \pm 0,22$	$4,10 \pm 0,25$	$0,40 \pm 0,02$	$2,07 \pm 0,12$	$1,58 \pm 0,09$
5.	TAll4PyP	$0,70 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,06$	$1,60 \pm 0,09$	$2,02 \pm 0,11$	$3,56 \pm 0,21$
6.	Zn-TAll4PyP	$1,42 \pm 0,08$	$1,52 \pm 0,08$	$1,50 \pm 0,08$	$1,75 \pm 0,1$	$0,60 \pm 0,03$
7.	TMetAll4PyP	$1,98 \pm 0,11$	$0,37 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,04$	$1,89 \pm 0,11$	$5,52 \pm 0,33$
8.	Zn-TMetAll4PyP	$0,76 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,11$	$0,19 \pm 0,01$	$5,29 \pm 0,29$	$2,87 \pm 0,16$
	$K_{\text{aver}} \cdot 10^{-5} \text{ M}$	2,31	2,26	1,52	3,02	4,70

From the table it follows, that the porphyrin binding ability of BSA and fatty acids free BSA are practically identical and are considerably higher (1,5 times) than that of HSA. Also it turned out that the binding ability of hemoglobin is 2 times higher, than the ability of HSA. High affinity to cationic porphyrins was displayed by cytochrome C (2-3 times higher than BSA). Because of a positive charge and lipophilic properties the cationic porphyrins can be localized with high probability in mitochondrion owing to a negative charge of an internal part of mitochondrion membranes; such arrangement of porphyrins can testify that mitochondrion are the primary place of cells destruction at PDT [10].

The knowledge of binding constants of cationic porphyrins with the various proteins can promote the study of mechanisms of photosensitizers transport at PDT of tumors and facilitate the synthesis of porphyrins which will be more efficient in therapy of tumours.

The author is thankful to R.K. Ghazaryan (Yerevan State Medical University) for kindly provision of porphyrins and metalloporphyrins for the experiments and also for discussion of the results.

REFERENCES

1. *Bernstein I.Y., Kaminski Yu.L.* Spectrophotometric analysis in organic chemistry. Khimiy", L., 1975.
2. *Madakyan V.N., Kazaryan R.K., Khachatryan M.A., Stepanyan A.S., Kurtikyan T.S., Ordyan M.B.* Khimiya heterociklicheskikh soedinenii, 2, 212-216, 1986.
3. *Bonnett R.* Chem. Soc. Rev., 24, 19-33, 1995.
4. *Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R.* Nature Reviews Cancer, 6, 535-545, 2006.
5. *Cohen S., Margalit R.* Biochem. J., 270, 325-330, 1990.
6. *Dougherty T.J., Gomer C.G., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q.* J. Natl. Cancer Inst., 90, 12, 889-905, 1998.
7. *Kapp E.A., Daya S. and Whitley C.G.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 167, 1383-1392, 1990.
8. *Kessel D.* Cancer Lett., 33, 183-188, 1986.
9. *Morgan J. and Oseroff A.R.* Drug Deliv. Rev., 49, 71-86, 2001.
10. *Oleinick N., Morris R.L. and Belichenko I.* Photochem. Photodiol. Sci., 1, 1, 1-21, 2002.

Received 31.07.2009



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(61), 2009

ՀԱՆՔԱՅԻՆ ՄԵԼԻՈՐԱՆՏՆԵՐԻ ՖՈՆԻ ՎՐԱ ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ՊԱՐԱՐՏԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՏՆՏԵՍԱԿՈՆՈԳԻԱԿԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄՄԲՈՒԿԻ ՑԱՆՔԵՐՈՒՄ

Մ.Հ. ԳԱԼՍՅԱՆ, Է.Մ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ս.Ս. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ,
Ս.Զ. ԹԱՄՈՅԱՆ

Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Դաշտային ուսումնասիրություններով պարզվել է, որ ցեմենտի փոշիով աղտոտված հողերում բնական հանքային մելիորանտների (ցեոլիտ և դացիտային տուֆ - 70 տ/հա) ֆոնի վրա գոմաղբի (40 տ/հա) և կենսահումուսի (5 տ/հա) կիրառումը նպաստել է սմբուկի բերքատվության բարձրացմանը (22,0-67,4%) և պտուղների մեջ ծանր մետաղների (Cu, Zn, Mn, Ni) պարունակության նվազեցմանը 13,7-25,8%-ով: Փորձի բոլոր տարբերակներում սմբուկի պտուղներում նիտրատների կուտակումը եղել է ՍԹԽ-ի սահմաններում:

