

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

2013



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

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

ԴԱՏՈՐ LXV, 2, 2013

ԴՅ ԳԱԱ «ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆ» ԻՐԱՏԱՐԱՎԱԶՈՒԹՅՈՒՆ

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

ԽՍՐԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

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

ԽՍՐԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Է.Տ. Գաբրիելյան, Մ.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան,
Վ.Պ. Հակոբյան, Կ.Գ. Ղարազյոզյան, Ս.Հ. Մովսիսյան, Կ.Ս. Պողոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան,
Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ռ.Ս. Արությունյան (*заместитель главного редактора*),
Ա.Ս. Բոյաճյան (*заместитель главного редактора*),
Ա.Գ. Եսայան (*ответственный секретарь*), Ջ.Ա. Վարդանյան, Գ.Ա. Գևորգյան,
Ս.Խ. Մայրապետյան, Ա.Ս. Մանվելյան, Ա.Ա. Թրչունյան

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Յ.Պ. Ակոպյան, Ջ.Ի. Ակոպյան, Յ.Տ. Ալեքսանյան, Յ.Գ. Աֆրիկյան,
Վ.Ս. Գաբրիելյան, Մ.Ա. Դավթյան, Կ.Գ. Կարազյոզյան, Ս.Օ. Մովսեսյան,
Լ.Լ. Օսիպյան, Գ.Ա. Փանոսյան, Կ.Ս. Պողոսյան.

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,
L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, A.H. Trchounian,
Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

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

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ•

Լադո Ղ.Յ., Գրիգորյան Ի.Է., Ֆրիդման Ա.Ս., Գալյուկ Ե.Ն., Դալյան Ե.Բ., Հարությունյան Ս.Գ. Դիֆերենցիալ սկանավորող կալորիմետրի միջոցով ԴՆԹ-ի հալման կորի որոշման սխալի գնահատումը.....	6
Արարատյան Լ.Ա., Ուսադյան Ռ.Յ., Սաֆրազբեկյան Է.Ա. Գետային ջրերի միկրոտարրերի կազմի ձևավորման մասին	13
Վարդանյան Ժ.Յ., Սարգսյան Մ.Վ. Սզնիների (<i>Crataegus</i> L.) գնահատումը, որպես ելակույթ Հայաստանի բուսաբանական այգիներում ինտրոդուկցիայի համար.....	19
Ադամյան Ն.Յու., Կարապետյան Մ.Ա., Սարգսյան Ն.Վ. Սպիտակ երեքնուկի (<i>Trifolium repens</i> L.) որպես հակահիպոքսիկ դեղաբույսի ազդեցությունը շնչառության վրա.....	27
Անտոնյան Ա.Պ. Եթիդիումի բրոմիդի կոմպլեքսների թթվային բնափոխումը.....	31
Սահակյան Գ.Վ., Պողոսյան Գ.Ա., Արծրունի Գ.Գ. Վերֆոնային լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի ազդեցությանը ենթարկված ոչ ցեղային սպիտակ առնետների երիթրոցիտների թաղանթների փոփոխությունները.....	36
Շամիրյան Ա.Ս., Բարսեղյան Է.Խ., Դավթյան Մ.Ա. Մի շարք Լ-ամինաթթուների ազդեցությունը հասուն <i>Rana ridibunda</i> գորտի լյարդի արգինազի պրոտեոլիտիկ ինակտիվացման պրոցեսի վրա.....	43
Նադասյան Է.Յ. Ջրածնի պերօքսիդը որպես սրտամկանի կծկողունակության վրա 43g մեխանիկական Տատանումների առաջացրած ազդեցության հնարավոր միջնորդակությամբ.....	47
Ադամյան Ռ.Գ. <i>Erodium sosnowskianum</i> Fed. (Geraniaceae) տեսակի ինքնուրույնության մասին.....	52
Սարգսյան Մ.Ա., Ավետիսյան Ա.Ա. ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնի Կենդանաբանության ինստիտուտի <i>Agriotes</i> Eschscholtz, 1829 ցեղի հավաքածուի վերաբերյալ.....	56
Գրիգորյան Վ.Վ. Ֆերմենտների ակտիվությունը որպես ծանր մետաղներով աղտոտված հողերի ինքնավերականգնման աստիճանի ցուցանիշ.....	61
Դյուկովա Կ.Գ., Իզմաիլյան Մ.Ս., Հալբերյան Ղ.Պ. <i>Pectobacterium carotovorum</i> ֆումարազի ֆունկցիոնալ բնութագրերը.....	65
Սարգսյան Մ.Ա., Մովսեսյան Յ.Ս., Ղազարյան Ն.Փ., Սարգսյան Ա.Մ., Ավագյան Ա.Մ. Ինվերտազի ակտիվությունը անտառային դարչնագույն հողեր բակտերիական միջատասպանների ներմուծումից հետո.....	71
Հարությունյան Թ.Վ. Սողեսների արյան մակաբույծներով վարակվածությունը կենսա- միջավայրից կախված.....	75
Առաքելյան Վ.Բ., Հարությունյան Մ.Վ., Անդրեասյան Վ.Կ. Մուլտիպլիկատիվ աղմուկի ինտենսիվության ազդեցությունը մակրոմոլեկուլների վրա լիզանզների ադսորբցիայի ստոխաստիկ պոտենցիալի վրա.....	80
Ղալլաբյան Մ.Վ., Եսոյան Մ.Ս., Մելյան Գ.Յ., Եսայան Ա.Յ., Հովհաննիսյան Ն.Ա. Հայկական խաղողի որոշ սորտերի միկրոսատելիտային մարկերների ուսումնասիրությունը Qiaxcel ԴՆԹ ֆրագմենտային անալիզատորի կիրառմամբ.....	85
Խաչատրյան Մ.Ժ. Մարդու կենցաղային գործունեության և անասնապահության ազդեցությունը շրջակա միջավայրի վրա Տավուշի մարզի օրինակով.....	90
Գրիգորյան Յ.Է. Պարարտանյութերի և ֆունգիցիդի համատեղ կիրառման ազդեցությունը դեղձենու բերքի հիմնական հատկանիշների վրա.....	95
Գևորգյան Է.Ս., Հովհաննիսյան Ա.Գ., Յավրոյան Ժ.Վ., Հակոբյան Ն.Ռ., Սարգսյան Է.Գ. Ցիտալատինի <i>in vivo</i> ազդեցությունը առնետի լյարդի և ուրցագեղձի կորիզա- թաղանթների չեզոք լիպիդների վրա.....	99
Գայբակյան Լ.Ղ. <i>Brevibacterium flavum</i> -ի ալանին: 2- կետոգլուտարատ ամինատրանս- ֆերազի որոշ հատկությունները.....	104
Հովսեփյան Ա.Յ., Մայրապետյան Խ.Ս., Պողոսյան Գ.Յ., Էրոյան Ս.Ա., Եղիազարյան Ա.Ս. Արևելյան կենսածառի (<i>Biota orientalis</i> Endl.) տնկիների աճեցման կենսատեխ- նոլոգիայի մշակումը բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում.....	110
Կարապետյան Զ.Ա. <i>Helicotylenchus</i> Steiner, 1945 սեռի ներկայացուցիչները Հայաստանում.....	114
• Համառոտ հաղորդումներ •	
Սթալլինգ Թ. <i>Myrmecophilus acervorum</i> (Panzer, [1799]) և <i>Myrmecophilus hirticaudus</i> Fischer von Waldheim, 1846 ճովի-մրջնասերների սոր գրանցումներ Հայաստանում.....	120
Նիկողոսյան Վ.Գ., Բաղդասարյան Ի.Բ. Ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսող համակեցությունների արդյունավետության պահպանման ուսումնասիրումը.....	123
Բաղդասյան Ա.Մ. Գալարմինի և Նրա նմանօրինակների ուղիղ հակաբակտերիալ ազդեցության ուսումնասիրումը սիբիրախտի բացիլների վրա <i>in vitro</i> պայմաններում.....	126

СОДЕРЖАНИЕ

•Экспериментальные и теоретические статьи•

Ландо Д.Ю., Григорян И.Э., Фридман А.С., Галюк Е.Н., Далян Е.Б., Арутюнян С.Г. Оценка ошибки в определении кривой плавления ДНК при использовании дифференциальной сканирующей калориметрии.....	6
Арапатьян Л.А., Ревазян Р.Г., Сафразбекян Э.А. К вопросу о формировании микроэлементного состава речных вод.....	13
Варданян Ж.А., Саркисян М.В. Боярышник (<i>Crataegus</i> L.) как исходный материал для интродукции в ботанических садах Армении.....	19
Адамян Н.Ю., Карапетян М.А., Саркисян Н.В. Влияние клевера лугового (<i>Trifolium repens</i> L.) на дыхание в условиях гипоксии.....	27
Антонян А.П. Кислотная денатурация комплексов бромистого этидия с ДНК.....	31
Саакян Г.В., Погосян Г.А., Арируни Г.Г. Изменения эритроцитарных мембран белых беспородных крыс, подвергшихся воздействию электростатического поля напряженностью выше фоновых	36
Шамирян А.С., Барсегян Э.Х., Давтян М.А. Влияние ряда L-аминокислот на процесс протеолитической инактивации аргиназы печени взрослых лягушек <i>Rana ridibunda</i>	43
Дадасян Э.О. Перекись водорода в качестве возможного посредника при воздействии 4 Гц механической вибрации на сократимость мышцы сердца.....	47
Адамян Р.Г. О самостоятельности вида <i>Erodium sosnowskianum</i> Fed. (<i>Geraniaceae</i>).....	52
Марджанян М.А., Аветисян А.А. К коллекции рода <i>Agriotes</i> Eschscholtz, 1829 (<i>Coleoptera</i> , <i>Elateridae</i> , <i>Elaterinae</i>) Института зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА.....	56
Григорян К.В. Активность ферментов как показатель самообновления почв, загрязненных тяжелыми металлами.....	61
Дюкова К.Г., Измаилян М.С., Алебян Г.П. Функциональные характеристики фумаразы <i>Pectobacterium carotovorum</i>	65
Саркисян М.А., Мовсесян А.С., Казарян Н.П., Саркисян А.М., Авакян А.М. Активность инвертазы после интродукции бактериальных инсектицидов в бурые лесные почвы	71
Арутюнян Т.К. Зараженность ящериц паразитами крови в зависимости от среды обитания.....	75
Аракелян В.Б., Арутюнян С.В., Андриасян В.К. Влияние интенсивности мультипликативного шума на стохастический потенциал при адсорбции лигандов на макромолекулах.....	80
Даллакян М.В., Есоян С.С., Мелян Г.Г., Есаян А.Г., Ованесян Н.А. Микросателлитное гено- типирование армянских сортов винограда с применением системы фрагмент- ного анализа ДНК Qiaxcel.....	85
Хачатрян С.Ж. Воздействие бытовой деятельности человека и скотоводства на окружающую среду на примере Тавушского марза.....	90
Григорян О.Э. Влияние совместного применения удобрений и фунгицида на основные показатели урожая персика.....	95
Геворгян Э.С., Оганесян А.Г., Явоян Ж.Ж., Акопян Н.Р., Саргсян Э.Г. <i>In vivo</i> воздействие цисплатина на состав нейтральных липидов печени и тимуса крыс.....	99
Гайбалян Л.Д. Некоторые свойства аланин: 2-кетоглутарат аминотрансферазы <i>Brevibacterium flavum</i>	104
Овсепян А.А., Майрапетян Х.С., Погосян Г.Ю., Элоян С.А., Егиазарян А.С. Разработка биотехнологии выращивания саженцев туи восточной (<i>Biota orientalis</i> Endl.) в условиях открытой гидропоники.....	110
Карапетян Дж.А. Представители рода <i>Helicotylenchus</i> Steiner, 1945 (<i>Nematoda</i> ; <i>Hoplolaividae</i>) в Армении.....	114

•Краткие сообщения•

Сталлинг Т. Новые находки сверчков-муравьелюбов <i>Myrmecophilus acervorum</i> (Panzer, [1799]) и <i>Myrmecophilus hirticaudus</i> Fischer von Waldheim, 1846 в Армении.....	120
Никогосян В.Г., Багдасарян И.Б. Изучение способности несимбиотических азотфиксирующих сообществ сохранять эффективность.....	123
Бадалян А.М. Исследование прямого антибактериального воздействия галармина и его аналогов на бактерии <i>Bacillus anthracis</i> в условиях <i>in vitro</i>	126

CONTENTS

•Experimental and theoretical articles•

<i>Lando D.Y., Grigoryan I.E., Fridman A.S., Galyuk E.N., Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G.</i> Evaluation of errors in determination of DNA melting curve registered with differential scanning calorimetry	6
<i>Araratyan L.A., Revazyan R.H., Safrazbekyan E.A.</i> To the issue of formation of microele- mental composition of river water	13
<i>Vardanyan Jh. H., Sargsyan M.V.</i> Evaluation of Hawthorns (<i>Crataegus</i> L.) as a starting material for introduction into the Botanical gardens of Armenia.....	19
<i>Adamyany N.Y., Karapetyan M.A., Sarkisyan N.V.</i> The Influence of <i>Trifolium repens</i> L. as an antihypoxic herb on respiration.....	27
<i>Antonyan A.P.</i> Acidic denaturation of complexes of DNA with ethidium bromide.....	31
<i>Sahakyan G.V., Poghosyan G.A., Artsruni G.G.</i> The changes of erythrocyte membranes of white outbreed rats exposed to electrostatic field with the tension exceeding the natural background.....	36
<i>Shamirian A.S., Barseghyan E.Kh., Davtyan M.A.</i> The effect of several L-amino acids on the inacti- vation process of <i>Rana Ridibunda</i> adult frog liver arginase.....	43
<i>Dadasyan E.H.</i> The Hydrogen peroxide as a possible messenger for 4Hz mechanical vibration treatment of heart muscle contractility.....	47
<i>Adamyany R.G.</i> About the independence of species <i>Erodium sosnowskianum</i> Fed. (Geraniaceae).....	52
<i>Marjanyan M.A., Avetisyan A.A.</i> On click-beetles of genus <i>Agriotes</i> Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Elaterinae) of collection of Institute of zoology of SCZH NAS RA.....	56
<i>Grigoryan K.V.</i> Enzyme activity as an indicator of the degree of self updating of soils contaminated with heavy metals.....	61
<i>Dyukova K.G., Izmailyan M.S., Halebyan G.P.</i> Functional characteristics of fumarase <i>Pectobacterium carotovorum</i>	65
<i>Sargsyan M.A., Movsesyan H.S., Ghazaryan N.P., Sargsyan A.M., Avagyan A.M.</i> The invertase activity after introduction of bacterial insecticides into brown forest soils	71
<i>Harutyunyan T.K.</i> Infection of reptiles by blood parasites depending on environmental conditions.....	75
<i>Arakelyan V.B., Harutyunyan S.V., Andriasyan V.K.</i> Influence of intensity multiplicative noise on stochastic potential of adsorption of ligands on macromolecules.....	80
<i>Dallakyan M.V., Yesoyan S.S., Melyan G.H., Yesayan A.H., Hovhannisyan N.A.</i> Armenian grape varieties SSR fingerprinting by using Qiaxcel DNA fragment analysis system.....	85
<i>Khachatryan S. Dj.</i> The influence of the household human activities and the cattle-breeding on the environment on example of Tavush marz.....	90
<i>Grigoryan H.E.</i> The influence of complex application of fertilizers and fungicide on basic indicators of peach yield.....	95
<i>Gevorgyan E.S., Hovhanisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R., Sargsyan E.G.</i> Cisplatin <i>in vivo</i> action on content of neutral lipids in rat liver and thymus nuclear membranes.....	99
<i>Gaybakyan L.D.</i> Some properties of alanine: 2 – ketoglutarate aminotransferases of <i>Brevibacterium</i> <i>flavum</i>	104
<i>Hovsepyan A.H., Mayrapetyan Kh.S., Poghosyan G.Y., Eloyan S.A., Eghiazaryan A.S.</i> Cultivation of biotechnology for growing of eastern thuja (<i>Biota orientalis</i> Endl.) saplings in open-air hydroponics.....	110
<i>Karapetyan J.A.</i> The representatives of the genus <i>Helicotylenchus</i> Steiner, 1945 (Nematoda; Hoplolaimidae) in Armenia	114
• Short communications •	
<i>Stalling Th.</i> First records of the ant-loving cricket <i>Myrmecophilus acervorum</i> (Panzer, [1799]) from Armenia and comments on <i>Myrmecophilus hirticaudus</i> Fischer von Waldheim, 1846 (Orthoptera: Myrmecophilidae)	120
<i>Nikogosyan V.G., Bagdasaryan I.B.</i> Study of the efficiency-keeping property of the communities of nitrogen-fixing azot-fixators.....	123
<i>Badalyan A.M.</i> Investigation of direct antibacterial activity of galarmin and its analogues on bacteria of <i>Bacillus anthracis in vitro</i>	126



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

EVALUATION OF ERRORS IN DETERMINATION OF DNA MELTING CURVE REGISTERED WITH DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

D.Y. LANDO¹, I.E. GRIGORYAN², A.S. FRIDMAN¹, E.N. GALYUK¹,
Y.B. DALYAN², S.G. HAROUTIUNIAN²

¹Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus
lando@iboch.bas-net.by

²Yerevan State University, Department of Molecular Physics
inessa.grigoryan@ysu.am

The differential scanning calorimetry (DSC) is more sensitive than UV absorption spectrophotometry as a tool for the measurement of DNA melting curves. The advantage of DSC is a direct determination of differential melting curves (DMC) obtained without numerical differentiation. However, the difference between the helix-coil transition enthalpies of AT and GC base pairs can cause distortions in the shape of melting curve. Up to date, the errors caused by those distortions were not evaluated. In this study, a simple procedure of recalculation of a calorimetric DMC into a real DMC is developed. It demonstrates that the "real" melting curve and differential melting curve deviate very slightly from the same two curves calculated from DSC data. The melting temperature and the temperature melting range are usually the same even if the difference in the enthalpies is several times higher than a real one.

Differential scanning calorimetry – high-resolution melting profiles – DNA plasmids – calf thymus DNA

ՂԱԹ-ի հալման կորերի ստացումը դիֆերենցիալ սկանավորող կալորիմետրի (ՂԱԿ) միջոցով ավելի ճշգրիտ է քան՝ ՈւՄ սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով: ՂԱԿ-ի առավելությունը կայանում է հալման դիֆերենցիալ կորերի (ՂԴԿ) ուղղակիորեն որոշման մեջ, առանց թվային դիֆերենցման: Այնուհանդերձ, ԱԹ և ԳՑ-հիմքերի զույգերի էնթալպիաների տարբերությունը կարող է հանգեցնել հալման կորի տեսքի խախտման: Մինչ օրս այդ տարբերությամբ պայմանավորված սխալանքի արժեքները որոշված չեն: Աշխատանքում առաջարկվում է կալորիմետրիկ ՂԴԿ – «իսկական» ՂԴԿ վերահաշվարկի ընթացք: Վերահաշվարկի կիրառումը ցույց է տվել, որ «իսկական» հալման կորը և հալման դիֆերենցիալ կորը աննշան են տարբերվում ՂԱԿ-ի տվյալներով որոշված նմանատիպ կորերից: Վերջինս ճիշտ է նաև հալման ջերմաստիճանի և հալման ջերմաստիճանային ինտերվալի համար նույնիսկ եթե ԱԹ և ԳՑ-հիմքերի զույգերի էնթալպիաների տարբերությունը մի քանի անգամ մեծ է իրական արժեքից:

Դիֆերենցիալ սկանավորող կալորիմետր – բարձր լուծողականության հալման պրոֆիլներ – պլազմիդային ՂԱԹ – հորթի ուրցագեղձի ՂԱԹ

Измерение кривых плавления ДНК методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) является более точным, чем при использовании УФ-спектрофотометрии. Преимуществом ДСК является прямое определение дифференциальных кривых плавления (ДКП), получаемых без численного дифференцирования. Тем не менее, разница в энтальпиях АТ и ГЦ-пар оснований может вызвать искажения в форме кривой плавления. До настоящего времени величины ошибки, вызванной этим различием, не было определено.

В этой работе предлагается простая процедура пересчета калориметрических ДКП в "истинные" ДКП. Ее применение показало, что "истинная" кривая плавления и дифферен-

циальная кривая плавления незначительно отличаются от аналогичных кривых, рассчитанных по данным ДСК.

Последнее справедливо для температуры плавления и температурного интервала плавления даже в случае, если разница в энтальпии АТ и ГЦ-пар в несколько раз выше ее реальной величины.

Дифференциальная сканирующая калориметрия – профили плавления высокого-разрешения – плазмидная ДНК – ДНК тимуса телянка

The differential scanning calorimetry (DSC) gives more accurate melting profiles than UV absorption spectrophotometry as a tool for the measurement of DNA melting. The advantage of DSC is a direct determination of differential melting curves (DMC) obtained from thermograms without numerical differentiation. However, there is a widely spread opinion that calorimetry has shortcomings that hinder exact determination of the melting curve, differential melting curve (DMC), melting temperature and temperature melting range. The most important of them is the difference between the helix coil-transition enthalpies of AT and GC base pairs. Because of lower enthalpy of AT base pairs, the low temperature part of calorimetric DMC that corresponds to melting of AT-rich regions is lower than real DMC that is the first temperature derivative of the fraction of melted base pairs (fig. 1A and 2). The high temperature part corresponding to melting of GC-rich regions is located above the real DMC. The calorimetric melting curve is shifted towards higher temperature (fig. 1B). At the same time, there is no exact evaluation of the distortion value caused by this effect.

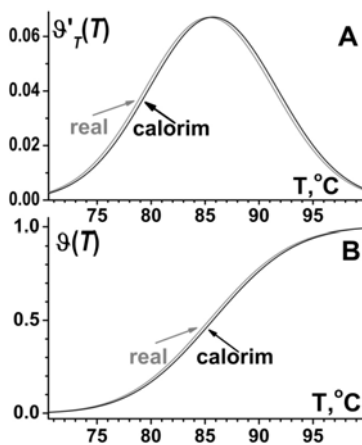


Fig. 1 A) Calorimetric differential melting curve (DMC) simulated with the Gaussian function characterized with the temperature melting interval $\Delta T=15^\circ\text{C}$ and the results of its recalculation into the real DMC for $H_{AT}=8500\text{ cal}/(\text{mol bp})$, $H_{GC}=12500\text{ cal}/(\text{mol bp})$. **B)** Calorimetric and real melting curves, which correspond with the differential melting curves depicted in fig. 1A.

As the differential scanning calorimetry, the UV registration of DNA absorption also does not directly measure the fraction of melted base pairs, and various methods are required to escape experimental errors [1-3]. However, the contribution to the total change of absorbance is approximately the same for AT and GC base pairs at $\lambda=270\text{ nm}$ [1, 2].

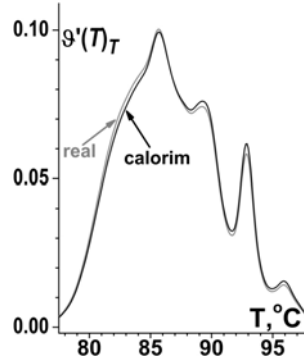


Fig. 2 Calorimetric DMC for calf thymus DNA and results of its recalculation into the real DMC for $H_{AT}=8500$ cal/(mol bp), $H_{GC}=12500$ cal/(mol bp).

In this study, a simple procedure of recalculation of a calorimetric DMC into a "real" DMC is proposed. Its use demonstrates that the method of differential scanning calorimetry causes negligible error in the determination of the melting curve, differential melting curve (DMC), melting temperature and temperature melting range.

Materials and methods. Ultra pure calf thymus DNA was used (protein<0.1%, RNA<0.1%, molecular mass ~30 MDa). The properties of this DNA have been previously described [6]. High-resolution melting profiles were obtained using a model of differential scanning microcalorimeter DASM 4 (Biopribor, Russia) with a cell volume 0,5 ml. In the DSC experiments, we followed standard procedures [9]. The melting was carried in 0,1 M NaCl, 5 mM Na_2CO_3 , 0,05 mM EDTA, pH 7.

In this study, the first derivative of the temperature dependence of the fraction of melted base pairs is called a "real differential melting curve" ($g'_T(T)$) to distinguish it from the calorimetric differential melting curve ($g'_{cT}(T)$) obtained from thermograms by subtraction of buffer baseline, sample baseline and normalization. The calorimetric melting curve $g_c(T)$ is calculated by integration of the calorimetric differential melting curve $g'_{cT}(T)$, i.e., it is the temperature dependence of heat absorption normalized to the total heat absorption caused by the DNA helix-coil transition. Both calorimetric dependences can be expressed through the additional heat capacity caused by the helix-coil transition ($\Delta C_p(T)$):

$$g'_{cT}(T) = \Delta C_p(T) / \int_{T_s}^{T_e} \Delta C_p(t) dt \quad (1),$$

$$g_c(T) = \int_{T_s}^T g'_{cT}(t) dt = \int_{T_s}^T \Delta C_p(t) dt / \int_{T_s}^{T_e} \Delta C_p(t) dt = H(T) / \bar{H} \quad (2)$$

where T_s and T_e are the start and end of the temperature interval of the DNA helix-coil transition, $H(T)$ is the heat absorption at a given temperature and $\bar{H}$ is the total heat absorption caused by the DNA helix-coil transition that is equal to its enthalpy.

Real melting temperature (T_m) and calorimetric melting temperature (T_{mc}) correspond to the half of melted base pairs and to the half of additional heat absorption caused by the helix-coil transition, respectively. The temperature melting range for both cases ($\Delta T = 1/g'_T(T_m)$ and $\Delta T_c = 1/g'_{cT}(T_{mc})$) were determined as the inverse of the real or calorimetric DMC at melting temperature.

The study was carried out for calf thymus DNA, EcoRI-cut pBR322 DNA, and two calorimetric DMC curves simulated with the Gaussian function. The latter curves correspond to low and high DNA heterogeneity with the temperature melting range $\Delta T=3$ or 15°C , respectively. The two values of the difference in enthalpies of GC and AT base pairs were considered: 1.1 and 4 kcal per mole of base pairs. The first value is used in different studies [10], and is closer to the experiment carried out for natural DNAs of various GC content [5]. The second difference occurs between enthalpies of the most [GC (CG)] and the least [TA (AT)] stable duplets of the nearest neighbors of base pairs [1]. It is the highest possible limit of the enthalpy difference.

The set of the thermodynamic parameters corresponding to the low (1.1 kcal) enthalpy difference is the following: $T_{AT}=65,2^\circ\text{C}$, $T_{GC}=107,8^\circ\text{C}$, $H_{AT}=8.4$ kcal/(mol bp), $H_{GC}=9.5$ kcal/(mol bp), $S_{AT}=S_{GC}=24.8$ cal/(mol bp·K⁻¹) [10]. It corresponds to case of entropies that are equal for AT and GC base pairs. The second set was used as an illustration of the extreme case of a very high difference in enthalpies (4 kcal/(mol bp)): $T_{AT}=65,2^\circ\text{C}$, $T_{GC}=107,8^\circ\text{C}$, $H_{AT}=8,5$ kcal/(mol bp), $H_{GC}=12,5$ kcal/(mol bp), $S_{AT}=25,12$ cal/(mol·bp·K⁻¹), $S_{GC}=32.81$ cal/(mol bp·K⁻¹).

For EcoRI-cut pBR322 DNA, the Poland-Fixman-Freire approach [8, 9] was used for direct calculation of real and calorimetric DMC for both sets of parameters. Then the method of recalculation developed in this study was applied to obtain a real DMC from a calorimetric one. Both approaches give very close real melting curves.

Results and Discussion.

Calculation of real melting curve from calorimetric melting curve.

Let the temperature T_l correspond to the melting out of the DNA regions with the average GC composition x_l . At that temperature, the majority of regions with $x < x_l$ are almost fully melted. If $x > x_l$, the regions are almost fully helical. It is obvious that

$$x_l = (T_l - T_{AT}) / (T_{GC} - T_{AT}) \quad (3)$$

The average per base pair enthalpy for those regions ($H_l(T_l)$) is given by Eq.(4):

$$H_l(T_l) = (1 - x_l) \cdot H_{AT} + x_l \cdot H_{GC} = H_{AT} + x_l (H_{GC} - H_{AT}) \quad (4)$$

$H_l(T_l)$ can be represented in the following way:

$$H_l(T_l) = H_{AT} + \frac{T_l - T_{AT}}{T_{GC} - T_{AT}} \cdot (H_{GC} - H_{AT}) \quad (5)$$

Using $H_l(T_l)$, one can obtain the heat absorption at a given temperature ($H(T)$) and the total heat absorption (average enthalpy) caused by the DNA helix-coil transition ($\bar{H}$), and then calculate calorimetric melting curve as $\vartheta_c(T) = H(T) / \bar{H}$. Let us represent Eq.(5) in the following way:

$$H_l(T_l) = A + B \cdot T_l \quad (6)$$

where

$$A = (T_{GC} \cdot H_{AT} - T_{AT} \cdot H_{GC}) / (T_{GC} - T_{AT}) \quad (7)$$

$$B = (H_{GC} - H_{AT}) / (T_{GC} - T_{AT}) \quad (8)$$

Then the additional heat absorption that is caused by partial helix-coil transition under heating to temperature T is given by Eq.(9):

$$H(T) = \int_{T_s}^T H_l(t) \cdot \mathcal{G}'_l(t) \cdot dt = A \cdot \mathcal{G}(T) + B \cdot \int_{T_s}^T t \cdot \mathcal{G}'_l(t) \cdot dt \quad (9)$$

If $T \geq T_e$ (i.e., for full DNA melting), $H(T)$ is equal to the average per base pair enthalpy ($\bar{H}$):

$$\bar{H} = H(T_e) = A + B\bar{T} \quad (10)$$

where

$$\bar{T} = \int_{T_s}^{T_e} t \cdot \mathcal{G}'_t(t) \cdot dt \quad (11)$$

The calorimetric melting curve, which is the temperature dependence of the fraction of heat absorption caused by the helix-coil transition, can be represented in the following way:

$$\mathcal{G}_c(T) = H(T) / \bar{H} = [A \cdot \mathcal{G}(T) + B \cdot \int_{T_s}^T t \cdot \mathcal{G}'_t(t) \cdot dt] / (A + B\bar{T}) \quad (12)$$

Differentiating Eq.(12), calorimetric DMC can be expressed in terms of real DMC (Eq.(13)):

$$\mathcal{G}'_{cT}(T) = [(A + B \cdot T) / (A + B\bar{T})] \cdot \mathcal{G}'_T(T) \quad (13)$$

For our study, it is more required to obtain an expression for real DMC ($\mathcal{G}'_T(T)$) in terms of calorimetric DMC ($\mathcal{G}'_{cT}(T)$):

$$\mathcal{G}'_T(T) = [(A + B \cdot \bar{T}) / (A + B \cdot T)] \cdot \mathcal{G}'_{cT}(T) \quad (14)$$

The expression for $\mathcal{G}'_T(T)$ includes $\bar{T}$ that can be found from experimental function $\mathcal{G}'_{cT}(T)$ by the following transformation of Eq.(14):

$$\mathcal{G}'_{cT}(T) / (A + B \cdot T) = \mathcal{G}'_T(T) / (A + B \cdot \bar{T}) \quad (15)$$

Then both parts are integrated with respect to T between T_s to T_e . As a result, one obtains Eq.(16) for $\bar{T}$:

$$\bar{T} = (C^{-1} - A) / B \quad (16)$$

where A and B are given by Eqs. (7),(8) and

$$C = \int_{T_s}^{T_e} [\mathcal{G}'_{cT}(t) / (A + B \cdot t)] \cdot dt \quad (17)$$

Thus, Eqs.(14), (16), (17) give $\mathcal{G}'_T(T)$ in terms of $\mathcal{G}'_{cT}(T)$.

Results of calculation. As follows from Eq. (14), calorimetric DMC is located lower than real DMC at $T < \bar{T}$ and higher at $T > \bar{T}$. It is well seen from fig. 1A and 2. It is also obvious that a stronger difference of a calorimetric melting curve from the corresponding real melting curve occurs for a larger temperature melting range.

Recalculation of experimental calorimetric curve $\mathcal{G}'_c(T)$ into a real one $\mathcal{G}'_T(T)$ using Eqs.(14), (16), (17) was carried out for experimental DSC curve of calf thymus DNA and DSC curves simulated with the Gaussian function. Additionally, the same expressions were used for recalculation of calorimetric melting curve computed for of EcoRI-cut pBR322 DNA into a real one. The melting temperature and temperature melting range were also determined for all types of curves.

If the difference in enthalpy is equal to the value obtained for DNA with different GC content [5, 10], i.e., ~ 1 kcal per mole of base pairs, then the calorimetric curves ($\mathcal{G}_c$, $\mathcal{G}'_{cT}$) and real curves ($\mathcal{G}$, $\mathcal{G}'_T$) are very close in all considered cases (results of calculation are not shown). The difference in melting temperature and melting range for two types of curves also does not exceed 0.1°C . Unfortunately, the exact dependence of enthalpy on GC content, similar to that was obtained for melting temperature [1], has not been determined directly. Therefore we have done computation for a possible highest difference between enthalpies of AT and GC base pairs. Calorimetric melting studies of the heteropolymeric poly[d(AT)]-poly[d(AT)], poly[d(AC)]-poly[d(GT)], and poly[d(GC)]-poly[d(GC)] duplexes and the homopolymeric poly[d(A)]-poly[d(T)] duplex demonstrate that the maximal difference in enthalpies of AT and GC base pairs can not be higher 4 kcal per mole of base pairs [3]. The same difference occurs for enthalpies of the most GC (CG) and least TA (AT) stable nearest neighbors of base pairs [1]. However, the maximal difference between all other nearest neighbors is reliably less than 2 kcal per mole of base pairs [1], and the last value also exceeds the upper limit of the average difference between GC and AT-base pairs.

Our calculation demonstrates that the calorimetric and real curves are also very close for EcoRI-cut pBR322 DNA and for the Gaussian curve with $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ even in the case of these high 4 kcal difference (the results are not shown). As follows from these results and Eq.(13), high deviation between real and calorimetric melting curves can take place only when both the temperature melting range and the difference in the enthalpy of AT and GC base pairs are high. Therefore the difference between calorimetric and real curves (fig. 1 and 2) is seen only for the calorimetric DMC curve simulated with the Gaussian function characterized with a large temperature melting range ($\Delta T = 15^\circ\text{C}$, fig. 1) and for DNA from calf thymus ($\Delta T = 10.6^\circ\text{C}$, fig. 2). Because of lower enthalpy of AT base pairs, the low temperature part of calorimetric DMC that corresponds to melting of AT-rich regions is lower than real DMC (fig. 1A and 2). The high temperature part corresponding to melting of GC-rich regions is located above the real DMC. As follows from the fig. 1B, calorimetric melting curve is always shifted towards higher temperatures. However, the difference in melting temperature is less than 0.3°C . The difference in the temperature melting range measured for calorimetric and real melting curves is less than 0.05°C . However, it should be pointed that the real difference in enthalpies is 2-4 times less than the value of 4 kcal taken for demonstration of the enthalpy effect. The average value 1.1 kcal is rather closer to the real difference [5, 10] than the extreme case of 4 kcal difference. Therefore, a deviation of calorimetric curves from real ones is much lower than that demonstrated in the fig. 1 and 2.

Thus, the results of our work demonstrate that melting curve calculated as a relative heat absorbance caused by DNA helix-coil transition $\mathcal{G}_c(T)$ is very close to the fraction of melted base pairs $\mathcal{G}(T)$ and can be used without any recalculation. The closeness of the differential melting curves, melting temperatures and temperature melting ranges is also demonstrated.

Acknowledgements: This work was supported by Belarusian-Armenian grant 11RB-017 and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research X13-068.

REFERENCES

1. Blake R.D. and Hydorn T.G. Spectral analysis for base composition of DNA undergoing melting. J Biochem Biophys Methods., 11, 6, 307-316, 1985.

2. *Blake R.D., Delcourt S.G.* Electrostatic forces at helix-coil boundaries in DNA. *Biopolymers*, 29, 2, 393-405, 1990.
3. *Chalikian T.V., Volker J., Plum G.E., Breslauer K.J.* A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: A characterization by calorimetric and volumetric techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7853-7858, 1999.
4. *Fixman M. and Freire J.J.* Theory of DNA melting curves. *Biopolymers*, 6, 12, 2693-2704, 1977.
5. *Karapetian A.T., Vardevanian P.O., Frank-Kamenetskii M.D.* Enthalpy of Helix-Coil Transition of DNA: Dependence on Na⁺ Concentration and GC-Content. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 8, 1, 131-138, 1990.
6. *Lando D.Y., Egorova V.P., Krot V.I., Akhrem A.A.* Determination of protein contaminants in DNA preparations of high purity. *Molec. Biol.*, 30, 3, 701-706, 1996.
7. *Poland D.* Recursion relation generation of probability profiles for specific-sequence macromolecules with long-range correlation. *Biopolymers*, 13, 9, 1859-1871, 1974.
8. *Vardevanyan P.O., Karapetyan A.T., Terzikyan G.A., Vardapetyan R.R., Danielyan E.A.* Differential melting curves of DNA: Reliability of extrema. *Biopolymers and Cell.*, 6, 4, 48-51, 1990.
9. *Volker J., Blake R.D., Delcourt S.G., Breslauer K.J.* High-Resolution Calorimetric and Optical Melting Profiles of DNA Plasmids: Resolving Contributions from Intrinsic Melting Domains and Specifically Designed Inserts. *Biopolymers.*, 50, 3, 303-318, 1999.
10. *Wartell R.M. and Benight A.S.* Thermal denaturation of DNA molecules: a comparison of theory with experiment. *Physics Reports.*, 126, 2, 67-107, 1985.

Received on 17. 01.2013

095913417



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

К ВОПРОСУ О ФОРМИРОВАНИИ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА РЕЧНЫХ ВОД

Л.А. АРАРАТЯН, Р.Г. РЕВАЗЯН, Э.А. САФРАЗБЕКЯН

Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА
levon.araratyan@gmail.com

Исследовались инфильтрационные воды альпийского и луго степного поясов и воды реки Амберд. Ранняя и бессистемная пастьба привела к эрозии почв и деградации указанных экосистем и сказалась на миграции тяжелых металлов (ТМ). Выявлено, что наиболее стабильны по расположению в геохимических рядах Fe, Mn, Zn (первые места) и Pb, Mo (последние места), а также Cu. Установлено, что речные воды наследуют многие показатели инфильтрационных вод: расположение ТМ в геохимических рядах, превышение тяжелыми металлами ПДК во всех исследуемых водах по одним и тем же элементам, соотношение форм ТМ.

Горные экосистемы – лизиметрические и речные воды – тяжелые металлы (ТМ) – водорастворимые и связанные формы – трансформация

Հետազոտվել են ալպյան ու մարգագետնատափաստանային գոտիների ինֆիլտրացիոն ջրերը և Ամբերդ գետի ջուրը: Վաղ և անկասկած արածեցումը հանգեցրին հողերի էրոզիային ու նշված էկոհամակարգերի դեգրադացմանը և արտահայտվել են ծանր մետաղների (ԾՄ) միգրացիայի վրա: Պարզվել է, որ ըստ իրենց տեղի երկրաքիմիական շարքերում առավել կայուն են Fe, Mn, Zn (առաջին տեղերում), Pb, Mo (վերջին տեղերում) և Cu: Հայտնաբերվել է, որ գետի ջրերը ժառանգում են ինֆիլտրացիոն ջրերի ցուցանիշները՝ ԾՄ տեղադրումը երկրաքիմիական շարքերում, նրանց գերազանցումը ՍԹԿ-ն բոլոր հետազոտված ջրերում՝ միևնույն տարրերի նկատմամբ, ԾՄ ձևերի հարաբերությունը:

Լեռնային էկոհամակարգեր – լիզիմետրիկ և գետի ջրեր – ծանր մետաղներ (ԾՄ) – ջրալույծ և կապված ձևեր – տրանսֆորմացիա

Infiltration waters of alpine and meadow-steppe belts and waters of Amberd River were studied. Early-scheduled and unregulated grazing has led to soil erosion and degradation of the noted ecosystems and has impacted migration of heavy metals as well. As indicated, the most stable in respect to their position in geochemical series are Fe, Mn, Zn (first positions) and Pb, Mo (final positions) as well as Cu. It is established that river waters inherit a number of indices of infiltration waters, namely, heavy metals position in geochemical series, heavy metals excesses vs. MAC values in all the studied waters in respect to the same elements as well as relations between forms of heavy metals.

Mountain ecosystems – lizimetric and river waters – heavy metals (HM) – water-soluble and bound forms – transformation

В связи с ростом населения, развитием техники и увеличением количества транспортных средств загрязнение природной среды получило еще большее распространение, и потому в настоящее время много внимания уделяется проблемам его

зайственных животных, приведший к стоптанности почв и оголению почвенного покрова, в результате чего они оказались в состоянии деградации [1]: усилились процессы эрозии, уменьшилось содержание гумуса, упало плодородие почв и снизилась урожайность столь важных для республики сенокосов и пастбищ. В результате нарушился также естественный ход процессов миграции химических элементов: уменьшение урожайности растений привело к снижению потребления растениями питательных элементов, что создало их избыток в почве и инфильтрационных водах и увеличило вымывание их и загрязнение грунтовых и речных вод, служащих одним из основных важнейших ирригационных источников в республике.

Целью наших исследований было определить микроэлементный состав почвенных (инфильтрационных) и речных вод высокогорных экосистем Арагацкого горного массива, установить их трансформацию при переходе от более высокогорных положенных по вертикальной поясности экосистем к нижележащим и далее к речной воде для выявления закономерностей изменения транзитных потоков ТМ, являющихся также важным связующим звеном между экосистемами. В исследованиях охвачены не только валовые и связанные формы микроэлементов, служащие их запасным фондом в почве, но и водорастворимые формы ТМ, поскольку именно они, являясь наиболее подвижными, в конечном счете определяют состояние экосистем.

Исследование процессов формирования микроэлементного состава речных вод будет способствовать пониманию трансформации транзитных потоков тяжелых металлов, начиная с альпийского пояса, где инфильтрационные (лизиметрические) воды составляют начальный цикл их формирования (исток реки) и далее – сверху вниз по вертикальной поясности, что будет способствовать разработке мероприятий по устранению процессов деградации и восстановлению нарушенного равновесия экосистем.

Материал и методика. Исследования проводились в Арагацком горном массиве, в условиях распространения горно-луговых (альпийский пояс, 3250 м н.у.м.) и луговостепных (луговостепной пояс, Амберд, 2085, 1567 м н.у.м.) почв. Для луговостепных и горнолуговых почв характерны высокое содержание гумуса и кислая реакция [3], которые являются одним из главнейших факторов воздействия на миграцию ТМ. Для получения инфильтрационных вод использовались лизиметрические установки, поставленные в указанных пунктах; образцы лизиметрических вод с исследуемых почв брались с глубины 0-10 и 0-50 см. Содержание тяжелых металлов определялось атомно-абсорбционным методом.

Результаты и обсуждение. Формирование речных вод начинается с атмосферных осадков, что обсуждалось нами ранее [2]. Дальнейший ход потока ТМ с инфильтрационными водами через их вертикальный сток проходит через почвенный слой исследуемых нами экосистем, претерпевая ряд трансформаций при взаимодействии с органическим веществом почвы и его минеральным поглощающим комплексом; к примеру, установлено, что если в атмосферных осадках исследуемые металлы находятся в катионной форме, то “при взаимодействии с почвенными элементами образуются отрицательно заряженные комплексные соединения металлов с различными фракциями органического вещества, что существенно меняет характер их миграционной способности по почвенному профилю” [4]. В итоге формируется речной поток (или водный бассейн) с определенным химическим составом, зависящим от экологического состояния вышерасположенных экосистем.

В табл. 1 и 2 приведены полученные нами данные о содержании ТМ в лизиметрических и речной водах исследуемых экосистем массива г. Арагац. Данные показывают, что содержание ТМ в лизиметрических водах по годам может колебаться в широких пределах, что обусловлено как климатическими условиями, так и сроками взятия образцов [2].

Табл. 1. Содержание ТМ в лизиметрической воде по профилю г. Арагац, мкг/л

Пункт	Год	Глубина, см	Тип обр.	Fe	Cu	Mn	Mo	Ni	Cr	Zn	Pb
Арагац, 3250 м	2007	0 - 10	взвесь	1700	20	500	12.0	50	17	100	8.0
		0 - 50		330	11	240	7.0	12	33	33	19
		0 - 10	сухой ост.	580	36	180	89	31	22	130	3.1
		0 - 50		520	9	260	н/о	6.0	4.0	7.0	3.0
		0 - 10	вал.	2280	56	680	101	81	39	230	11
		0 - 50		850	20	500	7.0	18	73	40	2.2
	2009	0 - 10	вал.	100	4.5	6.0	н/о	1.3	н/о	30	0.88
		0 - 50		41	3.0	6.0	н/о	0.82	н/о	13	0.53
Амберд, 2085 м	2007	0-10	взвесь	480	12	120	0.72	1.0	6.0	14	24
			сухой ост.	1200	22	650	н/о	22	17	35	17
			вал.	1680	34	770	0.72	230	23.0	49	41
	2009	0 - 10	вал.	390	9.0	8.6	н/о	0.82	1.6	64	1.0
		0 - 50	вал.	580	9.1	18.0	н/о	1.2	7.1	160	5.2
				ПДК ТМ для вод (мкг/л) [5]				500	10	100	250

Табл. 2. Содержание ТМ в речной воде массива г.Арагац, мкг/л

Пункт	Высота абс., м	Дата взятия обр.	Тип обр.	Fe	Cu	Mn	Mo	Ni	Cr	Zn	Pb
р. Амберд	1567	1.08.07г	взвесь	880	17	55	3.3	22	8.8	33	5.5
			сух.ост.	580	6.9	46	1.2	8.0	3.5	8.0	5.8
			вал.	1460	23.9	101	4.5	30.0	12.3	41.0	11.3
		16.7.08г	вал.	96	4.0	4.7	н/о	1.6	0.42	13.5	0.75
		20.10.08г	вал.	22	3.3	8.9	0.13	0.90	0.88	20.0	0.44
	Пункт 1 Пункт 2	28.07.09г	вал.	15.5	12.0	6.0	н/о	0.15	н/о	13.5	0.55
			вал.	17.5	1.1	6.3	н/о	0.28	н/о	6.3	0.61

Ниже приведены геохимические ряды ТМ, составленные по величине их содержаний в лизиметрических и речной водах.

Альпийский пояс

1. Fe > Mn > Zn > Ni > Cu > Cr > Mo > Pb - 0-10 см, связанная форма (взвесь)
2. Fe > Mn > Zn = Cr > Pb > Cu > Ni > Mo - 0-50 см, “ – “
3. Fe > Mn > Zn > Mo > Cu > Ni > Cr > Pb - 0-10 см, водорастворимая форма (лизиметрический фильтрат)
4. Fe > Mn > Cr > Zn > Cu > Ni > Mo > Pb - 0-50 см, “ – “

Лугостепной пояс

5. Fe > Mn > Pb > Zn > Cu > Cr > Ni > Mo - 0-10 см, связанная форма (взвесь)
6. Fe > Mn > Zn > Cu = Ni > Cr = Pb > Mo - 0-10 см, водорастворимая форма (фильтрат)

р. Амберд

7. Fe > Mn > Zn > Ni > Cu > Cr > Pb > Mo - связанная форма (взвесь)
8. Fe > Mn > Zn = Ni > Cu > Pb > Cr > Mo - водорастворимая форма (фильтрат)

Нетрудно заметить, что содержание Fe, Mn и Zn соответственно их распространенности в природе находится в основном в первых рядах; Zn лишь в 2 случаях уступает свое место, переходя на соседнее, 4-е место. По той же причине конечные места в рядах занимают Mo и Pb (в основном 6-8 места). Кроме того, обладая большим ионным радиусом, а также вследствие своего малого содержания они труднее переходят в раствор, при этом для Mo большую роль играет также то обстоятельство, что он сильнее связывается почвенным поглощающим комплексом при кислой реакции почв (которая свойственна для горно-луговых, а также лугово-степных почв) [6].

Стабильно расположение меди в указанных рядах: в 6 случаях он занимает 6-е место и лишь в 2 случаях опускается или поднимается на одно место. Наибольшим изменениям в расположении в геохимических рядах подвержены Cr – 3-7 и Ni – 4-7 места.

Если теперь рассмотрим какие элементы подвержены наибольшим изменениям местоположения в геохимических рядах в лизиметрических растворах, взятых с разной глубины, то увидим, что в альпийском поясе свинец перешел с последнего места, где он был в рядах для слоя 0-10 см, на 4-е место – в слое 0-50 см (прочносвязанная форма); для водорастворимой формы в том же поясе примерно такие же большие переходы в геохимических рядах отмечаются по хрому и молибдену. Наибольшая разница в расположении в геохимических рядах между различными формами ТМ в лизиметрическом растворе, взятом с одной и той же глубины, наблюдается по молибдену (слой 0-10 см) и свинцу (0-50 см).

В лугостепном поясе наибольшая разница в рядах между обеими формами также наблюдается по свинцу.

Для речной воды наблюдается почти полное сходство геохимических рядов ТМ обеих форм.

Ниже приводятся геохимические ряды валовых содержаний ТМ в лизиметрической и речной водах, составленные по их среднегодовым значениям.

1. Альпийский пояс: Fe > Mn > Cr > Zn > Cu > Ni > Mo > Pb - 0-50 см
2. Лугостепной пояс: Fe > Zn > Mn > Cu > Cr > Pb > Ni > Mo - 0-50 см
3. р. Амберд: Fe > Mn > Zn > Cu > Ni > Cr = Pb > Mo

Данные показывают, что наибольшая разница в расположении валовых содержаний ТМ в геохимических рядах – для лизиметрических вод разных поясов и в воде р. Амберд наблюдается по хрому, причем примечательно, что Cr по мере перехода вниз по вертикальной поясности к р. Амберд, с 3-го места в альпийском поясе переходит на 5-е (в лугостепном поясе) и далее на 6-е – в речной воде, т.е. происходит его постепенное связывание почвенным сложением в основном, гумусом и почвенным поглощающим комплексом. Колебания в расположении ТМ в геохимических рядах по остальным элементам небольшие (одно – два места).

На рис.1 приведено относительное содержание связанной во взвеси и водорастворимой форм ТМ в лизиметрической и речной водах массива Арагац. Нетрудно заметить, что в альпийском поясе относительное содержание связанной формы для слоя 0-10 см (А) колеблется по разным элементам в пределах 12-73%, составляя в среднем около 50%. Наиболее высоко относительное содержание связанной формы отмечены по железу, марганцу и цинку, а наиболее низкое – по молибдену и меди. В лизиметрических растворах, прошедших через слой 0-50 см, это соотношение резко меняется: здесь нижний предел связанной формы составляет около 50% (за небольшим исключением по железу), а верхний достигает 90%. И это естественно: из лизиметрических растворов, прошедших через слой 0-50 см, легкорастворимые формы ТМ поглощаются почвенным поглощающим комплексом и гумусом, в результате чего доля связанных форм в нем существенно повышается. Наиболее высоким относительным содержанием связанных форм ТМ в этом слое отличаются Cr, Pb и Zn, т.е. именно те ТМ, которые относятся к числу наименее растворимых.

В лугостепном поясе относительное содержание связанных форм в лизиметрическом растворе, взятом из слоя 0-10см, ниже по сравнению с тем же слоем горно-луговых почв (альпийский пояс): здесь оно почти для всех элементов не превышает 40%, а по никелю опускается до нескольких процентов, и лишь по свинцу отмечается его повышение до 60%. Последнее объясняется тем, что ионный радиус свинца наиболее высокий по сравнению с другими ТМ, и потому он сильнее закрепляется почвенными частицами (взвесь) и труднее переходит в раствор [6].

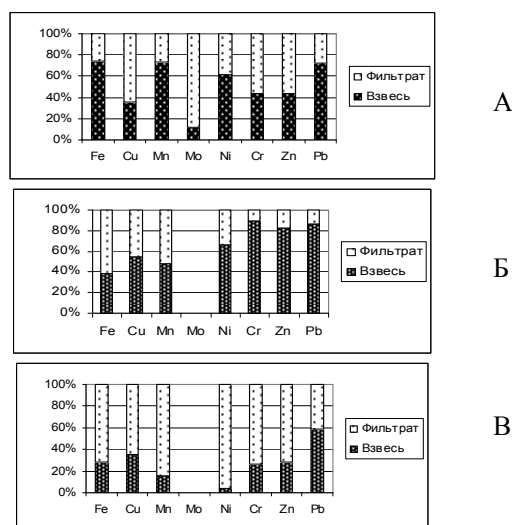


Рис.1. Относительное содержание водорастворимой (в фильтрате) и связанной (во взвеси) форм тяжелых металлов в лизиметрической воде горно-луговой (А – со слоя 0-10 см, Б – со слоя 0-50 см), лугово-степной (В – со слоя 0-10 см) почв и в воде р. Амберд (Г).

В речной воде относительное содержание связанной формы ТМ высокое и колеблется в сравнительно близких пределах (50-80%).

