

UOT: 577.1; 577.15; 577.152.1.16;581.5

## **SORGHUM BICOLOR YARPAQLARINDA NADP-MALAT DEHİDROGENAZA FERMENTİNİN ONTOGENEYDƏ DƏYİŞMƏ DİNAMİKASININ TƏDQIQI**

**Mustafayeva Ü.C., Quliyev N.M.**

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Mətbuat prospekti 2A, Bakı AZ1073  
E-mail: ulviyye\_mustafayeva@mail.ru

*Sorghum bicolor* bitkisi C<sub>4</sub> fotosintezin NADP - malik enzim yarım tipinə aid olub yüksək fotosintetik aktivliyə və mühüm kənd təsərrüfat əhəmiyyətinə malikdir. Sorqo dünyada düyüdən, taxıldan, qarğıdalıdan və arpadan sonra beşinci ən əhəmiyyətli dənli qida bitkisidir. Tədqiqatın əsas məqsədi *Sorghum bicolor* bitkisinin gündə fotosintetik fermentlərin aktivliklərinin dəyişmə dinamikasının öyrənilməsindən ibarət olmuşdur. Bu məqsədlə yetkin *Sorghum bicolor* bitkisinin yarpaqlarında NADP-malatdehidrogenaza fermentinin aktivlikləri bitkinin yaşından və ətraf mühit parametrlərindən asılı olaraq ölçülmüşdür. Aparılan tədqiqatlar nəticəsində müəyyən olunmuşdur ki, NADP-MDH fermentinin aktivliyi ilə bitkinin yaşı arasında müsbət korrelyasiya mövcuddur.

**Açar sözlər:** fotosintez, ferment, NADP-ME yarım tip, temperatur, sorqo

### **Giriş**

*Sorghum bicolor* bitkisi C<sub>4</sub> fotosintezin NADP - malik enzim yarım tipinə aid olub yüksək fotosintetik aktivliyə və mühüm kənd təsərrüfat əhəmiyyətinə malikdir. Sorqo dünyada düyüdən, taxıldan, qarğıdalıdan və arpadan sonra beşinci ən əhəmiyyətli dənli qida bitkisidir. NADP-malatdehidrogenaza (NADP-MDH; EC 1.1.1.82) fermenti C<sub>4</sub> fotosintezin NADP-malik enzim yarım tipinə aid olan bitkilərdə həlledici rol oynayır [1]. NADP-malat dehidrogenaza (MDH) oksalasetatın malata çevrilməsini kataliz edərək C<sub>4</sub> bitkilərdə fotosintetik karbon assimilyasiyasında mühüm rol oynayır. C<sub>4</sub> fotosintez tropik sahələrdə bitən bitkilər üçün xüsusi üstünlük təşkil edir. Bitkilərdə plastid NADP-malat dehidrogenaza fotosintezdə iştirak edən əsas fermentdir. Maraqlıdır ki, NADP-MDH katalitik reaksiyanı tətbiq etmədən əvvəl aktivləşdirmə tələb edən bir neçə əsas xloroplastik fermentlərdən biridir [4]. Bu aktivləşdirmə reduksiya olunmuş formada tioredoksin əldə edərək *in vivo* və ya işıqla *in vitro* olaraq əldə edilə bilər. Aktivləşmə üçün lazım olan tioredoksin, ferredoksin və ferredoksin-tioredoksin reduktaza enzim yolu ilə fotokimyəvi olaraq və ya kimyəvi yolla isə ditiotreytol ilə reduksiya olunur [5]. NADP-MDH-nin aktiv mərkəzlərində və tənzimləyici saytlarında bir-birinə yaxın -SH- qrupları yerləşir. Zülalların amin turşu ardıcılığında bir-birinə yaxın yerləşən sistein qalıqları var. Sistein qalıqlarındakı -SH- qrupları oksidləşdirici şəraitdə disulfid körpücükleri əmələ gətirir. Bu zaman fermentlərin aktivlikləri dəyişir. Bu tənzimlənmə mexanizmləri fermentlərin gecə işləməyinin qarşısını alır. Bu fermentlərin aktiv mərkəzindəki disulfid rabitələrinin reduksiya olunmasını tioredoksin zülalı həyata keçirir. Işıqda NADP-MDH tioredoksinlər vasitəsilə redoks oksidləşir. Belə ki, xloroplastlar yalnız işığın təsiri ilə redoks aktivləşən NADP-MDH-ya malikdirlər və buna görə də malat klapanı xloroplastlarda yalnız işıqda işləyir. Fotosintetik NADP-malik enzim (NADP-ME; EC 1.1.1.40) izoformasını işıqla tənzimləyir [3].

