

UOT 581.1, 581.11, 581.132, 632.112

Biokimya**QURAQLIĞIN AMARANT YARPAQLARINDA QAZ MÜBADİLƏSİ PARAMETRLƏRİNƏ VƏ DEKARBOKSİLLƏŞDİRİCİ MALATDEHİDROGENAZALARA TƏSİRİ****AMEA-nın müxbir üzvü N.M.Quliyev, H.Q.Babayev,
U.Ə.Mehvaliyeva, M.N.Əliyeva, Y.M.Feyziyev**

NAD-malik enzimin (NAD-ME, EC 1.1.1.39) amarant (Amaranthus cruentus L.) yarpaqlarının mezofil (MH) və örtük topa hüceyrələrinin (ÖTH) sitozol və mitoxondrilərində, NADF-malik enzimin (NADF-ME, EC 1.1.1.40) isə xloroplastlarda lokalizasiya olunduğu müəyyən olunmuşdur. Quraqlığın təsirindən ÖTH-nin mitoxondrilərində NAD-ME-in 121 kDa molekul çəkisinə (M_r) malik olan yeni bir izoformasını əmələ gəlsə də NADF-ME-in izoferment spektrində dəyişiklik baş verməmişdir. Toxum yetişmə (TY) mərhələsində yarpaqda suyun nisbi miqdarının (SNM) 90%-dən 48,2%-ə enməsi prolinin 90%, malondialdehidin miqdarının 100% artdığı şəraitdə fotosintezin sürətinin (P_n) və ağızcıqların keçiriciliyinin (g_s) 60% azalmasına, hüceyrəarası boşluqlardakı CO_2 -nin miqdarının (C_i), NAD-ME və NADF-ME aktivliyinin artmasına səbəb olmuşdur. NAD-ME və NADF-ME aktivliyi xlorofillərin və karotinoidlərin miqdarından olduğu aşkar olunmuşdur.

Açar sözlər: Amarant, quraqlıq, NAD-ME, NADF-ME, ağızcıq keçiriciliyi, adaptasiya

Giriş

Yüksək plastikliyə malik olan enzimlər (ME) L-malatın oksidləşməklə dekarboksilləşməsi reaksiyasını kataliz edirlər, bu zaman ikivalentli kationların iştirakı ilə son məhsul olaraq piruvat, NAD(F)H və CO_2 əmələ gəlir [4]. NAD-ME kofaktor kimi NAD^+ , NADF-ME isə $NADF^+$ istifadə etməklə fotosintez və qeyri-fotosintez proseslərində fəaliyyət göstərir [6].

ME-lər intensiv biosintez və enerji prosesləri gedən bütün bitki toxumalarında, xüsusilə kökdə və yarpaqda lokalizasiya olunmaqla [1] bitkilərin stresin təsirindən mühafizəsində [3], sitozolun pH-nın tənzimlənməsində və C_4 -bitkilərdə CO_2 -nin FEP tərəfindən fiksasiyası nəticəsində yaranan malatın dekarboksilləşməsində iştirak edirlər [15].

C_4 -tsiklin fermentləri MH və ÖTH-də lokalizasiya olunmaqla ÖTH-nin karboksilləşmə mərkəzlərində CO_2 -nin qatılığını artıran biokimyəvi nasos funksiyasını yerinə yetirirlər. Bu mexanizmin fəaliyyəti nəticəsində ÖTH-də CO_2 -nin qatılığının atmosfərə nisbətən ~10 də-

fə yüksəlməsi fototənəffüsün azalmasına səbəb olduğundan güman etmək olar ki, fotosintezin C_4 yolu C_3 yolun isti və quraqlıq zonalar üçün xas olan kompleks adaptasiya formasıdır [11].

Bu məqalədə quraqlığın amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-də C_4 -dikarbon turşularının metabolizmində mühüm rol oynayan NAD-ME və NADF-ME fermentlərinin izoferment spektrinə, lokalizasiyasına, bəzi fiziki-kimyəvi xassələrinə, qaz mübadiləsi parametrlərinə, aralıq metabolitlərin sintezinə və fotosintezin piqmentlərinin miqdarına təsiri tədqiq olunmuşdur.