Мы попытались оценить экологическое состояние лизиметрической и речной вод для оценки риска загрязнения тяжелыми металлами исследуемых вод (табл. 3).

Табл. 3. Превышение содержания тяжелых металлов ПДК в лизиметрической и речной водах Арагацкого горного массива (n раз)

Пункт, высота абс., м.	Год	Глубина, см	Fe	Cu	Mn	Mo	Ni	Cr	Zn	Pb
Лизиметрическая вода										
Арагац, 3250	2007	0-10	4.6	5.6	6.8	-	4.1	-	-	1.1
		0-50	1.7	2.0	5.0	-	-	-	-	2.2
	2009	0-10	-	-	-	-	-	-	-	-
		0-50	-	-	-	-	-	-	-	-
Амберд, 2085	2007	0-10	3.4	3.4	7.7	-	1.2	-	-	4.1
	2009	0-10	-	-	-	-	-	-	-	-
		0-50	1.2	-	-	-	-	-	-	-
Речная вода										
р.Амберд, 1567	2007	-	2.9	2.4	1.0	-	1.5	-	-	1.1

Нетрудно заметить, что в образцах 2009 г. превышение ПДК, причем очень небольшое, наблюдается только по железу (1.2 раз), содержание марганца близко к ПДК, а остальных исследуемых элементов заметно ниже него.

Сравнение величин превышения ПДК для образцов 2007 г. показывает довольно интересную картину: в лизиметрических растворах горно-луговых почв, взятых с глубины 0-10 см., превышение тяжелыми металлами их ПДК выше, чем со слоя 50 см, за исключением свинца. Превышение тяжелых металлов ПДК в лизиметрических растворах лугостепного пояса, взятых с глубины 0-10 см, близко к таковым для альпийского пояса (0-10 см).

В речной воде превышение ПДК ТМ низкое и колеблется в более узких пределах (1.1-2.9) по сравнению с лизиметрическими водами обоих поясов (1.1-7.7). Заслуживает внимания то обстоятельство, что превышение ПДК ТМ в исследуемых водах (лизиметрических и речной) наблюдается по одним и тем же элементам, а именно Fe, Cu, Mn, Ni, Pb.

Резюмируя вышеизложенное, можем сказать, что геохимические ряды, составленные по содержанию ТМ, показали довольно четкую картину, свидетельствующую о стабильности и идентичности (для лизиметрических растворов и речной воды) расположения в них Fe, Mn и Zn (в основном первые 3 места), а также Mo и Pb (последние 2 места) для обеих форм ТМ в лизиметрических растворах и речной воде, хотя в отдельных случаях мы можем зафиксировать резкий переход металлов в ряды (например, для связанной формы Pb – переход его на третье место в геохимическом ряду ТМ в лугостепном поясе). Из остальных металлов наибольшим изменениям в расположении в рядах подвержены Cr и Ni, а стабильнее всех расположено медь. Наблюдается почти полное сходство рядов водорастворимой и связанной форм ТМ в речной воде. Соотношение связанная / водорастворимая формы ТМ в лизиметрических растворах, взятых со слоя 0-10 см, или колеблется около 50% (альпийский пояс), или заметно ниже его (лугостепной пояс); в лизиметрическом растворе, взятом со слоя 0-50 см (альпийский пояс), его соотношение значительно выше (в основном 50-90%), поскольку при прохождении через больший слой почвы (50 см) из лизиметрического раствора легко растворимые формы ТМ сильнее поглощаются почвенным поглощающим комплексом. По той же причине указанное соотношение форм ТМ для речной воды близко к таковому для лизиметрической воды, взятой со слоя 50 см.

Большое сходство наблюдается также в превышении величин ПДК тяжелых металлов: коэффициент превышения ПДК для речной воды наблюдается по тем же металлам, что и для лизиметрических растворов (Fe, Cu, Mn, Ni, Pb), а величины превышения ПДК тяжелыми металлами для речной воды (1.1-2.9) укладываются в пределы, установленные для лизиметрических растворов (1.1-7.7).

Как видим, речные воды в значительной степени наследуют многие показатели лизиметрических растворов (расположение ТМ в геохимических рядах, соотношение форм ТМ, близкие пределы превышения содержания одних и тех же металлов их ПДК в лизиметрической и речной водах).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Սարգսյան Ա.Գ.* Կենսածին տարրերի հոսքերի ակթրոպոզեն տրանսֆորմացիան լեռնային էկոհամակարգերում և դրանց կանխատեսումը: Թեկնածուական սեղմագիր, Երևան, 26 էջ, 2012:
2. *Արարտյան Л.А., Реваян Р.Г., Сафразбеян Э.А., Сакоян А.Г., Аветисян М.Г.* Особенности распределения форм тяжелых металлов в природных водах в различных поясах Арагацского массива. Биолог. журн. Армении. 63, 1, с.23-30. 2011.
3. *Бабаян Г.Б.* Агрохимическая характеристика горно-луговых почв Арм.ССР. Ереван, АН Арм. ССР, 134 с., 1982.
4. *Кочарян А.Г., Гусев Е.М.* Особенности трансформации химического состава атмосферных осадков при их взаимодействии с почвенным покровом подзоны южной тайги Европейской территории России. Вода: химия и экология, 1, с. 3-10, 2012.
5. *Сахаев В.Г., Щербицкий Б.В.* Справочник по охране окружающей среды. Изд-во "Будівельник", Киев, 149с., 1986.
6. *Титлянова А.А.* О поведении цезия и рубидия в почвах. "Почвоведение", 3, с.53-61, 1962.

Поступила 14.08.2012



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

БОЯРЫШНИК (*CRATAEGUS* L.) КАК ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИНТРОДУКЦИИ В БОТАНИЧЕСКИХ САДАХ АРМЕНИИ

Ж.А. ВАРДАНИЯН, М.В. САРКИСЯН

Институт ботаники НАН РА
botanyinst@sci.am

На основании многолетних исследований и накопленного опыта по интродукции боярышников в ботанических садах Армении, а также их географическому распространению дается оценка представителей рода *Crataegus* как ценного исходного материала для дальнейшей интродукции по методу родового комплекса, с целью пополнения дендроколлекции ботанических садов и дендропарков страны ценными и высокодекоративными видами.

Боярышник – интродукция растений – дендрофлора – дендроколлекция

Հայաստանի բուսաբանական այգիներում սզիների ինտրոդուկցիայի, ինչպես նաև դրանց աշխարհագրական տարածվածության ուղղությամբ կատարված բազմամյա ուսումնասիրությունների և կուտակված փորձի հիման վրա տրվում է *Crataegus* ցեղի ներկայացուցիչների գնահատականը, որպես արժեքավոր եվասյուրի ցեղային կոմպլեքսի մեթոդով հետագա ինտրոդուկցիայի համար՝ երկրի բուսաբանական այգիների և դենդրոպարկերի հավաքածուները արժեքավոր և գեղազարդ ծառատեսակներով համալրելու նպատակով:

Սզի – բույսերի ինտրոդուկցիա – դենդրոֆլորա – դենդրոհավաքածու

The evaluation of the representatives of the genus *Crataegus* as a valuable initial material for introduction with use of generic complex method with the aim of enrichment of the dendrocollections of the botanical gardens and dendroparks of the country with high value ornamental species has been presented based on multi-year studies and experience on introduction of hawthorns in the botanical gardens of Armenia and data research on their geographical distribution.

Hawthorn – introduction of plants – dendroflora – dendrocollection

Интродукция растений – это основная проблема ботанических садов по изучению и созданию коллекции ценных видов различных флор. С целью целенаправленного и эффективного решения этой задачи необходимо глубокое изучение интродуцентов в новых природно-климатических условиях. Для хозяйственных целей издавна интродуцировались различные представители семейства Rosaceae – *Malus*, *Pyrus*, *Rosa*, *Crataegus*, *Amelanchier* и др. Род *Crataegus* L. является одним из наиболее богатых по видовому и формовому разнообразию родов среди древесных представителей семейства Rosaceae. Многие виды этого рода с давних пор являются объектами интродукции.

Материал и методика. Исходным материалом для интродукции служили как аборигенные, так и интродуцированные виды боярышника. Работы проводились в Институте ботаники НАН РА, Ереванском ботаническом саду, его Севанском и Ванадзорском отделениях.

Материалом для исследования послужили также коллекции Института ботаники НАН РА (ERE), Ереванского государственного университета (ERCB), Института ботаники им. В.Л. Комарова РАН (LE), Института растениеводства им. Н.И. Вавилова (WIR), Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина в Москве (WHA), Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (MW), Института ботаники АН Грузии (TBI), Государственного музея Грузии (TGM).

Целенаправленные исследования в природе и собственные сборы по роду *Crataegus* Армении осуществлялись в 2006-2012 гг. маршрутным и стационарным методами.

Результаты и обсуждение. Боярышники являются ценным растительным ресурсом. Их неприхотливость к почве, влаге, высокая зимостойкость и декоративность дают возможность для многопрофильного хозяйственного использования. Некоторые виды боярышника являются ценными пищевыми и лекарственными растениями: издавна разные народы использовали их в пищу, в народной медицине.

Плоды некоторых южнокавказских видов – *Crataegus pontica*, *C. orientalis*, *C. susanikiae*, *C. atrosanguinea* мясистые, приятные на вкус и употребляются в пищу местным населением в свежем и консервированном виде. Из плодов боярышника можно приготовить суррогат кофе, который лучше употреблять в качестве примеси к другим кофейным продуктам; из молодых листьев готовят чайный напиток. Цветки, плоды и листья боярышников издавна применялись в народной медицине.

В 1965 г. в Армении Золотницкая провела исследования по выявлению качественного и количественного состава физиологически активных веществ лекарственных растений Армении, в том числе некоторых аборигенных видов боярышника, возможные пути и направления их использования [13]. Ею изучены *Crataegus atrosanguinea*, *C. caucasica*, *C. kytostyla*, *C. orientalis*.

В работе “Растительные ресурсы СССР” приводится химический состав боярышников, полезные свойства и способы использования некоторых южнокавказских видов: *C. caucasica*, *C. curvisepala* (= *C. rhipidophylla*), *C. meyeri*, *C. microphylla*, *C. orientalis*, *C. pentagyna*, *C. pontica*, *C. tournefortii* [19].

Известно, что плоды боярышника содержат урсоловую, олеиновую, хлорогеновую и кофейную кислоты, ситостерин, гликозиды, флавоноиды, дубильные вещества, сорбит, холин и жирное масло. В цветках содержатся ацетилхолин, кверцетин, гиперозид, кофейная и хлорогеновая кислоты. Плоды и цветки оказывают лечебное действие при сердечных заболеваниях. Они тонизируют сердечную мышцу, усиливают кровообращение в сосудах сердца и мозга, понижают возбудимость центральной нервной системы, улучшают сон и общее состояние больного, несколько снижают кровяное давление. Промышленностью выпускается жидкий экстракт и настойка из плодов боярышника. Все препараты боярышника принимаются только по назначению врача. Виды *C. pentagyna* и *C. atrofusca* продаются на местных рынках как лекарственное растение для нормализации артериального давления и тахикардии сердца [13].

Засухоустойчивые и морозоустойчивые виды боярышника используются в качестве подвоя ценных плодовых культур – яблони, груши, айвы [18]. Культурную айву часто прививают на боярышник. В качестве подвоя обычно используют *C. monogyna* и *C. oxyacantha*.

Древесина боярышника беловато-розовая, красновато-желтая или красноватая, мелкослойная, плотная, очень твердая, крепкая, тяжелая, трудно поддающаяся

обработке, изредка применяется в токарном производстве. Колочки боярышника иногда использовали вместо гвоздей. Кора боярышников используется как дубитель и для окраски тканей в красно-коричневый цвет.

Несмотря на большой интерес к представителям рода, до сих пор нет единого мнения о его видовом составе. Только в последнее время описано большое количество видов и разновидностей боярышников, поэтому в разных источниках указывается разное их число: от 155 до 1250 [16, 26, 29]; 200 видов [22]. Благодаря экологическим и биологическим особенностям, представители рода *Crataegus* произрастают в самых различных местообитаниях и ценологических условиях умеренных и субтропических областях Северного полушария.

По данным некоторых авторов, главным центром видообразования секции *Crataegus* (sensu lato) являются Турция и Иран, а вторичным центром – Крым и Кавказ. Наличие 5 эндемичных видов на Кавказе подтверждает, что Кавказ является одним из центров видообразования боярышников [18, 29].

Для Кавказа Пояркова приводит 17 видов боярышника [17]. Полетико впервые обобщила результаты интродукции представителей рода *Crataegus* в Советском Союзе, разработала филогенетическую схему этого рода, состоящую из 25 секций [16]. Ею было установлено 74 дикорастущих вида боярышника, в культуру введено 89 представителей, 58 из которых североамериканские виды.

По данным Прилипко, на Кавказе произрастает 16 видов и один подвид боярышника, 7 из которых встречаются в культуре [18].

В последние годы из Южного Закавказья были описаны ряд новых для науки видов: *C. × ulotricha* Pojark. ex Gladkova; *C. cinovskissii* Kassumova, *C. susanykleinae* Gabrielian et Sargsyan, *C. gabrielianae* Pojark. ex Sargsyan и *C. × razdanica* Pojark ex Sargsyan. Обнаружены также новые для Южного Закавказья виды: *C. microphylla* K. Koch; *C. pallasii* Griseb.; *C. stevenii* Pojark.; новые для Армении виды: *C. eriantha* Pojark.; *C. pojarkoviae* Kossych. Подтверждено произрастание *C. szovitsii* Pojark. в Армении. В итоге число видов боярышника, произрастающих на Кавказе, резко увеличилось и достигло 24.

В Южном Закавказье произрастают 23 вида боярышника. Как на Кавказе в целом, так и в Южном Закавказье боярышники представлены теми же тремя секциями: *Crataegus*, *Pentagynae* С. К. Schneid. и *Azaroli* Loud. В Нахичеване представители секции *Pentagynae* не произрастают.

Для флоры Армении Пояркова [17] привела 10 видов боярышника, Федоров [27] – 11, Прилипко [18] – 10, Варданян [6] – 11.

В настоящее время в Армении род *Crataegus* представлен 22 видами [23].

В Южном Закавказье боярышники растут в различных условиях произрастания: некоторые виды приурочены к горным лесным районам – к нижнему и среднему горному поясу, отдельные виды заходят в верхний и субальпийские горные пояса, ксерофитные виды растут на сухих каменистых склонах, входят в состав аридных редколесий, а иногда образуют кустарниковые заросли на сухих склонах. Здесь боярышники являются составляющими в следующих растительных сообществах и встречаются: в горных степях (13 видов), лугостепях (7), различных формациях широколиственных лесов (18), субальпийских криволесьях (3), составе шибляка (11), аридных редколесьях (15), степных кустарниковых зарослях (3), приустьевых древостоях (8) и на скалах, россыпях и осыпях (8 видов).

Представители секции *Crataegus* в большинстве своем приурочены к лесным формациям, редколесьям и близким к ним ценозам. Виды секции *Pentagynae* встречаются в лесных сообществах, изредка в осветленных смешанных редколесьях. Большинство видов секции *Azaroli* приурочено к открытым горным склонам, скалам и осыпям.

В культуре высокодекоративные виды боярышника широко используются в декоративном садоводстве, в озеленении городов; они устойчивы к неблагоприятным условиям города, нетребовательны к почвам, выносят затенение, большинство видов зимостойки, засухоустойчивы, прекрасно переносят стрижку и формовку, обладают высокой побегообразовательной способностью, декоративны в течение всего периода вегетации.

Из боярышника можно создать декоративные группы в ландшафтных парках. Их используют для закрепления склонов оврагов, берегов водоемов и рек. Но самое частое применение боярышник находит при создании живых изгородей [5]. Они красивы и при этом практически непроницаемы, благодаря таким качествам, как густота кроны, наличие колючек, быстрое отрастание после обрезки. Для живых изгородей пригодны такие колючие виды, как *C. microphylla*, *C. orientalis*, *C. meyeri*, *C. pallasii*. Они отличаются умеренным ростом, засухоустойчивы. Плотной растущей группе боярышников путем обрезки можно придать форму квадрата, шара, пирамиды.

Для озеленения Еревана Махатадзе предложил следующие, хорошо переносящие стрижку виды: *C. monogyna* Jacq. f. *roseo-plena* hort., (для стрижки под узкоцилиндрическую и веретеновидную формы), *C. duglasii* Lindl. (под шаровидную форму), *C. macracantha* Lodd. (под яйцевидную, кубическую, шаровидную формы) [15].

Арутюнян [2] в составе экзотов г. Еревана указал *C. chlorosarca* Maxim., *C. oxyacantha* L. f. *splendens* L., *C. macrocantha*, *C. mollis* Scheele, *C. submollis* Sarg., *C. monogyna*, *C. punctata* Jacq. Варданяном [6, 7] для применения в озеленении городов и лесоразведении Армении предлагаются аборигенные виды: *C. orientalis*, *C. zangezura*, *C. meyeri* и *C. pontica*.

В Армении аридная территория составляет 15,2% (4545 км²). При подборе ассортимента аборигенных видов для создания аридных природных дендропарков в Армении предлагаются как высокодекоративные, так и засухоустойчивые и редкие виды боярышника [6].

Несмотря на то что виды рода *Crataegus* являются отличным материалом для создания бордюров и живых изгородей, в настоящее время в парках и насаждениях Еревана и других городов республики они, к сожалению, не нашли широкого применения. Для создания живых изгородей, кроме аборигенных видов *C. orientalis* и *C. meyeri*, рекомендуем использовать также новые для дендрофлоры Армении виды боярышников *C. pallasii*, *C. microphylla*.

Среди кавказских видов достаточно ярко выражен эндемизм [16]. Из 23 встречающихся в Южном Закавказье видов боярышника 5 являются эндемиками: *C. susanykleinae*, *C. × ulotricha*, *C. × razdanica*, *C. gabrielianae* (узколокальными эндемиками Армении) и *C. cinovskisii* (эндемик Нахичевана).

Некоторые виды боярышника Южного Закавказья нуждаются в усиленной охране. Виды *C. zangezura*, *C. ulotricha*, *C. microphylla*, *C. pontica*, *C. tournefortii*, *C. szovitsii* вошли в Красную книгу Армении [14].

Боярышники оцениваются как ценный исходный материал, и с давних пор интродуцируются во многих ботанических садах. Исследования по интродукции боярышников в Узбекистане проводил Русанов [20], в Белоруссии – Бобореко [3, 4]. Эсенова [28] занималась проблемами биологии и систематики боярышника в Туркмении, в Прибалтике дикорастущие и интродуцированные боярышники изучал и описал ряд новых видов Циновский [26]. Соловьева [24] изучала биологию некоторых видов боярышника в условиях г. Москвы. Совместно с Котеловой [25] она исследовала биологические особенности некоторых среднеазиатских, дальневосточных, кавказских и североамериканских видов. Вафин [8] изучал биологичес-

кие особенности интродуцированных боярышников Башкирского Предуралья. Авторами монографии “Боярышники” Вафиным и Путенихиным проводилась большая работа по изучению биологии интродуцированных боярышников [9].

В составе богатейшей в бывшем Советском Союзе дендрологической коллекции Главного ботанического сада РАН насчитывается 74 вида, 6 подвидов боярышника и один гибрид $\times Crataegosorbus miczurinii$ Pojark. (*Sorbus aucuparia* L. $\times$ *Crataegus sanguinea* Pall.). Дендрологами ботанического сада было установлено, что зимостойкость растений значительно изменяется с возрастом. В группе растений, зимостойкость которых оценивается в IV балла, наблюдается постепенное снижение жизнеспособности, выражающейся в низкой сопротивляемости вредителям и болезням, нарушении ритма развития и дальнейшем ухудшении состояния: наряду с такими растениями, которые, как правило, имеют южное происхождение, приводится *Crataegus pentagyna* [12].

Русановым разработан метод подбора и интродукции растений целыми родовыми комплексами, согласно которому привлекаются и выращиваются в новых условиях растения всех имеющихся видов данного рода. “Родовой комплекс” является одним из методов формирования ботанических коллекций. Такой подход дает возможность изучить ряд в целом и всесторонне, начиная с систематики, биологии и экологии видов и кончая хозяйственной оценкой интродуцентов. Метод родового комплекса дал также возможность решить задачи как научного, так и практического значения, например: поведение растений на территории сада; семенное размножение и распространение – агрессивное или пассивное; изучение всхожести семян и длительности сохранения ими жизнеспособности; вегетативное размножение и распространение; биология цветения и плодообразование; способность к гибридизации и спонтанная гибридизация, искусственное получение гибридов и другие вопросы. Плодотворность и действенность изучения интродуцентов родовыми комплексами подтверждались работами ученых Ташкентского ботанического сада, в частности с родами *Crataegus*, *Yucca*, *Rosa* [21]. Здесь сосредоточено 150 видов боярышника. Методом родовых комплексов, например, было вскрыто многолетнее пребывание в живом состоянии колючек у ряда серий и видов североамериканских боярышников – свидетельство их поздней мезофитности – могло быть обнаружено только на живых растениях. В ходе исследований были выявлены виды, пригодные для формирования живых изгородей, съедобные, содержащие физиологически активные лекарственные вещества виды.

Интродукция представителей рода *Crataegus* проводилась и в ботанических садах и дендропарках Армении, в первую очередь, в Ереванском ботаническом саду и в его двух горных отделениях – в Ванадзоре и Севане. Исходным материалом для интродукции служили как аборигенные, так и иноземные виды боярышника.

В 1985 году был опубликован “Аннотированный каталог деревьев и кустарников ботанических садов и дендропарков Армянской ССР”, изданный группой армянских дендрологов-ботаников, в котором обобщаются итоги интродукции деревьев и кустарников в Армении [1]. В составе дендроколлекций приводится 31 вид и 3 садовые формы боярышников, интродуцированных в различных ботанических садах и дендропарках республики. К сожалению, коллекция не полностью сохранилась в настоящее время.

В наших предыдущих работах, наряду с другими древесными растениями, широко представлен род *Crataegus* [6, 7]. В них приводятся данные о дикорастущих и интродуцированных боярышниках Армении. По приведенным данным, боярышники особенно перспективны при создании аридных природных дендропарков, первоочередная задача которых заключается в сохранении редких и ценных видов древесных и улучшении санитарно-гигиенических и микроклиматических ус-

ловий окружающей среды, в выращивании посадочного материала для засушливых регионов.

В настоящее время в дендроколлекциях Ереванского ботанического сада хорошо растут и плодоносят как аборигенные – *C. rhipidophylla*, *C. caucasica*, *C. pseudoheterophylla*, так и многие интродуцированные виды – *Crataegus macracantha*, *C. arnoldiana*, *C. oxacantha*, *C. monogyna*. Из садовых форм несколькими экземплярами высотой в 5-6 м представлен *C. oxyacantha* var. *paulii* Rehd. с розовыми махровыми цветами. На территории Ванадзорского отделения Ботанического сада растут *C. altaica*, *C. duglasii*, *C. macracantha*, *C. maximowiczii*, *C. monogyna*, *C. oxyacantha*, *C. pentagyna*, *C. nigra*, *C. atrosanguinea*. В Севанском отделении Ботанического сада в настоящее время регулярно плодоносят и дают жизнеспособные семена *C. macracantha*, *C. maximowiczii*, *C. nigra*. Виды же *C. submollis*, *C. pinatifida* и *C. coccinioides* погибли.

С точки зрения интродукции и создания богатой показательной коллекции, в ботанических садах Армении особо интересными родовыми комплексами являются наиболее богатые в таксономическом отношении, экологически пластичные и предельно обширные по ареалу роды древесных растений (*Sorbus*, *Quercus*, *Lonicera* и др.). В этом аспекте боярышники Южного Закавказья хорошо подходят под критерии родового комплекса. Считаем целесообразным включать в программу своих работ размещение родового комплекса представителей *Crataegus* в Ереванском ботаническом саду, что может служить богатым материалом для разностороннего изучения южнокавказских видов. Созданная нами коллекция боярышников с богатым видовым составом послужит базой для научных исследований и позволит проводить систематические, анатомические, селекционные исследования, а также работы по лесоразведению и озеленению. В результате наблюдений можно дать оценку эколого-биологических особенностей растений и определить степень адаптации их к новым условиям существования.

Наша задача – оценка боярышников как интродукционного материала на основе комплексного изучения их биологических особенностей в условиях Ереванского ботанического сада, отбор устойчивых и перспективных видов для выращивания в новых условиях произрастания. Составление коллекции должно проводиться в несколько этапов:

- проектирование и подготовка территории;
- разработка принципов и подходов выбора боярышников для коллекции по экологическим группам;
- оценка эколого-биологических свойств интродуцентов;
- анализ и обобщение результатов интродукции;
- разработка путей применения перспективных видов боярышников.

Полученные результаты исследований послужат основой для целенаправленного применения боярышников в лесоразведении, озеленении, садово-парковом строительстве, плодоводстве, других отраслях хозяйства, а также привлечения новых высокодекоративных и хозяйственно ценных видов и форм, особенно в Ереванском ботаническом саду, где планируется создание основной коллекции боярышников по методу родового комплекса с целью дальнейшего пополнения садов и парков республики ценными высокодекоративными видами.

При интродукционных работах методом родового комплекса необходимо учесть прежде всего климатическую и почвенную зональность выбранного участка. Подбор перспективных для испытания видов необходимо осуществлять с учетом экогруппы видов.

Большинство встречающихся в Южном Закавказье видов боярышника морозо- и засухоустойчивы, светолюбивы, мало требовательны к почве.

Ксерофиты (9 видов) – это в основном представители секции *Azaroli* (*C. orientalis*, *C. szovitsii*, *C. tournefortii*, *C. pontica*, *C. gabrielianae*) и некоторые виды из секции *Crataegus* (*C. meyeri*, *C. eriantha*, *C. armena*). Наибольшее число (13) видов являются мезоксерофитами (ксеромезофиты), принадлежат к секциям *Azaroli* и *Crataegus*. Мезофиты (10 видов) в основном принадлежат секциям *Crataegus* и *Pentagynae*.

Самой высокой экологической пластичностью и большой высотной амплитудой обладает *C. orientalis* из секции *Azaroli*, который встречается от предгорий до субальпийского пояса (500-2150 м). Другие виды секции *Azaroli* – *C. cinovskisii*, *C. szovitsii*, *C. tournefortii*, *C. gabrielianae*, *C. pojarkoviae* и *C. pontica* произрастают в среднем горном поясе, и только *C. pontica* заходит в нижний горный пояс, а *C. pojarkoviae* доходит до верхнего горного пояса. Виды секции *Crataegus* – *C. caucasica*, *C. rhipidophylla*, *C. pseudoheterophylla* и *C. × zangezura* экологически наиболее пластичны и встречаются от нижнего до субальпийского горного пояса. Виды *C. meyeri* и *C. armena* достигают до 2070 м высоты. Виды же *C. atrosanguinea* и *C. eriantha* обитают в нижнем и среднем горных поясах. Два представителя секции *Pentagynae* – *C. pentagyna* и *C. atrofusca* произрастают в нижнем и среднем горных поясах, а вид *C. susanykleinae* проникает в верхний горный пояс до 2000 м высоты.

Виды *C. armena*, *C. meyeri*, *C. stevenii*, *C. pallasii*, *C. atrosanguinea*, *C. pseudoheterophylla*, *C. microphylla*, *C. pontica*, *C. tournefortii*, *C. orientalis*, *C. zangezura* являются высокодекоративными и после исследований методом родовых комплексов могут быть рекомендованы для введения в культуру для городских парков. Для создания живых изгородей могут иметь перспективу виды *C. orientalis*, *C. meyeri*, *C. pallasii*, *C. microphylla*.

Благодаря своей выносливости, многочисленные представители рода весьма перспективны для создания аридных дендропарков в таком малолесном регионе, как Южное Закавказье. Для создания аридных дендропарков представляют интерес следующие виды: *C. tournefortii*, *C. armena*, *C. orientalis*, *C. meyeri*, *C. pontica*, *C. pojarkoviae*, *C. szovitsii*, а некоторые аборигенные виды – *C. pontica*, *C. susnykleinae* могут служить хорошим исходным материалом для селекционных работ с целью получения ценных по вкусовым качествам плодов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аннотированный каталог деревьев и кустарников ботанических садов и дендропарков Армянской ССР. Бюлл. бот. сада АН Арм ССР, 27, Ереван, 164 с., 1985.
2. Арутюнян Л.В. Древесные экзоты Еревана. Бюлл. бот. сада АН Арм ССР, 18, Ереван, 5-33, 1961.
3. Бобореко Е.З. Интродуцированные боярышники в Белорусской ССР и перспективы их использования. Автореф. Дисс. канд. биол. наук, Минск, 1-27, 1967.
4. Бобореко Е.З. Боярышник. Минск, 222 с., 1974.
5. Бозоян А.А. Особенности строения кроны крупноколючкового боярышника при декоративной формовке. Бюлл. Бот. сада, АН Арм ССР, 19, Ереван, 127-130, 1963.
6. Варданын Ж.А. Деревья и кустарники Армении в природе и культуре. Ереван, 367 с., 2003.
7. Варданын Ж.А. Сравнительная оценка лесных регионов Армении как источник интродукции ценных и редких видов деревьев и кустарников. Проблемы современной дендрологии. Мат. межд. научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения члена-корреспондента АН СССР П.И. Лапина. Москва, 59-62, 2009.

8. Вафин Р.В. Биологические особенности интродуцированных видов рода *Crataegus* L. (Башкирское Предуралье). Автореф. дисс... доктора биол. наук. Уфа, 24 с., 2002.
9. Вафин Р.В., Путенихин В.Н. Боярышники. Интродукция и биологические особенности. Москва, 224 с., 2003.
10. Габриэлян Э.Ц., Саркисян М.В. Новый эндемичный вид *Crataegus susanykleinae* (*Rosaceae*) из Армении. Флора, растит. и раст. ресурсы Армении, 17, Ереван, 10-11, 2009.
11. Григорян А.А. Ценные виды деревьев и кустарников лесов Армении (на арм. яз.). Ереван, 168 с., 1979.
12. Древесные растения Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН: 60 лет интродукции/отв. ред. А.С. Демидов. М., 586 с., 2005.
13. Золотницкая С.Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении, 2, Ереван, 372 с., 1965.
14. Красная Книга растений Республики Армения (под ред. К.Г. Таманян). Ереван, 592 с., 2010.
15. Махатадзе Л.Б. Состояние и некоторые задачи озеленения городов Армении. Бюлл. бот. сада АН Арм. ССР, 17, Ереван 7-15, 1959.
16. Полетико О.М. Род *Crataegus* L. Деревья и кустарники СССР, 3. М.- Л., 514-577, 1954.
17. Пояркова А.И. Род *Crataegus* L. Флора СССР, 9, М.- Л., 416-468, 498-510, 1939.
18. Прилипко Л.И. Род *Crataegus* L. Дендрофлора Кавказа, 4, Тбилиси, 136-157, 1965.
19. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. (Ред. Соколов П.Д.). Л.: Наука, 34-42, 1987.
20. Русанов Ф.Н. Интродуцированные боярышники Ботанического сада АН УзССР. Дендрология Узбекистана, 1, Ташкент, 8-254, 1965.
21. Русанов Ф.Н. Метод родовых комплексов в интродукции растений и его дальнейшее развитие. Бюлл. Глав. бот. сада, вып. 81, Наука, 15-20, 1971.
22. Русанов Ф.Н. Теория и опыт переселения растений в условия Узбекистана. Ташкент, 112 с., 1974.
23. Саркисян М.В. Род *Crataegus* (*Rosaceae*) в Южном Закавказье. Takhtajania, вып. 1, Ереван, 110-117, 2011.
24. Соловьева Н.М. Рост и развитие некоторых видов боярышника в условиях Москвы. Автореф. дисс...канд. биол. наук. М.: изд. МГУ, 26 с., 1970.
25. Соловьева Н.М., Котелова Н.В. Боярышник. М., 72 с., 1986.
26. Циновскис Р.Е. Боярышники Прибалтики. Рига, 388 с., 1971.
27. Федоров Ан.А. Род *Crataegus* L. Флора Армении, 3, Ленинград, 291-303, 1958.
28. Эсенова Х.Е. Интродуцированные виды рода *Crataegus* в условиях Туркмении. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Ашхабад, 21 с., 1968.
29. Christensen K.I. Revision of *Crataegus* Sect. *Crataegus* and Nothosect. *Crataeguineae* (*Rosaceae* – *Maloideae*) in the Old World. Systematic Botany Monographs, 35, Michigan, p. 199, 1992.

Поступила 03.08.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

**ՍՊԻՏԱԿ ԵՐԵՔՆՈՒԿԻ (*TRIFOLIUM REPENS* L.)
ՈՐՊԵՍ ԶԱԿԱՅԻՊՕՔՍԻԿ ԴԵՐԱԲՈՒՅՍԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՇՆՉԱՌՈՒԹՅԱՆ ԿՐԱ**

Ն.ՅՈՒԱՐԱՄՅԱՆ, Մ.Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ն.Վ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

Երևանի պետական լսարան, մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիայի ամբիոն
nona01011966@mail.ru

Ավանդական բժշկության մեջ շնչառական համակարգի հիվանդությունների ժամանակ որպես հակահիպոքսիկ բուժամիջոց կիրառվում է մարգագետնային սպիտակ երեքնուկը: Այն համարվում է բնական հակաօքսիդիչ, որը ընդունակ է չեզոքացնելու ազատ ռադիկալների ակտիվությունը, որոնց ավելցուկային քանակն օրգանիզմում հրահրում է ախտաբանական զարգացումներ:

Այս հետազոտությունը թույլ է տվել պարզել, որ մարգագետնային սպիտակ երեքնուկը հակահիպոքսիկ ազդեցություն է թողնում օրգանիզմի, համակարգային և բջջային մակարդակներում: Այն բարձրացնում է շնչառության կայունությունը թթվածնային անբավարարության պայմաններում, որն երկարավուն ուղեղի շնչառական կենտրոնի նեյրոնների ավելի բարձր դիմացկունության արդյունք է:

Թթվածնաքաղց – շնչառություն – շնչառական կենտրոն – սպիտակ երեքնուկ

При болезнях дыхательной системы (бронхиты, бронхиальная астма, простуда) народная медицина рекомендует множество лекарственных трав, обладающих антигипоксическими свойствами. К числу таких трав относится и клевер луговой (*Trifolium repens* L.). Результаты экспериментов дают основание полагать, что при кормлении животных луговым клевером повышение устойчивости организма происходит не только на системном (внешнее дыхание сохраняется дольше), но и на клеточном уровне, так как параллельно регистрируемая электрическая активность нейронов дыхательного центра продолговатого мозга проявляет высокую устойчивость по сравнению с контрольной группой.

Гипоксия – дыхательная система – дыхательный центр – клевер

The folk medicine recommends medicinal herbs with antihypoxic properties for the respiratory system diseases such as bronchitis, bronchial asthma, cold. One of these herbs is *Trifolium repens* L. Fam. Fabaceae. The experiment results suggest that the increase in organism stability occurs both at the system (external respiration remains longer) and cell levels since simultaneously registered electrical activity of the respiratory centre neurons of medulla has shown high stability as compared to screening group.

Hypoxia – respiratory system – respiratory centre – trifolium

Թթվածնաքաղցի հիմնախնդիրը ներկայումս մեծ տեղ է զբաղեցնում գործնական բժշկության բնագավառում, քանի որ այն ուղեկցում է մարդուն ամբողջ կյանքի ընթացքում այս կամ այն ձևով: Թթվածնաքաղցը հիպոքսիան դրսևորվում է լեռնային բարձրադիր պայմաններում, լեռնագնացության և պարաշյուտային թռիչքների ժամանակ: Մարդկանց առողջության համար որոշակի վտանգ են ներկայացնում ինչպես երկարատև, այնպես էլ կարճատև ինքնաթիռային թռիչքները:

Նման պայմաններում արյան մեջ իջնում է O_2 -ի քանակը, որը եթե անվնաս է առողջ մարդկանց համար, ապա լուրջ վտանգ է ներկայացնում շնչառական կամ սիրտ-անոթային հիվանդություններ ունեցողների համար: Պարզվել է, որ էկոլոգիական ծայրահեղ գործոնների (թթվածնային անբավարարություն, վիբրացիա, աղմուկ և այլն) ազդեցության հետևանքով առաջացած մի շարք հիվանդությունների (ալերգիաներ, առիթմիա, շնչառության խանգարումներ) ախտաբանական զարգացումներում ևս կարևոր տեղ է գրավում հիպօքսիան [4,5,9]: Բոլոր դեպքերում այն զարգանում է միևնույն սխեմայով: ԿՆՀ բջիջներում խանգարվում են օքսիդացման պրոցեսները, հյուսվածքներում նվազում է O_2 -ի քանակը, միտոքոնդրիումները քայքայվում են, խանգարվում են օքսիդացման և ֆոսֆորիլացման պրոցեսները, խախտվում է Na-K-ական պոմպի գործունեությունը, խթանվում է ազատ ռադիկալների առաջացման պրոցեսը: Վերոհիշյալ փոփոխությունները դանդաղեցնում են էներգետիկ կապերի առաջացումը, իջեցնելով բջջի էներգետիկական ներուժը և ճնշելով կենսասինթեզի գործընթացները: Դա հատկապես ցայտուն է դրսևորվում պլաստիկ նշանակության նյութերի՝ սպիտակուցների և նրանց կոմպլեքսների, ինչպես նաև տարբեր դասի լիպիդների, այդ թվում նաև բջջաթաղանթների կառուցվածքի մեջ մտնող նյութերի սինթեզման ժամանակ: Այս երևույթների զարգացումները կանխելու համար բժշկության մեջ կիրառվում են բնական և արհեստական հակաօքսիդիչ բուժամիջոցների դեղանյութեր, որոնք ունակ են կապելու ազատ ռադիկալները և կանխելու լիպիդների գերօքսիդացումը [1,2]: Սակայն քիչ են հետազոտությունները, որոնք կարող են բացահայտել ժողովրդական բժշկության մեջ որպես հակաօքսիդիչ միջոց կիրառվող բույսերի ազդեցության մեխանիզմները: Այդ նպատակով մեր փորձերում ուսումնասիրվել է ավանդական բժշկության մեջ շնչառական համակարգի տարբեր հիվանդությունների (բրոնխիտ, ասթմա, ինչպես նաև սակավարյունություն) ժամանակ օգտագործվող սպիտակ երեքնուկի ազդեցությունը շնչառության վրա թթվածնային անբավարարության պայմաններում:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունները կատարվել են սուր փորձի պայմաններում 180-230 գ ընդհանուր սպիտակ առնետների վրա, որոնք թմրեցվել են քլորալոգի (40 մգ/կգ և նեմբուլայի 10 մգ/կգ) խառնուրդով: Օգտագործել ենք կենդանիների երկու խումբ՝ ստուգիչ և փորձարարական: Փորձարարական խմբին կերի հետ 10 օր տրվել է սպիտակ երեքնուկի չոր զանգված՝ 100 գ ընդհանուր 5 մ գ (որը համապատասխանում է ավանդական բժշկության մեջ կիրառվող չափաբաժնին): Ստերեոտաքսիկ սեղանիկի վրա ամրացված կենդանու շնչառական նեյրոնների ակտիվության արտածման նպատակով ուղեղիկի մասնակի հեռացումից հետո ապակյա միկրոէլեկտրոդը իջեցվել է երկարավուն ուղեղի obex-ի շրջան: Նեյրոնների իմպուլսային ակտիվության արտաբջջային արտածումը իրականացվել է 2M NaCl-ի լուծույթով լցված ապակյա միկրոէլեկտրոդով (ծայրի տրամագիծը՝ 1,5-2 մկմ, դիմադրությունը՝ 3 ՄՕմ): Նեյրոնների տարբերակման, ինչպես նաև ընդհանուր շնչառության գնահատման համար միաժամանակ գրանցվել է կենդանու արտաքին շնչառությունը:

Նեյրոնների ուսումնասիրվող ցուցանիշների գրանցումը կատարվել է մթնոլորտային ճնշման բնականոն պայմաններում (սորմօքսիա) և թթվածնաքաղցի ազդեցության դիմադրականությամբ: Թթվածնաքաղցի մոդելը ստեղծվել է ճնշախցում: Օդի դուրս մղման ճանապարհով ճնշախցում առաջանում է տարբեր «բարձրությունների» համապատասխանող թթվածնի պարցիալ ճնշում, որը բերում է նաև արյան մեջ O_2 -ի լարվածության փոփոխությունների: Նման փոփոխություններ նկատվում են նաև տարբեր հիվանդությունների ժամանակ օրգանիզմում առաջացող էնդոգեն հիպօքսիայի հետևանքով: Նեյրոնների էլեկտրական ակտիվության գրանցումը կատարվել է 4500-5000 մ (pO₂=109-85 մմ սնդ.ս.) բարձրության վրա, որը համարվում է չափավոր թթվածնաքաղցի փուլ, 7500-8000 մ (pO₂=64-53 մմ սնդ.ս.) բարձրության վրա, որը համարվում է սուր թթվածնաքաղցի փուլ, և ելակետային մակարդակին «իջեցնելուց» հետո: Ճնշախցիկում կենդանիների բարձրացումն ու իջեցումը կատարվել է 20-25 մ/վ արագությամբ:

Նեյրոնների էլեկտրական ակտիվության գրանցումը, վերլուծությունը և ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը կատարվել է համակարգչային համապատասխան ծրագրով:

Արդյունքներ և քննարկում: Նորմօքսիայի պայմաններում կենդանիների ստուգիչ խմբում գրանցվել է 46 արտաշնչական (էքսպիրատոր նեյրոն (ԷՆ)) և 33 ներշնչական (ինսպիրատոր նեյրոն (ԻՆ)): Հիպօքսիայի առաջին փուլում (4,5-5 հազ.մ) իրենց ակտիվությունը պահպանել են 36 (78,2%) ԷՆ և 26(74,2%) ԻՆ: Հիպօքսիայի ծանր փուլում pO₂ խիստ անկումը հանգեցնում է ակտիվ շնչառական նեյրոնների քանակի կտրուկ նվազման (համապատասխանաբար 52,1% և 51,4%):

Կենդանիներին իջեցնելուց հետո նեյրոնների մոտ տեղի է ունեցել ելակետային տվյալների վերականգնում: Փորձերը ցույց տվեցին, որ երեքնուկի ազդեցությամբ հիպոթեզային և չափավոր և ծանր փուլում ավելի մեծ քանակով նեյրոններ են պահպանում իրենց ակտիվությունը: Այսպես՝ հիպոթեզային առաջին փուլում ակտիվությունը պահպանել են 92,8% ԷՆ և 93,1 % ԻՆ: Հիպոթեզային ծանր փուլում այդ ցուցանիշները եղել են 71,4% և 70,4% համապատասխանաբար: Կենդանիներին իջեցնելուց հետո ստուգիչ տվյալների համեմատությամբ փորձարարական խմբի մոտ ավելի մեծ քանակով նեյրոններ են (95%) վերականգնել իրենց ակտիվությունը: Բացի քանակական փոփոխություններից ուսումնասիրվել են նաև շնչառական նեյրոնների համագարկի տևողությունը, համագարկում իմպուլսների քանակը և իմպուլսային ակտիվության միջին հաճախականությունը, որը ավելի հավաստի է դարձնում ստացված տվյալները: Վերոհիշյալ ցուցանիշների փոփոխության դինամիկան բերված է աղ. 1-ում:

Աղ. 1. Երկարավուն ուղեղի շնչառական կենտրոնի փուլային նեյրոնների իմպուլսային ակտիվության փոփոխությունը սպիտակ երեքնուկի ազդեցությամբ թթվածնաքաղցի պայմաններում

Ցուցանիշներ	Ստուգիչ տվյալներ				Ցուցանիշների փոփոխությունը երեքնուկի օգտագործումից հետո			
	նորմա	4,5-5 հազ.մ	7,5-8 հազ.մ	իջեցում	նորմա	4,5-5 հազ.մ	7,5-8 հազ.մ	իջեցում
Էքսպիրատոր նեյրոններ								
Համագարկի տևողությունը	0,56	0,54	0,57	0,55	0,58	0,61	0,59	0,59
Իմպուլսների թիվը համագարկում	15	19	10	17	25	31	21	24
Իմպուլսների միջին հաճախությունը	26,7	35,2	17,5	30,9	43,1	52,5	34,4	40,6
Ինսպիրատոր նեյրոններ								
Համագարկի տևողությունը	0,42	0,41	0,55	0,55	0,37	0,34	0,37	0,40
Իմպուլսների թիվը համագարկում	14	16	15	18	17	20	16	17
Իմպուլսների միջին հաճախությունը	33,3	39,2	27,2	32,7	45,9	58,8	43,2	42,5

Երկարավուն ուղեղի շնչառական կենտրոնի նեյրոնների գործունեության գումարային արդյունքը արտահայտվում է արտաքին շնչառության ցուցանիշներում: Թթվածնաքաղցի առաջին փուլում և ստուգիչ և փորձարարական խմբի կենդանիների մոտ նկատվում է շնչառության խորացում և հաճախականության մեծացում, որով օրգանիզմը փորձում է համարել թթվածնի պակասը: Թթվածնաքաղցի խորացմանը (բարձրության ավելացմանը) զուգընթաց այդ ցուցանիշները փոխվում են հակառակ ուղղությամբ (շնչառությունը դառնում է մակերեսային, իսկ հաճախականությունը նվազում է), որն էլ հիմնականում հանգեցնում է շնչառության դադարի: Ստուգիչ խմբի կենդանիները դիմանում էին մինչև 6-6,5 հազ. մետր բարձրության, որտեղ 5 ր պահելուց հետո շնչառությունը կանգ էր առնում, և կենդանին կարող էր սատկել, իսկ փորձարարական խմբի կենդանիները, որոնք ստացել էին երեքնուկի ծաղիկներ, դիմանում էին մինչև 7,5-8 հազ. մ բարձրությանը, որը վկայում է այդ պայմաններում շնչառական նեյրոնների ավելի բարձր դիմացկունության մասին:

Օրգանիզմի որոշ ախտաբանական վիճակներում, ինչպես նաև թթվածնի ցածր պարունակությամբ միջավայրում տաքարյուն կենդանիների բջիջներում կարող է առաջանալ թթվածնի պահեստավորման անհրաժեշտություն: Դա հատկապես վերաբերվում է նյութափոխանակային մեծ ակտիվություն ունեցող նյարդային և մկանային բջիջներին, որոնք խիստ առանձնանում են թթվածնի յուրացման մեծ արագությամբ, ինչպես հանգստի, այնպես էլ մեծ ծանրաբեռնվածությունների ժամանակ [3]:

Այդ պայմաններին օրգանիզմի կենսագործունեության ապահովման համար մշակված են մի շարք կանխարգելիչ և բուժիչ միջոցառումներ, որոնցից են կլիմայավարժեցումը, չափավոր հիպոթեթերապիան, ինչպես նաև հակահիպոթեթի բնական և արհեստական բուժամիջոցների կիրառումը, որոնք ուղղված են մեղմացնելու օրգանիզմի հյուսվածքներում թթվածնաքաղցի ախտաբանական զարգացումները [6, 7]: Ինչպես վերը նշվեց, այդ զարգացումներում, ի թիվս մի շարք գործընթացների, որոշակի դեր է խաղում ազատ ռադիկալների առաջացումը: Դա համարվում է նաև օրգանիզմի ծերացման կարևոր գործոններից մեկը:

Բջջաթաղանթների լիպիդների և արյան պլազմայի լիպոպրոտեիդների կազմի մեջ մտնող չհագեցած ճարպաթթուների ազատ ռադիկալները մասնակցում են լիպիդների գերօքսիդացման ռեակցիաներում: Թունավորումների ժամանակ, քաղցկեղածին նյութերի և տարբեր սթրեսների առկայության, այդ թվում նաև թթվածնաքաղցի պայմաններում նման ռեակցիաների չափազանց ակտիվացումը խախտում է բջջաթաղանթի պաշտպանիչ հատկությունը, խանգարելով բջիջների կենսագործունեությունը, նպաստելով սրտի, լյարդի, ուղեղի և այլ օրգանների ֆունկցիայի խանգարմանը [3]:

Հայտնի է, որ սպիտակ երեքնուկի ծաղիկները պարունակում են ֆլավոնոիդներ, դաբաղանյութեր, էթերայուղեր, B-խմբի վիտամիններ, կոմարին, ալկալոիդներ և գլիկոզիդներ, ճարպային յուղեր, խեժ: Բույսի տերևները պարունակում են սպիտակուցներ, ճարպային յուղեր, ածխաջրեր, թիրոգին ամինաթթու, A, C, E վիտամիններ, ինչով էլ պայմանավորված է շնչառական անբավարարությունը թեթևացնելու նրա հատկությունը: Այս բույսի հակաօքսիդիչային հատկությամբ է պայմանավորված նաև դրա բուժիչ ազդեցությունը աթերոսկլերոզի, սրտային և երիկամային ծագման այտուցների ժամանակ [6,8]:

Գիտական որոշ հետազոտություններից պարզվել է, որ բջջաթաղանթները պարունակում են չհագեցած ճարպաթթուներ, որոնք անբարենպաստ ազդեցությունների պատճառով գերօքսիդացվում են [3]: Գերօքսիդները կուտակվելով հյուսվածքներում և բջջաթաղանթներում, միանալով ջրի հետ վերածվում են օքսիդների, որոնք էլ անջատում են ակտիվ O_2 : Վերջինս դառնում է նյութափոխանակության խանգարումների և թաղանթների վնասվածքների պատճառ: Գիտական տվյալների համաձայն վիտամին E-ն, որով հարուստ են երեքնուկի տերևները, կապելով այդ O_2 -ը կասեցնում է լիպիդների օքսիդացումը՝ հակազդելով գերօքսիդների թունավոր ազդեցությանը [6]:

Այսպիսով, հետազոտության տվյալները վկայում են այն մասին, որ սպիտակ երեքնուկի ազդեցությամբ թթվածնաքաղցի նկատմամբ օրգանիզմի դիմացկունության բարձրացումը համակարգային մակարդակով (արտաքին շնչառություն) պայմանավորված է բջջային մակարդակով նրա ազդեցությամբ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Թորոսյան Ա.Ա.* Հայաստանի դեղաբույսերը, Երևան, «Հայաստան», 1983, 200 էջ.
2. *Ծատուրյան Թ.Գ., Պետրոսյան Մ.Լ.* Հայաստանի ուտելի վայրի բույսերը, Երևան, «Լուսակն», 2007, 137 էջ.
3. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 142 с.
4. *Законников К.Ф.* Адаптация. Гипоксия. Здоровье. М., 1996, 95 с.
5. *Никифоров В.Н.* Ботулизм. Л., Медицина, 1985, 199 с.
6. *Пишкова О.В.* Действие β-каротина и витамина Е на ксигенотопографию и биоэлектрическую активность нервных клеток. Мат.-лы 209. конф., посвящ. 80-летию со дня рождения проф. Држевецкой И.А. «Физиологические проблемы адаптации». Ставрополь, с. 24-25, 2003.
7. *Темботова И.И.* Действие биоантиоксидантов облепихи крушиновидной на физиологические показатели сердечно-сосудистой системы человека. Канд.дисс. Нальчик, 21с., 2005.
8. *Шаев М.Т., Пишкова О.В.* Адаптационные изменения сердечно-сосудистой системы человека под влиянием природных антиоксидантов. Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова, 90, 8, с. 11-17, 2004.
9. *Smaldone M.C., Maranchie J.K.* Clinical implications of hypoxia inducible factor in renal cell carcinoma. Urol. Oncol., 27, 3, p. 238-45, 2009.

Ստացվել է 30.11.2012



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

КИСЛОТНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С ДНК

А.П. АНТОНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики
arant@ysu.am

Проведена кислотная денатурация комплексов бромистого этидия (БЭ) с ДНК. Получены кривые перехода спираль-клубок ДНК и ее комплексов с БЭ в интервале изменения соотношения концентраций $0 \leq r_b \leq 0.5$, где r_b = лиганд/ДНК при кислых значениях pH и $t = 25^\circ\text{C}$. Выявлено, что по мере возрастания концентрации БЭ точка перехода сдвигается в сторону более низких значений pH. Из кривых денатурации определены значения точки перехода – pH_m и ширины интервала перехода – ΔpH . Выявлено, что в указанных условиях БЭ взаимодействует с ДНК несколькими способами, при этом механизмы связывания этого лиганда одинаковы как при нейтральном, так и при кислых значениях pH раствора.