### **Material və metod**

Tədqiqat obyektini kimi Azərbaycanın bəzi regionlarında geniş əkin sahələrində becərilən C<sub>4</sub>-bitkilərin NADP-malik enzim yarım tipinə aid olan *Sorghum bicolor* bitkisinin yarpaqlarından istifadə edilmişdir. Bu növ *Poaceae* fəsiləsinin *Sorqo* cinsinə aiddir. *Sorghum bicolor* bitkisi

Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun təcrübə sahəsində yetişdirilmişdir (Şəkil 1).



Şəkil 1. *Sorghum bicolor*

İnkişafın müxtəlif mərhələlərində bitkinin yarpaqlarında fotosintetik fermentlərin aktivlikləri təyin olunmuşdur.

NADP-malatdehidrogenaza aktivliyini təyin etmək üçün yarpaqlar həvəngdəstədə kvars qumunun iştirakı ilə 50 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 0,01%BSA, 0,5% Triton, 14mM  $\beta$ -ME, 1 mM etilendiamin tetraasetat turşusu və 0,5% polovinilpirrolidon tərkibli bufer məhlulunda homogenizasiya olunmuşdur. Homogenizasiya 0,5 q yarpağa 2 ml bufer məhlulu əlavə etməklə aparılmışdır. Homogenizantlar sentrifüqada 5 dəqiqə ərzində 10,000g sürətilə sentrifüqalasdırılmışdır. NADP-malatdehidrogenaza aktivliyini təyin etmək üçün istifadə olunan reaksiya mühitinin tərkibi 10 mq/ml BSA, 0,5 M EDTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NADP·H və 50  $\mu$ l aktivləşdirilmiş ferment preparatı olan 100 mM, pH 8,0, Tris-HCl buferindən ibarətdir. Reaksiya mühitə 1 mM oksaloasetat əlavə edilməsi ilə başlanmışdır. NADP-MDH fermentinin aktivləşməsi üçün ferment preparatı tərkibində 1M Tris-HCl (pH 8,0), 1M DTT və 50  $\mu$ l ferment preparatı olan reaksiya mühitində 15 dəqiqə müddətində inkubasiya edilmişdir [6]. Reaksiya 1 ml həcmində spektrofotometrik küvetdə  $\lambda=340$  nm dalğa uzunluğunda optik sıxlığın azalmasına əsasən ölçülmüşdür.

Spektrofotometrik metodla fermentin aktivliyi aşağıdakı formulaya görə hesablanmışdır:

$$A = \Delta OD \cdot V / \epsilon \cdot b$$

Burada A-Beynəlxalq sistemdə fermentin aktivliyi,  $\Delta OD$ -optik sıxlığın 1 dəqiqə ərzində dəyişməsi, V-reaksiya mühitinin həcmi (ml),  $\epsilon$ -millimolar ekstensiya koeffisienti, NADP-MDH ( $\lambda=340$ nm) maksimal adsorbiyasının qiyməti, onun qiyməti 6.22 nm  $sm^{-1}$ -ə ekvivalentdir, b-reaksiya mühitinə əlavə olunan ferment ekstraktının  $\mu$ l-lə həcmidir.

