

UOT: 577.1; 577.152577.15; 577.152.1.16;581.5

***HYLOTELEPHIUM CAUCASICUM* NÖVÜNDƏ FOSFOENOLPİRUVAT KARBOKSİLAZA VƏ NAD-MALATDEHİDROGENAZA FERMENTLƏRİNİN AKTİVLİKLƏRİNİN VƏ BƏZİ KİNETİK PARAMETRLƏRİNİN TƏDQIQI**

Orucova T.Y., Bayramov Ş.M

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu,
Mətbuat prospekti 2a, Bakı, AZ1073,
E-mail: orujova.taliya@mail.ru

Hylotelephium caucasicum növündə FEPK və NAD-malatdehidrogenaza fermentlərinin aktivliklərinin gün ərzində dəyişmə dinamikası öyrənilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, NAD-malatdehidrogenaza və FEPK fermentlərinin dəyişmə dinamikası arasında müsbət korrelyasiya mövcuddur. Aparılmış tədqiqatlar göstərmişdir ki, malatın bitkinin yarpaqlarından gecə saatlarında ayrılmış FEPK fermentin aktivliyinə daha az təsir edir

Açar sözlər: Karbon qatılaşdırıcı mexanizmlər, CAM fotosintez, fotosintetik aktivlik

Giriş

CAM fotosintez CO₂ qazının fiksasiyası, ehtiyat şəkilində toplanması və üzvi turşuların sintezinə əsaslanan karbon qatılaşdırıcı mexanizmdir. CAM fotosintetik yoluna aid olan bitkilərdə Rubisko fermenti ətrafında CO₂ qazının qatılaşdırılması vaxtdan asılı olaraq iki mərhələdə baş verir [1]. Fotosintezin bu yolunda CO₂ qazı gecə saatlarında fiksasiya olunaraq üzvi turşuların tərkibinə daxil olur, onun üzvi turşulardan remobilizasiyası isə işıq periodu müddətində baş verir və nəticədə bitkinin fotosintetik orqanlarının daxilində (yaşıl yarpaqlarda və ya gövdədə, bəzi hallarda isə epifitlərin hava köklərində) CO₂ qazının qatılığı yüksəlir [14]. CAM fotosintezdə C₃ və C₄ karboksilləşmə proseslərinin baş verməsinin zamana görə fərqlənməsi, ətraf mühitin dəyişən şəraitinə cavab olaraq, 24 saat ərzində atmosferdən tutulan CO₂ qazının miqdarını, metabolizmdə karbon axınının intensivliyini və sudan istifadəni tənzimləməklə, onun plastikliyini təmin edir [3,14].

Ötən əsr ərzində quraqlığın artması ilə bağlı olan iqlim göstəriciləri və quraqlığın fəsadlarını proqnozlaşdıran iqlim modelləri, əsasında ehtimal olunur ki, dəyişən iqlim şəraitində CAM bitkilər karbonun səmərəli istifadəsi və biokütlənin istehsalının artırılması baxımından mühüm əhəmiyyətə malikdirlər [2, 7,11].

Tədqiqat işində Azərbaycan florasında yayılan fotosintezin CAM yoluna aid olan *Hylotelephium caucasicum* növündə fosfoenolpiruvat karboksilaza və NAD-malatdehidrogenaza fermentlərinin aktivliklərinin gün ərzində dəyişmə dinamikası və bəzi kinetik parametrləri öyrənilmişdir.

Material və metodlar

Tədqiqatlarda Kiçik Qafqazın Tovuz rayonu ərzində yayılan *Hylotelephium caucasicum* növündən istifadə olunmuşdur.

Fosfoenolpiruvat karboksilaza (FEPK, EC 4.1.1.31) fermentinin aktivliyini təyin etmək üçün reaksiya mühitinin tərkibi içərisində 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 10 mM NaHCO₃, 0,2 mM NADH, 10 U MDH, 10 mM FEP olan 60 mM HEPES-NaOH (pH 7,3) buferindən və 40 µl ferment preparatından ibarət olmuşdur. Reaksiya mühitə 10 mM oksaloasetat əlavə etməklə başlanmışdır [9].