ДНК – БЭ – кислотная денатурация – точка перехода – ширина интервала перехода

Կատարվել է ՂՆԹ-ի հետ էթիդիում բրոմիդի (ԵԲ) կոմպլեքսների թթվային քնափոխում: Ստացվել են ՂՆԹ-ի և ԵԲ-ի հետ նրա կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման կորերը, որտեղ r_b = լիգանդ/ՂՆԹ կոնցենտրացիոն հարաբերությունների փոփոխության, $0 \leq r_b \leq 0.5$ միջակայքում, pH-ի թթվային արժեքների դեպքում, $t = 25^\circ\text{C}$ պայմաններում: Բացահայտվել է, որ ԵԲ-ի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց պարույր-կծիկ անցման կետը տեղաշարժվում է pH-ի ավելի ցածր արժեքների կողմը: Բնափոխման կորերից որոշվել են անցման կետի՝ pH_m -ի և անցման միջակայքի լայնության (pH-ի արժեքները: Ցույց է տրվել, որ նշված պայմաններում ԵԲ-ն ՂՆԹ-ի հետ փոխազդում է մի քանի եղանակներով, ընդ որում, այս լիգանդի կապման մեխանիզմները միասման են ինչպես լուծույթի pH-ի չեզոք, այնպես էլ թթվային արժեքների դեպքում:

ՂՆԹ – ԵԲ – թթվային հալում – անցման կետ – անցման միջակայքի լայնություն

In present work the investigation of acid-induced denaturation of EtBr complexes with DNA has been carried out. The curves of helix-coil transition of DNA and its complexes with EtBr in $0 \leq r_b \leq 0.5$ concentration ratio change interval have been obtained, where r_b = ligand/DNA at pH acid values and $t = 25^\circ\text{C}$. It has been revealed that in parallel with EtBr concentration increase, the transition point is being shifted to the lower values of pH. The values of the transition point – pH_m and the transition interval width – ΔpH were determined from denaturation curves. It has been revealed that at mentioned conditions EtBr interacts with DNA by several modes, moreover the binding mechanisms of this ligand are similar not only to neutral but also to acid values of pH of solution.

DNA – EtBr – acidic denaturation – transition point – transition interval width

Исследования по взаимодействию низкомолекулярных веществ – лигандов с ДНК представляют большой интерес, поскольку большинство из важнейших биологических процессов жизнедеятельности клетки регулируется ДНК, которая проявляет конформационный полиморфизм, находясь в окружении различных молекул. В ходе реализации генетической информации ДНК меняет свою конформа-

цию в весьма широких пределах в зависимости как от последовательности и условий среды, так и от молекул лигандов, взаимодействующих с ней [1,9]. Известно, что при функционировании ДНК может находиться как в двухцепочечном, так и в одноцепочечном состояниях. Следовательно, можно рассматривать два типа конформационных переходов в ДНК – с разрушением или без разрушения двуспиральной структуры [1,4,9,13,14]. При этом переход из одного конформационного состояния в другое происходит в определенном, не нулевом интервале при изменении какого-либо внешнего параметра, воздействующего на ДНК (температура, pH) [4,8,13-15]. Различные молекулы могут оказывать определенное влияние на эти переходы. В частности, такие красители, как бромистый этидий (БЭ), актиномицин Д (АМД), профлавин (ПФ), Hoechst 33258 (H33258), метиленовый синий (МС) связываются как *in vivo*, так и *in vitro* и влияют на функциональную активность ДНК [5, 6, 11,12,17]. При взаимодействии этих лигандов с ДНК происходит сдвиг точки перехода и одновременно изменяется ширина интервала перехода в зависимости от их концентрации [1, 9, 13].

Целью данной работы явилось исследование влияния кислых pH на переход спираль-клубок ДНК и ее комплексов с БЭ, а также на особенности связывания БЭ с ДНК.

Материал и методика. В работе были использованы следующие препараты: ДНК тимуса теленка фирмы “Sigma” (США), бромистый этидий – БЭ, “Serva” (Германия), NaCl, Na-цитрат (трехзамещенный), HCl, (ос.ч.), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, ос.ч.). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации БЭ и ДНК были определены абсорбционным методом, используя следующие коэффициенты экстинкции – $\epsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК тимуса теленка, $\epsilon_{480}=5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для БЭ. Исследования проводились при концентрации Na^+ 0.02 М и температуре 25°C.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре PVE Unicam-SP8-100 (Англия). Для спектрофотометрических измерений использовали кварцевые кюветы объемом 3 мл, длиной оптического пути 1 см.

pH-титрование проводилось на иономере – универсальный ЭВ-74 (СССР) с электродом измерительным ЭСЛ 63-07. Раствор ДНК и ее комплексов с БЭ титровали 0.2 н HCl, каждый раз добавляя 2 мкл кислоты, перемешивали на магнитной мешалке, после чего регистрировали значение pH. Погрешность измерений pH не превышала ± 0.02 .

Кислотная денатурация комплексов ДНК-БЭ основана на измерении спектров поглощения ДНК при $\lambda=260$ нм и изменении pH (в кислую сторону). При титровании комплексов раствором HCl при $\lambda=260$ нм вклад поглощения кислоты на общую величину этого параметра был незначительным. Кривые перехода спираль-клубок получены по Вардеванян и др. [13].

Результаты и обсуждение. Теоретические и экспериментальные исследования по плавлению комплексов БЭ с ДНК указывают на то, что зависимость изменения ширины интервала плавления – $\delta\Delta T$, ($\delta\Delta T=\Delta T-\Delta T_0$, где ΔT и ΔT_0 ширины интервала плавления ДНК-лиганд комплексов и ДНК соответственно) от концентрации лиганда ($0 < g_b < 0.5$, где g_b – соотношение концентраций БЭ и ДНК соответственно) имеет колоколообразную форму [8,13]. Колоколообразная форма зависимости $\delta\Delta T$ от g_b обусловлена тем, что при низких концентрациях лиганда $\delta\Delta T$ возрастает и, проходя через слабовыраженный максимум, уменьшается, и при соблюдении определенных условий $\delta\Delta T$ может равняться нулю, т.е. ΔT стремится к ΔT_0 [8,13]. Увеличение зависимости $\delta\Delta T$ от g_b при низких концентрациях лиганда является следствием того, что в процессе плавления молекулы БЭ перераспределяются с денатурированных на еще не денатурированные участки ДНК, что в свою очередь обусловлено тем, что БЭ связывается с ней интеркаляционным способом и стабилизирует дц-структуру. При более высоких концентрациях все предпочтительнее на дц-ДНК

места для интеркаляции молекул лиганда насыщаются, и перераспределение в процессе перехода становится невозможным, вследствие чего $\delta\Delta T$ выходит на плато, после чего начинает уменьшаться. При дальнейшем увеличении концентрации лиганда $\delta\Delta T$ опять начинает возрастать (см. [13]). При этом δT_m ($\delta T_m = T_m - T_0$, где T_m и T_0 – температуры плавления комплексов и чистой ДНК соответственно) возрастает, а с определенных значений g_b , где $\Delta T = \Delta T_0$, δT_m начинает уменьшаться [8,13]. Этот эффект не зависит от ионной силы раствора в случае БЭ [8,13]. Это указывает на то, что на механизмы связывания БЭ с ДНК положительные катионы практически не влияют. В то же время величины параметров плавления различаются в зависимости от концентрации Na^+ , что указывает на то, что ионная среда ДНК влияет на ее структуру, вследствие чего могут меняться термодинамические параметры комплексообразования и конформационных переходов нуклеиновой кислоты [8].

Для выяснения влияния рН на термодинамические характеристики взаимодействия БЭ с ДНК нами проведены исследования кислотной денатурации комплексов в интервале изменения соотношения концентраций БЭ/ДНК – $0 \leq g_b \leq 1$ (мольное соотношение) при кислых значениях. Кислые значения рН были выбраны, поскольку при щелочных значениях этого фактора меняется ионная сила раствора в ходе титрования, так как каждый раз в раствор вводятся ионы Na^+ , а это приводит к смещению точки перехода, которая зависит от ионной силы раствора. На рис. 1 приведены кривые перехода спираль-клубок чистой ДНК (1) и ее комплексов с БЭ (2-11) в указанном интервале изменения g_b , полученные при кислых значениях рН. Из рис. 1 видно, что по мере увеличения концентрации БЭ pH_m (точка перехода), сдвигается в сторону более низких значений рН, а также имеет место уширение интервала концентрации $[H^+]$, в пределах которых комплексы переходят в полностью оц- состояние. Из кривых денатурации получены значения pH_m и ΔpH по аналогии с термоиндуцированным переходом. На основании этих величин получены зависимости δpH_m (1) и $\delta \Delta pH$ (2) от g_b , приведенные на рис. 2. Как видно из приведенного рисунка, зависимость $\delta \Delta pH$ от g_b , как и в случае термоиндуцированного перехода, имеет колоколообразную форму. Это указывает на то, что при кислых рН БЭ также проявляет мультимодальность при взаимодействии с ДНК.

При кислых рН ($2.5 \leq pH < 6$) аминогруппы БЭ находятся в полностью протонированном состоянии, при этом несвязанные молекулы лиганда протонированы при $pH \approx 2.5$, а связанные с ДНК молекулы – $pH \approx 5.5$ (см. [7]). Необходимо также отметить, что при $pH \geq 3$ в составе нуклеозидов и нуклеотидов протонируются в основном эндоциклические атомы N_1 аденина и N_3 цитозина, которые участвуют в образовании водородных связей в двухцепочечной ДНК [3]. Исходя из этого, мы полагаем, что эти группы в дц-ДНК не могут протонироваться при значениях $pH \geq 3.5$.

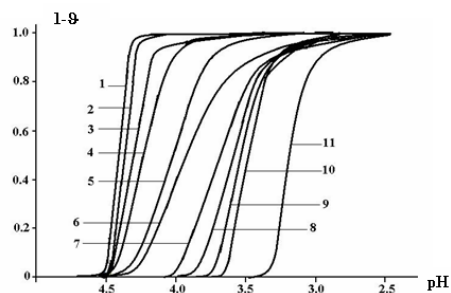


Рис. 1. Кривые перехода спираль-клубок чистой ДНК (1) и ее комплексов с БЭ (2-11) в интервале изменения $2.5 \leq pH \leq 7.0$, при концентрации $Na^+ = 2.0 \cdot 10^{-2} M$, $t = 25^\circ C$, при значениях g : 1–0; 2–0.01, 3–0.013; 4–0.02; 5–0.025; 6–0.04; 7–0.067; 8–0.10; 9–0.20; 10–0.33; 11–1.0.

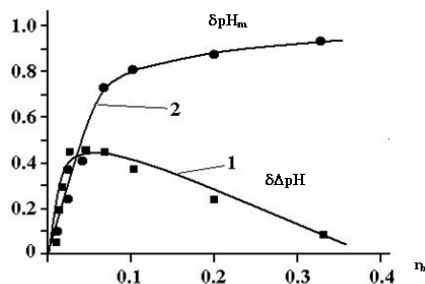


Рис. 2. Кривые зависимости ΔpH (1) и ΔpH_m (2) от r_b в интервале изменения $0 \leq r_b \leq 1$ при $t=25^\circ C$ $\mu=2 \cdot 10^{-2} M Na^+$. Кривые изменения ΔpH_m и ΔpH получены из кривых, приведенных на рис. 1. Зависимость ΔpH от r_b колоколообразная, как и в случае термoinдуцированного перехода.

Основываясь на то, что полученные экспериментальные результаты практически совпадают с таковыми, полученными при термoinдуцированном переходе, можно полагать, что при кислых рН способы связывания БЭ с ДНК не меняются. Следовательно, при низких концентрациях лиганда увеличение ΔpH обусловлено стабилизирующим влиянием БЭ на дц-структуру ДНК, т.е. в этих условиях молекулы БЭ интеркалируют в дц-ДНК. При увеличении концентрации БЭ ΔpH проходит через слабовыраженный максимум ($0,05 \leq r_b \leq 0,1$). По сравнению с термoinдуцированным переходом в этом случае максимум проявляется при относительно низких концентрациях БЭ (см. [13]). Вероятно, места для интеркаляции молекул БЭ в протонированном состоянии более ограничены, и после их насыщения БЭ начинает связываться с ДНК другим (другими) способом. В частности, ранее нами было показано, что БЭ может связываться с ДНК полуинтеркаляционным способом [14,16]. Этот способ обнаруживается и в случае дц-, и в случае оц-ДНК, при этом $K_1/K_2 \approx 2$ (где K_1 и K_2 – соответственно константы связывания БЭ с дц- и оц-ДНК полуинтеркаляционным способом), что указывает на то, что при полуинтеркаляции БЭ проявляет небольшую предпочтительность к дц-ДНК, чем и можно объяснить слабовыраженный максимум на кривой зависимости ΔpH от r_b . С увеличением концентрации БЭ на дц-участках места связывания насыщаются, вследствие чего молекулы лиганда начинают связываться с оц-участками ДНК, дестабилизируя ее, облегчая переход, вследствие чего кривая зависимости ΔpH от r_b начинает уменьшаться. На это указывает и тот факт, что изменение ΔpH_m резко возрастает в интервале $0,05 \leq r_b \leq 0,1$ и претерпевает небольшое изменение при $r_b > 0,1$.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в указанных условиях БЭ взаимодействует с ДНК несколькими способами [2,10,13,16], при этом способы связывания БЭ с ДНК одинаковы как при протонированном, так и при непротонированном состоянии лиганда, так как не наблюдаются изменения в механизмах связывания БЭ и с двухцепочечной, и с одноцепочечной ДНК при нейтральном или кислых значениях рН раствора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардеванян П.О., Антонян А.П. Изучение комплексов ДНК с лигандами различной природы. Биолог. журн. Армении, 62, 3, с. 50-58, 2010.

2. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н. В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. Комплексообразование бромистого этидия с одноцепочечным некомплементарным дезокситетрануклеотидом 5'-d(ApApGpC). Молекулярная биология, 31, 2, с. 263-273, 1997.
3. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М: "Мир", 584с., 1987.
4. Карпетян А.Т., Пермогоров В.И., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. Термодинамические исследования комплексов ДНК с красителями. Молекулярная биология, 6, 6, с. 867-873, 1972.
5. Changlun T., Zhou H., Jianmin W. Interaction between methylene blue and calf thymus deoxyribonucleic acid by spectroscopic technologies. Journal of Fluorescence, 20, p. 261-267, 2010.
6. Hossain M., Giri P., Kumar G.S. DNA intercalation by quinacrine and methylene blue: A comparative binding and thermodynamic characterization study. DNA and Cell Biology, 27, 2, p. 81-90, 2008.
7. Jones R.L., Wilson W.D. Effect of ionic strength on the pKa of ligands bound to DNA. Biopolymers, 20, p. 141-154, 1981.
8. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanyan P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA. J.Biomol. Struct. Dyn., 14, 2, p. 275-283, 1996.
9. Lane A.N., Jenkins T.C. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands. Q. Rev. Biophys., 33, 3, p. 255-306, 2000.
10. Monaco R.R. A Novel Major Groove Binding Site in B form DNA for Ethidium Cation. J Biomol. Struct. Dyn., 25, 2, p. 119-125, 2007.
11. Nafisi Sh., Saboury A.A., Keramat N., Neault J.-F., Tajmir-Riahi H.-A. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. Journal of Molecular Structure, 827, p. 35-43, 2007.
12. Rohs R., Sklenar H. Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: minor groove binding is favored over intercalation. J Biomol Struct Dyn, 21, 5, p. 699-711, 2004.
13. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. Exp. and Mol. Medicine, 33, 4, p. 205-208, 2001.
14. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Torosyan M.A., Karapetian A.T. The Influence of GC/AT Composition on Intercalating and Semi-Intercalating Binding of Ethidium Bromide to DNA. J. Braz. Chem. Soc., 23, 11, p. 2016-2020, 2012.
15. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Boyajyan Z.R., Karapetian A.T. Complex-formation of Ethidium Bromide with Poly [d(A-T)]-Poly[d(A-T)]. J Biomol Struct Dyn, 22, 4, p. 465-470, 2005.
16. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. Experimental and Molecular Medicine, 35, 6, p. 527-533, 2003.
17. Zhu L., Zhao R., Wang K., Xiang H., Shang Zh., Sun W. Electrochemical behaviors of methylene blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence. Sensors, 8, p. 5649-5660, 2008.

Поступила 17.03.2013



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

THE CHANGES OF ERYTHROCYTE MEMBRANES OF WHITE OUTBREED RATS EXPOSED TO ELECTROSTATIC FIELD WITH THE TENSION EXCEEDING THE NATURAL BACKGROUND

G.V. SAHAKYAN, G.A. POGHOSYAN, G.G. ARTSRUNI

Laboratory of Biochemical and Biophysical Investigations, Research Center,
Yerevan State Medical University
gogs@doctor.com

The in vivo influence of 1-hour 200 kV/m electrostatic field (ESF) on the biophysical parameters of rat erythrocyte ghosts is investigated. Studies have shown that ESF influence changes the physicochemical state of ghosts. The field influence results to the lipid-protein intermolecular reorganization in the superficial layer of membrane, increases the strength of association of peripheral proteins with integral proteins and lipid bilayer, and increases the membrane viscosity. Comparison of literature data with the results obtained, allows us to suggest that the investigated factor leads to the redistribution of membrane surface charge, which can be the both a reason or/and a result of revealed changes.

Electrostatic field – erythrocyte ghosts – surface charge

Հետազոտվել է 200 կՎ/մ լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի (ԷՄԴ) 1-ժամյա ազդեցությունը սպիտակ ոչ ցեղային առնետների էրիթրոցիտների ստվերների կենսաֆիզիկական չափանիշների վրա: Ցույց է տրվել, որ ԷՄԴ-ի ազդեցությունը բերում է ստվերների ֆիզիկա-քիմիական վիճակի փոփոխության: Դաշտի ազդեցության հետևանքով մեմբրանի ներքին շերտում տեղի են ունենում սպիտակուց-լիպիդային մոլեկուլային վերադասավորություններ, մեծանում է ծայրամասային սպիտակուցների և լիպիդային երկշերտի միջև առկա կապի ուժը, աճում է թաղանթի մածուցիկությունը: Գրականության տվյալների և հետազոտության արդյունքների համադրումը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ հետազոտվող գործոնը բերում է թաղանթի մակերևութային լիցքի վերաբաշխման, ինչը կարող է լինել ինչպես բացահայտված փոփոխությունների պատճառ, այնպես էլ հետևանք:

Էլեկտրաստատիկ դաշտ – էրիթրոցիտների ստվերներ – մակերևութային լիցք

Исследовано *in vivo* 1-часовое воздействие электростатического поля (ЭСП) напряженностью 200 кВ/м на биофизические параметры теней эритроцитов белых беспородных крыс. Показано, что воздействие ЭСП приводит к изменениям физико-химического состояния теней. В результате воздействия поля происходят липид-белковые молекулярные перестройки на наружном слое мембраны, повышается сила связи периферических белков с липидным бислоем и вязкость мембраны. Сопоставление литературных данных с полученными результатами, позволяют предположить, что исследуемый фактор приводит к перераспределению поверхностного заряда мембраны, что может являться как причиной, так и результатом выявленных изменений.

Электростатическое поле – тени эритроцитов – поверхностный заряд

The analyses of literature data and the results of our previous studies allow us to suggest that the electrostatic fields (ESF) with tensions exceeding the natural background are directly effect the physical and chemical properties of biological macromolecules and

their membrane-like ordered structures [4, 5, 9, 12]. We have advanced a hypothesis, according to which the initial mechanisms of the biological activity of ESF are conditioned by the physical processes on the border of the layers with different electrical conductivity [3]. The cell membrane is a system with obviously expressed borders of components with different electrical conductivity.

In available literature we did not find works testifying the concrete structural reconstructions in native membranes due to the ESF influence, when even the marginal changes of physical parameters of membranes can lead to the extremely considerable changes of their structural-and-functional state.

The presented study tries to make up for this deficiency. This paper introduces the results of analyses of physical parameters of erythrocyte ghosts of rats exposed to one-hour 200 kV/m ESF.

Materials and methods. The erythrocyte ghosts of 150-200 g male outbreed rats, which are preliminary exposed in 200 kV/m ESF during an hour, are served as an object of investigations. The ESF is created using the condenser type device with controlling parameters of the field [2]. Briefly, the chamber, where experimental animals are placed consists of three millimeter organic glass-made cylinder with 1 m diameter and 0.25 m height. The holes on the side walls and on the cover of the chamber ensure the ventilation and water supply. Each chamber is divided into four equal compartments. In each of them 5 rats are kept. The caging is made through a removable cover. In each compartment there is a feeding. The chamber is placed between two round aluminum electrodes of 1.5 m diameter with polished and curling edges to maximize uniform distribution of charges on the electrodes. The lower electrode is fixed and, simultaneously, with its primary function serves as support for an experimental chamber. The upper electrode is movable, which makes possible to adjust the distance between the electrodes and the voltage across the electrodes. In our case, to obtain the tension of 200 kV/m, the constant negative potential of 60 kV was applied on the upper electrode, and the lower electrode was grounded. Electrode spacing was 0.3 m.

Blood of intact animals is prepared by the method of cardio puncture [20]. Within the 7 days, after recovery of hematopoiesis, the same animals are exposed to ESF. Immediately after the influence, the blood is prepared by the above mentioned method. For the avoidance of circadian rhythms, the blood preparation is done in the same time of day.

The isolation of erythrocytes, preparation of their membranes and formation of ghosts was carried out by Dodge method in our modification [7]. Particularly, we have used the solution containing 0.145 M NaCl, 0.02 M Tris/HCl (pH 7.6) for red cell isolation, which allows us to increase the membrane outcome.

The biophysical parameters of erythrocyte ghosts are investigated by spectrophotometric method using the fluorescent probes 1-anilinonaftalene-8-sulfonate (ANS) and pyrene.

ANS is a water-soluble, non-penetrating probe with unit negative charge, which reacts in the sites of protein-lipid connections in the cell surface [10, 14, 19]. The bounding parameters of this probe with membrane are served as indicators for revealing the molecular reconstructions in membrane surface structure.

Pyrene is a hydrophobic, membrane-penetrating probe. The usage of this probe allows determining intramembrane changes, particularly the immersion degree of membrane proteins in lipids, polarity in bilayer, membrane viscosity and microviscosity [11, 15, 16].

For getting the whole picture, fluorescence parameters of ANS and pyrene have measured in the same ghost samples. At the same time, for revealing the role of non-structured proteins in realization of ESF effect, the isolation of erythrocytes and formation of ghosts have carried out in two samples: directly from the mass of erythrocytes after the tree-time washing in Tris-buffer (0.0145 M NaCl in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.6) and from the mass of erythrocytes after the tree-time washing in 0.9 %-NaCl solution.

ANS fluorescence of each ghost-containing sample has measured under the conditions of constant membrane-protein concentration (0.3 mg/ml) by titration with ANS (5-100 μ M), and under the conditions of constant ANS concentration (5 μ M) by titration with different protein concentrations (0.1-0.6 mg/ml). The obtained data have expressed in reversed coordinates, and the

graphics have made by Klotz [19]. The rate constant of reaction (K_c) and the amount of ANS-binding centers (N) have counted by formula of Scetchard [19]. The concentration of proteins in samples is determined by Lowry [13].

The measurement of fluorescent parameters of pyrene expressing the immersion degree of membrane proteins in lipid bilayer was carried out by method described in [18], in accordance to which the isolation of erythrocytes and formation of ghosts have carried out in two samples as described above.

The fluorescence of ghost-containing suspension in $\lambda_{\text{ext}} = 284 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emis}} = 334 \text{ nm}$ is determined for estimation of fluorescence of tryptophanil groups.

The immersion degree of membrane proteins in lipid bilayer is estimated by inductive-resonance mechanism in tryptophanil-pyrene system. Briefly, after the measurement of tryptophanil fluorescence, 30 μl ethanol solution of pyrene with 100 $\mu\text{mol/l}$ end concentration is added to the ghost-containing suspension.

The part of fluorescence of tryptophanil groups arranging at a range not more than one Fester radius calculated by formula: $P = (F_0 - F)/F_0$, where F_0 is a fluorescence of tryptophanil groups before pyrene is added, F is the same parameter after the probe adding expressed in conventional units of fluorescence (CU).

The constant of the degree of relationship between the peripheral proteins with membranes calculated by formula: $K = |(P_1 - P_2)/P_1|$, where P_1 is the value for ghosts obtained from erythrocytes washed in Tris-buffer, P_2 is the same parameter value for ghosts obtained from erythrocytes washed in NaCl solution.

Membrane microviscosity is estimated according to values of ratios I370/ I470, I390/ I470 fluorescence intensities of pyrene in $\lambda_{\text{ext}} = 284 \text{ nm}$. The increase of these parameters in erythrocyte membranes testifies the increase of microviscosity or the decrease of the hydrophobic volume of the zone of protein-lipid contacts [11,15, 16].

The values of ratios I370/ I470, I370/ I470 fluorescence intensities of pyrene in $\lambda_{\text{ext}} = 340 \text{ nm}$ in all investigated samples are measured for estimation of viscosity of lipid bilayer.

The polarity in lipid bilayer is estimated by the I_{370}/I_{390} ratio of pyrene in $\lambda_{\text{ext}} = 340 \text{ nm}$.

All measurements have done in 1cm quartz cuvettes at the room temperature by the spectrometer Hitachi MPF-4 (Japan). The results are expressed in conventional units (CU) of fluorescence.

For each point of measurement the ghosts of erythrocytes isolated from 6 animals are used and each considering point is taken as an average of 10 measurements.

Statistical processing of results is done according to the Student's t-parameter.

Results and Discussion. As stated above, the isolation of erythrocytes and formation of ghosts is carried out in two samples: directly from the mass of erythrocytes after the tree-time washing in Tris-buffer (0.0145 M NaCl in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.6) and from the mass of erythrocytes after the tree-time washing in 0.9%-NaCl solution. The analyses of the results of control samples show that depending on the way of erythrocyte washing the bounding parameters of ANS with the ghosts are changed. So, in the case of washing in NaCl the amount of ANS-bound centers (N) increases by 50.13 % (fig. 1) and the rate constant of reaction (K_c) decreases by 55.26 % (fig. 2) in comparison with the same parameters in the case of Tris-buffer washing. These results allow us suggesting that the NaCl washing of erythrocytes leads to the charge redistribution on the surface of cell membrane, which, on the one hand, brings to the increase of the amount of positive charged centers, which are the targets for ANS bounding. On the other hand, in all probability, the denudation of negative charged groups also takes place, which is clarify the decrease of affinity between ANS and ghosts, consequently K_c .

After 1-hour *in vivo* influence of ESF neither the change of values, nor the change direction of N in investigated samples is revealed compared with control (fig. 1), which testifies that the field influence did not affect the amount of ANS-bound centers.

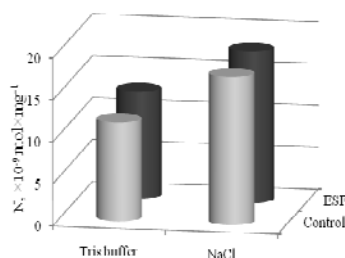


Fig. 1. The amount of ANS-bound centers N the ghosts prepared from the mass of erythrocytes after the washing in Tris-buffer (0.0145 M NaCl in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.6) and from the mass of erythrocytes after the washing in 0.9 %-NaCl solution in control samples and after the 1-hour *in vivo* influence of 200 kV/M ESF; in mol/mg proteins

$$N(\text{Control}_{\text{Tris-buffer}}) = (11.77 \pm 1.54) \times 10^{-9}; N(\text{Control}_{\text{NaCl}}) = (17.67 \pm 4.01) \times 10^{-9}; \\ N(\text{ESF}_{\text{Tris-buffer}}) = (12.77 \pm 1.71) \times 10^{-9}; N(\text{ESF}_{\text{NaCl}}) = (18.04 \pm 2.56) \times 10^{-9}, n=10$$

In accordance with obtained data (fig.2), after the influence of field in Tris buffer-washed erythrocyte ghosts K_c practically does not being changed, while in NaCl-washed ghosts it increased by 223.54 %. Comparing these results and taking into account the fact that ANS is a non-penetrative probe and interacts with membrane in the protein-lipid binding sites [19], we can assume that the influence of the field leads to the intermolecular reconstructions in membrane surface layer; in particular, it changes the interactions of peripheral proteins with integral protein molecules and lipid bilayer. At the same time, since ANS is a negative charged probe and K_c directly depends on the affinity between the interacting molecules, we can suggest that due to ESF influence the membrane charge is redistributed. It can be both the result, and the reason of intermolecular reconstructions in bilayer.

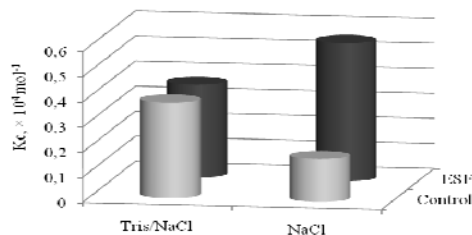


Fig. 2. The rate constant (K_c) of ANS binding reaction with the ghosts prepared from the mass of erythrocytes after the washing in Tris-buffer (0.0145 M NaCl in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.6) and from the mass of erythrocytes after the washing in 0.9 % NaCl in control samples and after the 1-hour *in vivo* influence of 200 kV/M ESF,

$$K_c(\text{Control}_{\text{Tris-buffer}}) = (0.38 \pm 0.05) \times 10^4; K_c(\text{Control}_{\text{NaCl}}) = (0.17 \pm 0.05) \times 10^4; \\ K_c(\text{ESF}_{\text{Tris-buffer}}) = (0.37 \pm 0.11) \times 10^4; \\ K_c(\text{ESF}_{\text{NaCl}}) = (0.55 \pm 0.05) \times 10^4, n=10$$

Erythrocyte-washing in NaCl allows us to reveal the ESF-induced changes, which are not identified in the case of softer treatment of erythrocytes in Tris-buffer. These results, in our opinion, testify about the changes of the relation strength between peripheral proteins and membrane due to the *in vivo* one-hour influence of ESF.

The results of the investigations by use of the membrane-penetrating probe pyrene show that the ESF influence brings to decrease of the immersion degree of membra-

ne proteins in lipid bilayer by 62.58 % (fig.3). In accordance with [18], these results are testified about the increase of the strength of relation between peripheral proteins and membrane, which confirms our above mentioned suggestions.

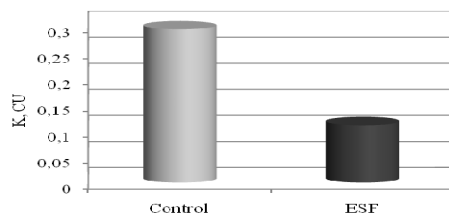


Fig. 3. Immersion degree (K) of peripheral proteins in erythrocyte membranes after the 1-hour in vivo influence of 200 kV/m ESF, CU, $K(\text{Control})=0.294\pm0.04$; $K(\text{ESF})=0.11\pm0.03$, $n=10$

The analyses of microviscosity, viscosity and polarity in the depth of membrane ghosts show that the values of investigated parameters do not depend on the way of the preparation of erythrocytes (tab. 1). As it is shown in the same table, the significance changes of microviscosity and polarity in the depth of membranes do not observed, while the viscosity increased in the both Tris buffer- and the NaCl-washed erythrocyte ghosts by 16.48 % and 14.29% simultaneously in compare with controls.

Table 1. Changes of I_{370}/I_{470} and I_{390}/I_{470} ratios of pyrene fluorescence in the excitation wavelength $\lambda=285$ nm and I_{370}/I_{470} , I_{390}/I_{470} and I_{370}/I_{390} in the excitation wavelength $\lambda=340$ nm after the 1-hour in vivo influence of 200 kV/m ESF in the ghosts-containing solutions prepared from the mass of erythrocytes after the washing in Tris-buffer (0.0145 M NaCl in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.6) and from the mass of erythrocytes after the washing in 0.9 % NaCl, * $p<0.05$

λ	$\lambda_{\text{emission}}$	285 nm		340 nm		340 nm
	$\lambda_{\text{extinction}}$	I_{370}/I_{470}	I_{390}/I_{470}	I_{370}/I_{470}^*	I_{390}/I_{470}	I_{370}/I_{390}
Control	Tris-buffer	3.69 ± 0.49 $n=10$	3.25 ± 0.43 $n=10$	0.91 ± 0.01 $n=10$	1.19 ± 0.18 $n=10$	0.79 ± 0.07 $n=10$
	NaCl	3.41 ± 0.48 $n=10$	3.46 ± 0.56 $n=10$	0.91 ± 0.01 $n=10$	1.18 ± 0.18 $n=10$	0.79 ± 0.08 $n=10$
ESF	Tris-buffer	3.54 ± 0.52 $n=10$	3.61 ± 0.53 $n=10$	1.06 ± 0.09 $n=10$	1.355 ± 0.09 $n=10$	0.78 ± 0.06 $n=10$
	NaCl	3.99 ± 0.71 $n=10$	3.78 ± 0.44 $n=10$	1.04 ± 0.01 $n=10$	1.215 ± 0.14 $n=10$	0.86 ± 0.08 $n=10$

In accordance with literature data, ESF-influence leads to the changes of lipid component and cholesterol/phospholipids ratio in liposomes and nature membranes [17, 21, 6, 8, 22]. It is also well known that the proteins adsorbed on the membrane surface scientifically acted on the structural and functional state of lipid environment of the integral proteins.

The comparison of observed changes of membrane viscosity with the literature data allows us to testify that, apparently, the lipid component of membranes is changed due to the ESF-influence, which can be both the result and the reason of the increase of immersion degree of peripheral proteins into the lipid bilayer. So, supposing that the redistribution of membrane surface charge takes place under the ESF-influence, which in its turn changes the conformation of peripheral proteins and, as a result, its immersion degree into the lipid bilayer increases and leads to the increase of membrane viscosity.

On the other hand, the field influence can change the lipid component of membranes [1], which in its turn can cause the redistribution of membrane surface charge and, as a result, the immersion of peripheral proteins can be changed.

Probably, both processes occur simultaneously, but it is impossible to differentiate the contribution of each of the processes on the base of the results of present study. But we can say with confidence that the investigated factor leads to the redistribution of erythrocyte membrane surface charge, which can be a reason or a result of changes we revealed.

The carried out investigations show that the one-hour *in vivo* influence of 200 kV/m ESF leads to the changes of physical and chemical state of rat erythrocyte ghosts. Particularly, the lipid-protein intermolecular reconstructions occur on the membrane surface, the viscosity of membrane and the strength of relation between peripheral proteins and lipid bilayer are increased.

REFERENCES

1. *Andelman D.* Electrostatic Properties of Membranes: The Poisson-Boltzmann Theory. In book: B.V. Handbook of Biological Physics edited by R. Lipowsky and E. Sackmann, Elsevier Science, 1, 603-641, 1995.
2. *Artsruni G.* The chamber for investigation of the influence of electrostatic fields on the small laboratory animals, ID card on the efficiency suggestion. № 134, 1983.
3. *Artsruni G.* The mechanisms of the biological activity of electrostatic fields. Med. Sci. of Armenia. XL, 3, 70-80, 2000.
4. *Brown G.C.* Electrostatic coupling between membrane proteins. FEBS Lett., 15, 260, 1, 1-5, 1990.
5. *Budi A., Legge F.S., Treutlein H., Yarovsky I.* Electric field effects on insulin chain-B conformation. J. Phys. Chem. B., 109, 47, 22641-22648, 2005.
6. *Change S.* Electric-field-induced volume and membrane ionic permeability changes of red blood cells. IEEE transactions on biomedical engineering, 40, 10, 1054-1059, 1993.
7. *Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.* The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. and Biophys., 100, 1, 119-130, 1963.
8. *Donath E., Arndt R.* Electric-Field-Induced Fusion of Enzyme-Treated Human Red Cells: Kinetics of Intermembrane Protein Exchange. Gen. Physiol. Biophys., 3, 239-249, 1984.
9. *English N. J., Solomentsev G.Y., O'Brien P.* Nonequilibrium molecular dynamics study of electric and low-frequency microwave fields on hen egg white lysozyme. J. Chem. Phys., 131, 3, 318-428, 2009.
10. *Horie T., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano M. J.* 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate binding site on human erythrocyte membrane using fluorescence lifetime and polarization. Pharmacobiodyn, 5, 2, 73-80, 1982.
11. *Isuev A.R.* Stage-specific changes in membrane microviscosity in *Misgurnus fossilis* embryos. Russian Journal of Developmental Biology, 40, 4, 232-237, 2009.
12. *Lecuyer S., Fragneto G., Charitat T.* Effect of an electric field on a floating lipid bilayer: A neutron reflectivity study. Eur. Phys J E Soft Matter., 21, 2, 153-159, 2006.
13. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randal R. J.* Protein measurements with the Folin phenol reagent. Biol. Chem., 193, 1, 265-275, 1951.
14. *McLure J.A., Birkett D.J., Elliot D.J., Williams J.A., Rowl A., Miners J.O.* Application of the Fluorescent Probe 1-Anilino-8-naphthalene-8-Sulfonate to the Measurement of the Nonspecific Binding of Drugs to Human Liver Microsomes. Drug Metabolism and Disposition, 39, 9, 1711-1717, 2011.
15. *Nandy P., Choudhury M.D., Chakrabarti P.* Effect of sealing on the incorporation of pyrene in goat erythrocyte ghosts – A fluorescence study. J. Biosci. 5, 2, 163–166, 1983.
16. *Novitskii V.V., Stepovaya E.A., Batukhtin A.V., Gol'dberg V.E., Kolosova M.V.* Erythrocyte membranes in patients with malignant tumors as shown by fluorescent probing. Bulletin of Experimental Biology and Medicine., 128, 2, 857-859, 1999.

17. *Sahakyan G.V., Batikyan T.B., Artsruni G.G.* The influence of electrostatic fields on structural and functional state of epididymal spermatozooids. *The New Armenian Medical J.*, 2, 4, 75-84, 2008.
18. *Tereshchenko S. J., Prohorenkov V., Prahin E.* Patent of Russian Federation, № 2187112, 2002.
19. *Vladimirov Yu. A., Dobrecov G.E.*, In book: Fluorescence probes in the investigation of biological membranes, Moscow, Nauka, 1980.
20. *Weis H.J., Baas E.U.* Cardiopuncture in the rat for repeated sampling of blood and injection. *Z. Gesamte. Exp. Med.*, 156, 314-316, 1971.
21. *Wilkea N., Maggio B.* Effect of externally applied electrostatic fields on the surface topography of ceramide-enriched domains in mixed monolayers with sphingomyelin. *Biophysical Chemistry*, 122, 1, 36-42, 2006.
22. *Zimmermann U.U.* The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: Fundamentals and applications. In: U. Zimmermann, G.A. Neil (Eds.), *Electromanipulation of Cells*, CRCPress, Boca Raton, Florida, 1996.

Received on 24. 09.2012



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

THE EFFECT OF SEVERAL L- AMINO ACIDS ON THE INACTIVATION PROCESS OF *RANA RIDIBUNDA* ADULT FROG LIVER ARGINASE

A.S. SHAMIRIAN, E.KH. BARSEGHYAN, M.A. DAVTYAN

Yerevan State University, Department of Biochemistry
anna_sh86@yahoo.com

The effect of 8 L-amino acids (alanine, valine, leucine, isoleucine, γ -aminobutyric acid, lysine, proline, ornithine) on the *Rana ridibunda* adult frog liver arginase limited trypsinolysis process was studied. The results revealed that under the influence of trypsin at 20°C after 20 hours L-alanine has appeared as one of the most potent protector of liver arginase. Accordingly, the other 5 amino acids are considered as competitive protectors. It is notable, that L-lysine and L-ornithine increase the sensitivity of studied enzyme towards proteolytic inactivation by trypsin.

Limited trypsinolysis – proteolytic sensitivity – ureotelic arginase

Ուսումնասիրված է 8 L-ամինաթթուների (ալանին, վալին, լեյցին, իզոլեյցին, γ -ամինա-կարագաթթու, լիզին, պրոլին և օրնիտին) ազդեցությունը *Rana ridibunda* հասուն գորտերի լյարդի սահմանափակ տրիպսինոլիզի ընթացքի վրա: Ցույց է տրված, որ տրիպսինի 20 ժ ազդեցության դեպքում 20°C-ում հետազոտվող ֆերմենտի համար լավագույն պաշտպանիչ է հանդիսացել L-ալանինը իսկ մասնակի պաշտպանիչներ են՝ L-վալինը, L-պրոլինը, L-լեյցինը, L-իզոլեյցինը և γ -ամինակարագաթթուն: Հատկանշական է, որ L-լիզին և L-օրնիտինը փորձի նույն պայմաններում բարձրացնում են ֆերմենտի զգայնությունը տրիպսինով պրոտեոլիզի նկատմամբ:

Սահմանափակ տրիպսինոլիզ – պրոտեոլիտիկ զգայնություն – ուրեոթելիկ արգինազ

Изучено влияние 8 L-аминокислот (аланин, валин, лейцин, изолейцин, γ -аминомасляная кислота, лизин, пролин, орнитин) на процесс ограниченного трипсинолиза аргиназы печени взрослых лягушек *Rana ridibunda*. Показано, что после 20 ч воздействия трипсина при 20°C для изучаемого фермента лучшим протектором являлся L-аланин, частичными протекторами были лейцин, пролин, изолейцин, валин и γ -аминомасляная кислота, а лизин и орнитин повышали чувствительность фермента к протеолизу трипсином.

Ограниченный трипсинолиз – чувствительность к протеолизу – уреотелическая аргиназа

The inhibition of arginase activation by several amino acids has been investigated in detail long ago. Subsequently it has been approved that almost all L-amino acids have minor inhibitory effect on several mammals purified liver arginase [5, 6]. The investigation of bovine liver arginase inhibition by different amino acids revealed, that ornithine, lysine, leucine, isoleucine, valine and proline have significant inhibitory effect, in the case when alanine and histidine cause a slight impulsive effect on studied enzyme activity. According to the authors, the inhibitory effect of amino acids depends on carbon chain length and only L-isomers of amino acids have this influence [4]. Likewise, authors reached the similar results about *Rana ridibunda* frog liver arginase [1, 2]. The studied amino acids inhibitory effect is due to the changing in the α -amino groups' protonation constant values or in α -carboxyl groups and enzyme active site binding [8].

In this study, we attempt to investigate the effect of several amino acids (alanine, valine, leucine, isoleucine, γ -aminobutyric acid, lysine, proline, ornithine) on the sensitivity of *Rana ridibunda* frog liver ureotelic arginase towards proteolytic inactivation.

Materials and methods. *Rana ridibunda* Pallas adult frogs are served as a research object. The study was approved by the ethics committee of the Biochemistry Department of YSU and implemented in accordance with the Helsinki convention related to animal studies. The *Rana ridibunda* frog liver arginase preparations final concentration is 5 %, which were prepared by distilled water. The absorbance of protein was measured in a spectrophotometer (Genesys 10S UV-VIS) at 280 nm. The molecular weights of fragments were determined by Gel-filtration method (Sephadex G-200, Uppsala, Sweden). The equilibration and elution was done with buffer solution containing 0.005 mol glycine-NaOH (pH=7.4) at 25°C, elution velocity is 20 ml per hour.

Marker proteins (urease, alcohol dehydrogenase, human serum albumin, pepsin, trypsin and ribonuclease) are used for determining the molecular masses. During the experiments we used purified, chymotrypsin free trypsin preparations, which was added by 1 mg/ml concentration to 5% enzyme preparation. After 20 hours the reaction stopped by soybean antitrypsin, with 0.2% concentration in the solution. We used L-ornithine, L-lysine HCL and γ -aminobutyric acid, leucine, isoleucine, valine, proline and alanine amino acids, respectively, 0.38 mM of amino acids per 1 ml of studied sample.

Results and Discussion. In this study, we have investigated the inhibitory effects of the studied amino acids on liver arginase proteolytic inactivation. Prior to data collection, all samples were incubated for 30 min in 20°C in the presence of corresponding amino acids. The results are presented in tab. 1 and fig. 1-8.

Tab. 1. The effect of several amino acids on the proteolytic inactivation process of *Rana ridibunda* adult frog liver arginase, n=5

Amino acid	Molecular weights of fragments					№ of fragments
Limited trypsinolysis without amino acid	62000	40000	33000	13700		4
L-alanine	86600	37500				2
L- isoleucine	53000	48800	33700			3
L- leucine	30800	21700	16700			3
L- valine	86600	48800	19900			3
γ -aminobutyric acid	53000	33700	16700			3
L- proline	48800	16700	12300			3
L- ornithine	86600	62600	48800	33700	16700	5
L- lysine	86600	62600	48700	33700	19900	5

According to the results obtained we can assume, that several L-amino acids protect the liver arginase from inactivation by trypsin. During the limited proteolysis a number of amino acids, including L-valine, L-leucine, L-isoleucine, γ -aminobutyric acid and L-proline consider the beneficial inhibitors of liver arginase (fig.1-5). Thus, enzyme pre-incubation by these amino acids before trypsinolysis decrease the number of derived fragments. Comparing the number of fragments in limited trypsinolysis without and by studied amino acids can be observed, that in preparation without amino acids after trypsinolysis appeared 4 fragments, while quantity of fragments decreases to 3 in preincubated samples by mentioned amino acids, which is considered as the result of inhibitory activity of L-amino acids.

Intriguingly, L-alanine (fig. 6) appears as one of the most potent protectors of liver arginase during the limited trypsinolysis. Therefore, after enzyme pre-incubation by alanine appeared only 2 fragments with 86000 and 37500 Da molecular weights. It is notable that, the stabilizing effect of alanine is reflected not only in the number of derived fragments likewise in the molecular weights of them. Presumably, alanine is considered a protector or surrender during the limited trypsinolysis by protecting trypsin sensitive bound on the surface of arginase.

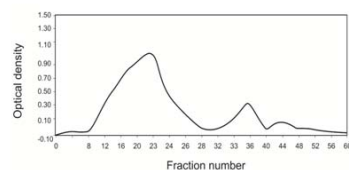


Fig.1. The effect of L-leucine on the limited trypsinolysis process

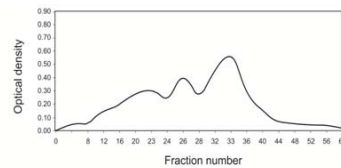


Fig.2. The effect of L-isoleucine on the limited trypsinolysis process

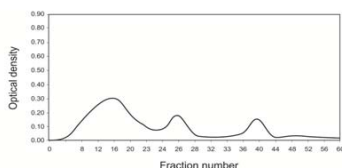


Fig.3. The effect of L-valine on the limited trypsinolysis process

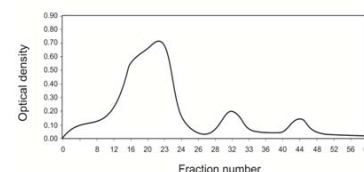


Fig.4. The effect of γ -aminobutyric acid on the limited trypsinolysis process

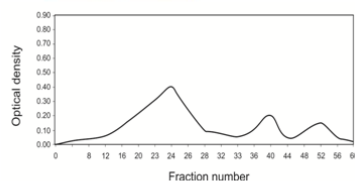


Fig.5. The effect of L-Proline on the limited trypsinolysis process

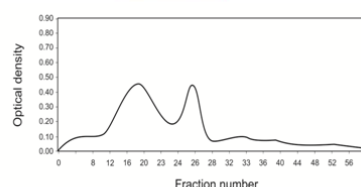


Fig.6. The effect of L-alanine on the limited trypsinolysis process

The other amino acids are either without effect or much weaker inhibitors of arginase, such as, frog liver arginase pre-incubation by L-ornithine and L-lysine (fig. 7, 8) which are considered as competitive inhibitors of frog liver arginase and as our attempts revealed simultaneously increase the sensitivity of enzyme towards trypsinolysis, producing minor changes in the proteolysis results. Therefore, the number of derived fragments has increased to 5.

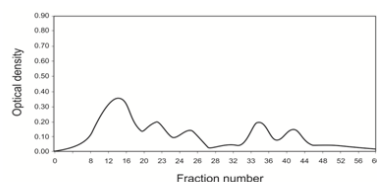


Fig.7. The effect of L-lysine on the limited trypsinolysis process

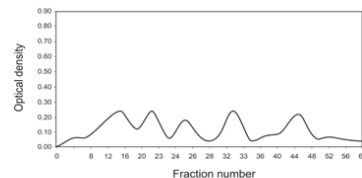


Fig.8. The effect of L-ornithine on the limited trypsinolysis process

Thus, we conclude that our results correspond with the studies relating to rat liver arginase, where the inhibitory effect of the studied amino acids toward arginase has previously been investigated by electron paramagnetic resonance method. According to the results obtained by EPR studies [7], arginase inhibitors divide into two classes which differ by their interactions with enzyme active site. A number of inhibitors, including ornithine, citrulline and isoleucine which belong to the same class do not bind directly to the manganese cluster of arginase.

These amino acids producing insignificant change in arginase EPR intensity and presumably interact with the recognition regions of active site for the alpha-aminocarboxylate groups of the substrate, which are located near the protein surface. The second class of inhibitors, including L-lysine, N ω -hydroxy-L-arginine (NOHA) and L-arginine (substrate) induce extensive changes in the EPR intensity and probably directly interact with dimanganese cluster of arginase. N ω -hydroxy-L-arginine (NOHA) is an intermediate in the nitric oxide synthase-catalyzed oxidation of L-arginine to L-citrulline and nitric oxide, and it is also a competitive inhibitor of arginase [3]. According to suggested model, occurred deprotonation of the side-chain ϵ amino group of L-lysine or N amine atom transfer from arginine to the His141 residue, afterwards nitrogen neutral atom bind to the manganese ion in order to replace one of its ligands [7].

In conclusion, we note that almost all the studied 6 L-amino acids have protective effect and more or less protect the frog liver arginase from proteolytic inactivation. Exemptions are lysine and ornithine, which according to the authors are classified in different class of inhibitors and have distinct effect mechanisms [7]. However, they have the same effect on the *Rana ridibunda* frog liver arginase proteolytic inactivation process, which probably depends on the adult frog liver arginase structural characteristics.

REFERENCES

1. Арируни Н.А., Барсегян Э.Х., Давтян М.А. Сравнительное изучение аргиназы печени лягушек *R. ridibunda* до и после метаморфоза. Биолог. журнал. Армении, 54, 1-2, с. 3-8, 2002.
2. Барсегян Э.Х. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность аргиназ различного происхождения. Тезисы конференции молодых ученых, посвященной 60-летию образования СССР, Ереван, 1982.
3. Cama E., Pethe S., Boucher J., Han S., Frances A., Ash D.E., Ronald E., Mansuy D., and David W.C. Inhibitor Coordination Interactions in the Binuclear Manganese Cluster of Arginase. *Biochemistry*, 43, p.8987-8999, 2004.
4. Carvajal, N.; Cederbaum, S.D. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, 870, p.181-184, 1986.
5. Colletuori D.M., and Ash, D.E. Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochemistry*, 40, p.9356-9362, 2001.
6. Ilies M.; Di Costanzo L.; North M.L.; Scott J.A.; Christianson D.W. 2-Aminoimidazole amino acids as inhibitors of the binuclear manganese metalloenzyme human arginase I. *J. Med. Chem.*, 53, p.4266-4276, 2010.
7. Khangulov S.V., Sosong T.M., Ash D.E., Dismukes G.C. L-Arginine binding to liver arginase requires proton transfer to gateway residue His141 and coordination of the guanidinium group to the dimanganese (II,II) center, *Biochemistry*, 37, p.8539-8550, 1998.
8. Subrahmanyam T.S., Reddy S.R., L-ornithine and L-lysine need their alpha-carboxyl groups for effective inhibition of bovine liver arginase. *Indian J. Biochem. Biophys.* 6, p.359-61, 1986.

Received on 22. 11.2012



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

THE HYDROGEN PEROXIDE AS A POSSIBLE MESSENGER FOR 4HZ MECHANICAL VIBRATION TREATMENT OF HEART MUSCLE CONTRACTILITY

E.H. DADASYAN

UNESCO Chair-Life Sciences International Postgraduate Educational Center
edh21_b@yahoo.com

It was shown that MV increased the melting duration (polarization) of PS by $21.33 \pm 4\%$, and decreased the H_2O_2 concentration in PS by $5 \pm 0.9\%$. MV-treated PS increased amplitudes of heart muscle. On the basis of the obtained data it is suggested that MV-induced increase of heart muscle contraction's amplitudes is due to decrease of H_2O_2 concentration in cell bathing medium.

Mechanical vibration – heart muscle contractility – H_2O_2

Ցույց է տրվել, որ 4 Հց մեխանիկական տատանումների ազդեցությամբ տեղի է ունենում ֆիզիոլոգիական լուծույթի հալման տևողության մեծացում $21.33 \pm 4\%$ -ով և H_2O_2 -ի կոնցենտրացիայի նվազում $5 \pm 0.9\%$ -ով: Մեխանիկական տատանումներով մշակված ֆիզիոլոգիական լուծույթը խթանել է սրտամկանի կծկողունակությունը: Ստացված տվյալներից ենթադրվում է, որ սրտամկանի կծկողունակության խթանումը մեխանիկական տատանումների ազդեցությամբ կատարվում է H_2O_2 -ի կոնցենտրացիայի նվազման շնորհիվ:

Մեխանիկական տատանումներ – սրտամկանի կծկողունակություն – H_2O_2

Было показано, что механическая вибрация продливает период плавления физиологического раствора на $21.33 \pm 4\%$, уменьшает концентрацию H_2O_2 на $5 \pm 0.9\%$. После воздействия механической вибрации увеличивается амплитуда сократимости сердца. Предполагается, что увеличение амплитуды сократимости сердца под влиянием механической вибрации происходит благодаря уменьшению концентрации H_2O_2 в жидко-клеточной среде.