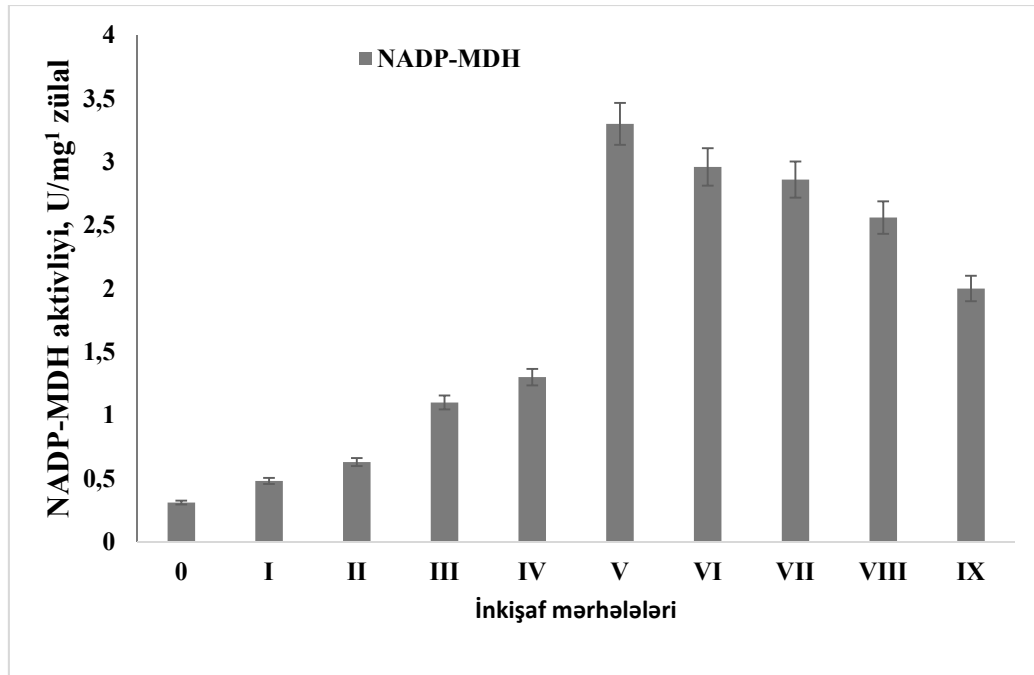
Həllolan zülalın ümumi miqdarı spektrofotometrə 0,12%-li Coomassie Brilliant Blue G-250 məhlulunun köməyi ilə təyin olunmuşdur [7].

### Nəticələrin müzakirəsi

İnkişafın müxtəlif mərhələlərində *Sorghum bicolor* bitkisinin yarpaqlarında ətraf mühit parametrlərindən asılı olaraq, NADP-MDH fermentinin aktivliyi təyin olunmuşdur. NADP-

malatdehidrogenaza fermenti fotosintetik karbon assimilyasiyasında mühüm rol oynayaraq, oksalasetatın malata çevrilmə reaksiyasını kataliz edir.

Aparılan tədqiqatlarda müxtəlif inkişaf mərhələsində olan *Sorghum bicolor* bitkisinin yarpaqlarında NADP-MDH fermentinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası öyrənilmişdir (şəkil 2). Aparılan tədqiqatlar nəticəsində müəyyən olunmuşdur ki, NADP-MDH fermentinin aktivliyi ilə bitkinin yaşı arasında müsbət korrelyasiya mövcuddur. Şəkil 2-dən görüldüyü kimi, fermentin aktivliyi boruya çıxma yəni reproduktiv mərhələdə müşahidə olunur. Belə ki, 5 yarpaq əmələ gəlmə mərhələsi ilə müqayisədə inkişafın flaq yarpağın əmələ gəlməsi mərhələsində fermentin aktivliyi təxminən 3 dəfə, dən əmələ gəlmə və fizioloji yetkinlik mərhələsi isə təxminən 1,5 dəfə yüksək olmuşdur. Fermentin aktivliyinin bitkinin yaşı ilə müsbət korrelyasiya təşkil etməsini bitkinin inkişafı ilə əlaqədar olaraq, dən əmələ gəlmə prosesi ilə əlaqələndirmək olar.



Şəkil 2. Müxtəlif yaşlı *Sorghum bicolor* bitkisinde NADP-MDH və NADP-ME fermentlərinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası. (0-cücərmə; I- 3 yarpaq əmələ gəlmə; II- 5 yarpaq əmələ gəlmə; III- böyümə nöqtələrinin fərqləndirilməsi)- vegetativ mərhələ; (IV- flaq yarpağın əmələ gəlməsi; V- boruya çıxma ; VI- yarım çiçəkləmə)- reproduktiv mərhələ; (VII- yumşaq mum yetişmə; VIII- sərt mum yetişmə; IX- fizioloji yetkinlik)- dən əmələ gəlmə və fizioloji yetkinlik mərhələsi.

Ehtimal olunur ki, NADP-MDH fermentinin aktivliyinin səhər saatlarında daha yüksək olması, fosfoenolpiruvat karboksilaza fermentinin aktivliyinin yüksək olmaması ilə bağlıdır. Belə ki, məlumdur ki, FEPK fermentinin məhsulu olan oksalasetat NADP-MDH fermenti vasitəsilə malata çevrilir. Ədəbiyyat məlumatlarına görə isti iqlim şəraitində C<sub>4</sub> bitkilərdə FEPK fermentinin aktivliyi daha çox səhər saatlarında müşahidə olunur, günorta saatlarına doğru isə fermentin aktivliyində azalma müşahidə olunur [2]. Çox güman ki, temperaturun təsirindən FEPK fermentinin aktivliyinin azalması onun məhsulu olan oksalasetatın miqdarının azalmasına da səbəb olur. Bu isə öz növbəsində oksalasetatın malata çevrilməsini həyata keçirən NADP-MDH fermentinin aktivliyinin azalması ilə də müşayiət olunur.

## Ədəbiyyat

1. **Backhausen J.,** Emmerlich A., Holtgreffe S. et al. (1998) Transgenic potato plants with altered levels of chloroplast NADP-malate dehydrogenase: interactions between

- photosynthetic electron transport and malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts // *Planta*, v. 207, p. 105–114
2. **Du Y.**, Nose A., Kondo A., Wasano K. (2000) Diurnal Changes in photosynthesis in Sugarbeet Leaves // *Plant Production Science*, v. 3, p. 9-16
  3. **Heyno E.**, Innocenti G., Lemaire S., Issakidis-Bourguet E., Krieger-Liszkay A. (2014) Putative role of the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling in Arabidopsis // *Phil.Trans.R. Soc. B.*, v. 369, p. 2013–2022
  4. **Krömer S.**, Scheibe R. (1996) Function of the chloroplastic malate valve for respiration during photosynthesis // *Biochemical Society Transactions*, v. 24, p. 761–766
  5. **Pagano E.**, Chueca A., Lopez-Gorge J. (2000) Expression of thioredoxins f and m of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions // *J. Exp. Bot.*, v. 51, p. 1299–1307
  6. **Scheibe R.**, Stitt M. (1988) Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, QA reduction and O<sub>2</sub> reduction in spinach leaves // *Plant PhysiolBiochem.*, v. 26, p. 473–481
  7. **Sedmak J.** and Grossberg S. (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250 // *Anal. Biochem*, v. 79, p. 544-552

**Мустафаева У. Дж., Кулиев Н.М.**

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАД Ф-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ ЛИСТЬЕВ В *SORGHUM BICOLOR***

C<sub>4</sub> растение NADP-малик энзимного типа *Sorghum bicolor*, обладающий высокой фотосинтетической активностью, имеет большое сельскохозяйственное значение. Сорго является пятым по важности зерновым растением после риса, пшеницы, кукурузы и ячменя. Основной целью исследования являлось изучение изменения активности ферментов фотосинтеза в *Sorghum bicolor*. С этой целью активность NADP-малатдегидрогеназы была определена в листьях зрелого растения в зависимости от возраста растения и параметров окружающей среды. Установлена положительная корреляция между возрастом растений и активностью NADP-MDH.

**Ключевые слова:** Фотосинтез, фермент, NADP-ME, температура, сорго

**Mustafayeva U.J., Quliev N.M.**

#### **DETERMINATION OF NADP-MALATDEHYDROGENASE ENZYME DYNAMICS IN ONTOGENESIS OF *SORGHUM BICOLOR* LEAVES**

NADP-malic type C<sub>4</sub> plant *Sorghum bicolor* exhibiting a high photosynthetic activity is of great agricultural importance. Sorgho is the fifth most important cereal plant after rice, wheat, maize and barley. The main aim of the research was to study the dynamics of the activities of photosynthetic enzymes in the *Sorghum bicolor* plant. To this end, the activities of NADP-malate dehydrogenase enzyme have been determined in leaves of the mature *Sorghum bicolor* plant depending on the plant age and environmental parameters. A positive correlation has been found between the plant age and NADP-MDH activity.

**Keywords:** Photosynthesis, enzyme, NADP-ME, temperature, sorgho

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 4.XII.2018