*Բնական մելիորանտներ - գոմաղբ - կենսահումուս - բերքատվություն -
ծանր մետաղներ - նիտրատներ*

Установлено, что в загрязненных цементной пылью почвах применение навоза (40 т/га) и биогумуса (5 т/га) на фоне природных мелиорантов (цеолит и дацитовый туф - 70 т/га) способствовало значительному повышению урожайности баклажана (22,0-67,4 %) и снижению содержания тяжелых металлов (Cu, Zn, Mn и Ni - 13,7- 25,8 %) в плодах. Накопление нитратов в плодах баклажана во всех вариантах опыта было в пределах ПДК.

*Природные мелиоранты - навоз - биогумус - урожайность -
тяжелые металлы - нитраты*

It has been revealed that application of dung (40 t/ha) and biohumus (5 t/ha) contributed to significant rise in yield of egg-plants (22,0-67,4 %) and fall of concentration of heavy metals (Cu, Zn, Mn and Ni - 13,7-25,8 %) in the fruits on the soils polluted with cement powder on the background of natural ameliorants (ceolites and dacite tufa - 70 t/ha). Nitrate accumulation in egg-plant fruits in all the variants of the experiment was within the limits of permitted concentrations.

Natural ameliorants - dung - biohumus - yield - heavy metals - nitrate

Հայաստանի Հանրապետության տարածքում կան ավելի քան 50 հազար հեկտար տեխնածին աղտոտված հողեր, որոնք գտնվում են ինտենսիվ զարգացած գյուղատնտեսական գոտիներում, ուր մշակվում են արժեքավոր գյուղատնտեսական մշակաբույսեր: Աղտոտված հողերում տոքսիկ նյութերի, այդ թվում ծանր մետաղների պարունակությունը զգալիորեն գերազանցում է սահմանային թույլատրելի խտությունը (ՍԹԽ):

Բնական մելիորանտների, հատկապես ցեոլիտների կիրառությունը գյուղատնտեսության մեջ ունի կարևորագույն նշանակություն: Բնական ցեոլիտները հանդիսանում են էկոլոգիապես անվտանգ հանքային հումքատեսակներ, որոնք օժտված են բարձր ադսորբցիոն հատկություններով և էական ազդեցություն են գործում մշակաբույսերի աճի, զարգացման, բերքի քանակի և որակի վրա [1, 7, 10, 11, 12]:

Մի շարք ուսումնասիրություններով պարզվել է, որ Արարատի ցեմենտի գործարանի շրջակա հողերում ծանր մետաղների կուտակումը բացասաբար է ազդում մշակաբույսերի աճի, զարգացման և ստացված մթերքների որակի վրա [1, 4, 5]:

Չնայած ՀՀ-ի տեխնածին աղտոտված հողերի տարածման տարբեր գոտիներում ծանր մետաղների և այլ տոքսիկ նյութերի պարունակության և մարդու համար դրանց վտանգավորության աստիճանի պարզաբանման ուղղությամբ վերջին ժամանակաշրջանում կատարվել են բազմաթիվ ուսումնասիրություններ [2, 4], սակայն աղտոտված հողերի վերակուլիվացման, մարդու առողջության համար էկոլոգիապես անվտանգ բուսաբուծական մթերքների ստացման տեխնոլոգիաներ չեն մշակվել:

Նյութ և մեթոդ: Փորձարարական աշխատանքները տարվել են 2006-2008 թթ. Արարատի մարզի Արարատի ցեմենտի գործարանի շրջակա տարածքի տեխնածին աղտոտված (ցեմենտի փոշու ներգործության 1-ին գոտի) գորշ կիսաանապատային, թույլ հումուսային (0-25 սմ հողաշերտում հումուսի քանակը չի գերազանցում 1%), ուժեղ կարբոնատային (կապված CO_2 -ը կազմում է 15,95-17,03 %) հողերում, որտեղ ջրային քաշվածքում pH -ը հիմնային է (8,0-8,2):