Механическая вибрация – сократимость мышцы сердца – H_2O_2

In our previous works it was shown that Mechanical Vibration (MV) has a frequency dependent effect on physicochemical properties of water and water solutions, which is accompanied by gas composition changes (decreasing CO_2 and increasing O_2) [1, 2, 11]. These changes were more pronounced at the 4Hz (30dB) frequency. The 4 Hz MV-treated water and water solutions have modulation effects on plant seed germination [4], microbes' growth and development [11, 12] and heart muscle contractility [5, 6]. However, the nature of the messenger(s) able to transfer the MV-induced changes of physicochemical properties of cell bathing medium to the intracellular metabolic cascade, as well as the metabolic pathway, through which the biological effect of MV is being achieved are not clear yet. It is known that the water dissociation products collision with soluble oxygen could generate the reactive oxygen species (ROS) [7, 8, 9, 13]. Therefore it is suggested that MV-induced changes of water dissociation could bring to the changes of hydrogen peroxide (H_2O_2) (ROS with the longest life time) content in cell bathing medium, which would modulate the cell metabolic activity. To check this hypothesis the effect of 4Hz 30dB MV on melting process of Physiological Solution (PS) after freezing in nitrogen (N_2) liquid, and H_2O_2 concentration in PS was studied.

Materials and methods. A special device was assembled, which allowed treating the PS by MV in range of 1–20 Hz frequency. A glass test tube with 10 mm diameter and 10 ml volume was fixed in the holder of the vibrator. The vibrator was driven by the sine-wave generator (PASCO, CA, USA) through the power amplifier.

To obtain the stable amplitude for vertical vibration, a feedback coil was used. The vibrator was constructed in the department of engineering at UNESCO Chair–Life Sciences International Postgraduate Educational Center. For matching the output power of the sine-wave generator with the driving power vibration, a special power amplifier (Institute of Radiophysics and Electronics Armenian NAS, Yerevan, Armenia) was used.

The snail (*Helix Pomatia*) isolated hearts were cannulated and suspended in bath with PS (pH 7.5). The PS contained: NaCl (80 mM), KCl (4 mM), CaCl_2 (7 mM), Tris-HCl (5 mM). Continuously the intra- and extra-heart perfusion with PS was applied. The intra-cordial pressure was controlled by keeping the perfusion solution in reservoirs vessel at a constant level. To record the heart contraction, a special setup was constructed (fig. 1). The transducer was fixed on the bottom of the heart by a silk suture. Up and down movements of the records baseline showed the heart contraction and relaxation, correspondingly.

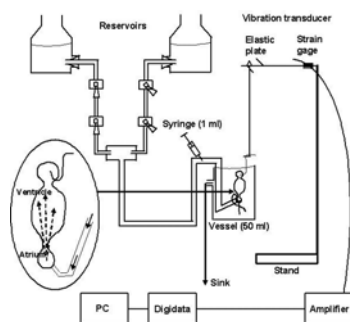


Fig.1. The setup for the registration of heart muscle contractility. Heart contractions were recorded isotonicly and displayed on PC through Digidata 1322A.

The melting duration of frozen PS samples was estimated by the following method: the 15-min MV-pretreated samples (per 0.5 ml) were placed in a hermetic plastic tube (volume 1 ml) that had a thermo-sensor at the bottom. Then, the tube was inserted into the Dewar vessel containing liquid N_2 for deep freezing (up to -75°C). After withdrawing from the liquid N_2 , the tube was left to melt in the thermostat at $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ condition. The temperature of the samples was recorded during the melting process by extra-sensitive thermometer Biophys-TT (elaborated by the Institute of Radiophysics and Electronics of Armenian NAS, Yerevan, Armenia) connected to PC through Digidata 1322A data acquisition system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The data were analyzed by dataTrax 2-computer software.

The quantity of H_2O_2 in PS samples was determined by the method of sensitive assay based on enhanced chemiluminescence in peroxidase-luminol-p-iodophenol system [11], which allowed detecting the H_2O_2 content at a range of nanomolar concentrations. The chemiluminescence of samples was quantified with 1450 MicroBeta liquid scintillation and luminescence counter Wallac-1450. For luminescence counting, the 24-well sample plates (1450-402) set on 1450-102 cassettes was used. The ratio of sample's and "counting solution"s volumes in each well of plate was 1:1 (v/v). The "counting solution" contained 10 mM Tris-HCl buffer (pH = 8.5), 50 μM p-iodophenol, 50 μM luminol, and 1 nM horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). The "counting solution" was prepared immediately prior to the measurement. The H_2O_2 concentration in nM was quantified according to the calibration curve.

The Sigma-Plot (Version 8.02A) was used for the data analysis.

The mean value and standard error of H_2O_2 concentration, were calculated and the statistical probability was determined by Student's paired t-test with the help of the computer program Sigma-Plot (Version 8.02A). The statistical probability was expressed on figures with the help of asterisks (*).

Results and Discussion. Previously it was shown that 4Hz MV has more pronounced modulation effect on physicochemical properties of water [1, 2]. In present work the effect of 4 Hz MV on melting duration of after freezing in liquid N₂ and H₂O₂ content as well as 4 Hz MV-treated PS effect on snails heart muscle contractions were studied.

It is known that the melting duration of water solution depends on its polarity, which determines by the quantity of hydrogen bounds between water molecules [10]. As can be seen on (fig. 2), 4 Hz MV has more pronounced effect (20±2%) on melting duration of PS than 5 Hz and 3 Hz MV have.

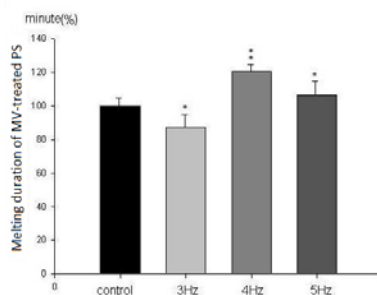


Fig.2. Melting duration of 15 min. MV-treated PS at 3Hz, 4Hz, 5Hz frequencies (expressed in %, compared to their control value). *P<0.05, **P<0.001.

Four Hz MV-induced increase of melting duration of PS could be explained by depression of water and electrolytes' molecules dissociation. In consequence the decrease of dissociation products of water molecules would decrease the possibility of the oxygen molecules collision with them and would depress the H₂O₂ formation.

To check this suggestion, in the next series of experiments the effect 4 Hz of MV on the H₂O₂ level in PS was studied.

Data presented on fig. 3, show that 4 Hz MV treatments has a decreasing effect on H₂O₂ content in PS (fig. 3A). As the H₂O₂ contents in cell bathing PS depends on both, its formation and degradation, it was interesting to perform the same experiments in isolated snail heart containing PS (fig. 3B).

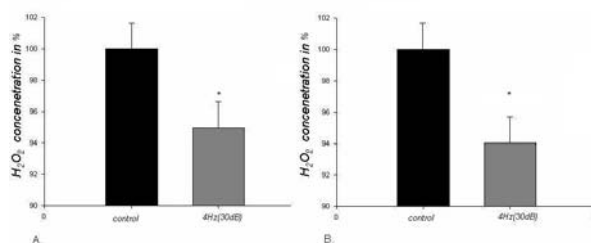


Fig.3. (A and B). The measurement of H₂O₂ in 15 min 4Hz (30 dB) MV-treated PS (A) and in heart containing MV-treated PS (B). (expressed in %, compared to their control value). *P<0.05.

Thus, the obtained data indicate on 4 Hz MV-induced depressing effect on H₂O₂ formation in PS. To find out weather such MV-induced decrease of the H₂O₂ in PS could serve as a potential messenger, through which MV could modulate the heart muscle contractility or not, in the next series of experiments the effect of MV -treated PS on heart muscle contractility was studied. Obtained data show that 4Hz MV exposure causes to the decrease of H₂O₂ level in heart containing PS more (6±1.2%) (fig. 3B) as

compared with heart-free PS ($5 \pm 0.9\%$) (fig. 3A), which probably could be explained by the increase of H_2O_2 -destroying enzymes in muscle or by heart muscle-induced structural changes of PS. For the final conclusion we need more detailed investigations.

One of the typical recordings of 10 experiments shows that 4 Hz MV-treated PS has clearly pronounced increasing effect on the amplitude of heart contractions (fig. 4). It is worth to note that in all our experiments, the MV-induced activation of heart muscle contractility has trace effect, the elucidation of which needs more detailed study. For elucidating if the observed MV-induced stimulating effect of muscle activity is the direct result of modulation of the metabolic activity of muscle or not, the similar protocol of experiments was performed in cold ($+10^\circ C$) PS (fig. 4B). As can be seen on (fig. 4B), the MV-treated PS-induced effect on heart muscle contractility was temperature insensitive. Therefore the comparative insensitivity of MV-treated PS effect on muscle contractility allows us to suggest on non metabolic nature of the mechanism(s) responsible for observed effect of MV-treated PS on muscle.

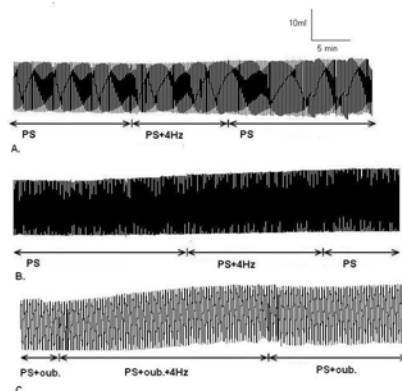


Fig.4. The effect of 15 min. 4Hz (30dB) MV-treated PS on the heart muscle contractility at room temperature (A), in cold medium ($10^\circ C$) (B), and in ouabain containing PS ($10^{-4}M$) (C).

For clarifying the role of Na^+/K^+ ATP-ase in realization of MV effect on heart muscle contractility, in the next series of experiments, the effect of MV-treated ouabain (inhibitor of Na^+/K^+ ATP-ase) containing PS ($10^{-4} M$) and MV-treated K-free PS effects on heart beating was studied. As can be seen on one of typical records of 10 experiments, the MV-treated PS effect on heart contractility was insensitive to pump inhibitor-ouabain. Same data was observed in case of K-free induced pump inhibition (data are not presented). The data of present experiments performed in MV-treated ouabain (inhibitor of Na^+/K^+ ATP-ase) containing PS ($10^{-4} M$) (fig. 4C), and in MV-treated K-free PS (data are not presented) indicate to the non sensitivity of 4Hz MV-treated PS-induced effect on Na^+/K^+ pump. In all experiments MV-induced activation of heart muscle contractility had trace effect and it was necessary to perfuse heart by non treated PS longer than 30 min to remove this effect.

The obtained data allow us to make the following conclusions:

1. MV leads to decrease of H_2O_2 concentration in cell bathing medium as a result of depression of water molecules dissociation.
2. MV-treated PS increases the amplitude of heart muscle contractility.

REFERENCES

1. *Akopian S, Ayrapetyan S.* A study of the specific conductivity of water exposed to constant magnetic field, electromagnetic field, and low-frequency mechanical vibration. *Molecular Biophysics*, 50, 255–259, 2005.
2. *Ayrapetyan S.* Cell aqua medium as a preliminary target for the effect of electromagnetic fields. In: Ayrapetyan S & Markov M (Eds), *Bioelectromagnetics: Current concepts* The Netherlands: NATO Science Series. Springer Press: pp. 31– 64, 2006.
3. *Amyan A, Ayrapetyan S.* On the modulation effect of pulsing and static magnetic fields and mechanical vibrations on barley seed hydration. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 36, 69–84, 2004.
4. *Ayrapetyan S, Stepanyan R, Ayrapetyan G, Mikaelyan N.* Effect of mechanical vibration of the perfusing solution on the contractile activity of the perfused snail heart. *Biophysics*, 44, 895–900, 1999.
5. *Ayrapetyan G, Grigoryan A., Dadasyan E, Ayrapetyan S.* The comparative study of the effects of 4 Hz Electromagnetic Fields-, Infrasound-treated and hydrogen peroxide containing physiological solutions on Na pump-induced inhibition of heart muscle contractility. *The Environmentalist*, 27, 483–488, 2007.
6. *Chaplin, M.F.* Water Structure and Behavior. Available via <http://www.lsbu.ac.uk/water>, 2005.
7. *Domrachev G, Rodigin Yu, & Selivanovsky D.* Role of sound and liquid water as dynamically unstable polymeric system in mechano-chemically activated processes of oxygen production on Earth. *J. Phys. Chem.*, 66, 851–855, 1992.
8. *Gudkova O, Gudkov S, Gapeyev A, Bruskov V. Rubanik A, Chemeris N.* The study of the mechanisms of formation of reactive oxygen species in aqueous solutions on exposure to high peak-power pulsed electromagnetic radiation of extremely high frequencies. *Biofizika*, 50, 773–779, 2005.
9. *Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K., Chernikov A.V.* Heat induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res.*, 30, 1354–1363, 2002.
10. *Kireev V.* Physical Chemistry. English translation: Higher School Publishing House Moscow, 1968.
11. *Այրապետյան Դ.Ս., Տեփանյան Բ.Ս., Արաքելյան Ա.Դ., Այրապետյան Շ.Ն.* Действие механической вибрации на электропроводность воды, *Биофизика*, 44, 197–202, 1999.
12. *Այրապետյան Շ.Ն., Տեփանյան Բ.Ս., Օհանեսյան Դ.Դ., Բարսեղյան Ա.Ա., Ալաверդյան Զ.Ր., Արաքելյան Ա.Դ., Մարկոսյան Լ.Ս.* Влияние механических колебаний на жизнедеятельность Лоп-мутантного штамма *Escherichia coli* K-12. *Микробиология*, 70, с.248–252, 2001.
13. *Классен В.* Омагничивание водных систем. изд. М. Химия, 296 с. English translation: (EBAB) *European Biology and Bioelectromagnetics*, 1, 2, pp 201–220, 1982, 2006.

Received on 03.08.2012



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

О САМОСТОЯТЕЛЬНОСТИ ВИДА *ERODIUM* *SOSNOWSKIANUM* FED. (*GERANIACEAE*)

Р.Г. АДАМЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра ботаники и микологии
radatyan@ysu.am

На основании дополнительного исследования макроморфологических признаков, включая признаки строения семени и плода, обоснована самостоятельность вида *Erodium sosnowskianum* Fed.

Erodium sosnowskianum – *E. armenum* – Geraniaceae – морфология – семя – плод – вид

Erodium sosnowskianum Fed. տեսակի ինքնուրույնությունը հաստատվում է մակրոմորֆոլոգիական հատկանիշների լրացուցիչ հետազոտություններով՝ ներառյալ սերմի և պտղի կառուցվածքի հատկանիշները:

Erodium sosnowskianum – *E. armenum* – Geraniaceae – սերմ – պտուղ – տեսակ

The independence of the species *Erodium sosnowskianum* Fed. is confirmed on the additional research of macromorphological characteristics, including the characteristics of the structure of the seed and fruit.

Erodium sosnowskianum – *E. armenum* – Geraniaceae – morphology – seed – fruit – species

Систематическое положение вида *Erodium sosnowskianum* Fed., ввиду значительного морфологического сходства и частичного перекрытия ареалов с видом *E. armenum* (Trautv.) Woronow, оставалось спорным. Вид *Erodium sosnowskianum* был описан Федоровым в 1941 году [5]. Однако при обработке рода *Erodium* для многотомного издания “Флора СССР” Введенский [2] не указывает его в составе рода. Обработывая сем. Geraniaceae для монографического издания “Флора Армении” Аветисян [1] принимает этот вид в качестве самостоятельного. Позднее, при обработке рода *Erodium* для флоры Кавказа Новоселовой [3] не удалось изучить тип вида *E. sosnowskianum* и, основываясь на описании вида, приводимого Федоровым, она сочла целесообразным рассматривать его в качестве синонима вида *E. armenum*. Что касается последнего, то первоначально он был описан Траутфеттером [4] в качестве разновидности вида *E. absinthioides* Boiss., а в 1912 году Воронов [6] возвел его в ранг самостоятельного вида.

Позднее Девис [7] снова понизил его ранг до подвида. При этом во “Flora Iranica” [8] данный вид вообще не приводится, но позднее во “Flora of Iran” трактовка вида принимается по Воронову [9].

При исследовании отдельных вегетативных и генеративных органов у этих растений, нами были обнаружены существенные различия, обосновывающие самостоятельность вида *E. sosnowskianum*. Изучались образцы из гербария ERE (Институт ботаники НАН РА), ERCB (ЕГУ) и собственные сборы *E. armenum* (рис. 1). Исследовался также типовой экземпляр *E. sosnowskianum*, который хранится в гербарии Института ботаники НАН РА (рис. 2).

Вид *E. sosnowskianum* характеризуется как приземистое растение с толстым корневищем, вверху покрытым черноватыми чешуевидными остатками отмерших черешков. Стебли тонкие, несколько ветвистые, 5-10 см дл., покрытые рассеянными отклоненными волосками с примесью железистых. Прикорневые и стеблевые листья двояко перисторассеченные, в основании продолговатые, черешковые, верхние – почти сидячие, 4-7 см дл., 1-1,5 см шир. Дольки многочисленные, линейные. Прилистники продолговатые, рыжеватые, опушенные. Соцветие малоцветковое зонтичное. Цветки мелкие, лепестки фиолетовые с узким ноготком. Чашелистики яйцевидные, с ясно заметными жилками, по краю белопленчатые, густо железисто опушенные, на вершине почти без остроконечия, тычинки при основании расширенные, почти голые, пыльники желтые, в три раза короче нитей. Обитает у подошвы потухшего вулкана Зиарет Агмаганского (Гегамского) хребта, на альпийских пастбищах [5].

Таким образом, одним из отличительных признаков является жизненная форма растений, у *E. sosnowskianum* стебли менее развиты и не достигают 10 см, тогда как у *E. armenum* довольно хорошо развитые, хоть и немногочисленные. Растения различаются также степенью опушения. Стебли вида *E. armenum* покрыты отстоящими, более густыми волосками, тогда как *E. sosnowskianum* слабоопушенное растение. Меньшим количеством цветков в соцветии отличается вид *E. sosnowskianum*. Хорошим диагностическим признаком является размер ости чашелистика (рис. 3а). У вида *E. sosnowskianum* они почти безостые, а у вида *E. armenum* ость 1-2 мм. Створки плода у *E. sosnowskianum* прижатопушенные, в отличие от *E. armenum* (рис. 3б).

Нами установлены следующие диагностические признаки для *E. armenum*: семена бурые, сморщенные, мелкочапчатые, крупные, 4 мм, цилиндрической формы, а для *E. sosnowskianum* – грязнооранжевые, гладкие, мелкие 2,7 мм и конусовидные (рис. 3в).

Ниже приводится ключ для определения этих двух видов.

1. Сильноопушенное растение с длинными, вниз обращенными волосками. Соцветие из 5-6 цветков, чашелистики с короткой остью. Семена бурые, крупные, 4 мм, сморщенные, цилиндрической формы, мелкочапчатые. Выс. 10-30 см.

E. armenum (Trautv). Woronow.

– Слабоопушенное растение, чашелистики безостые. Семена грязно оранжевые, мелкие, 2,7 мм, конусовидные, гладкие. Выс. 5-10 см.

E. sosnowskianum Fed.

E. sosnowskianum Fed. 1941, Заметки по сист. и геогр. раст. Тбил. бот. инст. 10:58. – Журавельник Сосновского.

VI-VIII. 2400 (2600) – 4095 м. На альпийских лугах. – Араг., Гег. - Кавказ (Южн. Закавказ.). Эндемик Армении. Описан с подошвы потухшего вулкана Зиарет Гегамского хребта.

Typus: "Habitat ad pedem vulcanis Ziaret jugi Aghmaghanensis. In pascuis alpinis. Anno 1938 die 26 Julii mensii lecta." ERE !

Is.: Not. Syst. Geogr. Inst. Bot. Tphil. 1941, f.10 :59, Fig. 1.

E. armenum (Trautv.) Woronow 1912, в Тр. Бот. Сада. 28: 432. Ej. 1910, в Мат. Фл. Кавк. III, 7: 110. – *E. absintoides* Boiss. 1867, var. *armena* Trautv. 1873, Тр. Бот. Сада. 2: 517; – *E. absinthoides* Boiss. 1867, subsp. *armenum* (Trautv.) Davis 1967, Notes Roy. Bot. Card. Edinburgh 28, 1: 36. **Ж. армянский.**

VI-VII. 1200-2300 м, 2300-4095 м. От среднего до верхнего горных поясов. На субальпийских и альпийских лугах. – Идж., Шир., Араг., Апар., Севан., Ерев., Гег., Дар. – Кавказ (Южн. Закав.). Сев. – вост. Турция, Иран. Описан из Армении (г. Арагац).

Typus: "In Armenie monte Alagoz" Radde LE.

Is.: Фл. Арм. 1973б, 6: 229, табл.СII.



Рис. 1. *Erodium armenum*

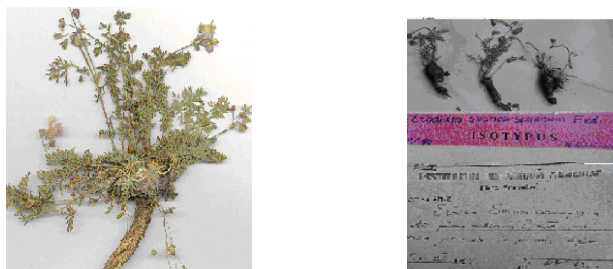


Рис. 2. *E. sosnowskianum*



Рис. 3. 1 – *E. armenum*, 2 – *E. sosnowskianum*. Чашелистики (а), плоды (б), семена (в).



Карта распространения: -▲ *E. sosnowskianum*, △ - *E. armenum*

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аветисян Е.М.* Сем. Geraniaceae. Флора Армении. Ереван, 6, 211-230, 1973.
2. *Введенский А.И.* Род *Erodium*. Флора СССР. М.: Л., 14, 1-72, 1949.
3. *Новоселова М.С.* Род *Erodium* во флоре Кавказа. Бот. журн., 83, 5, 107-112, 1998.
4. *Траутфеттер Р.Э.* *Erodium absinthoides* W. Тр. Имп. С.-Петер. бот. сада. С.-Петер., 2, вып. 1, 517, 1973.
5. *Федоров А.А.* Четыре новых вида растений флоры Армении. Заметки по сист. и геогр. раст. АН СССР. Грузинский филиал ТБИ, вып. 6, 58-60, 1941.
6. *Busch N.A., Marcowicz B.B., Woronow G.N.* *Erodium armenum* (Trautv.) Woronow. Труды Императорского С.-Петер. бот. сада. С.-Петербург, 28, 432, 1912.
7. *Davis P.H.* *Geraniaceae*. Flora of Turkey and East Aegean Island. Edinburg, 2, 451-487, 1967.
8. *Schonbeck-Temesy E.* Geraniaceae. Flora Iranica. N 69/30, 1, 67 p., 1970.
9. *Janighorban M.* Geraniaceae. Flora of Iran. N 62, 86-88, 2009.

Поступила 04.10.2012



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

**К КОЛЛЕКЦИИ РОДА *AGRIOTES* ESCHSCHOLTZ, 1829
(COLEOPTERA, ELATERIDAE, ELATERINAE) ИНСТИТУТА
ЗООЛОГИИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЗООЛОГИИ И
ГИДРОЭКОЛОГИИ НАН РА**

М.А. МАРДЖАНЯН, А.А. АВЕТИСЯН

*Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА, Институт зоологии
mmarjanyan@yahoo.com*

В статье дается список 25 видов рода *Agriotes* Eschscholtz, 1829 коллекций Института зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА, с учетом новых таксономических и хронологических данных. Четыре вида впервые указываются для фауны Армении. Дана таблица видов рода с прямыми параметрами, включающая 11 видов.

Род Agriotes – коллекции – список видов

Հոդվածում տրվում է 25 ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոնի Կենդանաբանության ինստիտուտի հավաքածուների *Agriotes* սեռի 25 տեսակների ցուցակ՝ նոր կարգաբանական և տարածվածության տվյալներով: Հայաստանի ֆաունայի համար չորս տեսակը նշվում է առաջին անգամ: Սեռի 11 տեսակների համար՝ ուղիղ պարամետրերով բերվում է որոշիչ աղյուսակ:

Agriotes սեռ – հավաքածուներ – տեսակների ցուցակ

The list of 25 species of the genus *Agriotes* Eschscholtz, 1829 deposited in the collection of Institute Zoology of SCZH NAS of Republic Armenia with some taxonomical and chorological data is given. Four species are new for Armenian fauna. Key to the species with straight parameres including 11 species is proposed.

Genus Agriotes – collection – check-list of species

Род *Agriotes* Eschscholtz, 1829 казался одним из сравнительно хорошо изученных групп семейства щелкунов (Coleoptera, Elateridae) [1,2], в частности, и из-за заметного хозяйственного значения некоторых входящих в него видов. По данным Каталога жесткокрылых Палеарктики [4] род насчитывает более 150 видов, из них около 20 представлены на Кавказе. За последние 2 десятилетия описаны многочисленные виды [5-18], в частности, из ранее малоизученных регионов – Ближнего Востока, Кавказа, Турции, Ирана, Средней Азии. Это побудило нас к пересмотру коллекции видов рода *Agriotes* Института зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА. Коллекция частично была определена рядом специалистов; в 1970 году часть их была определена Е.Л. Гурьевой. Ее определения послужили сравнительным материалом в ходе нашей работы по изучению рода. При определении спорных видов мы консультировались с С.М. Яблоковым-Хнзоряном, В.Г. Долиным, Е.Л. Гурьевой и глубоко им признательны.

Выражаю искреннюю благодарность коллегам Дж. Платиа и М.Ю. Калашяну за предоставление информации и материала.

Материал и методика. Материалом для работы послужили жуки рода *Agriotes*, находящиеся в коллекциях Института зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА.

Длина тела измерялась по продольной оси, ширина – по самой широкой части тела, по отдельности измерялись длина и ширина переднеспинки и надкрылий, при этом длина переднеспинки измерялась без ее задних выступающих углов. Совокупительную сумку с пластинками и эдеагус для их очистки от тканей держали в растворе КОН от 3 до 12 ч.

Результаты и обсуждение. Коллекции видов рода *Agriotes* Института зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА содержат сборы с конца 19 века из разных пунктов Палеарктики, в дальнейшем они пополнялись экземплярами из разных пунктов Кавказского региона и Средней Азии (С.М. Яблоков-Хнзоян, М. Марджанян, М. Калашян и др.). Ниже приводим список видов рода *Agriotes* коллекции; для Армении приводятся только данные, не указанные в нашей монографии [3]. Сведения об общем распространении видов могут быть найдены в Каталоге жесткокрылых Палеарктики [4] и в первоописаниях [7, 12]. Виды, впервые указываемые для фауны Армении, отмечены знаком *.

Список видов рода *Agriotes*

1. *A. ustulatus* Schaller, 1783 - Dalmatia; Dalmatia, Cattaro.
2. *A. gallicus* Lacordaire, 1835 – Dalmatia.
3. **A. starcki* Schwarz, 1891- Armenia, Erivan, leg. Dobrovljanski; Armenia, Erivan, 7.07.1914, leg. A. Schelkovnikov - new to Armenia.
4. *A. gurgistanus* Faldermann, 1835 - Armenia, Aghartsin, 15.07.1995, leg. M. Kalashian.
5. *A. informis* Schwarz, 1891- Tadjikistan, Dushanbe, Kafirnigan, 11.06.1975, leg. M. Mardjanian.
6. *A. lineatus* Linnaeus, 1767- Armenia, Goris, Tatev, 21.05.1988, leg. M. Kalashian; Armenia, Ranchpar, 30.06.2011, leg. M. Kalashian.
7. *A. proximus* Schwarz, 1891 - Elizavethpol, Adzhikent.
8. **A. proximoides* Platia, Furlan & Gudenzi, 2002 - Armenia, Tavush, Semenovka, 02.-27.07.2005, soil trap leg. M. Kalashian; Armenia, Tsakhkadzor, 09.06.1978; Armenia, Erivan, Dzorsk.(canyon), Maljushenco - new to Armenia.
9. *A. obscurus* Linnaeus, 1758 - Armenia, Erivan, leg. Dobrovljanski, 1908.
10. *A. sputator* Linnaeus, 1758- Armenia, Garni, 22-26.06.2000, leg. M. Kalashian.
11. *A. brevis* Candèze, 1863- Armenia, Sisian, 21.05.1988, leg. M. Kalashian; Armenia, Tatev, 21.05.1988, leg. M. Kalashian; Armenia, Verin Talin, 22.06.1992, M. Akhverdian.
12. *A. radula* Desbrochers des Loges, 1875 - Iran.
13. *A. tadjikistanicus* Gurjeva, 1967 - Iran.
14. *A. infuscatus* Desbrochers des Loges, 1870 - Republic of Mountain Karabagh, Martakert distr., env. Vardadzor, 595 m, 11-12.05.2012, Kalashian leg.
15. *A. meticulous* Candèze, 1863 - Armenia, Hatsavan, 22.06.2004, leg. M. Kalashian; Armenia, Ranchpar, 20.06.2011, leg. M. Kalashian.
16. *A. lapicida* Faldermann, 1835.

17. *A. integricollis* Reitter, 1911-Armenia, Aparan, Ria-Thaza, 2050 m, 25.08.2007, leg. M. Kalashian.
18. *A. bagheri* Platia, Furlan & Gudenzi, 2002.
19. **A. iranicus* Platia, Furlan & Gudenzi, 2002 - Armenia, Merdzavan, 27.04.1975, leg. Mardjanian; Armenia, Merdzavan, 27.04.1973, leg. Mardjanian; Armenia, Armavir (Oktemberyan), 07.06.1951, leg. G. Avakian; Armenia, Ranchpar 20.06.2011, leg. M. Kalashian - new to Armenia.
20. *A. medvedevi* Dolin, 1960 - Iran.
21. *A. pilosellus* (Schoenherr), 1817.
22. *A. tauricus* Heyden, 1882- Armenia, Kochbeks (Vorotan) pass, 30.07.1963, leg. Khnzorian S.M.
23. *A. litigiousus* P. Rossi, 1792.
24. *A. turcicus* Candeze, 1863.
25. *A. platiai* Kabalak & Sert, 2009 - Turkey, Iran.

Последние 4 вида характеризуются прямыми параметрами, без бокового зубца. Для Кавказского региона и сопредельных стран ранее было указано 7 видов группы, в результате фаунистических и таксономических исследований (7, 11, 14, 18) описаны еще 4 вида. Назрела необходимость обобщения материала, ввиду этого ниже приводим определительную таблицу для 11 видов {включая европейский вид *A. litigiousus* (Rossi)} с прямыми параметрами, с учетом признаков, указанных в первоописаниях, литературных и собственных данных. В определительную таблицу не включен недавно описанный вид *A. tekirdagensis* Platia, 2012 (12), согласно описанию, он габитуально сходен с *A. solai* Platia, 2004, "отличается от него более удлиненным эдеагусом и строением последнего видимого стернита брюшка, который в вершинной трети треугольно изогнут"; оба вида описаны из Турции.

**Определительная таблица видов (с прямыми параметрами)
рода *Agriotes* Eschscholtz, 1829 фауны Кавказа и сопредельных стран**

- 1 (20) Все стерниты брюшка одноцветные.
- 2 (19) Задние углы переднеспинки с четким килем.
- 3 (18) Переднеспинка сходной длины и ширины или чуть длиннее ширины.
- 4 (11) Надкрылья в 2.7–3.0 раза длиннее ширины, одноцветные, без рисунка; боковой кант переднеспинки у середины сглажен или слегка прерван.
- 5 (8) 2-й членик усиков в 1.5 раза длиннее ширины; боковой кант у середины сглажен; киль задних углов переднеспинки сильно приподнят и длинный; переднеспинка с округлыми боками.
- 6 (7) Щиток в 1,5 раза длиннее ширины; задние углы переднеспинки слабо-расходящиеся. Тело от черно-каштанового до коричневого, надкрылья светлороскожные. Длина 9–14 мм.....1. *A. tauricus* Heyden.
- 7 (6) Щиток в 2 раза длиннее ширины; задние углы переднеспинки сильно-расходящиеся. Такой же окраски как и предыдущий. Длина 9–13 мм.....
.....2. *A. litigiousus* (Rossi).
- 8 (5) 2-й членик усиков более чем в 1.5 раза (1.7–2) длиннее ширины; боковой кант переднеспинки у середины слабо прерван; киль задних углов переднеспинки слабо приподнят и короткий; переднеспинка параллельно-бокая.

- 9 (10) 2-й членик усиков в 1.7–1.9 раза длиннее ширины; переднеспинка в 1,14 раза длиннее ширины. Черный, надкрылья иногда светлокорицевые, усики и ноги красноватые. Длина 8–11 мм, ширина 2.5 мм.
.....3. *A. turcicus* Candeze.
- 10 (9) 2-й членик усиков в 2.0 раза длиннее ширины; переднеспинка сходной длины и ширины. Черный, надкрылья светло или темнокорицевые, слабоблестящие. усики и ноги красноватые. Длина 13.4 мм.
Распространение – Иран.....4. *A. danieli* Platia & Nemeth, 2011.
- 11 (4) Надкрылья в 2.4–2.6 раза длиннее ширины, одноцветные, обычно с рисунком, реже без него; боковой кант переднеспинки цельный; киль задних углов переднеспинки параллельный боковому краю.
- 12 (17) Междуярдья плоские, четко шероховатые.
- 13 (16) Надусиковые кили не достигают переднего края лба. Надкрылья и эпиплевры в основном желтые, с коричневой каймой у бокового края, усики и ноги желтые.
- 14 (15) 3-й и 2-й членики усиков сходной длины, цилиндрические.
Длина 8.0–11 мм.....5. *A. lundbergi* Platia, 1989.
- 15 (14) 3-й членик чуть длиннее 2-го. Длина 10.0–11.0 мм.
.....6. *A. adlbaueri* Platia & Schimmel, 1992.
- 16 (13) Надусиковые кили достигают переднего края лба. Голова, переднеспинка черные, надкрылья светло- или темнобурые или краснотемнобурые, усики и лапки красноватые. 2-й – 3-й членики усиков сходные, цилиндрические; киль задних углов переднеспинки нежный. Длина 8.4–9.7 мм.....7. *A. audisioi* Platia & Schimmel, 1992.
- 17 (12) Междуярдья слабывыпуклые, шероховато точечные; надкрылья в 2.4 раза длиннее переднеспинки. Длина 10 мм. Одноцветно черный или темнотемнобурый, усики и ноги красноватые.....8. *A. turkmenicus* Platia & Gudenzi, 1999.
- 18 (3) Переднеспинка поперечная в 1.18 раза шире длины; 2-й-3-й членики усиков сходной длины, 2-й членик слабоцилиндрический, 3-й – конический. Надусиковые кили почти не достигают переднего края лба. Междуярдья плоские, в нежной точечности; вершины надкрылий слабодышащие. Темнотемнобурый; щиток, надкрылья светлотемнобурые, ноги – красноватые. Длина 9.9 мм, ширина 2.84 мм. Распространение – Таджикистан.....9. *A. gurjevae* Platia, 2010.
- 19 (2) Задние углы переднеспинки со следом кия. 2-й -3-й членики усиков сходные, 2-й членик чуть длиннее ширины. Надусиковые кили не достигают переднего края лба. Щиток сходной длины и ширины, нежно точечный; надкрылья в 2.6 раза длиннее переднеспинки. Черный, слабоблестящий, усики, ноги – красноватые. Длина 12.5 мм, ширина 3.2 мм.....10. *A. solai* Platia, 2004.
- 20 (1) Последний стернит брюшка двуцветный, в вершинной 1/2 красно-желтый; 2-й членик усиков в 1.15–1.2 раза длиннее 3-го; переднеспинка параллельнобокая, в 1.1–1.2 раза длиннее ширины, диск редко точечный, киль задних углов четкий проходит вдоль ее бокового края; надкрылья в 2.1 раза длиннее переднеспинки. Одноцветно черный, усики и ноги красно-желтые. Длина 9.62 мм–10 мм, ширина 2.71 мм.....11. *A. platiai* Kabalak & Sert, 2009.

Таким образом, в результате пересмотра коллекции рода *Agriotes* Eschscholtz Института зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА выявлено

25 видов, из них 16 характерны для фауны Кавказского региона, 4 вида европейские, 2 вида средиземноморско-туранские, 1-туранский, 1-турецко-иранский, 1-иранский. Впервые для фауны Армении отмечены 4 вида.

Кроме этих видов, выявлен ряд видов, вероятно, новых для науки, из Кавказского региона, Ирана и Средней Азии. Уточнение их статуса и, при необходимости, описание предполагается дать в отдельной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурьева Е.Л. Фауна СССР. Жуки-щелкуны (Elateridae). Подсемейство Elaterinae. Трибы Megapenthini, Physorhinini, Ampedini, Elaterini, Pomachiliini. Л. Наука, 1979.
2. Долин В.Г., Атамуратов Х.И. Жуки-щелкуны (Elateridae) Туркменистана. Киев. Ин-т зоологии НАН Украины. 1994.
3. Марджанян М.А. Фауна Армянской ССР. Щелкуны (Elateridae). Ереван, Изд.АН Арм. ССР, 1987.
4. Cate P.C. Family Elateridae. In: Loeb I. & Smetana A. (eds.). Catalogue of Palearctic Coleoptera, 4, Elateroidea – Derodontoidea – Bostrichoidea – Lymexyloidea – Cleroidea. Apollo Books Stenstrup. 2007.
5. Cate P.C. & Platia G. New species of Agriotes Eschscholtz (Coleoptera, Elateridae) from Greece, Turkey and Syria. Z.Arb.Gem.Ost.Ent., 49, 109-113, 1997.
6. Guglielmi A. & Platia G. Contributo alla ciniscenza degli Elateridi di Grecia e Turchia. Frag. Entomol. Roma, 18, 1, 169-224, 1985.
7. Kabalak M. & Sert O. A new Agriotes species (Coleoptera, Elateridae) from Turkey. Turk.J.Zool., 33, 451-455, 2009.
8. Platia G. Descrizione di nuove specie di Elateridi della Grecia e della Turchia (Coleoptera, Elateridae). Lavori – Societa Veneziana di Scienze Naturali, 14, 1, 79-86, 1989.
9. Platia G. Nuovi Elateridi d'Europa, Turchia & Qatar con note tassonomiche e geonemiche su alcune specie (Coleoptera, Elateridae). Boln.Sociedad Entomologica Aragonesa (S.E.A.), n. 38, 39-45, 2004.
10. Platia G. New species and chorological notes of click beetles from the Palaearctic Region, especially from the Middle East (Coleoptera, Elateridae). Boln. S.E.A., n. 48, 23-49, 2010.
11. Platia G. Descriptions of fourteen new species of click beetles from the Palearctic Region, with chorological notes (Insecta, Coleoptera, Elateridae). Quaderna di Stadi e Notizie di Storico Naturale della Romagna, 30, 103-130, 2010.
12. Platia G. Descriptions of ten new species of click beetles from the Palearctic Region, with new distributional records (Coleoptera, Elateridae). Boln. S.E.A., n. 50, 199-207, 2012.
13. Platia G., Furlan L., Gudenzi I. Descrizione di sei nuove specie di Elateridi dell'Iran (Insecta, Coleoptera, Elateridae). Naturalista Valtellinese – Atti Mus.civ.Stor.nat. Morbegno, 13, 65-77, 2002.
14. Platia G. & Gudenzi I. Descrizione di sei nuove specie di Elateridi della regione paleartica con note geonemiche e sinonimiche (Insecta, Coleoptera, Elateridae). Quaderno St.Not.Stor.Nat.Romagna, 11, suppl., 17-31, 1999.
15. Platia G. & Nemeth T. On some Palaearctic click beetles deposited in the Hungarian Natural History Museum (Coleoptera, Elateridae). Ann.Hist.- Nat.Mus.Nat.Hung., 103, 65-106, 2011.
16. Platia G., Jansson N., Avei M., Sarikaja O., Coskin M., Kayis T. New species of click beetles from Turkey (Coleoptera, Elateridae). Boln.S.E.A., n. 48, 207-215, 2011.
17. Platia G. & Schimmel R. Descrizione di sei nuove specie di Elateridi di Grecia e Turchia (Coleoptera, Elateridae). Lavori – Soc.Venez.Sci.Nat. 17, 87-95, 1992.
18. Platia G., Schimmel R., Tarnawski D. Description of two new species of Agriotes Eschscholtz of the Agriotes nuceus – group from Turkey with chorological notes (Insecta, Coleoptera, Elateridae). Genus, 20, 2, 243-248, 2009.

Поступила 31.10.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՐՊԵՍ ԾԱՆՐ ՄԵՏԱՂՆԵՐՈՎ ԱՐՏՈՏԿԱԾ ՀՈՂԵՐԻ ԻՆՔՆԱՎԵՐԱԿԱՆՈՒՄԱՆ ԱՍՏԻՃԱՆԻ ՑՈՒՑԱՆԻՇ

Կ.Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

Երևանի պետական լսարան, Էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոն
G.Karlen@mail.ru

Բացահայտվել է, որ հողի ֆերմենտների ակտիվության մակարդակը կարելի է օգտագործել որպես ծանր մետաղներով աղտոտված հողերի ինքնավերականգնման աստիճանի արտոնորոշիչ ցուցանիշ:

Աղտոտված հողերի ինքնավերականգնում – ծանր մետաղներ – ֆերմենտների ակտիվություն

Выявлена возможность использования уровня активности ферментов в качестве диагностического показателя степени самообновления почв, загрязненных тяжелыми металлами.

Самообновление загрязненных почв – тяжелые металлы – ферментативная активность

The possibility of using of enzyme activity level as a diagnostic indicator of the degree of self updating of soils contaminated with heavy metals is revealed.

Self updating of contaminated soils – heavy metal – enzyme activity

Ավալերդու տարածաշրջանում նախկինում կատարված ուսումնասիրությունները ցույց են տվել (1989թ.), որ Դեբեդ գետի ուժեղ աղտոտված ջրերով անտառային դարչնագույն տափաստանացված հողերի ոռոգման դեպքում ծանր մետաղների պարունակությունը բազմակի բարձր է խտությունների թույլատրելի սահմաններից, որի արդյունքում կտրուկ ճնշվել էր հողերի ֆերմենտային ակտիվությունը կտրվածքի ամբողջ խորությամբ (աղ. 1) [3, 4]:

Աղտոտված հողերի վարելաշերտերում չաղտոտվածների համեմատությամբ ֆերմենտների ակտիվությունը նվազել էր 34-68%-ով, ինվերտազինը՝ 60, ֆոսֆատազինը՝ 44, ուրեազինը՝ 34, կատալազինը՝ 68%: Ֆերմենտային ռեակցիաների արագության նվազումը պայմանավորված էր առաջին հերթին հողում ծանր մետաղների շատ բարձր պարունակությամբ, աղտոտված ջրերով ոռոգման ժամանակ՝ հողի քիմիական կազմի, ֆիզիկական և ֆիզիկաքիմիական հատկությունների փոփոխություններով: Այդ ազդեցություններն այնքան ուժեղ էին, որ այստեղ հողառաջացման գործընթացն ընթանում էր դրանց քայքայման ուղղությամբ: Պետք է նշել, որ աղտոտված ջրերը հողերի ֆերմենտային ակտիվության վրա ազդում են անուղղակի ճանապարհով [2,4]:

Նույն տարածաշրջանում, նույն հողերի վրա կատարված ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ստեղծված նոր պայմաններում նկատվում է այլ պատկեր:

1989թ. Ավալերդու պղնձամետալուրգիական գործարանը տնտեսական ճգնաժամի արդյունքում առաջացած ֆինանսական դժվարությունների և շուկայի բացակայության պատճառով որոշ ժամանակ դադարել էր աշխատել և կրկին գործարկվել է 1997թ., իսկ ներկայումս գործարկվում է ոչ ամբողջ հզորություններով: Այդ ամենի արդյունքում բարելավվել է Դեբեդ գետի ջրերի և դրանցով ոռոգվող անտառային դարչնագույն տափաստանացված հողերի նախկինում գոյություն ունեցող էկոլոգիական վիճակը:

Ներկայումս Թումանյանի տարածաշրջանի անտառային դարչնագույն տափաստանացված հողերի ոռոգման համար օգտագործվում են Դեբեդ գետի մասնակի մաքրված ջրերը: Այդ ջրերով ոռոգման դեպքում չի սպասվում հողերի լրացուցիչ աղ-տոտում:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունները կատարել ենք դաշտային և լաբորատոր վերլուծությունների մեթոդով: Հողի տիպի սահմաններում կտրվածքները դրվել են նույն մշակաբույսերի տակ: Հիմնական կտրվածքներից հողի նմուշները վերցրել ենք 2009 թ.՝ ըստ գենետիկական հորիզոնների: Արտաբջջային ֆերմենտների ակտիվությունը որոշել ենք թարմ օդաչոր հողերում ունիֆիկացված մեթոդներով [2]: Ինվերտազ ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտել ենք մգ գլյուկոզ 1գ հողի հաշվարկով, մեկ օրում: Ֆոսֆատազինը մգ P 100 գ հող, 30 ր: Ուրեազինը մգ NH₃ 1 գ հողում, օրվա ընթացքում: կատալազինը՝ սմ³ O₂ 1գ հողում, մեկ րոպեում:

Աղ. 1. Անտառային դարչնագույն տափաստանացված հողերի կենսաբանական ակտիվությունը, Գրիգորյան 1989թ.

Հողը, կտրվածքի համարը	Հորիզոնը և խորությունը, սմ	Ինվերտազ, մգ գլյուկոզ	Ֆոսֆատազ, մգ P	Ուրեազ, մգ NH ₃	Կատալազ, սմ ³ O ₂
Չաղտոտված, ոռոգվում է Շնող գետի ջրերով 29թ	Aվ 0-26	22,1	5,2	3,8	16,8
	B ₁ 26-50	18,8	3,4	2,3	14,1
	B ₂ 50-75	7,4	2,5	2,1	6,8
	B ₃ 75-95	2,5	2,0	1,6	4,1
	BC 95-116	1,8	1,3	1,0	2,6
Միջին աղտոտված, ոռոգվում է Դեբեդ գետի ջրերով 31թ	Aվ 0-24	14,1	3,0	1,9	11,0
	B ₁ 24-45	7,4	2,7	1,3	10,2
	B ₂ 45-72	5,2	1,2	1,0	5,5
	B ₃ 72-96	1,3	1,0	0,8	2,6
	BC 96-115	0,8	0,6	0,3	1,2
Ուժեղ աղտոտված, ոռոգվում է Շնող գետի ջրերով 33թ	Aվ 0-25	8,9	2,9	1,3	5,4
	B ₁ 25-46	4,8	1,8	1,0	4,8
	B ₂ 46-62	3,5	0,5	0,8	2,6
	B ₃ 62-81	2,2	0,3	0,5	2,2
	BC 81-100	0,9	0,2	0,3	1,6

Արդյունքներ և քննարկում: Մեր կողմից հաստատվել է, որ Նախկինում ծանր մետաղներով աղտոտված հողերում ընթանում է ինքնավերականգնման գործընթաց, որը կարելի է բացահայտել ֆերմենտների ակտիվության միջոցով: Այդ ջրերով 20 տարի ոռոգման ընթացքում միջին աղտոտված հողերում ինվերտազի ակտիվությունը բարձրացել է 31,2%-ով, ուժեղ աղտոտված հողերում՝ 40,4%-ով, մյուս ֆերմենտների ակտիվության մակարդակը բարձրացել է համապատասխանաբար՝ ուրեազինը – 52,6 և 76,9%, ֆոսֆատազինը՝ 33,3 և 24,1%, կատալազինը՝ 41,8 և 87,0% (աղ. 2): Ըստ ֆերմենտների ակտիվության մակարդակի ուժեղ աղտոտված անտառային դարչնագույն տափաստանացված հողերը մոտենում են միջին աղտոտվածներին, իսկ միջին աղտոտվածները՝ թույլ աղտոտվածներին:

Նախկինում ծանր մետաղներով աղտոտված հողերի ֆերմենտային ակտիվության բարձրացումը վկայում է այն մասին, որ բնապահպանական միջոցառումների արդյունքում Դեբեդ գետի ջրերը ձեռք են բերել նոր քիմիական կազմ և համեմատաբար լավ ոռոգելի հատկություններ: Այդ ջրերով ոռոգման դեպքում աստիճանաբար վերականգնվում են հողի դինամիկ հատկությունները, որոնք խախտվել էին Նախկինում ծանր մետաղներով աղտոտված ջրերով ոռոգման դեպքում: Ֆերմենտների ակտիվության աճը հազիվ թե կարելի լինի բացահայտել աղտոտիչ տարրերի պարունակության փոփոխությամբ, այնպես որ այդ հողերը դեռևս բնութագրվում են ծանր մետաղների բարձր պարունակությամբ: 20 տարվա ընթացքում Դեբեդ գետի մասնակի մաքրված ջրերով ոռոգման հետևանքով նկատվում է միայն ծանր մետաղների պարունակության չնչին նվազում: Ենթադրվում է, որ մասնակի մաքրված ջրերով ոռոգման ժամանակ բացառվում է ծանր մետաղների ուղղակի ինակտիվացնող ազդեցությունը ֆերմենտային ռեակցիաների արագության վրա (այդպիսի վիճակ գոյություն ունեւ Նախկինում, երբ աղտոտված ջրերով յուրաքանչյուր ոռոգման ընթացքում հողի վերին, կենսաբանորեն առավել ակտիվ շերտը, ստանում էր տեխնածին ուժեղ հարված): Նման վիճակը պայմանավորված է նաև նրանով, որ մաքրված ջրերով ոռոգման ժամանակ

Նակ, հումուսի և տիղմային ֆրակցիայի պարունակության աճի շնորհիվ բարձրանում է աղտոտիչ տարրերի հանդեպ հողի պաշտպանական ֆունկցիան:

Աղ. 2. Անտառային դարչնագույն տափաստանացված հողերի կենսաբանական ակտիվությունը, 2009թ.

Հողը, կտրվածքի համարը	Հորիզոնը և խորությունը, սմ	Ինվերտաց, մգ գլյուկոզ	Ֆոսֆատաց, մգ P	Ուրեաց, մգ NH ₃	Կատալազ, սմ ³ O ₂
Չաղտոտված, ոռոգվում է Շնող գետի ջրերով 29թ	A ₀ 0-25	24,5	5,4	4,2	16,8
	B ₁ 25-48	21,2	4,5	2,5	16,1
	B ₂ 48-73	14,5	3,1	2,1	11,5
	B ₃ 73-97	7,1	1,9	1,8	5,9
	BC 97-118	1,7	1,3	1,4	4,2
Միջին աղտոտված, ոռոգվում է Դեբեդ գետի ջրերով 31թ	A ₀ 0-26	18,5	4,0	2,9	15,6
	B ₁ 26-50	10,6	3,1	2,0	12,8
	B ₂ 50-75	6,3	1,5	1,2	9,9
	B ₃ 75-95	1,7	1,2	0,8	4,2
	BC 95-116	1,0	0,7	0,5	2,7
Ուժեղ աղտոտված, ոռոգվում է Շնող գետի ջրերով 33թ	A ₀ 0-26	12,5	3,6	0,3	10,1
	B ₁ 26-48	7,3	2,0	1,7	9,2
	B ₂ 48-64	4,1	1,2	0,8	5,3
	B ₃ 64-80	2,2	0,7	0,7	5,0
	BC 80-103	0,8	0,2	0,3	3,2

Դրան նպաստում է նաև հողի հիմնային ռեակցիան, որի դեպքում նվազում է ծանր մետաղների անցումը շարժուն, ավելի տոքսիկ վիճակի: Կատալազի ակտիվության կտրուկ բարձրացումը վկայում է աղտոտված հողերի ջրաօդային ռեժիմի և այլ ֆիզիկական հատկությունների լավացման մասին, որոնք նպաստում են որոշակի ֆերմենտային մակարդակի ստեղծմանը [6]:

Ծանր մետաղներով հողերի աղտոտման և դրանց ինքնավերականգնման գործընթացներում տեղի են ունենում հողառաջացման պրոցեսի և ֆերմենտային ռեակցիաների ուղղվածության խոր փոփոխություններ: Այդ փոփոխություններն ունեն հակադարձ բնույթ և ուղղվածություն: Առաջին դեպքում վատթարանում է հողի կազմությունը և հատկությունները, ֆերմենտների իմոբիլիզացիայի և ազդեցության համար ստեղծվում են անբարենպաստ պայմաններ, տեղի է ունենում եղած ֆերմենտների ինակտիվացում (տեխնածին Նյութերի ազդեցության ներքո), կտրուկ նվազում է կենսաքիմիական ռեակցիաների ուժգնությունը, հողի բերրիությունը և մշակաբույսերի բերքատվությունն ընդհանրապես: Ուժեղ աղտոտված հողերը այնպես են կորցնում իրենց սկզբնական տեսքը, որ նրանց կարելի է դասակարգել որպես նոր տիպի հող [4]:

Չի կարելի համաձայնել հեղինակների հետ, որոնք պնդում են, թե աղտոտված հողերը զրկվում են լրիվ վերականգնումից: Իհարկե, չի կարելի կարճ ժամանակահատվածում սպասել ծանր մետաղներով աղտոտված հողերի վերականգնում: Դա շատ երկար և բարդ էվոլյուցիոն գործընթաց է, որի ընթացքում աղտոտված հողերը մոտենում են այն հողերին, որոնցից տրանսֆորմացվել են: Տեխնածին աղտոտվածության պայմաններում հողերի քայքայումը ընթանում է մի քանի անգամ ուժգին, քան դրանց վերականգնումը: Ըստ հողի ֆերմենտների ակտիվության աճի, մեր կողմից կատարված հաշվարկների՝ ուժեղ աղտոտված հողերի գյուղատնտեսական շրջա նառության և առանց որևէ լուրջ ագրոտեխնիկական միջոցառումների դրանց վերականգնումը կտևի 50-60 տարի [1, 5]:

Այսպիսով, ֆերմենտային ռեակցիաների արագությունը հսկող հողաէկոլոգիական ցուցանիշները օրինաչափ փոփոխվում են՝ ըստ ոռոգելի ջրերի աղտոտվածության աստիճանի և բացահայտվում են հողի ֆերմենտների ակտիվության միջոցով: Դա հնարավորություն է տալիս հողի ֆերմենտային ռեակցիաների արագության մակարդակը օգտագործել որպես դրանց ինքնավերականգնման ախտորոշիչ ցուցանիշ [4, 5]:

Աղտոտված հողերում ծանր մետաղների տեղափոխությունը հիմնականում ընթանում է հորիզոնական ուղղություններով՝ ըստ հողահանդակի թեքության:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ваикулат Н.И.* Гигиенические мероприятия по защите почвы от загрязнения соединениями мышьяка. Гигиена населенных мест. Киев, вып. 13, с.19-123, 1974.
2. *Галстян А.Ш.* Унификация методов определения активности ферментов почв. Почвоведение, 2, с. 107-114, 1978.
3. *Глазовская И.А.* Геохимия природных и техногенных ландшафтов. М., Геогр. факультет МГУ, 350с., 2007.
4. *Григорян К.В.* Экологическая оценка компонентов биогеоценоза по активности ферментов почв в условиях техногенного загрязнения. Автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 32с., 1990.
5. *Добровольский В.В.* Биохимические циклы тяжелых металлов и регуляторная роль почвы. Почвоведение, 4, с. 431-441, 1997.
6. *Иванов В.В.* Экологическая геохимия. Справочник. В 6 кн. под ред. Э.К. Бурсенкова. М., Экология, кн.4. Главные d элементы. 416с., 1966.