Material və metodlar

Tədqiqat obyekti olaraq amarantın təbii şəraitdə becərilmiş *Amaranthus cruentus* L. növü götürülmüşdür. İnkişafın 30-cu günündən başlayaraq təcrübə variantının bitkilərində suvarılma dayandırılaraq süni torpaq quraqlığı yaradılmış, kontrol bitkilərdə isə suvarılma vegetasiyanın sonunadək davam etdirilmişdir.

Amarant yarpaqlarından MH, ÖTH-in təmizlənməsi və subhüceyrə fraksiyalarının alın-

ması mexaniki yolla yerinə yetirilmişdir [8].

Qaz mübadiləsi parametrləri - P_n , g_s , C_i və transpirasiya sürəti (T_r) LI-6400 XT (LI-COR 6400 XT, Biosciences, ABŞ) infraqırmızı qazanalizatorundan istifadə edilməklə ölçülmüşdür.

Sərbəst prolinin miqdarı Bates [2], malondialdehidinin miqdarı [12], yarpağın su göstəriciləri Tambussi [14], pigmentlərin miqdarı isə Sims və Gamon [13] üsulları ilə ölçülmüşdür. Reaksiyanın kinetik parametrləri - Mixaelis-Menten sabiti (K_m) və reaksiyanın maksimal sürəti (V_{max}) Laynuiver-Berk metodu ilə təyin olunmuşdur.

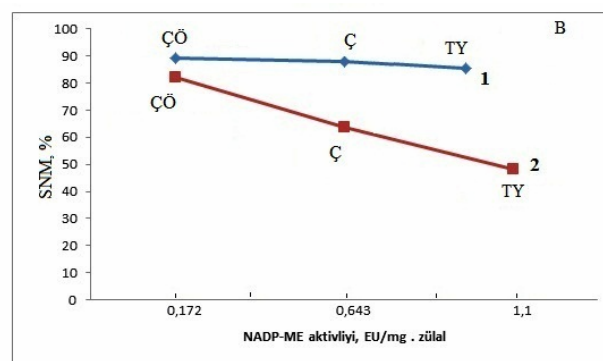
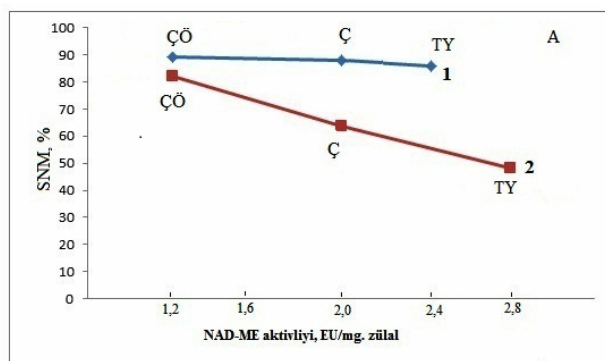
NAD-ME və NADF-ME aktivliyi [9], nativ elektroforez [5], gellərin spesifik aşkarlanması spesifik mühitdə tetrazol [7], fermentlərin molekulyar çəkili elektroforetik [10], zülalların ümumi miqdarı Louri üsulu ilə təyin olunmuşdur.

Nəticələr və onların analizi

Məlumdur ki, C_4 bitkilərin yarpaqlarında CO_2 -qatılaşdırma mexanizmin olması onların

C_3 bitkilərə nisbətən quraqlıqda suyun daha effektiv istifadəsini təmin edir ki, bu da ağızcıq keçiriciliyi ilə birbaşa bağlıdır [11]. Yarpaqdakı SNM, havanın nisbi rütubəti və torpağın nəmliyi birlikdə yarpaq, torpaq və atmosfer arasında mübadilə edən suyun balansını nizam salırlar. Müəyyən olunmuşdur ki, havanın nisbi rütubəti və torpağın nəmliyi 50–60%-dən çox olduqda yarpaqlarda SNM-i da çox olur (90%-ə yaxın).