Դաշտային փորձերը դրվել են յոթ տարբերակներով, երեք կրկնողությամբ (տ/հա). 1. Առանց մելիորանտների (ստուգիչ), 2. Ցեոլիտ 70, 3. Ցեոլիտ 70 + գոմաղբ 40, 4. Ցեոլիտ 70 + կենսահումուս 5, 5. Դաջիտային տուֆ 70, 6. Դաջիտային տուֆ 70 + գոմաղբ 40, 7. Դաջիտային տուֆ 70 + կենսահումուս 5:

Փորձամարզերի մակերեսը եղել է 50 մ² (10,2 x 4,8 մ): Դաշտային փորձերում օգտագործված հանքային մելիորանտները և օրգանական պարարտանյութերը տրվել են զարնանը՝ հողի հիմնական մշակման ժամանակ:

Վեգետացիայի ընթացքում կատարվել են սմբուկի աճի ու զարգացման ֆենոլոգիական դիտարկումներ և կենսամետրիկ չափումներ:

Որպես փորձանյութ օգտագործվել է սմբուկի $\square$ Երևանի տեղական $\square$ սորտը, որը ավելի քան 20 տարի շրջանացված է Հայաստանի տարբեր հողակլիմայական գոտիներում, այդ թվում և Արարատյան հարթավայրում:

Փորձարարական աշխատանքների տարիներին սմբուկի սածիլումը կատարվել է մայիսի առաջին տասնօրյակում: Վեգետացիայի ընթացքում կատարվել են 3 քաղիան-փխրեցում, 2 բուկլից և 500 մ³ նորմայով 17 ջրում:

Բերքի հաշվառումը կատարվել է ըստ հասունացման փուլերի, չորս անգամ: Փորձերի արդյունքները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման՝ ըստ դիսպերսիոն վերլուծության մեթոդի, փորձի սխալի (S_x ,%) և ամենանվազագույն էական տարբերության ($U_{\text{էՏ}}$, g) որոշումով [6]:

Արդյունքներ և քննարկում: Դաշտային փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ հանքային մելիորանտները և դրանց ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերը որոշակի ազդեցություն են ունեցել սմբուկի աճի, զարգացման, բերքի քանակի և որակական ցուցանիշների վրա:

Ֆենոփուլերով կատարված դիտարկումները ցույց են տվել, որ ցեոլիտը և դաջիտային տուֆը և դրանց ֆոնի վրա գոմաղբն ու կենսահումուսը սածիլացումից հետո բույսերի սկզբնական փուլերի՝ կոկոնակալման և ծաղկման, բույսերի աճի և վեգետատիվ մասերի զարգացման վրա էական ազդեցություն չեն ունեցել: Սակայն նույնը չի կարելի ասել հետագա փուլերի անցման տևողության և հատկապես պտուղների ձևավորման ու հասունացման փուլերի վերաբերյալ:

Եթե առանց մելիորանտների (ստուգիչ) և ցեոլիտի ու դաջիտային տուֆի տարբերակներում սածիլացումից մինչև վերջին պտուղների հավաքը բույսերը անցել են 139-141 օրերի ընթացքում, ապա մելիորանտների ֆոնի վրա գոմաղբ և կենսահումուս ստացած տարբերակներում՝ 148-151 օրերում:

Կատարված ուսումնասիրությունների վերլուծությամբ պարզվել է, որ օրգանական պարարտանյութերի ազդեցության տակ սմբուկի վեգետացիան ձգձգվել է, բայց իրականում այդ տարբերակներում բույսերն աճել են ավելի փարթամ, ունեցել են մուգ կանաչ գույն, պտուղներն ավելի առողջ ու հյութալի էին, քան միայն հանքային մեկիորանտներ ստացած տարբերակներին, որն էլ հետագայում արտահայտվել է բերքի քանակով:

Հանքային մեկիորանտները տարբեր ազդեցություն են ունեցել սմբուկի բերքի քանակի և որակի վրա:

Երկու տարվա միջին տվյալներով, եթե ցեղիտի ազդեցության տակ սմբուկի բերքի քանակը ստուգիչի համեմատությամբ նվազել է 23,3 g/հա կամ 9,8 %-ով, ապա դացիտային տուֆի ազդեցությամբ ոչ միայն չի նվազել, այլ ստուգիչի համեմատությամբ հավելյալ բերքը կազմել է 84,9 g/հա կամ 35,8 % (աղյուսակ 1):

Աղյուսակ 1. Հանքային մեկիորանտների ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերի օգտագործման ազդեցությունը սմբուկի բերքի վրա (g/հա)

Փորձի տարբերակները		Ուսումնասիրության տարիները		2 տարվա միջինը	Բերքի հավելումը	
		2007 թ.	2008 թ.		g/հա	%
1.	Ստուգիչ	247,0	227,0	237,0	-	-
2.	Ցեղիտ 70 տ/հա	226,9	200,6	213,7	-23,3	-9,8
3.	Ցեղիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	312,8	282,7	297,7	60,7	25,6
4.	Ցեղիտ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	304,1	274,2	289,1	52,1	22,0
5.	Դացիտային տուֆ 70 տ/հա	341,8	302,0	321,9	84,9	35,8
6.	Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	416,9	377,0	396,9	159,9	67,5
7.	Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	408,0	360,0	384,0	147,0	62,0
Sx, %		0,4	0,7			
ԱէS _{0,95} , g		4,6	5,7			

Աղյուսակի տվյալներից պարզորոշ երևում է, որ հանքային մեկիորանտների ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերը էական ազդեցություն են թողել սմբուկի բերքի ավելացման վրա: Չնայաց նրան, որ ցեղիտի տարբերակում բերքը նվազել է, սակայն այդ նույն ֆոնի վրա գոմաղբն ու կենսահումուսը ավելացրել են սմբուկի բերքը և ֆոնի համեմատությամբ բերքի հավելումը համապատասխանաբար կազմել է 84,0 g/հա կամ 39,3 % և 75,4 g/հա կամ 35,3%:

Գոմաղբն ու կենսահումուսը դացիտային տուֆի հետ միասին ավելի բարձր արդյունք են ապահովել: Ըստ որում դացիտային տուֆի ֆոնի վրա կենսահումուս կիրառելիս բերքի հավելումը ցեղիտի տարբերակի համեմատությամբ կազմում է 94,9 g/հա կամ 32,8 %, իսկ գոմաղբ կիրառելիս՝ 99,2 g/հա կամ 33,3 %:

Մեր կարծիքով ցեղիտի և դացիտային տուֆի ազդեցության նման տարբերությունը բացատրվում է նրանով, որ ցեղիտները ընդամենը պարունակում են 0,12-0,23 % ընդհանուր ֆոսֆոր և 2,2-2,7 % ընդհանուր կալիում: Բացի այդ ցեղիտները, ունենալով միջավայրում հիմնային ռեակցիա առաջացնելու հատկություն, նպաստում են հողի հիմնայնության բարձրացմանը, որը անկասկած բացասաբար է անդրադարձել, ինչպես նախկինում մեր կողմից ուսումնասիրված կարտոֆիլի, լոլիկի և եգիպտացորենի, այնպես էլ այս դեպքում սմբուկի աճի, զարգացման և բերքի վրա:

Դացիտային տուֆի համեմատաբար դրական ազդեցությունը սմբուկի աճի, զարգացման և բերքատվության վրա, բացատրվում է նրանով, որ այս հանքատեսակում ընդհանուր կալիումի պարունակությունը հասնում է 10-12 %-ի: Այն միաժամանակ ունենալով բարձր ծակոտկենություն, կլանում և պահում է հողում եղած ավելորդ խոնավությունը և նրանում լուծված հանքային սննդատարրերը, վեգետացիայի ընթացքում աստիճանաբար մատակարարում բույսերին, որն էլ նպաստում է բերքատվության բարձրացմանը [7, 8, 9]:

Սմբուկի պտուղներում որոշվել են նաև նիտրատների պարունակությունը: Այդ նպատակով բոլոր երեք կրկնողությունների յուրաքանչյուր տարբերակից ընտրվել են 5-ական պտուղներ, որոշվել նիտրատների պարունակությունը և հաշվվել միջին տվյալները: Ինչպես ցույց են տալիս աղյուսակ 2-ի տվյալները, նիտրատների քանակությունը սմբուկի պտուղներում մեկ կգ հում զանգվածում եղել է թույլատրելի խտության սահմաններում՝ 118,7-142,5 մգ: Բաց գրուտներում աճեցրած սմբուկի պտուղներում նիտրատների պարունակության սահմանային թույլատրելի խտությունը կազմում է 150 մգ/կգ [3]: Չնայած օրգանական պարարտանյութերի ներգործությամբ սմբուկի պտուղներում որոշ չափով (12,1-24,3 մգ/կգ) ավելացել է նիտրատների պարունակությունը, բայց և այնպես այն բոլոր տարբերակներում գտնվում է թույլատրելի նորմաների սահմաններում:

Աղյուսակ 2. Հանքային մելիորանտների ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերի օգտագործման ազդեցությունը սմբուկի պտուղներում նիտրատների կուտակման վրա (մգ/կգ հում զանգվածում)

Փորձի տարբերակները	Ուսումնասիրության տարիները		2 տարիների միջինը
	2007 թ.	2008 թ.	
Ստուգիչ	127,0	109,4	118,2
Ցելիտ 70 տ/հա	124,4	109,5	133,9
Ցելիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	141,3	143,8	142,5
Ցելիտ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	136,8	139,0	137,9
Դացիտային տուֆ 70 տ/հա	125,2	112,3	118,7
Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	140,8	130,4	135,6
Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	137,7	122,8	130,2

Լաբորատոր հետազոտություններով ուսումնասիրվել է սմբուկի պտուղներում ծանր մետաղների կուտակման ինտենսիվությունը և պարզվել է, որ փորձի բոլոր տարբերակներում նվազել է ծանր մետաղների, հատկապես Cu-ի, Zn-ի և Mn-ի պարունակությունը, հատկապես բնական մելիորանտների հետ օրգանական պարարտանյութեր կիրառված տարբերակներում: Ըստ որում երկու տարվա միջին տվյալներով ստուգիչ տարբերակի համեմատությամբ Cu-ի քանակը նվազել է 2,5-3,0 մգ/կգ կամ 20,2-24,2 %-ով, Zn-ը՝ 1,9-2,6 մգ/կգ կամ 13,7-19,5 %-ով, Mn-ը՝ 1,2-1,5 մգ/կգ կամ 13,7-17,1 %-ով: Որոշ չափով նվազել է նաև Ni-ի պարունակությունը (0,5-0,8 մգ/կգ կամ 16,2-25,8 %), իսկ Pb-ի պարունակությունը էական փոփոխություն չի կրել (աղյուսակ 3):

Աղյուսակ 3. Հանքային մելիորանտների ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերի օգտագործման ազդեցությունը սմբուկի պտուղներում ծանր մետաղների կուտակման վրա (մգ/կգ չոր նյութում)

Փորձի տարբերակները	2 տարիների միջինը						
	Cu	Zn	Fe	Mn	Pb	Ni	Mo
1. Ստուգիչ	12,4	13,9	36,6	8,8	2,2	3,1	<0,2
2. Ցեղիտ 70 տ/հա	11,4	13,1	35,1	7,8	2,1	2,8	<0,2
3. Ցեղիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	9,9	12,0	33,7	7,3	2,0	2,6	<0,2
4. Ցեղիտ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	9,6	11,2	33,5	7,3	2,0	2,4	<0,2
5. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա	10,4	12,3	35,6	8,0	2,1	2,7	<0,2
6. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	9,8	11,7	35,1	7,6	2,0	2,5	<0,2
7. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	9,4	11,3	34,1	7,4	2,0	2,3	<0,2

Այսպիսով Արարատի տարածաշրջանի ցեմենտի գործարանի ցեմենտի փոշու ազդեցության առաջին գոտու հիմնային ռեակցիա ունեցող հողերում, միայն ցեղիտ կիրառելիս, այն որոշակի չափով բացասական է ազդել սմբուկի աճի, զարգացման ու բերքատվության վրա: Երկու տարվա միջին տվյալներով միայն ցեղիտ ստացած տարբերակում սմբուկի բերքը նվազել է 9,8 %-ով, որը բացատրվում է նրանով, որ ցեղիտը ունի հողի հիմնայնությունը բարձրացնելու հատկություն, բացի այդ նրանում P և K սննդատարրերը կամ բացակայում են կամ չնչին քանակությամբ են:

Դացիտային տուֆը, նույնիսկ առանց օրգանական պարարտանյութերի, միանգամայն դրական է ազդել սմբուկի աճի, զարգացման և բերքատվության բարձրացման վրա: Ստուգիչ տարբերակի համեմատությամբ բերքի հավելումը կազմել է 35,8 %: Վերջինս պայմանավորված է այդ մելիորանտում կալիումի բարձր պարունակությամբ (10-12 %), ինչպես նաև բարձր ծակոտկենության շնորհիվ հողային, օդային, ջրային ու սննդային ռեժիմների բարելավումով:

Հանքային մելիորանտների ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերի (գոմաղբ, կենսահումուս) կիրառումը դրական է ազդել սմբուկի բերքատվության բարձրացման վրա: Այդ տարբերակներում բերքի հավելումը կազմել է 52,1-159,9 g/հա կամ 22,0-67,5 %:

Ցածր բերրիություն ունեցող և ազոտով թույլ ապահովված հողերում գոմաղբի 40 տ/հա և կենսահումուսի 5 տ/հա չափաքանակների կիրառումը էականորեն չի բարձրացրել նիտրատների պարունակությունը սմբուկի պտուղներում: Փորձի բոլոր տարբերակներում նիտրատների պարունակությունը գտնվել է սահմանային թույլատրելի խտության (ՍԹԽ) շրջանակներում: Առավել վտանգավոր ծանր մետաղներով (Cu, Zn, Mn, Ni) աղտոտված հողերում կիրառված հանքային մելիորանտները և դրանց ֆոնի վրա օրգանական պարարտանյութերը սմբուկի պտուղներում 13,7-25,8 %-ով նվազեցրել են պղնձի, ցինկի, նիկելի և մանգանի ներթափանցումը, նպաստելով էկոլոգիապես մաքուր և մարդու առողջության համար անվտանգ սննդամթերքի ստացմանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Գալստյան Մ.Հ.* Գյուղ. գիտ. դոկտորի գիտակ. աստիճանի հայցմ. ատենախոսության սերմնագիր, Եր., 42 էջ, 2007:
2. *Երիցյան Ս.Կ., Գրիգորյան Գ.Հ., Բարթիկյան Պ.Ս., Երիցյան Լ.Ս.* Վերամշակված դաջիտային տուֆերի ազդեցությունը մշակաբույսերի բերքատվության բարձրացման և հողում ազոտի կորստի նվազեցման վրա, Գյուղ. գիտ. տեղեկագիր, № 7-9, էջ 272-279, 1993:
3. *Агроэкология (учебник под ред. В.А. Черникова)*, М.: «Колос», 536 с., 2000.
4. *Այրաпетյան Յ.Մ., Շիրинյան Ա.Վ.* Известия Арм. СХА, № 3, 11-14, 2005.
5. *Այրաпетյան Յ.Մ., Գալստյան Մ.Ա., Արությունյան Ս.Ս., Թամոյան Ս.Ժ.* Мат.-лы межд. науч. конференции «Экологические проблемы сельского хозяйства», Ереван, 145-151, 2008.
6. *Доспехов Б.А.* Методика полевых опытов, М.: «Колос», 415с., 1979.
7. *Ермолаев А.А.* Химия в сельском хозяйстве. № 5, с. 39-43. 1987.
8. *Мнацаканян А.Х., Петросов И.Х.* Известия АН СССР «Науки о земле», № 2, с. 19-37, 1983.
9. *Петросов И.Х., Джрбашян Р.Т., Мнацаканян А.Х.* Институт геологических наук НАН РА, Ереван, с. 163-169, 1999.
10. *Цхакая Н.Л. Квашам Н.Ф.* Японский опыт по использованию природных цеолитов, Тбилиси, с. 25-30, 1985.
11. *Яковлев Е.Н., Рубцов Л.М., Басистый В.П., Федоров А.А.* Использование природных цеолитов под полевые культуры на различных типах почв Дальнего Востока, Новосибирск, ч. I, с. 110-112, 1991.
12. *Torma St. Uroda*, № 1. p. 4-7, 1992.

Մտնագրվել է 18.05.2009



Биолог. журн. Армении, 3 (61), 2009

\

О СИНУСОИДАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ ПТИЦ

К.А. ДЖИВАНЯН¹, Н. В. АДАМЯН²

¹Ереванский госуниверситет,

²Гюмрийский государственный педагогический институт

В статье описываются некоторые субмикроскопические особенности эндотелиоцитов и звездчатых ретикулоцитов в печени домашних кур. В числе синусоидальных клеток выявлены и описаны также липоциты.

Печень - эндотелиоцит - купферовская клетка - липоцит

Հոդվածում նկարագրվում են տնային հավերի լյարդի էնդոթելային բջիջների և աստղաձև ռետիկուլոցիտների մի քանի ենթամանրադիտակային առանձնահատկությունները: Միուստիդային բջիջների թվում բացահայտվել և նկարագրվել են նաև լիպոցիտները:

Լյարդ - էնդոթելային բջիջ - Կուպֆերի բջիջ - լիպոցիտ

Some submicroscopic features of endotheliocytes and Kupffer cells in the liver of house hens are described. Lipocytes are also revealed and described among sinusoidal cells in the liver of hens in the article.

Liver – endotheliocytes - Kupffer cell -lipocyte

Печень, самая крупная пищеварительная железа, у всех позвоночных животных является центральной лабораторией организма и выполняет целый ряд важнейших функций, направленных на сохранение гомеостаза целого организма, включая антигенное постоянство его структур [1]. Свои многообразные функции печень выполняет благодаря сложнейшим взаимодействиям между паренхиматозными и стромальными клетками.

Популяции стромальных клеток печени условно объединены под названием “синусоидальные клетки”. У млекопитающих их количество равно примерно трети всего клеточного состава печени [2]. Обстоятельное описание клеточной композиции печеночного синусоида позволило в печени млекопитающих дифференцировать четыре вида клеток - эндотелиоциты, звездчатые ретикуло-эндотелиоциты (клетки фон Купфера), жиронакапливающие (липоциты) и особая разновидность синусоидных клеток, напоминающих естественные клетки-киллеры (НК-клетки) других локализаций. В литературе накопилось большое количество данных о роли названных клеток, обеспечивающих участие печени в иммунных реакциях

организма и регуляцию численности и пролиферативной активности гепатоцитов [3-7].

В нашу задачу входило методом электронномикроскопического исследования описать синусоидальные клетки печени одного из представителей класса птиц – домашней курицы.

Материал и методика. Работа была выполнена на 4-х петушках 5-6-месячного возраста. Образцы печени фиксировали в течение двух часов в 2,5 %-ном растворе глutarальдегида на 0,1 М какодилатном буфере pH 7,4, и далее в течение часа в 1 %-ном растворе четырехокси осмия на том же буфере. Обезвоживание производили в спиртах возрастающей концентрации и заливали в смесь аральдита и эпона 812, с использованием оксипропилена для улучшения и ускорения процесса пропитки. Ультратонкие срезы толщиной 50 нм готовили на ультрамикротоме LKB 8800A и после контрастирования по Рейнольдсу изучали и фотографировали в электронном микроскопе Тесла Bs 413A и Bs 500 при увеличении 5250, 10000 и 17000 х.

Результаты и обсуждение. Проведенные нами исследования позволили в числе синусоидальных клеток в печени домашних кур выявить и описать, помимо эндотелиоцитов, макрофаги и жиронакапливающие клетки.

Синусоидальные макрофаги (клетки Купфера) в печени домашних кур, также как у млекопитающих, имеют звездчатую форму (рис. 1).

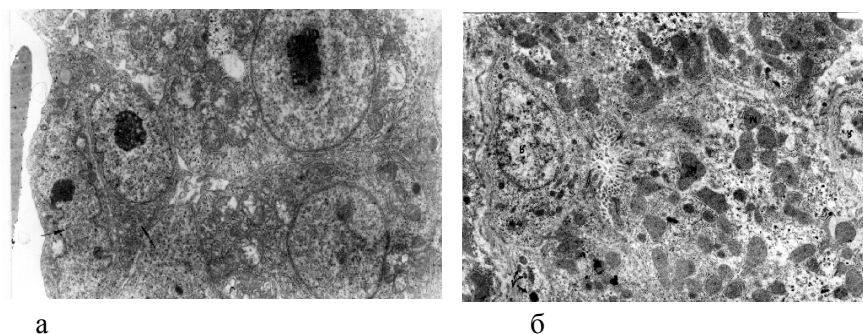


Рис.1. Эндотелиальная (справа) и купферовская (слева) клетки (а) и липоцит (б) в печени домашней курицы. Ув 10000 х.

Они располагаются между гепатоцитами и эндотелиальными клетками, снаружи охватывая последние. Червеобразные тела, впервые описанные в печени млекопитающих в работе [8], позволяют отличить звездчатые ретикулоциты от других клеточных форм. Они развиваются как трубчатые инвагинации плазматической мембраны, которые затем превращаются в перекрученные в цитоплазме тела со сложными ответвлениями. Устьем они выходят в межклеточное пространство. В макрофагах печени домашних кур червеобразные структуры малочисленны и неразветвлены. Купферовские клетки отличаются хорошо развитой зернистой эндоплазматической сетью, состоящей из плоских цистерн, с плотно расположенными рибосомами на поверхности. Митохондрии в клетках Купфера относительно мелкие, но кристы в них расположены довольно плотно.

Эндотелиоциты в стенках синусоидов печени домашних кур со своей ядродержащей частью вдаются в просвет синусоида (рис.1.а). В их цитоплазме обычно имеются 2-3 пиноцитозные вакуоли. Ядро эндотелиоцитов большое, светлое, агрегаты гетерохроматина небольшие, расположены главным образом под ядерной мембраной, в срез попадает обычно одно ядрышко. Ядерная мембрана эндотелиоцитов имеет множество зачатую глубоких инвагинаций. В перикарионе и цитоплазматических отростках эндотелиоцитов имеются расширенные цистерны шероховатой эндоплазматической сети, покрытые сплошным слоем рибосом, наблюдаются и другие клеточные органоиды: митохондрии, гладкая эндоплазматическая сеть, лизосомы, элементы цитоскелета.

Липоциты в печени кур имеют отростчатую форму (рис.1.б). Они локализируются под эндотелиальным барьером в пространстве Диссе. Ядра овальные или пирамидальной формы, редко – округлые. Ультраструктурным признаком липоцитов служат как многочисленные капли липидов, так и хорошо развитый комплекс Гольджи, что свидетельствует об активных процессах синтеза липидов в этих клетках. В цитоплазме липоцитов имеются многочисленные свободные рибосомы. Липоциты отличаются небольшим количеством митохондрий. Они мелкие, с небольшим количеством крист. Липидные включения не ограничены мембраной. Между каплями липидов в цитоплазме липоцитов бывают разбросаны гранулы гликогена.

Таким образом, эндотелиоциты, макрофаги и липоциты в печени кур по своим ультрамикроскопическим особенностям имеют сходство с одноименными клетками в печени млекопитающих. Однако материал и метод, которыми мы располагали, не позволили ответить на вопрос о наличии популяции натуральных киллеров среди непаренхиматозных клеток в печени домашних кур.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Маянский Д.Н.* Успехи совр. биологии, 112, 1, 100-114, 1992.
2. *Щеголев А.И., Мишнев О.Д.* Успехи соврем. биологии, 111, 1, 73-82, 1991.
3. *Lai H.S., Chen W.J., Chen K.M.* Nutrition, 12, 10, 700-705, 1996.
4. *Minagawa M., Oya H., Yamamoto S., Shimizu T., Bannai M., Kawamura H., Hatakeyama K., Abo T.* Hepatology, 31, 4, 907-915, 2000.
5. *Roggin K.K., Papa E.F., Kurkchubasche A.G., Tracy T.F.* J Surg Res. 90, 2, 166-173, 2000.
6. *Shiratori Y, Hongo S, Hikiba Y, Ohmura K, Nagura T, Okano K, Kamii K, Tanaka T, Komatsu Y, Ochiai T, Tsubouchi H, Omata M.* Dig Dis Sci. 41, 10, 1939-46, 1996.
7. *Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, Hagiya M, Okita K.* J. Gastroenterol., 35, 2, 112-119, 2000.
8. *Toro J., Ruzsa P., Rohtich P.* Exptl Cell Res. 26, 601. 1962.

Поступила 13.07.2009.