Ստացվել է 22.02.2013



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФУМАРАЗЫ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

К.Г. ДЮКОВА, М.С. ИЗМАИЛЯН, Г.П. АЛЕБЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
karina_dukova@yahoo.com

В работе определены кинетические параметры и установлены оптимальные условия функционирования фумаразы (EC 4.2.1.2.) бактериальных клеток *Pectobacterium carotovorum* в реакции гидратации фумарата с образованием яблочной кислоты. Согласно данным, полученным на основе кинетических исследований этой реакции, константа Михаэлиса (K_m) равна 7,01 мМ. Показано, что фумараза *P. carotovorum* проявляет максимальную активность в диапазоне температур 32-37°C и pH 7,5-9. Значение энергии активации реакции (EA) составляет 4,7 ккал/моль в интервале температур 14-37°C. При хранении ферментного препарата в течение 10 дней в 0,1 М растворе фумарата аммония при температуре 25°C фумараза теряет 55 % исходной активности.

Фумараза – *Pectobacterium carotovorum* – L-яблочная кислота

Որոշված են *Pectobacterium carotovorum* բակտերիալ բջիջների ֆումարազի (EC 4.2.1.2.) կինետիկական պարամետրերը և գործունեության օպտիմալ պայմանները ֆումարատից մալատ հիդրատացման ռեակցիայում: Համաձայն ստացված տվյալների, որոնք հիմնված են ռեակցիայի կինետիկական հետազոտությունների վրա, Միխաելիսի հաստատունը (K_m) հավասար է 7,01 մМ: Ցույց է տրված, որ *P. carotovorum*-ի ֆումարազը առավելագույն ակտիվություն ցուցադրում է pH 7,5-9 սահմաններում, և 32-37°C ջերմաստիճանային փիրայքում: Ակտիվացման էներգիայի արժեքը (EA) հավասար է 4,7 կկալ/մոլ 14-37°C ջերմաստիճանային փիրայքում: Ֆերմենտային պրեպարատը 10 օր 0,1 М ամոնիումի ֆումարատի լուծույթում 25°C ջերմաստիճանում պահպանելիս, ֆումարազը կորցնում է իր նախնական ակտիվության 55%-ը:

Ֆումարազ – *Pectobacterium carotovorum* – L-խնձորաթթու

We studied the kinetic parameters and optimum conditions for the functioning of the fumarase (EC 4.2.1.2.) of *Pectobacterium carotovorum* bacterial cells in the hydration of fumarate to form malate. According to data obtained by kinetic studies of this reaction, the Michaelis constant (K_m) is equal to 7.01 mM. It was shown, that fumarase of *P. carotovorum* exhibits maximal activity at pH 7.5-9 and at temperature of 32-37°C. The value of activation energy (EA) is 4.7 kkal/mol in the temperature range of 14-37°C. In storing the enzyme preparation for 10 days in a 0.1 M solution of ammonium fumarate at 25°C fumarase loses 55% of the initial activity.

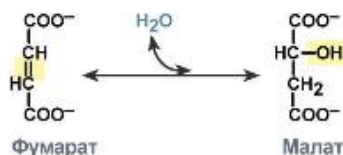
Fumarase – *Pectobacterium carotovorum* – L-malic acid

Штаммы - продуценты с выраженной L-аспартазной активностью, используемые для синтеза L-аспарагиновой кислоты, в той или иной степени являются также носителями фумаразы. Поэтому во всех случаях синтеза L-аспарагиновой

кислоты с применением микробных биокатализаторов, основанных на неочищенном ферментном препарате, одновременно с L-аспарагиновой кислотой, образуется по крайней мере один побочный продукт – L-яблочная кислота [11].

Бактериальный штамм *P. carotovorum* является одним из наиболее перспективных для промышленного производства аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты и аммиака. Однако для получения эффективного микробного биокатализатора из *P. carotovorum* как для синтеза L-аспарагиновой кислоты, так и ее солей, существует необходимость контроля фумаразной активности клеток и поиск возможности инактивации фумаразы с минимальным ущербом для аспартазной активности.

Фумараза (фумарат гидратаза) стереоспецифичный фермент, катализирует в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) обратимую реакцию гидратации фумарата с образованием L-яблочной кислоты (схема 1)



Фумаразы принадлежат к семейству ферментов, утилизирующих фумарат в качестве как субстрата, так и продукта в путях его метаболизма. Фумараза класса 1, обнаруженная у прокариот, это термолabile и железозависимый фермент с молекулярной массой 120 кДа [8]. Фумараза класса 2, обнаруженная у млекопитающих (в сердце свиньи, печени крысы), у дрожжей и некоторых микроорганизмов – это термостабильный, железнезависимый фермент с молекулярной массой 200 кДа [8]. В отличие от фумараз млекопитающих, бактериальные фумаразы не столь широко изучены и представлены в литературе [5, 9].

Целью настоящей работы является изучение кинетических характеристик фумаразы бактериального штамма-продуцента аспартазы *P. carotovorum* для оценки степени участия фумаразы в процессе превращения фумарата в аспарат.

Материал и методика. Условия эксперимента, материалы и питательная среда.

В работе использованы следующие реактивы: фумаровая кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия, 25 %-ный водный аммиак – коммерчески доступные реактивы производства Армении и стран СНГ. Продуцент фумаразы – бактериальный штамм *Pectobacterium carotovorum* INMIA B-8727 (ранее известный как *Erwinia aroidea*) из коллекции микроорганизмов НППЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

В качестве препарата фумаразы использован ферментный экстракт, полученный центрифугированием предварительно обработанной ультразвуком клеточной суспензии, содержащей 1 г влажных клеток в 5 мл 0,1 М раствора фумарата аммония (pH=8,5). Культуру выращивали в жидкой питательной среде при 30°C в течение 16-18 ч согласно методике [1].

Определение активности и расчет кинетических параметров. Активность фумаразы измеряли в реакции гидратации фумарата по убыванию субстрата в реакционной среде следующего состава: 20 мМ субстрат (фумарат натрия), 20 мМ К, Na-фосфатный буфер, pH=8,5. Общий объем реакционной смеси составлял 2 мл, температура 37°C. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата (концентрация фермента в реакционной смеси – 20 мг/мл в пересчете на влажную биомассу клеток). Концентрацию фумаровой кислоты определяли спектрофотометрически по поглощению при 240 нм. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата в минуту в указанных условиях. Удельная активность отображала общую активность фумаразы на 1 г влажной биомассы, учитывая коэффициент молярной экстинкции фумаровой кислоты $\epsilon = 2440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Начальную скорость реакции определяли по наклону касательной к кривой убывания поглощения фумарата.

Расчеты кинетических параметров (K_M) и ($V_{\max}$) и их стандартные ошибки были проведены методом многомерного линейного регрессионного анализа [4], с использованием программы Gauss 4.0.

Определение стабильности фумаразы. Ферментный препарат клеток в растворе 0,1 М фумарата аммония хранили в термостате при температуре 25°C, периодически отбирая пробы на определение активности.

Определение температурного и pH оптимумов. Активность фермента измеряли при разных температурах в интервале от 14 °C до 57°C и при разных pH в интервале от 5,5 до 10,2, используя 100 мМ К,Na-фосфатный буфер с соответствующими значениями pH.

Для обработки экспериментальных результатов по изучению влияния температуры на исследуемую реакцию и расчета энергии активации (E_A) использовали нижеприведенную форму уравнения Аррениуса:

$$E_A = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \ln \frac{k_2}{k_1},$$

где: R – 1,987 кал/К° моль – универсальная газовая постоянная

Результаты и обсуждение. Зависимость скорости реакции гидратации фумарата натрия от концентрации субстрата.

Концентрационная зависимость скорости гидратации фумарата натрия изучена в диапазоне 2–25 мМ. Как показано на рис. 1, график зависимости $[V]$ от $[S]$ имеет вид равнобочной гиперболы, что типично для ферментативных реакций. Полученный график зависимости в координатах Лайнуивера-Берка – ($1/v$ от $1/s$) имеет прямолинейный характер (рис. 2). Значения кинетических параметров (K_M) и ($V_{\max}$), рассчитанные методом многомерного линейного регрессионного анализа, равны $K_M = 7,01 \pm 0,77$ мМ и $V_{\max} = 338,6 \pm 1,5$ мкмоль/мин/г.

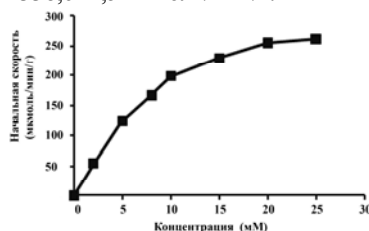


Рис. 1. Кривая зависимости начальной скорости реакции гидратации фумарата от концентрации субстрата (концентрация фермента в реакционной смеси – 20 мг/мл в пересчете на влажную биомассу клеток).

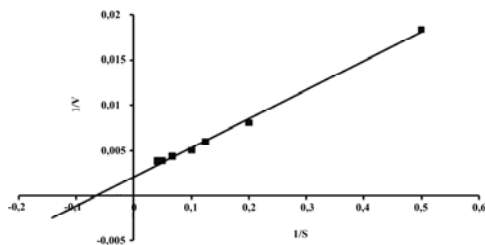


Рис.2. Зависимость начальной скорости реакции гидратации фумарата от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка

Влияние температуры на скорость реакции гидратации фумарата. Температурная зависимость скорости потребления фумарата была изучена в диапазоне температур 14÷57⁰С.

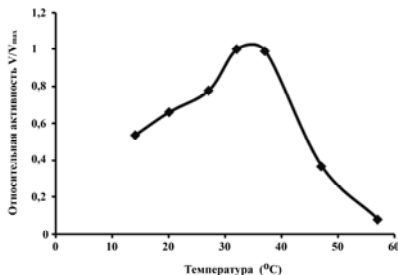


Рис.3. Зависимость активности фумаразы *P. carotovorum* от температуры.

Как видно из приведенного графика (рис.3), скорость расхода фумарата экспоненциально возрастает до 32⁰С, а начиная с 37⁰С, вследствие тепловой инактивации, постепенно падает и при 57⁰С составляет 7,8 % от максимального значения. На рис. 4 она представлена в аррениусовских координатах; приведен график зависимости логарифма начальной скорости реакции – lg (v) от обратного значения абсолютной температуры 1/T. Как видно из рис. 3, в интервале температур 14÷37⁰С (что соответствует 1/T (К⁻¹) = 0,003333÷0,00303) зависимость имеет практически прямолинейный характер, т.е. подчиняется уравнению Аррениуса, а линейность нарушается выше 37⁰С.

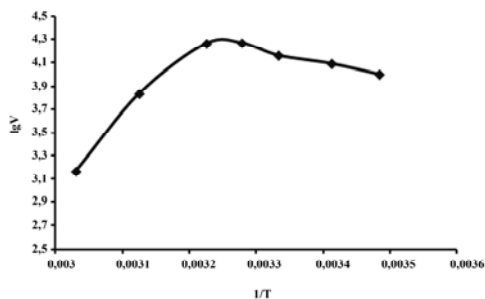
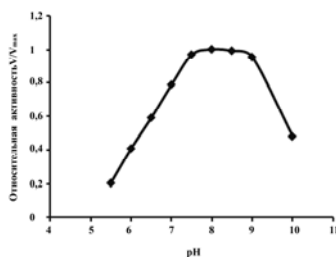


Рис.4. Зависимость логарифма начальной скорости расхода фумарата в реакционной среде от обратного значения абсолютной температуры для фумаразы *P. carotovorum* при pH 8,5.

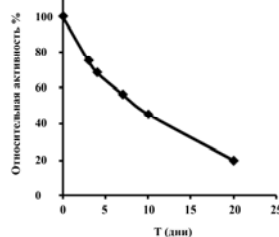
Расчитанное из прямолинейного участка графика значение энергии активации реакции E_A составляет 4686,8 кал/моль, что очень близко значению энергии активации, характерной для очищенного фермента $E_A = 4990$ кал/моль (из сердца свиньи), приведенного в литературе [3].

Влияние pH на скорость реакции гидратации фумарата. Изучение зависимости скорости реакции потребления фумарата натрия от pH в реакции гидратации фумарата при участии фумаразы *P. carotovorum* показало (рис. 5), что кривая зависимости не имеет отчетливо выраженного максимума. В интервале pH (5,5÷7,5) скорость реакции интенсивно возрастает, затем в интервале pH (7,5÷9) выходит на плато с незначительными колебаниями в значениях и, далее, при pH от 9 к 10,2 наблюдается резкое падение скорости реакции.

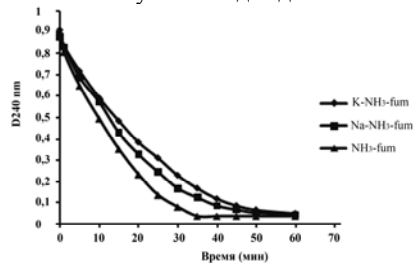
Рис.5. Зависимость активности фумаразы *P. carotovorum* от pH.

Таким образом, при оптимальном для аспартазы pH 8,5 [2] фумараза *P. carotovorum* также проявляет максимальную активность, что будет создавать определенные трудности при использовании этого штамма в качестве катализатора в биотрансформационном процессе получения L-аспарагиновой кислоты и ее солей. При сравнении, для фумараз, выделенных из разных источников, приведенные в литературе кривые зависимости скорости реакции потребления фумарата натрия от pH, имеют ярко выраженные максимумы в диапазоне pH 6,5÷7,5 [8, 10].

Определение стабильности фумаразы *P. carotovorum*. Нами была исследована стабильность фумаразы *P. carotovorum* при хранении в 0,1 М растворе фумарата аммония при температуре 25⁰.

Рис.6. Изменение активности фумаразы *P. carotovorum* при хранении в растворе 0,1 М фумарата аммония при температуре 25⁰С.

На рис. 6 показана кривая зависимости относительной активности фумаразы от времени. Как видно, фермент теряет 55% от исходной активности на 10-й день хранения. Для сравнения коммерческая фумараза из сердца свиньи при хранении в аналогичных условиях теряла 60 % исходной активности в течение первых трех суток хранения [7]. На рис. 7 приведены кривые потребления фумарата в виде 1 М растворов натрий-аммониевой, калий-аммониевой и аммониевой солей в реакции, катализируемой *P. carotovorum* в оптимальных условиях для действия аспартазы (pH 8,5; T-37⁰).

Рис.7. Кинетическая кривая расхода субстрата в реакции ферментативного аминирования фумарата под действием аспартазы *P. carotovorum*.

На основании полученных нами результатов можно сказать, что фумараза при оптимальных условиях для эксплуатации штамма-продуцента аспартазы *P. carotovorum* вносит свой вклад в потребление фумаровой кислоты, а представленные кривые являются результатом суммарного действия двух ферментов. Из фумарата одновременно с L-аспарагиновой кислотой образуется еще один побочный продукт – L-яблочная кислота. Содержание яблочной кислоты в конечном продукте реакции составляет ~ 5%. Несмотря на то, что L-яблочная кислота принципиально способна превращаться в аспартат, возможность образования яблочной кислоты необходимо предотвратить путем инактивации фумаразы [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Алевян Г. П., Тозалакян П. В., Габриелян Ф. К., Мелконян А. Б., Бабаханян А. В. Влияние поверхностно-активного вещества БА-420 на проявление аспартазной активности клеток *Erwinia aroidea*. Биолог. журн. Армении, 50, 3-4, 234-240, 1997.
2. Алевян М.Г. Оптимизация условий определения активности L-аспартазы бактериальных клеток *Erwinia aroidea*. Химич. журн. Армении, 60, 1, 144-151, 2007.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., Мир, 1966.
4. Корнши-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1979.
5. Bock R., Alberty R. Studies of the enzyme fumarase. 1. Kinetics and equilibrium. J. Am. Chem. Soc., 75, 1921-1925, 1953.
6. Chibata I., Tosa T., Sato T. Improvement of production of L-aspartic acid using immobilized microbial cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 291-295, 1984.
7. Chui-Tein Chen, Shui-Chyr Duh, Kung-Tsung Wang. Facile synthesis of L-malic acid by a consecutive enzymatic reaction. Biotechnology letters, 16, 4, p. 355-358, 1994.
8. Genda T., Watabe S., Ozaki Hy. Purification and characterization of fumarase from *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 5, 1102-1109, 2006.
9. Kobayashi K., Tuboi S. End group analysis of the cytosolic and mitochondrial fumarases from rat liver. J. Biochem., 94, 707-713, 1983.
10. Presecki A.V., Zelic B., Vasic-Rascki D. Comparison of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. Enzyme and microbial technology., 41, 605-612, 2007.
11. Takamatsu S., Umemura I., Yamamoto K., Sato T., Chibata I. Production of L-alanine from ammonium fumarate using two-immobilized microorganisms. Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 15, 3, 147-152, 1982.

Поступила 15.01.2013



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

ԻՆՎԵՐՏԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՆՏԱՌԱՅԻՆ ԴԱՐՉՆԱԳՈՒՅՆ ՀՈՂԵՐ ԲԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ՄԻՋԱՏԱՍՊԱՆՆԵՐԻ ՆԵՐՍՈՒԾՈՒՄԻՑ ԴՅՏՈՒՄԸ

Մ.Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ¹, Հ.Ս. ՄՈՎՍԵՅԱՆ^{1,2}, Ն.Փ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ¹,
Ա.Մ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ¹, Ա.Մ. ԱՎԱԳՅԱՆ¹

¹Սննդամթերքի անվտանգության ոլորտի ռիսկերի գնահատման և
վերլուծության գիտական կենտրոն ՊՈԱԿ,
masissargsyan@mail.ru

²Երևանի պետական համալսարան, Էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոն
hasmikmov@ysu.am

Բացահայտվել է բակտերիական BT E-3, BT AP-8, BT AM-22, BT CM-25 միջատասպանների ազդեցությունն անտառային դարչնագույն հողերի բերրիության ցուցանիշ՝ ինվերտազի ակտիվության վրա: Պարզվել է, որ ցողման արդյունքում հող ներմուծված բակտերիական միջատասպանները բացասաբար չեն ազդում արտաբջջային ֆերմենտի ակտիվության վրա, ինչը BT տեսակի միջատասպանների կիրառությանը լայն հնարավորություն է տալիս:

BT տեսակի միջատասպաններ – ինվերտազ – անտառային դարչնագույն հողեր – ցողում

Выявлено влияние бактериальных инсектицидов BT E-3, BT AP-8, BT AM-22, BT CM-25 на активность инвертазы, которая является показателем плодородия бурых лесных почв. Установлено, что бактериальные инсектициды, интродуцированные в почву в результате опрыскивания, не оказывают отрицательного воздействия на активность внеклеточного фермента, что создает широкую возможность для применения инсектицидов вида BT.

Инсектициды вида BT – инвертаза – бурые лесные почвы – опрыскивание

The influence of bacterial insecticides BT E-3, BT AP-8, BT AM-22, BT CM-25 on invertase activity, which is indicator of fertility of brown forest soils, was revealed. It was established that bacterial insecticides introduced into brown forest soil as a result of spraying, do not influence adversely on activity of extracellular enzyme which creates wide opportunities for the application of BT insecticides.

BT insecticides – invertase – brown forest soils – spraying

Ինվերտազը (ՖՊ 3.2.1.26) կարևոր դեր ունի ածխածնի շրջապտույտի գործընթացում, ազդելով սախարոզի, ռաֆինոզի և հենցիանոզի β-ֆրուկտոֆուրանոզիդային կապի վրա՝ առաջացնում է բույսերի և հողաբնակ մանրէների համար հեշտ յուրացվող միաշաքարներ:

Ինվերտազը հողում լայն տարածում ունեցող ֆերմենտ է, որը հիմնականում սինթեզվում է մանրէների և բույսերի արմատային համակարգի կողմից: Ըստ Կրետովիչի, այս ֆերմենտի ակտիվությունն առավել դրսևորվում է խմորասնկերի մոտ [6]:

Որոշ հեղինակների տվյալներով բջջում սինթեզված ֆերմենտի որոշակի քանակություն, արտազատուկի տեսքով ընկնելով հող, ադսորբվում է հողի մասնիկների կողմից և երկարատև պահպանում իր ակտիվությունը [4, 9]:

Համաձայն գրական աղբյուրների [4, 7, 9, 13], ինվերտազը համարվում է հողի կենսաբանական ակտիվությունն ու բերրիությունը բնութագրող ստույգ ցուցանիշ:

Ախտորոշման նպատակով տարբեր հեղինակներ [4, 5, 8, 12, 14] առաջարկում են հողերի միատարրությունը, էրոզացվածության և աղտոտվածության աստիճանը որոշել ըստ ինվերտազի ակտիվության ցուցանիշի:

2011-2012 թթ. մեր կողմից որոշվել է ցողման արդյունքում հող ներմուծված *Bacillus thuringiensis* (BT) տեսակի բակտերիական միջատասպանների ազդեցությունը հողի բերրիությունը բնութագրող ինվերտազի ակտիվության վրա: Հաշվի է առնվել այն փաստը, որ ցողված պատրաստուկների աննշան մասն է ազդում ֆիտոֆագերի վրա, իսկ գերակշռող մասը (60-99%) տարբեր ուղիներով (ցողելիս, տեղումների և տերևաթափի ժամանակ և այլ) ի վերջո ընկնում է հող [11]: Նկատի ենք ունեցել նաև մեր գիտափորձերի այն արդյունքը, որ ցողումից հետո հող ներմուծված BT տեսակի հարուցիչներն անտառային դարչնագույն հողերում քանակության նվազման միտումով պահպանվում են 4-5 ամիս [15]:

Մեր հետազոտությունների հիմնական նպատակն էր ուսումնասիրել և կանխարգելել կիրառվող միջատասպանների հնարավոր անցանկալի ազդեցությունները հողի բերրության վրա:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտության նյութ են հանդիսացել BT E-3, BT AP-8, BT AM-22, BT CM-25 տեղական բակտերիական միջատասպանները, անտառային դարչնագույն հողերն ու արտաբջջային հողային ինվերտազը:

Կուլտուրալ հեղուկի խտությունը, ծախսի քանակն ու տարբերակներից յուրաքանչյուրին հատկացված անտառփորձատեղամասը կազմել են համապատասխանաբար 600 մլն սպոր/մլ, 5 լ/50 մ² և 50 մ²:

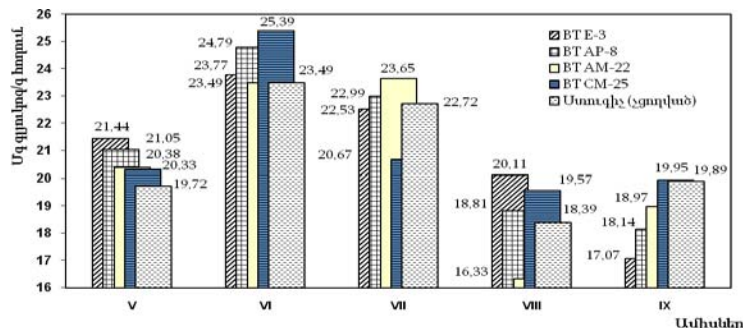
Ցողումները կատարվել են Ozdesan մակնիշի մեքենի սրսկիչով:

Բակտերիական միջատասպաններով առանձին ցողված և չցողված (ստուգիչ) հողերի ինվերտազի ակտիվությունը որոշվել է լաբորատոր պայմաններում՝ ըստ Գալստյանի [3] մեթոդի: Հողանմուշները վերցվել են փորձատեղամասերի 0-10սմ խորությամբ հողաշերտերից: Տարբերակներից յուրաքանչյուրն ունեցել է 3-ական կրկություն:

Ինվերտազի ակտիվությունը արտահայտվել է 1գ հողում 24 ժամվա ընթացքում առաջացած գլյուկոզի քանակությամբ (մգ):

Գիտափորձերի արդյունքները ենթարկվել են վիճակագրական վերլուծության [1, 2]:

Արդյունքներ և քննարկում: Հողի ինվերտազի ակտիվության որոշման երկամյա հետազոտության արդյունքները բերված են նկ. 1-ում:



Նկ.1. Ինվերտազի ակտիվության դինամիկան անտառային դարչնագույն հողերում BT տեսակի միջատասպաններով ցողումից հետո (2011-2012 թթ. միջինը)

Նկ.1-ի ցուցանիշներից պարզորոշ երևում է, որ ինվերտազի ակտիվության դինամիկան բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված (ստուգիչ) տարբերակներում մայիսից սեպտեմբեր կրում է փոփոխություն: Ֆերմենտի առավելագույն ակտիվությունը բակտերիական միջատասպաններով (BT E-3, BT AP-8, BT AM-22, BT CM-25) առանձին ցողված և չցողված հողերում դրսևորվել է հունիսին, նվազագույնը՝ օգոստոսին (ընդհանրացված միջին ցուցանիշները՝ համապատասխանաբար 24,340 և 18,642 մգ գլյուկոզ/գ հողում): Սեպտեմբերին արձանագրվել է ֆերմենտի ակտիվության բարձրացման միտում (ընդհանրացված միջինը 18,804 մգ գլյուկոզ/գ հողում):

Ըստ գրականության տվյալների, վեգետացիայի շրջանում ինվերտացի ակտիվության փոփոխությունը դրող գործոններն են՝ ջերմությունը (կոռելյացիոն գործակիցը՝ $r=0,88$), խոնավությունը ($r=0,91$) [9], հողաբնակ մանրէների քանակությունը ($r=0,43$) և մանրէների կողմից սինթեզված թունավոր նյութերը [10]:

Աղ. 1-ում ներկայացված են ինվերտացի ակտիվության 2011թ. գիտափորձերի արդյունքները՝ վիճակագրական ցուցանիշներով:

Աղ. 1. Ինվերտացի ակտիվության մաթեմատիկական ցուցանիշներն անտառային դարչնագույն հողեր BT տեսակի միջատասպանների ներմուծումից հետո (2011թ.)

Տարբերակ	Ամիսներ	Գյուկողի միջին քանակությունը, մգ/գ հողում	Քառակուսային շեղումը	Տատանման գործակիցը, %	Միջին սխալը	Փորձի սխալը, %	Ստյուդենտի $t_{\text{գափականի}}$ հաշվարկային ցուցանիշը
BT E-3	Մայիս	20,67	1,621	7,84	0,936	4,5	0,959 *
	Հունիս	23,10	1,769	7,66	1,021	4,4	0,286
	Հուլիս	21,76	1,369	6,29	0,790	3,6	0,152
	Օգոստոս	19,68	1,657	8,42	0,957	4,9	1,018
	Սեպտեմբեր	16,44	1,404	8,54	0,811	4,9	2,012
BT AP-8	Մայիս	20,44	1,212	5,93	0,670	3,3	0,950
	Հունիս	24,02	1,186	4,94	0,685	2,8	0,220
	Հուլիս	22,32	1,844	8,26	1,065	4,8	0,189
	Օգոստոս	18,15	0,733	4,04	0,423	2,3	0,061
	Սեպտեմբեր	17,72	1,020	5,76	0,589	3,3	1,278
BT AM-22	Մայիս	19,67	1,293	6,57	0,746	3,8	0,269
	Հունիս	22,66	0,733	3,23	0,423	1,9	0,639
	Հուլիս	22,98	1,957	8,52	1,130	4,9	0,548
	Օգոստոս	15,78	1,500	9,50	0,866	5,5	1,748
	Սեպտեմբեր	18,38	0,894	4,86	0,516	2,8	0,790
BT CM-25	Մայիս	19,68	1,508	7,66	0,871	4,4	
	Հունիս	24,68	1,299	5,26	0,750	3,0	
	Հուլիս	20,02	1,178	5,88	0,680	3,4	
	Օգոստոս	19,03	1,339	7,04	0,773	4,1	
	Սեպտեմբեր	19,36	1,799	2,29	1,039	5,4	
Զցողված (ստուգիչ)	Մայիս	19,35	1,078	5,57	0,622	3,2	
	Հունիս	23,65	2,063	8,72	1,191	5,0	
	Հուլիս	21,99	1,641	7,46	0,947	4,3	
	Օգոստոս	18,21	1,192	6,54	0,688	3,8	
	Սեպտեմբեր	19,35	1,482	7,66	0,856	4,4	

* $P_{0,95}$ և $n=3$ -ի դեպքում Ստյուդենտի $t_{\text{գափականի}}$ աղյուսակային ցուցիչը հավասար է 3,182

Աղ. 1-ի տվյալներից երևում է, որ տատանման գործակիցն ու փորձի սխալը տատանվել են համապատասխանաբար 2,29-9,50%-ի և 1,9-5,5%-ի սահմաններում, դրանով էլ հաստատվել է, որ գիտափորձերի արդյունքները հավաստի են:

Պարզվել է նաև, որ Ստյուդենտի $t_{\text{գափականի}}$ հաշվարկային ցուցանիշները փորձնական տարբերակներում հետազոտության ամիսներին տատանվել են 0,061-2,012-ի սահմաններում և $P_{0,95}$ և $n=3$ -ի դեպքում, փորք են Ստյուդենտի $t_{\text{գափականի}}$ աղյուսակային 3,182 ցուցիչից: Դա հաստատում է այս փաստը, որ բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված տարբերակներում դրսևորված ինվերտացի ակտիվության միջև չկա արժանահավատ տարբերություն: Այսպիսով, հետազոտության արդյունքներով հաստատվել է, որ ցողման հետևանքով հող ներմուծված BT տեսակի միջատասպանները բացասաբար չեն ազդում անտառային տիպիկ սևահողերի բերրիությունը պայմանավորող ինվերտացի ակտիվության վրա:

Ինվերտացի ակտիվությունը բակտերիական միջատասպաններով ցողված և չցողված անտառային դարչնագույն հողերում վեգետացիայի շրջանում՝ մայիսից սեպտեմբեր կրում է դինամիկ փոփոխություն:

Ինվերտազի ակտիվությունը BT տեսակի միջատասպաններով ցողված և չցողված (ստուգիչ) անտառային դարչնագույն հողերում բուսածման շրջանում ենթարկվում է նմանատիպ փոփոխության՝ առավելագույն ակտիվությունը դրսևորվում է հունիսին, նվազագույնը՝ օգոստոսին:

Ցողման արդյունքում հող ներմուծված BT տեսակի միջատասպան հարուցիչները բացասաբար չեն ազդում անտառային դարչնագույն հողերի բերրիության ցուցանիշ՝ ինվերտազի ակտիվության վրա, ինչը անտառտեղամասերում վնասակար միջատների դեմ բակտերիական միջատասպանների կիրառությանը լայն հնարավորություններ է ընձեռում:

Հետազոտություններն կատարվել են ՀՀ ԿԳՆ ԳԴԿ-ի կողմից տրամադրված ֆինանսական աջակցության շնորհիվ՝ 11-4b540 ծածկագրով գիտական թեմայի շրջանակներում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 180 с., 1962.
2. *Бернштейн А.* Справочник статистических решений. М., Статистика, 162 с., 1968.
3. *Галстян А.Ш.* Определение активности ферментов почв (Методические указания). Ереван, 55 с., 1978.
4. *Галстян А.Ш.* Ферментативная активность почв Армении. Ереван, Айастан, вып. VIII, 275 с., 1974.
5. *Григорян К.В., Галстян А.Ш.* Оценка степени загрязненности почвы по активности инвертазы. В кн.: Методы и проблемы экотоксикологического моделирования и прогнозирования. Пушино, с. 164-165, 1979.
6. *Кретович В.Л.* Биохимия растений. М., Высшая школа, с. 132-133, 1980.
7. *Купревич В.Ф.* Почвенная энзимология. Минск: Наука и техника, 402 с., 1974.
8. *Симонян Б.Н., Галстян А.Ш.* Определение степени эродированности почв по активности ферментов. Докл. АН Арм. ССР, 58, 1, с. 44-47, 1974.
9. *Хазиев Ф.Х.* Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М., Наука, 203 с., 1982.
10. *Худяков Я.П.* Периодичность микробиологических процессов в почве // Труды ин-та микробиологии АН СССР, 5, с. 150-160, 1958.
11. *Чигарев Г.А., Старостин С.П., Калабина М.Н.* Снос пестицидов при их применении, Бюлл. ВНИИЗР. Л., 27, с. 13-18, 1974.
12. *Brookes P.C.* The use of microbial parameters in monitoring soil pollution // Biology and Fertility of Soils, 19, p. 269-279, 1995.
13. *Burns R.G., Dick R.P.* (eds) Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. CRC Press, 640 p., 2002.
14. *Dick R.P.* (ed) Methods of Soil Enzymology. Soil Science Society of America, 395 p., 2011.
15. *Sargsyan M.A., Movsesyan H.S., Ghazaryan N.P., Sargsyan A.M., Mesropyan H.R.* *Bacillus thuringiensis*-based insecticides residues in brown forest soils and their influence on soil-inhabiting ammonifiers. International Conference of Agricultural Engineering CIGR-AgEng2012, 2012, http://cigr.ageng2012.org/images/fotosg/tabla_137_C0354.pdf

Ստացվել է 24.09.2012



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

ЗАРАЖЕННОСТЬ ЯЩЕРИЦ ПАРАЗИТАМИ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Т.К. АРУТЮНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра зоологии
temharutunyan@gmail.com

Изучалась зараженность кровепаразитами скальных ящериц рода *Darevskia* в зависимости от среды обитания. Сравнивались двуполые (*D. valentini*) и партеногенетические (*D. armeniaca*) виды и их межпопуляционные различия в зараженности особей указанным паразитом.

Скальные ящерицы – кровепаразиты – партеногенетические и бисексуальные виды

Ուսումնասիրվել է *Darevskia* ցեղի ժայռային մողեսների վարակվածությունն արյան մակարոցներով՝ կախված բնակության միջավայրի պայմաններից: Համեմատվել են երկսեռ (*D. valentini*) և կուսածին (*D. armeniaca*) տեսակները և տվյալ մակարոցով վարակվածության, միջպոպուլյացիոն տարբերությունները:

Ժայռային մողեսներ – արյան մակարոցներ – կուսածին և երկսեռ տեսակներ

The infection of blood parasites rock lizards of genus *Darevskia* depending on the environment was studied. The bisexual (*D. valentini*) and parthenogenetic (*D. armeniaca*) species and their interpopulation differences depending on the infestation were compared.

Rock lizards – blood parasites – bisexual and parthenogenetic species

Исследование природной среды живых организмов является одним из наиболее молодых и бурно развивающихся направлений биологии [7,8]. Экологические факторы отличаются значительной изменчивостью во времени и пространстве, следовательно, оказывают разное воздействие на живые организмы [12]. Среда обитания характеризуется огромным разнообразием пространственных и временных элементов, условий и явлений, которые рассматриваются в качестве экологических факторов. Окружающая среда способна оказать прямое или косвенное влияние на живые организмы, хотя бы на протяжении одной из фаз их индивидуального развития [3, 4, 5, 6]. На один и тот же экологический фактор разные виды реагируют по-разному. Каждое животное характеризуется своей специфической видовой требовательностью к воздействию окружающей среды и занимает в ней определенную экологическую нишу [1].

Одним из форм биологических факторов является паразитизм. Нет ни одного вида многоклеточных животных или растений, которые не имели бы своих паразитов. Паразиты могут населять полости тела хозяина, проникать в ткани или

внутри отдельных клеток [2]. Паразитизм широко распространен среди представителей *Protozoa*, из которых особый интерес вызывают кровепаразиты [10, 11]. При формировании паразит-хозяин взаимоотношений скальных ящериц важную роль играет специфичность паразитов по отношению к хозяину и условиям внешней среды [9].

Для данного исследования мы взяли две разные территории, где встречаются одни и те же виды скальных ящериц.

Кучак (Армения) находится на высоте 1878 м над ур. моря. Климат умеренно-горный. Средняя температура июля $+16-18^{\circ}\text{C}$. Среднегодовая температура воздуха колеблется в пределах $+5-6^{\circ}\text{C}$. За год на территорию образования выпадает 450-600 мм осадков. Среднегодовая влажность воздуха 67%. Природные ландшафты являются черноземными равнинами.

Ахалкалаки (Грузия) находится на высоте 1500-2000 м над ур. моря. Климат влажно-холодный. Средняя температура июля $20-21^{\circ}\text{C}$. Среднегодовая температура воздуха $-2-3^{\circ}\text{C}$ градусов. За год на территорию образования выпадает от 300 мм до 600 мм осадков. Среднегодовая влажность воздуха 67%. Ландшафт можно охарактеризовать как плоскогорье.

Цель данных исследований – выяснить степень зараженности паразитами крови двух видов скальных ящериц рода *Darevskia* в зависимости от места обитания.

Возникает вопрос, какие факторы могут действовать на зараженность скальных ящериц, если между видами и экологическими факторами двух местообитаний различий почти нет.

Материал и методика. Сбор материала проводился в течение полевого сезона 2010-2011 г. Взрослые особи скальных ящериц *Darevskia armeniaca* (партеногенетический вид) и *D. valentini* (бисексуальный вид) отлавливались на территории Кучак (в Армении) и на территории Ахалкалаки в Грузии. Из маленькой отрезанной части хвоста делались мазки крови. Все животные были отпущены назад в места их отлова. На территории Кучака была поймана 21 половозрелая особь *D. valentini* (самцы – 13 особей, самки – 8 особей) и 49 особей *D. armeniaca*. На территории Грузии были пойманы 30 особей *D. valentini* (самцы – 21 особь, самки – 9 особей) и 37 особей *D. armeniaca*.

Высохшие на воздухе мазки крови фиксировались метиловым спиртом. Мазки окрашивались по методу Романовского–Гимзы. Готовые мазки просматривались под микроскопом при 400-кратном увеличении. В каждой мазке были подсчитаны по 2000 эритроцитов, а в них число зараженных кровепаразитами эритроцитов.

Результаты и обсуждение. Исследование кровепаразитов двух видов скальных ящериц в Армении и в Грузии дали следующие результаты (табл.1). Экстенсивность инвазии у *D. valentini* из территории Кучака составляет 76.2%, интенсивность инвазии – 60.6 (в клетках крови 16 зараженных особей нашли около 970 паразитов). Экстенсивность инвазии у *D. armeniaca* из территории Кучака составляет 30.6%, интенсивность инвазии – 23.4 (в клетках крови 15 зараженных особей нашли 351 паразит). Экстенсивность инвазии у *D. valentini* из территории 23.3%, интенсивность инвазии составляет 46.1 (в клетках крови 7 зараженных особей нашли около 323 паразитов), а у *D. armeniaca* из той же территории экстенсивность инвазии составляет 78.4%, интенсивность инвазии – 16 (в клетках крови 29 зараженных особей нашли около 464 паразитов).

Сравнительный анализ зараженности *D. valentini* и *D. armeniaca* армянской популяции на рис.1 выглядит следующим образом.

Зараженность вида *D. valentini* в значительной степени превышает зараженность *D. armeniaca*, то есть бисексуальные виды заражены больше, чем партеногенетические виды.

Табл. 1. Зараженность скальных ящериц кровепаразитами.

<i>Виды</i>	Общее число особей	Число зараженных особей	Число паразитов	Экстенсивность инвазии, %	Интенсивность инвазии
<i>D.valentini</i> (Кучак)	21	16	969	76.2	60.6
<i>D.armeniaca</i> (Кучак)	49	15	351	30.6	23.4
<i>D.valentini</i> (Грузия)	30	7	323	23.3	46.1
<i>D.armeniaca</i> (Грузия)	37	29	464	78.4	16



Рис. 1. Зараженность популяции Кучака

Сравнительная картина тех же видов из популяции Ахалкалаки дала следующие результаты (рис.2).



Рис. 2. Зараженность популяции Грузии

В грузинской популяции зараженность партеногенетических видов превышает таковую двуполых видов.

Сравнивая общую зараженность популяции партеногенетических и бисексуальных видов из Армении и Грузии, мы получили следующую картину (рис. 3):

Так, если в армянской популяции больше заражены бисексуальные виды, то в Грузинской популяции картина выглядит наоборот. То есть, те же виды в разных условиях имеют различную степень восприимчивости к паразитам.

Оба района характеризуется очень похожими климатическими условиями, и на обе популяции действуют практически одинаковые экологические условия. Какие факторы влияют на различие в степени зараженности между популяциями остается неизвестным.

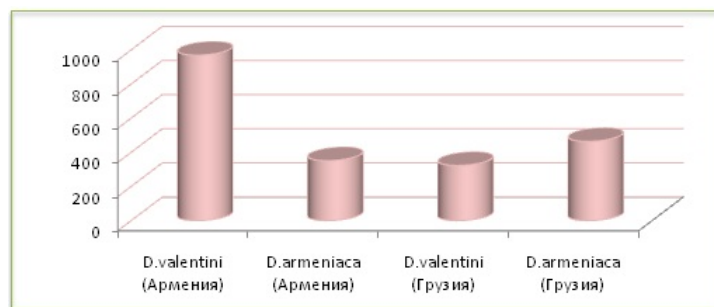


Рис.3. Сравнение зараженности между армянскими и грузинскими популяциями

Наши результаты подтверждают, что не только в разных популяциях, но между синтопическими видами существуют различия по зараженности паразитами крови. В одной популяции больше заражены бисексуальные виды, в другой – партеногенетические виды, что свидетельствует о том, что зараженность не является видовой спецификой этих животных. Несмотря на то что абиотические, биотические связи и антропогенные факторы на обеих территориях одинаковы, зараженность этих животных имеет различный рисунок. Число зараженных особей в грузинской популяции скальных ящериц немного выше, чем в армянской популяции, но экстенсивность зараженности более высокая в армянской популяции. Возможно, этот результат связан с наличием на территории Ахалкалаки нескольких озер (Топоровань, Хончалы, Мадатана), которые в какой-то степени могут изменить микроклимат, кормовую базу и число эктопаразитов. Таким образом, одни и те же виды в разных районах различаются восприимчивостью к паразитам. В одних и тех же районах партеногенетические и бисексуальные виды имеют разную степень зараженности. Степень зараженности животных в этой работе не выявляет зависимости от места обитания и экологических условий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. Особи, популяции и сообщества, I, М., Мир, 667 с., 1989.
2. Догель В.А. Курс общей паразитологии. 2-е дополненное издание. Л., Гос. учебно-педагогическое изд-во Мин-ва просвещения РСФСР, 372 с., 1947.
3. Константинов А.С., Мартынова В.В. Влияние колебаний солености на энергетику молоди рыб. Вopr. ихтиол., 32, вып. 4. с.161-166, 1992.
4. Константинов А.С., Мартынова В.В. Влияние колебаний солености на рост молоди рыб. Вopr. ихтиол., 30, вып. 6, с.1004-1011, 1990.
5. Константинов А.С., Зданович В.В. Влияние осцилляции температуры на рост и биохимический состав тела молоди рыб. Вопросы рыболовства, 4, 2, 14, с. 347-355. 2003.
6. Ручин А.Б. Влияние светового фактора на рост и энергетику молоди рыб. Автореф. на соиск. учен.степ. канд. биол. наук. Саранск. Изд-во Мордовск. ун-та, 22 с. 2000а.
7. Dawkins, R. Parasites, desiderata lists and the paradox of the organism. Parasitology 100, S63–S73, 1990.
8. Gulland, F.M.D. Impact of infectious diseases on wild animal populations, a review. In: Grenfell, B.T., Dobson, A.P. (Eds.), Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp. 20–51, 1995.
9. Nuismer, S.L. & Otto, S.P. Host-parasite interactions and the evolution of ploidy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 11036–11039, 2004.

10. *Real L.A.* Sustainability and the ecology of infectious disease. *Bioscience*, 46, 88–97, 1996.
11. *Schall, J.J., Pearson, A.R.* Body condition of a Puerto Rican anole, *Anolis gundlachi*: effect of a malaria parasite and weather variation. *J. Herpetol.* 34, 489–491, 2000.
12. *Sahney, S., Benton, M.J. and Ferry, P.A.* „Links between global taxonomic diversity, ecological diversity and the expansion of vertebrates on land“ (PDF). *Biology Letters*, 6, 4, 544–547, 2010.

Поступила 09.01.2013



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ МУЛЬТИПЛИКАТИВНОГО ШУМА НА СТОХАСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРИ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА МАКРОМОЛЕКУЛАХ

В.Б. АРАКЕЛЯН¹, С.В. АРУТЮНЯН², В.К. АНДРИАСЯН³

¹ Ереванский госуниверситет, кафедра молекулярной физики
v.arakelyan@ysu.am

² Ереванский государственный медицинский университет, кафедра медицинской физики,
³ Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH -8085
Zurich, Switzerland

Исследовано влияние мультипликативного шума на адсорбцию лигандов на макромолекулах в условиях, когда адсорбированный лиганд изменяет структуру адсорбционного центра. Вычислен стохастический потенциал адсорбционного центра макромолекулы. Показано, что при некоторых значениях параметров адсорбции внешний шум может индуцировать бистабильный режим адсорбции лигандов на макромолекулах.

ДНК – лиганд – адсорбция – мультипликативный шум

Ուսումնասիրված է մոլեկուլիկատիվ աղմուկի ազդեցությունը մակրոմոլեկուլներում լիգանդների ադսորբցիայի վրա, երբ ադսորբցված լիգանդը փոխում է ադսորբցիայի կենտրոնի կառուցվածքը: Հաշված է մակրոմոլեկուլի ադսորբցիայի կենտրոնի ստոխաստիկ պոտենցիալը: Ցույց է տրված, որ ադսորբցիայի պարամետրերի որոշ արժեքների դեպքում արտաքին աղմուկը կարող է առաջ բերել մակրոմոլեկուլների վրա լիգանդների ադսորբցիայի բիստաբիլ ռեժիմ:

ԴՆԹ – լիգանդ – ադսորբցիա – մոլեկուլիկատիվ աղմուկ

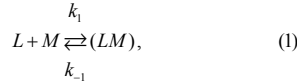
The influence of the multiplicative noise on stochastic potential during the adsorption of ligands on macromolecules is investigated under the condition when the adsorbed ligand modifies the structure of the adsorbing center. The stochastic potential of the adsorption center of the macromolecule is found. It is shown that at some values of the adsorption parameters, the external noise may induce a bistable regime of adsorption of ligands on the macromolecules.

DNA – ligand – adsorption – multiplicative noise

В подавляющем большинстве случаев явление адсорбции рассматривают в приближении, когда адсорбируемый лиганд не влияет на структуру адсорбционного центра [2,3,6,7]. Однако поскольку, как правило, адсорбционный центр макромолекул окружен легкоподвижными полярными или заряженными атомарными группами, а адсорбируемый лиганд в свою очередь также может быть заряжен или иметь дипольную группу, то при адсорбции следует ожидать достаточно сильное взаимодействие адсорбируемого лиганда с адсорбционным центром, в результате которого может происходить изменение структуры адсорбционного центра макромолекулы.

В работе [5] детально было исследовано влияние деформации адсорбционного центра на процесс связывания лигандов с макромолекулами и получен ряд новых и неожиданных результатов. В этой работе будет исследовано влияние интенсивности мультипликативного шума на адсорбцию лигандов на ДНК в условиях, когда адсорбируемый лиганд деформирует потенциальную яму адсорбционного центра.