Yarpaqda SNM və torpağın nəmliyinin azalaraq müəyyən həddə çatması bitkilərdə müdafiə sistemlərinin işə düşməsi üçün siqnal rolunu oynayır. Birinci şəkildən göründüyü kimi quraqlıq nümunələrinin ontogenezin çiçəkləmə önü (ÇÖ), çiçəkləmə (Ç) və TY mərhələlərində yarpaqda SNM-nin getdikcə azalaraq 89,2%-dən 48,2%-ə enməsi ÖTH-nin mitoxondrilərində NAD-ME-in aktivliyinin TY mərhələsində ÇÖ mərhələsinə nisbətən 2,3 dəfə (şəkil 1A), xloroplastlarda isə NADF-ME aktivliyinin ~0,7 dəfə (şəkil 1B) artmasına səbəb olmuşdur.



Şəkil 1. Yarpağın ÖTH-də NAD-ME (A) və NADF-ME (B) aktivliyinin SNM-dən asılı olaraq dəyişmə dinamikası. 1 – kontrol, 2 – quraqlıq

Cədvəl

Quraqlığın yarpaqların qaz mübadiləsi göstəricilərinə təsiri

Mərhələ	Variant	P_n	g_s	C_i	T_r
ÇÖ	K	22,5±10,2	0,88±6,8	265,0±0,19	3,34±3,4
	Q	17,4±8,7	0,64±5,9	283,0±1,21	3,44±3,8
Ç	K	21,9±10,1	0,79±6,1	289,0±3,8	4,03±4,1
	Q	15,8±8,3	0,55±4,03	303,0±4,1	2,92±2,3
TY	K	17,6±8,9	0,77±6,1	309,0±4,5	2,2±1,9
	Q	10,9±6,8	0,48±3,9	324,0±5,1	1,89±1,7

Qeyd: P_n - $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; g_s - $\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; C_i - $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$; T_r - $\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Quraqlıq eyni zamanda CO₂ mübadilə sisteminə də ciddi təsir göstərir. Cədvəldən görünüyü kimi ontogenezdə quraqlıq artdıqca P_n, T_r və g_s getdikcə azalmış, yalnız C_i artmışdır. Quraqlıqda ağızciqlar vasitəsi ilə udulan CO₂-nin diffuziyasının çətinləşməsi karbon qatılaşdırıcı mexanizmi fəallaşdırır. Bunlara müvafiq olaraq yarpaqda ME-lər TY mərhələsinin sonunadək tədricən aktivləşmiş, qısa müddətli sabitlikdən sonra onların aktivlikləri azalmağa başlamışdır.

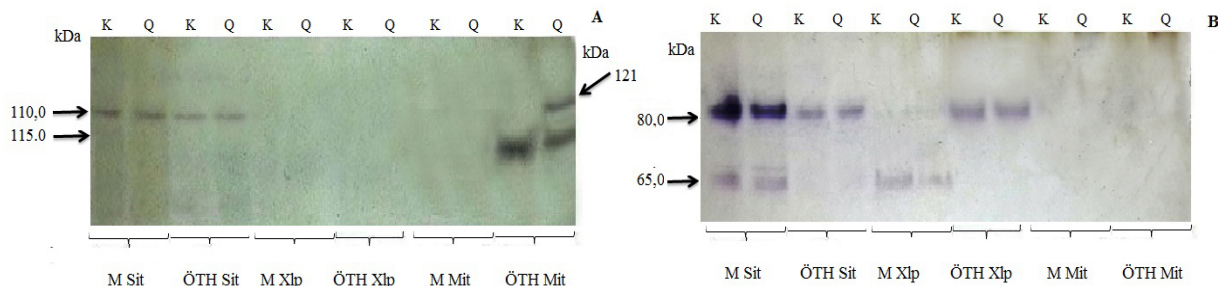
Bitkilər quraqlığın təsirinə qaz mübadiləsi parametrləri, fermentlərin aktivliyi və sintez olunan aralıq metabolitlər səviyyəsində qarşı cavab verirlər. Buna görə də quraqlığın bitki orqanizmlərinə təsirinin tədqiqində aralıq metabolitlərin miqdarının dəyişmə dinamikasının öyrənilməsinin böyük əhəmiyyəti vardır. ÇÖ fazada təcrübə nümunələrində prolinin miqdarı kontrola nisbətən 10%, Ç fazasında 70%, TY fazasında isə 90% artmışdır. Bu zaman MDA-nın miqdarı uyğun olaraq 5, 40 və 100%-ə bərabər olmuşdur. Malatın miqdarında inkişafın mərhələlərinə uyğun olaraq kontrolla müqayisədə 10, 20 və 80% azalma müşahidə olunmuşdur. Bu tendensiya fotosintezin pigmentlərinin miqdarında da özünü göstərmişdir. Beləki, ontogenezin hər 3 mərhələsində MH və ÖTH-də xlorofil a/b nisbətinin azalma istiqamətində gətirdiyi halda karotinoidlərin (Kar) miqdarında ciddi artım müşahidə olunmuşdur. Kontrol müqayisədə Kar/Xl(a+b) nisbəti ÖTH-də daha yüksək qiymət almışdır. Bu karotinoidlərin miqdarının artması, Xl(a+b) cəminin isə azalması hesabına baş vermişdir. Göstərilən bu əlamətlər quraqlıq zamanı ME-lərin aktivliyinin tənzim olunmasına da təsir göstərir.