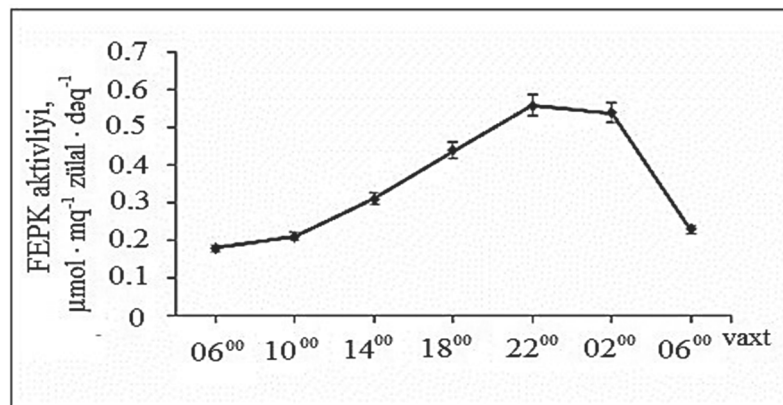
NAD-malatdehidrogenaza (NAD-MDH, EC 1.1.1.37) fermentinin aktivliyinin təyin etmək üçün reaksiya mühitinin tərkibi içərisində 1mM EDTA, 0.2 mM NADH, 2 mM oksalasetat

olan 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) buferindən və 10 µl ferment preparatından ibarət olmuşdur. Reaksiya mühitə 2 mM oksaloasetat əlavə etməklə başlanmışdır [9].

Nəticələr və onların müzakirəsi

CAM metabolizmə malik olan bitkilərdə, gecə ərzində baş verən karboksilləşmə prosesi fosfoenolpiruvat karboksilaza fermenti vasitəsilə həyata keçirilir. FEPK fermentinin aktivliyi CAM metabolizmdə fazaların bir-birinə keçid həddlərini müəyyənləşdirən əsas faktorlardan biri olduğu üçün, FEPK fermentinin aktivliyini tənzimləyən mexanizmlər CAM metabolizmdə mühüm rol oynayır [1].

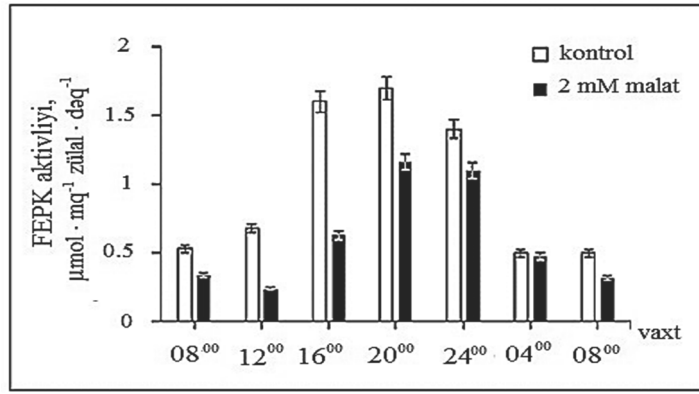
FEPK fermentinin aktivliyinin gündəlik dəyişmə dinamikası *H. caucasicum* bitkisinin yarpaqlarında tədqiq edilmişdir (şəkil 1). Müəyyən olunmuşdur ki, səhər vaxtı və ilkin səhər saatlarında ferment aşağı aktivlik göstərsədə, günün ikinci yarısından etibarən fermentin aktivliyi tədricən artır və gecə (saat 02⁰⁰) saatlarında maksimum aktivlik müşahidə olunur.



Şəkil 1. Günün müxtəlif saatlarında *H. caucasicum* bitkisinin yarpaqlarından ayrılmış FEPK fermentinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası.

Gününü ikinci yarısından başlayaraq fermentin aktivliyinin tədricən artması, çox güman ki, onun zülal miqdarının artması ilə bağlıdır. Axşam saatlarından etibarən (saat 20⁰⁰-dan sonra) I fazanın başlaması ilə fermentin aktivliyində artma müşahidə olunur gecə saatlarında bu aktivlik maksimum qiymət alır. Şəkil 1-dən görüldüyü kimi səhər saatlarında keçid faza olan ikinci fazanın başlaması ilə fermentin aktivliyində baş verən azalma isə fermentin defosforlaşması və vakuolu tərk edən malatın təsirindən onun inhibirləşməsi ilə izah edilə bilər.