Теоретическая часть. Адсорбцию и десорбцию лигандов на макромолекулах представим как квазихимическую реакцию связывания и распада лиганда с адсорбционным центром. В простейшем случае, когда адсорбируется один тип лиганда и с одним адсорбционным центром связывается один лиганд, квазихимическая реакция связывания лиганда L со свободным адсорбционным центром M записывается в виде:



где (LM) – комплекс лиганда с адсорбционным центром; k_1 и k_{-1} – константы скоростей образования и распада комплекса (LM) . Уравнение, описывающее изменение во времени среднего заполнения адсорбированных центров $\bar{r}$ имеет вид

$$\frac{d\bar{r}}{dt} = k_1 c_f (1 - \bar{r}) - k_{-1} \bar{r} \quad (2)$$

где c_f – концентрация лигандов в растворе. Взаимосвязанный процесс адсорбции лигандов на макромолекуле и изменение структуры адсорбционного центра подробно исследовано в работе [5]. Принимается, что при попадании лиганда в потенциальную яму адсорбционного центра, ее глубина несколько увеличивается, а при выходе лиганда из потенциальной ямы ее глубина релаксирует к первоначальному значению, которую имела яма до попадания в нее лиганда. Считаем, что деформация потенциальной ямы связана с конформационными изменениями макромолекулы в результате взаимодействия лиганда с атомарными группами вблизи адсорбционного центра. Принимаем, что величина углубления потенциальной ямы пропорциональна обобщенной конформационной переменной. Далее считаем, что изменение конформационной переменной со временем при связывании лиганда с адсорбционным центром пропорциональна как среднему заполнению адсорбционного центра, так и силе упругости, которая возникает в результате взаимодействия лиганда с подвижными атомарными группами адсорбционного центра. Учитывая эти обстоятельства, можно записать следующее окончательное уравнение, описывающее изменение глубины потенциальной ямы со временем [1,5]

$$\tau \frac{dx}{dt} + x = x_\infty \bar{r}, \quad (3)$$

где x – углубление потенциальной ямы в единицах $k_B T$ (k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура), τ – время релаксации конформационных изменений, x_∞ – предельное значение углубления при бесконечной длительности пребывания лиганда в потенциальной яме. Система нелинейных дифференциальных уравнений (2)-(3) описывает согласованный процесс адсорбции и изменение конформационной переменной в каждом адсорбционном центре. Систему уравнений (2)-(3) можно упростить. Считаем, что переменная r реагирует на мгновенное значение переменной x , т.е. она является “быстрой” переменной. Тогда в силу адиабатического принципа исключения “быстрых” переменных, решение уравнения (2) берем для квазистационарного режима

$$\bar{r}(x) = \frac{c_f K_0}{\exp(-x) + c_f K_0}, \quad (4)$$

где K_0 – константа равновесия для квазихимической реакции (1) без учета углубления потенциальной ямы адсорбционного центра, которая связана с константой равновесия при учете углубления потенциальной ямы K соотношением $K = K_0 \exp(x)$ [5]. Подставив (4) в (3) и введя безразмерное время $t' = t / \tau$, получим следующее нелинейное динамическое уравнение, описывающее изменение x во времени

$$\frac{dx}{dt} = -x + \beta \cdot \frac{\gamma}{\exp(-x) + \gamma}, \quad (5)$$

где $\beta = x_\infty$, $\gamma = c_f K_0$. Для удобства в дальнейшем знак штрих у времени будем опускать и под t подразумевать безразмерное время t' . Примем, что под воздействием внешнего шума флуктуирует параметр β , который можно представить в виде суммы среднего $\bar{\beta}$ и гауссовского шума $\xi(t)$, среднее значение которого равно нулю, т. е. в виде $\bar{\xi}(t) = 0$, $\xi(0) \cdot \xi(t) = \delta(t)$, где $\delta(t)$ – дельта функция [4]. Имеем следующее выражение для $\beta(t)$

$$\beta(t) = \bar{\beta} + \sigma_\beta \cdot \xi(t), \quad (6)$$

где σ_β^2 – интенсивность шума. Подставив (6) в (5) получим следующее стохастическое уравнение, описывающее изменение во времени конформационной переменной $x(t)$

$$\frac{dx}{dt} = -x + \frac{\gamma \bar{\beta}}{e^{-x} + \gamma} + \frac{\gamma \sigma_\beta \cdot \xi(t)}{e^{-x} + \gamma}. \quad (7)$$

Для удобства дальнейших вычислений перепишем (7) в стандартном виде [7]

$$\frac{dx}{dt} = f(x) + \sigma_\beta \cdot g(x) \cdot \xi(t), \quad (8)$$

где

$$f(x) = -x + \frac{\gamma \bar{\beta}}{e^{-x} + \gamma}, \quad (9)$$

$$g(x) = \frac{\gamma}{e^{-x} + \gamma}. \quad (10)$$

Уравнение (8) относится к стохастическому уравнению мультипликативного типа. Если интерпретировать уравнение (8) в смысле Стратановича, то согласно известной процедуры [4], можно получить следующее выражение для стохастического потенциала

$$U(x) = - \left(\int_0^x f(u) du / g^2(u) \right) - \frac{\sigma_\beta^2}{2} \ln g(x). \quad (11)$$

Подставив в (11) явные выражения для $f(x)$ и $g(x)$ из (9) и (10) получим следующее окончательное выражение для стохастического потенциала в виде

$$U(x, \gamma, \beta) = -\frac{1}{2\gamma^2} \cdot \exp(-2x) \cdot \left(x + \frac{1}{2} \right) - \frac{2}{\gamma} \exp(-x) \cdot \left(x + 1 - \frac{\beta}{2} \right) + \frac{x^2}{2} - \beta \cdot x - \frac{\sigma_\beta^2}{2} \ln \left(\frac{\exp(-x) + \gamma}{\gamma} \right). \quad (12)$$

От свойств стохастического потенциала (12) зависят режимы адсорбции лигандов на макромолекулах. Эффективный детерминистический потенциал нашей системы легко получить из уравнения (5) и он равен

$$U_{\text{eff}}(x, \gamma, \beta) = \frac{x^2}{2} - \beta \cdot (x - \ln(\gamma + \exp(-x))). \quad (13)$$

Результаты и обсуждение. Проанализируем стохастический потенциал (12) при различных значениях параметров, входящих в выражение (12). В работе [5] было показано, что при детерминистическом описании в зависимости от значения параметров, могут реализоваться различные режимы адсорбции, причем в определенном интервале значений параметров адсорбция лигандов может происходить и в бистабильном режиме. Исследуем действие интенсивности мультипликативного шума на стохастический потенциал (12) при тех значениях параметров адсорбции, когда детерминистическое описание не приводит к бистабильному режиму адсорбции. Для определения интервалов изменения таких значений параметров адсорбции, следует стандартным образом провести анализ правой части уравнения (5). Результаты анализа показывают, что при $\beta \leq 4$ и произвольном положительном γ (так как по определению $\gamma = c_f K_0$) при детерминистическом описании невозможна реализация бистабильного режима адсорбции. Для определенности мы возьмем значение $\beta = 1$. На рис.1 представлен график эффективного детерминистического потенциала в зависимости от x

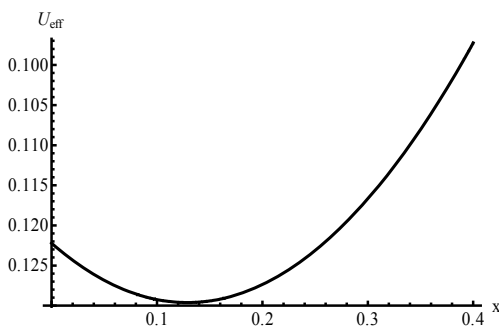


Рис. 1. Зависимость эффективного детерминистического потенциала (13) от конформационной переменной x при $\beta = 1$ и $\gamma = 0,13$.

Из рис.1 видно, что при $\beta = 1$ и $\gamma = 0,13$ эффективный детерминистический потенциал U_{eff} , который задается формулой (13), имеет один минимум. Это означает, что адсорбция лигандов на макромолекулах идет в моностабильном режиме.

Если учесть, что на адсорбцию лигандов действует мультипликативный шум, то процесс адсорбции следует описать с помощью стохастического потенциала, график которого представлен на рис. 2.

Из рис.2 видно, что при тех же значениях параметров β и γ , что и на рис.1, но при наличии мультипликативного шума интенсивностью $\sigma^2_\beta = 2,25$, зависимость стохастического потенциала от конформационной переменной имеет уже два минимума. Это означает, что адсорбция лигандов на макромолекулах идет в бистабильном режиме.

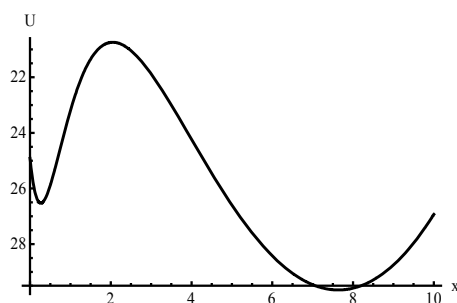


Рис. 2. Зависимость стохастического потенциала (12) от конформационной переменной x при $\beta = 1$, $\gamma = 0,13$ и интенсивности мультипликативного шума $\sigma^2_\beta = 2,25$.

Наличие одного или двух минимумов на кривой зависимости потенциала от конформационной переменной приводит к тому, что в зависимости от параметров могут реализоваться различные режимы адсорбции лигандов на макромолекулах – изотерма Ленгмюра, суммы двух изотерм Ленгмюра, S-образная изотерма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдидей Ю.Б., Магура И.С., Пивоварова Н.В., Харкянен В.Н., Чинаров В.А. Описание функционирования потенциалуправляемого ионного канала на основе ион-конформационного взаимодействия. Биол. мембраны. 8, 6, с. 648-655, 1991.
2. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере. Мол. биология, 5, с.245-490, 1971.
3. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. Биофизика, 48, с.773-796, 2003.
4. Хорстхемке В., Лефевр Р. Индуцированные шумом переходы. М., Мир, с.400, 1987.
5. Arakelyan V.B., Haroutiunian S.G., Abgaryan G.A., Arakelyan H.V., Haroutunyan T.S. Ligand Binding With Continuous Modification of Binding Sites. J. Biomol. Struct. Dyn., 22, 2, p. 245-252, 2004.
6. Crothers D. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. Biopolymers, 6, p.575-584, 1968.
7. McGhee J.D., Von Hippel P.H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to One-dimensional Homogeneous Lattice. J. Mol. Biol., J. Mol. Biol. 86, p.469-489, 1974.

Поступила 05.02.2013



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

ARMENIAN GRAPE VARIETIES SSR FINGERPRINTING BY USING QIAXCEL DNA FRAGMENT ANALYSIS SYSTEM

M.V. DALLAKYAN¹, S.S. YESOYAN¹, G.H. MELYAN², A.H. YESAYAN¹,
N.A. HOVHANNISYAN¹

¹Department of Ecology and Nature Protection, Yerevan State University,
bionellbiotech@yahoo.com

²Scientific Center of Viticulture, Fruit-Growing and Wine-Making,
Armenian National Agrarian University,
Melyan58@mail.ru

The applicability of QIAxcel System for SSR fingerprinting of grape varieties exploiting the internationally accepted 9 microsatellite markers was investigated. To optimize the allele sizing, a comparative genotyping of seven reference varieties with known sizes of microsatellite alleles, proposed by GENRES 081 project consortium, was performed. Based on the results of optimization, some Armenian table grape varieties were successfully genotyped. So, the QIAxcel System might be a useful tool for accurate genotyping and identification of plant genetic resources for scientific and commercial purposes.

Qiaxcel – microsatellites – genotyping – grape

Ուսումնասիրվել և գնահատվել է QIAxcel համակարգի կիրառելիությունը խաղողի սորտերի՝ միջազգայնորեն ընդունված 9 միկրոսատելիտային մարկերներով ուսումնասիրությունների համար: Ալելների երկարության որոշման օպտիմացման համար կատարվել է GENRES 081 ծրագրի կողմից առաջարկված խաղողի 7 ստուգիչ սորտերի համեմատական գենոտիպավորում, որոնց համար հայտնի են միկրոսատելիտային ալելների նուկլեոտիդային երկարությունները: Հիմք ընդունելով օպտիմացման արդյունքները ուսումնասիրվել են Հայաստանի խաղողի որոշ սորտեր, որոնց համար ստացվել են համապատասխան գենետիկական պրոֆիլներ: Ցույց է տրվել, որ Qiaxcel համակարգը կարող է արդյունավետ գործիք լինել բույսերի գենետիկական ռեսուրսների նույնականացման և գենոտիպային ուսումնասիրությունների համար ինչպես գիտական, այնպես էլ կոմերցիոն նպատակներով:

Qiaxcel – միկրոսատելիտներ – գենոտիպավորում – խաղող

Изучена и оценена применяемость системы QIAxcel для микросателлитного генотипирования сортов винограда с применением 9 международнопризнанных микросателлитных маркеров. В целях оптимизации определения длины аллелей было проведено сравнительное генотипирование семи стандартных сортов с известной длиной микросателлитных аллелей, предложенных консорцием проекта GENRES 081. Основываясь на результатах оптимизации генотипированы некоторые армянские сорта винограда. Показано, что система Qiaxcel может стать эффективным инструментом для генотипирования и идентификации генетических ресурсов растений как в научных, так и в коммерческих целях.

Qiaxcel – микросателлиты – генотипирование – виноград

Grapevine represents one of the most important products of plant domestication during the development of human civilization. It is intimately bound up with the expansion of agriculture, trade and commerce and is also important in social-religious, cultural and political aspects of many societies [4, 14].

Grapevine production, based on proper use of local genetic resources and on sustainable viticulture practices, provides a major potential source of income for farmers, especially in low income transition countries of the Caucasus and Eastern Europe, including Armenia. In 2010 the world's global grapevine area was estimated as 8.1 million hectares out of which approximately 8 million ha vineyard is mostly processed into wine, but some is destined for fresh consumption as table grapes, dried into raisins, processed into non-alcoholic juice, and distilled into spirits (<http://faostat.fao.org>). Currently, there are over 10,000 grape cultivars names in use worldwide [2], and their classification is often confusing because of homonyms, synonyms, scarce or incorrect historical information [13]. In addition, the different languages used in the east European countries, like Armenia, produce different spellings of the same variety name, which may cause double registering. Simultaneously accurate identification of grape varieties is most important issue for its sustainable conservation, management and use [7]. For proper identification of grape varieties in line with ampelography, the modern biomolecular approaches (DNA markers based analysis), are needed. Nowadays SSR and SNP markers are the most advanced and widely used markers in grape varieties fingerprinting and related investigation. For SSR analyses the capillary electrophoresis technology is widely used [8, 10, 14, 19]. The capillary electrophoresis is mainly combined with use of fluorescently labeled primers and performed for example ABI 3100xl DNA Sequencer (ABI 3100xl: Applied Biosystems, USA). Such kind of analyses provides high detection sensitivity [11, 17] and might be used for grape profiling. So, it is clear that the cost of the instrument and appropriate reagents are quite high and economically not effective. The QIAxcel System (Qiagen, USA) is a relatively inexpensive instrument that uses disposable micro-channel cartridges containing sieving-gel matrix with ethidium bromide (EtBr) dye to generate both gel images and allele sizes [3,12,13]. Most of small laboratories can effectively use these systems for genotyping.

The purpose of this investigation was to study the applicability of QIAxcel system for SSR fingerprinting of grape varieties exploiting the internationally accepted 9 micro-satellite markers.

Materials and methods. Armenian table grape varieties “Deghin Yerevani”, “Vardaguyn Yerevani”, “Parvana”, “Marmari”, “Sev Kishmish” provided by Scientific Center of Viticulture, Fruit-Growing and Wine-Making in Armenia, as well as seven reference varieties (Furmint B, Sultanina, Cabernet-Sauvignon, Chardonnay B, Merlot N, Pinot noir N, Carignan N) proposed by GENRES 081 consortium were investigated.

The following 9 polymorphic SSR primers were chosen: VVS2 [20], VVMD5, 7 [5], VVMD25, 27, 28, 32 [6], ZAG62 and ZAG79 [18].

DNA was isolated from fine powdered leaf tissues frozen in refrigerator at -25°C degrees and homogenized in Tissue Lyzer LT (Qiagen) to avoid cross contamination among samples. The extraction was performed according to the protocol for DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Isolated DNA quantity and quality were evaluated using Multiskan Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). In addition, 10 µl of each DNA extract were loaded and visualized on a 1.5% agarose gel.

PCR amplifications were performed by using Type it Microsatellite PCR kit (Qiagen) in 25 µl reaction mixtures containing 5 µl DNA template (10 ng/µl), 12.5 µl of 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix (3mM MgCl₂) with (Qiagen), 2.5 µl of primer Mix (2mM of each primer), and 5 µl of sterile RNase free water. PCR Amplification was performed in gradient PCR machine (Techne, gradient thermal cycler) with the following programme 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 90 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final extension at 68°C for 10 min. For selection of optimal annealing temperature for the selected primers the gradient PCR were performed at the first steps with T – 58°C, gradient 18°C.

Gel electrophoresis (3% agarose) of 2 µL of each sample per lane was used to verify PCR amplification had occurred during 30 min, under 120V. The QIAxcel System was used to determine

determine the size of the amplified alleles for each individual using the QIAxcel Advanced User Manuel (QIAGEN 2011). The QIAxcel DNA High Resolution Kit and Cartridge were utilized, along with the QX 25 bp/500 bp and pUC18/HaeIII Size Markers and the QX 15 bp/600 bp Alignment Marker, for the base calling of alleles (QIAGEN 2011). The concentration of the size marker was diluted to 30 ng/ μ L (QIAGEN 2011). Data were automatically recorded and exported using BioCalculatorTM software, which provides both a gel view and an electropherogram of the separated PCR products (alleles) [21].

Results and Discussion. A comparison of the results of SSR fingerprints of grape reference varieties obtained on QIAxcel system by using QX 25 bp/500 bp and pUC18/HaeIII markers and the results provided by the Genres 081 project consortium show differences in size of SSR markers sizes (Tab.1). The difference in case of application of pUC18/HaeIII maker for size determination was around 10-15 bp, and in case of QX 25 bp/500 bp marker was around 5-10 bp. In table 1 the difference in allele sizes for Furmint B variety is presented. It should be noted that the QIAxcel System software calculates allele sizes based on the DNA size marker table generated from an earlier analysis on the same cartridge. However, in our experiments for each run we were running the size marker too.

Tab. 1. Comparison allele sizes generated by 9 SSR primers for reference variety Furmint B

The name of reference variety	SSR markers	SSR markers sizes determined by GENRES 081 consortium	SSR markers sizes determined by Qiaxcel system, using pUC18/HaeIII size marker	SSR markers sizes determined by Qiaxcel system, using QX 25/500 bp size marker
Furmint B	VVMD5	223 238	240 248	229 242
	VVMD7	239 249	250 261	245 257
	VVMD25	238 240	249 255	243 250
	VVMD27	176 191	185 202	182 200
	VVMD28	227 247	238 285	235 253
	VVMD32	263 271	274 285	269 280
	VVS2	131 151	145 163	136 160
	VrZAG62	188 204	201 215	194 210
	VrZAG79	238 250	252 265	245 255

The widely used for SSR genotyping ABI instruments use an internal standard in each sample and allelic samples are calculated individually for each capillary. That is why the resolution and accuracy of size determination is around 1-2 base pairs. The application of QIAxcel system for evaluation of genetic diversity of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) [9], for molecular characterization of wild species and miniature roses [1] was shown that only limitation is the low resolution of allele determination in comparison with ABI systems. In all mentioned cases the authors are using unmodified protocols of size determination by QIAxcel system provided by manufacturer.

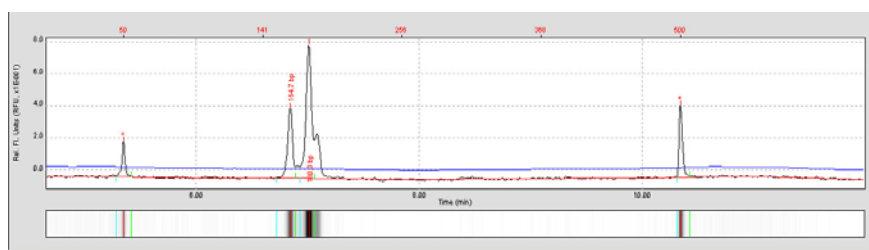
In our experiments to increase the accuracy of size determination we have chosen QX 25/500 bp size marker as the range of DNA fragments is mostly correspond to the expected sizes of the SSR alleles. We have included the size marker in all of the samples for the QIAxcel System, and as result the calculated allelic sizes were within 1 or 2 bp. So the modification of the protocol increased the accuracy of size determination by Qiaxcel system.

By using the optimized allele scoring protocol for Qiaxcel system, we have performed genetic fingerprinting of some Armenian table grape varieties. According to the results obtained it is possible to differentiate the varieties with 9 SSR markers by using Qiaxcel system (tab.2).

Tab. 2. Genetic fingerprints of table grapes by 9 SSR markers

Variety	SSR markers size (bp)								
	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VVS2	VrZAG62	VrZAG79
Deghin Yerevani	227 232	230 244	228 237	162 177	203 231	236 237	126 133	170 170	233 242
Vardaguyn Yerevani	227 227	236 250	228 238	162 177	202 231	236 236	156 135	173 173	232 245
Parvana	229 234	234 244	241 241	165 180	232 232	243 266	130 135	175 175	240 246
Marmari	232 232	240 241	229 239	178 180	220 232	238 238	141 133	171 171	235 244
Sev Kishmish	228 228	249 253	237 241	164 180	205 235	238 238	140 161	179 193	235 240

The QIAxcel System (fig.1) automatically generated tables of allele size, the resolution and allele size determination might be optimized, it is less expensive and less labor intensive in comparison with ABI systems.

**Fig.1.** The graphs of the allele sizes of Deghin Yerevani grape variety with SSR primers VVMD 27 (upper) and VrZAG262 (lower) presented by QIAxcel System genetic analyzer

QIAxcel system is much more effective than conventional electrophoreses in agarose and polyacrylamide gels. It could automatically analyze 96 samples without the need for manual sample and gel preparations. So, it can be useful tool not only for accurate genotyping assays, but also for large scale population analysis, when allele sizes are converted to binary (1, 0) output before analysis. QIAxcel System might be useful tool for accurate genotyping and variety identification of microbial, plant and animal genetic resources for scientific and commercial purposes.

Acknowledgements

This research was performed within COST Action FA1003 "East-West Collaboration for Grapevine Diversity Exploration and Mobilization of Adaptive Traits for Breeding" and under financial support of Armenian Harvest Promotion Center.

REFERENCES

1. Akond M., Jin S., Wang X. Molecular characterization of selected wild species and miniature roses based on SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 147, 89–97, 2012.
2. Alleweldt G. Genetics of grapevine breeding. *Prog. Bot.*, 58, 441-445, 1997.
3. Amirkhanian V.D., Liu M.S. Low-Cost and High-throughput MultiChannel Capillarybased Electrophoresis (MCCE) System for DNA Analysis. *Biomedical Nanotechnology Architectures and Applications*, Bornhop DJ, Dunn DA, Mariella RP, Murphy Jr CJ, Nicolau DV, Nie S, Palmer M, Raghavachari R (Eds). *Proc. SPIE*, 4626, 238-246, 2002.
4. Bassermann-Jordan F. *Geschichte des Weinbaus*, 3rd edn. Pfälzische Verlagsanstalt GmbH., Neustadt an der Weinstraße, reprint of the 2nd edn. Frankfurter Verlags-Anstalt A.G., Frankfurt am Main, II, 362–416, 1975.
5. Bowers J.E., Dangel G.S., Vignani R., Meredith C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633, 1996.

6. Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 243-246, 1999.
7. Dettweiler E., Jung A., Zyprian E., Toepfer R. Grapevine cultivar MuÈller-Thurgau and its true to type descent. *Vitis*, 39, 63-65, 2000a.
8. Guttman A., Cook N. Capillary gel affinity electrophoresis of DNA fragments. *Anal. Chem.*, 63, 2038-2042, 1991.
9. Hadziabdic, Denita, "Evaluation of genetic diversity of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) in the eastern United States using microsatellites.. " PhD diss., University of Tennessee, 2010. http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/694.
10. Huang X.C., Quesada M.A., Mathies R.A. Capillary array electrophoresis using laser-excited confocal fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 64, 967-972, 1992.
11. Huang Y.F., Huang C.C., Hu C.C., Chang H.T. Capillary electrophoresis-based separation techniques for the analysis of proteins. *Electrophoresis*, 27, 3503-3522, 2006.
12. Lee B.N. High Throughput RNA Quality Control. *Bioscience Technology* May, 30-31, 2006.
13. Liu M.S., Zang J., Evangelista R.A., Rampal S., Chen FTA Doublestranded DNA analysis by capillary electrophoresis with laserinduced fluorescence using thidium bromide as an intercalator. *BioTechniques*, 18, 316-323, 1995.
14. Mathies R.A., Huang X.C. Capillary Array Electrophoresis: An Approach to High-Speed, High-throughput DNA Sequencing. *Nature*, 359, 167-169, 1992.
15. Myles S., Boyko A.R., Owens C., Brown P.J., Grassi F., Aradhya M.K., Prins B., Reynolds A., Chia J., Ware D., Bustamante C., Buckler E.i. Genetic structure and domestication history of the grape. *Agricultural sciences: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.100963108*, 2010.
16. Olmo H.P. *The origin and domestication of the Vinifera grape in: P.E. Mc Govern, S.J. Fleming, S.H. Katz (Eds.). The Origins and Ancient History of Wine*, Gordon and Breach, Luxembourg, 31-43, 1995.
17. Ramachandran A., Zhang M., Goad D., Olah G., Malayer J.R., Rassi Z.E., Capillary electrophoresis and fluorescence studies on molecular beacon-based variable length oligonucleotide target discrimination. *Electrophoresis*, 24, 70-77, 2003.
18. Seif K.M., Regner R.F., Glossl J., Steinkellner H., Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42, 367-373, 1999.
19. Strege M., Lagu A Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries. *Anal. Chem.*, 63, 1233-1236, 1991.
20. Thomas M.R., Scott N.S., Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86, 985-990, 1993.
21. Wang X., Rinehart T.A., Wadl P.A., Spiers J.M., Hadziabdic D., Windham M.T., Trigiano R.N. A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *Afr. J. Biotechnol.*, 8, 2432-2436, 2009.

Received on 18.05.2013



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

ՄԱՐԴՈՒ ԿԵՆՑԱՂԱՅԻՆ ԳՈՐԾՈՒՆԵՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԱՆԱՍՆԱԿԱԿՈՒԹՅԱՆ ԱՇԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՇՐՋԱԿԱ ՄԻՋԱԿԱՅՐԻ ՎՐԱ ՏԱԿՈՒՇԻ ՄԱՐԶԻ ՕՐԻՆԱԿՈՎ

Ա.Ժ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Երևանի պետական մասնաճյուղ, Էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոն,
sonetkhachatryan@mail.ru

Աշխատանքում ներկայացված են Տավուշի մարզում շրջակա միջավայրի վրա մարդու կենցաղային գործունեության և անասնապահության ազդեցության ծավալները: Տրվել են այս երկու ոլորտներից շրջակա միջավայր ներմուծվող ազոտի և ֆոսֆորի տարեկան քանակները 2009-2012 թվականներին: Ինչպես նաև հիմնավորվել են այս մարզում անասնապահության զարգացման հնարավորությունները:

*Կենսածին տարրեր – անասնապահություն – մարդու կենցաղային գործունեություն –
շրջակա միջավայրի աղտոտում – արոտավայրերի բեռնվածություն*

В работе представлен объем воздействия бытовой деятельности человека и скотоводства на окружающую среду в Тавушском марзе. Рассчитаны годовые количества азота и фосфора, вносимые в окружающую среду в период 2009-2012 гг., а также обоснована возможность развития животноводства на территории этого марза.

*Биогенные элементы – скотоводство – бытовая деятельность человека – загрязнение
окружающей среды – нагрузка пастбищ*

The impact of human household activities and cattle-breeding on the environment in Tavush marz are presented in the work. Annual amount of nitrogen and phosphorus entered into the environment in the marz during 2009-2012 were calculated. The capacity of the development of cattle-breeding in this territory was also justified.

*Nutrients – cattle breeding – household human activities –
environmental contamination – load of pastures*

Տավուշի մարզը գտնվում է Հայաստանի հյուսիս-արևելյան մասում: Վերջինիս մակերեսը կազմում է 2704 կմ² տարածք [2]: Մարզը հարավ-արևելքում և հարավում սահմանակից է ՀՀ Գեղարքունիքի և Կոտայքի մարզերին, արևմուտքում՝ ՀՀ Լոռու մարզին և պետական սահմանով՝ Վրաստանին, հյուսիսում և արևելքում՝ Ադրբեջանին: Այս տարածքում գոյություն ունեն 5 քաղաքային և 57 գյուղական համայնքներ՝ 134900 ընդհանուր բնակչությամբ: Տավուշի մարզը բնութագրվում է լավ զարգացած գյուղատնտեսությամբ (2011թ. Տավուշի մարզի գյուղատնտեսության ճյուղը կազմել է ՀՀ համապատասխան ճյուղի ընդհանուր ծավալի 4,9%-ը), ինչը պայմանավորված է ինչպես բնակլիմայական պայմաններով, այնպես էլ թույլ զարգացած արդյունաբերությամբ: Մարզում անասնաբուծության մեջ առաջատար ճյուղեր են համարվում խոշոր եղջերավոր անասնաբուծությունն ու խոզաբուծությունը: Մարզի և հատկապես Աղստևի հովտի բնակլիմայական պայմանները (մեղմ կլիմա, մաքուր օդ, հանքային բուժիչ ջրեր, անտառներ, գեղատեսիլ լեռնաշխարհ) չափազանց նպաստավոր են մարդկանց հանգստի կազմակերպման և տուրիզմի զարգացման համար: Իսկ եթե այդ ամենը համադրվի լավ զարգացած գյուղատնտեսության հետ, կարող են նպաստավոր պայմաններ ստեղծվել Էկոտուրիզմի, հետևաբար նաև գյուղական համայնքների զարգացման համար:

Գործնականում մարդու ցանկացած տնտեսական գործունեություն ունենում է իր ազդեցությունը շրջակա միջավայրի վրա [4, 5]: Տավուշի մարզում մարդկային գործունեության կարևոր բնագավառներից են բնակչության կենցաղային գործունեությունն ու գյուղատնտեսությունը: Այս ոլորտներից շրջակա միջավայրի վրա ազդեցության բացասական հետևանքներից մեկը դա կենսածին տարրերով աղտոտումն է: Մասնավորապես տեղի է ունենում ազոտի և ֆոսֆորի տարրեր միացությունների ներմուծում շրջակա միջավայր, որոնք այնուհետև մակերևութային ու ստորգետնյա հոսքերի միջոցով հասնում են գետեր՝ բերելով էկոհամակարգերի բնական հավասարակշռված վիճակի խախտման: Որպես հավելում կարելի է նշել, որ այս մարզում չեն գործում կենցաղային հոսքաջրերի մաքրման կայանները, հետևաբար մարդկային տնտեսական գործունեության հետևանքով առաջացած հոսքաջրերը չեն հավաքվում և չեն մաքրվում:

Աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել շրջակա միջավայրի վրա մարդու կենցաղային գործունեության և անասնապահության ազդեցության ծավալները ու տալ վերջինիս զարգացման հնարավորությունը:

Նյութ և մեթոդ: Ըստ Վոլենվայդերի՝ քաղաքային շրջաններում յուրաքանչյուր մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով մեկ օրում միջավայր է անցնում 28 գ ազոտ և 2,8 գ ֆոսֆոր, իսկ գյուղական շրջաններում՝ համապատասխանաբար 14 գ և 1,4 գ [7]: Ըստ (1), (2), (3) և (4) բանաձևերի կարելի է հաշվել մեկ տարվա ընդացքում ներմուծվող ազոտի և ֆոսֆորի քանակը.

$$\begin{aligned} N_{տ.ք.} &= 3656 & N_{օր.ք.} & (1) \\ P_{տ.ք.} &= 3656 & P_{օր.ք.} & (2) \\ N_{տ.գ.} &= 3656 & N_{օր.գ.} & (3) \\ P_{տ.գ.} &= 3656 & P_{օր.գ.} & (4), \end{aligned}$$

որտեղ $N_{տ.ք.}$, $P_{տ.ք.}$ և $N_{տ.գ.}$, $P_{տ.գ.}$ համապատասխանաբար մեկ մարդուց մեկ տարում ներմուծվող ազոտի ու ֆոսֆորի քանակն է քաղաքային և գյուղական համայնքներից, իսկ $N_{օր.ք.}$, $P_{օր.ք.}$ և $N_{օր.գ.}$, $P_{օր.գ.}$ մեկ մարդուց մեկ օրում ներմուծվող ազոտի ու ֆոսֆորի քանակն է քաղաքային և գյուղական համայնքներից: Ըստ Վոլենվայդերի, խոշոր եղջերավոր անասունների 1000 կգ կենդանի քաշից տարեկան արտաթորանքների միջոցով շրջակա միջավայր է ներմուծվում 156 կգ ազոտ և 17 կգ ֆոսֆոր, մանր եղջերավոր անասուններից՝ 119 կգ ազոտ ու 20 կգ ֆոսֆոր, իսկ խոզերից՝ 150 կգ ազոտ և 45 կգ ֆոսֆոր (աղ. 1) [8]:

Աղ.1. Ընդհանուր ազոտի և ֆոսֆորի պարունակությունը գյուղատնտեսական կենդանիների էքսկրեմենտներում (կգ/տարի 1000 կգ կենդանի քաշից)

Կենդանատեսակ	Էքսկրեմենտների ընդհանուր զանգված, կգ/տարի	Ազոտի բացարձակ պարունակություն, կգ/տարի	Ֆոսֆորի բացարձակ պարունակություն, կգ/տարի
խոշոր եղջերավոր անասուն	27000	156	17
մանր եղջերավոր անասուն	16000	119	20
խոզ	30000	150	45

Ներդրելով մարզի խոշոր եղջերավոր անասունների միջին քաշը 450 կգ, մանր եղջերավոր անասունների միջին քաշը 50 կգ, իսկ խոզերինը՝ 80 կգ, հետևում է.

$$\begin{aligned} N_{խ.ե.} &= 450 \cdot N_{տ.խ.ե.} / 1000 & (5) \\ P_{խ.ե.} &= 450 \cdot P_{տ.խ.ե.} / 1000 & (6) \\ N_{մ.ե.} &= 50 \cdot N_{տ.մ.ե.} / 1000 & (7) \\ P_{մ.ե.} &= 50 \cdot P_{տ.մ.ե.} / 1000 & (8) \\ N_{խ.} &= 80 \cdot N_{տ.խ.} / 1000 & (9) \\ P_{խ.} &= 80 \cdot P_{տ.խ.} / 1000 & (10), \end{aligned}$$

որտեղ $N_{խ.ե.}$, $P_{խ.ե.}$, $N_{մ.ե.}$, $P_{մ.ե.}$ և $N_{խ.}$, $P_{խ.}$ համապատասխանաբար մեկ խոշոր եղջերավոր անասունի, մեկ մանր եղջերավոր անասունի և մեկ խոզի էքսկրեմենտներից միջավայր մտնող ազոտի և ֆոսֆորի քանակն է, իսկ $N_{տ.խ.ե.}$, $P_{տ.խ.ե.}$, $N_{տ.մ.ե.}$, $P_{տ.մ.ե.}$ և $N_{տ.խ.}$, $P_{տ.խ.}$ համապատասխանաբար խոշոր, մանր եղջերավոր անասունի և խոզի 1000կգ կենդանի քաշից արտաթորվող էքսկրեմենտներից շրջակա միջավայր ներմուծվող ազոտի և ֆոսֆորի քանակներն են: Ըստ Վոլենվայդերի, միջին ծանրաբեռնված 1 հա արոտավայրում տարեկան հող է ներմուծվում 10 գ/մ² ազոտ և 1,45 գ/մ² ֆոսֆոր [8]: Վերջինս համապատասխանեցնելով Տավուշի մարզի բնակլիմայական պայմաններին, կգանգ եզրակացության, որ թույլատրելի ծանրաբեռնվածության ապահովման դեպքում մեկ հեկտար տարածքի վրա կարելի է արածեցնել 1,4 պայմանական գլուխ խոշոր և 13 պայմանական գլուխ մանր եղջերավոր անասուն:

Արդյունքներ և քննարկում: Համաձայն Հայաստանի Հանրապետության Ազգային վիճակագրական ծառայության տվյալների՝ 2012 թ. այս տարածքում բնակվել է 134,9 հազ. մարդ, որից 52,9 հազ.՝ քաղաքներում, իսկ 82 հազ.՝ գյուղերում (աղ. 2) [3]:

Աղ.2. Տավուշի մարզի բնակչության թվաքանակը

Տարեթիվը	Քաղաքային բնակչություն (հազ. մարդ)	Գյուղական բնակչություն (հազ. մարդ)	Ընդհանուր բնակչություն (հազ. մարդ)
2009	52,5	81,6	134,1
2010	52,6	81,9	134,5
2011	52,7	81,9	134,6
2012	52,9	82	134,9

Ինչպես երևում է աղ. 2-ից, վերջին չորս տարիների ընթացքում Տավուշի մարզի բնակչության թվաքանակի էական փոփոխություն չի նկատվել:

Օգտվելով (1), (2), (3) և (4) բաժաններից կարելի է հաշվել, թե այս տարածքում բնակչության տնտեսական գործունեության հետևանքով ինչքան ազոտ և ֆոսֆոր է մտնում շրջակա միջավայր: Ինչպես ցույց են տվել հաշվարկները 2012 թ. մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով շրջակա միջավայր է ներմուծվել 959,66 տ ազոտ և 95,96 տ ֆոսֆոր (աղ. 3):

Աղ.3. Մարդու կենցաղային գործունեության հետևանքով Տավուշի մարզում միջավայր ներմուծված ազոտի (N) և ֆոսֆորի (P) պարունակությունը (տ/տարի)

Տարեթիվը	Քաղաքային շրջաններ		Գյուղական շրջաններ		Ընդամենը	
	N	P	N	P	N	P
2009	536,55	53,66	416,98	41,69	953,53	95,35
2010	537,57	53,76	418,51	41,85	956,08	95,61
2011	538,59	53,86	418,51	41,45	957,10	95,71
2012	540,64	54,06	418,02	41,90	959,66	95,96

Անասնապահության ոլորտին վերաբերող մեր կողմից կատարված հաշվարկներից և ՀՀ Ազգային վիճակագրության վարչության տվյալներից պարզվել է, որ 2012 թ. Տավուշի բնակչությունը ունեցել է 34136 խոշոր ու 15146 մանր եղջերավոր անասուն և 14346 խոզ (աղ.4) [1]: Ինչպես երևում է աղյուսակից, խոշոր և մանր եղջերավոր անասունների գլխաքանակի էական փոփոխություն չի նկատվել 2009-2012 թթ. ժամանակահատվածում, իսկ խոզերի գլխաքանակը այդ նույն ժամանակահատվածում ավելացել է շուրջ 66%-ով:

Աղ.4. Տավուշի մարզի խոշոր ու մանր եղջերավոր անասունների և խոզերի գլխաքանակը 2009-2012 թթ.

Տարեթիվը	Խոշոր եղջերավոր անասուն	Մանր եղջերավոր անասուն	Խոզ
2009	33361	16122	8626
2010	33751	14155	13348
2011	33755	14574	13696
2012	34136	15146	14346

Օգտվելով (5), (6), (7), (8), (9) և (10) բաժաններից, մենք կատարել ենք հաշվարկներ և պարզել, որ 2012 թ. խոշոր ու մանր եղջերավոր անասունների և խոզերի արտաթորանքների միջոցով շրջակա միջավայր է ներմուծվել ընդամենը 2658,62 տ ազոտ և 327,94 տ ֆոսֆոր (աղ.5): Ուսումնասիրությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ 2009-2012 թթ. տեղի է ունեցել շրջակա միջավայր ներմուծվող ազոտի աճ 4,6%-ով և ֆոսֆորի աճ 8,4%-ով:

Օգտվելով Վոլենվայդերի տվյալներից և մեր կողմից կատարված հաշվարկներից՝ հաշվվել է նաև Տավուշի մարզի արոտավայրերի բեռնվածությունը: Համաձայն Հայաստանի Հանրապետության կառավարությանն առընթեր անշարժ գույքի կադաստրի պետական կոմիտեի տվյալների՝ Տավուշի մարզն ունի 63201,5 հա արոտավայր:

Աղ.5. Տավուշի մարզում խոշոր ու մանր եղջերավոր անասունների և խոզերի արտաթորանքների միջոցով շրջակա միջավայր ներմուծված ազոտի և ֆոսֆորի քանակները (տոննա/տարի)

Տարեթիվը	Խոշոր եղջերավոր անասուն		Մանր եղջերավոր անասուն		Խոզ		Ընդամենը	
	N	P	N	P	N	P	N	P
2009	2341,94	255,21	95,93	16,12	103,51	31,05	2541,38	302,38
2010	2369,32	258,20	84,22	14,16	160,18	48,05	2613,72	320,41
2011	2369,60	258,35	86,72	14,57	164,35	49,31	2620,67	322,11
2012	2396,35	261,14	90,12	15,15	172,15	51,65	2658,62	327,94

Ըստ Վոլենվայդերի առաջարկած մոտեցման՝ 9,3 պայմանական գլուխ մանր եղջերավոր անասուններին անհրաժեշտ է մեկ պայմանական գլուխ խոշոր եղջերավոր անասունի համար պահանջվող արոտավայր:

Հաշվարկներից երևում է, որ Տավուշի մարզի արոտավայրերի բեռնվածությունը 2012 թ. կազմել է ընդամենը 40,4% (աղ. 6):

Աղ.6. Տավուշի մարզի արոտավայրերի բեռնվածությունը և անասնագլխաքանակի աճի հնարավորությունը

Տարեթիվը	Արոտավայրերի բեռնվածություն, %	Անասնագլխաքանակի աճի հնարավորությունը մեկ պայմանական խոշոր եղջերավոր անասունի հաշվարկով
2009	39,7	53388
2010	39,9	53209
2011	39,9	53160
2012	40,4	52717

Վիճակագրական տվյալներից պարզվել է, որ նկատվում է անասնագլխաքանակի աննշան աճ, որը ինչպես մենք պարզեցինք վտանգ չի հանդիսանում տարածաշրջանի համար: Ինչպես երևում է աղ. 6-ի տվյալներից, այս տարածաշրջանում անասնապահության զարգացման մեծ հնարավորություն կա (մինչև 52717 գլուխ խոշոր եղջերավոր անասուն): Միայն անհրաժեշտ է կատարել ճիշտ արածեցում, այսինքն, չառաջացնել տեղային գերբեռնվածություն, օգտագործել համայնքներից հեռու գտնվող արոտավայրերը և յուրաքանչյուր հինգերորդ տարին արոտավայրը թողնել հանգստի վիճակում, որպեսզի տեղի ունենա բնական սերմնաշրջանառություն: Այս ճանապարհով կարելի է հասնել արոտավայրերի արդյունավետության բարձրացմանը, ինչպես նաև նվազեցնել հողային էրոզիան:

Ըստ Ռասպլետինայի՝ խոշոր և մանր եղջերավոր անասունների էքսկրեմենտների միջոցով հող մտած ֆոսֆորի 1,5%-ը անցնում է մակերևութային և գրունտային ջրեր [6]: Ազոտի համար այս ցուցանիշը ավելի մեծ է և այն հավասար է 10-20%: Սրա հետ կապված անհրաժեշտ է կառուցել գոմաղբի կուտակման վայրեր, որպեսզի անասնապահության հետագա զարգացումը չունենա իր բացասական ազդեցությունը շրջակա միջավայրի՝ մասնավորապես Աղստև գետի վրա:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Անասնագլխաքանակի համատարած հաշվառման հանրագումարները 2012 թվականի հունվարի 1-ի դրությամբ, Հայաստանի Հանրապետության Ազգային վիճակագրական ծառայություն, Երևան, 6 էջ, 2012:
2. Հայաստանի Հանրապետության մարզերը և Երևան քաղաքը թվերով 2007–2011, Հայաստանի Հանրապետության Ազգային վիճակագրական ծառայություն, Երևան, էջ 312-318, 2012:
3. Հայաստանի Հանրապետության մշտական բնակչության թվաքանակը 2012 թվականի հոկտեմբերի 1-ի դրությամբ, Հայաստանի Հանրապետության Ազգային վիճակագրական ծառայություն, Երևան, 10 էջ, 2012:

4. *Жарикова М.В.* Влияние экологического фактора на качество жизни населения. Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского, Тамбов, 1, 3, (13), с. 131-135, 2008.
5. *Иванов К.С., Сурикова Т.Б., Сотникова Е.В.* Экологический мониторинг и контроль, М., МГТУ “МАМИ”, 178 с., 2011.
6. *Кондратьев С.А., Ефремова Л.В., Расплетина Г.Ф. и др.* Оценка внешней нагрузки на Ладожское озеро. Экологическая химия. 6, 2. с. 73–84, 1997.
7. *Vollenweider R.A.* Scientific fundamental of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. Organ. Econ. Coop. and Develop., Directorate for Scientific Affairs. p. 159. 1968.
8. *Vollenweider R.A.* Scientific fundamental of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. Report organization economic cooperation and development, p. 213. 1970.

Ստացվել է 11.03.2013



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

ՊԱՐԱՐՏԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ԵՎ ՖՈՒՆԳԻՑԻԴԻ ՀԱՄԱՏԵՂ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԵՂՁԵՆՈՒ ԲԵՐՔԻ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՀԱՏԿԱՆԻՇՆԵՐԻ ՎՐԱ

Հ.Է. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան, ագրոնոմիական ֆակուլտետ,
Կ. Կ. Աղաջանյանի անվան ընդհանուր երկրագործության ամբիոն
agrochemistry@mail.ru

Ուսումնասիրությունները կատարվել են 2008-2010 թթ. Արարատյան հարթավայրի պայմաններում՝ դեղձենու Ուսպեխ և Նարինջի վաղահաս սորտերի վրա: Հետազոտությունների ընթացքում հանքային պարարտանյութերը կիրառվել են գարնանը՝ հող մտցնելով, իսկ օրգանահանքային բաղադրության պարարտանյութը (կոմպլեքսոն) կիրառվել է տոպազի հետ համատեղ՝ արտարմատային սնուցմամբ՝ պտուղների կազմակերպման շրջանում (մայիսի 2-րդ տասնօրյակ) և 20 օր դրանից հետո: Փորձերով ապացուցվել է, որ բարձր և որակյալ բերք հնարավոր է ստանալ այն դեպքում, երբ հանքային պարարտացման հետ կատարվում է արտարմատային սնուցում՝ ըստ անհրաժեշտության համատեղված վնասակար օրգանիզմների դեմ քիմիական պայքարի որևէ միջոցառմամբ:

Դեղձ – պտղաթափ – օրգանահանքային պարարտանյութ – ֆունգիցիդ – բերքատվություն

Исследования проводились в 2008-2010 гг. в условиях Араратской равнины на сортах персиковых деревьев Успех и Наринджи. Минеральное удобрение вносилось в почву весной, а органоминеральное удобрение (комплексон) совмещалось с топазом и применялось в период формирования плодов (вторая декада мая) и через 20 дней. Опытами установлено, что высокий и качественный урожай можно обеспечить в том случае, когда с основными минеральными удобрениями применяется внекорневая подкормка, и химические средства борьбы с вредными организмами.

Персик – опадение плодов – органоминеральное удобрение – фунгицид – урожайность

The studies have been carried out in Ararat valley on Uspek and Narindzhi peach varieties. In the experiments, mineral fertilizers were introduced into the soil in spring, while organic-mineral fertilizer (complexon) is mixed with with topaz and applied during fruit formation (the second decade of May) and after 20 days. Experiments prove that high and qualitative yield is provided in case of mineral fertilization alongside with off-root nourishment with chemicals applied against harmful organisms in the case of necessity.

Peach – fruit drop – organic fertilizer – fungicide – crop yield

Որպես արժեքավոր պտղատեսակ, դեղձի նկատմամբ եղած հասարակական պահանջարկը գնալով մեծանում է, սակայն լինելով համեմատաբար նուրբ և բնական պայմանների կտրուկ փոփոխությունների նկատմամբ զգայուն ծառատեսակ, դեղձենին առավել շատ է տուժում ոռոգման, պարարտացման, էտի, ձևավորման, վնասատուների և հիվանդությունների դեմ պայքարի, ինչպես նաև ագրոտեխնիկական այլ միջոցառումների խախտումներից:

Հաշվի առնելով նշված հանգամանքները, մշակվել են դեղձենու պարարտացման նոր մոտեցումներ, որտեղ ընդգրկվել են արմատային և արտարմատային պարարտացումները, ինչպես նաև բույսերի պաշտպանության քիմիական միջոցառումները, որոնց համատեղ կիրառումից ոչ միայն բարձրանում է նշված նյութերի ազդու կենսաբանական և տնտեսական արդյունավետությունը, այլ նաև զգալիորեն թուլանում է միջավայրի վրա գործադրվող անթրոպոգեն ճնշումը [1, 2]:

Հետազոտությունների նպատակն է եղել ուսումնասիրել հանքային, օրգանահանքային պարարտանյութերի ու ֆունգիցիդի համատեղման ազդեցությունը դեղձենու նշված սորտերի կենսաբանական հիմնական հատկանիշների՝ բերքի որակական և քանակական ցուցանիշների, պտղաթափի աստիճանի վրա, ինչպես նաև որոշվել է տոպագ ֆունգիցիդի թունազրկման դինամիկան դեղձենու պտուղներում:

Նյութ և մեթոդ: Փորձը դրվել է չորս կրկնողությամբ, յուրաքանչյուր կրկնողությունում 5-ական ծառ՝ հետևյալ տարբերակներով.

1. ստուգիչ (առանց պարարտացման և սրսկման),
2. կոմպլեքս (ՕՀՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%,
3. N₉₀,
4. N₉₀ P₉₀,
5. N₆₀ P₉₀ K₉₀,
6. N₉₀ P₉₀ K₉₀,
7. N₁₂₀ P₉₀ K₉₀,
8. N₁₂₀ P₉₀ K₉₀ կոմպլեքս (ՕՀՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%:

Որպես օրգանահանքային պարարտանյութ, օգտագործվել է կոմպլեքսն, որը լավ լուծվում է ջրում, պարունակում է մակրո և միկրոտարրեր, ինչպես նաև հումատային նյութեր, կիրառվում է հող մտցնելով և արտարմատային սնուցմամբ: Կոմպլեքսը համատեղվում է գեթե բոլոր պեստիցիդների հետ, այդ թվում տոպագի հետ, ընդ որում, համընկնում են նաև դրանց կիրառման ժամկետները: Ստացված լուծույթը վեգետացիայի ընթացքում բույսերին տրվել է 2 անգամ՝ պտուղների կազմակերպման շրջանում և դրանից 20 օր հետո: Այս ժամկետները համընկնում են ալրացողի զարգացման, ինչպես նաև դեղձենու պտուղների կազմավորման հետ:

Արդյունքներ և քննարկում: Քիչ չեն դեպքերը, երբ բերքը լինում է բարձր, իսկ բերքի որակական ցուցանիշները՝ ցածր, կամ բերքում պահպանվում են թույլատրելի չափերը գերազանցող վնասակար նյութերի մնացորդներ (նիտրատներ, նիտրիտներ, պեստիցիդների մնացորդային քանակներ), քանի որ շատ հաճախ ագրոտեխնիկական սխալ միջոցառումների կիրառման հետևանքով բերքի քանակն ավելանում է որակի հաշվին: Վերջինս անցանկալի երևույթ է, և այն պարզելու համար կատարվել է դեղձենու պտուղների որակական անալիզ: Տվյալները բերվում են աղ. 1-ում:

Աղ. 1-ի տվյալները ցույց են տալիս, որ պարարտանյութերը նպաստել են դեղձենու պտուղներում չոր նյութերի, ինչպես նաև ընդհանուր շաքարների և C վիտամինի ավելացմանը: Համեմատաբար ցածր թթվություն են պարունակել N₁₂₀P₉₀K₉₀ + կոմպլեքսն (ՕՀՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08% ստացած տարբերակի պտուղները, որտեղ թթվությունը եղել է 0,46%: Մնացած ցուցանիշներով ևս այս տարբերակն աչքի է ընկել լավագույն ցուցանիշներով, մասնավորաբար՝ չոր նյութերը կազմել են 16,1%, ընդհանուր շաքարները՝ 10,8%, իսկ C վիտամինը՝ 5,5 մգ %: Պտղաբերող այգին սովորաբար ավելի ուժեղ է արտացոլում պարարտանյութերի ազդեցությունը, որովհետև գեներատիվ օրգանները ժառանգական տեսանկյունից դոմինանտ ռեակցիա ունեն արտաքին գործոնների նկատմամբ, քան դրան սպասարկող վեգետատիվ օրգանները: Հայաստանում մշակվող հիմնական պտղատեսակներից պարարտանյութերի նկատմամբ ամենապահանջկոտը դեղձենին է, ինչն ավելի է կարևորում կենսաբանորեն ճիշտ պարարտացման անհրաժեշտությունը: Պտղալիցի շրջանում շատ կարևոր է պտուղների սննդանյութերով բավարար չափով ապահովումը, որի արդյունքում նվազում է պտղաթափը: Պտղաթափի վերաբերյալ 2008-2010թթ. հունիսի 3-րդ տասնօրյակում կատարած դիտումներն ու հաշվումները ցույց են տվել, որ պարարտացված տարբերակների ծառերի մոտ հունիսյան պտղաթափը, որը հաճախ համարվում է սովորական երևույթ, շատ անգամ պակաս է եղել ստուգիչի համեմատությամբ: Վերջինս իր հերթին նպաստել է բերքի բարձրացմանը: Աղ. 2-ում բերված են հետազոտության արդյունքները:

Աղ. 2-ի տվյալներից երևում է, որ հունիսյան պտղաթափի ամենից շատ տեղի է ունեցել չպարարտացված ծառերի մոտ: Պտղաթափի աստիճանը երկու սորտերի մոտ անհամեմատ քիչ է եղել 8-րդ տարբերակում (N₁₂₀ P₉₀ K₉₀ կոմպլեքսն (ՕՀՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%), որտեղ հանքային պարարտանյութերի ֆոնի վրա կիրառվել է արտարմատային սնուցում՝ համատեղված տոպագ պատրաստուկի հետ:

Աղ. 1. Պարարտանյութերի և տոպագի ազդեցությունը դեղձենու պտուղների որակական հիմնական ցուցանիշների վրա

Տարբերակներ	Հոր նյութեր, %	Շաքարներ, %			թթվություն, %	վիտամին C, մգ %
		միաշաքարներ	երկշաքարներ	գլյուկոզ		
1. Ստուգիչ (առանց պարարտացման և սրսկման),	14,2	3,9	5,7	9,6	0,58	4,2
2. Կոմպլեքս (ՕՐՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%	14,4	4,1	5,9	10,0	0,55	4,4
3. N ₉₀	14,3	4,0	5,9	9,9	0,56	4,3
4. N ₉₀ P ₉₀	14,6	4,2	6,1	10,3	0,52	4,7
5. N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	15,2	4,2	6,2	10,4	0,50	4,9
6. N ₉₀ P ₉₀ K ₉₀	15,7	4,1	6,2	10,3	0,51	5,1
7. N ₁₂₀ P ₉₀ K ₉₀	15,8	4,3	6,3	10,6	0,48	5,3
8. N ₁₂₀ P ₉₀ K ₉₀ + կոմպլեքս (ՕՐՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%	16,1	4,3	6,5	10,8	0,46	5,5

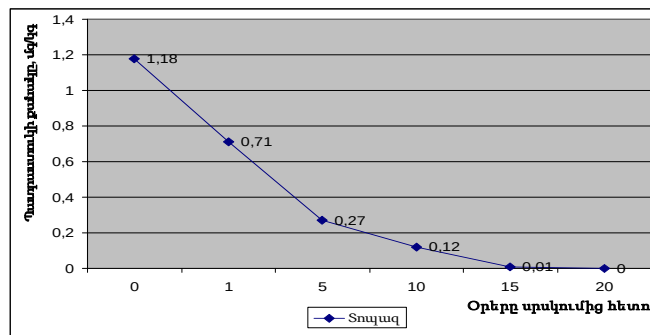
Աղ. 2. Պարարտանյութերի և տոպագի ազդեցությունը դեղձենու պտղաթափի աստիճանի վրա, հատ

Տարբերակներ	Ուսպեխ				Նարինջի							
	2008թ.	2009թ.	2010թ.	միջինը	Տարբերությունը ստուգիչի նկատմամբ		2008թ.	2009թ.	2010թ.	միջինը	Տարբերությունը ստուգիչի նկատմամբ	
					հատ	%					հատ	%
1. Ստուգիչ (առանց պարարտացման և սրսկման),	42	52	47	47	-	100	44	51	45	47	-	100
2. Կոմպլեքս (ՕՐՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%	38	46	39	41	6	87,2	35	38	32	35	12	74,4
3. N ₉₀	33	45	42	40	7	85,1	32	36	41	36	11	76,5
4. N ₉₀ P ₉₀	30	39	40	36	11	76,5	27	30	37	31	16	65,9
5. N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	25	32	38	32	15	68,0	21	24	31	25	22	53,1
6. N ₉₀ P ₉₀ K ₉₀	21	28	31	27	20	57,4	18	20	28	22	25	46,8
7. N ₁₂₀ P ₉₀ K ₉₀	17	21	26	21	26	44,6	15	16	22	18	30	38,2
8. N ₁₂₀ P ₉₀ K ₉₀ + կոմպլեքս (ՕՐՊ) 0,25%-ոց ջրային լուծույթ + տոպագ 0,08%	11	15	15	14	33	29,7	11	13	16	13	34	27,6

Այս տարբերակում Ուսպեխ սորտի թափված պտուղների միջին քանակը եղել է 14 հատ, կամ ստուգիչ տարբերակի համեմատությամբ նվազել է 3,3 անգամ, իսկ Նարինջի սորտի մոտ՝ 13 հատ, կամ 2,8 անգամ քիչ ստուգիչ տարբերակի համեմատ:

Ֆունգիցիդները օժտված են կենսաբանական բարձր ակտիվությամբ, որոնք ազդելով հարուցիչի վրա, թափանցում են բույսերի օրգանների մեջ՝ տվյալ դեպքում դեղձենու պտուղների մեջ, դրանով իսկ վտանգ ներկայացնելով մարդկանց, կենդանիների և շրջակա միջավայրի համար ընդհանրապես: Ֆունգիցիդների մնացորդները ներգրավվում են բույսերի կենսաքիմիական գործընթացներում, որի հետևանքով ճնշում կամ խթանում են բույսերի ֆիզիոլոգիական գործընթացները, ինչն իր արտացոլումն է գտնում բերքի որակի վրա: Հայտնի է, որ ֆունգիցիդների կիրառումը տնտեսապես շահավետ է, սակայն արդյունավետության վերջնական պատասխանը տրվում է դրանց թունազրկման և պտղի որակի վրա ունեցած ազդեցության որոշումից հետո: Այս հարցերի պատասխանը տալու համար կատարվել են հետազոտություններ՝ պարզելու համար տոպագի թունազրկման դիսամիկան դեղձի պտուղներում: Արդյունքները բերված են նկ.1-ում:

Բերված գծապատկերից երևում է, որ սրսկման արդեն հաջորդ օրը դեղձենու պտուղներում նկատվել է տոպագի մնացորդների զգալի նվազում, ընդ որում, առաջին օրերին այն տեղի է ունեցել ավելի կտրուկ, քան հետագայում: Վնասակար մնացորդներն իսպառ վերացել են սրսկումից արդեն 15-20 օր հետո:



Նկ.1. Ղեղձենու պտուղներում տոպագի թունազրկման դինամիկան

Պարարտանյութերի կիրառումն էականորեն է ազդել նաև բերքի քանակի ավելացման վրա: Երեք տարվա միջին տվյալները ցույց են տալիս, որ Ղեղձենու բարձր բերքատվությանը հատկապես նպաստում է այն տարբերակը, որտեղ հանքային պարարտանյութերի ֆոնի վրա կիրառվել է արտարմատային սնուցում օրգանահանքային պարարտանյութով՝ համատեղված տոպագ ֆունգիցիդի հետ: Եթե ստուգիչ տարբերակում 3 տարվա միջին բերքատվությունը կազմել է 99,6 g/հա, ապա այդ նույն ցուցանիշը 8-րդ տարբերակում եղել է 194,9 g/հա: Սա նշանակում է, որ բերքի հավելումը ստուգիչ տարբերակի նկատմամբ կազմել է 95,3 g/հա, կամ 95,7%-ով ավելի:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Գրիգորյան Հ.Է., Երիցյան Ս.Կ., Գրիգորյան Ա.Յ. Հանքային պարարտանյութերի, կոմպլեքսների և տոպագի ազդեցությունը Ղեղձենու բերքի վրա, Ագրոգիտություն, N 3-4, Երևան, 2011թ., էջ 182-186:
2. Григорян О.Э. “Экономическая эффективность применения удобрений и топаза на персиковых деревьях, “ИЗВЕСТИЯ ГАУА” ,1, 21-24с., 2012.