Şəkil 2A-dan göründüyü kimi amarantın ontogenezinin Ç mərhələsində quraqlığın təsi-

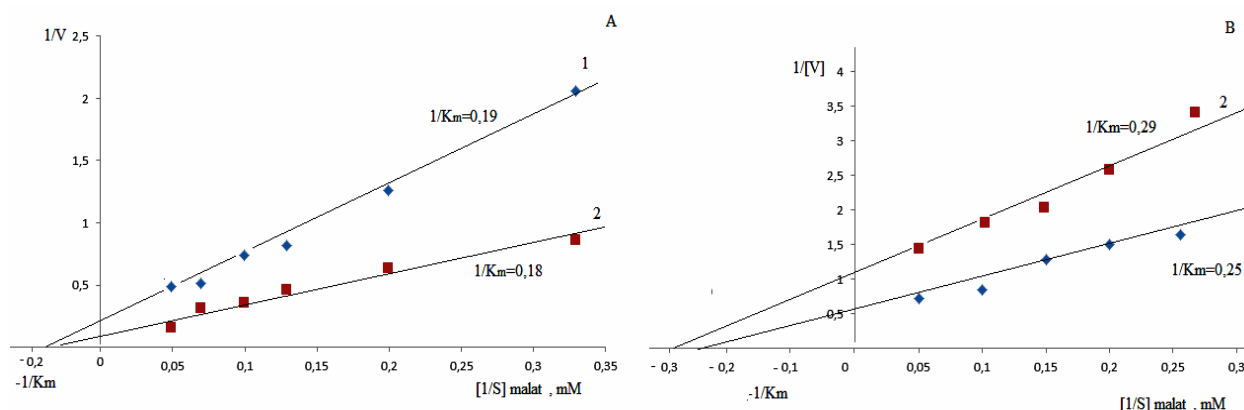
rindən MH və ÖTH-nin sitozolunda heç bir yenilik baş verməyə də ÖTH-nin mitoxondrilərində elektroforetik hərəkətililiyinə və molekulyar çəkisinə görə fərqlənən NAD-ME-in 121 kDa molekulyar çəkisinə malik yeni bir izoforması əmələ gəlmişdir. Mitoxondrial izoformaların aktivliyi NAD-ME-in ümumi aktivliyinin ~91%-ni təşkil etmişdir. NADF-ME isə ÖTH xloroplastlarında lokalizasiya olunan bir izoformaya malikdir (~80 kDa) (şəkil 2B) və bu fermentin ümumi aktivliyinin ~95 %-ni təşkil edir.