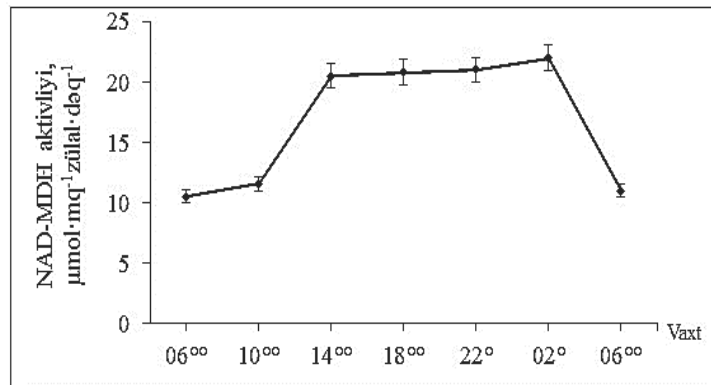
CAM bitkilərdən ayrılmış FEPK fermenti gecə və gündüz vaxtı malatla inhibirləşməyə qarşı həssaslıq nümayiş etdirir [4]. Malatın fermentə inhibirləşdirici təsirini öyrənmək üçün günün müxtəlif saatlarında ayrılmış FEPK fermentinin aktivliyinə 2 mM malatın təsir edilmişdir (şəkil 2). Müəyyən olunmuşdur ki, 2 mM malat fermentin aktivliyinin təxminən iki dəfə azalmasına səbəb olur. Malatın fermentə inhibirləşdirici təsiri daha çox günorta və axşam saatlarında müşahidə olunmuşdur. Səhər saatlarında ayrılmış fermentə 2 mM malatla təsir etdikdə fermentin aktivliyi kontrolla müqayisədə təxminən 1.5 dəfə, saat 12⁰⁰ və 16⁰⁰-da isə müvafiq olaraq 2,5 və 2,8 dəfə azalmışdır. Gecə saatlarında ayrılmış fermentin aktivliyinə isə malat daha az təsir etmişdir.



Şəkil 2. *H. caucasicum* bitkisinin yarpaqlarından günün müxtəlif saatlarında ayrılmış FEPK fermentinin aktivliyinə 2 mM malatın inhibirləşdirici təsiri.

Şəkil 2-dən görüldüyü kimi, qaranlıq periodunun ikinci yarısından başlayaraq, fermentin aktivliyi 2 mM malatın təsirindən təxminən 10-18% inhibirlənmişdir. Alınmış nəticələr ədəbiyyat məlumatları ilə də uyğunluq təşkil edir. Göstərilmişdir ki, CAM bitki olan *K. daigremontiana* növündə malatın iştirakı ilə fermentin aktivliyi, qaranlıq periodunun ikinci yarısında təxminən 20-25% azalır [4, 15]. Malata qarşı həssaslıq nümayiş etdirən mexanizmin əsasında bir sıra faktorlar dayana bilər, məsələn malatın vakuol membranlarından keçiriciliyi[5], FEPK protein kinazaların tənzimlənmə mexanizmləri və s. Qeyd olunur ki, *M. crystallinum* bitkisinin yarpaqlarından qaranlıq period müddətində ayrılmış FEPK malata qarşı çox həssasdır[16]. Malata qarşı həssaslıq çox güman ki, fermentin fosforlaşma vəziyyəti ilə bağlıdır. Belə ki, FEPK fermentinin fosforlaşması fermentin fosfoenolpiruvata və aktivatorlara qarşı həssaslığını artırdığı halda, onun malata qarşı olan həssaslığının azalmasına səbəb olur[12, 13]. Alınmış nəticələrə əsasən güman etmək olar ki, qaranlıq periodu müddətində fermentin fosforlaşması fermentin malata qarşı həssaslığının azalmasına səbəb olmuşdur.

Gün ərzində *H. caucasicum* bitkisinin yarpaqlarından ayrılmış NAD-MDH fermentinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası öyrənilmişdir (şəkil 3)



Şəkil 3. *H. caucasicum* bitkisinin yarpaqlarından günün müxtəlif saatlarında ayrılmış NAD-MDH fermentinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası.

Şəkil 3-dən görüldüyü kimi NAD-MDH fermentinin aktivliyi səhər saatlarında aşağı olsada, günün ikinci yarısından başlayaraq fermentin aktivliyi artmağa başlayır. Müəyyən olunmuşdur ki, səhər saat 6⁰⁰ ilə müqayisədə, günorta saat 14⁰⁰-da NAD-MDH fermentinin aktivliyi 2 dəfə artmışdır.

Fermentin daha yüksək aktivliyi gecə saatlarında müşahidə olunmuşdur. Məlumdur ki, CO₂ qazının FEPK fermenti ilə fiksasiyası nəticəsində əmələ gələn oksalasetat hüceyrənin sitazolunda NAD-malatdehidrogenaza fermentinin iştirakı ilə malata çevrilir[6,8,10].

Beləliklə, aparılan tədqiqatlar nəticəsində müəyyən olunmuşdur ki, gün ərzində yoxlanılan saatlarda NAD-malatdehidrogenaza və FEPK fermentlərinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası arasında müsbət korrelyasiya mövcuddur. Bu isəhər iki fermentin qarşılıqlı işlədiyini deməyə imkan verir.

Ədəbiyyat

1. **Borland A** and Taybi T 2004.Synchronization of metabolic processes in plants with Crassulacean acid metabolism // *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 1255–1265
2. **Borland A.**, Griffiths H., Hartwell J. et al. 2009. Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands // *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 2879–2896
3. **Borland A.**, Zambrano A., Ceusters J., Shorrocks K. 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world // *New phytologist*, v. 191, p.619–633.
4. **Borland AM.**, Hartwell J, Jenkins GI. et. al.1999. Metabolite Control Overrides Circadian Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase and CO₂ Fixation in Crassulacean Acid Metabolism // *Plant Physiology*, v. 121, p. 889-896
5. **Chen L** and Nose A. 2000. Characteristics of adenosinetriphosphatase and inorganic pyrophosphatase in tonoplast isolated from three CAM species, *Ananas comosus*, *Kalanchoë pinnata* and *K. daigremontiana* // *Plant Production Science*, v. 3, p. 24–31
6. **Cushman J** and Borland A. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation // *Plant, cell & environment*, v. 25, p. 295-310
7. **Davis S.**, LeBauer D., Long SP. 2014. Light to liquid fuel: theoretical and realized energy conversion efficiency of plants using Crassulacean Acid Metabolism (CAM) in arid conditions // *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 3471–3478
8. **Dodd A.**, Borland A., Haslam R. et al., 2002 Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic // *Journal of Experimental Botany*, v.53, p. 569-80
9. **Du Y.**, Nose A., Wasano K., Uchida Y. 1998. Responses to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the Calvin cycle and the C₄ pathway in sugarcane (*Saccharum sp.*) leaves // *Australian Journal Plant physiology*, v. 25, p. 253-260
10. **Hatch M** and Kagawa T. 1974. NAD malic enzyme in leaves with C₄ pathwayphotosynthesis and its role in C₄ acid decarboxylation // *Arch Biochem Biophys*,v. 160, p. 346–349
11. **Holtum J**, Chambers D, Morgan D, et al. 2011. Agave as a biofuel feedstock in Australia // *Global Change Biology Bioenergy*, v. 3, p. 58–67
12. **Kanai R** and Edwards GE. 1999. The biochemistry of C₄ photosynthesis // In: Sage RF, Monson RK (eds) C₄ plant biology. Academic Press, p 49–87
13. **Lüttge U.** 2002. CO₂-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism // *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 2131–2142
14. **Nelson E** and Sage R 2008. Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression // *Journal of Experimental Botany*, v.59, p. 1841–1850
15. **Shaheen A.**, Nose A., Wasano K.2002 In Vivo Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Crassulacean Acid Metabolism Plants -Is Pineapple CAM Not Regulated by PEPC Phosphorylation? // *Environmental Control in Biology*, v.40, p. 343-354

16. **Winter K** and Holtum J. 2011. Induction and reversal of Crassulacean Acid metabolism in *Calandrinia polyandra*: effects of soil moisture and nutrients. Functional Plant Biology, v. 38 p. 576–582.

Оруджева Т.Я., Байрамов Ш.М.

**ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ И НЕКОТОРЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
ФОСФОЕНОЛПИРУВАТ КАРБОКСИЛАЗЫ И NAD-МАЛАТЕГИДРОГЕНАЗЫ У
*HYLOTELEPHIUM CAUCASICUM***

Изучено суточное изменение активности ферментов ФЕПК и NAD-малатегидрогеназы у *Hylotelephiumcaucasicum*. Установлено, что существует положительная корреляция между динамикой изменения активности ферментов NAD-малатегидрогеназы и ФЕПК. Результаты исследований показали, что малат меньше влияет на активность ФЕПК выделенное в ночное время суток.

Ключевые слова: углерод концентрирующий механизмы, фотосинтетическая активность, САМ фотосинтез.

Orujova T.Y., Bayramov Sh.M.

**THE STUDY OF ACTIVITY AND SOME KINETIC PARAMETERS OF NAD- MALATE
DEHYDROGENASE AND PHOSPHOENOL PYRUVATE CARBOXYLASE IN
*HYLOTELEPHIUM CAUCASICUM***

The diurnal changes in the activity of the enzymes PEPC and NAD-malate hydrogenase in *Hylotelephium caucasicum* have been studied. It has been established that there is a positive correlation between changes in the activity of the enzymes NAD-malate hydrogenase and PEPC. The results of studies have shown that malate has less effect on the activity of PEPC extracted at night from leaves of *Hylotelephium caucasicum*.

Keywords: carbon concentrating mechanisms, CAM photosynthesis, photosynthetic activity

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 4.XII.2018