Ստացվել է 15.05.2012



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

CISPLATIN *IN VIVO* ACTION ON CONTENT OF NEUTRAL LIPIDS IN RAT LIVER AND THYMUS NUCLEAR MEMBRANES

E.S. GEVORGYAN, A.G. HOVHANISYAN, ZH.V. YAVROYAN,
N.R. HAKOBYAN, E.G. SARGSYAN

Yerevan State University, Biophysics Department
gevorgyan_emil@yahoo.com

The content of total neutral lipid and its individual fractions in rat liver and thymus nuclear membrane preparations was studied. The *in vivo* action of antitumor agent cisplatin leads to decrease of total neutral lipid content in both liver and thymus nuclear membrane preparations a 24% and 20% correspondingly. Six fractions of neutral lipids were revealed in both liver and thymus nuclear membrane preparations. The cisplatin action leads to decrease of relative content and percentage of free cholesterol while the relative content and percentage of other fractions do not reliably changed. At the same time the absolute quantities of all fractions are reliably changed which demonstrates the high-powered action of cisplatin on nuclear lipid metabolic pathways. The absolute quantities of all fractions reliably decreased under the cisplatin action in both liver and thymus nuclear membrane preparations.

Cisplatin – nuclear membranes – neutral lipids – cholesterol

Հետազոտվել է առնետի լյարդի և ուրցագեղձի կորիզաթաղանթների չեզոք լիպիդների բաղադրությունը հակաուռուցքային միացություն ցիսպլատինի *in vivo* ազդեցության տակ: Ցույց է տրված, որ ցիսպլատին իջեցնում է չեզոք լիպիդների ընդհանուր քանակը 24%-ով լյարդի և 20%-ով ուրցագեղձի կորիզաթաղանթների պատրաստուկներում: Չեզոք լիպիդների վեց ֆրակցիաներ են հայտնաբերվել ինչպես լյարդի, այնպես էլ ուրցագեղձի կորիզաթաղանթներում: Ցիսպլատինի ազդեցությունը բերում է պատրաստուկներում խոլեստերինի հարաբերական քանակի և տոկոսային բաղադրության հավաստի նվազման այն դեպքում, երբ մնացած ֆրակցիաների հարաբերական քանակը և տոկոսային բաղադրությունը հավաստիորեն չի փոփոխվում: Միաժամանակ, բոլոր ֆրակցիաների բացարձակ քանակները հավաստիորեն փոփոխվում են, ինչը վկայում է բջջակորիզի լիպիդների մետաբոլիզմի վրա ցիսպլատինի զգալի ներգործության մասին: Բոլոր ֆրակցիաների բացարձակ քանակները ինչպես լյարդի, այնպես էլ ուրցագեղձի կորիզաթաղանթներում հավաստիորեն նվազում են:

Ցիսպլատին – կորիզաթաղանթներ – չեզոք լիպիդներ – խոլեստերին

Изучено *in vivo* воздействие противоопухолевого препарата цисплатина на состав нейтральных липидов печени и тимуса крыс. Показано, что цисплатин приводит к снижению количества тотальных нейтральных липидов в препаратах ядерных мембран печени (на 24%) и тимуса (на 20%) крыс. Шесть фракций нейтральных липидов было выявлено в препаратах ядерных мембран как печени, так и тимуса крыс. *In vivo* воздействие цисплатина приводит к достоверному снижению относительного количества и процентного содержания свободного холестерина, в то время как относительное количество и процентное содержание остальных фракций достоверно не изменяется. Одновременно показано, что абсолютное количество всех фракций нейтральных липидов достоверно снижается как в препаратах ядерных мембран печени, так и в препаратах ядерных мембран тимуса крыс, что свидетельствует о значительном воздействии цисплатина на внутриядерные процессы метаболизма липидов.

Цисплатин – ядерные мембраны – нейтральные липиды – холестерин

The nuclear envelope is a unique dynamic structure, which serves not only as a physical barrier between the nucleus and the cytoplasm, but also as a regulator of many cellular events. It is evident that the main components of inner and outer nuclear membranes, including the phospholipid and neutral lipid components, may play important role in these various events [1,2,7]. Changes in nuclear lipid metabolism, which may be realized under the *in vivo* action of different endogenous and exogenous regulators, will lead to sudden alterations in functioning of various nuclear events: such as macromolecular exchanges between the cytosole and nucleoplasm or signal transduction nuclear pathways [11,13]. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum) is among those well known exogenous agents which is clinically used as adjuvant therapy of cancers aiming to induce tumor cells death [8, 12]. This compound has a number of possible targets in cells but the major target for it is nuclei: nuclear membranes and a number of intranuclear genetic structures, including chromosomes, chromatin and nuclear matrix. In this paper the changes of total neutral lipid content of nuclear membranes preparations from rat liver and thymus cells as well as the relative alterations of individual neutral lipids, and absolute changes their quantities after the *in vivo* action of cisplatin were described.

Materials and methods. The experiments were carried out on albino rats (120-150g weight). Cisplatin was injected peritoneal in concentration of 5 mg per 1000 g animal weight. Rats were decapitated after 24 hours of cisplatin injection. Rat liver nuclei were isolated by the method of Blober and Potter [6] and nuclear fraction of thymus – by the method of Allfrey et al [3]. Nuclear membranes were isolated by the method of Berezney et al [4]. Lipid extraction was carried out by Bligh and Dayer [5]. The fractionation of neutral lipids was carried out by micro thin layer chromatography (micro TLC) using L silicagel, 6x9 cm² plates with the thickness of layer 5-7 mm, using diethyl ester – petroleum ester – formic acid in ratio 40:10:1 as a dividing mixture. After the chromatography the plates were dried up at 20°C and were treated by 10% H₂SO₄. Then, the elaborated plates were heated at 180°C for 15 min. The quantitative estimation of separated and specific lipid phospholipids was carried out by special computer software FUGIFILM Science Lab 2001 Image Gauge V 4.0, which was destined for densitometry. Obtained results were treated by statistics.

Results and Discussion. Total neutral lipid content (in mcg/g of tissue) in nuclear membrane preparations of rat liver and thymus cells in baseline and after *in vivo* treatment of cisplatin was presented in fig.1. Cisplatin treatment reliable decreased the total neutral lipids content in both nuclear membrane preparations: a 24% decrease in rat liver nuclear membranes and 20% decrease in rat thymus nuclear membranes (fig.1).

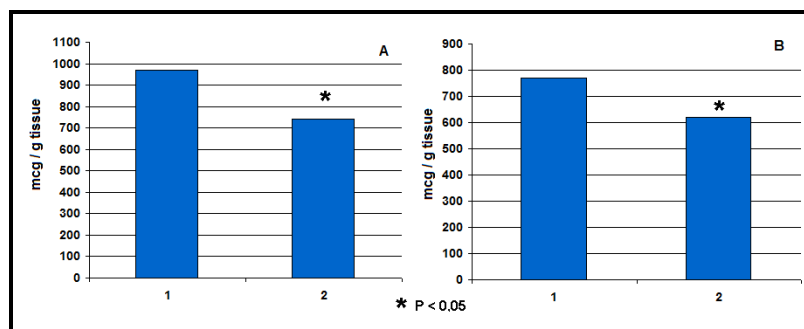


Fig. 1. Neutral lipid content (in micrograms per grams of tissue) in nuclear membrane preparations of rat liver (A) and thymus (B) cells before (1) and after (2) the *in vivo* treatment of cisplatin.

The relative quantities and percentage of individual fractions of neutral lipids in nuclear membrane preparations from liver and thymus cells after administration of cisplatin were demonstrated in tab. 1 and 2. Six fractions of separate neutral lipids were revealed in both nuclear membrane preparations. Over 78 % (in liver nuclear membranes) and near 76 % (in thymus nuclear membranes) of total neutral lipids were represented by free cholesterol, free fatty acids and cholesterol esters, while the percentage of three other fractions (monoglycerides, diglycerides and triglycerides) was only 21-24% (tab. 1, tab. 2).

Tab. 1. The relative content (in micrograms) and percentage of individual neutral lipid fractions in nuclear membrane preparations of rat liver cells before and after the cisplatin action

#	Neutral lipids	B a s e l i n e		C i s p l a t i n	
		Quantity in mcg.	%	Quantity in mcg.	%
1	Cholesterol	18.50±1.50	37.0	*15.40±1.35	30.8
2	Cholesterol Esters	8.15±1.10	16.3	9.05±1.32	18.1
3	Free Fatty Acids	12.40±0.60	24.8	14.20±0.83	28.4
4	Monoglycerides	4.80±0.48	9.6	4.90±0.45	9.8
5	Diglycerides	3.40±0.65	6.8	3.65±0.31	7.3
6	Triglycerides	2.75±0.46	5.5	2.80±0.15	5.6
	T o t a l	50	100	50	100

*p<0.05

In vivo action of cisplatin led to reliable changes only of free cholesterol percentage in both nuclear membrane preparations. Its percentage decreased in both liver and thymus nuclear membranes (tab. 1 and 2). The alterations of relative quantities of rest fractions of neutral lipids were negligible and not reliable.

Tab. 2. The relative content (in micrograms) and percentage of individual neutral lipid fractions in nuclear membrane preparations of rat thymus cells before and after the cisplatin action

#	Neutral lipids	B a s e l i n e		C i s p l a t i n	
		Quantity in mcg.	%	Quantity in mcg.	%
1	Cholesterol	19.25±1.16	38.5	17.10±1.20	34.2
2	Cholesterol Esters	7.40±1.04	14.8	7.90±0.67	15.8
3	Free Fatty Acids	11.35±1.13	22.7	12.73±0.47	25.5
4	Monoglycerides	5.00±0.40	10.0	5.10±0.25	10.2
5	Diglycerides	4.50±0.45	9.0	4.75±0.23	9.5
6	Triglycerides	2.50±0.44	5.0	2.42±0.15	4.8
	T o t a l	50	100	50	100

*p<0.05

These relative quantities among the individual fractions of neutral lipids after the cisplatin action were resulted when we took equal amounts of lipids (50 mcg) both in baseline and cisplatin-treated probes. Taking into consideration that *in vivo* administration of cisplatin leads to reliable decrease of total neutral lipids content in both rat liver and rat thymus nuclear membrane preparations a 24% and 20% correspondingly (fig.1) the necessity arises to determine the changes of absolute quantities of individual neutral lipids after cisplatin action. The absolute quantities of all fractions of neutral lipids in liver and thymus nuclear membrane preparations were decreased reliably (tab. 3).

Cisplatin *in vivo* action leads to decrease of all neutral lipid fractions in both liver and thymus nuclear membrane preparations (tab. 4). The most significant reduction was revealed in free cholesterol fraction (36.5% in liver and 28.5% in thymus nuclear membrane preparations) and the less decrease was detected in free fatty acids fraction (12.6% in liver and 9.6% in thymus nuclear membrane preparations). The quantities of other neutral lipid fractions decreased in various extent.

Tab. 3. The quantities (in micrograms per gram of tissue) of individual neutral lipids fractions in nuclear membrane preparations of rat liver and thymus cells before and after the cisplatin action (CH – cholesterol; CHE – cholesterol esters; FFA – free fatty acids; MG – monoglycerides, DG – diglycerides, TG – triglycerides).

#	Neutral lipids	Liver Nuclear Membrane		Thymus Nuclear Membrane	
		Baseline	Cisplatin	Baseline	Cisplatin
1	CH	58.90±14.35	*227.92±10.90	296.45±19.33	*212.04±8.16
2	CHE	158.11±6.68	*133.94±9.03	113.96±5.42	*97.96±2.40
3	FFA	40.56±11.00	*210.16±8.85	74.79±10.79	*158.10±3.55
4	MG	93.12±3.94	*72.52±1.77	77.00±5.12	*63.24±2.07
5	DG	65.96±3.61	*54.02±1.66	69.30±5.52	*58.90±1.93
6	TG	53.35±1.44	*41.44±3.19	38.50±4.02	*29.76± 2.19
	T o t a l	970.00±41.0	*740.00±35.40	770.00±50.20	*620.00±20.30

*p<0.05

This appreciable diminution of neutral lipids quantities under the antitumor agent cisplatin action is very important as during malignant transformation the ratio of neutral lipids to phospholipids increases dramatically and new fractions of neutral lipids appear [14].

Tab. 4. The alteration (in percent) of individual phospholipid quantities in liver and thymus nuclear membrane preparations under the cisplatin *in vivo* action

#	Neutral lipids	Liver Nuclear Membrane	Thymus Nuclear Membrane
1	Cholesterol	- 36.5%	- 28.5%
2	Cholesterol esters	- 15.3%	- 14.0%
3	Free Fatty Acids	- 12.6%	- 9.6%
4	Monoglycerides	- 22.1%	- 17.9%
5	Diglycerides	- 18.1%	- 15.0%
6	Triglycerides	- 22.3%	- 22.7%
	T o t a l	- 23.7%	- 19.5%

*p<0.05

These results are consonant with our previous data obtained in studies of changes of neutral lipids content in rat liver and thymus chromatin after the cisplatin *in vivo* action. In those studies the quantities of all four neutral lipid fractions in both chromatin preparations were also decreased [9]. Similar results were obtained also in studies of phospholipids content in rat liver and thymus chromatin preparations under the cisplatin *in vivo* treatment. The quantities of all five phospholipid fractions revealed in chromatin preparations as well as the total phospholipid content were also reliably decreased [10]. So all these results demonstrate the deep and multiform transformation of lipid metabolism in nuclei caused by cisplatin injection.

REFERENCES

1. Albi E., Lazzarini A., Lazzarini R., Floridi A., Damaskopoulou E., Curcio F., Cataldi S. Nuclear lipid microdomain as place of interaction between sphingomyelin and DNA during liver regeneration. *Int. J. Mol.Sci.*, 14, pp.6529-6541, 2013.
2. Albi E., Viola Magni M.P. The role of nuclear lipids. *Biology of the Cell*, 96, pp. 657-667, 2004.
3. Alfrey V.G., Mirsky A.E., Osawa S. The protein synthesis in isolated cell nucleus. *Gen. Physiol.*, 40, 3, p. 451, 1957.

4. *Berezney R., Funk L.K., Crane F.H.* Isolation of nuclear membrane from a large scale preparation of bovine liver nuclei, *203*, 3, p.531-546. 1970.
5. *Bligh E.G., Dyer W.J.* A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Biochem. Physiol.*, *37*, pp. 911-917, 1959.
6. *Blobel G., Potter V.R.* Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*, *154*, pp.76-79, 1966.
7. *Domart M.-Ch., Larijani B.* Lipid-depended and –independed regulation of nuclear envelope disassembly. *J.Chem.Biol.*, *6*, pp. 3-5, 2013.
8. *Florea A-M, Busselberg D.* Cisplatin as an anti-tumor drag: cellular mechanisms of activity, drag resistance and induced side effects. *Cancers*, *3*, pp.1351-1371, 2011.
9. *Gevorgyan E.S., Hovhanisyan A.G., Yavroyan Zh.V., Hakobyan N.R.* Content of neutral lipids in rat liver and thymus chromatin under the in vivo action of cisplatin. *Biol.Journal of Armenia*, *64*, 3, pp.97-101, 2012.
10. *Gevorgyan E.S., Yavroyan Zh.V., Hovhanisyan A.G., Hakobyan N.R.* In vivo action of cisplatin on phospholipid content in rat liver and thymus chromatin. *Electronic Journal of Natural Sciences*, *2*, 19, pp.3-6, 2012.
11. *Ledeer R.W., Wu.G.* Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *Journal of Lipid Research*, *49*, pp.1176-1185, 2008.
12. *Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B.* Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, *2*, pp. 2490- 2518, 2010.
13. *Schneider R., Cole Ch.N.* Integrating complex functions. *Nucleus*, *1*, 5, pp.387-392, 2010.
14. *Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B.* Structural and functional aspects of nuclear lipids in normal and tumor cells. *Biochemistry (Moscow)*, *65*, 5, pp.620-643, 2000.

Received on 17. 01.2013



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА АЛАНИН: 2-КЕТОГЛУТАРАТ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

Л.Д. ГАЙБАКЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА
luizaarm@list.ru

Из клеточных экстрактов *Brevibacterium flavum* выделена и частично очищена мажорная фракция аланинтрансминазы. Показано, что в результате 2-этапной очистки удельная трансаминазная активность возросла в 14 раз, а выход ферментативной активности составил 18 %. Методом гель-фильтрации установлена молекулярная масса фермента, равная 96,5 кДа. Установлено, что в прямой реакции синтеза аланина трансаминаза проявляет максимальную активность при pH 8,8-9,8, а в обратной – при pH 9,3-9,8. Выявлена 50%-ная потеря активности фермента при температуре 61°C в течение 10 мин, тогда как добавление к инкубационной среде 25 % глицерина снижает значение этого параметра до 55°C.

Brevibacterium flavum – аланинтрансминаза – очистка – молекулярная масса – оптимум pH – термостабильность

Brevibacterium flavum-ի բջջային էքստրակտներից անջատվել և մասնակիորեն մաքրվել է ալանին տրանսամինազային ակտիվության հիմնական ֆրակցիան: Մաքրման կիրառված երկու ետապների արդյունքում տրանսամինազի տեսակարար ակտիվությունը բարձրացել է 14 անգամ, իսկ ֆերմենտային ակտիվության ելքը կազմել է 18 %: Գել-ֆիլտրման տվյալներով ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը 96,5 կԴա է: Ալանինի սինթեզի ուղիղ ռեակցիայում տրանսամինազը առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում pH 8,8-9,8 տիրույթում: Հակադարձ ռեակցիայում ֆերմենտի առավելագույն ակտիվությունը դիտվում է pH-ի առավել նեղ՝ 9,3-9,8 տիրույթում: *B. flavum*-ի ալանին տրանսամինազը ակտիվության 50 %-ը կորցնում է 10 ր 61°C ջերմաստիճանում տաքացնելիս, մինչդեռ 25 % գլիցերինի ներկայությամբ այդ պարամետրի արժեքն ընկնում է մինչև 55°C:

Brevibacterium flavum – ալանին տրանսամինազ – մաքրում – մոլեկուլային զանգված – pH օպտիմում – ջերմակայունություն

From cell extracts of *Brevibacterium flavum* the major fraction of alanine transaminase activity was isolated and partially purified. In the result of 2-stage purification procedure the specific activity of transaminase increased 14-fold, and the yield of enzyme activity was 18%. According to the gel filtration data the enzyme has a molecular weight of 96.5 kDa. In the direct synthesis reaction of alanine the transaminase exhibits maximal activity at pH 8.8-9.8. In the reverse reaction the maximum enzyme activity was observed in a narrower range of pH 9.3-9.8. Alanine transaminase of *B. flavum* loses 50 % of activity in the incubation of 10 min at 61°C, while the addition to the incubation medium 25% glycerol reduces this value to 55°C.

Brevibacterium flavum – alanine transaminase – purification – molecular weight – optimum pH – thermal stability

Л-аланин: аминотрансфераза (аланинтрансминаза; ЕС 2.6.1.2) катализирует обратимую реакцию переаминирования Л-аланина и 2-кетоглутаровой кислоты (Л-аланин + 2-кетоглутарат = пируват + Л-глутамат), что имеет важное значение в метаболизме аланина.

В 1967 г. Сейер и Дженкинс впервые выделили, очистили и охарактеризовали аланинтрансминазу из сердца быка [10], этот фермент впоследствии также был выделен из других источников и подробно описан. В частности, выделены и охарактеризованы аланинтрансминазы из мозга быка [9], клеток *Chlamydomonas reinhardtii* [6], корней ячменя [4], клеток *Candida maltosa* [12], клеток гипертермофильной археобактерии – *Pyrococcus furiosus* [14], печени пресноводных рыб *Clarias batrachus* и *Labeo rohita* [11] а также клонирована через кДНК, экспрессирована и охарактеризована аланинтрансминаза-1 собаки [8]. Следует отметить, что пути биосинтеза аланина у бактерий и бактериальные аланинтрансминазы у модельного штамма *Escherichia coli* [5] и потенциальных продуцентов аминокислот – коринеформных бактерий мало изучены.

Изучены пути биосинтеза аланина у *Brevibacterium flavum* [1] и участие в нем аланинтрансминазы, валин:пируват аминотрансферазы (трансминаза С) [2, 3] и аланинрацемазы. Аналогичная картина наблюдается и у *E. coli*, у которого идентифицированы три гена, участвующие в синтезе аланина – *avtA*, *alaA* и *alaB* [13, 15]. Показано, что *avtA* соответствует гену трансминазы С *B. flavum*, продукт гена *alaA* не был охарактеризован, а *alaB* кодирует аланинтрансминазу *E. coli* [13].

Дальнейшее детальное изучение биосинтеза аланина у *E. coli* выявило, что у этих бактерий имеются три основные аланинсинтезирующие аминотрансферазы – *AvtA*, *YfbQ* (*AlaA*) и *YfdZ* (названное авторами *AlaC*), которые обеспечивают 90 % синтеза аланина, и около восьми минорных аланинсинтезирующих аминотрансфераз – *ArgD*, *AstC*, *SerC*, *AspC*, *GabT*, *PuuE* (называемый также *GoaG*), *TyrB* и *YgjG*), способных обеспечивать 10 % синтеза аланина [5]. Эти результаты американских ученых были подтверждены независимыми исследованиями японских исследователей [16].

Ким с соавторами очистили до гомогенности *YfbQ* и *YfdZ* аланинтрансминазы *E. coli* и показали, что оба фермента – димеры с молекулярными массами 87 кДа (субъединицы – 46 и 47 кДа соответственно) и проявляют Км(каж.) для пирувата в районе внутриклеточной концентрации этой кислоты [5].

Целью данной работы являлось выделение, очистка и предварительная характеристика аланинтрансминазы *B. flavum* ATCC 14067.

Материал и методика. В работе использован штамм *B. flavum* ATCC 14067 (валидное название – *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067), поддерживаемый на мясоептонном агаре (МПА).

Культуру выращивали на питательной среде, содержащей (%): сахарозу – 10; (NH₄)₂SO₄ – 3; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄ – 0,1; а также биотин – 1 мг/л; тиамин – 2 мг/л; pH – 7,4, в колбах объемом 750 мл, содержащих по 100 мл питательной среды, в течение 22-24 ч, на круговых качалках со скоростью вращения 200 об/мин при температуре 30°C. Клетки осаждали центрифугированием при 10000 g 40 мин, температуре 4°C. Биомассу промывали буферным раствором А [состав буфера – трис-HCl 20 mM, pH – 8,9; ЭДТА – 2 mM; меркаптоэтанол – 15 mM; пиридоксаль фосфат (ПДФ) – 0,1 mM; глицерин – 10 %] и после центрифугирования хранили при температуре 18°C.

Клетки дезинтегрировали ультразвуковой обработкой в течение 20 мин при частоте звука 20 кГц и мощности 300 Вт (Labsonic 2000, В. Braun, Германия) в растворе А. Остатки клеток удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин (центрифуга К-24, Германия).

Очистку аланинтрансминазы проводили при температуре 4°C по схеме, представленной в табл. 1.

На втором этапе полученный на предыдущей стадии ферментный препарат подвергли анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-тойоперле, уравновешенном раствором А. Экстракт наносили на колонку (2,5х20 см) и промывали раствором А, объем которого вдвое больше объема колонки. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0-0,4 М), приготовленным на растворе А (V=500 мл). Фракции собирали автоматическим коллектором "Isco" (США), активные фракции объединяли и использовали на следующем этапе.

Далее очистку проводили на колонке (1,5х83 см) с сефарозой CL 6В, уравновешенной буферным раствором А, содержащим 0,1 М NaCl. Аминотрансферазу элюировали тем же буферным раствором. Полученные активные фракции объединяли, концентрировали диализом против полиэтиленгликоля (мол. масса 20 кДа) и использовали в дальнейших экспериментах.

Активность фермента определялась в реакционной среде с конечным объемом 400 мкл, содержащей: 100 мМ L-глутаминовой кислоты; 50 мМ пирувата; 0,05 мМ ПЛФ; 5 мМ меркаптоэтанола; 2 мМ ЭДТА; 0,1 М трис-HCl, pH-8,9 и ферментный препарат в необходимом количестве. Количество образованного 2-кетоглутарата определяли по окислению восстановленной НАД в присутствии глутаматдегидрогеназы ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Активность фермента в обратной реакции определяли в реакционной среде с конечным объемом 400 мкл, содержащей: 100 мМ L-аланина; 50 мМ пирувата; 0,05 мМ ПЛФ; 5 мМ меркаптоэтанола; 2 мМ ЭДТА; указанный буферный раствор и ферментный препарат в необходимом количестве. Количество образованного пирувата определяли по окислению восстановленной НАД в присутствии лактатдегидрогеназы.

За единицу активности фермента принималось образование 1 мкмоль продукта за минуту в указанных условиях. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса по поглощению в ультрафиолетовой области [7].

Молекулярные массы ферментов определялись методом гель-фильтрации на колонке (1,5х83 см) с сефарозой CL 6В, калиброванной белками с известными молекулярными массами: ферритин (450 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), яичный альбумин (45 кДа), химотрипсинаген (25 кДа) и бычий миоглобин (17 кДа).

Для определения pH оптимумов активность ферментов измеряли при pH в интервале от 6 до 10. При изучении pH оптимума реакционная смесь содержала четырехкомпонентный буфер (по 100 мМ трис, фосфатного, карбонатного, боратного раствора), pH которой приводили к соответствующим значениям добавлением концентрированного HCl или NaOH.

Для изучения термостабильности фермент инкубировали в указанных условиях при разных температурах в течение 10 мин (pH 8,9). После инкубации пробы остужали в ледяной бане и измеряли остаточную ферментативную активность.

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: ЭДТА, меркаптоэтанол, трис(гидроксиметил)аминометан, белковые маркеры для молекулярных масс, 2-кетоглутаровая кислота и диализные мешки фирмы "Serva", Германия; ДЭАЭ тойоперл 650М фирмы "Toyo Soda", Япония, сефароза CL 6В фирмы "Pharmacia", Швеция, остальные реактивы производства стран СНГ.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано, что у *B. flavum* основной ферментативной активностью в биосинтезе L-аланина является глутамат: пируват трансаминирование [1], обусловленное аланинтрансaminaзой. В данной работе предпринята попытка выяснить характер этой активности. Для этого в предварительных экспериментах было выяснено, что аланинтрансaminaзная активность клеточных экстрактов *B. flavum* очень лабильна, что было известно и у других организмов [5, 10-12]. Фермент из *B. flavum* в обычном трис-HCl буфере теряет активность в течение 2-3 дней. Нами были проверены различные стабилизирующие агенты, в результате чего предложен буферный раствор А, содержащий пиридоксаль фосфат, меркаптоэтанол, ЭДТА и глицерин, в котором при 4°C аланинтрансaminaзная активность сохранялась в течение 4-5 недель.

Из клеточных экстрактов *B. flavum* выделяли и частично очищали мажорную фракцию аланин трансaminaзной активности. Результаты очистки представлены в табл. 1. Добавление к приведенной схеме этапов фракционного осаждения сульфатом

аммония и адсорбционной хроматографии на колонке с гидроксипатитом оказались неэффективны.

Табл.1. Результаты очистки аланинтрансаминазы *B. flavum*.

Этапы очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Дезинтеграция клеток	70	15,1	0,09	100,0
ДЭАЭ тойонерл 650М	60	1,3	0,67	54,9
Сефароза CL 6В	15	0,9	1,27	18,0

В результате примененных 2-х этапов очистки удельная трансаминазная активность возросла в 14 раз, а выход ферментативной активности составил 18 %. Однако полученный препарат электрофоретически гетерогенен (данные не приведены) и нуждается в дальнейшей очистке для возможного применения в экспериментах по изучению субстратной специфичности и других свойств. Некоторые характеристики частично очищенной аланинтрансаминазы *B. flavum* представлены ниже.

Результаты определения молекулярной массы аланинтрансаминазы *B. flavum* методом гель-фильтрации на сефарозе CL 6В приведены на рис.1.

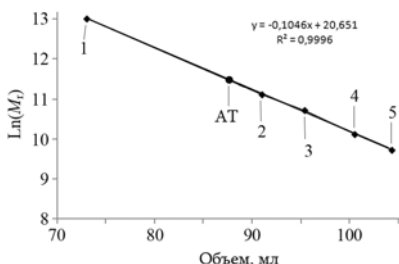


Рис.1. Определение молекулярной массы аланинтрансаминазы *B. flavum* методом гель-фильтрации. 1 – ферритин (450 кДа), 2 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 3 – яичный альбумин (45 кДа), 4 – химотрипсин (25 кДа), 5 – бычий миоглобин (17 кДа), АТ – аланин-аминотрансфераза *B. flavum*.

Из рис.1 следует, что фермент имеет молекулярную массу 96,5 кДа. Эти данные соответствуют известным литературным данным для аланинтрансаминаз: фермент из сердца свиньи имеет молекулярную массу 100 кДа [1], из *Chlamydomonas reinhardtii* – 105 кДа [6], из корней ячменя – 97 кДа [4], из *Candida maltosa* – 99 кДа [12], из *Pyrococcus furiosus* – 93,5 кДа [6], из *Escherichia coli* – 87 кДа [1].

Зависимость активности аланинтрансаминазы *B. flavum* от pH представлена на рис. 2. Из рисунка следует, что фермент в прямой реакции синтеза аланина проявляет максимальную активность при pH 8,8-9,8. В обратной реакции максимальная активность трансаминазы наблюдается в более узком диапазоне pH – 9,3-9,8. По сравнению с оптимумами pH известных аланинтрансаминаз: фермент имеет оптимум из сердца свиньи pH в диапазоне 7,5-8,5 [10], из *C. maltosa* – 7,0-8,0 [12], из *P. furiosus* – 6,5-8,0 [14], оптимум pH действия данного фермента сильно смещен в щелочную область.

Результаты изучения термостабильности аланинтрансаминазы *B. flavum* представлены на рис. 3.

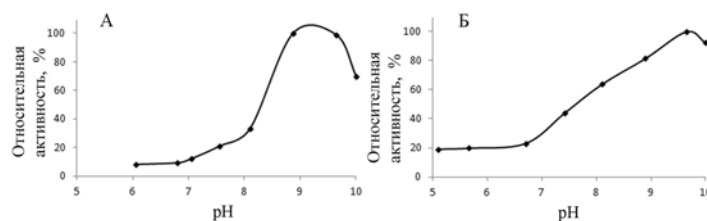


Рис.2. Зависимость активности аланинтрансминазы *B. flavum* от pH реакционной среды. А – прямая реакция (реакция синтеза аланина, 100 % активности соответствует 1,2 ед/мг), Б – обратная реакция (100 % активности соответствует 0,25 ед/мг).

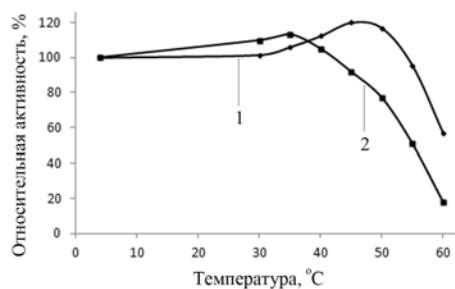


Рис.3. Влияние инкубирования 10 мин при указанных температурах на активность аланин-трансминазы *B. flavum* (прямая реакция, 100 % активности соответствует 1,2 ед/мг). 1 – среда инкубации содержала: 50 мМ трис-НСl буфера, pH 8,9, 0,05 мМ ПЛФ, 5 мМ меркаптоэтанол и 2 мМ ЕДТА, 2 – та же инкубационная среда с добавлением 25 % глицерина.

Из приведенных результатов следует, что примененные добавки стабилизируют фермент от тепловой денатурации, а добавление 25 % глицерина понижает термостабильность трансминазы. В указанных условиях аланинтрансминаза *B. flavum* теряет 50 % активности при инкубировании 10 мин, температуре 61°C, тогда как добавление к инкубационной среде 25 % глицерина снижает значение этого параметра до 55°C. Необходимо отметить значительное активирование фермента при низких температурах инкубирования. Для сравнения аланинтрансминаза из *C. Mal-tosa* при той же pH теряет 50 % активности при инкубировании 30 мин, температуре 46°C [12].

Исследования показали наличие в бесклеточных экстрактах *B. flavum* более одной аланинтрансминазы, что совпадает с известными результатами, полученными для *E. coli* [5, 16]. В данной работе изучены некоторые характеристики основной фракции аланин трансминазы *B. flavum*. Необходимы дальнейшие исследования для характеристики ферментов биосинтеза L-аланина у этого биотехнологически важного объекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайбакян Л.Д., Аветисова Г.Е., Азизян А.Г., Амбарцумян А.А., Давтян М.А. Изучение ферментов биосинтеза аланина у *Brevibacterium flavum*. Биотехнология, 1, 44-48, 2003.

2. Ambartsumyan A.A., Bezirdzhyan Kh.O. Isolation and preliminary characterization of valine: pyruvate aminotransferase from *Brevibacterium flavum*. Biochemistry (Moscow), 59, 9, 1021-1026, 1994.
3. Ambartsumyan A.A., Bezirdzhyan Kh.O. Catalytic properties of valine:pyruvate aminotransferase from *Brevibacterium flavum*. Biochemistry (Moscow), 59, 9, 1027-1032, 1994.
4. Good A.G., Muench D.G. Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. Plant Physiol., 99, 1520-1525, 1992.
5. Kim S.H., Schneider B.L., Reitzer L. Genetics and regulation of the major enzymes of alanine synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 192, 20, 5304-5311, 2010.
6. Lain-Guelbenzu B., Cardenas J., Muroz-Blanco J. Purification and properties of L-alanine aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur. J. Biochem., 202, 881 - 887, 1991.
7. Peterson G.L. Determination of total protein. Meth Enzymol. 91, 95-119, 1983.
8. Rajamohan F., Nelms L., Joslin D.L., Lu B., Reagan W.J., Lawton M. cDNA cloning, expression, purification, distribution, and characterization of biologically active canine alanineaminotransferase-1. Protein Expr. Purif., 48, 1, 81-9, 2006.
9. Ruscák M., Orlický J., Zúbor V., Hager H. Alanine aminotransferase in bovine brain: purification and properties. J. Neurochem., 39, 1, 210-6, 1982.
10. Saier Jr. M.H., Jenkins W.T. Alanine Aminotransferase I. Purification and properties. J. Biol. Chem., 242, 1, 91-100, 1967.
11. Srivastava A.S., Oohara I., Suzuki T., Shenouda S., Singh S.N., Chauhan D.P., Carrier E. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 137, 2, 197-207, 2004.
12. Umemura I., Yanagiya K., Komatsubara S., Sato T., Tosa T. Purification and Some Properties of Alanine Aminotransferase from *Candida maltosa*. Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2, 283-287, 1994.
13. Wang M.D., Buckley L., Berg C.M. Cloning of genes that suppress an *Escherichia coli* K-12 alanine auxotroph when present in multicopy plasmids. J. Bacteriol., 169, 5610-5614, 1987.
14. Ward D.E., Kengen S.W.M., van der Oost J., de Vos W.M. Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine production J. Bacteriol., 182, 9, 2559-2566, 2000.
15. Whalen W.A., Berg C.M. Analysis of an avtA::Mu d1 (Ap lac) mutant: metabolic role of transaminase C. J. Bacteriol., 150, 739-746, 1982.
16. Yoneyama H., Hori H., Lim S.-L., Murata T., Ando T., Isogai E., Katsumata R. Isolation of a mutant auxotrophic for L-alanine and identification of three major aminotransferases that synthesize L-alanine in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 5, 930-938, 2011.

Получена 28.12.2012



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

**ԱՐԵՎԵԼՅԱՆ ԿԵՆՍԱԾԱՌԻ (*BIOTA ORIENTALIS* ENDL.)
ՏՆԿԻՆԵՐԻ ԱՃԵՑՄԱՆ ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱՅԻ ՄԵԱԿՈՒՄԸ
ԲԱՑՕԹՅԱ ԶԻԴՐՈՊՈՆԻԿԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

**Ա.Յ. ՅՈՎՍԵՓՅԱՆ, Խ.Ս. ՄԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Գ.Յ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ,
Ս.Ա. ԷԼՈՅԱՆ, Ա.Ս. ԵՐԻԱԶԱՐՅԱՆ**

ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Ղազարյանի անվան հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտ
hydropinstitute@gmail.com

Երկարամյա հետազոտությունների արդյունքում (2005-2012թթ.) մշակվել է արևելյան կենսածառի (*Biota orientalis* Endl.) տնկիների անհող աճեցման կենսատեխնոլոգիա: Պարզվել է, որ բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում, 3-4 տարում, մեկ քառակուսի մետր մակերեսից կարելի է ստանալ զարգացած արմատային համակարգով կենսածառի 10-12 լիարժեք տնկիներ, որոնք վերատնկարկման ժամանակ ապահովում են 93-95% կապողականություն:

Կենսածառ – հիդրոպոնիկա – կենսատեխնոլոգիա – սննդալուծույթ – տնկի – Էկոլոգիա

В результате многолетних исследований (2005-2012гг.) разработана биотехнология беспочвенного выращивания саженцев туи восточной (*Biota orientalis* Endl.).

Выявлено, что в условиях открытой гидропоники в течение 3-4 лет с единицы площади можно получать 10-12 саженцев, соответствующих стандарту, с мощной корневой системой, которые при пересадке обеспечивают 93-95%-ную приживаемость.

Туя – гидропоника – биотехнология – питательный раствор – саженцы – экология

Soilless cultivation biotechnology of Eastern Thuja (*Biota orientalis* Endl.) has been developed in the result of long-term studies (2005-2012).

It was found out that in open-air hydroponics conditions it is possible to obtain 10-12 saplings with strong root system from one unit surface, during 3-4 years, in accordance with a standard, which ensures 93-95% stickiness during planting.

Thuja – hydroponics – biotechnology – nutrient solution – saplings – ecology

Հայաստանում վատթարացած Էկոլոգիական վիճակը սրում է անտառատարածքների ու կանաչ գոտիների վերականգնման ու ընդլայնման հիմնահարցը, որի լուծման հանգուցային օղակը ծառափատեսակների տնկիների արագ արտադրության կազմակերպումն է [3]:

Ներկայումս առաջնահերթ և հրատապ խնդիր է դարձել անտառների և կանաչ պուրակների ստեղծման ու վերականգնման աշխատանքների իրականացումը, անտառի ազգային քաղաքականությանը և ռազմավարությանը համապատասխան անտառների, անտառային տարածքների և կանաչ գոտիների կայուն կառավարմանը ուղղված գործողությունները [4], ինչին համահունչ իր յուրահատուկ դերը կարող է ունենալ բույսերի անհող մշակույթը [5, 9, 10]:

Նշված հանգամանքն անհամեմատ մեծացնում է ծառափայտեսակների տնկիների պահանջարկը մեր երկրում և էլ ավելի սրում դրանց ժամանակակից եղանակով արտադրության հիմնախնդիրը: Խնդրի լուծման գործում իր ուրույն տեղն ունի բույսերի անհող մշակույթը՝ հիդրոպոնիկան, որը հնարավորություն է տալիս կարճ ժամկետում կազմակերպել տնկանյութի արագացված արտադրություն [1, 3, 9], ինչն էապես կնպաստի վերականգնելու հանրապետության նոսրացած անտառները, այգիներն ու կանաչ պուրակները և կկանխի թանկ գներով դրսից տնկիների ներմուծումը:

Արևելյան կենսածառի ասեղնատերևները և ծայրակները պարունակում են 0,4-1,0% կամֆորայի բույրով եթերայուղ [2]: Հայտնի են արևելյան կենսածառի բազմաթիվ պարտեզային ձևեր, որոնք լայնորեն օգտագործվում են կանաչ շինարարության մեջ [3, 6, 7] և լավ հարմարված են Հայաստանի գրեթե բոլոր մարզերում:

Կենսածառը երիտասարդ հասակում հեշտությամբ ձևավորման շնորհիվ բարձր է գնահատվում քաղաքաշինության մեջ՝ եզրագարդեր, ծառուղիներ, կանաչ ցանկապատեր ստեղծելու և տարբեր կոմպոզիցիոն ձևավորումներում օգտագործելու նպատակով [7, 8]: Այժմ մեծ ուշադրություն է դարձվում մշտադալար ծառատեսակներով քաղաքային այգիների ստեղծման և քաղաքամերձ տարածքների ձևավորման խնդիրներին՝ կապված օդի աղտոտվածության բարձրացման և բնության պահպանության խնդիրների հետ:

Այդ տեսակետից փշատերև ծառատեսակների դերը մեծ է, քանի որ դրանք ոչ միայն լավ դիմանում են ծխին ու գազերին, հարստացնում օդը թթվածնով, այլև շնորհիվ մեծ քանակությամբ ֆիտոնցիդների պարունակության ունեն նաև վարակազերծիչ նշանակություն: Այսպես, օրինակ, մեկ հեկտար փշատերև անտառը մեկ օրվա ընթացքում մթնոլորտ է արտանետում մինչև 5 կգ ֆիտոնցիդներ [2, 5, 7, 10]:

Սովորական հողային մշակույթում մշտադալարներն աճում են շատ դանդաղ, ուստի, արտադրության պայմաններում բույսերը տեղափոխում են տնկարանի առաջին դաշտ, 1 մ² մակերեսում տնկարկում են 10 սերմնաբույս և թողնում 2-3 տարի, որից հետո դրանք տեղափոխում են տնկարանի երկրորդ դաշտ՝ տնկարկելով 1 բույս 1 մ² սխեմայով, թողնելով ևս 2-3 տարի [7]:

Հաշվի առնելով փշատերև ծառատեսակների տնկանյութի ավանդական եղանակով արտադրության որոշակի դժվարությունները [7] և դրանց նկատմամբ եղած բարձր պահանջարկը՝ նպատակ դրեցինք մշակել կենսածառի տնկիների անհող արտադրման կենսատեխնոլոգիա:

Նյութ և մեթոդ: (*Biota orientalis* Endl.) նոճագիների (Cupressaceae) ընտանիքին պատկանող մշտադալար ծառ կամ թուփ է՝ 10-15 մ բարձրությամբ [6, 7, 8]:

Հետազոտությունները իրականացվել են ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս. Դավթյանի անվան Հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտի հիդրոպոնիկական փորձարարական կայանում՝ 2005-2012թթ.:

Բացօթյա հիդրոպոնիկայում հրաբխային սև խարամ լցանյութում գարնանը՝ մարտի վերջին, կատարվել է արևելյան կենսածառի սերմերի ցանքս՝ 100 գ/մ² նորմայով: Ցանքսի սկզբից մինչև զանգվածային ծլումը (20-25 օր) կատարվել է անձրևացում, իսկ հետագայում սնուցումը տրվել է ներքևից՝ սովորական եղանակով [1]: Մեկ քառակուսի մետրից 800-1000 հատ հիդրոպոնիկ եղանակով ստացված կենսածառի սերմնաբույսերը (նկ. 1) գարնանը՝ ապրիլի սկզբից, տնկարկվել են բացօթյա հիդրոպոնիկայում՝ հրաբխային սև և կարմիր խարամ լցանյութերում: Տնկարկը կատարվել է 10-12 սերմնաբույս՝ 1 մ² սխեմայով: Տնկիների կենսաչափական տվյալներն են. բարձրությունը՝ 14-18 սմ, առաջին կարգի ճյուղերը՝ 6-8 հատ, արմատավզիկի տրամագիծը՝ 1,5-2,0 մմ: Վեգետացիայի ընթացքում բույսերը սնուցվել են Դավթյանի կողմից առաջարկված սննդալուծույթով [1, 9], որը տրվել է գարնանը և ամռանը՝ օրական 1-2, իսկ սեպտեմբերից՝ 1 անգամ, pH= 5,5-6,5:

Վեգետացիայի վերջում՝ սեպտեմբերից տնկիների վերերկրյա զանգվածի հասունացմանը նպաստելու նպատակով սննդարար լուծույթից ամբողջությամբ հանվում է ազոտը, և աստիճանաբար պակասեցվում սնուցման հաճախականությունը, որը բարձրացնում է տնկիների ցրտադիմացկունությունը:

Արդյունքներ և քննարկում: Աղյուսակում բերված փորձերի արդյունքները ցույց են տալիս, որ կենսածառի սերմնաբույսերը հրաբխային սև և կարմիր խարամներում ցուցաբերում են բարձր կաչողականություն՝ 95-100 %, որոնցից 3-րդ տարում ստացվում են լիարժեք տնկիներ (աղ. 1, նկ. 3): Առաջին տարում տեղափոխված սերմնաբույսերի աճը երկու լցանյութերում էլ ընթանում է դանդաղ, իսկ երկրորդ և երրորդ տարում աճը խիստ ակտիվանում է (աղ. 1, նկ. 2, 3):



Նկ.1. Արևելյան կենսածառի միամյա բուսակները բացօթյա հիդրոպոնիկայում

Կենսածառի տնկիների երկրորդ և երրորդ տարվա աճի ցուցանիշների (58-72 սմ և 112-130 սմ համապատասխանաբար) համեմատումը ցույց է տալիս, որ անհող մշակույթի պայմաններում դիտվել է աճի ամենամյա ուժգնացում, որը բացատրվում է արմատային համակարգի հետզհետե հզորացմամբ [3, 5]:

Փորձարկված լցանյութերից բույսերի աճի ինտենսիվությամբ և բնի հաստությամբ առավելությունը տրվում է հրաբխային սև խարամին (աղ.1), որը կարելի է մեկնաբանել այդ լցանյութի համեմատաբար առավել տաքացմամբ:

Մեր ուսումնասիրություններից պարզվել է նաև, որ հիդրոպոնիկայի պայմաններում կենսածառի սերմնաբուսակներից երրորդ տարում մեկ քառակուսի մետրից ստացվել են 10-12 ստանդարտին համապատասխանող տնկիներ, որոնք ունեն զարգացած արմատային համակարգ, վերատնկարկման ժամանակ ապահովվում են 93-95% կաշողականություն և կարող են հաջողությամբ օգտագործվել կանաչապատման ու քաղաքաշինության բնագավառում:



Նկ.2. Արևելյան կենսածառի տնկիները երկրորդ տարում բացօթյա հիդրոպոնիկայում

Անհող մշակույթի պայմաններում հնարավոր է բույսերի տնկարկի խտությունը մեծացնել մինչև 10 անգամ, ապահովելով վերգետնյա և ստորգետնյա օրգանների լուսաօդային և ջրասնդային անհրաժեշտ պայմաններ:

Շնորհիվ առավել ինտենսիվ աճի, բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում, 3-4 տարում հնարավոր է ստանալ ստանդարտին համապատասխան այնպիսի տնկիներ, որոնք սովորական հողային մշակույթում ստացվում են 5-6 տարում:



Նկ.3. Արևելյան կենսածառի տնկիները երրորդ տարում բացօթյա հիդրոպոնիկայում

Աղ. 1. Արևելյան կենսածառի տնկիների աճն ու ելանքը բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում

Էջանյութ	Բույսերի բանակը, հատ/մ ²	Կաջողականությունը, %	Ծառաբուծական ցուցանիշներ, տարի					
			առաջին		երկրորդ		երրորդ տարի	
			բարձրությունը, սմ	բնի տրամագիծը, մմ	բարձրությունը, սմ	բնի տրամագիծը, մմ	բարձրությունը, սմ	բնի տրամագիծը, մմ
Հրաբխային սև խարամ	10	100	30	3,2	68	12	118	20
	12	100	31	3,1	72	11	130	16
Հրաբխային կարմիր խարամ	10	95	28	2,9	58	11	112	17
	12	95	28	2,8	61	10	117	15

Այսպիսով, մեր ուսումնասիրությունների արդյունքում եկել ենք այն եզրահանգման, որ կենսածառի տնկիների հիդրոպոնիկ արտադրությունը հեռանկարային է և արդյունավետ, և կարող է զգալիորեն նպաստել մեր հանրապետության կանաչապատման խնդրի լուծմանը:

Բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում երեք տարում 1 մ² մակերեսից կարելի է ստանալ կենսածառի 10-12 լիարժեք տնկիներ, որոնք վերատնկարկման ժամանակ ապահովում են 93-95% կաջողականություն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ղալթյան Գ.Ս., Մայրապետյան Ս.Կ.* Վարդաբույր խորդենու անհող արտադրությունը, ՀՍՄՀ ԳԱ հրատարակչություն, Երևան, էջ15-21, 1976:
2. *Հովսեփյան Ա.Հ., Էլոյան Ս.Ա.* Կենսածառի եթերայուղի ստացման հնարավորությունը բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում, ՀՀ ԳԱԱ ՀՊԻ հաղորդումներ 29, էջ 24-26, 1999:
3. *Հովսեփյան Ա.Հ., Էլոյան Ս.Ա., Մայրապետյան Ս.Ս., Պողոսյան Գ.Յ.* Մի շարք ծառաբուծական տնկիների արտադրությունը անհող մշակությամբ, «Էկոլոգիայի բնության պահպանության կարևորությունը կայուն զարգացման հեռանկարում» Միջազգային գիտաժողովի նյութեր, Երևան, էջ 63, 2008:
4. ՀՀ Գյուղատնտեսության նախարարություն, Անտառային տնտեսություն, ՀՀ անտառների բնութագիրը, www.minagro.am/antar.asp/, 2006:
5. *Մայրապետյան Ս.Կ., Հովսեփյան Ա.Հ.* Կենսածառի հիդրոպոնիկական արտադրության հնարավորությունն ու արտադրությունը, ՀԳԱ ԱՊԼՀԻ հաղորդումներ, 24, էջ 72-77, 1984:
6. *Վարդանյան Ժ.Հ.* Ծառագիտություն, Երևան, Հայկական գյուղատնտեսական ակադեմիա, 370 էջ, 2005:
7. *Алексеевский А.Н.* Питомники декоративных деревьев и кустарников. М., изд-во литературы по строительству, 346 с, 1965.
8. *Гроздев Б.А.* Дендрология, М., изд-во Наука, 350с, 1960.
9. *Майрапетян С.Х.* Культура эфиромасличных растений в условиях открытой гидропоники. Ереван, изд-во АН Арм. ССР, 314 с, 1989.
10. *Martin I., Alonso N., Lopez M., Prieto M., Cadah C., Eymar E.* Nitrogen fertilization using hydroponic cultures to fertigate ornamental shrubs. Journal of plant nutrition, 29, issue 1, 2006.