ME-lər quraqlığın təsirindən modifikasiya olunduqlarından onların kataliz etdikləri reaksiyaların kinetikasında da müəyyən dəyişikliklər əmələ gəlir. NAD-ME və NADF-ME-in kataliz etdikləri reaksiyaların sürətinin substratın qatılığından asılılığı qrafikindən görünüyü kimi [S_{malat}]-ın miqdarı 10 mM olduqda kontrol və quraqlıq variantlarda V_{max} uyğun olaraq 5 və 10 EU/mg zülal, reaksiyanın sürət sabiti (K_m) isə uyğun olaraq 5,3 və 5,5 mM olmuşdur (şəkil 3A). NADF-ME üçün isə V_{max} 2 və 0,9 EU/mg zülal, reaksiyanın sürət sabiti (K_m) isə uyğun olaraq 4 və 3,4 mM olmuşdur (şəkil 3B). Hər 2 fermentin kataliz etdiyi reaksiya Mixaelis-Menten mexanizmi ilə baş verir.

Alınan nəticələr onu deməyə əsas verir ki, quraqlıqda ağızciq hüceyrələrinin bağlanması hesabına atmosferdən udulan CO₂-nin miqdarı azaldığından fotosintez zəifləyir. Bu zaman bitkini mühafizə etmək üçün C₄-bitkilərdə karbon qatılaşdırıcı mexanizmin daha da aktivləşməsi nəticəsində malat, aspartat kimi C₄ dikarbon turşularının və Ci-nin miqdarı artır. Bu zaman dekarboksilləşdirici ME-lərin aktivliyinin yüksəlməsi hesabına fotosintezin yüksək intensivliyi təmin olunur.



Şəkil 2. Çiçəkləmə fazasında yarpaqların MH və ÖTH-nin subhüceyrə fraksiyalarında NAD-ME (A) və NADF-ME-in (B) izoferment spektri. K - kontrol, Q - quraqlıq



Şəkl. 3. Çiçəkləmə fazasında yarpaqda NAD-ME (ÖTH, mit) (A) və NADP-ME-in (ÖTH, xlp) (B) kataliz etdiyi reaksiyanın sürətinin substratın (L-malatın) qatılığından asılılığı. 1- kontrol, 2 - quraqlıq

Alınan nəticələrə əsasən qeyd etmək olar ki, C_4 -bitkilərin NAD-ME yarım tipinə aid olan növlərin yarpaqlarında quraqlığın təsirindən ME-lər subhüceyrə lokalizasiyasına, aktivliyinə, bəzi fiziki-kimyəvi xassələrinə görə fərqlənən bir neçə izoformaya malik olurlar. Prolin və lipid peroksidləşməsinin son məhsulu olan malondialdehid kimi aralıq metabolitlərin miqdarının artması, fotosintezin pigment sistemlərində baş verən dəyişkənliklər də quraqlığın təsirinə qarşı müdafiə sistemlərinin tərkib hissəsi hesab edilə bilər.

Bu iş Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişaf Fondunun maliyyə dəstəyi ilə yerinə yetirilmişdir – Grant EIF-2012-2(6)-39/19/3.

ƏDƏBİYYAT

1. *N.N., Edwards G.E.* NAD-malic enzyme from plants // *FEBS Lett.*, 1985, v. 182, p. 225-233.
2. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant Soil*, 1973, v. 39, p. 205-207.
3. *Casati P., Drincovich M.F., et al.* Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defence // *Photosynth Res.*, 1999, V. 61, p. 99-105.
4. *Chang G.G., Tong L.* Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases // *Biochemistry*, 2003, v. 42, p. 12721-12733.
5. *Davis B. J.* Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, p. 404-427.
6. *Drincovich M.F., Casati P., Andreo C.S.* NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways // *FEBS Lett.*, 2001, V. 490, p. 1-6.
7. *Fieldes M.A.* Explanation of the achromatic bands produced by peroxidase isozymes in polyacrilamide electrophoresis gels stained for malate dehydrogenase // *Electrophoresis*, 1992, v. 13, p. 82-86.
8. *Gardestrom P., Edwards G.E.* Isolation of mitochondria from leaf tissue of *Panicum miliaceum*, a NAD-malic enzyme type C_4 plant // *Plant Physiology*, 1983, v. 71, p. 24-29.
9. *Hatch M. D., Kagava T.* NAD malic enzyme in leaves with C_4 -pathway photosynthesis and its role in C_4 acid decarboxylation // *Arch. Bioch. Bioph.*, 1974, v. 160, № 2, p. 346-349.
10. *Laemmly U.K.* Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, v. 77, № 4, p. 680-683.
11. *Long J.J., Wang J.I., Berry J.O.* Cloning and analysis of the C_4 photosynthetic NAD-dependent malic enzyme of amaranth mitochondria // *The Journal of Biol. Chem.*, 1994, v. 269, p. 2827-2833.
12. *Peever T.L., Higgins V.J.* Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and non specific elicitors from *Cladosporium fluvum* // *Plant Physiology*, 1989, v. 90, p. 867-875.
13. *Sims D.A., Gamon J.A.* Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages // *Remote Sensing of Environ.*, 2002, v. 81, p. 337-354.
14. *Tambussi E., Nogues S., et al.* Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism // *Planta*, 2005, v. 19, p. 1-25.
15. *Valenti V., Pupillo P.* Activation kinetics of NAD-malic enzyme of cauliflower bud mitochondria // *Plant Physiol.*, 1981, v. 68, p. 1191-1196.

AMEA Botanika İnstitutu

DROUGHT EFFECT ON GAS-EXCHANGE PARAMETERS AND DECARBOXYLATING MALATE DEHYDROGENASES IN AMARANTH LEAVES

**N.M.Guliyev, H.G.Babayev, U.A.Mehvaliyeva,
M.N.Aliyeva, Y.M.Feyziyev**

NAD-malic enzyme (NAD-ME, EC 1.1.1.39) was found to be localized in cytosol and mitochondria of mesophyll (M) and bundle sheath (BS) cells of *Amaranthus cruentus* L. leaves and NADP-malic enzyme (NADP-ME 1.1.1.40) was detected in chloroplasts. Drought caused the appearance of a new 121 kDa (Mr) isoform of NAD-ME in BS mitochondria, whereas no changes occurred in NADP-ME isoenzyme spectrum. The decrease in relative water content of leaves from 90% to 48.2%, increases in proline (90%) and malondialdehyde (100%) amounts during seed formation stage led to 60% decrease in photosynthesis rate (P_n) and stomatal conductance (g_s), and increase in CO_2 concentration (C_i) in intercellular spaces and NADP-ME, NAD-ME activities. NADP-ME and NAD-ME activities were determined to be strongly related to amounts of chlorophyll and carotenoids.

Keywords: *amaranth, drought, NAD-ME, NADP-ME, stomatal conductance, adaptation*

ВЛИЯНИЕ ЗАСУХИ НА ПАРАМЕТРЫ ГАЗООБМЕНА И ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩИЕ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ АМАРАНТА

**Н.М.Гулиев, Г.Г.Бабасев, У.А.Мехвалиева,
М.Н.Алиева, Я.М.Фейзинов**

НАД-малик энзим (НАД-МЭ, КФ 1.1.1.39) локализован в цитозоле и митохондриях мезофильных (МК) и обкладочных (ОК) клеток листьев *Amaranthus cruentus* L. Однако НАДФ-малик энзим (НАДФ-МЭ 1.1.1.40) обнаружен в хлоропластах. В результате засухи появляется новая изоформа НАД-МЭ с молекулярным весом 121 кДа в митохондриях, тогда как в изоферментном спектре НАДФ-МЭ не происходят изменения. Уменьшение относительного содержания воды (ОСВ) от 90% до 48,2%, увеличение количеств пролина (90%) и малондиальдегида (100%) в стадии созревания зерна приводит к 60% снижению скорости фотосинтеза (P_n), устьичной проводимости (g_s), и увеличению концентрации CO_2 (C_i) в межклеточном пространстве и активности НАДФ-МЭ и НАД-МЭ. Была обнаружена тесная зависимость активности этих ферментов от количества хлорофиллов и каротиноидов.

Ключевые слова: *амарант, засуха, НАД-МЭ, НАДФ-МЭ, устьичная проводимость, адаптация*