Ստացվել է 07.11.2012



Биол. журн. Армении, 2 (65), 2013

ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА *HELICOTYLENCHUS* STEINER, 1945 (NEMATODA; HOPLOLAIVIDAE) В АРМЕНИИ

ДЖ.А.КАРАПЕТЯН

Институт зоологии Научного центра зоологии и гидроэкологии НАН РА
julia_soo@rambler.ru

Проведенные в Армении исследования показали наличие представителей рода *Helicotylenchus* Steiner, 1945 в разных районах. Нематоды паразитировали на корнях и в прикорневой почве разных диких и культурных растений в открытом и закрытом грунтах.

Фитонематоды – паразиты растений – род Helicotylenchus

Հայաստանում կատարված հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ *Helicotylenchus* Steiner, 1945 ցեղի ներկայացուցիչները տարբեր շրջաններում մակաբուծում են տարբեր վայրի և մշակովի բույսերի արմատներում և արմատամերձ հողում, ինչպես բաց դաշտային պայմաններում, այնպես էլ փակ գրունտում:

Բուսակեր նեմատոդներ – բույսերի մակաբույծներ – ցեղ Helicotylenchus

The researches carried out in Armenia showed presence of representatives of the genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 in various areas. Nematodes parasited on roots and the radial soil of wild and cultural plants, both in open and the closed soil.

Phytonematoda – plant parasitic –genus Helicotylenchus

Представители рода *Helicotylenchus* при тепловой обработке принимают форму спирали – “спиральные” нематоды. По этому признаку Штайнер выделил род *Helicotylenchus*, который отличается также кольчатой губной областью с небольшими поровидными фазмидами, расположенными на уровне ануса или недалеко от него, с массивным копьём и относительно большим расстоянием между отверстием протока дорсальной пищевой железы в просвет пищевода и основанием копья.

Род *Helicotylenchus* является самым многочисленным. Его представители – экто- или эндопаразиты растений. “Спиральные” нематоды распространены по всему земному шару и поражают сельскохозяйственные, технические, субтропические, декоративные культуры, деревья и другие растения. Этих нематод находят погруженными передней частью тела в корни. Вследствие проколов тканей на корнях возникают многочисленные мелкие некрозы. Нередко “спиральных” нематод обнаруживают целиком внедрившимися в корни. В таких случаях в наружных слоях корней можно найти все стадии развития – от яйца до половозрелой нематоды.

В Армении представители рода *Helicotylenchus* встречаются как в открытом, так и в закрытом грунтах.

Материал и методика. Материалом для изучения рода *Helicotylenchus* послужили образцы, собранные из разных районов Армении и на разных культурах. Нематоды рода паразитировали на корнях и в прикорневой почве разных диких и культурных растений в открытом и закрытом грунтах. Для выделения нематод из корней и прикорневой почвы растений использовали модификационный вороночный метод Бермана. Прикорневую почву и корни помещали на сетки из латуни или синтетических материалов, затем опускали в воронки с водой, диаметром 10-20 см таким образом, чтобы образцы были покрыты тонким слоем воды. Экспозиция выделения – 72 ч. Пробирки с нематодами фиксировали ТАФ-ом. Из фиксированных нематод готовили временные и постоянные водно-глицериновые препараты по методике Кирьяновой [4]. Видовой состав определяли при помощи микроскопа МБИ-3.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали наличие представителей рода *Helicotylenchus* на корнях и в прикорневой почве разных диких и культурных растений в открытом и закрытом грунте в Армении.

Вид *Helicotylenchus digonicus* Perry, 1959

Этот вид обнаружен в типовом растении – мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) и на корнях многих видов кормовых злаков. Типовое местонахождение – Мадисон в штате Висконсин (США). Один из наиболее широко распространенных видов геликотилеихов, обнаруженных во многих странах мира: США, Канада, Мексика, Иран, Великобритания, Дания, Италия [11,13,14,22]. В России зарегистрирован в различных местах средней и южной частей страны, в Грузии, Казахстане, Киргизии, Молдове и Таджикистане [3,4,8,10].

В Армении обнаружен в г. Ванадзор в прикорневой почве *Asparagus sprengeri* и *Cineraria hybrida*, а также в марзе Вайоц дзор на корнях винограда и в прикорневой почве пшеницы.

Вид *Helicotylenchus vulgaris* Yuen, 1964

Вид обнаружен в лесной почве, на которой преобладала растительность, состоящая в основном из верховых и низовых злаков, таких как лисохвост луговой (*Alopecurus pratensis* L.), мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) и на других растениях. Типовое местонахождение вида – Великобритания [13,14,16]. Он часто обнаруживается в России, Грузии, Таджикистане, Зап. Сибири, Казахстане [6,7,10].

В Армении обнаружен в городе Ванадзор в тепличных хозяйствах на корнях декоративных растений *Cineraria hybrida*, *Asparagus sprengeri* и также *Saxifraga rosa*.

Вид *Helicotylenchus canadensis* Wasseem, 1961

Типовое растение клевер красный (*Trifolium pratense* L.). Обнаружен также в прикорневой почве пастбищных злаков и осок, ели, бегонии, яблони, белого и гибридного клеверов и люцерны. Типовое местонахождение – Канада, встречается в Англии, Польше [24,25,13].

В Армении обнаружен как в закрытом, так и в открытом грунтах, в оранжереях треста озеленения.

В Ванадзоре в прикорневой почве *Asparagus plumosus*, а также в открытом грунте – в прикорневой почве сахарной свеклы, пшеницы, ячменя и гороха в г. Аштараке, г. Масис и Ташир.

Вид *Helicotylenchus rotundicanda* Sher, 1966

Типовое растение – свиной пальчатый (*Cynodon dactylon* L.) обнаружен вблизи корней, а также в прикорневой почве авокадо американского (*Persea americana* Mill), камелии японской (*Camellia japonica* L.), бирючины (*Legustrum* sp.), сливы, томата, свеклы, люцерны, клевера белого.

Типовое местонахождение – Калифорния, встречается в Канаде, Иране и в Испании [12,16,17].

В Армении обнаружен в оранжереях тепличных хозяйств Ванадзора в прикорневой почве *Gladiolus lemoinei*, *Cineraria hybrida*, *Asparagus sprengeri*.

Вид *Helicotylenchus caroliniensis* Sher, 1966

Обнаружен в болотистой почве. Типовое местонахождение – Флоренс в штате Южная Каролина (США). Найдены также в разных провинциях ЮАР. Растения-хозяева не известны.

В Армении обнаружен в окрестностях г. Ванадзор в прикорневой почве ячменя, а также в оранжереях треста озеленения г. Ванадзор в прикорневой почве *Cineraria hybrida*.

Вид *Helicotylenchus platyurus* Perry, 1959

Типовой хозяин – земляника (*Fragaria* sp.), паразитирует более чем на 20 видах деревьев и кустарников, к хозяевам относится также дуб, клен, лиственница, ель, тополь, кедр и др. Особенно часто встречается в прикорневой почве древесно-кустарниковых пород. Также встречается на корнях мятлика, пастбищных злаков, клевера красного и белого и др. Широко распространен в США, часто встречается в Канаде, из стран Европы обнаружен в Польше [11,13].

В Армении обнаружен в оранжереях г. Ванадзор, в прикорневой почве *Asparagus sprengeri*.

Вид *Helicotylenchus varicaudatus* Yuen, 1964

Этот вид распространен в странах Европы: Англии, Франции, Нидерландах, Австрии. В Польше и Германии обнаружен на боярышнике, дубе, ясене, клене и на травянистых растениях [13,14,15,22].

В Армении обнаружен в оранжереях треста озеленения г. Ванадзор в прикорневой почве *Asparagus sprengeri*, а также на корнях виноградной лозы в селе Нор-Артаметском (экспериментальная база Института зоологии).

Вид *Helicotylenchus serenus* Siddigi, 1963

Типовое местонахождение Пакистан, встречается также в Индии. Обнаружен в прикорневой почве туи и кедра гималайского.

В Армении обнаружен в оранжереях треста озеленения г. Ванадзор и Еревана. В прикорневой почве *Asparagus sprengeri*, *Cineraria hybrida*, *Hibiscus rosa*.

Вид *Helicotylenchus retusus* Siddigi and Brown, 1964

Типовое растение – сахарный тростник, обнаружен в прикорневой почве. Паразитирует также на корнях кукурузы, риса, цитрусовых, банана, сои, сорго, кокосовой пальмы и граната. Обнаружен на Филиппинах, а также в других тропических и субтропических странах: Индии, Индонезии, Таиланда, Ирана. Этот вид известен также в Туркмении [4,17,23].

В Армении обнаружен в оранжереях треста озеленения г.Гюмри в прикорневой почве *Hooya carnosa*.

Вид *Helicotylenchus dihystrera* Sher, 1961

Тропический вид, размножение которого наблюдается при температуре 10-35⁰С. Питается на корнях как экто- или полуэндопаразит, иногда как эндопаразит. Может полностью внедряться в корни сои.

Типовое растение – сахарный тростник. Обнаружен на корнях множества различных растений. Типовое местонахождение Харвуд (Австралия). Наиболее широко распространенный вид геликотилеихов в южных странах: Южная Корея, Индонезия, Индия, Шри-Ланка, Малазия, Ирак, Иран, Израель, Африка и других странах [12,18,21,23]. В России встречается в южных районах страны, а также в Грузии, Казахстане, Молдове, Узбекистане [1,6,8].

В Армении обнаружен в трестах озеленения городов Ванадзор и Гюмри в теплицах на корнях и прикорневой почве *Asparagus sprengeri*, *Cineraria hybrida*, *Gladiolus lemoinei*.

Вид *Helicotylenchus pseudorobustus* Golden, 1956

Широко распространенный и весьма обычный вид в Европе – Австрии, Германии, Нидерландах, Бельгии, Франции, Польше и Италии. В полевых условиях особенно сильно размножается на корнях кукурузы, а также овса и пшеницы.

Типовое местонахождение Швейцария [14,15,17,24].

В Армении обнаружен в тепличных хозяйствах г. Ереван – на корнях томатов, в оранжереях треста озеленения г. Ванадзор в прикорневой почве *Cineraria hybrida*, В Эчмиадзинском районе на полях лука, гороха, моркови, а также в прикорневой почве винограда.

Вид *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb,1893) Golden, 1956

Типичный эндопаразит корней, все стадии развития которого обнаруживаются в кортикальных тканях. Этот вид следует отнести к термофильным видам нематод, эндемичным для тропических- субтропических стран. Во многих странах мира сильно поражает бананы. В зоне умеренного климата *Helicotylenchus multicinctus* выживает только на тепличных растениях, будучи завезенным с юга [21,22,23]. Типовое местонахождение остров Фиджи.

В Армении обнаружен в Мегри, в корнях и прикорневой почве винограда, клевера, белены.

Вид *Helicotylenchus concavus* Roman,1961

Типовое растение – сахарный тростник. К числу хозяев относятся многие виды растений, повсеместно возделываемых в южных странах: цитрусовые, хлопчатник, табак, авокадо американское, манго и др. Впервые обнаружен в г. Сан-Себастьян на острове Пуэрто-Рико, встречается в Вест-Индии, на Филиппинах [23].

В Армении обнаружен в прикорневой почве ячменя, табака и виноградной лозы в окрестностях г. Берда Тавушского марза.

Вид *Helicotylenchus erythrinae* (Zimmermann, 1904) Golden,1956

Этот вид наиболее часто поражает различные виды злаков, а также сеянцы древесно-кустарниковых пород. Зона действия распространяется на все тропические и субтропические страны мира.

Типовое растение эритрина притеняющая (*Erythrina lithosperma*) из семейства бобовых. Паразитирует на многих видах диких и культурных растений. К хозяевам относятся августиновая трава (*Stenotaphum secundatum* (Walt.) Kuntze), а также пшеница, кукуруза, рис, бананы, какао, кофейное дерево.

Широко распространенный паразит в южных странах. Типовое местонахождение – Индонезия. В Европе встречается только в Средиземноморье. Распространен в США, Вест-Индии, Венесуэле, Панаме [14,12]. В России все основные находки в более южных районах. Встречается также на территории Грузии, Узбекистана, Молдовы, Туркмении [9,1,8].

В Армении обнаружен в г. Эчмиадзин в прикорневой почве пшеницы и томата, в Масисском районе на корнях лука.

Вид *Helicotylenchus pseudodigonicus* Stczykiel, 1970

Обнаружен в Польше в прикорневой почве земляники на многих плантациях. Численность паразита увеличивается с возрастом плантации. В России вид отмечен на растениях малины, черной смородины, земляники, яблони, груши.

В Армении обнаружен в прикорневой почве виноградной лозы экспериментальной базы Института зоологии.

Вид *Helicotylenchus crassatus* Anderson, 1973.

Типовое растение – клевер красный (*Trifolium pratense* L.). К хозяевам относятся также клевер белый и гибридный, люцерна, пастбищные злаки, яблоня, табак и одуванчик.

Типовое местонахождение – провинция Квебек (Канада).

В Армении обнаружен в окрестностях Амберда Аштаракского марза на корнях и в прикорневой почве клевера красного (*Trifolium pratense* L.).

Вид *Helicotylenchus tunisiensis* Siddigi, 1963

Этот вид обнаружен в прикорневой почве картофеля (*Solanum tuberosum* L.). В дальнейшем в прикорневой почве маслины (*Olea europaea* L.), рожкового дерева (*Ceratonia siliqua* L.), арахиса (*Arachis hypogaea* L.), банана (*Musa* sp.).

Типовое местонахождение – окрестности г. Тунис (Тунис). Широко распространен в Израиле.

Этот вид обнаружен также в Армении в Аштаракском марзе в прикорневой почве пшеницы.

Таким образом, проведенные исследования показали наличие представителей рода *Helicotylenchus* на корнях и в прикорневой почве различных диких и культурных растений в открытом и закрытом грунтах Армении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багатурия Н.Л. Эколого-фаунистический обзор нематод капусты, сахарной свеклы и огурца в Картли (Восточная Грузия). Автореф. канд.дис., Тбилиси, с.31, 1975.
2. Герман Э.В. Матер.1 научн.конф.молодых специалистов и аспирантов. Алма-Ата. с.73-76, 1969.
3. Иванова Т.С. Нематоды зерновых культур Заревшанской долины. Душанбе, с.83, 1968.

4. Кирьянова Е.С., Шагалина Л.М. Паразитические корневые нематоды рода *Helicotylenchus* (Nematoda: Hoplolaimidae) в Туркменистане. Изв.АН ТССР, сер.биол.наук, 5., с.90-92, 1976.
5. Краль Э.Л. Паразитические корневые нематоды, семейство Hoplolaimidae. Л., Наука, с.419, 1978.
6. Нестеров П.И. Фауна нематод плодовых деревьев в Молдавии. В кн: Нематодные болезни с-х.культур и меры борьбы с ними. М., с.190-191, 1972.
7. Расулов Ш.А. Фауна нематод озимой пшеницы и диких злаков предгорной зоны Дагестана. Зоол.журнал. 49., вып.1, с.24-27, 1970.
8. Тулагенов А.Т., Усманова А.З. Фитонематоды Узбекистана (отряд Tylenchida). Ташкент, с.372, 1975.
9. Цкитишвили Т.Д. Нематодофауна главнейших цитрусовых культур Аджарии. Автореф.канд.дис., Тбилиси, с.15, 1971.
10. Элиашвили Т.С. О нематодах двух типов почв в Восточной Грузии. В кн.:VIII Всесоюз.совещ.по нематодным болезням с-х. культур. Кишинев, с.158-159, 1976.
11. Anderson R.V. Canadian species of the genus *Helicotylenchus* Steiner.1945 (Nematoda: Hoplolaimidae), their identifying characteristics and descriptions of tree new species.- Canad.J.Zool., 52, 11,p.1365-1381, 1974.
12. Arias M., Romero M.D. Nematodes on beet in Spain. XI Intern.Nematol.Symposium Europ. Soc. Nematologists, Reading,Sept.1972.Abstracts. p.1, 1972.
13. Brzeski M.W. Plant parasitic nematodes associated with cabbage in Poland.I Systematic studies. Ann.Zool.Polsk.Akad.Nauk.Inst.Zool., 26, 9, p.249-279, 1968b.
14. Dao F.D.Climatic influence on the distribution pattern of plant parasitic and soil inhabiting nematodes. Mededel.Landbouwhogeschool Wageningen, 70, 2, p.181, 1970.
15. Decker H. Wurzelnematoden von allgemeiner Bedeutung. Phytopathol.und Pflanzenschutz. Bd.2.Berlin, 2, p.30-51,1974.
16. D'Errico F.P. Su alcuni nematodi fitoparassiti trovati in Italia.- Boll. Labor. Entomol. Agr. Filippo Silvestri.Portici., 28, p.183-189, 1970.
17. Kheiri, A. Plant-parasitic nematodes (Tylenchida) from Iran. Bio. Jaarboek Dodonaea, 40, p.224-239, 1972b.
18. Loof, P.A.A. Freelifving and plant parasitic nematodes from Spitzbergen, collected by Mr. H. van Rossen. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, 71, 7 pp. 1-86, 1971.
19. Rössner J. Phytoparasitiire Nematoden in Forstpflanzgarten.-Z. angew. Zool. Bd.56, 1. p.1-64, 1969a.
20. Sharma, R.D., Sher, S.A., Occurrence of Plant Parasitic Nematodes in Avocado in Bahia, Brazil. Nematropica, 3, 1, p.20-23, 1973.
21. Siddiqi M.R. On the genus *Helicotylenchus* Steiner. 1945 (Nematoda: Tylenchidae) with description of nine new species. Nematologica, 18, 1.P. 74-91,1972a.
22. Sher, S.A. Revision of the Hoplolaiminae (Nematoda) VI. *Helicotylenchus* Steiner, 1945 1) Nematologica, 12, 1, pp. 1-56(56), 1966.
23. Timm, R.W. A Preliminary Survey of the Plant-Parasitic Nematodes of Thailand and the Philippines. Thai Sambhand Printing Press, 'Bangkok, Thailand, p.71, 1965a.
24. Wasilewska L. Nematodes of the sand dunes in the Kampinos Forest. I. Species structure. Ekologia polska, XVIII, 20, Warszawa, p. 429-443, 1970.
25. Yuen, P.H. The nematode fauna of the regenerated woodland and grassland of Broadbalk Wilderness. Nematologica, 12, 2, p. 195-214, 1966.

Поступила 29.08.2012



Biolog. Journal of Armenia, 2 (65), 2013

**FIRST RECORDS OF THE ANT-LOVING CRICKET
MYRMECOPHILUS ACERVORUM (PANZER, [1799]) FROM ARMENIA
AND COMMENTS ON *MYRMECOPHILUS HIRTICAUDUS* FISCHER
VON WALDHEIM, 1846 (ORTHOPTERA: MYRMECOPHILIDAE)**

T. STALLING

Möndenweg 26, 79594 Inzlingen, Germany
Stalling@gmx.de.

New records of the ant-loving crickets *Myrmecophilus acervorum* (Panzer, [1799]) and *Myrmecophilus hirticaudus* Fischer von Waldheim, 1846 for Armenia are presented. *M. acervorum* is reported for the first time from Armenia and the Caucasus. The criteria used for identification are described.

Ant guest – Caucasus – Myrmecophilus

Ներկայացված են *Myrmecophilus acervorum* (Panzer, [1799]) և *Myrmecophilus hirticaudus* Fischer von Waldheim, 1846 ճռիկ-մրջնասերների սոր գրանցումներ Հայաստանում: *M. acervorum* տեսակն առաջին անգամ է նկարագրված Հայաստանի և Կովկասի համար: Նկարագրված են չափորոշիչներ, որոնք օգտագործվում են նրանց նույնականացման համար:

Ճռիկ-մրջնասեր – Կովկաս – Myrmecophilus

Представлены новые находки сверчков-муравьелюбов *Myrmecophilus acervorum* (Panzer, [1799]) и *Myrmecophilus hirticaudus* Fischer von Waldheim, 1846 в Армении. *M. acervorum* впервые описан для Армении и Кавказа. Описаны критерии, использованные для их идентификации.

Сверчок-муравьелюб – Кавказ – Myrmecophilus

Ant-loving crickets (genus *Myrmecophilus* Berthold, 1827) are small insects, which are known to live as guests in the nests of ants. To date, 57 valid species have been described worldwide [6]. From the Caucasus, only *Myrmecophilus hirticaudus* Fischer von Waldheim, 1846 was known previously from the Greater Caucasus (Teberda, Russia) and the Lesser Caucasus (Armenia, Meghri) [9].

Materials and methods. During a trip to Armenia in July 2011, ant nests under stones were checked for ant guests. All specimens of *Myrmecophilus* were collected.

Results and Discussion. Two species of *Myrmecophilus* were found in Lori province and Syunik province.

Myrmecophilus acervorum (Panzer, [1799]) (fig. 1) was found in the northern and southern parts of Armenia. All specimens were found in ant nests under stones: 10 adults ♀♀, 10 nymphs ♀♀ and 16 nymphs of unknown sex in nests of *Lasius* sp., 24.07.2011, Sisian, Sjunik province, 39° 33' 02" N, 45° 59' 43" E, 1780 m, leg. & coll. T. Stalling; 10 adults ♀♀, 5 nymphs ♀♀ and 4 nymphs of unknown sex in nests of *Lasius* sp., 1 nymph ♀♀ and 6 nymphs of unknown sex in nests of *Myrmica* sp., 04.08.2011, Dzoraget, Lori province, 40° 56' 57" N, 44° 37' 34" E, 1065 m, leg. & coll. T. Stalling. The habitat was grass steppes interspersed with stones at both localities.



Fig.1. *Myrmecophilus acervorum*, female, Dzoraget, Armenia, 04.08.2011

Myrmecophilus hirticaudus (fig. 2) was found in the northern part of Armenia. All specimens were found in ant nests under stones: 2 adults ♀♀, 1 adult ♂ in nests of *Camponotus* sp., 04.08.2011, Dzoraget, Lori province, 40° 56' 57" N, 44° 37' 34" E, 1065 m, leg. & coll. T. Stalling; 1 adult ♂ in a nest of *Camponotus* sp., 05.08.2011, Dzoraget, Lori province, 40° 56' 57" N, 44° 37' 34" E, 1065 m, leg. & coll. T. Stalling. The habitat was grass steppe interspersed with stones.



Fig. 2. *Myrmecophilus hirticaudus*, female, Dzoraget, Armenia, 04.08.2011

The records of *M. acervorum* are the first for Armenia and the Caucasus, and are the easternmost records known to date. Previously, the species was known from Austria [12], Czech Republic [3], France [4], [5], Germany [11], [14], Hungary [16], Luxembourg [13], Poland [1], Russia (Kaliningrad Oblast) [8] and Slovakia [8]. The exact eastern distribution boundary remains unknown. *M. hirticaudus* was previously known from the Crimea, the Caucasus [9], [10], [2], Croatia [15] and Bulgaria [7].

The criteria used for identification are described by Stalling & Birrer [15]. The adults of the two species differ distinctly according to the following criteria: body colour, dark reddish-brown with pale ochreous posterior border on the pronotum and tergite in *M. acervorum*, uniformly brown in *M. hirticaudus*; number of spines on the metatarsus of the hind legs, two dorsal spines in the proximal and medial positions in *M. acervorum*, three dorsal spines positioned in the proximal, medial and distal parts of the metatarsus in *M. hirticaudus* (spine sometimes absent in the medial position, whereas spine in the proximal position always present).

M. acervorum and *M. hirticaudus* were found together at Dzoraget in single cases and even in the same ant nests, which demonstrated sympatric occurrence. No males of *M. acervorum* were found so the species can also be assumed to reproduce parthenogenetically in this part of its range. *M. hirticaudus* males and females were found so the species can be assumed to reproduce sexually.

Acknowledgements

Many thanks to Doris Stalling for fieldwork assistance.

REFERENCES

1. Baccetti, B. Notulae Orthopterologicae XXII. Il Genere *Myrmecophilus* (Berth.) in Italia. Redia, 50, 1-33, Firenze, 1966.
2. Baccetti, B. Notulae Orthopterologicae. 50. Su alcuni ortotteroidei del mediterraneo orientale. Fragmenta Entomologica, 23, 2, 247-276, 1992.
3. Bezděčka, P., Kočárek, P., J. Šuhaj Distribution of the Cricket *Myrmecophilus acervorum* (Orthoptera: Myrmecophilidae) in Moravia and Silesia with notes on the biology. Klapalekiana 36, 7-17, 2000.
4. Chopard, L. Orthopteroïdes. Faune de France, 56, 196-197, 1951.
5. Defaut, B., Sardet, E., Y. Braud Orthoptera: Ensifera et Caelifera. Catalogue permanent de l'entomofaune française, fascicule, 7, 2009.
6. Eades, D.C., Otte, D., Cigliano M.M., H. Braun Orthoptera Species File Online. Version 2.0/4.1. [05.01.2013]. <http://Orthoptera.SpeciesFile.org>, 2013.
7. Fet, V., A. Popov. Biogeography and Ecology of Bulgaria. Dordrecht (Springer), 2007.
8. Fedor, P.J. The orthopteroid insect fauna in the surroundings of the Zemplínska Sirava reservoir (Eastern Slovakia) after forty years. Acta Zoologica Universitatis Comenianae, 44, 51-56, 2001.
9. Gorochov, A.V. Towards the fauna of crickets (Orthoptera, Gryllidae) of the Transcaucasus [in Russian]. Bulletin of the Academy of Sciences of the Georgian SSR, 114, 3, 621-624, 1984.
10. Gorochov, A.V. Faunistic and Systematic Notes on Gryllidae (Orthoptera) of the Crimea [in Russian]. Vestnik Zoologii, 1, 12-20, 1984.
11. Hölldobler, K. Studien über die Ameisengrille (*Myrmecophilus acervorum* Panzer) im mittleren Maingebiet. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 20, 7, 607-648. 1947.
12. Junker, E., U. Ratschker Zur Verbreitung der Ameisengrille *Myrmecophilus acervorum* (Panzer (1799)), in Sachsen (Insecta, Ensifera, Myrmecophilidae). Faunistische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden, 22, 2, 11-21, 2000.
13. Proess, R. Verbreitungsatlas der Heuschrecken des Großherzogtums Luxemburg. Ferrantia 39, 7-178, 2004.
14. Schimmer, F. Beitrag zu einer Monographie der Gryllodeengattung *Myrmecophila* Latr. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie, 93, 409-534, 1909.
15. Stalling, T., S. Birrer, Identification of the ant-loving crickets, *Myrmecophilus* Berthold, 1827 (Orthoptera: Myrmecophilidae), in Central Europe and the northern Mediterranean Basin. Articulata (press.), 2013.
16. Zoltan, K. Adatok a Dunántúli-középhegység egyenességzárnyú (Orthoptera) faunájának ismeretéhez II. Folia Historico Naturalia Musei Matrensis, 30, 189-201, 2006.

Received 26. 02.2013



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

ՈՉ ՍԻՄԲԻՈՏԻԿ ԱԶՈՏՖԻՔՍՈՂ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆԱԿԵՑՈՒԹՅԱՆ ՊԱՅՊԱՆՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Վ.Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ, Ի.Բ. ԲԱՂԴԱՍԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ
nikoghoss@yahoo.com

Ուսումնասիրվել է տարբեր դիագնոստիկայի պարունակող ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսող միկրոօրգանիզմների համակեցությունների արդյունավետությունը երկարատև պահպանման պայմաններում: Պարզվել է, որ փորձարկված համակեցությունները հիմնականում պահպանել են իրենց էֆեկտիվությունը, չնայած որոշ դեպքերում նկատվել է նաև արդյունավետության անկում:

Դիագնոստիկայի – համակեցություն – ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսատորներ – ցորեն

Изучена эффективность сообществ несимбиотических азотфиксирующих микроорганизмов, содержащих различные диазотрофы, в условиях длительного хранения. Оказалось, что исследованные сообщества в основном сохранили свою эффективность, хотя в некоторых случаях наблюдалось падение эффективности.

Диазотрофы – сообщества – несимбиотические азотфиксаторы – пшеница

The efficiency of the communities of non-symbiotic nitrogen-fixing and diazotroph-containing microorganisms during long-term storage was studied. It was found that in general, the investigated communities keep, their efficiency, although in some cases the drop in efficiency was also observed.

Diazotrophs – communities – non-symbiotic nitrogen – fixators – wheat

Հայտնի է, որ դիագնոստիկայից կազմված խառը կուլտուրաները բազմակի վերացանքներից հետո լաբորատոր պայմաններում պահպանվում են երկար: Ցույց է տրված նաև, որ դիագնոստիկայի նման համակեցություններում զարգացող տարբեր բակտերիաների տեսակային կազմը, նրանց հարաբերակցությունն ու նիտրոգենազային մեծ ակտիվությունը պահպանման ընթացքում փոփոխությունների չեն ենթարկվել [2, 3]: Սակայն կան նաև տեղեկություններ, որ ջերմաստիճանի փոփոխությունը հանգեցնում է համակեցությունում զարգացող տարբեր պոպուլյացիաների կառուցվածքային փոփոխությունների, որի հետևանքով կարող են հանդես գալ նոր դոմինանտ տեսակներ [6]: Ըստ որոշ հեղինակների, սննդատարրերի անբավարար քանակի դեպքում միկրոօրգանիզմների ցենոզում պրոտեոլիտիկ ֆերմենտներ պարունակող որոշ բակտերիաներ որպես սննդանյութ կարող են օգտագործել այլ միկրոօրգանիզմների բջիջները [4]: Կան նաև տեղեկություններ բույսերի սերմերի բակտերիազգացման ոչ էֆեկտիվության վերաբերյալ [8,9]: Դիագնոստիկայի կենսաբազմազանությունը խորությամբ ուսումնասիրվում է նաև վերջին տարիներին [1,5]:

Սույն հաղորդման նպատակն է ներկայացնել վերջին տասնամյակներում Հայաստանի տարբեր շրջաններից մեկուսացված դիագնոստիկայի պարունակող ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունների (ԱՄՀ) էֆեկտիվության պահպանման ուղղությամբ մեր ուսումնասիրությունների արդյունքները:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտության նյութ է ծառայել 1989-2007թթ. Հայաստանի տարբեր շրջաններում մշակվող ցորենի արմատային համակարգից (ռիզոսֆերա, ռիզոպլան) մեկուսացված ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսատորների 250 ԱՄՀ-ները: Այդ համակեցությունները ազարային էշբիի սննդամիջավայրում պահպանվել են 6-8°C-ի պայմաններում:

Փորձարկված համակեցությունների կենսագործունեության հետևանքով առաջացած նյութերի ներգործությունը ցորենի աճի վրա որոշվել է սերմերը փորձարկվող ջրային սուսպենզիաների մշակման մեթոդով 3-5 կրկնողությամբ [7]: Այդ նպատակով նախորոք ջրածնի պերօքսիդի (H_2O_2) 17%-ոց լուծույթում 20 ր տևողությամբ ստերիլիզացված ցորենի սերմերը 18 ժ տևողությամբ $27^{\circ}C$ պայմաններում բակտերիզացվել են հետազոտվող կուլտուրաների 109 բջիջ պարունակող ջրային սուսպենզիաներով: Հետագայում բակտերիզացված սերմերը դրվել են նախորոք ստերիլիզացված և ստերիլ ջրով խոնավացված ֆիլտրի թղթեր պարունակող Պետրի թասերում 4 օր $27^{\circ}C$ պայմաններում աճեցնելուց հետո կատարվել է ծլած սերմերի քանակության և արմատների ու ծիլերի երկարության հաշվառում: Որպես ստուգիչ օգտագործվել են ստերիլ ջրով մշակված ցորենի սերմերը:

Արդյունքներ և քննարկում: Հետազոտությունների արդյունքներից պարզվել է, որ ՀՀ վայրերում մշակվող ցորենի ռիզոսֆերայում և ռիզոպլանում մեծ տարածում ունեն *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Azospirillum* ցեղերին պատկանող դիազոտրոֆները, բնական բիոցենոզներում նրանց ուղեկցող այլ միկրոօրգանիզմների առկայությամբ: Որոշ ԱՄՀ-ներում նկատվել են նաև ջրիմուռներ:

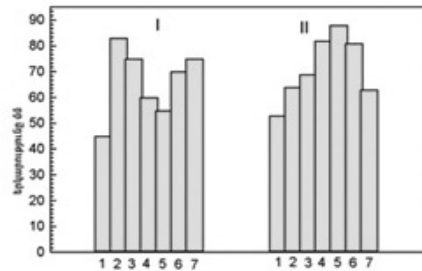
Աղ. 1. ԱՄՀ-ների էֆեկտիվության փոփոխությունները թանգարանային պայմաններում երկարատև պահպանման ընթացքում
Ծանոթություն - «+» - խթանում, «-» - անկում, «0» - չեզոք, «1» - մեկուսացման տարվա համեմատ:

ԱՄՀ-ներ	Մեկուսացման տարեթիվը	Համակեցությունների ազդեցությունը ցորենի սերմերի ծլունակության վրա						Արդյունքը
		Մեկուսացումից հետո		Արմատների		Ծիլերի		
				Անցողության վրա				
		Մեկուսացումից հետո	2010թ.	Մեկուսացումից հետո	2010թ.	Մեկուսացումից հետո	2010թ.	
A50	1989	-	-	+	+	+	+	պահպանված
A54	1989	-	0	+	+	+	+	մասամբ պահպանված
A 56	1989	+	+	+	+	+	+	պահպանված
U-8 ^a	1997	+	0	+	+	+	0	մասամբ պահպանված
U-97-7	1997	+	+	+	+	+	+	պահպանված
U-97-50 ^a	1997	+	+	+	+	+	0	մասամբ պահպանված
U-97-6	1997	+	0	+	+	+	+	մասամբ պահպանված
Ac-32	1999	-	-	+	+	+	+	պահպանված
99-18	1999	+	+	+	+	+	+	մասամբ աճ ¹
99-86	1999	-	-	+	0	+	-	անկում
99-67	1999	-	-	+	+	+	-	մասամբ պահպանված
99-64	1999	-	-	+	+	+	+	պահպանված
03-62	2003	+	+	+	+	+	+	պահպանված
03-19	2003	+	+	+	+	+	+	պահպանված
04-25	2004	+	-	+	+	+	+	մասամբ պահպանված
04-9	2004	+	+	+	-	+	-	անկում
04-13	2004	+	-	+	+	+	-	անկում
04-71	2004	+	+	+	+	+	+	պահպանված
05-45	2005	+	-	+	+	0	0	պահպանված
05-35	2005	+	-	+	0	0	-	անկում
05-2	2005	+	-	+	+	+	+	մասամբ պահպանված
05-6	2005	-	-	+	+	+	+	պահպանված
06-25	2006	+	-	+	+	+	0	մասամբ պահպանված
06-67	2006	-	-	+	+	+	-	անկում
06-70	2006	-	-	+	+	-	-	մասամբ պահպանված
07-4	2007	+	+	+	+	+	0	մասամբ պահպանված
07-18	2007	+	-	+	+	-	+	մասամբ պահպանված
07-32	2007	+	-	+	+	-	+	մասամբ պահպանված
07-53	2007	+	-	+	+	-	+	մասամբ պահպանված
07-23	2007	+	-	+	+	0	+	մասամբ պահպանված
07-62	2007	+	+	+	+	0	+	պահպանված

Կատարված հետազոտությունները ցույց են տվել (աղ. 1), որ թանգարանային պայմաններում պահպանման ընթացքում հիմնականում անփոփոխ է մնացել փորձարկված համակեցությունների ցորենի արմատների և ծիլերի աճեցողության խթանման հատկությունը: Թանգարանային պայմաններում 21 տարի պահպանված A56 ԱՄՀ-ի մոտ անփոփոխ է մնացել նաև նրա ցորենի ծլունակության խթանման հատկությունը:

Աղ.2. Փորձարկված ԱՄՅ-ների էֆեկտիվության ուսումնասիրությունների ընդհանրացրած արդյունքները

Ուսումնասիրված ԱՄՅ-ների թիվը	Պահպանման ընթացքում էֆեկտիվությունը			
	պահպանվել է	պահպանվել է մասամբ	չի պահպանվել	մասամբ ավելացել է
31	12	13	5	1
100%	38.71	41.3	16.1	3.1



Աղ.1. ԱՄՅ-ների ներգործությունը ցորենի սերմերի աճի վրա IV օրը:
I – արմատի երկարությունը, II – ծիլի երկարությունը, 1 -ստուգիչ,
2 – 99-67, 3 – 99-86, 4 – U -97-50, 5 – 99-18, 6 – 07-18, 7 – A54.

Աղ.1-ում բերված տվյալներից պարզորոշ նկատվում է նաև, որ թանգարանային պայմաններում համակեցությունների պահպանման տեղափոխությունը չի ազդում նրանց էֆեկտիվության վրա: Օրինակ՝ այդ պայմաններում 3 տարի պահպանված 07-32-ը կորցրել է իր ցորենի ծլունակության խթանման հատկությունը, որը չի նկատվել 13 տարի նույն պայմաններում պահպանված U-97-50² –ի մոտ: Փորձարկված ոչ սիմբիոտիկ որոշ համակեցությունների ներգործությունը ցորենի սերմերի աճեցողության վրա ներկայացված է Աղ.1-ում:

Ամփոփելով կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքները (աղ. 2), կարելի է եզրակացնել, որ փորձարկված ԱՄՅ-ների ճնշող մեծամասնությունը թանգարանային պայմաններում հիմնականում պահպանել է էֆեկտիվությունը: Չնայած դրան, չպետք է բացառել նաև, որ որոշ համակեցությունների մոտ կարող է տեղի ունենալ էֆեկտիվության անկում կամ նույնիսկ խթանում մեկուսացման տարվա համեմատ: Մեր կարծիքով դա կարող է տեղի ունենալ, ինչպես նշվել էր վերը [6, 8], միջավայրում միկրոօրգանիզմների զարգացման պայմանների փոփոխության արդյունքում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Булыгина Е.С., Задорина Е.Б., Кузнецов Б.Б. Исследование структуры диазотрофного сообщества пахотной почвы. Аграрная наука, 4, 13-15, 2008.
2. Глаголева О.Б., Умаров М.М., Злотников А.К. Нитрогеназная активность различных диазотрофных бактерий в чистых и смешанных культурах. Микробиология, 67, 2, 221-227, 1994.
3. Глаголева О.Б., Злотников А.К., Умаров М.М. Влияние аммония на азотфиксирующую активность смешанных культур ризосферных диазотрофных бактерий. Микробиология, 67, 2, 201-204, 1995.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., Высшая школа, 1985.
5. Задорина Е.Б. Биоразнообразие диазотрофов почв с различной антропогенной нагрузкой. Канд. диссертация, М., 2008.
6. Лисовский Г.М., Спыновская Э.К., Ян Н.А. В кн.: "Биология и культивирование микроорганизмов", Красноярск. 89-92, 1969.
7. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М., 1968.
8. Barber L., Russel S., Evans H. Inoculation of Millet with Azospirillum. Plant and Soil, 52, 49-57, 1979.
9. Tilak K., Singh C., Roy N. Azospirillum brasilense and Azotobacter chroococcum: effect on yield of maize and sorghum. Soil Biol. Biochem., 14, 4, 417-418, 1982.

Ստացվել է 22.11.2011



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(65), 2013

ԳԱԼԱՐՄԻՆԻ ԵՎ ՆՐԱ ՆՄԱՆՕՐԻՆԱԿՆԵՐԻ ՈՒՂԻՂ ՀԱԿԱՔԱԿՏԵՐԱԿԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ՍԻՔԻՐԱԽՏԻ ԲԱՑԻԼՆԵՐԻ ՎՐԱ *IN VITRO* ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Ա.Մ.ԲԱԴԱԼՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտ
asya.badalyan@mail.ru

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդներ գալարմինի և նրա անալոգների ուղիղ հակաբակտերիական ազդեցությունը *Bacillus anthracis* բակտերիաների վրա *in vitro* պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ d-15 գալարմինի և dGx-NH₂-ի որոշակի բաժնեջակներ ազդում են սիբիրախտի բացիլների մորֆոլոգիայի վրա, իսկ վիրուլենտության վրա չեն ազդում:

Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդ – սիբիրախտ – բացիլ

Исследовано прямое антибактериальное воздействие богатых пролином полипептидов гипоталамуса – галармина и его аналогов на бактерии *Bacillus anthracis* в условиях *in vitro*. Показано, что галармин, а также и его аналоги dGx-NH₂ и d-15 галармина не обладают прямой антибактериальной активностью в условиях *in vitro*.

Богатые пролином полипептиды – сибирская язва – бацилл

Direct antibacterial activity of hypothalamic proline-rich polypeptides galarmin and analogues against bacteria of *Bacillus anthracis* in the *in vitro* conditions was investigated. It was shown that galarmin and its analogues dGx-NH₂ and d-15 galarmin do not have direct antimicrobial activity *in vitro*.

Proline-rich polypeptide – anthrax – bacillus

Դեռևս 1939 թ. Գլադսոնը պարզել է, որ սինթետիկ միջավայրում լեյցինի, վալինի, իզոլեյցինի առկայությամբ նկատվում է սիբիրախտի վակցինային կուլտուրայի փարթամ աճ: Սակայն Նշված ամինաթթուներից յուրաքանչյուրն ունի տոքսիկ ազդեցություն սիբիրախտի բացիլի վրա և ճնշում է նրա աճը: Այդ հատկությունը հատկապես արտահայտված է իզոլեյցինի մոտ: Նա եկել էր այն եզրակացության, որ այդ ամինաթթուները ոչ միայն ունակ են չեզոքացնելու դրանցից յուրաքանչյուրի տոքսիկ ազդեցությունը, այլ նաև խթանելու բակտերիայի աճը: Միաժամանակ ցույց է տրվել նաև, որ լեյցինը և վալինը անփոխարինելի ամինաթթուներ են սիբիրախտի բացիլների համար [3]:

Հաստատված է, որ Գալոյանի կողմից հիպոթալամուսի նեյրոսեկրետոր գրանուլներից անջատված գալարմինը (Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr) դրսևորում է մեծ ազդեցություն մի շարք գրամ դրական և գրամ բացասական միկրոօրգանիզմներով պայմանավորված ինֆեկցիաների նկատմամբ (*Salmo. Typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Salm. typhi*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. anthracis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) [1-5]: Գալոյանին հաջողվել է նաև կենդանիների հիպոթալամուսում բացահայտել նոր անալոգ Gx-NH₂ -ը, որը կազմված է 10 ամինաթթվային մնացորդից (Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-NH₂), և որտեղ վերջին պրոլինը ամիդացված է:

Այս հետազոտության նպատակը գալարմինի և նրա անալոգների ուղիղ հակաբակտերիալ ազդեցության ուսումնասիրումն է *Bacillus anthracis* բակտերիայի վրա *in vitro* պայմաններում՝ ստանալու այն պատասխանը, ունեն արդյոք վերոնշյալ նյութերն ուղղակի ազդեցություն, թե դրանց ազդեցությունը պայմանավորված է իմունամոդուլյատոր հատկությամբ:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտության համար օգտագործվել է հակասիբիրախտային թիվ 55 վակցինային շտամը (սերիան՝ 10-08; 01.10.2008, Россия, 601120, г. Покров): Գալարմինի և նրա անալոգների ուղիղ հակաբակտերիալ ազդեցությունը *Bacillus anthracis* բակտերիայի վրա ուսումնասիրվել է բակտերիոսկոպիկ և բակտերիոլոգիական եղանակով: Հետազոտական աշխատանքների ընթացքում սիբիրախտի վակցինային մանրէների քանակությունը որոշվել է օպտիկական ստանդարտների միջոցով և մանրէաբանական եղանակով:

2-ական մլ մսապատոհային ազարակի մեջ լցվել են գալարմին, d15-գալարմին և Gx-NH₂ կենսապատրաստուկները համապատասխանաբար 8, 16 և 32-ական մկգ բաժնեչափերով և 1 ժ ենթարկել ինկուբացիայի՝ վերջիններս ազարակի մեջ դիֆուզվելու նպատակով: Այնուհետև 4-5 օրվա կիսապարավորված վակցինային շտամից պատրաստվել է 100 մլ նոսրացմամբ կախուկ և 0.25 մլ (25 մլ ն սպոր) տեղափոխվել փորձանոթների մեջ: Արդյունքները դիտարկվել են 24, 48 և 72 ժ կտրվածքով:

Արդյունքներ և քննարկում: *In vitro* պայմաններում ուսումնասիրվել է նվազագույն մահացու բաժնեչափով սիբիրախտի պատվաստանյութի մանրէների կայունությունը 8, 16 և 32 մկգ բաժնեչափերով գալարմին, d15-գալարմին և Gx-NH₂ կենսապատրաստուկների նկատմամբ (աղ. 1):

Աղ. 1. Գալարմինի, d-15 գալարմինի և dGx-NH₂-ի ազդեցությունը սիբիրախտի թիվ 55 վակցինային շտամի բացիլների վրա *in vitro* պայմաններում

Ժամ	dGx-NH ₂			Գալարմին			d-15գալարմին			Ստուգիչ	
	8, մկգ	16, մկգ	32, մկգ	8, մկգ	16, մկգ	32, մկգ	8, մկգ	16, մկգ	32, մկգ	պոզիտիվ	նեգատիվ
24	++++	++++	++	+	+++	++++	+++	+++	++++	++++	-
48	++++	++++	++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	++++	-
72	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	-

Ծանուցում.

Պոզիտիվ ստուգիչ՝ սիբիրախտ, նեգատիվ ստուգիչ՝ արգանակ

++++ սիբիրախտի բացիլների փարթամ աճ

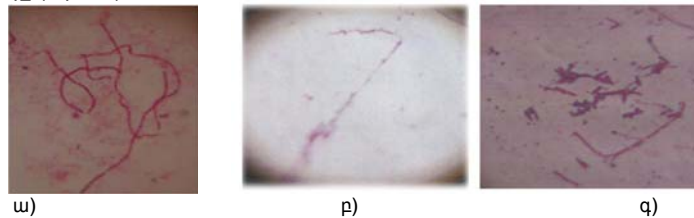
++ սիբիրախտի բացիլների ընկճված աճ

+

սիբիրախտի բացիլների ձևափոխված աճ

- սիբիրախտի բացիլներ չկան

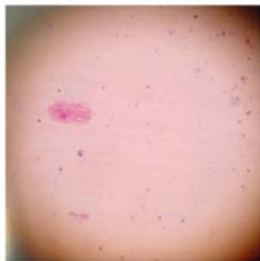
Ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ 24 ժ հետո 32 մկգ բաժնեչափով dGx-NH₂-ի ազդեցությամբ սիբիրախտի բացիլների աճը ընկճված է, շղթան ավելի բարակած ի տարբերություն ստուգիչի, որտեղ կա շղթայի փարթամ աճ, իսկ 8 մկգ գալարմինի ազդեցությամբ սիբիրախտի բացիլները ձևափոխվում են (նկ.1): 72 ժ ընթացքում բոլոր տարբերակներում դիտարկվում է փարթամ աճ, սակայն 8 մկգ գալարմինի ազդեցությամբ սիբիրախտի բացիլները դեռևս մորֆոլոգիապես ձևափոխված են (նկ.4): Նեգատիվ ստուգիչում բացիլներ չկան, իսկ պոզիտիվում՝ ընդհակառակը (նկ.2, 3):



Նկ.1. ա) Սիբիրախտի բացիլների աճը 24 ժ ընթացքում (X 630)
բ) Սիբիրախտի բացիլների աճը 32 մկգ dGx-NH₂ -ի ազդեցությամբ 24 ժ ընթացքում (X 630)
գ) Սիբիրախտի բացիլների աճը գալարմինի ազդեցությամբ 24 ժ ընթացքում (X 630)

Փորձի հաջորդ փուլում մանրէների կենսունակությունը ստուգելու նպատակով 32 մկգ բաժնեչափով dGx-NH₂ և 8 մկգ բաժնեչափով միջավայրերից 0.5 մլ են ներարկվել է 18-20 գ մարմինի միջին զանգվածով 10 ոչ գծային սպիտակ արու մկան: Նույն ծավալով ներարկվել է նաև ստուգիչից և արգանակ (նկ. 2,3): Արդյունքում վարակված կենդանիները սատկել են 3-րդ օրը, բացառությամբ այն կենդանիների, որոնց ներարկվել է 32 մկգ բաժնեչափով dGx-NH₂ և 8 մկգ բաժնեչափով գալարմինի միջավայրից:

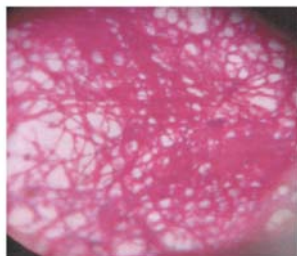
Դրանք դիմակայել են 1-2 օր ավել: Արգանակ ներարկված կենդանիները չեն սատկել: Փորձարկվող կենդանիները պահվել են էթիկայի սկզբունքներին համապատասխան:



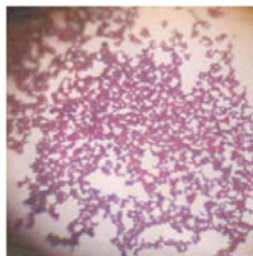
Նկ.2. Նեգատիվ ստուգիչ



Նկ. 3. Պոզիտիվ ստուգիչ



ա)



բ)

Նկ. 4. ա) Սիբիրախտի բացիլների 72 ժ աճեցվածք
բ) Սիբիրախտի բացիլները գալարմինի ազդեցությամբ 72 ժ ընթացքում

Այսպիսով, պարզվել է, որ փորձանոթային պայմաններում գալարմինը և dGx-NH₂-ը ազդում են սիբիրախտի բացիլների մորֆոլոգիայի վրա, իսկ վիրուլենտության վրա ազդեցություն չունեն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Априкян В.С., Галоян А.А.* Антибактериальная активность нового гипоталамического полипептида. Докл. НАН РА. 99, 4, с. 367-371, 1999.
2. *Априкян В.С., Галоян А.А.* Гипоталамический полипептид предохраняет от гибели мышей при их заражении грам-отрицательными бактериями. Нейрохимия, 17, 1, с. 60-63, 2000.
3. *Колесов С.Г.* Сибирская язва. М., "Колос". с.22, 1976.
4. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic. Plenum Publishers, New York, p. 188, 2004.
5. *Galoyan A.A.* The brain immune system: Chemistry and biology of the signal molecules. Handbook of Neurosecretory and Molecular Neurobiology, 3rd ed., (Editor in chief-Professor Abel Lajtha), Neuroimmunology (eds. A. Galoyan, and H. Besedovsky), p. 155-195, 2008.
6. *Galoyan A.A., S.L. Grigoryan, K.V. Badalyan.* Neurochemical Research, 31, 6, 795-803, 2006.

Ստացվել է 15.04.2013

«ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԱՅՆ» -ի էլեկտրոնային տարբերակը
և հեղինակների համար կանոնները գետեղված են հետևյալ կայքէջում
<http://www.flib.sci.am/eng/Biology/>

Հրատ. պատվերի դ 443
Ստորագրված է տպագրության՝ 25.05.2013 :
Թուղթը՝ օֆսետ. № 1:
8 տպ.մամուլ: Տպաքանակ՝ 150 :
ՀՀ ԱԱ «Գիտություն» հրատարակչության տպարան:
0019, Երևան, Մարշալ Բաղրամյան պ. 24: