

**ТАДЖИКСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

УДК: 581.137.31.4  
ББК:28.57

На правах рукописи

**Сайфудинов Ахлиддин Киёмович**

**ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АКТИВНОСТИ  
СВОБОДНОГО МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА  
КАЛЬВИНА ЛИСТЬЕВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЯ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация  
на соискание учёной степени  
доктора биологических наук

Научный консультант: заслуженный работник РТ,  
доктор биологических  
наук, профессор  
**М.А.Бабаджанова**

**Душанбе – 2023**

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	10-11
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	12-26
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СВОЙСТВАХ И МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ФИТОГОРМОНОВ, О МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ</b>	<b>27-87</b>
1.1. История открытия фитогормонов	27-31
1.2. Классификация фитогормонов и их общие свойства	32-49
1.3. Цитокинины. Воздействие цитокининов на процессы физико-химического характера в растениях	50-51
1.3.1. История научного исследования цитокининов	52-54
1.3.2. Влияние цитокининов на физиолого-биохимические процессы	55-60
1.3.3. Цитокинины: механизм действия	60-71
1.4. Регуляция активности ферментов	72-73
1.4.1. Аллостерическая регуляция	72-73
1.4.2. Надмолекулярная организация ферментов и её преимущества	73-80
1.5. Резюме	81-87
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	<b>88-104</b>

2.1.	Объекты исследования	88-94
2.2.	Исследовательские методы	95
2.2.1.	Реактивы	95
2.2.2.	Микроопределение количественного содержания белка с биуретовым реактивом	95
2.2.3.	Определение неорганического фосфора	96
2.2.4.	Определение активности рибозофосфатизомеразы	96-97
2.2.5.	Определение активности фосфорибулокиназной	97-98
2.2.6.	Определение активности рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/ оксигеназы спектрофотометрическим методом	98
2.2.7.	Получение, проведение очистки многоферментного комплекса из листьев хлопчатника	99-103
2.8.	Статистическая обработка результатов	104
<b>ГЛАВА 3. КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АКТИВНОСТЕЙ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ АРАБИДОПСИСА РАСЫ ЭНКХАЙМ</b>		105-126
3.1.	Выявление оптимальных условий реакционной среды для проявления рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикл Кальвин в экстрактах из листьев арабидопсиса	105
3.1.1.	Зависимость от длительности реакции рибозофосфати-	105-107

- зомеразной активности мультиферментного комплекса.  
Исследование кинетики ферментативных реакций
- 3.1.2. Влияние количества белка в реакционной среде на рибозо-фосфатизомеразную активность полиферментного комплекса 107-108
- 3.1.3. Воздействие изменения концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность, концентрации мультиферментными комплекса 109-111
- 3.2. Влияние условий реакционной среды для проявления фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм 112-113
- 3.2.1. Влияние количества белка в реакционной среде на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса 112-113
- 3.2.2. Зависимость от концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса 113-115
- 3.2.3. Влияние концентрации АТФ в реакционной среде на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса 115-116
- 3.3. Изучение оптимальных условий реакционной среды для проявления карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса 116-118

3.3.1.	Влияние продолжительности реакций на проявление карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса	116-118
3.3.2.	Зависимость от количества белка в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) мультиферментного комплекса	118-120
3.3.3.	Влияние концентрации углекислоты в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса	120-122
3.3.4.	Влияние концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (РБФК/О)/ оксигеназы мультиферментного комплекса	123-124
3.5.	Резюме	125-126

**ГЛАВА 4. КИНЕТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА СОРТА 108-Ф**

4.1.	Зависимость от условий реакционной среды рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника	127-128
4.1.1.	Влияние длительности реакции на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса	127-128

- Зависимость от количества белка в реакционной среде
- 4.1.2. рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса 129-130
- 4.1.3. Влияние концентрации рибозо-5-фосфата на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса 130-132
- Влияние условий реакционной среды на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника
- 4.2. локиназную активность мультиферментного комплекса в 132-133
- 4.2.1. Влияние длительности реакции на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса 132-133
- Зависимость от количества белка в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса
- 4.2.2. форибулокиназной активности мультиферментного комплекса 134-135
- 4.2.3. Влияние концентрации субстрата на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса 135-136
- Зависимость от концентрации АТФ в реакционной среде
- 4.2.4. фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса 137-138
- 4.3. Выявление оптимальных условий реакционной среды для проявления карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника 138-140
- 4.3.1. Зависимость от длительности реакции карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/ оксиге-

назы мультиферментного комплекса

- Влияние количества белка в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса 140-141
- 4.3.2. Зависимость карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса от концентрации субстрата в реакционной среде 142-143
- 4.3.3. Влияние углекислоты на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса 143-144
- 4.3.4. Резюме 145

## **ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА *IN VITRO* НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ АРАБИДОПСИСА РАСЫ ЭНКХАЙМ И ЕГО МУТАНТОВ** 146-159

- 5.1. Зависимость от различных способов добавления кинетина рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм 146-150
- 5.2. Влияние кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина 150-152
- 5.2.1. Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорибулокиназной активности в экстрактах из листьев 150-152

исходной расы арабидопсиса расы Энкхайм и его мутанта  
58/15

Зависимость от возраста растений арабидопсиса влияния  
5.2.2. кинетина на фосфорibuлокиназную активность мульти- 153-155  
ферментного комплекса цикла Кальвина

Влияние различных концентраций кинетина в реакционной  
5.3. среде на карбоксилазную активность рибулозобисфос- 155-157  
фаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса  
в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм

5.4. Резюме 157-159

## **ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КИНЕТИНА *IN VITRO* НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИ- ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В 160-174 ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА**

Влияние кинетина на ферментативные активности в  
6.1. препаратах различной степени очистки из листьев 160-161  
хлопчатника

Зависимость от степени очистки ферментного препарата из  
листьев хлопчатника активирующего действия кинетина *in*  
6.1.1. *vitro* на фосфорibuлокиназную активность мультифер- 161-162  
ментного комплекса

Влияние кинетина *in vitro* на карбоксилазную активность  
6.1.2. рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультифер- 162-164  
ментного комплекса в препаратах различной степени очистки



	из листьев хлопчатника	
6.2.	Зависимость от фазы развития растений влияния кинетина <i>in vitro</i> на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника	164-168
6.2.1.	Зависимость от концентраций кинетина в реакционной среде фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса при использовании различных субстратов	164-168
6.2.2.	Влияние кинетина <i>in vitro</i> на ферментативные активности мультиферментного комплекса в зависимости от фазы развития растений хлопчатника	168-172
6.2.3.	Зависимость от различных концентраций кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф	172-173
6.3.	Резюме	173-174
6.4	Рекомендация производству	174
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.</b>	175-189
	<b>Основные научные результаты диссертации</b>	
	<b>ВЫВОДЫ</b>	190-192
	<b>ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА</b>	193-220

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПФЦ	восстановительный пентофосфатный цикл или цикл Кальвина
АДФ	Аденозиндифосфат
АТФ	Аденозинтрифосфат
РФИ	рибозофосфатизомераза (КФ 5.3.1.6.)
ФРК	фосфорibuлокиназа (КФ 2.7.1.19)
РБФКО	рибулозо <b>бис</b> фосфаткарбоксилаза/оксигеназа(КФ 4.1.1.39)
Р5Ф	рибозо-5-фосфат
Рy5Ф	рибулозо-5-фосфат
РБФ	рибулозо-1,5- <i>бис</i> фосфат
3-ФГК	3-фосфоглицериновая кислота
ПВП	Поливинилпирролидон
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ДТТ	Дитиотрейтол
ЭДТА	Этилендиаминтетраацетат
кДа	Килодальтон
А	Активность, мкмоль продукте в минуту
УА	удельная активность, мкмоль продукта или субстрата в минуту в расчете на 1 мг белка
$V_{\max}$	максимальная скорость реакции
Е	Фермент

Р	продукт реакции
рН	концентрация водородных ионов
ФСК	фермент-субстратный комплекс
МФК	мультиферментный комплекс
АЦ	активный центр
АлЦ	аллостерический центр
Кинетин	6-фурфуриламинопурин (6-БАП)
мол.масса	молекулярная масса

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Цитокинины, наряду с другими фитогормонами, участвуют в регуляции множества физиолого-биохимических процессов, включая и регулируя целые физиологические и морфогенетические программы на протяжении всего онтогенеза растений (Кулаева, 1973; Полевой, Саламатова, 2004;).

Цитокинины стимулируют деление и рост клеток, дифференцировку пластид, формирование митохондриального аппарата и шероховатого эндоплазматического ретикулума, задерживают старение листьев, активируют приток метаболитов, а также образование побегов из каллусов в культуре, участвуют в адаптации растений к внешним условиям, определяют общую архитектуру растения, поддерживая оптимальный баланс между объемом надземной и подземной частей растения, регулируют клубенькообразование у бобовых культур, имеют большие возможности и перспективы применения в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине и даже в косметике (Уоринг, Филлипс, 1983; Кефели, 1991; Ломин и др., 2012; Рахмихудоев, Сайфудинов, 2015; Долгих и др., 2016;).

Главной мишенью цитокининов в растительной клетке являются пластиды. Цитокинины способствуют превращению этиопластов в хлоропласты, формированию системы внутренних мембран и сборке компонентов электрон-транспортной цепи хлоропластов, активации циклического фотофосфорилирования, возрастанию синтеза хлорофилла, синтеза многих ферментов, особенно ключевого фермента фотосинтеза-рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Борзенкова, Мокроносов, 1976; Хохлова, 1977; Мокронисов, 1983; Муромцев и др., 1987; Кефели, 1991; Алиев, 1998; , Сайфудинов, 2017)

Такое многообразное влияние цитокининов на хлоропласты обусловлено их участием в регуляции экспрессии генов пластидных белков, кодируемых как ядерными, так и пластидными генами (Schmulling et al., 1997; Zubo et al., 2005).

Большинство генов пластома кодируют продукты, прямо или косвенно связанные с функционированием фотосинтетического аппарата. Гены напрямую активирующиеся цитокинином были обнаружены у арабидопсиса и кукурузы в 1998 году в лабораториях Дж. Кибера (США) и Т.Сугиямы (Brendstatter, Kieber, 1998; Taniguchi et al., 1998).

У арабидопсиса обнаружено три рецептора цитокинина. Романову А.Г. (2009; 2011) удалось расшифровать структуру этих рецепторов, даже рассчитать константы сродства различных цитокининов к рецепторам. Исследуются свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов, определяется транскрипционная скорость функционально различных групп генов пластома *Arabidopsis Thaliana*.

Вышеизложенное показывает, что в последнее десятилетие исследования механизма действия цитокининов на молекулярном уровне успешно развиваются.

Очень успешно цитокинины находят и практическое применение. В агропроизводстве их используют для усиления кущения растений, изменения формы и увеличения размеров ряда плодов, повышения доли женских цветков (огурцы и др.), всхожести семян, устойчивости к абиотическим стрессом и болезням, предуборочной дефолиации (хлопчатник и др.) и т.д. Совместно с ауксинами цитокинины применяют в биотехнологии при выращивании клеточных и каллусных линий в стерильной культуре и при получении трансгенных растений.

По современным представлениями одним из ведущих регуляторных механизмов метаболизма клетки на молекулярном уровне является образование и функционирование разнообразных надмолекулярных комплексов ферментов (Фридрих, 1986; Курганов, Любарев, 1991; Ермаков, 1993; Романова, Павловец, 1997; Gontero et al., 2002).

Образование ферментами цикла Кальвина – рибозофосфатизомеразой, фосфорибулокиназой и рибулозобисфосфаткарбоксилазой/оксигеназой мультиферментного комплекса с молекулярной массой 520 кДа установлено исследованиями Бабаджановой с сотр. (Бабаджанова, 1981; 1990; Бабаджанова, Насыров, 1992; Бабаджанова и др., 2002; 2006; 2010).

**Степень изученности темы исследования.** Цитокинины успешно и широко изучаются в научных исследованиях и успешно применяются в современном агропроизводстве и биотехнологии. Однако, несмотря на многообразие действия цитокининов на фотосинтез в литературе отсутствуют сведения об изучении их прямого влияния на активность и синтез мультиферментного (ых) комплекса (ов) цикла Кальвина в онтогенезе растений.

Исследование механизмов прямого действия экзогенного кинетина (6-БАП) на ферментативные активности мультиферментного комплекса ферментов карбоксилирующей фазы фотосинтеза (цикла Кальвина) листьев высших растений различного возраста является весьма актуальным.

#### **Связь работы с научными программами и темами**

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательских тем кафедры физиологии растений и биотехнологии Таджикского национального университета: № 0107ТД 612 «Мультиферментные комплексы цикла Кальвина и регуляция их активности в связи с

ростом, развитием и продуктивностью», №0110РК 134 «Исследование механизмов регуляции физиолого – биохимической адаптации растений к различным условиям», №0116 ТЈ00748 «Физиолого – биохимические механизмы устойчивости растений к стрессовым факторам». Постановление правительства Таджикистана от 30.03.2013 №47 «Сбор сохранение и использование генетических ресурсов растений».

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Цель исследования:** Сравнительные кинетические исследования каждой в отдельности ферментативной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника и изучения влияния кинетина (6-БАП) *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса в онтогенезе растений арабидопсиса и хлопчатника и определение стадии развития растений, наиболее чувствительных к недостатку содержания цитокининов в листьях; выявление механизма действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса.

**Объект исследования** были листья арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* Heynh), исходной расы Энкхайм, его мутанты высокопродуктивной триплекс и низкопродуктивный 58/15, а также хлопчатника средневолокнистого (*Gossypium hirsutum* L., семейство *Malvaceae*) сорта 108-Ф. Семена арабидопсиса были приобретены благодаря академику АН РТ П.Д.Усманову.

**Предмет исследования.** Изучение влияние кинетина на активность мультиферментного комплекса ключевых ферментов карбоксилирующей фазы фотосинтеза (цикла Кальвина) в онтогенезе растений.

### **Задачи исследования:**

- провести кинетические исследования рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника при использовании различных субстратов;

- изучить в онтогенезе растений влияние различных концентраций и способов добавления кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его мутантов а также хлопчатника;

- изучить зависимость от фазы развития растений влияния различных концентраций кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника при использовании различных субстратов;

- определить действие экзогенного кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в препаратах различной степени очистки из листьев хлопчатника;

- исследовать механизм действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина.

**Методы исследования.** Количественного содержания белка определяли с реактивом Бенедикта проводили по методике, описанной Кочетовым (1980). Измерения велись при длине волны 330 нм на высокочувствительном спектрофотометре ULTROSPEC II (LKB, Швеция) с полной шкалой от 0 до 0,001 экстинции, или фотоэлектроколориметре Speecord.

**Определение неорганического фосфора** проводилось по методу Фиске-Суббароу (Лоури-Лопас) в модификации Скулачева (Кочетов, 1980).



**Определение активности рибозофосфатизомеразы** проводилось по модифицированному методу Аксельрода и Янг [Axelrod, Jang, 1954]. Рибозофосфатизомеразную активность выражали в мкмоль рибулозо-5-фосфата в минуту в расчете на 1 мг белка.

**Определение активности фосфорибулокиназы** проводилось по методу Гурвитца и др. [Hurwitz et al., 1956]. Фосфорибулокиназную активность выражали в мкмоль рибулозо-1,5-бис-фосфата в минуту (Е) в расчете на 1 мг белка.

**Активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О)** определяли спектрофотометрически по методике Рэккера, модифицированной А.К.Романовой [Романова, 1980].

**Выделение ферментных активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений.** При получении ферментных препаратов из листьев хлопчатника, использовали общепринятые приемы очистки, но в соответствии со специфическими особенностями этих листьев модифицировали методику получения экстракта. Экстракты из листьев арабидопсиса выделяли аналогичным способом, но в буфер не добавляли поливинилпиралидон.

При очистке ферментных препаратов использовали фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на Сефадексе G-50 и гель-хроматографию на Сефадексе G-200.

Полученные результаты обработаны статистически (Урбах, 1964) по формулам, представленным в сборнике методов биохимического анализа растений под редакцией В.В.Полевого и Г.Б.Максимова (1978), а также в книге Г.Ф.Лакина (1990).

Представленные данные достоверны при доверительной вероятности 97-99%.

**Отрасль исследований.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности ВАК при Президенте РТ 03.01.05 физиология и биохимия растений по следующим пунктам: 1. Фотосинтез и дыхание растений. Их связь с продуктивностью и урожаем. Фотофизические, фотохимические и биохимические механизмы фотосинтеза; 3.Онтогенетические программы роста и морфогенеза растений, включая эмбриогенез, вегетативный рост, генеративное развитие,плодоношение и старение.

**Этапы исследования** охватывают более 15 лет теоретического и практического изучения. На первом этапе была сформулирована тема исследования, ее цель и задачи, выбраны объекты исследования, разработаны подходы, проведен литературный поиск;

На втором этапе было изучено в зависимости от компонентов реакционной среды кинетическое поведение ключевых ферментов цикла Кальвина – рибозофосфатизомеразы, фосфорibuлокиназы и рибулозобисфосфаткар-боксилазы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника;

На третий этап было проведено исследование в онтогенезе растений влияния различных концентраций и способов добавления кинетина на активность ферментов мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его мутантов;

На четвертой этапе было определено влияние кинетина на активность ферментов мультиферментного комплекса в препаратах различной степени очистки из листьев хлопчатника;

На пятой этапе была исследована зависимость от использования различных субстратов (рибозо-5-фосфата, рибулозо-5-фосфата или рибулозобисфосфата) влияние кинетина *in vitro* на различных фазах развития растений хлопчатника и определение механизма действия кинетина

Шестой этап состоял в написании диссертации, её апробации и обсуждении.

**Основная информационная и экспериментальная база** состояла из литературных источников, научных публикаций, интернете, материалов конференций, т.е научных библиотек он-лайн ресурсов, а также лабораторных исследований.

**Достоверность диссертационных результатов.** Достоверность экспериментальных данных, полученных современными физиолого – биохимическими методами исследований с использованием сертифицированного оборудования подтверждается достаточной повторностью, воспроизводимостью и статистической обработкой.

**Научная новизна исследования.** Впервые проведено сравнительное изучение зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов фотосинтеза рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника.

- Величины максимальной скорости реакции  $V_{max}$ , каждой из ферментативных реакций, катализируемых мультиферментным комплексом из листьев хлопчатника имеют более высокие значения в сравнении с комплексом из листьев арабидопсиса. Это обусловлено тем, что для мультиферментного комплекса из листьев хлопчатника характерны более сложные и быстрые положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов. В результате этого за более короткое время достигаются высокие каталитические активности, значительно превышающие максимальные скорости реакций мультиферментного комплекса из листьев арабидопсиса.

- Установлено, что из трех испытанных способов добавления экзогенного кинетина: в процессе гомогенизации листьев, в реакционную среду, или и в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду, оптимальным для активации ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса независимо от возраста растений оказалось добавление его в реакционную среду.

- Изучена зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм и его низкопродуктивного мутанта 58/15. Наибольшее активирующее действие на ферментативные активности независимо от объекта, кинетин оказывал в концентрации 2 мкмоль/мл реакционной среды. Наибольшее активирующее действие - 300% или в три раза кинетин оказал на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и 2,5 раза в экстрактах из листьев хлопчатника.

- Обнаружена онтогенетическая зависимость активирующего действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы Энкхайм и его мутантов – высокопродуктивного - триплекс и низкопродуктивного - 58/15. Наибольшая степень активирующего действия кинетина проявлялась или у очень молодых – шестнадцатидневных растений, или у очень старых – тридцативосьмидневных. Это связано, по-видимому, с недостаточным содержанием эндогенных цитокининов как в листьях очень молодых растений, так и в листьях старых растений.

- Установлено, что при очистке экстрактов из листьев хлопчатника на стадии гель-хроматографии на колонке с Сефадекс G-

200 способность ферментов мультиферментного комплекса активироваться кинетином полностью терялась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при гель-хроматографии на Сефадексе G-200 происходит застревание (задержка) или (и) рецептора кинетина, или (и) «вторичного» мессенджера (усилителя сигнала), имеющих белковую природу, молекулярная масса которых намного меньше 500 кДа.

- При определении влияния различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорibuлокиназную и рибулозобисфосфаткарбокxилазную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в присутствии собственных специфических субстратов и при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата обнаружено, что степень активирующего действия кинетина на фермент была значительно выше при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата, а не в присутствии рибулозо-5-фосфата или рибулозо-1,5-бисфосфата. Полученные результаты дают основание полагать, что кинетин выполнял в данном случае роль аллостерического эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости рибозофосфатизомеразной, фосфорibuлокиназной и рибулозобис-фосфаткарбокxилазной реакции. Механизм действия других фитогормонов может быть другим, чем у кинетина. В будущем необходимо провести дальнейшие специальные исследования.

- Установлена онтогенетическая зависимость активирующего действия кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментных комплексов цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф. Показано, что для значительной активации (80%) фосфорibuлокиназной активности

мультиферментных комплексов в фазе цветения растений в сравнении с фазой 5-6 настоящих листьев и бутонизации необходимы более высокие концентрации кинетина. Полученные данные свидетельствуют о том, что в фазе бутонизации и цветения растения хлопчатника необходимо дополнительное количество кинетина.

**Теоретическая ценность исследования.** Результаты полученных экспериментальных исследований показали важность и необходимость изучения зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов темновой фазы фотосинтеза – рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфат-карбоксилазы /оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина.

Онтогенетические исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина имеют важное значение для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции физиолого-биохимических процессов в течение жизни растения и его адаптации к постоянно меняющимся внешним факторам.

Полученные экспериментальные данные о зависимости влияния экзогенного кинетина от генотипа, фазы развития растений, от его концентрации, степени очистки ферментных препаратов необходимы для решения ряда теоретических и прикладных задач физиологии и биохимии продукционного процесса растений, при разработке тестов в биотехнологической и селекционной работе для оценки продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений.

Совокупность полученных результатов экспериментальных исследований имеют важное значение для развития теории ферментативного катализа.

**Практическая ценность исследования.** Результаты проведенных экспериментальных исследований имеют важное значение для фитотехники при разработке методов обработки растений экзогенными цитокининами или их аналогами в те фазы развития растений, когда им недостаточно содержания собственных эндогенных фитогормонов, вследствие чего они становятся стресс-чувствительными или стресс - неустойчивыми при неблагоприятных экологических факторах (засуха, засоленность, затопление и т.д ). Также это важно для биотехнологических и селекционных работ по созданию растений с направленными изменениями систем гормональной регуляции и хорошей защитной реакцией, для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции цитокининами функционирования фотосинтетического аппарата высших растений.

Листья хлопчатника для сохранения завязей и получения высоких урожаев необходимо обрабатывать раствором кинетина в фазе цветения растений.

Полученные данные можно рекомендовать для чтения лекций по общим курсам биохимии, физиологии и биотехнологии растений, спецкурсов по фотосинтезу, фитогормонам, энзимологии на биологических факультетах ВУЗ-ов, а также использовать при проведении различных лабораторных практикумов, выполнении дипломных, магистерских и диссертационных работ.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Функционирование мультиферментных комплексов цикла Кальвина зависит от вида растений, т.е. видоспецифично – это обусловлено различным характером кинетического поведения ферментов в мультиферментном комплексе. Кинетическое поведение ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев

арабидопсиса значительно отличается от поведения ферментов мультиферментного комплекса листьев хлопчатника. Для мультиферментного комплекса листьев хлопчатника характерны более сложные и быстрые положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов, в результате этого за более короткое время достигаются более высокие каталитические активности, значительно превышающие максимальные скорости реакций мультиферментного комплекса листьев арабидопсиса;

2. Влияние экзогенного *in vitro* кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев арабидопсиса и хлопчатника зависит от его концентрации в реакционной среде и возраста растений, что обусловлено, по-видимому, различным содержанием эндогенных цитокининов в разные фазы развития растений. Наиболее чувствительной к добавлению кинетина оказалась фаза цветения растений;

3. В последовательности реакций, катализируемых тремя ферментами мультиферментного комплекса цикла Кальвина – рибозофосфатизомеразой –  $E_1$ , фосфорibuлокиназой –  $E_2$  и рибулозобисфосфаткарбокxилазой/ окxигеназой –  $E_3$ , кинетин выполняет роль аллостерического эффекторов для всех трёх ферментов. Вызванные рибозо-5-фосфатом положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц рибозофосфатизомеразы усиливаются кинетином и передаются на фосфорibuлокиназу и рибулозобисфосфаткарбокxилазу/окxигеназу. Результатом этих взаимодействий между активными центрами ферментов является значительное возрастание каждой ферментативной активности мультиферментного комплекса.

**Личный вклад соискателя.** Личный вклад соискателя заключался в разработке цели и задач исследования, подборе объектов



исследования, постановке и выполнении экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, написание статей, монгорафии, научных докладов.

**Апробация диссертации и информация об использовании результатов исследования.** Результаты проведённых исследований были доложены на ежегодных апрельских научно–практических конференциях профессорско-преподавательского состава Таджикского национального университета (Душанбе 2013-2021), материалах научной конференции, посвященной 60-летию образования Академии наук РТ «Физиология растений и проблемы развития растениеводства в Таджикистане» (Душанбе, 2011); на 5-той международной конференции «Экологические проблемы и рациональное использование природных ресурсов» (Душанбе 2012); «Экологические особенности биологического разнообразия» (Худжанд, 2013), материалах Республиканской конференции «Достижения современной биохимии: теоретические и прикладные аспекты» (Душанбе, 2016), материалах республиканской научно-теоретической конференции кафедры ботаники ТНУ «Проблемы таксономии растительности Таджикистана» (Душанбе, 2017), материалах республиканской конференции «Достижения современной биологии в Таджикистане» (Душанбе, 2017), республиканской научно-теоретической конференции «Влияние глобального изменения климата на продуктивность агроэкологических систем в Республике Таджикистан», посвященной Международному десятилетию «Вода для устойчивого развития на 2018-2028 гг.», конференции, посвященной 70-летию Таджикского Государственного национального университета (Душанбе, 2018), материалы VIII-ой международной конференции «Экологические особенности биологического разнообразия» (Таджикистан, г.Худжанд, 3- 4 октября 2019 г.), республиканской

конференции «Достижения современной биохимии в Таджикистане» (Душанбе, 2020), материалы международной научной конференции «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» (Душанбе, 2022), Международной научной конференции «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» Душанбе 2022.

**Опубликование результатов диссертации.** По теме диссертации опубликовано 28 работ, 14 из них входят в перечень ВАК при Президенте Республики Таджикистан, а также опубликована одна монография и одна методическая разработка. Получено 1- авторских свидетельства, два внедрения

**Структура и объем диссертации.** Диссертация написана на русском языке, на 220 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 6 глав заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающей в себя 171 источника, приложения, содержит 14 таблиц и 52 рисунка.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СВОЙСТВАХ И МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ФИТОГОРМОНОВ, О МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

### 1.1. История открытия фитогормонов

**Фитогормоны** – это органические вещества небольшого молекулярного веса – от 26 до 346 Да, образуемые в малых количествах в одних частях растений и действующие на другие их части, запуская и регулируя целые физиологические и морфогенетические программы. Таким образом, они играют решающую роль в регуляции роста, развития, воспроизводства растений и их защитных реакций.

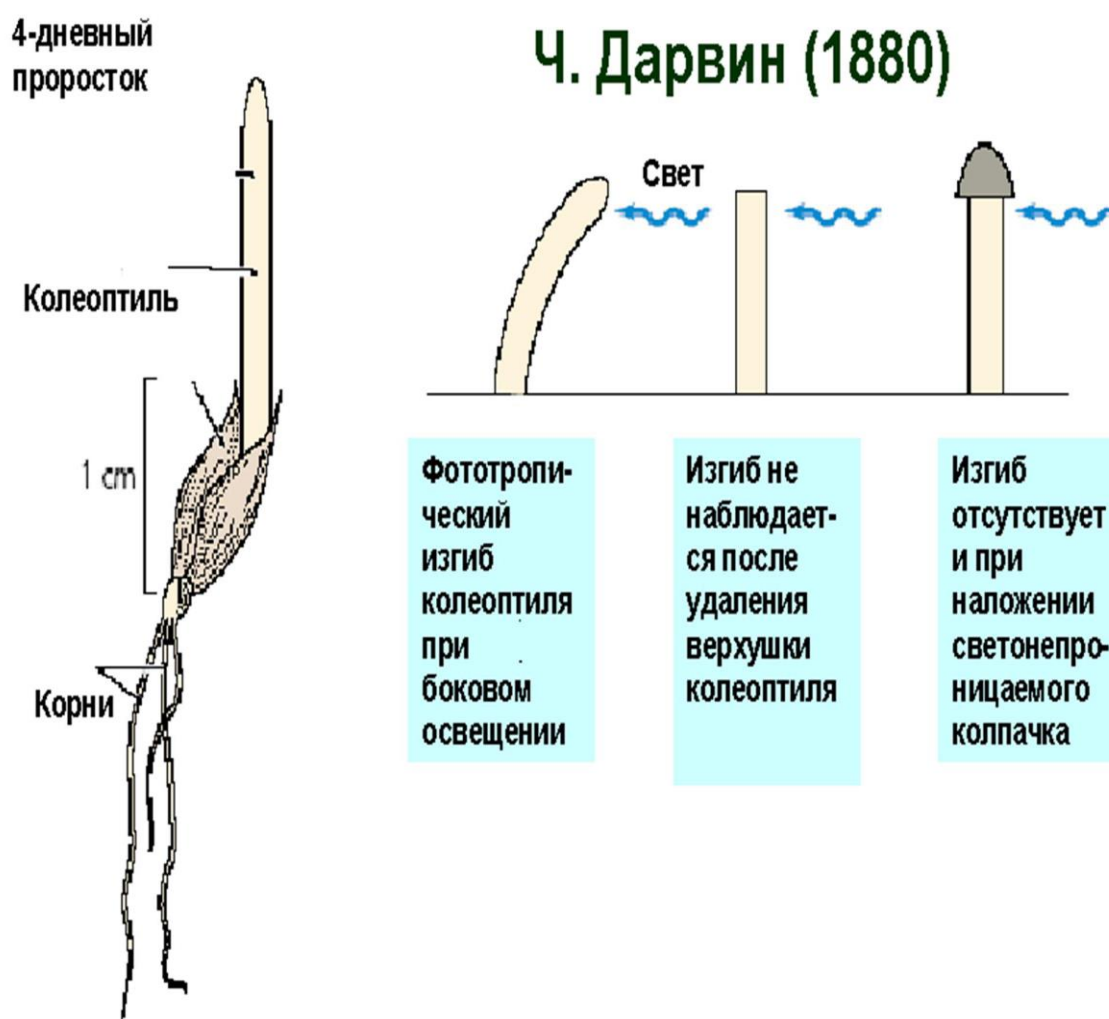
Термин «гормоны» (греч. hormone – побуждающий, вызывающий) был предложен в 1905 г У.М.Бейлиссом и Э.Г.Старлингом. Но открытие фитогормонов принадлежит Чарльзу Дарвину.

Ч. Дарвин в своей книге «О способности растений к движению», изданной в 1880 году, описал опыты по фототропизму растений, изучая изгибание проростков злаков по направлению к свету [65]. Им было обнаружено, что свет воспринимается только самой верхушкой coleoptilya, а изгиб происходит в нижележащей зоне, которая сама по себе нечувствительна к свету. Ч.Дарвин предположил, что какой-то химический сигнал (вещество) перемещается из верхушки coleoptilya до эффекторной (восприимчивой) зоны, вызывая в ней характерный изгиб (рис.1).

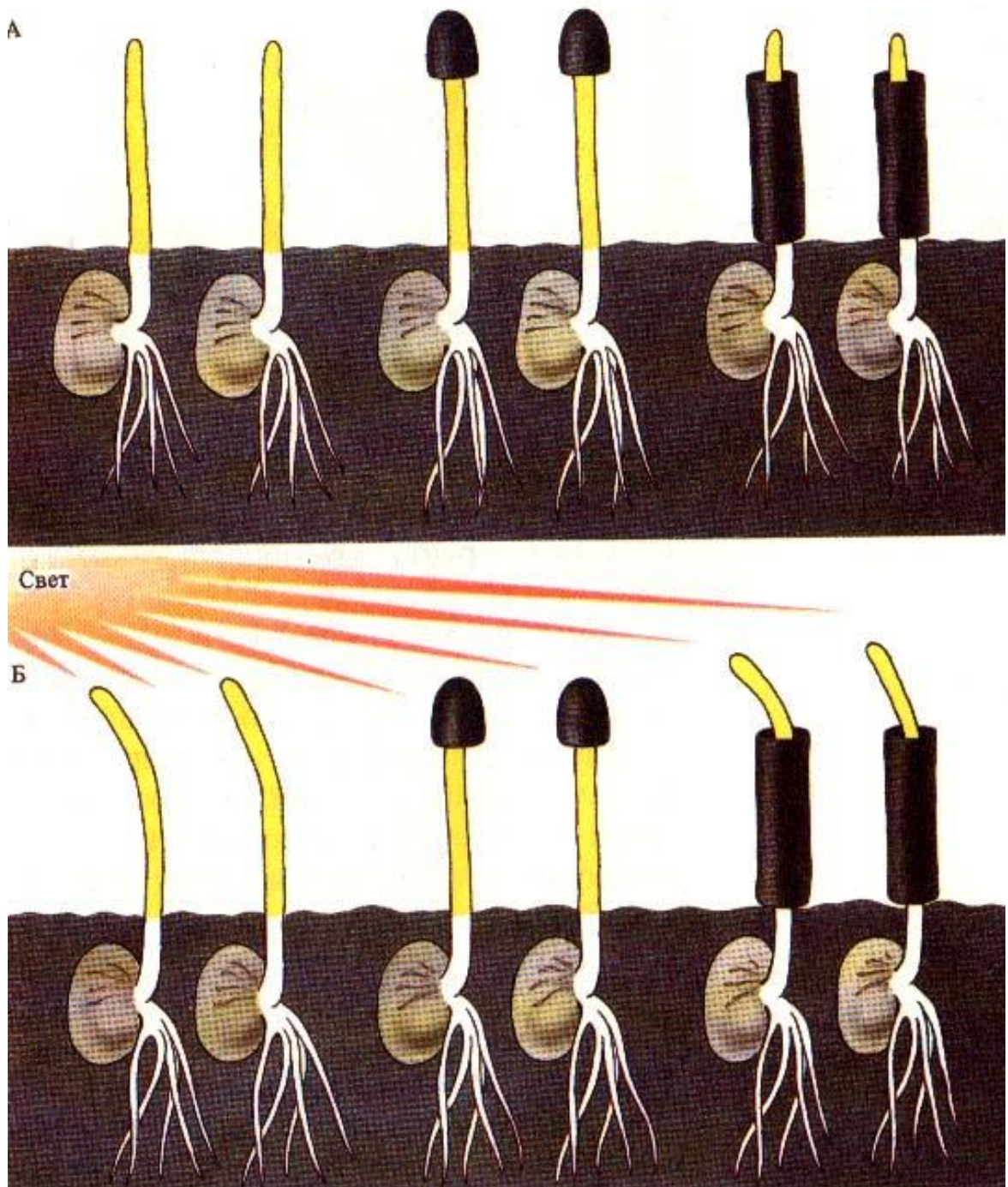
Эти опыты Ч.Дарвин повторил и с этиолированными проростками канареечной травы (рис. 2).

Природа (структура) этого химического стимула (ростового вещества) была установлена только в начале 20-го века исследованиями многих ученых. Ф.Вент (1926), Н.Г.Холодный (1966) выделил вещество, накладывая отрезанные верхушки coleoptilya на агаровую пластинку.

Вещество, диффундировавшее в агар, при наложении агар-агаровых кубиков на срез декапитированного coleoptilia вызывало его рост (рис.3.). Это вещество было в 1931-1934гг. Ф.Кеглем с сотр., и Тимяном идентифицировано как индолилуксусная кислота (ИУК). Так был открыт класс фитогормонов «ауксины» (от греч. αυξανο - расту).



**Рисунок 1. Опыты Ч.Дарвина с coleoptелями злаков (1880 г.).**

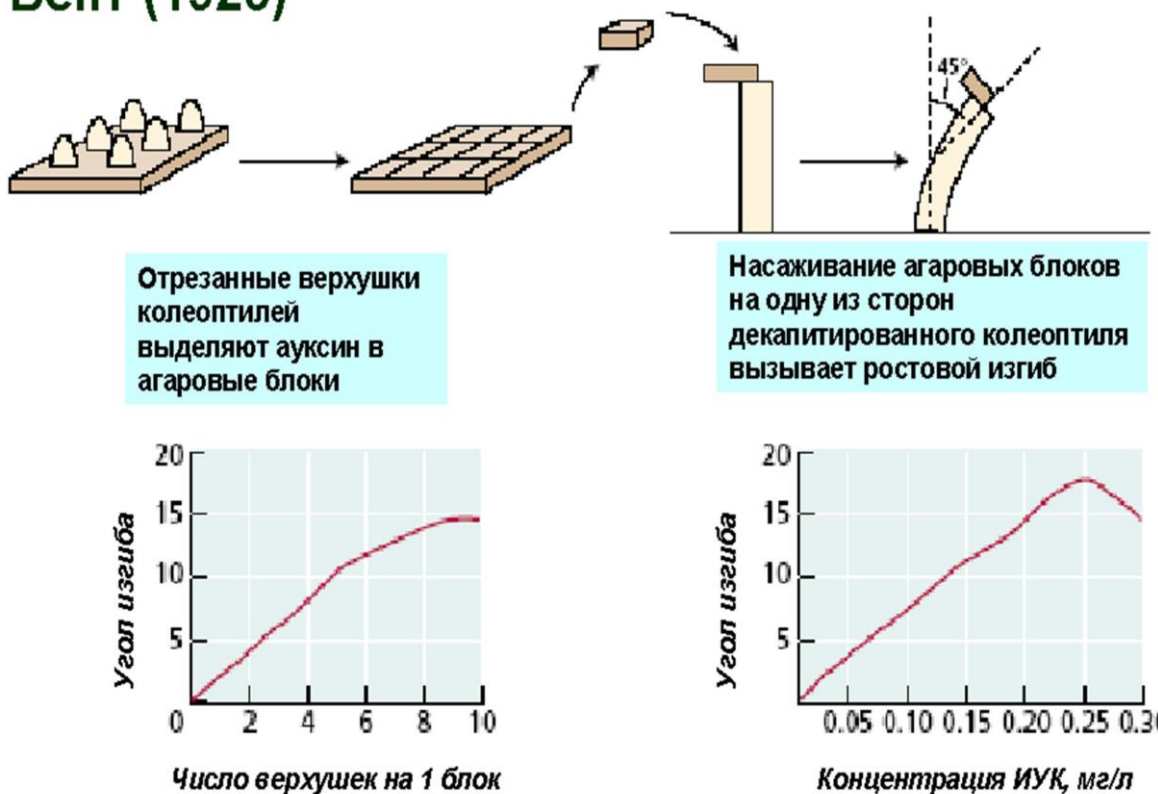


**Рисунок 2. Опыты Ч.Дарвина с этиолированными проростками канареечной травы (1880 г.).**

А. исходные проростки с светонепроницаемыми колеоптелями или цилиндрами

Б. проростки после одностороннего освещения

## Вент (1926)



**Рисунок 3. Выделение Вентом из верхушек колеоптелей злаков на агаровые пластинки «ростового» вещества (Вент, 1926).**

Д. Нелюбову в 1901 году удалось понять, что появление этилена в гороховых проростках обуславливает масштабную реакцию со стороны стебля. Она проявляется сразу в трех аспектах: во-первых, отмечается ингибирование растяжения, во-вторых, стебель становится более толстым, в-третьих, начинает произрастать в горизонтальном направлении. Генерация этилена производится в разных частях горохового растения: это не только стебель, но и корни, листья, а также семена. Существование этилена является научно доказанным у каждого без исключения растения, отнесенного к высшим. Кроме того, определенные грибы и бактерии также демонстрируют способность к генерации этилена. Меньшей способностью к созданию этилена обладают ткани, которые находятся на начальных или

конечных стадиях онтогенеза. Кроме того, в малых количествах этилен генерируется такими тканями, которые легко подвергаются растяжению, делению. К факторам, которые обуславливают увеличение количества производимого этилена, относятся: появление у растения физических дефектов; дефицит жидкости, используемой для питания; существование растения в условиях пониженных либо повышенных температур окружающего воздуха; воздействие со стороны источника УФ-излучения [27,65 ] .

Исследования, которые были предприняты в середине 1920-х годов ученым из Японии Е. Куросавой, позволили определить, что в культуральной жидкости, имеющейся в грибе вида *Giberella fujikuzoi*, имеется вещество, существование которого обуславливает значительный рост стебля в высоту.

Первым, кому удалось выделить данное вещество в чистом виде, стал другой ученый из Японии, Т. Ябута (в своих исследованиях он пользовался рисовыми ростками). Данное химическое соединение стало называется гибберелином.

В середине 1950-х годов исследования, предпринятые английским специалистом Б. Кроссом, позволили определить, какой структурой характеризуется гибберелевая кислота.

Химические соединения, при попадании которых в растение его клетки начинают делиться с повышенной скоростью, стали называться цитокининами. Ф. Кук стал первым ученым, кому удалось получить в чистом виде вещество, которое представляет собой интенсифицирующий фактор для внешнего деления. Исследователь посчитал, что данное соединение необходимо именовать кинетином.

В 1961 г В.Лью и Х.Карне из зрелых коробочек хлопчатника выделили в кристаллическом виде вещество, ускоряющее опадение

листьев и назвали его абсцизином (от англ. abscission – отделение, опадение) или АБК. Открытием АБК завершилось длительное исследование природных фитогормонов [65].

## **1.2. Классификация фитогормонов и их общие свойства**

Обязательным условием существования растения, его развития является согласованное функционирование всех его клеток. Это, в свою очередь, невозможно без налаженного информационного обмена между ними. Таким образом, каждая клетка может выступать как в качестве отправителя «сигнала», передаваемого иной клетке, так и быть реципиентом сигналов.

В ситуации, когда передаваемый сигнал обладает химическим происхождением, то молекулу, обладающую сигнальным назначением, необходимо считать первичным мессенджером [89].

Каждая клетка, которая входит в состав растения, способна воспринимать разнообразные сигналы и менять свое функционирование в зависимости от полученной информации. Очень большую роль имеют гормоны растений, которые представляют собой важнейшую часть первичных мессенджеров [89].

В предыдущие десятилетия активно использовалась классификация, в соответствии с которой все гормоны подразделялись на ингибиторы и стимуляторы. Однако сегодня потребности в применении такой классификации нет, поскольку последние исследования установили: один и тот же гормон способен являться как ингибитором, так и стимулятором. Из этого можно сделать вывод о присущей гормонам многофункциональности: их появление оказывает стимулирующее воздействие не на какую-либо конкретную реакцию, а на их цепочку. Когда проявляется ответная реакция, гормон должен быть подвергнут деструкции либо деактивированию.



Гормоны обеспечивают управление всеми без исключения стадиями онтогенеза. В зависимости от того, на каком именно этапе развития пребывает конкретный организм, он должен обладать строго определенным объемом разных гормонов. Таким образом, в науке приобрело широкое распространение такое понятие, как «гормональный гомеостаз». Обеспечивается гормональный гомеостаз за счет управления биологическим производством гормонов, их перемещением, а также и компартиментацией.

Существует такая классификация гормонов, в соответствии с которой они делятся на экзогенные и эндогенные. Первые применяются человеком для работы с клетками растительного происхождения. Что касается вторых, то они генерируются непосредственно в растениях.

Приведем одну из наиболее современных классификация гормонов, оказывающих интенсифицирующее влияние на рост растений. [64]

<b>Регуляторы роста, обладающие природным происхождением</b>	
<b>Фитогормоны</b>	<b>Вещества, имеющие гормоноподобный характер</b>
1. ауксины	7. салициловая кислота
2. гиббереллины	8. жасминовая кислота
3. цитокинины	9. фенольные соединения
4. абсцизовая кислота	10. олигосахарины
5. этилен	11. короткие пептиды
6. брассиностероиды	12. лектины

**Каждый фитогормон обладает несколькими характеристиками.**

**Они продемонстрированы в перечне ниже:**

- эндогенный характер появления;

- незначительная масса;
- существование в небольших концентрациях (порядка  $10^{-9}$  моль/л);
- места, где происходит синтез и применение гормона, находятся на удалении друг от друга (таким образом, гормон вынужден перемещаться по растению);
- появление гормона может иметь своим следствием характерными физиологический отклик, демонстрируемый конкретными клетками;
- воздействие, оказываемое гормонами, является многофункциональным;
- появление гормона, как правило, практически не сказывается на процессе метаболизма в клетке;
- применение исключительно в сигнальных функциях.

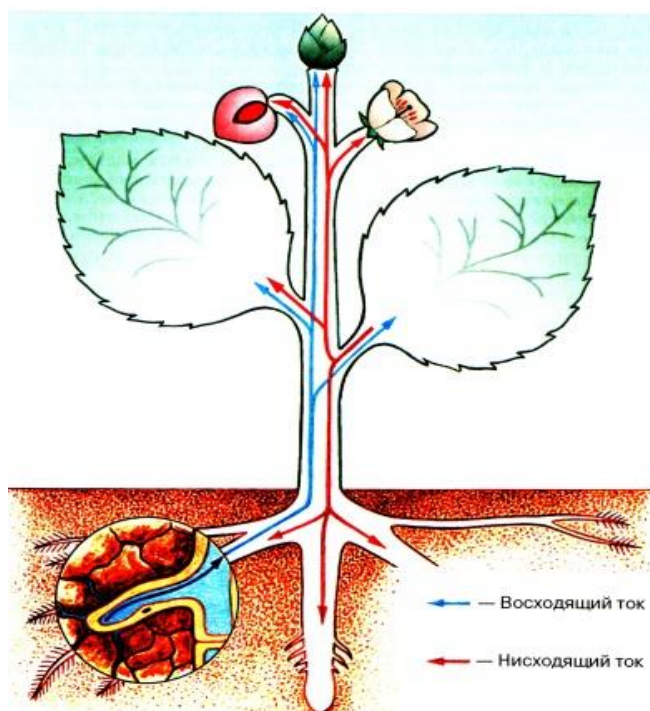
### **Ауксины**

Генерация ауксина (ИУК) является крайне малой. Так, например, при использовании десяти тысяч единиц колеоптилей овса можно генерировать ауксин в количестве 1 мкг. Таким образом, концентрация ауксина в разнообразных растениях находится в пределах 1-100 мкг/кг [30,44].

Местом создания ИУК является верхушечная меристема (а также листья, которые непосредственно прилегают к ней). Кроме того, ИУК способен генерироваться в зародышах, семядолях. После того, как ИУК создается, он начинает перемещаться по растению полярным образом (это значит, что в одном из направлений он двигается с большей скоростью, чем в ином). Из верхней части растения, где ИУК создается, он начинает передвигаться вниз, используя для этого трубки ситовидного типа (рисунок 4).

Когда ИУК завершает свое действие, он подвергается деструкции, что обеспечивается ИУК-оксидазой. Таким образом, концентрация ИУК в тканях растения время от времени меняется. Варьируется и активность

ИУК: максимальной она становится после того, как вещество достигает корня (что касается ИУК, располагающегося в стебле, то здесь активность становится минимальной). Активация рассматриваемого фермента производится в условиях активного освещения. Что касается ИУК-оксидазы, то она демонстрирует большую активность в тканях, находящихся на поздних стадиях онтогенеза (вследствие этого в таких тканях фиксируются пониженные концентрации ИУК).



**Рисунок 4. Местонахождение ауксинов в растении. Концентрация ауксинов является максимальной в верхней части растения, минимальной – в его нижних частях (Полевой, 1989)**

ИУК способен становиться неактивным, если начинает генерировать комплексы с различными соединениями (как правило, это аминокислоты, а также сахара). Однако когда подобного рода комплексы подвергаются деструкции, то ИУК быстро приходит в ту же активность, что была раньше. Благодаря появлению комплексов, включающих в свой состав

ИУК и сахара, аминокислоты. Обеспечивается накопление данного гормона организмом.

Фактором, который оказывает разрушающее воздействие на ИУК, является УФ-излучение (деструктирующее влияние становится максимальным при достижении длины волны в 280 нм).

На рисунке 5 показана краткая информация о физиологическом влиянии, которое обеспечивается ауксинами [44,65,69,89].

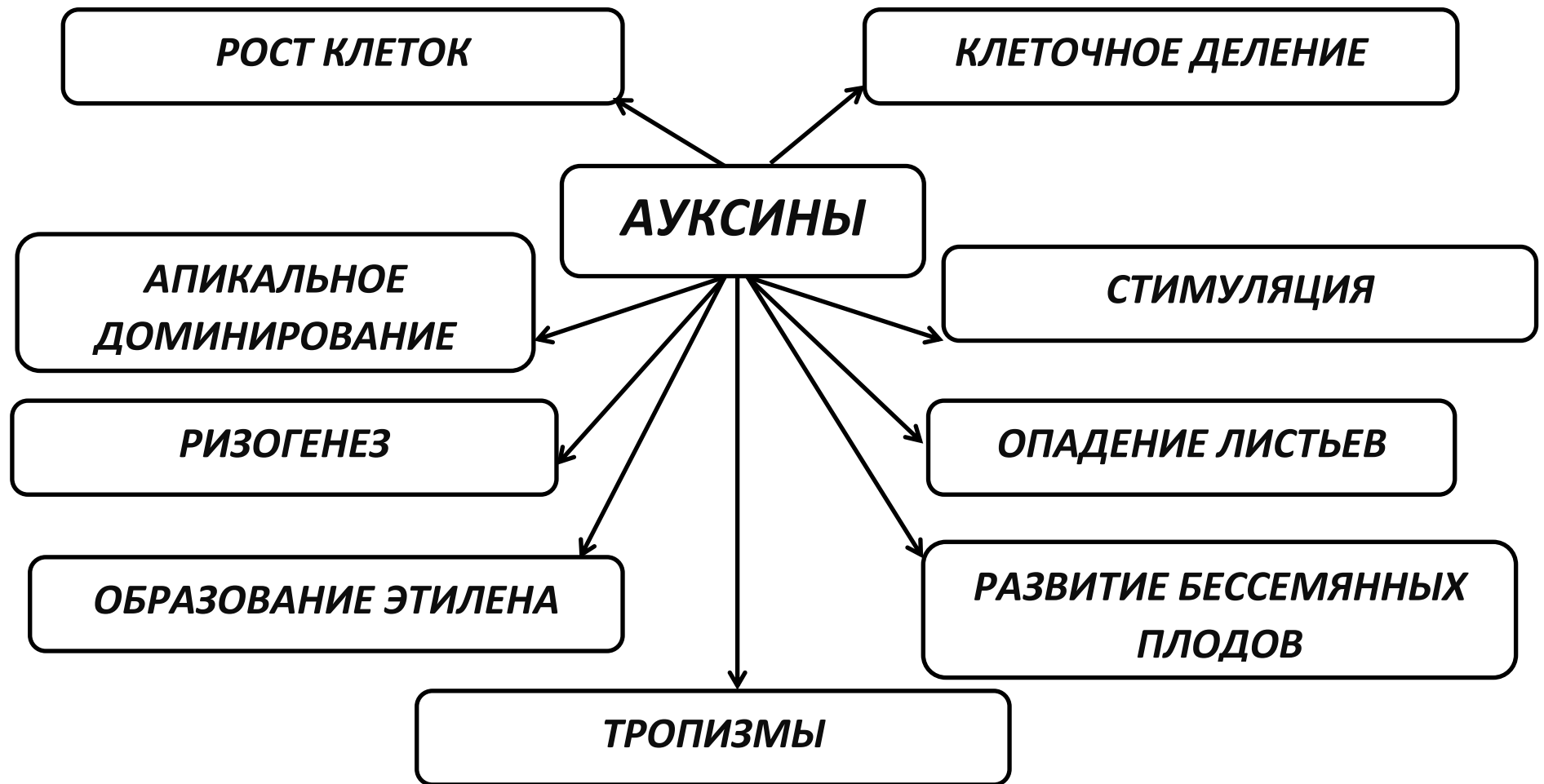


Рисунок 5. Физиологические воздействия, оказываемые ауксинами

## Гиббереллины

Является доказанным тот факт, что гибберелины имеются во всех без исключения частях растений. При этом процесс перемещения таких веществ нельзя характеризовать как полярный. Они перемещаются как от верхней части растения в нижнюю, так и наоборот, используя для этого трубки ситовидного типа. Скорость, с которой осуществляется их отток, идентична темпам перемещения веществ, генерируемых посредством фотосинтеза.

Современная наука располагает сведениями о более чем ста типах гибберелинов. При этом девяносто из них было обнаружено исключительно у грибов. Что касается высших растений, то они характеризуются наличием двух десятков типов гибберелинов. Для каждого из них предусматривается собственное уникальное обозначение: ГК<sub>1</sub>, ГК<sub>2</sub>, ГК<sub>3</sub> и т.д. Чаще всего в растениях, относящихся к высшим, встречается такой гибберелин, как ГК<sub>6</sub> (или, иными словами, гиббереловая кислота, имеющая формулу C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>).

Краткая информация о том, каким физиологическим воздействием на растения обладают гибберелины, продемонстрирована на рисунке 6 [44,65, 89].



**Рисунок 6. Физиологические эффекты гиббереллинов**

**Абсцизовая кислота представляет собой сигнал о том, что растение столкнулось с водным стрессом (иными словами, с недостатком или избытком питательной жидкости)**

Генерация абсцизовой кислоты становится большей, чем обычно, когда состояние растения отличается от нормального, а именно при следующих условиях:

- при засухе;
- при чрезмерном количестве воды, содержащемся в клетке;
- при охлаждении

Под действием этих факторов в клетке повышается концентрация следующих осмотических активных веществ:

- Оксипролина, сахарозы, осмолитов
- Полиаминов (спермидин, путресцин).

Абсцизовая кислота синтезируется в основном в листьях, накапливается преимущественно в хлоропластах [44,65, 89].

**Физиологические эффекты абсцизовой кислоты:**

- АБК тормозит процессы роста;
- Репрограммирует ростовые процессы (антагонист ауксина, цитокинина, гиббереллинов);
- Обеспечивает покой семян, задерживает прорастание семян, влияет на переход в покоящееся состояние семян, почек, клубней;
- Индуктор синтеза запасных белков семян;
- Индуктор клубнеобразования;
- Индуктор синтеза осмолитов при обезвоживании;
- Индукция зимующих почек ряски;
- Вызывает закрытие устьиц;
- Подавляет дифференциацию хлоропластов;



- Приводит к снижению фотофосфорилирования и интенсивности фотосинтеза;

- Применение абсцизовой кислоты повышает устойчивость растения к разнообразным неблагоприятным явлениям (например, к обезвоживанию, превышению концентрации жидкости, ненормальным температурам окружающего воздуха, влиянию солей). Кроме того, внесение абсцизовой кислоты делает более быстрым процесс генерирования протекторных белков (которые, в свою очередь, также увеличивают имеющуюся у растения устойчивость к воздействию различного рода неблагоприятных факторов) [44,65, 89,119,124].

#### **Физиологическое влияние этилена**

Физиологическое влияние, которым обладает на растения такое вещество, как этилен, можно охарактеризовать как многоаспектное:

- Он управляет процессом появления, созревания плодов;

- Этилен способствует увеличению толщины, но уменьшению длины стебля, а также клеток, что связано с изменением ориентации микрофибрилл целлюлозы.

- Способствует образованию отдельного слоя и опадению листьев и плодов;

- Этилен делает более быстрыми процессы старения растения;

- Этилен способствовать воздействию на пол растения (как правило, его появление имеет своим следствием формирование цветков женского типа у некоторых растений, среди которых можно выделить тыкву и огурец);

- Этилен является необходимым элементом, чтобы растение осуществляло разнообразные движения (например, опускало листья) [29,66].

## Брассиностероиды

В 1970 году специалистами научной лаборатории Д. Митчелла, находящейся на территории США, удалось, используя рапсовую пыльцу, получить химическое соединение, оказывающее интенсифицирующее влияние на рост фасоли. Данное химическое соединение стало именоваться браеинолипидом. Спустя девять лет после открытия браеинолипида М. Грови удалось понять, какой химической природой он характеризуется. Концентрации данного вещества в рапсовой пыльце являются ничтожно малыми: так, при использовании пыльцы массой в 10 килограмм исследователю удалось получить только 4 мг рассматриваемого химического соединения. Как было выявлено, браеинолипиды обладают структурой, которая похожа на ту, что имеется у стероидных гормонов, имеющих у животных.

Исследования, которые были осуществлены в последующем, позволили обнаружить наличие в растениях иных соединений стероидного типа, имеющих гормональный эффект.

Таким образом, появилась необходимость в выделении отдельной группы растительных гормонов, являющихся стероидными. Они стали именоваться брассинами (в некоторых источниках также используется название «браеиностероиды»). К настоящему моменту в биологии известно порядка шести десятков видов брассинов.

Брассины являются членами класса терпеноидов. Помимо них, сюда также включаются гибберелины, фузикокины, а также абсцизовая кислота.

Брассины, как было определено различными учеными, имеются не только в пыльце растений. Зафиксированы их концентрации в галах, семенах (не добравшихся до стадии зрелости), стеблях, а также листьях.

Кроме того, осуществленные исследования позволили понять, что брассины имеются не только у цветковых, но также и у голосеменных.

Появление брассинов оказывает интенсифицирующее влияние на удлинение клеток (в этом плане они являются идентичными ауксинам). При этом воздействие, оказываемое брассинами, можно охарактеризовать как более замедленное (в сопоставлении с тем, что демонстрируется ауксинами). Оно стартует ориентировочно через полчаса после появления брассина в соответствующей части растения и продолжается на протяжении 1,5-2 часов. Необходимо отметить, что эффект, который достигается благодаря совместному использованию брассинов и ауксинов, является значительным. Так, ауксины, обладая быстрым воздействием, активируют процесс растяжения, а брассины продолжают его.

Кроме того, отмечено, что брассины способны вступать во взаимодействие и с гибберелинами. Это оказывает дополнительное стимулирующее воздействие на удлинение клеток.

Если количество брассинов, которые генерируются растением, недостаточно, то фиксируется частичная мужская стерильность. При определенных условиях она может прогрессировать до полной стерильности.

Кроме того, появление брассинов в растении приводит и к нескольким иным воздействиям. Во-первых, их наличие сказывается на том, что корни начинают продуцироваться менее активно. Также влияние брассинов сказывается на урожайности (это особенно важно в отношении сельскохозяйственных культур).

Если брассины вносятся в больших дозах, то они замедляют рост растения, делают его устойчивым к воздействию, оказываемому неблагоприятными факторами внешней среды, более значительной.

Использование препарата «Эпин», который основан на брассинах, предоставляет возможность выращивать сельскохозяйственные культуры, характеризующиеся усиленной крепостью, а также устойчивостью к разнообразным инфекциям [44,89].

### **Салициловая кислота**

Салициловая кислота впервые стала известной биологической науке более ста лет назад: в 1900 году состоялось ее выделение из вида *Salix*. Отметим, что сразу же после того, как салициловая кислота была сгенерирована в чистом виде, начались активные исследования ее возможного применения в медицине. Результатом стало открытие ацетилсалициловой кислоты, более известной как аспирин.

Однако на этом научные разработки, посвященные выявлению методов полезного применения салицилатов, не остановились. Спустя 80 лет после открытия салициловой кислоты был определен потенциал использования салицилатов в сельском хозяйстве. Сведения о его наличии были получены благодаря исследованиям термогенеза, протекающего в растениях, произрастающих в субтропических регионах.

Процесс термогенеза стартует в середине ночи (его суммарная длительность составляет 7 часов, поэтому заканчивается он в конце утреннего времени). Початок отличается по температуре от той, что создается в окружающей среде, более чем на 10 градусов Цельсия. Вследствие этого происходит испарение химических соединений, обладающих запахом, схожим с ароматами, источаемым подвергнутым гниению мясом. Вследствие этого у растений появляются насекомые, способные их опылить. Они используют покрывало, чтобы попасть в нижнюю камеру. Однако впоследствии они не могут выбраться обратно, поскольку сталкиваются с щетинками. Вследствие этого насекомые оказываются вынужденными оказаться заточенными в пределах нижней

камеры на одни сутки. В вечернее время фиксируется повышение температуры нижней составляющей початка (он начинается становится более теплым, чем окружающая среда, причем температурная разница составляет до 10 градусов Цельсия). Вследствие этого происходит раскрытие пылинок, а насекомые начинают осыпаться пылью. Что касается щетинок, то они к вечеру обезвоживаются и начинают занимать меньше места, тем самым теряя возможность препятствовать вылету насекомых. Это значит, что опылители приобретают возможность покинуть территорию нижней камеры, которой сразу же и пользуются.

Временем, в течение которого происходит аккумуляция салициловой кислоты, является послеобеденное (оно начинается ориентировочно в 12 часов, а завершается в 17 часов). За этот промежуток количество салициловой кислоты, которая находится в верхнем придатке, повышается более чем в одну сотню раз. Что касается ночного времени, то на его протяжении количество салицилата, находящегося внизу початка, становится большим, чем до этого. Однако после завершения процесса термогенеза концентрации салицилата возвращаются к нормативным.

Салициловая кислота повышает иммунитет растений к патогенам, например, у табака повышает устойчивость к вирусу табачной мозаики.

Салициловая кислота поддерживает структуру хлоропластов, защищает от окислительного стресса, участвует в регуляции закрывания устьиц [89].

### **Жасминовая кислота**

Датой первого выделения жасминовой кислоты признается 1962 год. Именно в это время удалось получить ее в чистом виде, используя для этого эфирное масло, сгенерированное крупноцветковым жасмином.

Воздействие жасминовой кислоты, а также жасмонатов (веществ, являющихся производными от нее) является многофакторным. Во-первых, они способны ингибировать процесс увеличения размеров проростков. Во-вторых, они негативно сказываются на росте пыльцевых трубок. В-третьих, существование жасминовой кислоты имеет своим следствием закрывание устьиц. Наконец, жасминовая кислота способствует тому, чтобы у растения активно появлялись клубни и луковицы (если их формирование предусмотрено процессом развития конкретного растения).

Из всего того, что было сказано выше, следует: жасмонаты демонстрируют активное участие в разнообразных процессах. Ими, в частности, являются:

1. Уменьшение темпов вегетативного роста растений.
2. Увеличение качества иммунного ответа, демонстрируемого растением.

Когда жасмонат появляется в растении на стадии зародыша, то он интенсифицирует появление в нем белков, относящихся к завершающим стадиям эмбрионального развития (это Lea-белки).

Кроме того, внесение жасмонатов предоставляет возможность запустить физиологическую реакцию, в результате которой в растении накапливаются «запасные» белки вегетативного типа. Кроме того, их появление способствует синтезу белков, характерных для водного дефицита. Появление белков водного дефицита приводит к ослаблению флоемного тока и закрыванию устьиц.

Если жасминовая кислота подвергается такой процедуре, как этерификация, то она становится более летучей. В научной среде распространено предположение, в соответствии с которым метилжасминат, проходя по воздуху, предоставляет растению «информацию» о том, что имеются патогены, готовые «напасть» на него.

Таким образом, появление метилжасмината предоставляет растению возможность «подготовиться» к «атаке» со стороны инфекций, защититься от их негативного влияния [44,89].

### **Фенольные вещества**

Наличие фенольных веществ в растениях является значительно большим, чем гормонов (разница в концентрации достигает двух-трех порядков). Еще одним отличием между рассматриваемыми химическими соединениями является то, что фенольные вещества не могут перемещаться из одной части растения в другую, постоянно оставаясь там, где произошел их синтез.

В качестве фенольных веществ, которые чаще иных встречаются в растениях, можно выделять разнообразные кислоты (к примеру, кумаровую, кофейную, ванилиновую), а также кумарин.

Фенольные вещества обладают ингибирующим воздействием на ткани. При повышении их концентрации рост становится более медленным. Однако данный результат носит временный характер: как только фенольные вещества удаляются из частей растения, то клетки сразу же становятся способными демонстрировать такие же темпы роста, что и ранее.

Отметим, что по мере перехода онтогенеза к более поздним стадиям количество фенольных веществ, содержащихся в растении, становится большим.

Ингибиторы, которые обладают природным происхождением, оказывают негативное влияние на процесс растяжения клеток. Кроме того, они не позволяют формироваться корням, появляться и произрастать семенам. Что касается определенных видов ингибиторов, то они (помимо всего того, что было сказано выше) также не позволяют надлежащим образом осуществляться фосфорилированию. Фактором, вследствие

которого рост становится более медленным, является снижение концентраций АТФ в клетке.

Фенольные соединения, имеющиеся в растениях, а также ауксины обладают общим «прародителем». Им является гликолевая кислота. Таким образом, если в растении быстро образуются новые фенольные ингибиторы, то ауксины появляться не могут (или генерируются в крайне малых количествах). Если же ауксины находятся в растении в оптимальном количестве, то активность фенольных ингибиторов, как правило, становится более значительной.

Обратим внимание еще и на то, что вследствие наличия в растении фенольных веществ происходит негативное воздействие на процесс синтеза цитокининов, гибберелинов.

Что касается конкретно кумарина, то он не позволяет должным образом функционировать механизмам нижнего и верхнего тока. Кроме того, кумарин делает скорость генерации пасоки более низкой, оказывает уменьшающее воздействие на интенсивность транспирационных процессов [44].

### **Олигосахарины**

Олигосахариды, которые принимают участие в управлении процессами физиологического характера, имеющихся у растений, имеют название «олигосахарины».

Их появление обеспечивается распадом клеточной стенки. К такому распаду приводит как воздействие собственных ферментов растения, так и ферментов, имеющихся у бактерий, грибов.

Наличием олигосахаридов обеспечивается управление процессом генерации плодов (оно происходит благодаря деструкции гликанов, относящихся к клеточной стенке).



Существуют также и специфические олигосахарины, которые представляют собой сигналы, необходимые для идентификации симбионтов, существующих в рамках системы *Rhizobium* – растение – хозяин. Что касается бобовых растений, то генерация клубеньков становится невозможной, если не имеется надлежащего обмена олигосахаридами [89].

### **Короткие пептиды**

Исследования, которые были осуществлены в 1991 году, позволили получить первый известный в науке короткий гормон, в состав которого было включено 18 типов аминокислот. Было определено, что белок, представляющий собой «прародителя» для данного гормона, содержит в 10 раз больше аминокислот (порядка 200 единиц).

Вследствие того, что данный белок имел ответственность за демонстрацию системного ответа, генерируемого при появлении дефектов механического характера, он стал именоваться системинем. Процесс биологического синтеза данного белка управляется ранее рассмотренным жасмонатом. При более подробных научных исследованиях, которые осуществлялись в отношении томатов, было обнаружено, что они имеют в своем составе белок-рецептор, вступающий в связь с системинем.

Научные разработки, которые были проведены впоследствии, позволили также определить, что системин имеется в арабидопсисе, перце, картофеле и множестве иных сельскохозяйственных культур. Молекулы системина из растений разных видов различаются по строению, но функционируют одинаково. Системин проявляет биологическую активность в концентрации  $10^{-5}$ М.

В отличие от иных гормонов, системин никак не сказывается на процессе роста растений. Суть его воздействия заключается в активации

тех систем растений, которые обеспечивают его защиту от недугов, заболеваний и прочих негативных факторов.

Научные разработки, объектом которых являлся аспарегус, предоставили возможность получить пептид, являющийся максимально коротким (он состоит только из четырех аминокислот). Он характеризуется наличием фитосульфокина. Данное вещество оказывает интенсифицирующее воздействие на генерацию клеток, делая тем самым процесс митоза более быстрым. Концентрации фитосульфокина были обнаружены в тех местах, где процесс генерации клеток характеризуется наибольшей скоростью.

Исследования, которые были осуществлены на протяжении последнего десятилетия, позволили получить гормональный пептид, сформированный более чем пятью десятками аминокислот. Поскольку при его появлении среда становится более щелочной, то он стал именоваться фактором подщелачивания.

А исследования, объектом которых выступал арабидопсис, позволили получить пептид, именующийся как CLAVATA 3. В его состав включено 78 аминокислот. Зоной его создания является центральная меристема. Благодаря наличию пептида CLAVATA 3 обеспечивается управление величиной апиакальной меристемы, наличием которой характеризуется побег изучаемого растения. Оценивая динамику Clavata 3, можно приобрести понимание о том, насколько интенсивным является процесс генерирования клеток в пределах центральной меристемы. Если концентрации рассматриваемого пептида являются высокими, то это значит, что процесс генерации клеток интенсивный [44,89].

### **1.3. Цитокинины. Воздействие цитокининов на процессы физико-химического характера в растениях**

#### **1.3.1. История научного исследования цитокининов**

Научные разработки, которые имели результат в виде приобретения знания о цитокининах (а также их выделения), были предприняты в рамках реализации попыток по нахождению факторов, интенсифицирующих процесс деления конкретных растительных клеток. Суть одной из таких попыток, которая стартовала в 1940-е годы, заключалась в использовании яйцеклетки, которая еще не была оплодотворена, ее помещении в заранее обеспеченные условия для получения зародышей гаплоидного типа. Однако эта разработка не увенчалась успехом. Тем не менее, в результате данного исследования было определено, что оказать интенсифицирующее воздействие на рост зародышей, которые находятся в молодом возрасте, можно через использование кокосового ореха, вносимого в молоко. Вследствие того, что никакие из известных к тому моменту времени сочетания не позволяли и близко подойти к полученному результату, было определено следующее: в молоке, создаваемому из кокоса, имеется соединение, позволяющее обеспечивать такой результат. Таким образом, несколькими исследователями были осуществлены попытки получить данный фактор в чистом виде.

Первыми специалистами, кому удалось получить цитокинины в чистом виде, стали сотрудники научной лаборатории, относящейся к университету Висконсина. Ими была предпринята попытка интенсифицировать деление табачных клеток, которые находились в сердцевине данного растения. Такие клетки, которые находятся в пределах интактных растений, способны становиться большими, но при этом не подвергаются делению. Но как было выявлено в результате научных разработок, после того, как такие клетки оказываются в среде, где имеется молоко кокоса и ауксины, стартует процесс деления табачных клеток. Скуг вместе с членами своей лаборатории оценивали влияние разных веществ, в

результате чего ими было определено, что наилучшее влияние на деление клеток обеспечивается сочетанием ауксина и аденина.

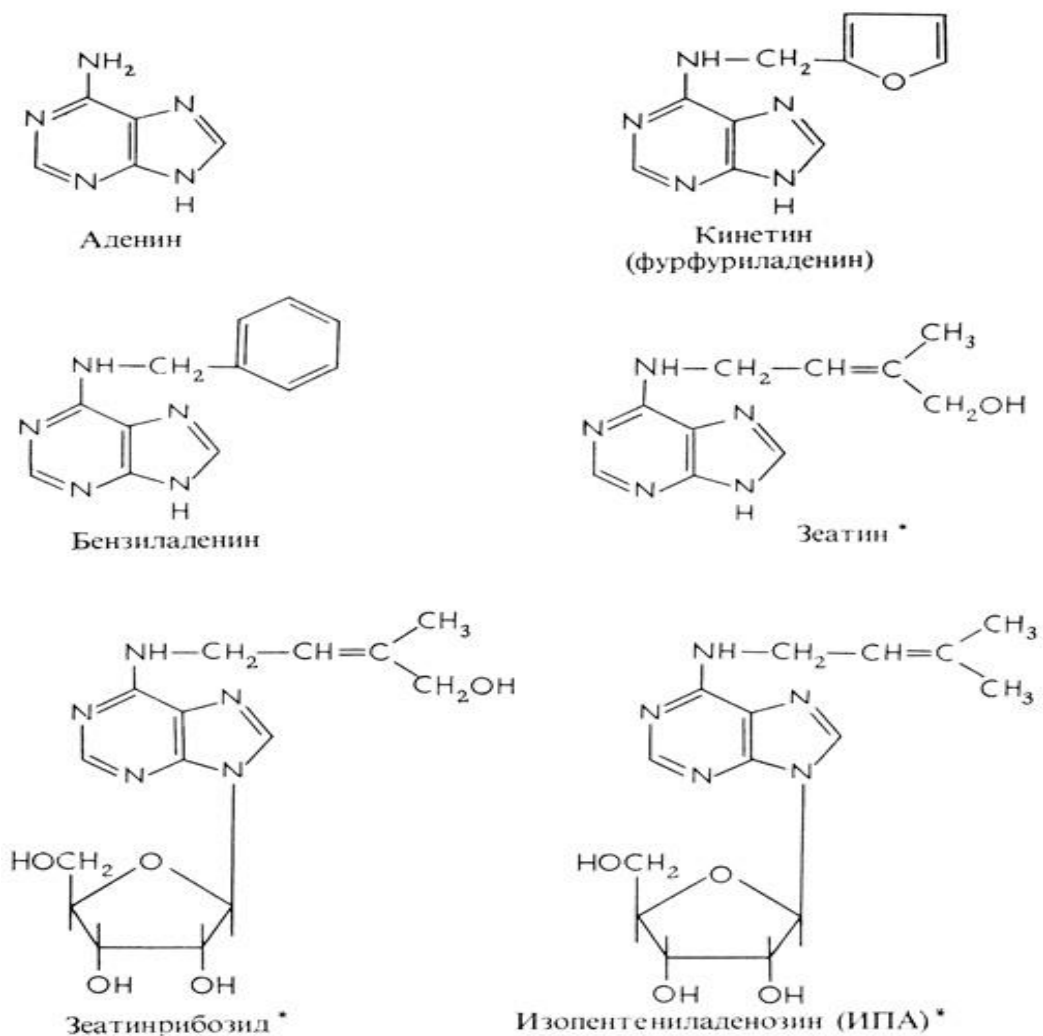
Стоит обратить внимание на тот факт, что открытие цитокининов вовсе не являлось конечной целью описанного в предыдущем абзаце эксперимента. Однако этот результат все равно был достигнут, что примечательно, благодаря допущенной ошибке. В соответствии с разработанной методикой, флаконы, которые содержали в себе ДНК, полученную из сперматозоидного материала сельди, должны были находиться в автоклаве на протяжении некоторого времени, в течение которого подвергались нагреву до уровня в 100 градусвв Цельсия. Однако вследствие случайной ошибки был задан иной режим работы автоклава, и флаконы, содержащие в себе ДНК, перегрелись. Таким образом, табачная паренхима стала расти гораздо более интенсивно, чем когда-либо ранее.

В 1955 году было сделано научное открытие, определившее, что в препарате ДНК, разогретом до высоких температур, имеется химическое соединение, оказывающее интенсифицирующее воздействие на процесс генерации клеток. Данное соединение стало именоваться 6 фульфуриладенином (кинетином) [125,126,127].

Когда кинетин стал детально изучен с точки зрения собственного строения, у исследователей появилась возможность начать поиски иных веществ, обладающих таким же воздействием. Как было выявлено, злаковые зерна, которые находятся на начальных стадиях развития, а также плоды, не добравшиеся до стадии зрелости, являются крайне богатыми с точки зрения наличия веществ, оказывающих интенсифицирующее воздействие на процесс клеточного деления.

Д. Летаму в 1963 году (Letham, 1963) покорилась генерация зеатина (рисунок 7) – вещества, структура которого являлась похожей на кинетин. Осуществленные впоследствии исследования позволили определить, что

зеатин (а также соединения, являющиеся родственными для него, имеются абсолютно в каждом растении). По результатам научного обсуждения было определено, что подобные вещества необходимо именовать цитокининами. Как правило, они являются связанными с фосфатом, рибозой. Кроме того, было выявлено, что та активность, которая была продемонстрирована полученным из кокоса молоком, обуславливается наличием в нем сразу нескольких веществ. Что касается именно цитокининов, то в кокосовом молоке был обнаружен зеатин-рибозид [59,80, 89, 111, 116,148,152].



**Рисунок 7. Структурные формулы разнообразных цитокининов (Физиология растений под редакцией Ермакова, 2007)**

Сегодня является доказанным наличием цитокининов в большом количестве тканей, обладающих растительным происхождением. Это не только, например, верхушки корневых систем, но также и шейки корней.

Цитокинины, которые, как уже было упомянуто ранее, появляются в корнях, начинают перемещаться по растению с использованием его сосудов. В результате данного процесса они оказываются в листьях, а также иных органах растения. Как было выявлено в результате лабораторных испытаний, в 10 мл пасоки, полученной из виноградной лозы, имеется порядка 1 мкг разнообразных цитокининов. Отметим также, что генерация цитокининов является возможной в корнях листьев, почках, клубнях и семенах, находящихся на стадии прорастания. Таким образом, можно сформулировать, что процесс генерирования цитокининов локализуется в разных частях растения в зависимости от того, на какой именно стадии онтогенеза оно пребывает. Когда растение становится возрастным, то количество цитокининов, синтезируемых им, плавно снижается.

Цитокинины, которые являются экзогенными, не могут перемещаться из одного органа растения в другой. Вместо этого они действуют в пределах обработки листа. [97,129].

Существует несколько форм функционирования цитокининов: неактивная и активная. В качестве наиболее распространенной неактивной формы необходимо рассматривать гликозиды (т.е. химическое соединения, которые образуются в результате взаимодействия между цитокининами и глюкозой). Клетка может управлять количеством активных цитокининов, содержащихся в ней (для этого она присоединяет сахара либо удаляет их). Кроме того, фермент цитокининоксидаза отщепляет аденин, превращая цитокинин в неактивную форму. Фермент активируется при резком

повышении концентрации цитокининов. Цитокининоксидаза активна только в присутствии кислорода [44,65, 89,121].

### **1.3.2. Влияние цитокининов на физиолого-биохимические процессы**

Биохимическая активность цитокининов сильно зависит от их концентрации и связана с влиянием на ряд физиоло-биохимических процессов: синтез белков и нуклеиновых кислот, активацию в прорастающих семенах гидролитических ферменты-амилазы, и протеазы, повышение активности эндопептидазы, пиррофосфатаз, малик-фермента, нитратредуктазы, рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, образование мембран хлоропластов, повышение интенсивности фотосинтеза, формирование митохондриального аппарата и шероховатого эндоплазматического ретикулума. В высоких концентрациях цитокинины подавляют рост и даже приводят к апоптозу (гибели). Это их свойство используют для опадения листьев у хлопчатника [109,159].

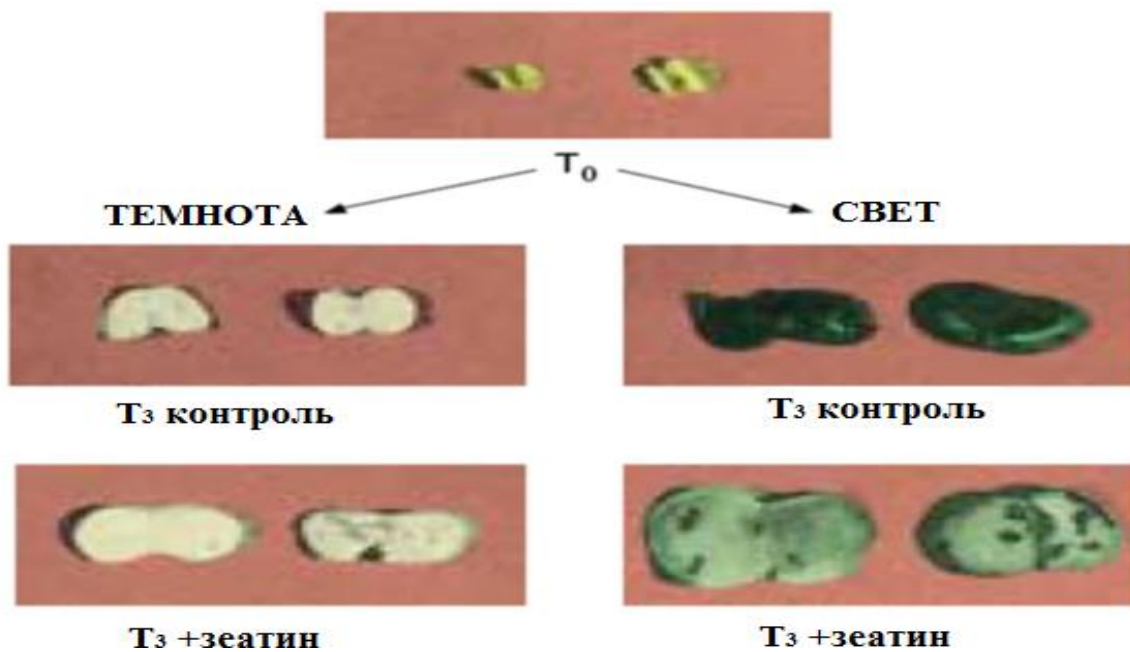
На рис.8. суммированы физиологические эффекты цитокининов, а на рис. 8-14 наглядно показаны эти эффекты.

Активация клеточного деления, ускорение транспортных процессов в мембранах, регуляция поступления элементов питания в клетки, регуляция клубенькообразование у бобовых культур, защитное действие от неблагоприятных экологических факторов и т.д. [34,40,45,56,65,68].



**Рисунок 8. Физиологические эффекты цитокининов**



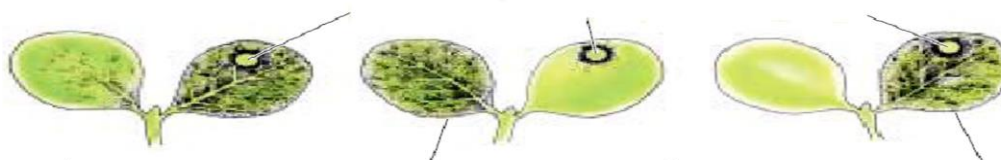


**Рисунок 9. Активация роста растяжением у семядолей  
двудольных растений**

Влияние кинетина на удлинение семядолей редиса:

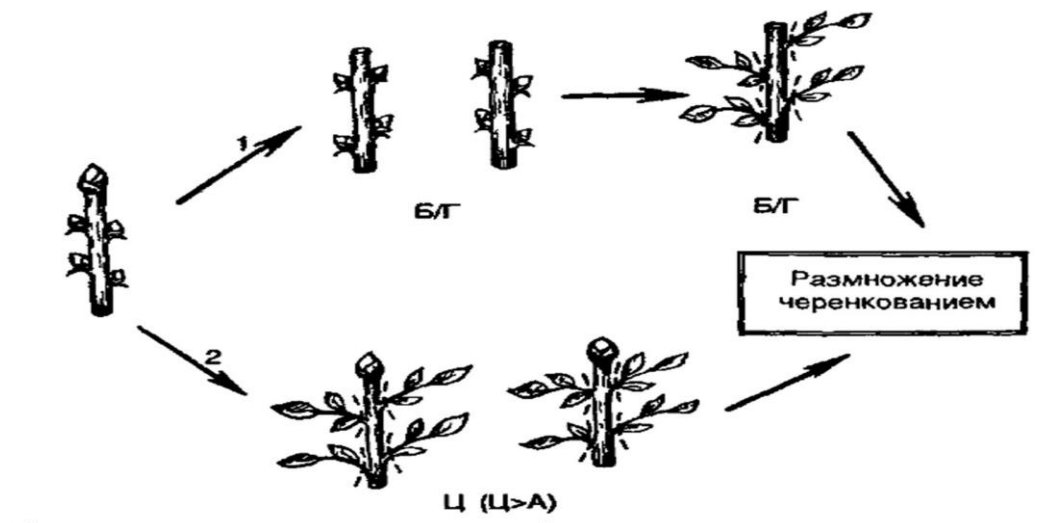
$T_0$  – семядоли редиса до эксперимента;

$T_3$  – спустя 3 дня



**Рисунок 10. Задержка старения листьев («гормоны омоложения»)**

**Влияние кинетина на передвижение  $^{14}\text{C}$ -глицина в листьях *Vicia faba* (Полевой, 1989)**



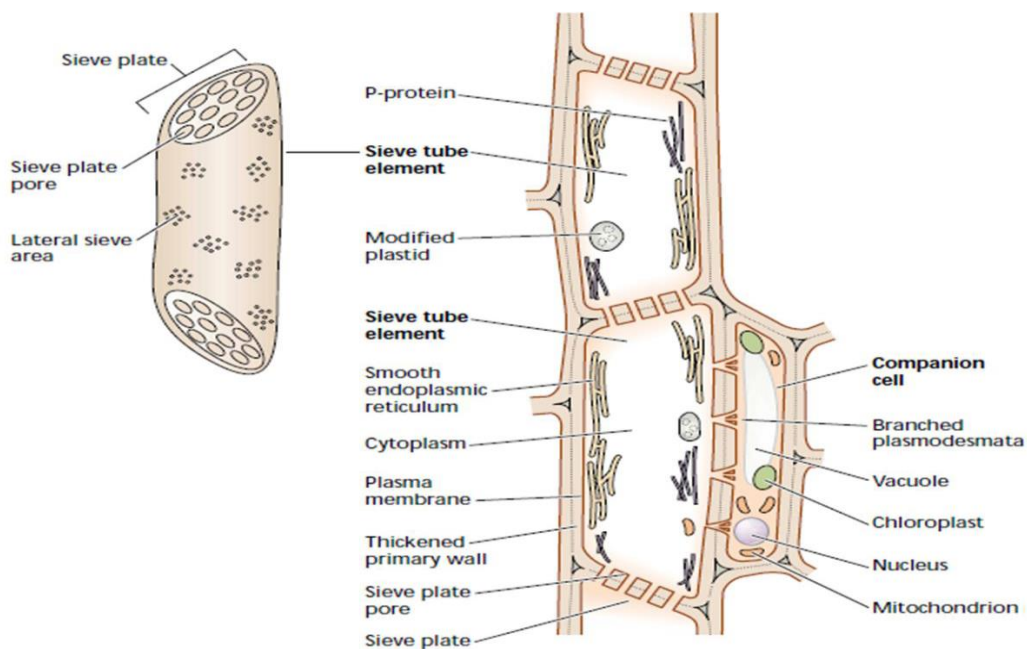
**Рисунок 11. Снятие апикального доминирования  
Ауксины и цитокинины – антагонисты в процессе регуляции  
развития боковых почек (Sachs, Thimann, 1967)**

Б – brassinosteroids

Г – gibberellins

Ц – cytokinins

А - auxins



**Рисунок 12. Стимуляция образование элементов флоэмы.  
Поперечный разрез участка стебля *Trifolium* (Полевой 1982)**



**Рисунок 13. Подавление роста боковых корней (Полевой 1982)**



**Рисунок 14. «Ведьмина метла» возникает в результате роста боковых почек под действием цитокинина (Кулаева, 1973)**



**БАП > ИУК**

Из-за увеличенного количества  
цитокининов  
Появляются стеблевые почки



**ИУК > БАП**

Из-за увеличенного количества  
цитокининов появляются  
корневые культуры

**Рис 15. Стимуляция процесса формирования стебля (Кулаева, 1973)**

Цитокинины способны оказывать воздействие стимулирующего характера на прорастание семян, которые на протяжении длительного периода времени находились на хранении. Кроме того, цитокинины можно применять в работе с семенами, которые должны быть подвергнуты стратификации (т.е. процедуре прорастания при воздействии пониженных температур).

Помимо всего сказанного выше, у цитокининов также имеется возможность выводить почки, которыми обладают клубни, а также растения древесного типа, из состояния спячки.

Обратим внимание на тот факт, что после применения цитокининов скорость цветения определенных длиннодневных растений может стать выше, чем до их использования.

Ранее уже было обращено внимание на тот факт, что проведение обработки цитокининами может иметь своим следствием развитие женских половых признаков у огурцов, тыквы, а также некоторых иных видов сельскохозяйственных культур.

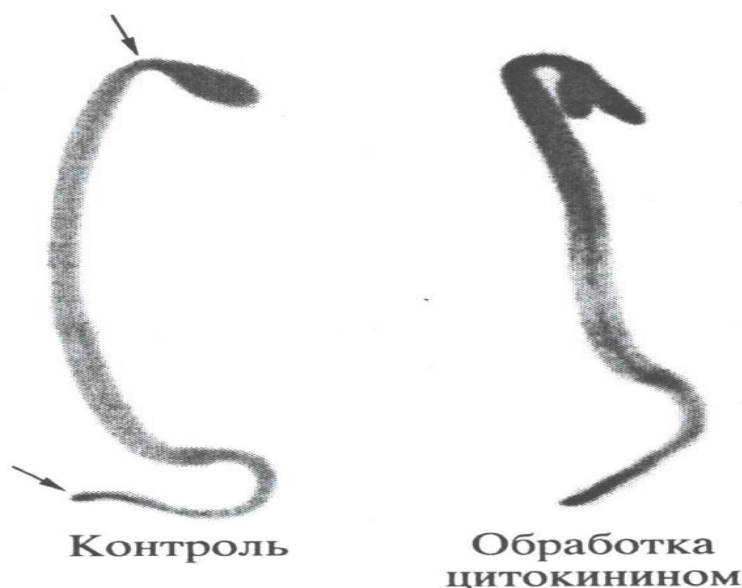
Как показывает практика, цитокинины также можно эффективно применять при работе с плодами, которые являются бессеменными. Их интенсифицирующее воздействие объясняется активизацией аттрагирующего эффекта.

### **1.3.3. Цитокинины: механизм действия**

**Гены, чувствительные к цитокинину.** Хотя цитокинины были открыты в 1955г Ф.Скугом и его сотр. [125] , значительные успехи в исследовании молекулярных основ их действия достигнуты в последние два десятилетия. Это связано с открытием внутриклеточной мишени действия цитокининов, их мембранного рецептора и факторов регуляции[103] .

Исследования, которые были осуществлены в конце 1990-х годов, (1998 г.), позволили определить наличие в кукурузе, арабидопсисе, а также в некоторых иных культурах, используемых в сельском хозяйстве, гены, которые после внесения цитокининов подвергаются активизации. Одним из первых таких генов стал ARRS. Когда цитокинины оказывали воздействие на ARRS, то активизация данного гена происходила крайне быстро, причем для ее начала не использовался какой-либо белок. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что ген ARRS представляет собой мишень, в первую очередь подвергающуюся воздействию, оказываемому цитокининами [10,11,42, 68,98,147].

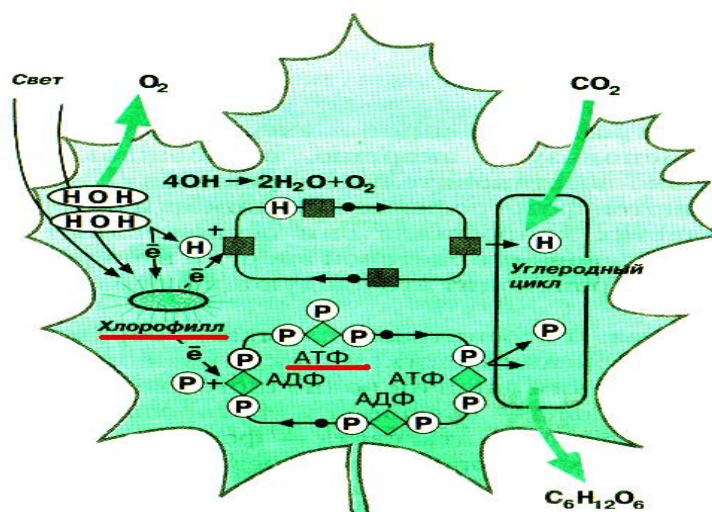
Использование трансгенного арабидопсиса, который обладал соединенными между собой генами ARR5 и GUS, предоставляло возможность отслеживать экспрессию промотора (рисунок 16).



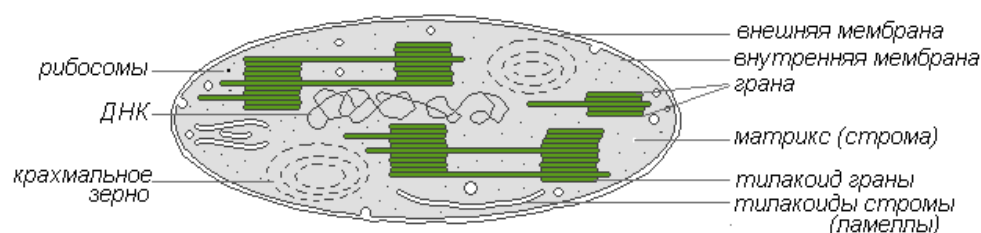
**Рисунок 16. Проростки (этиолированные) арабидопсиса трансгенного типа (снятые спустя три дня после начала произрастания) (Романов, 2009).**



При обработке кинетином трехдневных этиолированных проростков трансгенного ARR5::GUS арабидопсиса происходила повсеместная активация репортерного гена, что хорошо видно при гистохимическом GUS-окрашивании [70,71,100,113,146]. - рис. 16. Прямые измерения содержания м-РНК гена ARR5 показали, что уже через 15 мин воздействия кинетина накопление мРНК этого гена составляло 80% от максимального уровня, достигаемого при 45 минутном воздействии. Полученные данные свидетельствовали о том, что содержание мРНК гена ARR5 регулировалось кинетином исключительно на уровне активации транскрипции.



Строение хлоропласта



**Рисунок 17. Цитокинины оказывают влияние на ультраструктуру хлоропластов, повышают содержание хлорофилла и интенсивность фотосинтеза (Романов, Медведев, 2006)**

В процессе идентификации генов, которые наиболее быстро демонстрируют ответ на внесение цитокининов, применялись специальные

микрочипы. В них имелись небольшие ячейки, в которых располагались специальные олигонуклеотиды, соответствующие более чем 24 000 генам арабидопсиса. Таким образом, была выполнена задача по внесению в микрочипы абсолютного большинства генов, имеющих у арабидопсиса [99,118, 134,136].

Изучаемые проростки подвергались обработке с использованием цитокинина (перед проведением исследования был подготовлен состав, характеризующийся оптимальными концентрациями данного вещества). Использовалось несколько сеансов обработки, которые продолжались на протяжении 0,25 и 2 часов. После этого из проростков, которые прошли кинетинную обработку (а также из тех, что не были подвергнуты такой операции, т.е. являлись контрольными), осуществлялось выделение мРНК. В свою очередь, данные мРНК применялись для создания кДНК флуоресцентно-меченого типа. При определении того, в каких концентрациях создались кДНК, использовались уже рассмотренные ранее микрочипы.



**Рисунок 18. Процесс соединения репортерного гена с изучаемым (Романов,2009)**

Как было определено в результате осуществления исследования, экспрессия, которая может быть описана как значительная, была продемонстрирована порядка 11 500 генов. При этом для 80 генов количество создаваемых транскриптов возрастало в 1,8-2 раза относительно начальных значений уже после первой обработки, которая продолжалась в течение 15 минут. Однако это количество равняется менее чем 10% от суммарного объема генов, продемонстрировавших активность. Среди тех генов, которые, как было выявлено, проявляют активность, более семидесяти испытали воздействие со стороны кинетина. Что касается еще 11 генов, то они, столкнувшись с кинетином, подверглись репрессии. Обратим внимание на то, что небольшое количество генов, которые продемонстрировали активный ответ на первую обработку цитокининами, зафиксировано не только в случае с арабидопсисом, но и для табака [70,138,149,].

Функция этих «ранних» генов первичного ответа на цитокинин состоит в управлении генной экспрессией.

Через 2 часа воздействия кинетина было обнаружено более 1500 цитокинин-чувствительных генов названных «поздними» генами, их количество почти в 20 раз больше чем генов первичного ответа. Таким образом, среди тех генов, которые были причислены к категории «ранних», имелось больше тех, что активировались цитокининами. Что касается «поздних», то они, как правило, испытывали репрессивное воздействие вследствие появления цитокинина.

Тот факт, что гены, которые демонстрируют чувствительность к цитокининам, могут быть подразделены на «поздние» и «ранние», является доказательством трансформации геномной активности. Она происходит в соответствии с каскадным принципом (он подразумевает, что небольшие концентрации таких генов, чья активация производится максимально



быстро, имеют своим следствием увеличение экспрессии всей остальной совокупности генов, влияющих на протекание глобальных физиологических процессов в растении) [55, 56,68,156].

Экспрессии генов цитокининами посвящены также работы других авторов [150,151].

### **Рецепторы цитокининов**

В середине 1990-х годов (1996 г.) специалистом из Японии Т.Какимото было высказано предположение, в соответствии с которым в качестве рецептора для цитокинина, возможно, стоит рассматривать сенсорную гистидинкиназу [115]. На практике правильность данного тезиса была доказана в 2001 году [139,155,170].

В соответствии с представлениями, которые являются распространенными в современной биологической науке, в составе арабидопсиса имеются CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2 (все они являются рецепторами цитокининов, схожими друг с другом по составу). Каждый из них является трансмембранным белком, причем их молярная масса является большей, чем 100 кДа.

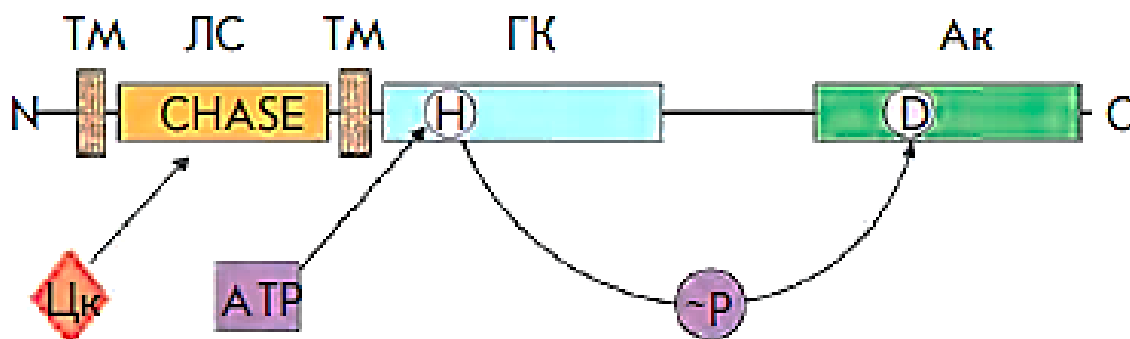
У тех видов риса и кукурузы, которые являются по особенностям своего строения далекими от арабидопсиса, тем не менее, были идентифицированы почти также же по строению рецепторы для цитокининов (соответствующие исследования были осуществлены на протяжении середины 2000-х годов) [43, 103,132,].

Как было определено в результате рассматриваемых исследований, в ситуации, когда арабидопсис не имел активных рецепторов цитокининов, гены, ответственные за обеспечение первичного ответа, не демонстрировали какой-либо реакции на цитокинины [130,137].

Такие тройные мутанты были крохотными маложизнеспособными и стерильными растениями. Структура рецептора цитокинина CRE1/АНК 4

показана на рис. 19. Сенсорная гистидинкиназа является белком, который подразделен на определенное количество доменов. В его N-конце располагается домен, существованием которого обеспечивается наличие рецептора (который, в свою очередь, сформирован двумя сегментами, каждый из которых является гидрофобным). Они отделены друг от друга многопептидной цепью, которая располагается вне пределов клетки. Данная многопептидная цепь стала именоваться CHASE, что является сокращением от Cyclase-Histidine kinase – Associated Sensing Extracellular [93,128,156].

CHASE несет ответственность за идентификацию цитокининов, а также за осуществление их связывания. В пределах клетки располагается центральная составляющая белка, которая образована определенным количеством доменов. Один из таких доменов рассматривается как активный в гистидинкиназном отношении. Связывание гормона происходит на N-конце белка, в срединной части белок фосфорилируется, а затем фосфор перебрасывается на C-конец, где располагается воспринимающий домен, имеющий остаток аспартата, способный акцептировать фосфор с фосфогистидина. Этот «активированный» фосфор выполняет роль специфической сигнальной «метки», передающий цитокининовый сигнал внутри клетки.



**Рисунок 19. Структура рецептора цитокининов (для примера использован рецептор CRE1/АНК4)**

Как было отмечено рядом исследователей, для обеспечения корректного восприятия поступающего сигнала и дальнейшего его транслирования по клетке необходимо, чтобы рецепторы и гормоны надлежащим образом взаимодействовали между собой [33,36,54,55,56, 57,70,71,163].

В соответствии с результатами, которые были получены по итогам множества экспериментом, именно из-за наличия сенсорных гистидинкиназ цитокинин способен управлять процессами физиологического характера, локализованными в разных частях растения [ 110,157].

Сенсорные гистидинкиназы являются составляющей системы, которая обеспечивает транслирование сигналов от рецептора до регулятора. Растения адаптировали сигнальную систему, которая была получена от прокариотов. Испытывая воздействие со стороны характерного сигнала, рецептор подвергается димеризации, а затем становится фосфорилируемым. Формирующийся после протекания данного процесса нагретый фосфат поступает на регулятор ответа. А он в зависимости от того, каким является ответ, оказывает влияние на конкретный оперон или ген, вследствие чего они начинают функционировать более (или менее) активно. [161]

### **Трансдукция цитокининового сигнала**

Сенсорные гистидинкиназы представляют собой составляющую плазмолемы. Кроме того, они являются встроенными во внутренние мембраны, которые имеются в клетках [41,140,143,160,171 ].

Для того, чтобы у активированного фосфата имелась возможность оказать активирующее воздействие на систему, состоящую из двух компонентов, он должен быть перенесен в ядро. Поскольку фосфат не обладает способностью к самостоятельному перемещению по растению,

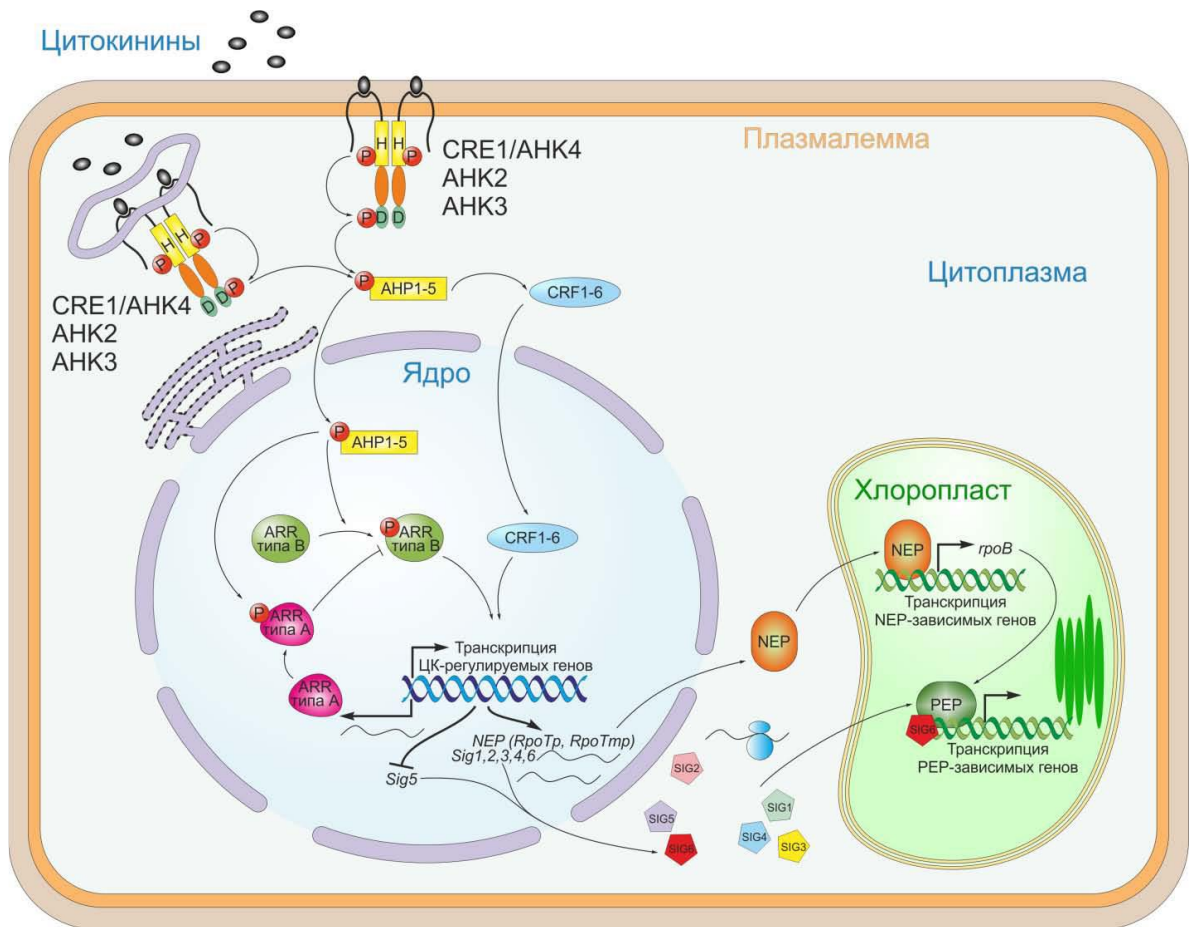
требуется применить какой-либо переносчик. Если рассматривать арабидопсис, то оказывается, что такое растение характеризуется наличием пяти различных белков, способных стать переносчиками. Они получили название фосфотрансмиттеры (т.е. вещества, осуществляющие трансмиссию, перемещение фосфатов).

Фосфотрансмиттерами осуществляется получение фосфата, который предварительно был подвергнут активации, после чего осуществляют его перемещение до ядра. После того, как фосфотрансмиттеры, переносящие на себе фосфаты, оказываются в ядре, они передают его ARR-В регуляторам. Таким образом, после проведения фосфорилирования у ARR-В имеется способность вступать во взаимодействие с конкретными цепями ДНК, имеющихся в промоторах генов. Конечным результатом операции по фосфорилированию становится воздействие на определенные последовательности, состоящие из нуклеотидов. В зависимости от того, как именно сработает ген ответа, они могут быть репрессированы либо активированы. Именно они представляют собой гены первичного ответа.

Арабидопсис характеризуется наличием системы трансдукции сигнала, которая состоит из двух составляющих. В левой стороне идентифицированы величины белков. В скобках, находящихся справа, приведена информация о суммарном объеме белков конкретного типа.

NLS – обозначение сигнала локализации; H – обозначение для остатка гистидина; D – обозначение для остатка аспартата; F, G1, G2, GARP, N, P/Q-rich – обозначения, которыми кодируются аминокислотные остатки; б – стандартная схема перемещения цитокинового сигнала внутри клетки; АНК – рецепторы; АНР – вещества, обеспечивающие перемещение фосфатов, подвергнутых активации, по растению; ARR-В – вещества, регулирующие ответ (тип В); ARR-А – вещества, регулирующие

ответ (тип А). Для обозначения фосфатов, которые были подвергнуты активации, используются круги светлого цвета. [164].



**Рисунок 20. Механизм функционирования цитокининов (Романов, 2009)**

Отметим, что наибольшее воздействие цитокинины способны оказывать на А-регуляторы ответа. Такие ответы обладают способностью воспринимать фосфат, который предоставляется используемыми для его перемещения трансмиттерами. Обратим внимание, что именно А-рецепторы получают большую часть фосфатов, прошедших через активацию. Таким образом, объем транскрипции, которая обуславливается наличием цитокинина, становится меньшим. Именно это является причиной того, что индукция транскрипции в гене ARR5 обладает специфическим характером, что было впервые выявлено Романовым в

2009, 2011 гг. Научные разработки, осуществленные Даниловой, имели результат в виде определения влияния цитокининных рецепторов для аккумуляции транскриптов, имеющихся в генах хлоропластов [32,33].

Согласно современным представлениям, пластиды имеют происхождение от цианобактерий эндосимбиотического типа, которые существовали в древнейшие времена. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что у них имеется кольцевая ДНК. В пластидах имеется порядка 120 генов. При этом более 50% белков, которые являются требуемыми для выполнения хлоропластами собственных функций, имеет кодирование ядром. Как считают некоторые специалисты, пластидные гены обладают экспрессией, размер которой управляется специальными ядерными генами (это обеспечивается, в частности, за счет принятия участия в стандартном процессе генной транскрипции [96,150,151,166]).

Научные разработки, которые были осуществлены в течение 2000-х и 2010-х годов, позволили понять, как цитокининные рецепторы сказываются на экспрессии, демонстрируемой генами, входящими в состав пластидов [32,33,168]. В частности, было определено, что рецептор АНКЗ обладает главной ролью в обеспечении управления транскрипцией генов хлоропласта. Обнаружены различия в транскрипционной активности этих генов, т.е. активация транскрипции хлоропластных генов была дифференциальной.

Отметим, что современная биологическая наука не обладает доказательствами того, что хлоропласты всегда характеризуются наличием гистидинкиназ. Однако укоренилось мнение, в соответствии с которым серин-треониновая киназа, находящаяся в пределах пластидов, вовлекается в транскрипцию генов хлоропластов [122,123,130].

Особенности протекания транскрипции генов, обеспечивающих существование хлоропластов, во многом зависят от стадии онтогенеза, на

которой пребывает растение. Кроме того, сказывается и специфика, диктуемая окружающей средой. Свою лепту вносит и способность РНК-полимеразы вовлекаться во взаимодействие с  $\sigma$ -факторами. Данные вещества, в свою очередь, пребывают в доступе только при совпадении ряда условий.

Помимо рассмотренной выше системы, состоящей из двух компонентов, в трансдукции сигнала, генерируемого цитокинами, принимает участие также и фосфолипаза D [141]. Она обладает таким продуктом, как фосфатидная кислота. Данное химическое вещество обладает способностью вовлекаться в реакцию с белками, тем самым увеличивая либо уменьшая демонстрируемую ими биологическую активность [158]. У фосфатидной кислоты имеется способность трансформировать содержание белков в разных клеточных образованиях, делая белки привязанными к мембранам. Отметим, что данный процесс может как интенсифицировать, так и наоборот, сковывать взаимодействие между различными белками, которые отвечают в том числе и за сигнальную трансдукцию. Из сказанного выше следует, что у фосфатидных кислот имеется способность управлять активностью процесса белкового фосфорилирования. Деятельность, развиваемая фосфолипазой, также способна являться важной с точки зрения обеспечения изменения структуры рецепторов, содержащихся в пределах мембраны.

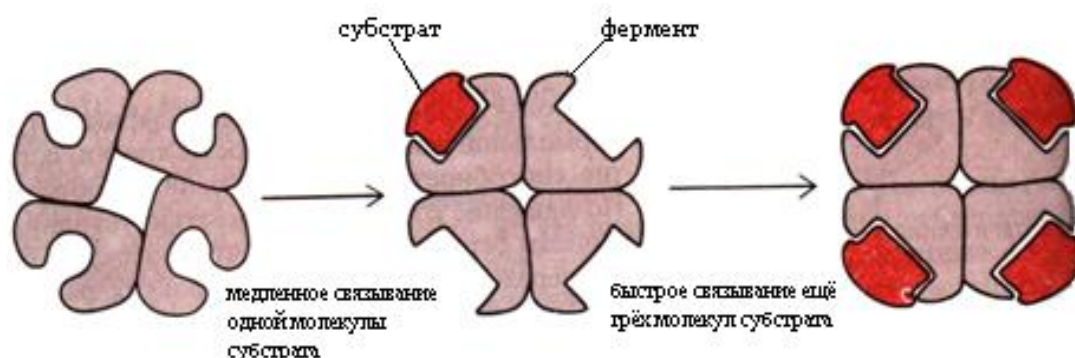
В специально поставленных экспериментах обнаружено, что в колеоптилях кукурузы БАП активировал фосфолипазу D, но не оказывал действия на фосфолипазу D корневой системы проростков. Этот факт можно объяснить, по-видимому, различным влиянием цитокининов на корневую систему и надземные органы растений [82,137,169].

## 1.4. Регуляция активности ферментов

### 1.4.1. Аллостерическая регуляция

Для регуляции активности ферментов очень важное значение имеют аллостерические ингибиторы и активаторы. Ферменты, на которые они действуют называются аллостерическими. Аллостерические ферменты – это олигомерные ферменты, состоящие из нескольких субъединиц. В результате взаимодействия между разными субъединицами фермента активность его может быть ингибирована или активирована. При взаимодействии между субъединицами связывание субстрата становится кооперативным, и кривая зависимости скорости реакции  $V$  от концентрации субстрата  $[S]$  приобретает сигмоидную или S-образную форму, а не классическую гиперболическую [31,37,48,53,88]. В ферменте, состоящем из аллостерических субъединиц, конформация одной субъединицы влияет на конформацию соседних субъединиц. Поэтому связывание одной молекулы субстрата может повлиять на сродство фермента к другим молекулам субстрата (рис.21.).

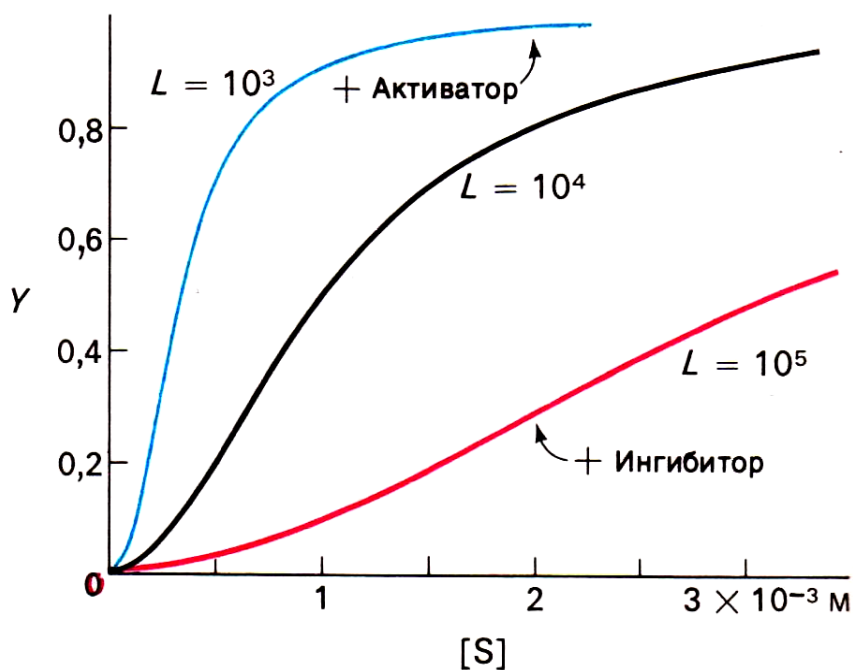
Активность аллостерических ферментов может регулироваться воздействием определённых метаболитов, связывающихся с ферментом не в активном центре, а в аллостерическом.



**Рисунок 21. Кооперативное связывание субстрата с ферментом (Курганов,1978)**



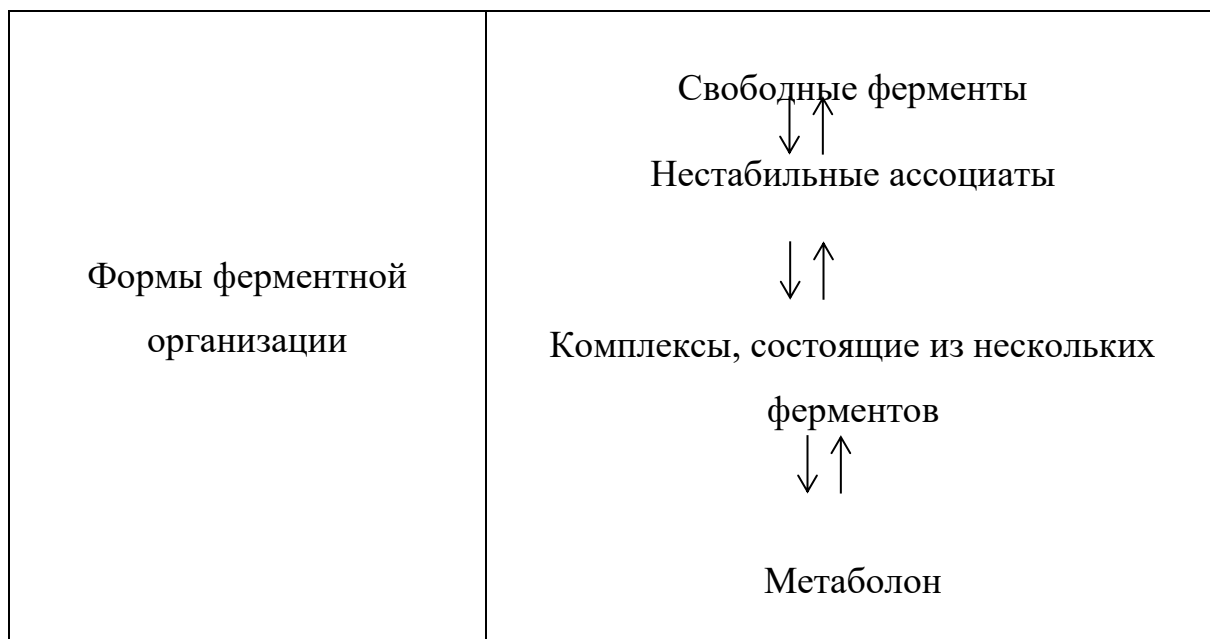
Изменение кинетических кривых зависимости насыщения субстратом фермента происходит в присутствии активатора и ингибитора. В присутствии активатора происходит насыщение фермента при меньших концентрациях субстрата и при этом достигается большая величина максимальной скорости реакции  $V_{\max}$ , а форма кривой насыщения субстратом становится ближе к гиперболической. В присутствии же ингибитора необходимы большие концентрации субстрата, при этом максимальная скорость реакции  $V_{\max}$ , значительно снижается, а кривая насыщения фермента субстратом приобретает ярко выраженную сигмоидную форму. (рис.22)



**Рисунок 22. Насыщение  $Y$  как функция концентрации субстрата  $[S]$  в соответствии с моделью согласованного механизма (Курганов,1978)**

#### 1.4.2. Надмолекулярная организация ферментов и её преимущества

На рисунке 23 продемонстрировано описание основных форм, в которых работают ферменты, находящиеся в клетках:



**Рисунок 23. Типы ферментной организации**

Последовательные реакции одной метаболической цепи катализируют в основном, комплексы ферментов, являющихся мобильными. Такие комплексы называются **мультиферментными**.

Изучены структура и свойства мультиферментных комплексов карбоксилирующей фазы фотосинтезат [6,8,9,10,13,17,104,105,108, 107,135,144,145,154].

Мирзорахимовым (2012) установлена зависимость от возраста растений синтеза мультиферментных комплексов в листьях высших растений.

Для ускорения той или иной последовательности реакций или защиты функциональной системы от неблагоприятных воздействий в некоторых условиях образуются из небольших групп ферментов временные комплексы, называемые **нестабильными** ассоциатами.

На субклеточных структурах (мембранах) адсорбированы или встроены в них мультиферментные комплексы, состоящие из ферментов

общего метаболического пути. Такие комплексы относят к **метаболонам** [38,153 ].

Из листьев хлопчатника выделены свободный и мембраносвязанный комплексы ферментов карбоксилирующей фазы фотосинтеза [11,12].

**Многоферментные комплексы** –представляют собой совокупности ферментов, воздействие которых оказывает каталитический эффект на реакции, входящие в состав единой цепи метаболизма.

**Нестабильные ассоциаты** – комплексы, которые формируются на временной основе и образованы небольшими по размеру ферментными группами. Нестабильные ассоциаты позволяют ускорить протекание реакций, образующих ту или иную последовательность.

**Метаболон** – комплексы, которые образуются несколькими ферментами.

Если комплекс, который образован несколькими ферментами, становится закрепленным на специальных «якорных» пространствах, имеющих в клетках, то он начинает представлять собой метаболон.

Все описанные выше формы существования ферментов пребывают в состоянии динамического равновесия. То, как именно соотносится их количество, определяется большим числом факторов. Это, например, характер самого живого организма, тип клетки, ее текущее состояние.

### **Функциональные последствия объединения ферментов в мультиферментные комплексы**

#### **Эффект сближения**

Когда ферменты начинают составлять один комплекс, то входящие в их состав активные центры значительно сближаются друг с другом. Таким образом, продукт, который генерируется одним из ферментов, является доступным для всех остальных ферментов, входящих в комплекс.

Для каждого из контуров поставлена в соответствие глобулярная единица. В большинстве случаев в состав глобулярной цепи входит одна совокупность пептидов (однако известны и такие случаи, когда данное правило не соблюдается). Для обозначения регуляторной и каталитической единиц используются такие параметры, как R, C. А для идентификации ферментов, существование которых оказывает каталитический эффект на протекание какой-либо стадии метаболического процесса, используются обозначения E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> и E<sub>3</sub>.

Для обеспечения связывания между интермедиатом и ферментом, который располагается на следующей позиции в цепи взаимодействий, требуется добиться того, чтобы ферментные центры были ориентированы строго определенным образом относительно друг друга.


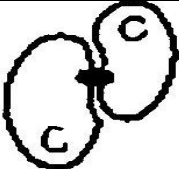
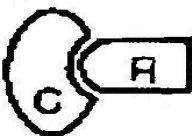
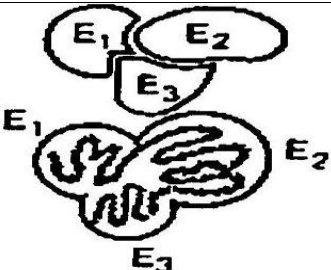

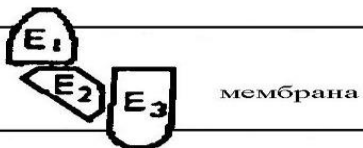
На рисунке 24 продемонстрировано схематическое описание уровней ферментной организации.

В этом случае достигается так называемая компартиментация метаболита (в специализированной литературе для ее обозначения зачастую применяется такой термин, как «эффект ориентированного переноса» [38, 58,90]).

В состав одной клетки может входить большое количество метаболитов. Из-за того, что каждая клетка обладает строго определенным объемом жидкости (а значит, характеризуется наличием ограниченной гидратирующей емкости), возможности для достижения рабочей концентрации в отношении всех метаболических интермедиатов не имеется.

Таким образом, эволюция клетки стала протекать в направлении формирования многоферментных совокупностей, существование которых предоставляло возможность сделать интермедиаты «канализированными»

(т.е. такими, чтобы они не покидали пределы многоферментного комплекса).

Уровни организации	Схема	Название
Глобулярный белок		Мономерный фермент
Четвертичная структура		Олигомерный фермент
		Сложный фермент
Надмолекулярная организация		Мультиферментный комплекс Мультиферментный конъюгат
		Ферментные ансамбли
	<p data-bbox="624 1424 1070 1447">Мембрана или макромолекула</p>	Адсорбционный
	 <p data-bbox="847 1570 983 1592">мембрана</p>	интегральный

**Рисунок 24. Уровни ферментной организации**

Трансформации, которым подвергаются интермедиаты, осуществляются в пределах специального конвейера активных центров. Таким образом, появляется возможность обеспечивать постоянное

местонахождение интермедиатов в пределах многоферментного комплекса [46,48, 49,50,51, 131,154,162].

Микрокомпарментализация – это процесс, который является характерным для комплексов, состоящих из множества ферментов. Благодаря микрокомпарментализации происходит объединение ферментов, оказывающих последовательное каталитическое воздействие на все стадии процесса метаболического пути.

### **Защита метаболита и (или) клетки**

Метаболит может быть надежно защищен от негативного воздействия, которое может быть оказано ферментами, относящимися к иным метаболическим путям, в случае, если обеспечивается эффект туннельного переноса. Благодаря его существованию метаболит тратит меньше времени, чтобы оказаться в ином активном центре, чем был до этого. Кроме того, благодаря эффекту туннельного переноса появляется гарантия того, что метаболит не будет подвергнут распаду (который может сформироваться, например, вследствие протекания гидролизных процессов). Еще одним положительным следствием эффекта туннельного переноса является то, что его существование позволит снизить расходы энергии на обеспечение процесса переноса. Важно обратить внимание еще и на тот факт, что существуют определенные метаболиты (к числу которых необходимо отнести, в частности, альдегиды), которые оказывают токсическое воздействие на клетку. Таким образом, очень важно отделить их от иных составляющих клетки.

### **Сокращение временных затрат на осуществление перехода**

В качестве времени перехода рассматривается промежуток, который затрачивается на то, чтобы метаболит переместился к иному активному

центру, нежели тот, возле которого он находится в данный момент. Как уже было обращено внимание ранее, в процессе формирования многоферментных образований активные центры, наличием которых характеризуется абсолютно каждый фермент, становятся сближенными относительно друг друга. Это имеет эффект в виде сокращения времени перехода, а также активизации ориентированного переноса. Если создается многоферментное образование, то утрачивается необходимость в обеспечении уравнивания результата предыдущего химического взаимодействия. После того, как завершается тунеллирование продукта, сформированного благодаря одному взаимодействию, достигается каталитический эффект. Все это имеет своим следствием уменьшение временных затрат на перенос, а также снижение потребности в субстрате.

Как было выявлено многими специалистами, вследствие сокращения временных затрат на трансформацию метаболитов сам процесс метаболизма становится более быстрым [117].

#### **Активация необходимых, подавление ненужных взаимодействий**

Из-за того, что ферменты начинают становиться составляющими единого комплекса, их поверхности начинают меняться. Это происходит вследствие начала взаимодействия между молекулами, которые располагаются на поверхности разных ферментов. Таким образом необходимо добиваться исключительно точного ориентирования активных центров относительно друг друга. Даже если будет допущена какая-либо незначительная ошибка, то эффективность каталитического процесса существенно снизится. Ферментативные реакции характеризуются такими кинетическими параметрами, как  $V_{max}$ ,  $K_m$ . Из этого следует, что даже в том случае, когда каждый элемент по отдельности характеризуется незначительной активностью в плане оказания каталитического

воздействия на процесс, то после их объединения в систему обеспечивается синергетический эффект.

Вовлечение ферментов во взаимодействие позволяет сделать катализ более «легким» чем до этого. Данный результат достигается прежде всего благодаря кинетическому поведению ферментов, вовлекающихся во взаимодействие между собой.

У некоторых ферментов имеется способность оказывать каталитическое воздействие не только на физиологические, но также и на побочные реакции. Вследствие того, что после агрегации ферментов начинает протекать метаболизм в нормальном режиме, то этим предупреждается возникновение взаимодействий, рассматриваемых в качестве нежелательных.

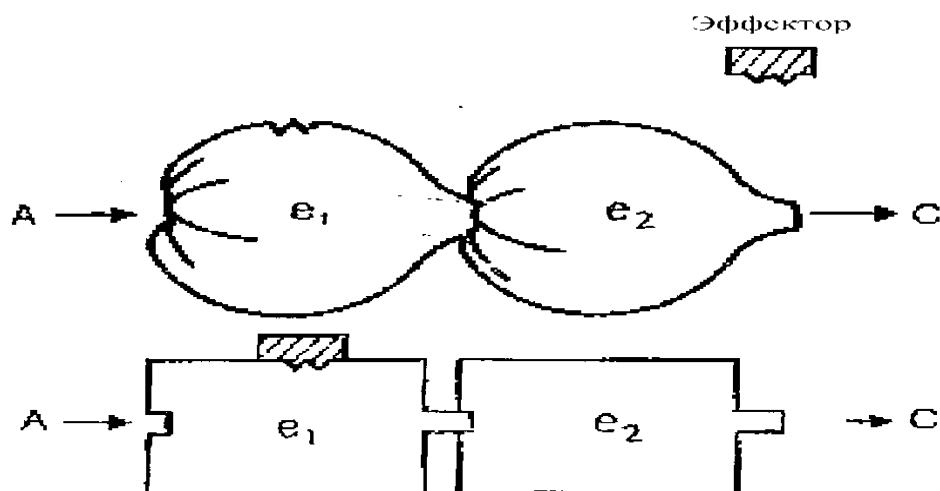
### **Координированные регуляторные эффекты**

Трансформации кинетических параметров -  $V_{\max}$ ,  $K_m$  в научной среде считаются координированной регуляцией совокупностей, состоящих из множества ферментов.

На рисунке 25. продемонстрирован порядок оказания воздействия эффектором на комплекс, образованный двумя ферментами.

Видно, что при присоединении эффектора к аллостерическому центру фермента  $E_1$  происходят синхронные изменения конформации и фермента  $E_1$ , и фермента  $E_2$ . Результатом таких конформационных изменений являются возрастание скорости реакций и сродства ферментов к своим субстратам.





**Рисунок 25. Координированные конформационные изменения, вызванные в двухферментном кластере эффектором, действующим на единственный аллостерический центр в первом ферменте ( $e_1$ ) (Фридрих, 1986).**

## 1.5. Резюме

### Открытие фитогормонов

Честь открытия фитогормонов принадлежит Ч.Дарвину. В 1880 г он издал книгу «Способность растений к движению», где описал свои опыты по фототропизму с колеоптилями злаков и проростков канареечной травы. Ч.Дарвин обнаружил, что изгиб по направлению к свету происходит не верхушкой колеоптиля, а в нижележащей нечувствительной к свету зоне. Он предположил, что какое-то вещество из верхушки колеоптиля транспортируется в нижележащую зону и вызывает там изгиб.

Это вещество было выделено в 1926 г Ф.Вентом, а его химическая природа установлена в 1931-1934 гг. трудами многих ученых – (Ф.Кегль и др., В.Тиманн) и идентифицирована как индолилуксусная кислота (ИУК). Так был открыт первый класс фитогормонов «ауксины» (от греч. *auxano* - расту).

### **1880 г можно считать датой открытия фитогормонов.**

К настоящему времени в растениях обнаружено 6 классов, так называемых классических фитогормонов – ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, этилен, brassinosteroids и 6 классов гормоноподобных соединений – салициловая кислота, жасминовая кислота, фенольные соединения, олигосахарины, короткие пептиды, лектины.

Все эти вещества называют природными регуляторами роста. В зависимости от концентрации и условий фитогормоны могут стимулировать или ингибировать рост растений. Эффект отдельного гормона зависит не только от его концентрации в тканях, но и от соотношения с другими фитогормонами и метаболитами. Все фитогормоны обладают общими свойствами: специфической и высокой биологической активностью, т.е. действуют в очень низких концентрациях ( $10^{-13}$  –  $10^{-5}$  моль/л), полифункциональностью и плеiotропностью действия, взаимодействуют друг с другом, контролируют все этапы онтогенеза и т.д.

### **Взаимодействие фитогормонов**

Благодаря существованию цитокининов и ауксинов обеспечивается управление процессами удлинения, генерации клеток, Нельзя не обратить внимание на то, что данные процессы представляются исключительно важными, поскольку без них рост растений (а следовательно, и их существование) невозможны.

Гибберелины, цитокинины, а также ауксины представляют собой совокупность химических соединений, которыми определяется архитектура всех видов растений. Так, например, ауксины, которые, как уже было сказано ранее, генерируются в верхней части растений, не позволяют его боковым почкам нормально развиваться. Что касается

цитокининов, то их воздействие является прямо противоположным, вследствие чего начинает развиваться процесс ветвления. А гибберелины, в свою очередь, оказывают общее интенсифицирующее влияние на произрастание растения, что обеспечивается посредством активации меристем вставочного характера. Упомянем также и о том, что наличие ауксинов способствует развитию корневой системы растения.

Цитокинины (вместе с абсцизовой кислотой) управляют тем, как в растении протекает фотосинтез. Кроме того, благодаря влиянию цитокининов открываются устьица, хлоропласты дифференцируются. Что касается воздействия цитокининов на газовый обмен, то оно носит интенсифицирующий характер (иными словами, после того, как количество цитокининов увеличивается, газовый обмен становится более активным). В свою очередь, абсцизовая кислота угнетает данные процессы. Среди важных эффектов, имеющих у цитокининов, можно выделить аттригирующий (проявляется в том, что клетки становятся способными получать больший объем питательных химических соединений, нежели до этого). А еще цитокинины способны сделать более крупными размеры листьев (а это значит, что интенсивность процесса фотосинтеза становится более высокой).

Цитокинины, гиббереллины и этилен для многих растений являются индукторами или стимуляторами цветения, способствуют прорастанию семян и повышению их всхожести.

Последовательное участие фитогормонов необходимо для нормального формирования плодов и семян.

Ауксины, цитокинины и гиббереллины, выделяемые семяпочками или семенами стимулируют завязывание и рост плодов.

Абсцизовая кислота и этилен регулируют созревание и опадение плодов, а также листьев. Стрессовые воздействия на растения вызывают

возрастание количества этилена, а водный дефицит – количества абсцизовой кислоты.

Брассиностероиды ускоряют рост растений, усиливая реакцию геотропизма, способствуют дифференциации ксилемы, повышают жизнеспособность пыльцы, задерживают старение листьев, регулируют угол наклона листьев, повышают устойчивость растений к стрессу.

### **Механизм действия фитогормонов**

Фитогормоны воспринимаются чувствительными клетками благодаря специфическим рецепторам, расположенным на плазмолемме или эндоплазматическом ретикулуме. Рецепторы, которые вступают во взаимодействие с гормонами, приобретают иную форму, и транслируют полученный сигнал в клетку. В качестве вторичных посредников, которыми обеспечивается дальнейшая передача сигнала внутри растения, могут рассматриваться жирные и фосфатные кислоты, протеинфосфатазы, а также перекись водорода. После того, как сигнал, передаваемый от гормона, добирается до эффекторов, то он становится намного более сильным. Однако конечной целью его перемещения является гены, находящиеся в клетке. В зависимости от того, какими являются ткань и тип гормона, происходит интенсифицирующее (либо, напротив, ингибирующее) воздействие на конкретную совокупность генов. Когда фитогормоны начинают влиять на гены, которые представляют собой цель воздействия, то происходит появления либо устранение соответствующих ферментов. Отметим, что лишь незначительная часть активных генов является компонентными. Однако даже тех изменений в активности, которые происходят с данными генами, достаточно для активации или деградации программы протекания метаболического процесса.

### **Применение фитогормонов в практических целях**

Поскольку фитогормоны способны оказывать самое разнообразное воздействие на процесс развития многих растений (в том числе и тех, что обладают сельскохозяйственным применением), они активно используются в биотехнологии, а также в аграрном производстве [81].

Без использования цитокининов и ауксинов является невозможным получение растений, носящих трансгенный характер. Кроме того, ауксины (в том числе и те их аналоги, что обладают синтетическим происхождением), активно применяются для укоренения черенков (это очень важная задача при вегетативном типе размножения растительных культур). Отметим также, что ауксины позволяют уменьшить количество плодов, которые опадают с растений непосредственно перед их уборкой.

Что касается цитокининов, то они (вместе с аналогами, которые обладают синтетическим происхождением) могут применяться для интенсификации кущения растительных культур, увеличения геометрических размеров плодов, а также повышения количества семян, которые добираются до стадии всходов. Как считает Шевелуха, внесение цитокининов предоставляет возможность сделать сельскохозяйственные культуры более устойчивыми к стрессовым воздействиям, носящим абиотический характер. А Гроссман (Grosman, 1991) обращает внимание на то, что злаковые и плодовые культуры, которые предварительно обрабатываются разнообразными цитокининами, демонстрируют повышение урожайности. Обработка цитокининами задерживает старение срезанных цветов и овощей [70].

В последние десятилетия значительно увеличилась интенсивность применения цитокининов в косметической промышленности. В составах, которые используются для увлажнения, омолаживания кожного покрова человека, используются разнообразные цитокинины. В медицинской

практике некоторые цитокинины применяют в качестве противораковых препаратов [114,167].

Обратим внимание также и на то, что показатели созревания плодов могут быть улучшены за счет использования веществ, представляющих собой этилен-продуценты. Кроме того, их применение предоставляет возможность сделать уборку урожая менее энергозатратной.

Химические соединения, которые ингибируют генерацию гибберелинов в растительных культурах, могут быть использованы для недопущения опадения злаковых. Использование гибберелинов в процессе осуществления обработки предоставляет возможность повысить скорость формирования цветков у растений. Кроме того, как показывают исследования, применение гибберелинов имеет результат в виде повышения показателей урожайности бессеменного винограда.

Исследования, осуществленные в 2000-х и 2010-х годах, позволили значительно расширить научные знания о трансгенных формах, имеющих у окультуренных растений.

Представляется перспективным развитие работы в направлении создания новых систем гормонального регулирования. По нашему мнению, интенсификация деятельности в данном направлении приведет к появлению новых видов сельскохозяйственных культур, которые будут характеризоваться значительно большей урожайностью, чем те, что выращиваются сегодня.

### **Управление ферментной активностью**

Чтобы оказать какое-либо управляющее воздействие на метаболизм, который протекает в клетке, необходимо увеличивать либо уменьшать ферментную активность.

Для ключевых ферментов фотосинтеза характерны такие механизмы регуляции активности как аллостерическая регуляция и надмолекулярная организация.

Одним из наиболее эффективных механизмов, обеспечивающим управление протеканием метаболических процессов в пределах клетки, выступает формирование надмолекулярных совокупностей ферментов. В большинстве случаев те ферменты, которые располагаются в пределах одного и того же пути метаболизма, формируют многоферментные совокупности, что даёт им ряд преимуществ. К ним относится эффект сближения активных центров ферментов, что открывает образуемому первым ферментом продукту легкий доступ ко второму ферменту и т.д. Продукт реакции, катализируемой первым ферментом становится субстратом второго фермента и так происходит во всей последовательности реакций данной метаболической цепи.

Ранее в работе уже было обращено внимание на тот факт, что при возникновении эффекта туннельного переноса метаболит становится более защищенным от потенциального негативного воздействия, оказываемого ферментами, относящимися к иным путям метаболизма. Кроме того, достижение туннельного эффекта предоставляет возможность существенно сократить временные затраты, требующиеся на перемещение метаболита к новому ферментному центру. Таким образом, достигается возможность сделать затраты энергии уменьшенными.

Что касается комплексов, которые образованы несколькими ферментами, то они, как правило, сталкиваются с регуляторным эффектом, когда испытывают воздействие со стороны хотя бы одной молекулы, относящейся к веществу-регулятору.

В результате всех этих эффектов активность ферментов в мультиферментном комплексе значительно выше, чем у их свободных форм.

Обзор литературных данных показывает, что достигнуты большие успехи в изучении влияния цитокининов на разнообразные физиолого-биохимические процессы. Однако, непосредственное влияние цитокининов на активность ферментов карбоксилирующей фазы фотосинтеза не изучено. Целью наших исследований являлось изучение непосредственного влияния синтетического цитокинина – кинетина на активность каждого в отдельности фермента мультиферментного комплекса цикла Кальвина высших растений.

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **2.1. Объекты исследования**

В рамках настоящего исследования использованы такие объекты, как листья хлопчатника средневолокнистого (латинское обозначение - *Gossypium hirsutum* L., *Malvaceae*), относящиеся к сорту 108-Ф. Кроме того, в процессе проведения исследования использовался арабидопсис (латинское обозначение - *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh*, *Cruciferae*) вместе с мутантами (триплекс, 58/15). Поскольку арабидопсис относится к числу растений, которое является существенно более простым для культивирования, нежели остальные, то именно его необходимо рассматривать в качестве удобного для проведения исследований объекта. Рассматриваемые растения характеризуются непродолжительным периодом вегетации. Что касается предоставляемого ими семенного материала, то он может быть описан как обильный (на одном растении может существовать до 40 000 семян, а минимальным их количеством является 10 000). Что касается совокупного геномного объема, то он



представлен 24 000 единицами (это значит, что его можно рассматривать как небольшой по объему).

Подобраны листья арбидопсиса, относящегося к расе Энкхайм ( $2n=10$ ). Они обладают ярко-зеленым цветом. Кроме того, изучались мутанты, полученные от арбидопсиса расы Энкхайм. Они характеризовались наличием иной, нежели у исходного растения, листовой окраской. Кроме того, они демонстрировали иные показатели по фотосинтезу, нежели исходный арбидопсис.

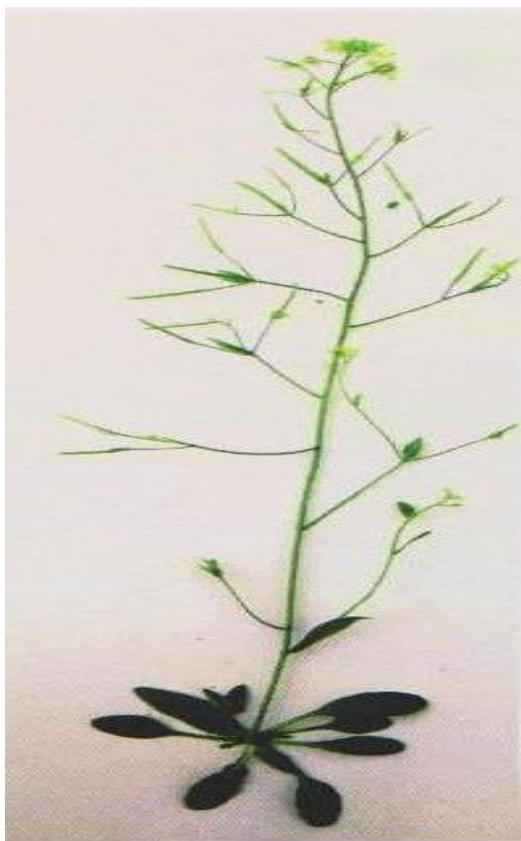
Семя арбидопсиса, а также растений, являющихся его мутантами, приобретены благодаря академику АН РТ П.Усманову. Авторы исследования выражают глубокую признательность и благодарность академику.

Мутант 58/15 получен благодаря проведению обработки семян арбидопсиса, относящегося к расе Энкхайм, таким веществом, как этиленметансульфонат. Цвет листьев мутанта 58/15 может быть как желтым, так и светло-зеленым (наблюдаемая окраска меняется в зависимости от того, под каким углом располагается источник освещения, как продемонстрировано на рисунке 26). Что касается мутанта триплекс, то процесс его возникновения можно описать как спонтанный. Триплекс характеризуется ярко-зелеными листьями. Кроме того, его специфическая особенность – наличие повышенного количества стручков (в некоторых случаях в пределах одной ножки может располагаться до пяти стручков). Из этого следует, что мутант Триплекс можно рассматривать как растение, имеющее исключительно высокую продуктивность в плане генерирования семян (рис.27). Что касается названия, то оно было разработано в соответствии с тем, что в большинстве случаев на ножке листа имеется три стручка. Некоторые специалисты делают предположение о том, что триплекс характеризуется наличием трансформированной гормональной

регуляции (таким образом, определенный интерес к его изучению демонстрируют специалисты в сфере физиологии растений). В результате научных исследований было определено, что ген  $t_2$  способен сделать процесс фотосинтеза на растениях более интенсивным (однако данный результат достигается только в том случае, если имеется определенный генотип). Вследствие этого можно подобрать такой набор генов, при которых появятся растения, характеризующиеся максимальной плодовитостью [ 83,84].



**Рисунок 26. Арбидопсис (Энкхайм) на старте цветения**



**Рисунок 27. Триплекс (на этапе плодоношения)**

Структурно-функциональная специфика всех мутантов арбидопсиса (из тех, что были рассмотрены ранее) является уникальной. Так, триплекс является с точки зрения потенциальной способности к осуществлению фотосинтеза более эффективным, чем исходный арбидопсис расы Энкхайм. Что касается мутанта 58/15, то он не способен осуществлять фотосинтез настолько же интенсивно, что и арбидопсис расы Энкхайм.

При заполнении таблицы использованы средние результаты, которые были получены по итогам опытов, проведенных Якубовой и Юлдошевым, в 1984 году [ 92].

В таблице 2 продемонстрированы данные по продуктивности исходного арбидопсиса расы Энкхайм, а также его мутантов, изучаемых в настоящей работы.

**Таблица 1. Интенсивность протекания фотосинтетического процесса у арбидопсиса (Энкхайм), триплекса, мутанта 58/15**

Объект	Количество CO <sub>2</sub> на:					
	мг на 1 г сырого веса	мкг на 1 г сырого веса	мкг на 1 г хлорофилла	мкг на 1 мм <sup>2</sup>	мкг на 1 г хлоропласта x10 <sup>-12</sup>	мкг на 1 клетку, x10 <sup>-12</sup>
Исходная форма Энкхайм	35,1	325	233,8	57,5	7,4	269,3
Мутант триплекс	47,0	519	300,2	90,9	11,7	492,5
Мутант 58/15	30,0	268	422,7	49,0	6,3	139,5

Таким образом, на нижней позиции по продуктивности располагается мутант 58/15. Большей продуктивностью, чем он, обладает исходный арбидопсис расы Энкхайм. Что касается триплекса, то он имеет значительно большую способность к продуктивности, нежели исходный арбидопсис расы Энкхайм, и мутант 58/15.

**Таблица 2. Показатели продуктивности арбидопсиса расы Энкхайм, триплекса, мутанта 58/15 (в сопоставлении)**

Объект	Число стручков, находящихся на растении	Число семян, имеющих в одном растении
Enkhaïm (исходная раса)	150,7 ± 4,5	6150 ± 76,3
Мутант – 58/15	80,5 ± 2,4	3560 ± 48,9
Мутант - триплекс	250,5 ± 7,5	11250 ± 125,8

На рисунке 26 продемонстрирован внешний вид арбидопсиса расы Энкхайм. На рисунке 28 показан пример мутанта триплекс. А на рисунке 29 продемонстрировано, как выглядит мутант 58/15. Для их выращивания

использовались ящики, которые располагались в оранжерее. На протяжении всего периода выращивания поддерживались такие параметры внешней среды, которые позволяют растениям развиваться максимально быстро (температура внешнего воздуха поддерживалась в пределах значений 21-24 градусов Цельсия, растения находились в почве, на треть состоящей из перегноя, а на оставшуюся часть – из песка, относительная влажность воздуха находилась в пределах 70-80%, освещенность не выходила за рамки 20000-25000 люкс). В процессе исследования анализировалось состояние листьев, находящихся на разных стадиях онтогенеза.

Хлопчатник 108-Ф произрастает на территории Таджикистана на протяжении многих десятилетий. Он обладает листьями, которые имеют светло-зеленый цвет. Что касается формы, то она может быть охарактеризована как пальчато-дольчатая (рис.30). Вследствие того, что на хлопчатнике имеется большое количество листьев, они оказывают затеняющее воздействие друг на друга, перекрывая доступ к свету.

В отличие от растений арабидопсиса хлопчатник очень сложный объект для генетических и физиолого-биохимических исследований [85]. Это обусловлено тем, что по происхождению хлопчатник вида *Gossypium hirsutum* L. Является амфидиплоидом с кариотином  $2n=52$ , состоящим из двух геномов (ААДД), гомологичных геномом диплоидных видов Старого света ( $2n=26$ ) геном (АА) и Нового света ( $2n=26$ ; геном ДД).

В процессе выращивания хлопчатника обеспечивалось неукоснительное соблюдение всех агротехнических правил. Поля, на которых производился хлопчатник, относятся к Институту ботаники, входящему в состав АН РТ (высота над уровнем моря составляет 830 метров).





**Рисунок 28. Мутант 58/15 (на стадии плодотворения).**



**Рисунок 29. Произрастание арабидопсиса в специально подготовленной почве.**



**Рисунок 30 Хлопчатник 108-Ф (фотография сделана в фазе завершающего плодообразования)**

## **2.2. Исследовательские методы**

### **2.2.1. Реактивы**

В процессе осуществления работы применялось большое количество реактивов, среди которых можно выделить такие, как рибозо- (рибулозо-) 5-фосфат, рибулозо-5-(би)фосфат, рибулозо-1,5-бисфосфат, АТФ, альбумин, поливинилпирролидон. Для обеспечения гель-хроматографии и фильтрации применялись различные сефадексы, которые выпускались шведским брендом Pharmacia.

В процессе проведения исследования использовались также и реактивы, имеющие отечественное происхождение. Это были, например, аммониевый сульфат, дигидрофосфат калия, а также аммониевый молибдат. Подготовка сефадексов осуществлялась в соответствии с рекомендациями, которые изложены в руководстве по энзимологии за авторством Г. Кочетова [ 42].

### **2.2.2. Микроопределение количественного содержания белка с биуретовым реактивом**

Используемый метод базируется на формировании продуктов, обладающих характерной окраской, после проведения биуретовой реакции. Появление характерной окраски обуславливается тем, что белок характеризуется наличием пептидных связей. То, насколько ярко выраженной является получаемая окраска, зависит от объема содержащегося белка. Реактив, используемый с целью осуществления микроопределения, называется реактивом Бенедикта. На высокочувствительном спектрофотометре ULTROSPEC II (ЛКВ, Швеция) велись измерения при длине волны 330 нм [21].

### **2.2.3. Определение неорганического фосфора**

Чтобы определить концентрацию неорганического фосфора, необходимо воспользоваться методикой, впервые предложенной Фиске-Субарроу (в модификации, разработанной Скулачевым) [42].

Фосфор неорганического происхождения, который имеется в каждой пробе, оперативно демонстрирует реакцию в ответ на взаимодействие с молибденовой кислотой. В результате данного химического контакта появляется фосфорно-молибденовая кислота. Впоследствии она подвергается восстановлению, в результате чего появляется конечный продукт, обладающий ярко-синей окраской. Для обеспечения восстановления применялась аскорбиновая кислота (модификация Скулачева).

То, насколько ярким является синий цвет, определяется количеством содержащегося фосфора неорганического происхождения. Чтобы сформировать калибровочный график, необходимо применить базовые растворы  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , отличающиеся друг от друга по количеству имеющегося в них фосфора неорганического происхождения. Для осуществления измерения применялось спектрофотометрическое оборудование, а длина волны превышала 750 нм.

### **2.2.4. Определение активности рибозофосфатизомеразы**

Определение того, насколько значительную активность демонстрирует рибозофосфатизомераза, осуществлялось в соответствии с подвергнутой изменению методикой Янга, Аксельрода. В составе смеси, подготовленной для проведения реакции, имелось 0.02 М трис-НСl буфер, рН 7,6, мкг белка и 10 мкмоль Р5Ф. Изомеризационное взаимодействие осуществлялось на протяжении 60 секунд при температуре внешней среды, равняющейся 30 градусам Цельсия.



Результатом описанного выше взаимодействия становился кетосахар. Определение его количества осуществлялось через использование карбазольной методики (в соответствии с реакцией, предложенной Диппе) [102]. Для этого к конечному продукту описанного в предыдущем абзаце взаимодействия добавляли серную кислоту (3%, объем – 0,1 мл); раствор цистеин- HCl (0,1%, объем – 0,1 мл); раствор карбазола (0,12%, объем – 0,1 мл). Когда значение температуры внешней среды составляло 50 градусов Цельсия, а реакция осуществлялась на протяжении получаса, то окраска становилась наиболее интенсивной. После остывания растворов, измерялась экстинция (при этом применялось фотоэлектрометрическое или спектрофотометрическое оборудование, обеспечивающее волну длиной 540 нм). Активность рибозофосфатизомеразы выражали в мкмоль рибулозо-5-фосфата, образующегося в минуту в расчете на 1 мг белка [21].

### **2.2.5. Определение активности фосфорibuлокиназы**

Для расчета того, какой активностью характеризуется фосфорibuлокиназа, использовалась методика, предложенная Гурвицем совместно с сотрудниками его научной лаборатории [112]. (для целей данного исследования методика была подвергнута незначительному изменению). Производилось инкубирование фермента в среде, которая содержала 0,025 М трис- HCl буфером, pH 8.0, 0,03 М АТФ, 0,004 М MgCl<sub>2</sub> и 0,001 М ДТТ. В процессе инкубирования фермента температура окружающей среды составляла 37 градусов Цельсия, продолжительность обработки равнялась 180 секундам. Как только она завершалась, в смесь вносился второй субстрат– Ру5Ф (0,1-20 мкмоль). Длительность начинавшегося взаимодействия составляла 60 секунд, после завершения которых реакция принудительно останавливалась (посредством внесения в получившуюся среду ТХУ с массовой долей 6%). Нейтрализация итоговой

смеси обеспечивалась посредством применения натриевого бикарбоната. Чтобы идентифицировать фосфор, являющийся щелочегидролизуемым, осуществлялся отбор проб (объемом по 0,2 мл каждая), после чего они подвергались гидролизу на протяжении 20 минут (взаимодействующим агентом являлся гидроксид натрия, взятый в количестве 0,2 мл). Для нейтрализации полученной смеси применялась соляная кислота, взятая в объеме 1,2 мл. После этого вносилась дистиллированная вода (объем – 0,7 мл), аммониевый молибдат (0,4 мл, концентрация – 2,5%), аскорбиновая кислота (0,1 мл, концентрация – 1%). Чтобы добиться появления окраски, осуществлялось выдерживание пробы на протяжении 300 секунд (нагрев внешней среды был установлен на отметке в 37 градусов Цельсия). После этого производилось охлаждение жидкости, длившееся 600 секунд. Для проведения измерений при длине волны 750 нм использовалось фотоэлектрометрическое или спектрофотометрическое оборудование модели ULTROSPEC II. Активность фосфорибулокиназы выражали в мкмоль рибулозо-1,5-бисфосфата в минуту  $E_1$  в расчете на 1 мг белка [21] .

#### **2.2.6. Определение активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы спектрофотометрическим методом**

Для определения того, насколько активной является РБФК/О, использовалась методика, впервые разработанная Рэкером и впоследствии подвергнутая видоизменению А. Романовой [73]. Суть метода заключается в нахождении количества 3-ФГК, на 1 моль которой окисляется 1 моль НАДН. В качестве мерки активности, проявляемой РБФК/О, используется темп снижения оптической плотности.

Для осуществления измерений использовалось спектрофотометрическое оборудование модели ULTROSPEC II. ГАФД.

### **2.2.7. Получение, проведение очистки многоферментного комплекса из листьев хлопчатника**

В процессе выделения ферментов из хлопчатника применялись такие способы очистки, которые рассматриваются в качестве общепринятых. Однако поскольку листья данного растения обладают специфическими особенностями, порядок выделения из них экстракта был определенным образом трансформирован. Необходимость внесения корректировок обосновывается тем, что после того, как хлопчатник начинает формировать бутоны, понять, какую активность демонстрируют его ферменты, невозможно (в листьях начинает содержаться слишком большое количество фенольных веществ). Когда листья хлопчатника подвергаются гомогенизации, то происходит деструкция естественных адсорбентов для фенольных веществ. Вследствие этого увеличивается кислотность формирующейся среды, а цвет начинает приобретать бурый оттенок. Чтобы не допустить такого исхода, заранее были определены такие значения рН, которые являются допустимыми. Кроме того, уже перед стартом работы было подсчитано, как должны соотноситься между собой листья и буфер. В процессе получения препаратов применялся двууглекислый натрий, внесение которого требовалось для недопущения инактивации РБФК/О.

Чтобы сформировать экстракт, использовались листья хлопчатника массой 50 граммов. Предварительно из каждого листа удалялись средние жилки. Для удаления загрязнений и прочих мешающих проведению исследования веществ, листья хлопчатника были подвергнуты промыванию в дистиллированной воде, а также понижению температуры до 0 градусов Цельсия. После завершения такой обработки была осуществлена растирка листьев в ступке из фарфора с внесением 75 мл 0,1 М трис-НСl буфера, рН 8,5 содержащим 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,0005

М ЭДТА, 0,01 М ДТТ, 0,01 М  $\text{NaHCO}_3$ , 1% ПВП. Гомогенат, который формировался по итогам растирки, подвергался отжиманию (для этого применялся кусок капронового материала), а затем определяет его объем и показатель рН. После этого гомогенат помещался в центрифужное оборудование и вращался на протяжении 40 минут в режиме 18 тысяч оборотов ежеминутно. Затем, как только гомогенат доставался из центрифуги, рассчитывалось, сколько белка в нем содержится, какую рибозофосфатизомеразную, фосфорибулокиназную и рибулозо-бис-фосфаткарбоксилазную активность он проявляет. Что касается иной части супернатанта, то она, как и до этого, очищалась.

Для получения экстракта из арбидопсиса применялся аналогичный метод. Однако в этом случае в буфер не вносилось такое вещество, как поливинилпирролидон.

**Гель-фильтрация.** Чтобы убрать поливинилпирролидон, вследствие наличия которого фенольные вещества подвергались адсорбции, экстракт пропускали через колонку, где имелся заранее подготовленный сефадекс модели G50. Элюат, характеризующийся прозрачностью и обладающий светло-зеленым оттенком, собирался до того момента, как из колонки начинали выходить фенольные комплексы, имеющие темный окрас.

**Фракционирование аммониевым сульфатом.** Внесение аммониевого сульфата (с массовой долей 30-50%) осуществлялось посредством применения мешалки магнитного типа при температуре, равной стандартным комнатным условиям. Протяженность перемешивания составила полчаса. Затем супернатант удалялся, а полученный осадок подвергался растворению в буфере Б.

**Удаление солей из ферментного препарата.** Осуществление гель-хроматографии требует того, чтобы в обрабатываемой смеси не имелось аммониевого сульфата. Для удаления солей применялась колонка,

имеющая геометрические размеры 0,3\*0,025 см. Она полностью была заполнена сефадексом марки G50, а также буфером Б. Сбор элюата завершался в тот момент, когда начинал выходить аммониевый сульфат.

**Гель-хроматография.** Элюат, который был подготовлен на предыдущем этапе, вносился в колонку, которая обладала геометрическими размерами 0,55\*0,03 см. В ней имелся сефадекс марки G150 (допускалось также применение сефадекса марки G200), которая была уравновешена за счет использования буфера В. Количество получаемого белкового соединения регистрировалось посредством использования спектрофотометрического оборудования (ISCO-UA-5, США). В фракциях, которые удалось собрать, определялось количество белка. Кроме того, рассчитывалось, насколько данные фракции являются активными с точки зрения активности ферментов. Фракции, продемонстрировавшие наибольшую активность, подвергались объединению.

На рисунке 31 продемонстрировано описание алгоритма, позволяющего получать свободный многоферментный комплекс.

**Буферные смеси, позволяющие получать и очищать  
многоферментный комплекс**

Буфер «А» для выделения

0,1 М трис-НСl, рН-8,5

0,2 М NaCl,

0,01 М MgCl<sub>2</sub>,

0,0005 М ЭДТА

0,01 М NaHCO<sub>3</sub>,

перед тем, как приступить к

выделению, необходимо внести

0,01 М ДТТ,

1% ПВП (для хлопчатника)

Буфер «В» для гель-хроматографии

0,025 М трис-НСl, рН-8,3

0,01 М MgCl<sub>2</sub>,

0,0005 М ЭДТА

0,01 М ДТТ (перед хроматографией)

Буфер «Б» (для осуществления  
гель-фильтрации)

0,05 М трис-НСl, рН-8,3

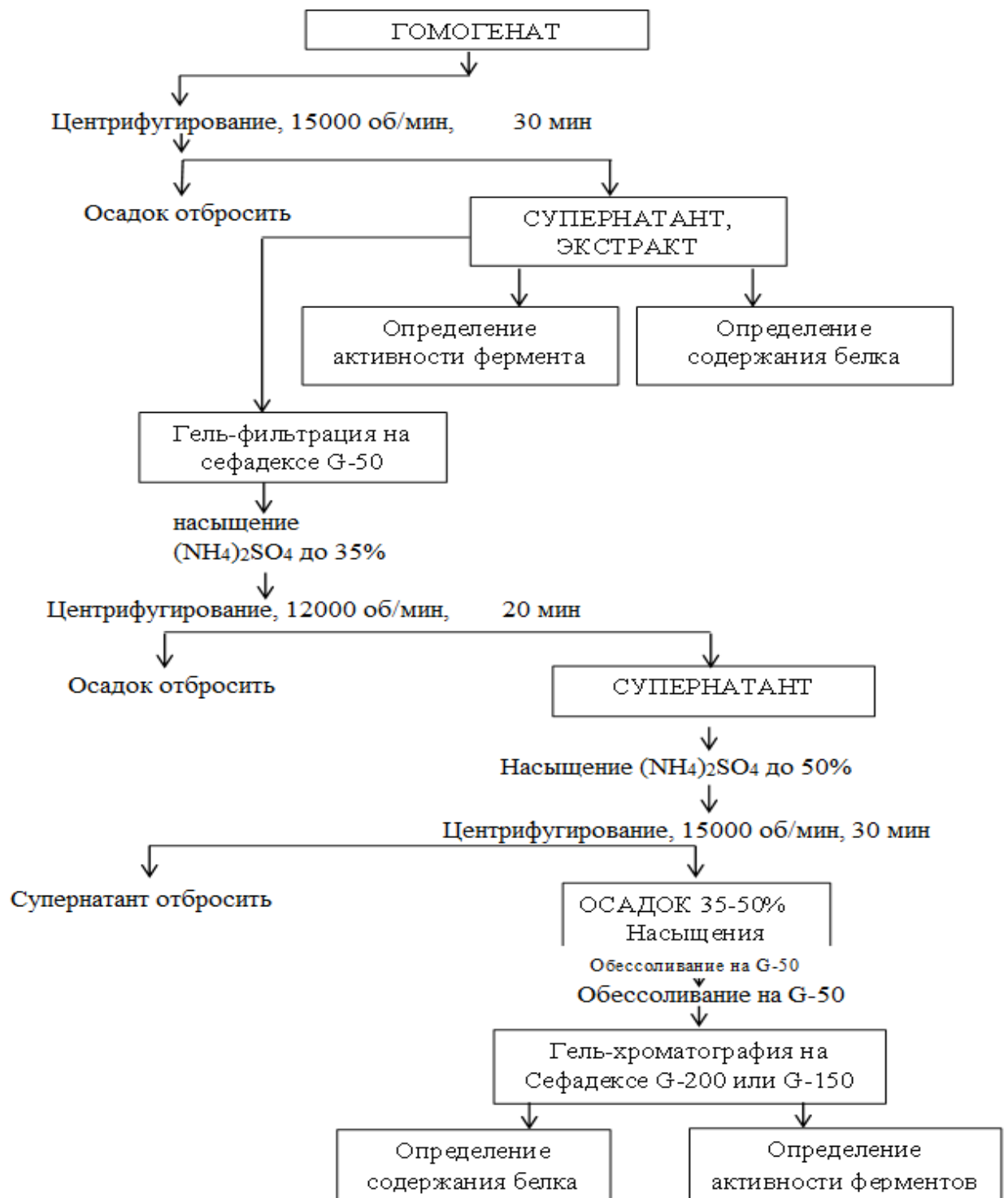
0,2 М NaCl,

0,01 М MgCl<sub>2</sub>,

0,0005 М ЭДТА

0,01 М NaHCO<sub>3</sub>,

0,01 М ДТТ (перед фильтрацией)



**Рисунок 31. Модифицированная схема выделения и очистки свободного мультиферментного комплекса (Бабаджанова М.А., 1990)**

## **2.8. Статистическая обработка результатов**

Данные, которые были получены в результате осуществления описанных выше действий, подвергнуты статистической обработке. Она велась в соответствии с формулами, описанными в издании за авторством Г. Максимова и В. Полевого (опубликовано в 1978 году).

Отметим, что данные, которые были получены в результате осуществления статистической обработки, могут считаться достоверными, если доверительная вероятность находится в диапазоне 97-99%. [ 52,86].



### **ГЛАВА 3. КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АКТИВНОСТЕЙ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ АРАБИДОПСИСА РАСЫ ЭНКХАЙМ**

Поскольку целью данной работы являлось изучение влияния кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев, вначале необходимо было выявить концентрации компонентов реакционной среды и условия, при которых проявлялась бы максимальная активность каждого из ферментов мультиферментного комплекса в отдельности.

В данной главе приведены результаты исследования влияния длительности реакции, количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде на активность рибозофосфатизомеразы, фосфорibuлокиназы и карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса.

#### **3.1. Выявление оптимальных условий реакционной среды для проявления рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса**

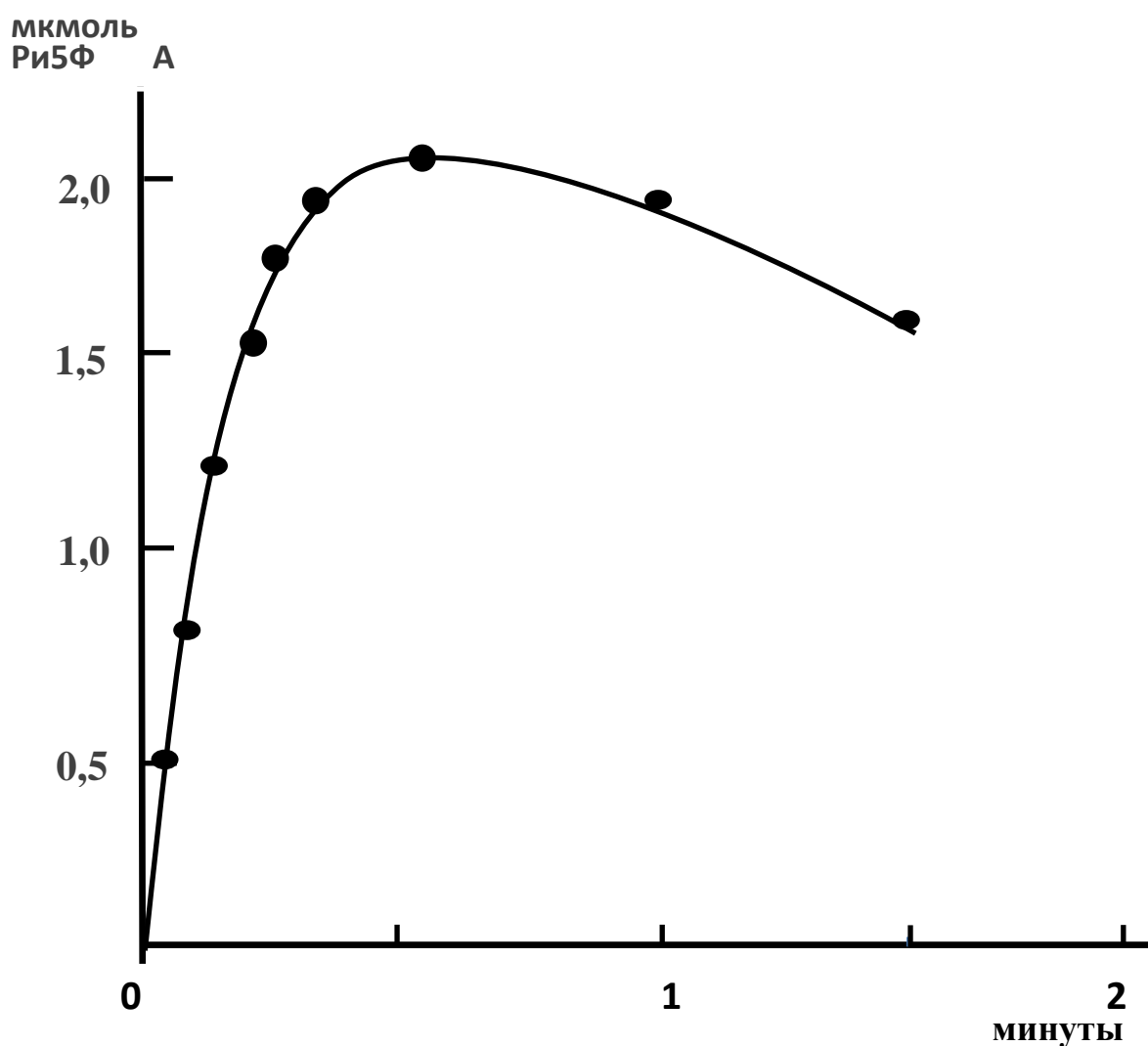
##### **3.1.1. Зависимость от длительности реакции рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса.**

###### **Исследование кинетики ферментативных реакций**

Изучение зависимости от длительности реакции активности рибозофосфатизомеразы комплекса ферментов проводилось при физиологических концентрациях рибозо-5-фосфата и уменьшенных количествах белка в реакционной среде, чтобы соблюдать в экстракте из листьев арабидопсиса расы Энкхайм проводилось при физиологических

концентрациях рибозо-5-фосфата и уменьшенных количествах белка в реакционной среде, чтобы соблюдалась насыщающая концентрация субстрата.

На рисунке 32 продемонстрированы результаты, которые были получены после исследования процесса аккумуляции рибулозо-5-фосфата при протекании рибозофосфатизомеразной реакции.



**Рисунок 31. Количество рибулозо-5-фосфата, накапливающегося в зависимости от длительности протекания рибулозофосфатизомеразной реакции в экстракте из листьев арабидопсиса расы Энкхайм**

Анализ данных, которые продемонстрированы на рисунке 31, позволяет прийти к выводу, что кривая не имеет гиперболического характера. После того, как проходит 15 секунд с начала реакции, резкий рост количества накапливаемого вещества приостанавливается, после чего график выходит на плато. В течение 15-30 секунд количество рибулозо-5-фосфата при протекании рибозофосфатизомеразной реакции не меняется. А затем многоферментный комплекс начал демонстрировать сниженную активность, из-за которой количество рибулозо-5-фосфата при протекании рибозофосфатизомеразной реакции становилось меньшим. Таким образом, можно сделать вывод, в соответствии с которым рибозофосфатизомераза представляет собой фермент, чья активность описывается сложными законами.

Что касается дальнейших научных разработок, предпринятых в ходе выполнения данной работы, то определено, что исследовать рибозофосфатизомеразную активность полиферментного комплекса особенно пристально необходимо в течение периода, ограниченного 31-й и 60-й секундами после начала реакции.

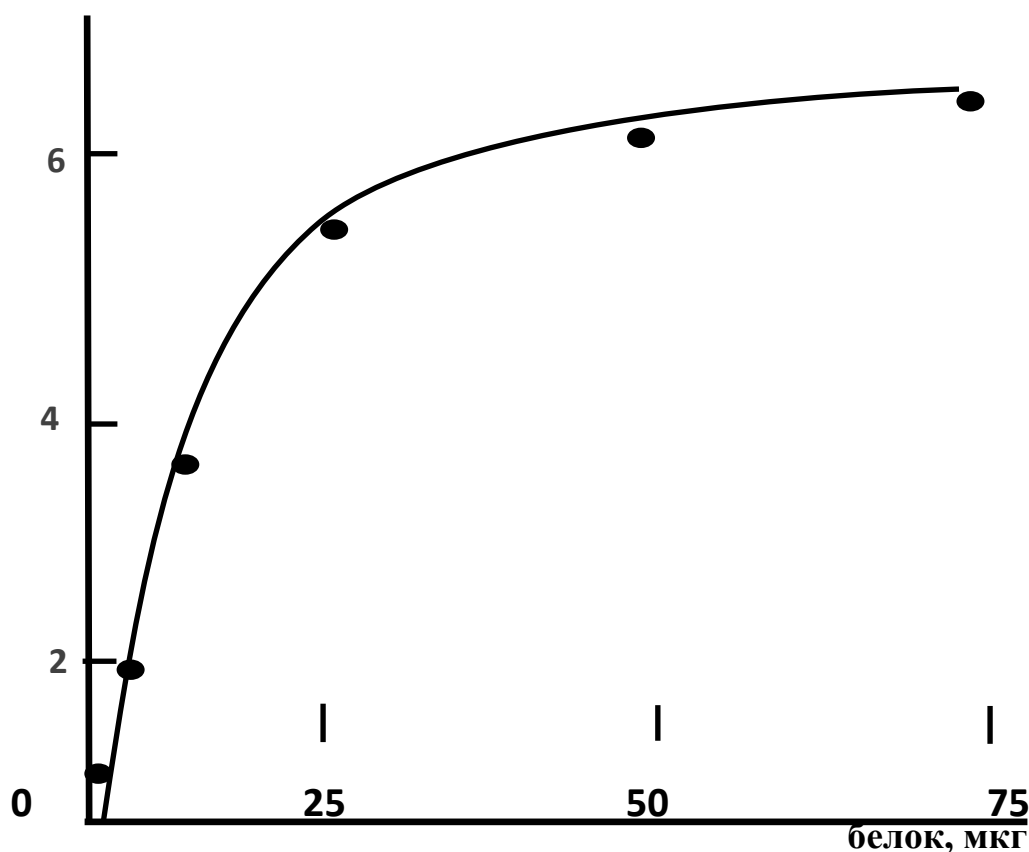
### **3.1.2. Влияние количества белка в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность полиферментного комплекса**

В рамках настоящего исследования должен быть разрешен вопрос о том, как изменение количества белка сказывается на рибозофосфатизомеразной активности, полиферментного комплекса при концентрации рибозо-5-фосфата 10 мкмоль/мл.

Результаты, полученные в ходе проведения такого изучения, приведены на рисунке 32.

Как следует из анализа данных, продемонстрированных на рисунке 32, график, описывающий зависимость между количеством белка и проявляемой рибозофосфатизомеразой активностью, не может считаться гиперболическим. Так, в случае, когда количество белка, вносимого в среду реакции, плавно возрастал (вследствие чего его масса повышалась от 1 до 10 мкг), фермент демонстрировал прямо пропорциональный прирост активности. Однако после того, как количество вносимого в реакционную среду белка превышало 10 мкг, фермент начинали показывать меньшую активность. Таким образом, можно сформулировать вывод, в соответствии с которым после достижения массы белка в 10 мкг полиферментный комплекс начинал демонстрировать меньшую активность.

мкмоль  
Ри5Ф/мин А



**Рисунок 32. Влияние количества белка на активность полиферментного комплекса**

В случае, если масса белка, который вносился в среду реакции, составляла 25-75 мкг, активность полиферментного комплекса практически не менялась (иными словами, имело место плато на графике). В этом случае молекулы, фермента становились полностью насыщенными субстратом.

Таким образом, в ходе проведения дальнейших исследований на каждый 1 мл среды, подготавливаемой для осуществления реакций, использовалось 10 мкг белка.

### **3.1.3. Воздействие изменения концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность, мультиферментным комплекса**

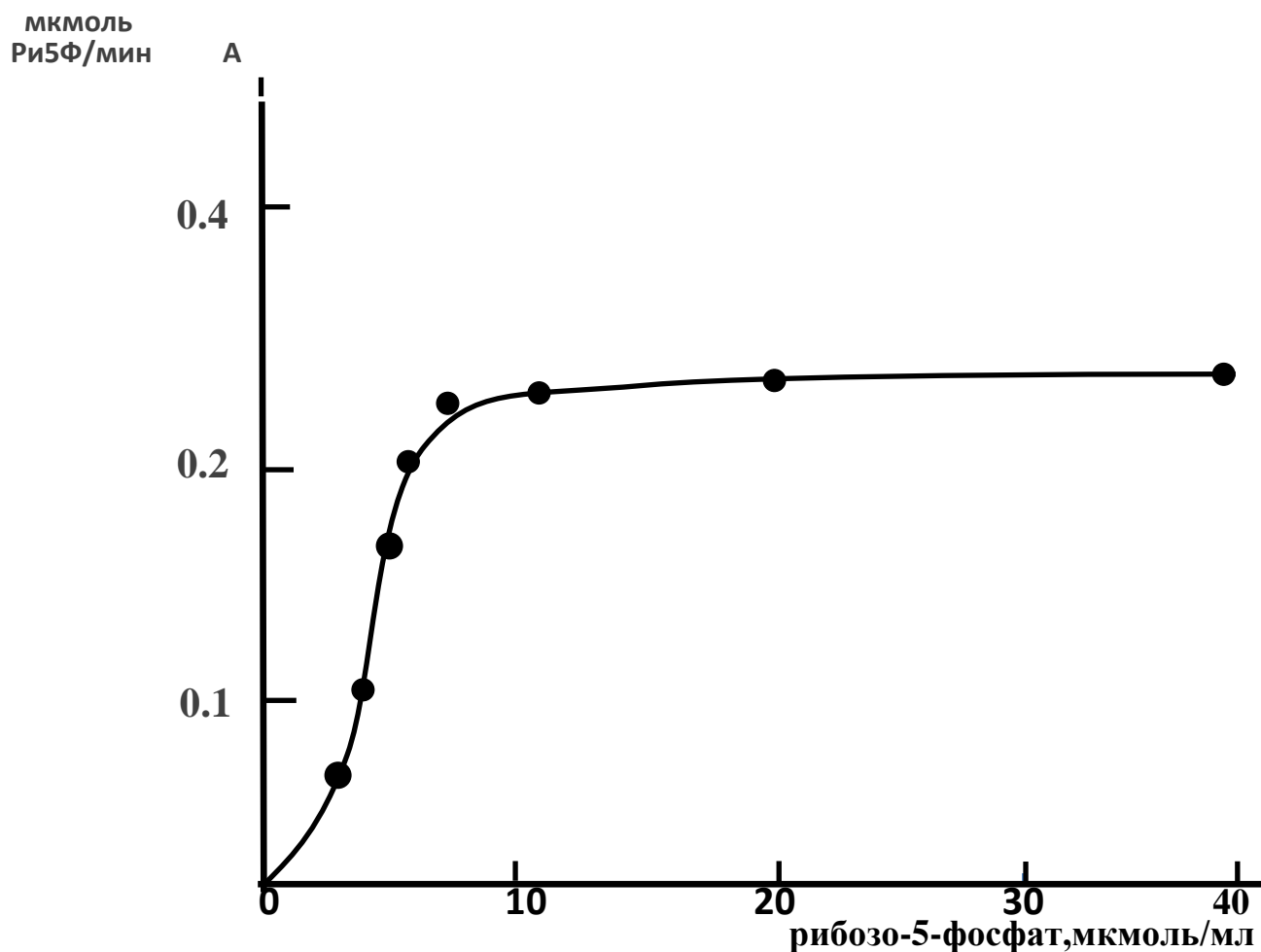
Для определения того, как количество рибозо-5-фосфата сказывается на демонстрируемой полиферментным комплексом активности, создавались условия, когда фермент может проявить всю имеющуюся у него активность.

Результаты определения того, как изменение количества рибозо-5-фосфата, вносимого в среду проведения реакции, сказывалось на демонстрируемой полиферментным комплексом активности, показаны на рисунке 33.

Изучение информации, которая показана на рисунке 33, предоставляет возможность прийти к следующим выводам. Во-первых, график, демонстрирующий, как именно скорость протекания химической реакции (обозначается как  $V$ ) меняется в зависимости от концентрации вносимого в среду реакции субстратного материала ( $S_0$ ), может быть охарактеризован как S-образный. В результате исследований, которые были предприняты большим количеством специалистов, определено наличие большого количества достоинств у сигмоидной кинетики. Обусловлено это тем, что благодаря сигмоидной кинетике у белков,

входящих в состав организма, начинает улучшаться функциональная роль [51,53].

Как демонстрируют данные, полученные по итогам осуществления эксперимента, рибозофосфатизомеразу необходимо считать ферментом аллостерического типа (что противоречит ранее имевшимся представлениям, в соответствии с которым она считалась ферментом нерегуляторного типа). Тот факт, что график, показывающий, как скорость протекания химической реакции  $V$  меняется в зависимости от концентрации вносимого в среду реакции субстратного материала  $S$ , является сигмоидным, показывает следующее: субъединицы, входящие в состав фермента, взаимодействуют между собой в кооперативном порядке. Таким образом, в ситуации, когда одна из молекул субстрата оказывается связанной, то происходит повышение интенсивности взаимодействия между субстратом и ферментом. В результате кооперативного взаимодействия субъединиц фермента связывание одной молекулы субстрата повышает сродство фермента ( $K_m$ ) к другим молекулам субстрата. В результате этого при меньшей концентрации субстрата достигается максимальная скорость реакции.



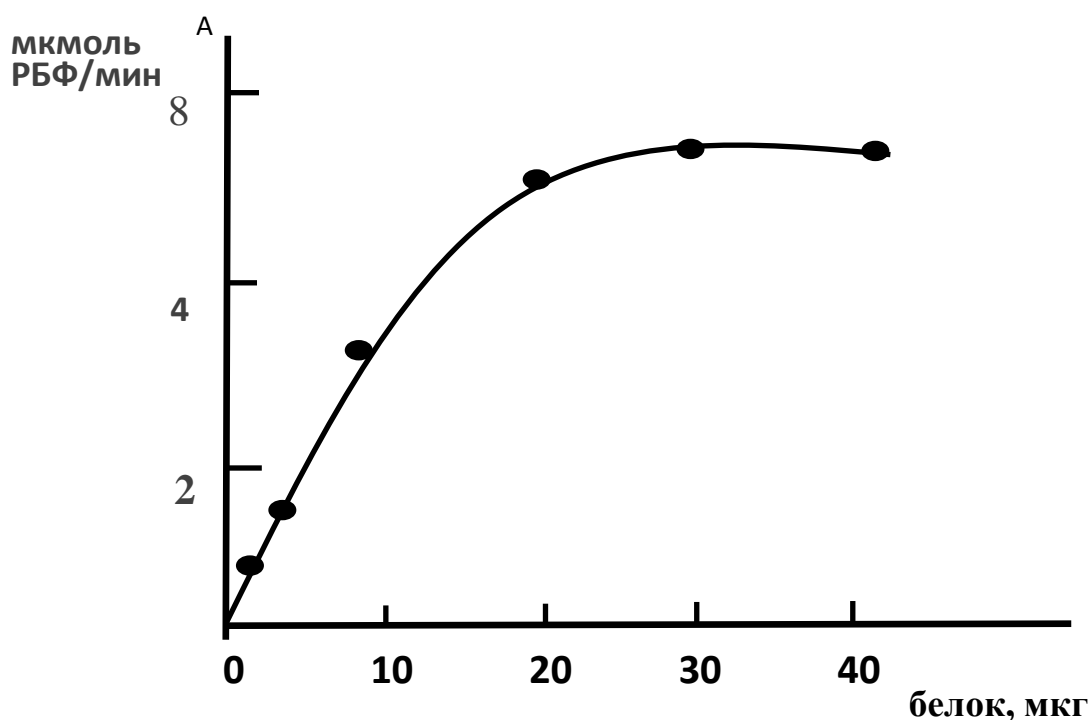
**Рисунок 33.** Влияние концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

На основании результатов, приведенных на рис. 33, оптимальной концентрацией рибозо-5-фосфата для рибозофосфатизомеразы мультиферментного комплекса в экстракте из листьев арабидопсиса расы Энкхайм являлось 10 мкмоль/мл реакционной среды. Эта концентрация рибозо-5-фосфата в мл реакционной среды использовалась для дальнейших исследований. [ 22,26].

### 3.2. Влияние условий реакционной среды для проявление фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм

#### 3.2.1. Влияние количества белка в реакционной среде на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса

На рисунке 34 приведены результаты изучения влияния количества белка в реакционной среде на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.



**Рисунок 34.** Зависимость фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина из листьев арабидопсиса расы Энкхайм от концентрации белка в реакционной среде.

Как видно из представленных на рис. 34 данных, кривая зависимости активности фосфорibuлокиназы мультиферментного комплекса от количества белка в реакционной среде не имела классическую



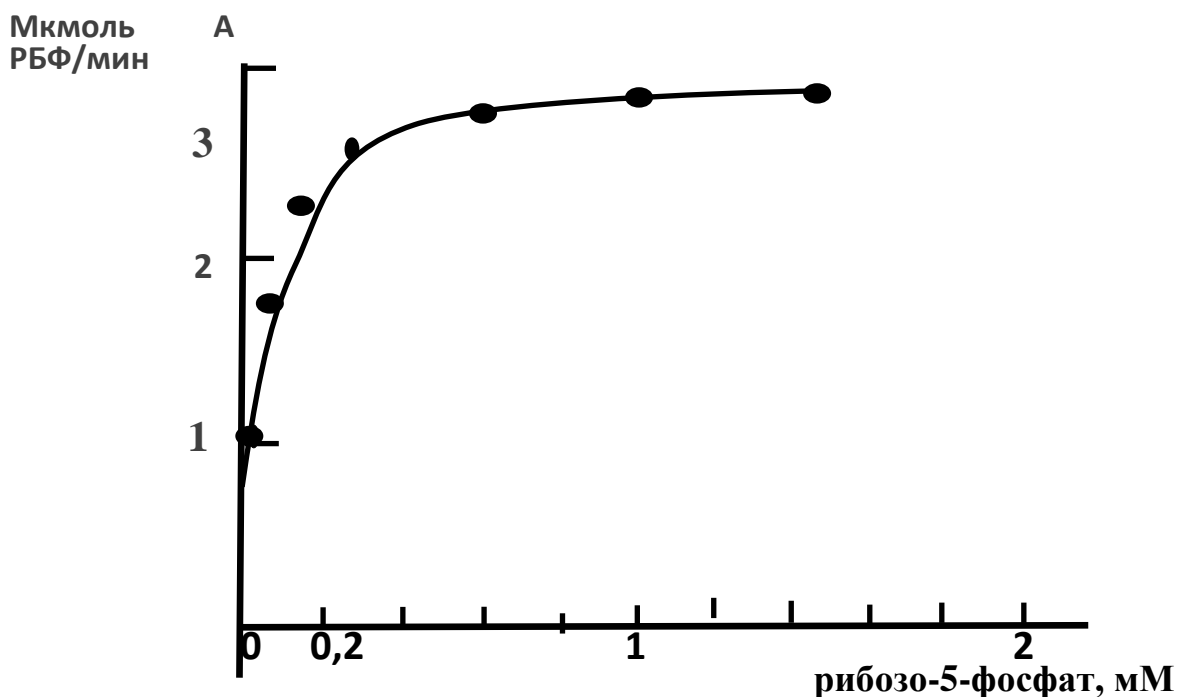
гиперболическую форму. Уже в пределах количества белка от 1 до 10 мкг не наблюдалось прямо пропорционального возрастания активности фермента. Увеличение количества белка до 20 мкг белка в мл реакционной среды приводило к снижению фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса. При дальнейшем увеличении количества белка до 30 и 40 мкг на мл реакционной среды наблюдался выход на плато скорости фосфорибулокиназной реакции, т.е. все молекулы фермента полностью насыщены субстратом.

На основании полученных данных можно считать, что наибольшая фосфорибулокиназная активность мультиферментного комплекса проявилась при количестве белка 10 мкг на мл реакционной среды. При этом количестве белка в реакционной среде проводили дальнейшие исследования.

### **3.2.2. Зависимость от концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса**

При длительности реакции 1 минута и концентрации белка 10 мкг в 1 мл реакционной среды исследовали влияние концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстракте из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

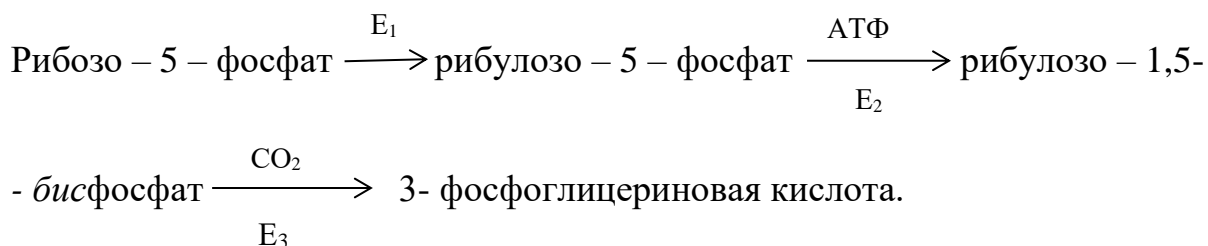
Результаты изучения зависимости от концентрации рибозо-5-фосфата скорости ферментативной реакции, катализируемой фосфорибулокиназой экстракта из листьев арабидопсиса расы Энкхайм представлены на рис. 35.



**Рисунок 35.** Зависимость фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина из листьев арабидопсиса расы Энкхайм от концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде.

Как видно из приведенных на рис.35 данных, форма кривой отличается от гиперболической и характеризуется быстрым насыщением фермента субстратом уже при концентрации субстрата 0,25 мМ. и последующим выходом на плато, т.е. постоянный уровень.

Представленные результаты дают основание считать, что рибозо-5-фосфат повышает скорость фосфорибулокиназной реакции, являющейся второй после рибозофосфатизомеразной в данной метаболической цепи цикла Кальвина, т.е. выполняет роль эффектора.



Результаты являются подтверждением преимуществ образования ферментами мультиферментного комплекса, в котором реакции протекают с более высокой скоростью, чем катализируемые свободными формами ферментов. [94]. Это обусловлено тем, что при связывание рибозо-5-фосфата с аллостерическим центром рибозофосфатизомеразы, первого фермента  $E_1$  данного мультиферментного комплекса, вызывает координированные конформационные изменения (рис.25) и у второго фермента  $E_2$  – фосфорибулокиназы. Вследствие этого изменяются кинетические параметры –  $V_{max}$  и  $K_M$  фосфорибулокиназы, т.е. при малых концентрациях рибозо-5-фосфата достигается максимальная скорость фосфорибулокиназной реакции.

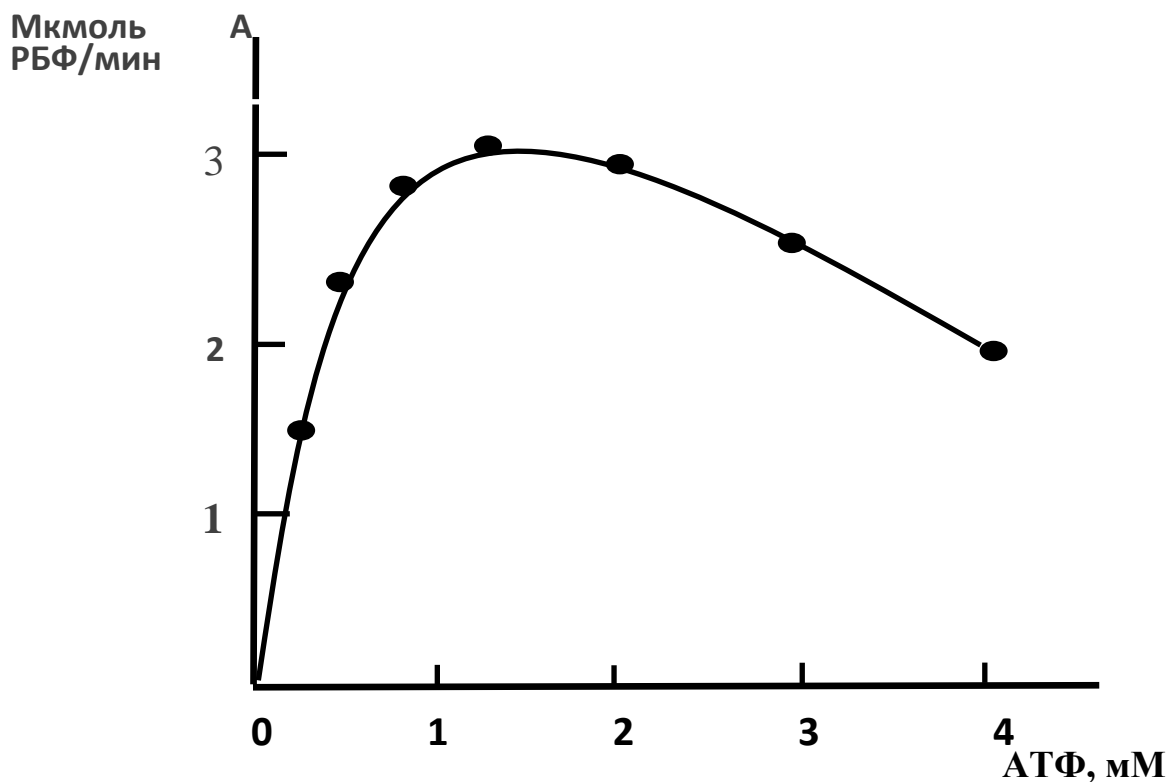
На основании полученных результатов в дальнейших исследованиях нами использовалась концентрация рибозо-5-фосфата 0,5-1 мМ в мл реакционной среды.

### **3.2.3. Влияние концентрации АТФ в реакционной среде на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса**

На рисунке 36 представлены результаты изучения зависимости от концентрации АТФ в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

Из приведенных на рис. 36 данных видно, что на кривой изменения активности фосфорибулокиназы в зависимости от концентрации АТФ не имеется сильных загибов. При концентрациях АТФ в реакционной среде от 0.1 до 1 мМ фосфорибулокиназная активность возрастала, в пределах концентраций АТФ от 1 мМ до 2 мМ наблюдалось насыщение фермента субстратом. При значительных концентрациях АТФ, выше 2 мМ, фосфорибулокиназная активность снижалось. Полученные результаты

дают основание считать, что АТФ является не только субстратом реакции, но и активатором фосфорибулокиназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса.



**Рисунок 36.** Зависимость от концентрации АТФ в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

В дальнейших исследованиях нами использовалась концентрация АТФ 1 мМ на 1 мл реакционной среды.

**3.3. Изучение оптимальных условий реакционной среды для проявления карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса**

### 3.3.1. Влияние продолжительности реакции на проявление карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса

Карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса определяли после инкубации всех компонентов реакционной среды в течение 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 16 минут.

**Таблица 3. Влияние длительности реакции на проявление карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РБФК/О) мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм (субстрат рибулозо-5-фосфат + АТФ)**

Длительность реакции, минуты	Активность РБФК/О в мкмоль CO <sub>2</sub> на	
	мг белка	мин на 1 мг белка
1	0,025±0,001	0,025±0,001
2	0,044±0,001	0,022±0,001
4	0,049±0,001	0,012±0,0005
6	0,059±0,001	0,009±0,0005
8	0,060±0,001	0,007±0,0005
12	0,082±0,002	0,007±0,0005
16	0,084±0,002	0,005±0,0005

В таблице 3 приведены результаты исследования зависимости от длительности реакции скорости карбоксилазной реакции, катализируемой рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой/оксигеназы в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм. Из представленных в таблице данных, видно, что скорость реакции снижалась через одну минутку. Следовательно, компоненты реакционной среды находились в оптимальном соотношении в течение 0,5-1 минуты. Скорость реакции не являлась линейной, т.е. количество продукта, образовавшегося за одну минуту не увеличивалось вдвое за 2 минуты, втрое за 3 минуты и т.д. На основании полученных данных изучение влияния различных факторов на скорость карбоксилазной реакции рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса проводилось в течение 1 минуты.

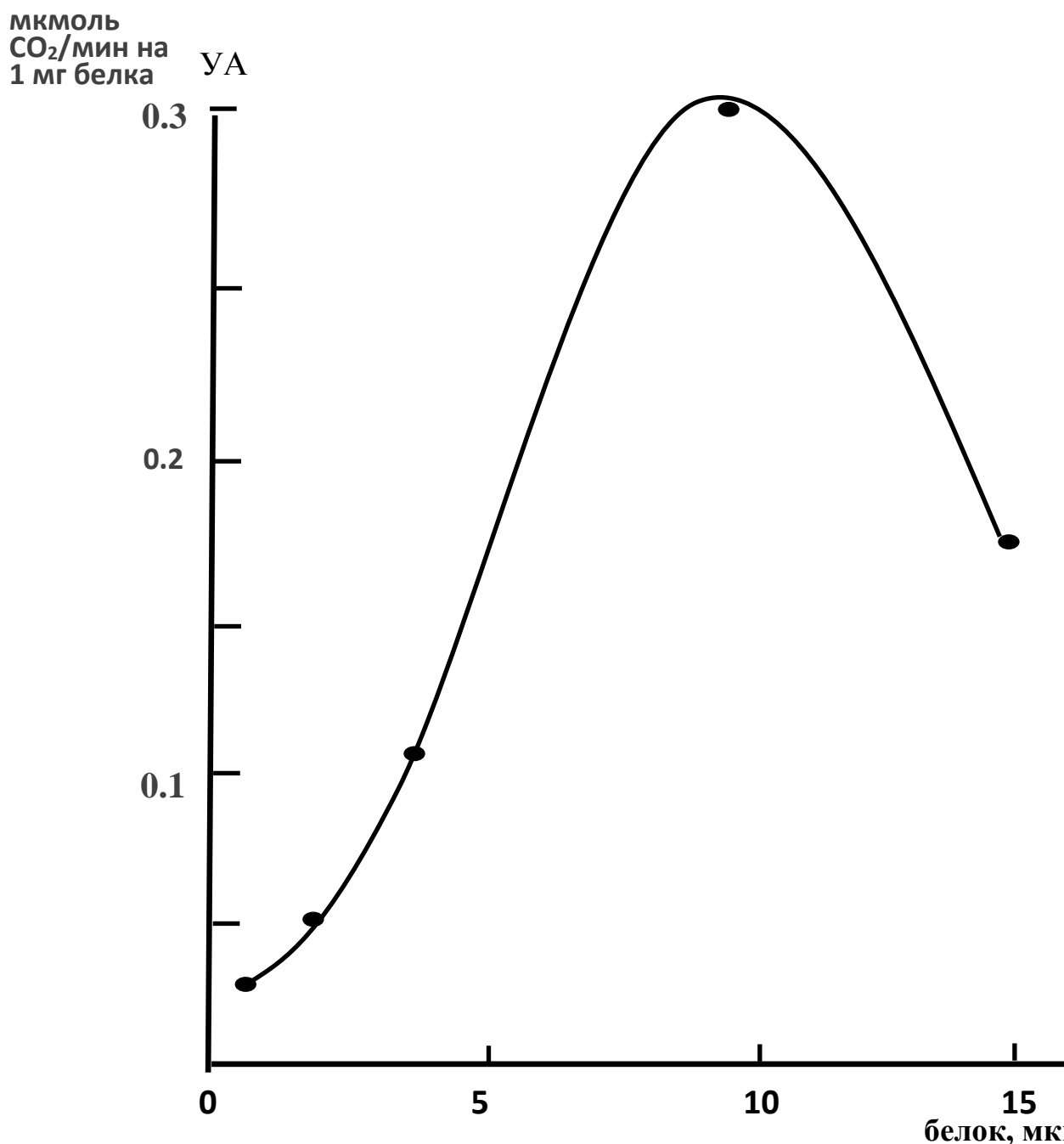
### **3.3.2. Зависимость от количества белка в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бис-фосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) мультиферментного комплекса**

Влияние количества белка на проявление карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм было изучено нами при содержании в мл реакционной среды 10 мкмоль рибозо-5-фосфата, 10 мкмоль АТФ и длительности реакции 1 минута.

Результаты изучения зависимости карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бис-фосфаткарбоксилазы от концентрации белка в реакционной среде представлены на рис.37.

Как видно из приведенных на рис.37 данных кривая зависимости карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы от количества белка в реакционной среде не имела гиперболическую форму, а была классической сигмоидной формы. В пределах количества

белка в мл реакционной среды 1-2 мкг наблюдались кооперативные эффекты взаимодействия субъединиц фермента, индицируемые присоединением молекул субстрата. При увеличении количества белка в реакционной среде до 5-10 мкг карбоксилазная активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы возрастала. Максимальная скорость реакции достигалась при количестве белка в мл реакционной среды 10 мкг. Дальнейшее увеличение количества белка в мл реакционной среде приводило к резкому снижению скорости карбоксилазной реакции. Следовательно в данных условиях реакционной среды оптимальным количеством белка для проявления карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса являлось 10 мкг. В дальнейших исследованиях использовалось 10 мкг белка в мл реакционной среды.



**Рисунок 37. Влияние количества белка в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулзобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.**

**3.3.3. Влияние концентрации углекислоты в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулзобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса**

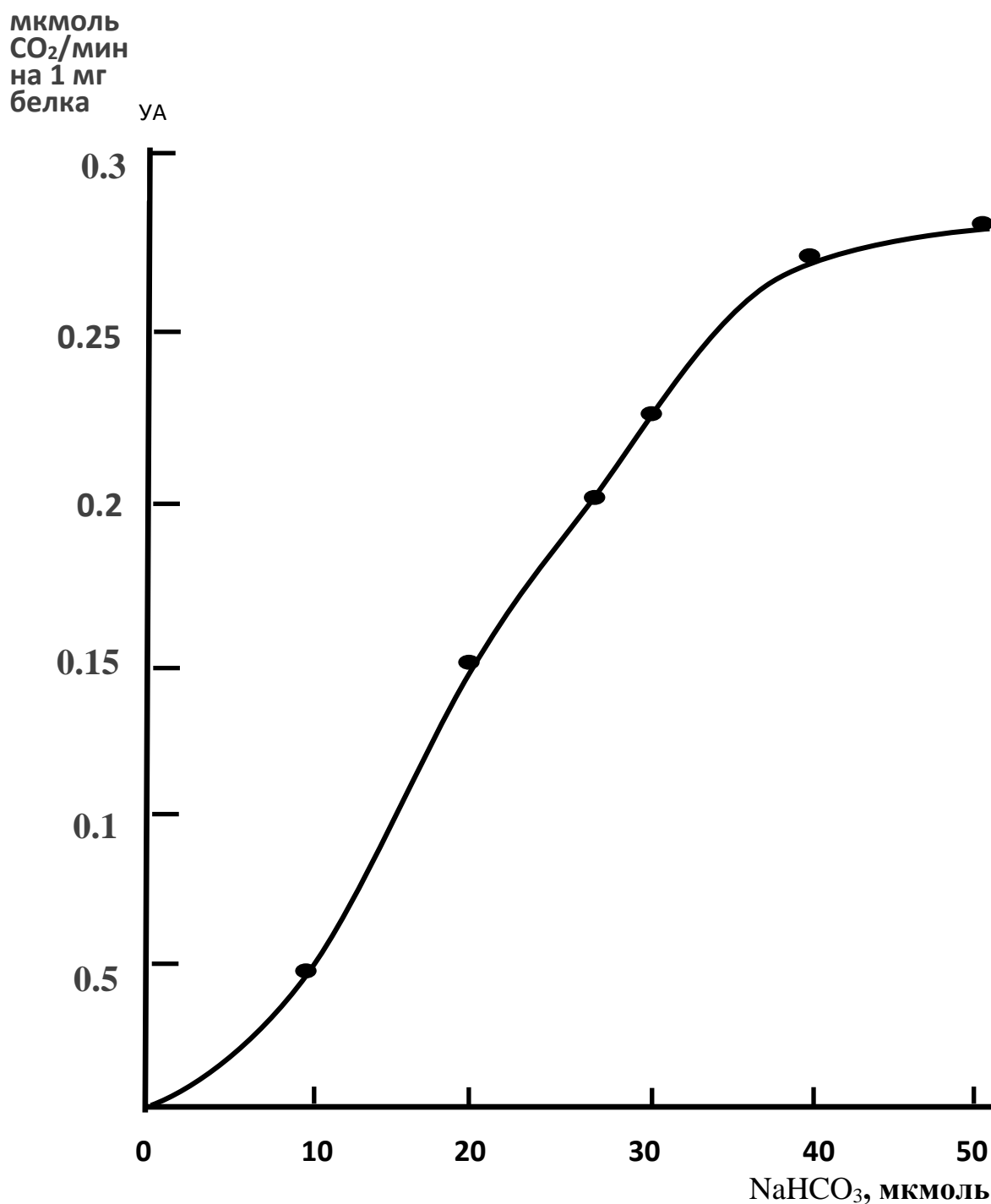


Для свободной формы рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы доказано, [144] что одна молекула углекислоты выполняет роль активатора фермента, другая же – участвует в карбоксилазной реакции. Кинетические анализы показали, что эти две молекулы  $\text{CO}_2$  присоединяются к разным центрам связывания на ферменте аллостерическому и каталитическому.

Исследование влияния концентрации углекислоты в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы позволило бы выяснить, играет ли углекислота роль активатора фермента в мультиферментном комплексе. В связи с этим важное значение имеет выявление насыщающей фермент концентрации углекислоты.

Результаты изучения зависимости от концентрации углекислоты в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм представлены на рис.38.

Из представленных на рис.38 данных видно, что кривая зависимости от концентрации углекислоты в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы имела классическую сигмоидную форму. Это свидетельствует о сложных кооперативных эффектах при взаимодействии субъединиц между собой, индицируемые молекулами углекислоты при связывании с ферментом.



**Рисунок 38. Влияние концентрации NaHCO<sub>3</sub> в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилаз/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.**

Максимальная карбоксилазная активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы проявлялась при содержании 40-50 мкмоль

углекислоты в мл реакционной среды. Следовательно, эта концентрация углекислоты являлась оптимальной в данных условиях реакционной среды, т.е. фермент полностью насыщен субстратом. В дальнейших исследованиях использовалось 50 мкмоль углекислоты на 1 мл реакционной среды.

### **3.3.4. Влияние концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (РБФК/О)/оксигеназы мультиферментного комплекса**

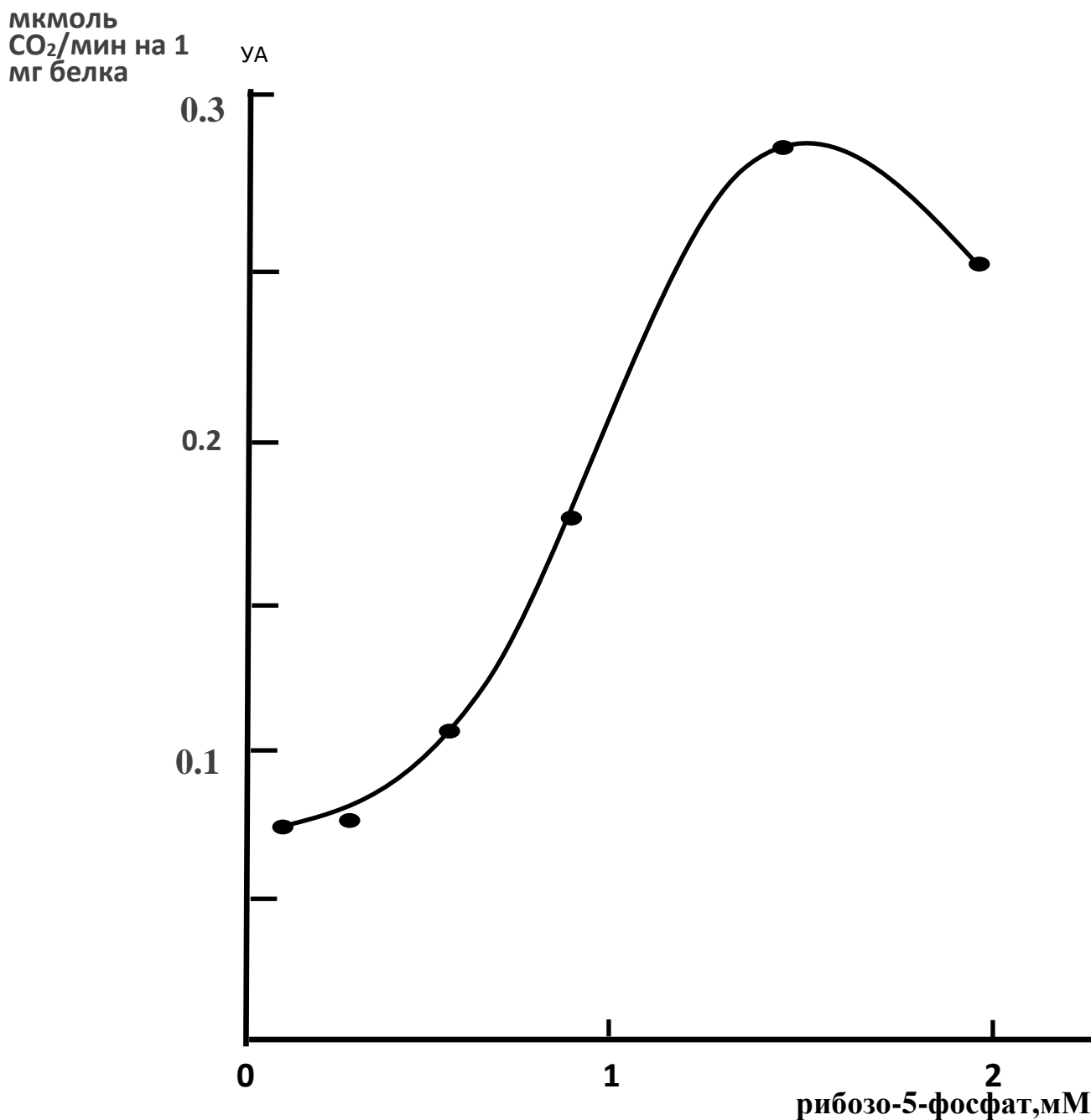
Влияние концентрации рибозо-5-фосфата на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм было изучено нами при содержании в мл реакционной среды 10 мкг белка, 10 мкмоль АТФ и длительности реакции 1 минута.

Полученные результаты приведены на рис.39.

Как видно на рис. 39 кривая зависимости от концентрации рибозо-5-фосфата карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы имела сложную сигмоидную форму с лаг-периодом при содержании в реакционной среде 0,1-0,3 мМ субстрата. Лаг-период свидетельствует об индуцируемом субстратом кооперативных взаимодействиях между активными центрами субъединиц фермента.

При увеличении содержания рибозо-5-фосфата в реакционной среде до 0,5-1 мМ начиналось возрастание карбоксилазной активности фермента.

Дальнейшее увеличение содержания субстрата до 1,5 мМ приводило к максимальному возрастанию скорости карбоксилазной реакции. В пределах концентраций рибозо-5-фосфата 1.5-2.0 мМ карбоксилазная активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы снижалась.



**Рисунок 39. Зависимость от концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде карбоксилазной активности рибулзобисфосфаткарбоксилаз/ оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.**

Анализ полученных результатов показал, что оптимальной концентрацией рибозо-5-фосфата в данных условиях реакционной среды

являлся 1 мМ. Эту концентрацию рибозо-5-фосфата использовали в дальнейших исследованиях.

### 3.5. Резюме

Подобраны оптимальные условия реакционной среды для проявления рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

Кинетические исследования показали, что для проявления максимальной активности каждого из трех ферментов мультиферментного комплекса достаточна длительность реакции 1 минута.

Кривые зависимости всех трёх ферментативных активностей мультиферментного комплекса от количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде имели самые разнообразные сложные сигмоидные формы, отражающие характер взаимодействий между собой активных центров субъединиц ферментов.

При проявлении рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина характерно положительное кооперативное взаимодействие между активными центрами субъединиц ферментов.

Физиологическая важность положительной кинетической кооперативности по субстрату состоит в том, что благодаря ей уменьшается интервал концентраций субстрата, необходимый для существенного изменения активности фермента [51].

Установлено, что для проявления максимальной рибозофосфатизомеразной фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультифер-

ментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм оптимальными в 1 мл реакционной среды являлись 10 мкг белка, 10 мкмоль рибозо-5-фосфата, 10 мкмоль АТФ и 50 мкмоль углекислоты ( $\text{NaHCO}_3$ ).

## **ГЛАВА 4. КИНЕТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА СОРТА 108 -Ф**

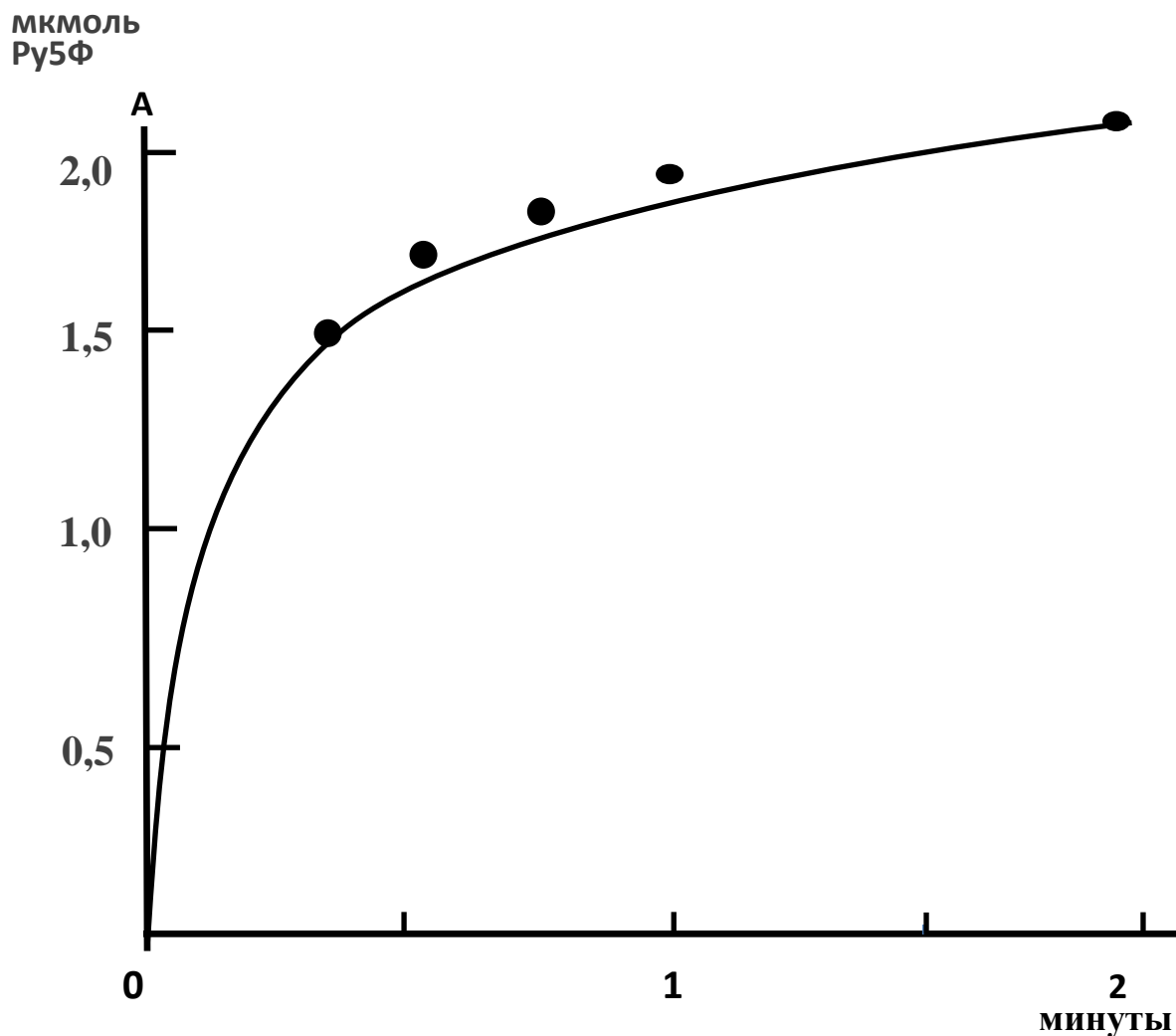
Поскольку целью данной работы было провести сравнительные исследования влияния кинетина на каждый из трёх ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника, то необходимо было изучить кинетическое поведение ферментов в зависимости от концентрации компонентов реакционной среды и её условий.

В данной главе приведены результаты исследования влияния продолжительности реакции, количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную, фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф. в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев[16,95].

### **4.1. Зависимость от условий реакционной среды рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника**

#### **4.1.1. Влияние длительности реакции на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса**

На рис. 40. приведены данные, полученные при изучении зависимости от длительности реакции накопления продукта рибозофосфатизомеразной реакции – рибулозо-5-фосфата.



**Рисунок 40. Зависимость от длительности реакции рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108.**

Из приведенных на рис.40 данных видно, что в течение продолжительности реакции 0,5 мин достигается настолько высокая скорость реакции, что сразу же начинается загиб кривой зависимости скорости реакции от её длительности, продолжающийся в течение 0,5-2 минут.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность фермента настолько высокая, что в течение 0,5 мин фермент превращается почти все имеющиеся молекулы субстрата в продукт и для дальнейшего



увеличения скорости реакции необходимы большие концентрации субстрата или меньшие количества белка в реакционной среде.

На основании полученных данных в дальнейших исследованиях определение рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса проводили в течение 0,5-1 минуты.

#### 4.1.2. Зависимость от количества белка в реакционной среде рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса

Изучение влияния количества белка в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса было проведено нами при концентрации субстрата фермента рибозо-5-фосфата 10 мкмоль/мл.

Полученные результаты приведены на рис. 41.

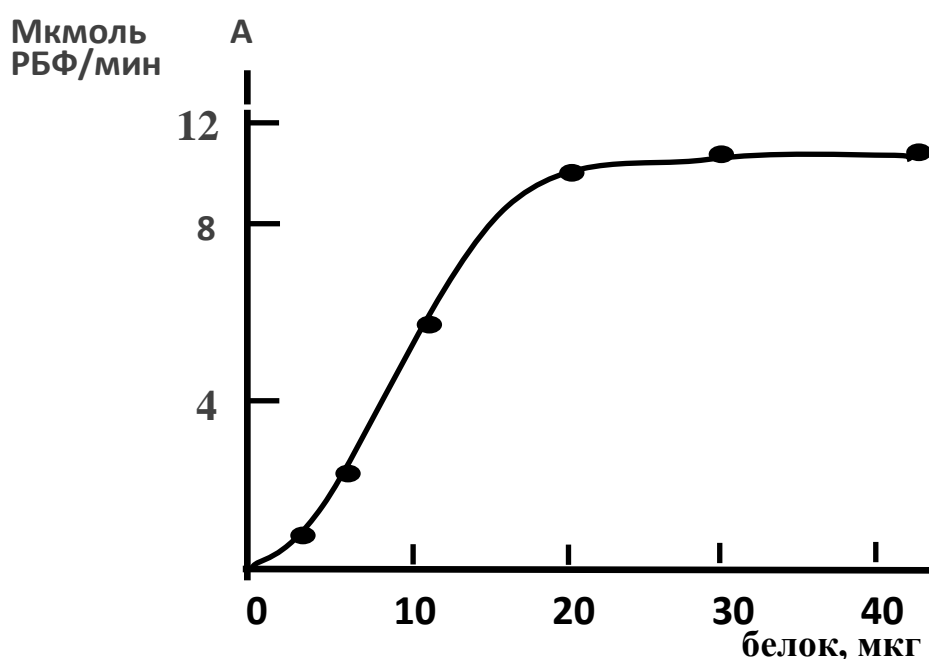


Рисунок 41. Зависимость от количества белка в реакционной среде фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф

На рис. 41 видно, что кривая зависимости активности рибозофосфатизомеразы от её количества в реакционной среде имела классическую сигмоидную форму. Начальный ход кривой свидетельствовал о том, что в пределах концентраций белка от 1 до 5 мкг при связывании субстрата происходило кооперативное взаимодействие между субъединицами фермента, что приводило к возрастанию сродства фермента к субстрату, вследствие чего скорость реакции увеличивалась.

Количество белка 10 мкг/мл реакционной среды являлось оптимальным, так как дальнейшее увеличение количества белка приводило к загибу кинетической кривой, свидетельствовавшее о снижении скорости рибозофосфатизомеразной реакции.

При количестве белка 20 мкг/мл реакционной среды кинетическая кривая зависимости скорости рибозофосфатизомеразной реакции от концентрации белка выходила на плато. Это свидетельствовало о превращении имеющихся молекул субстрата в продукт реакции, т.е. об его исчерпывании.

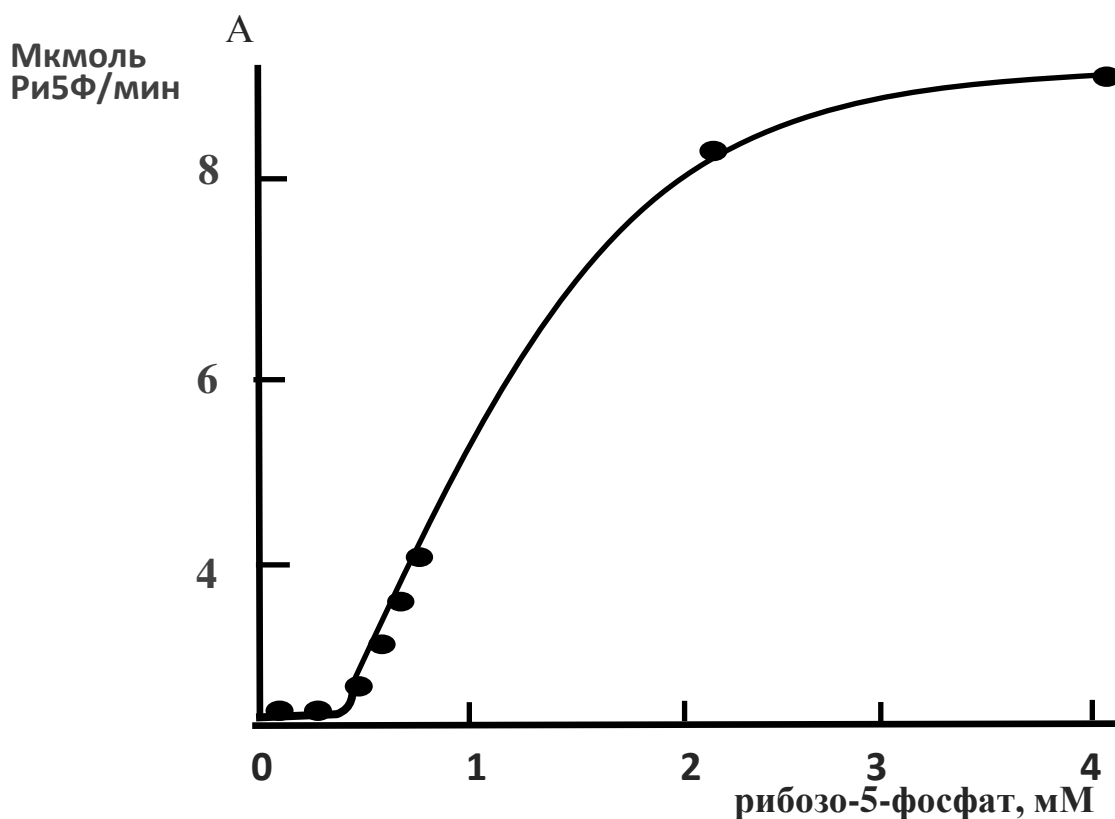
В дальнейших исследованиях на основании полученных результатов нами использовалось 10 мкг белка на 1 мл реакционной среды.

#### **4.1.3. Влияние концентрации рибозо-5-фосфата на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса**

Влияние концентрации субстрата в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф изучали в условиях, оптимальных для проявления активности фермента.

Результаты исследования зависимости ферментативной реакции, катализируемой рибозофосфатизомеразной экстракта из листьев

хлопчатника сорта 108-Ф, от концентрации рибозо-5-фосфата приведены на рис. 42 ниже.



**Рисунок 42. Влияние концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.**

Из представленных на рисунке 42 данных, видно, что кривая зависимости скорости реакции  $V$  от концентрации субстрата  $S$  имела очень сложную S-образную форму с тремя точками загиба.

В пределах концентраций рибозо-5-фосфата 0,1-0,5 мМ происходило кооперативное взаимодействие между разными субъединицами рибозофосфатизомеразы, что привело к возрастанию сродства фермента к субстрату. Это отразилось в первой точке загиба кинетической кривой зависимости скорости рибозофосфатизомеразной реакции от концентрации субстрата в реакционной среде.

После первой точки загиба кинетической кривой при концентрации рибозо-5-фосфата 0,5 мМ/мл реакционной среды скорость рибозо-фосфатизомеразной реакции возрастала пропорционально концентрации субстрата в пределах 0,5-1 мМ.

При увеличении концентрации рибозо-5-фосфата в пределах 1-2 мМ начинался второй загиб кинетической кривой, т.е. возрастание скорости рибозофосфатизомеразной реакции не было пропорциональным увеличению концентрации субстрата.

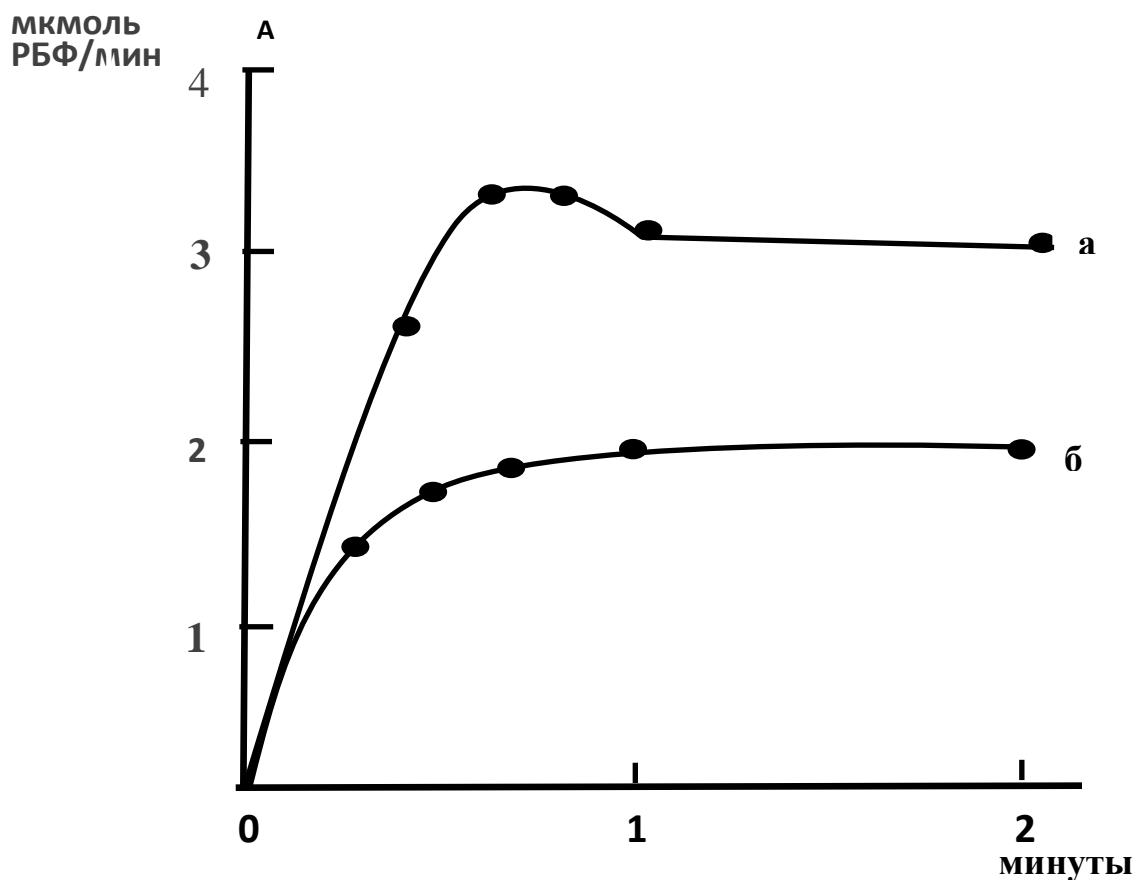
При концентрации субстрата 2 мМ/мл реакционной среды кинетическая кривая зависимости рибозофосфатизомеразной реакции от концентрации субстрата выходила на плато.

На основании результатов, приведенных на рис. 39 оптимальной концентрацией рибозо-5-фосфата для рибозофосфатизомеразы мультиферментного в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф являлся 1 мМ или 10 мкмоль/мл реакционной среды. Эта концентрация рибозо-5-фосфата в мл реакционной среды использовалась нами для дальнейших исследований.

## **4.2. Влияние условий реакционной среды на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника**

### **4.2.1. Влияние длительности реакции на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса**

Результаты, полученные при исследовании влияния длительности реакции на фосфорibuлокиназную активность при использовании собственного субстрата фермента – рибулозо-5-фосфата и в присутствии рибозо-5-фосфата-субстрата предшествующего фермента рибозофосфат-изомеразы приведены на рис 43.



**Рисунок 43.** Зависимость от длительности реакции фосфорилбулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в присутствии рибозо-5-фосфата (а) и рибулозо-5-фосфата (б).

Из представленных на рисунке 43 данных видно, что характер проявления и величины фосфорилбулокиназной активности различны в зависимости от примененного субстрата. При использовании рибулозо-5-фосфата кинетическая кривая накопления продукта реакции-рибулозо-5-бисфосфата не соответствовала гиперболической кривой Михаэлиса-Ментен и к 30 секундам выходила на плато.

При использовании рибозо-5-фосфата-субстрата предшествующего фермента кинетическая кривая накопления продукта реакции имела более высокую скорость и такой же резкий выход на постоянный уровень.

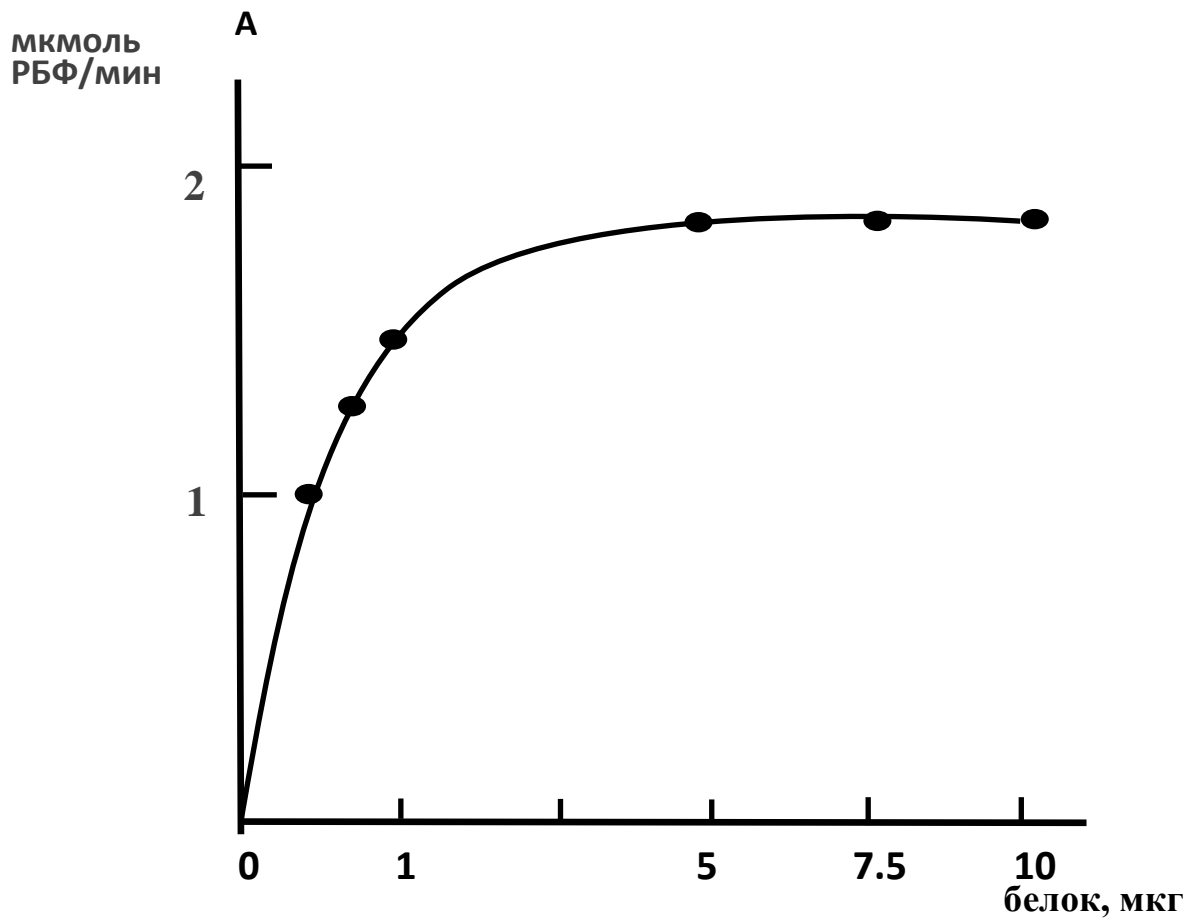
Стационарное состояние реакции сохранялось в обоих случаях в течение 0,5-1 минуты, затем наблюдался резкий выход на плато.

Полученные данные дали основание в дальнейших исследованиях использовать продолжительность реакции не более 0,5 - 1 минуты.

#### **4.2.2. Зависимость от количества белка в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса**

Результаты изучения зависимости фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса от количества белка в реакционной среде приведены на рис.44.

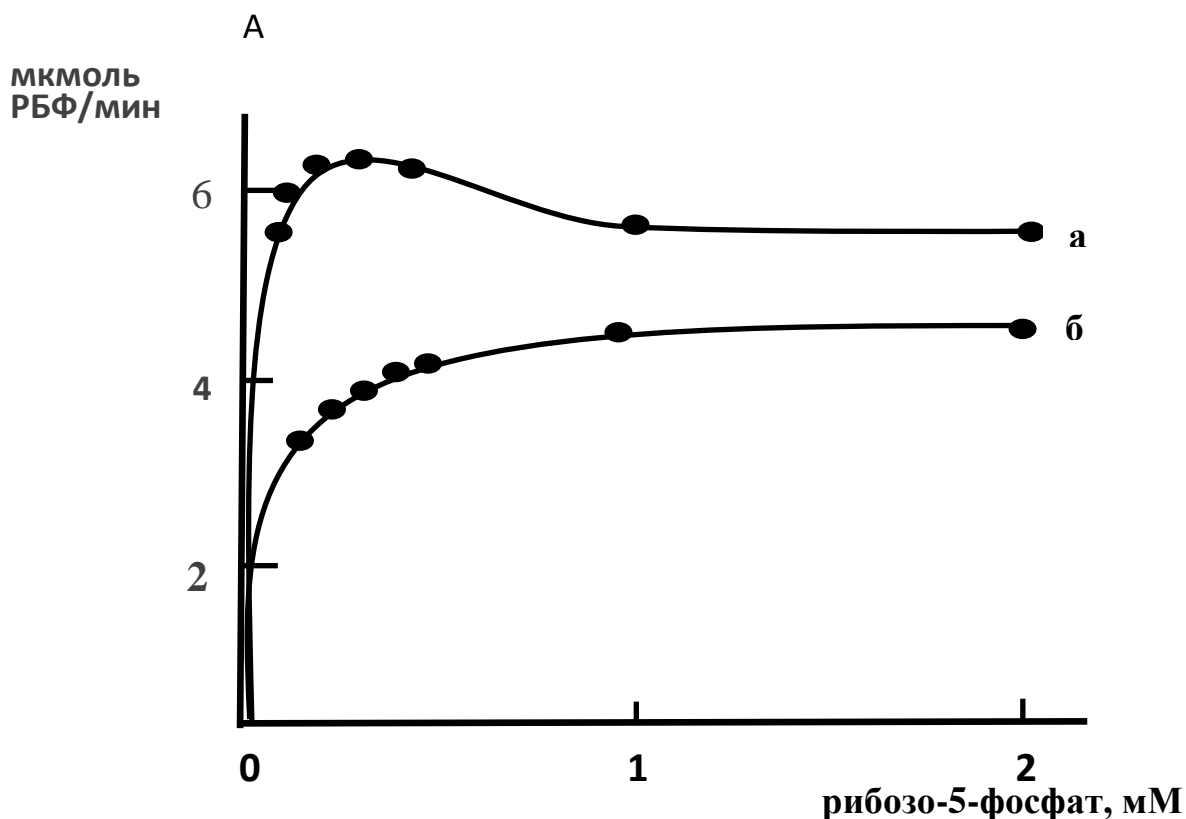
Из представленных на рис.44 данных видно, что форма кривой отличалась от гиперболической и характеризовалась резким выходом на плато. Насыщение фермента субстратом происходило уже при количестве белка 0,5 мкг, затем скорость реакции оставалась постоянной при 5-10 мкг белка. На основании полученных данных в дальнейших исследованиях использовали 5-10 мкг белка в 1 мл реакционной среды.



**Рисунок 44.** Зависимость от количества белка в реакционной среде фосфорилбулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф (Бабаджанова, Сайфудинов, 2019). [ 23].

#### 4.2.3. Влияние концентрации субстрата на фосфорилбулокиназную активность мультиферментного комплекса

Изучение зависимости от концентрации субстрата фосфорилбулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф проводили в присутствии рибозо-5-фосфата и рибулозо-5-фосфата. Полученные данные представлены на рис. 45.



**Рисунок 45. Зависимость от концентрации рибозо-5-фосфата (а) или рибулозо-5-фосфата (б) в реакционной среде фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.**

На рисунке 45 видно, что формы кривых и величины фосфорibuлокиназной активности зависели от использованного субстрата, но в обоих случаях они отличались от гиперболической кривой Михаэлиса-Ментен. При использовании собственного специфического субстрата фермента-рибулозо-5-фосфата (рис.45б) максимальная активность достигалась уже при концентрации 0,25 мМ, затем наблюдался загиб кривой, обусловленный быстрым насыщением фермента субстратом при концентрации 0,5 мМ. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата до 1-2 мМ скорость реакции оставалась постоянной.

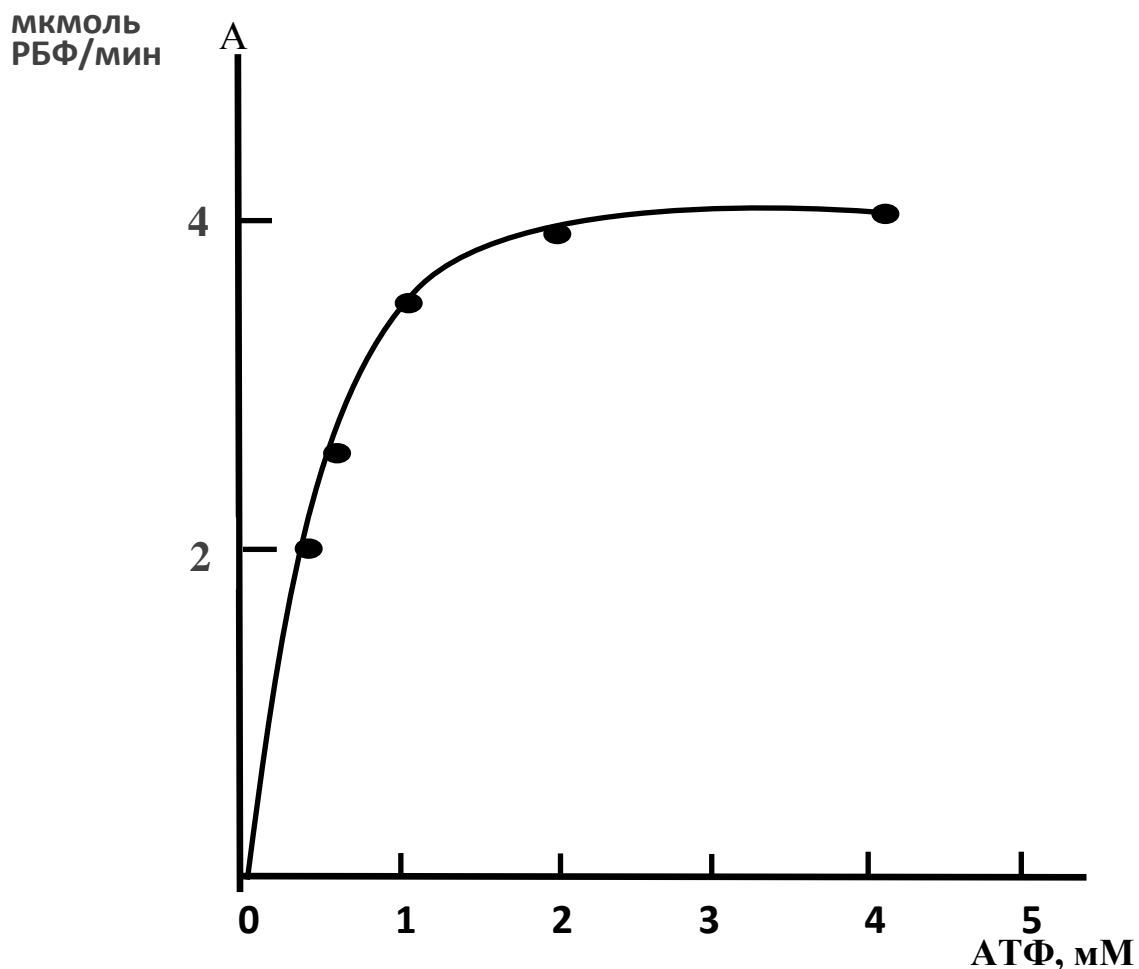


При использовании рибозо-5-фосфата форма кинетической кривой и фосфорибулокиназной активности (рис. 46 а) была иной, активности фермента были значительно выше у влечины применения рибулозо-5-фосфата. После всплеска ферментативной активности при 0,25-0.5 мМ скорость реакции постепенно снижалась при 0,75-1 мМ и осталась постоянной до 2 мМ. На основании полученных данных в дальнейших исследованиях использовали 0,5-1 мМ рибозо-5-фосфата на 1 мл реакционной среды.

#### **4.2.4. Зависимость от концентрации АТФ в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса**

Результаты исследования зависимости от концентрации АТФ в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф приведены на рис. 46.

Как видно на рис. 46 кинетическая кривая не имела гиперболическую форму и характеризовалась загибом уже при концентрации АТФ 1 мМ. Максимальная фосфорибулокиназная активность достигалась при 2 мМ, затем оставалась постоянной до 4 мМ АТФ. В дальнейших исследованиях нами использовался 1 мМ АТФ на мл реакционной среды [ 23].



**Рисунок 46.** Зависимость от концентрации АТФ в реакционной среде фосфорилрибулокиназной реакции мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

**4.3. Выявление оптимальных условий реакционной среды для проявления карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника**

**4.3.1. Зависимость от длительности реакции карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса**

Для определения влияния длительности реакции на проявление карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса все компоненты реакционной среды инкубировали в течение 45 сек, 1, 2, 4 и 8 минут.

В таблице 4 приведены полученные результаты. Из приведенных в таблице данных видно, за 45 сек достигалась высокая скорость карбоксилазной реакции и в случае использования собственного субстрата фермента – рибулозо-1,5-бисфосфата, и при использовании рибозо-5-фосфата в качестве субстрата. Но при применении рибозо-5-фосфата скорость карбоксилазной реакции мультиферментного комплекса была выше на 15%.

**Таблица 4. Влияние длительности реакции на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-ф в присутствии собственного субстрата и рибозо -5-фосфата**

Длительность реакции	а) рибулозо -1,5-бисфосфат		
	Активность в мкмоль CO <sub>2</sub> на 1мг белке	Активность в мкмоль CO <sub>2</sub> в минуту на 1мг белка	% активности
45 сек	0,91 ±0,02	-	100
1 мин	0,48±0,01	0,48	100
2 мин	0,54±0,01	0,27	100
4 мин	0,61±0,01	0,15	100
8 мин	0,61±0,01	0,15	100
	б) рибозо -5-фосфат		
45 сек	1,05 ±0,03	-	115
1 мин	0,56±0,01	0,56	116
2 мин	0,61±0,01	0,30	110
4 мин	0,55±0,01	0,14	90
8 мин	0,58±0,01	0,14	95

При использовании обоих субстратов при длительности реакции 1 минута скорость карбоксилазной реакции мультиферментного комплекса снижалась вдвое, т.е. снижение происходило за 15 секунд.

При дальнейшем увеличении длительности реакции происходило всё большее снижение скорости карбоксилазной реакции мультиферментного комплекса как при использовании рибулозо-1,5-бисфосфата, так и в присутствии рибозо-5-фосфата.

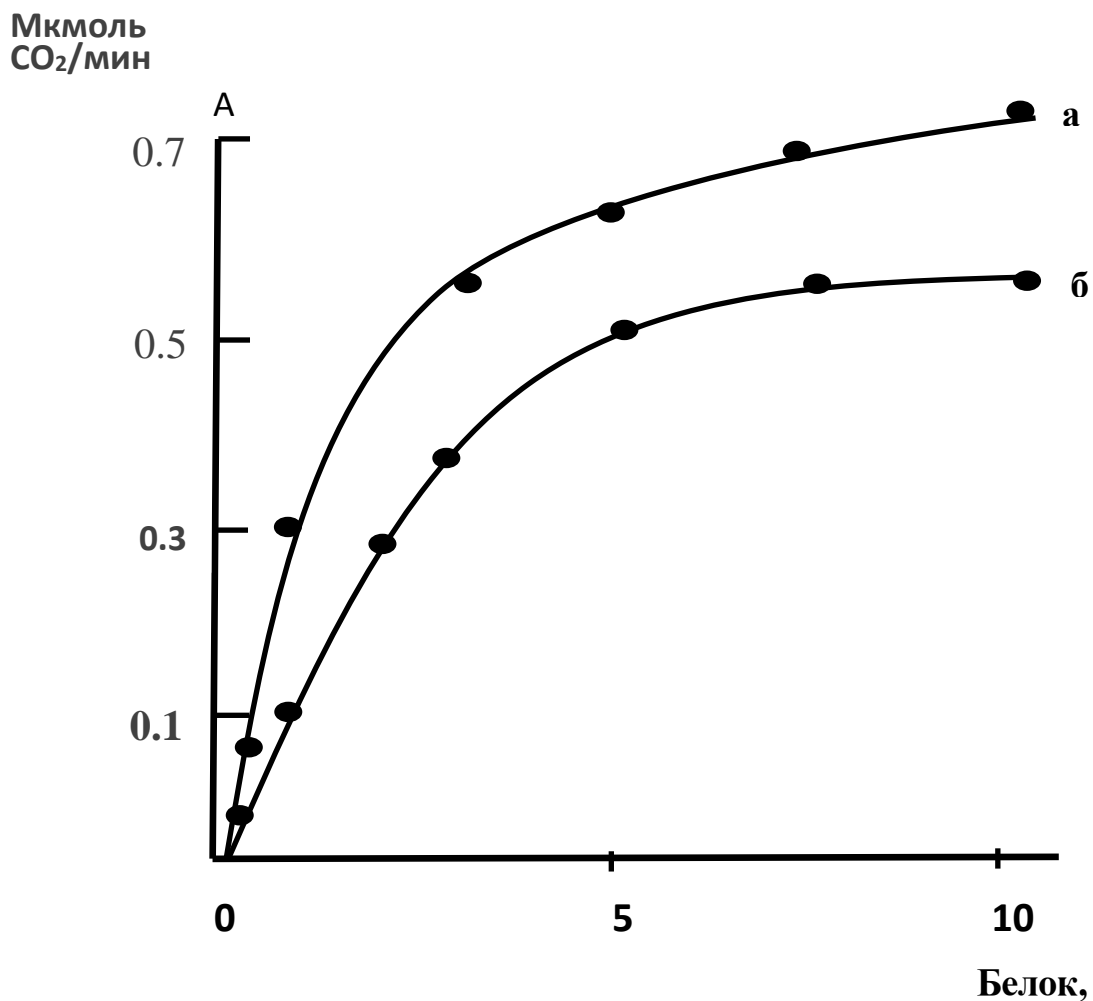
В сравнении со скоростью реакции за 1 минуту, скорость реакции за 4 минуты снизилась в три раза в присутствии рибулозо-1,5-бисфосфата, а при использовании рибозо-5-фосфата - в четыре раза.

Полученные результаты дали основание использовать в дальнейших исследованиях при определении карбоксилазной активности рибулозо**бис**фосфаткарбоксилазы мультиферментного комплекса длительность реакции 0,5-1 минута.

#### **4.3.2. Влияние количества белка в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса**

Зависимость от количества белка в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса было изучено нами при концентрации субстрата фермента-рибулозо-1,5-бисфосфата или рибозо-5-фосфата – 10 мкмоль/мл.

Полученные результаты приведены на рис. 47.



**Рисунок 47.** Зависимость от количества белка в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/-оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф при использовании рибозо-5-фосфата (а) и рибулозо-1,5-бисфосфата (б).

Как видно из приведенных на рисунке 47 данных, независимо от использованного субстрата кривые зависимости карбоксилазной активности мультиферментного комплекса от количества белка не имели классическую гиперболическую форму. В пределах количества белка от 0,5 до 1 мкг наблюдалось резкое возрастание активности фермента. При дальнейшем увеличении количества белка от 1 до 5 мкг на мл реакционной среды скорость реакции выходила на плато.

5-10 мкг белка на 1 мл реакционной среды использовали в дальнейших исследованиях.

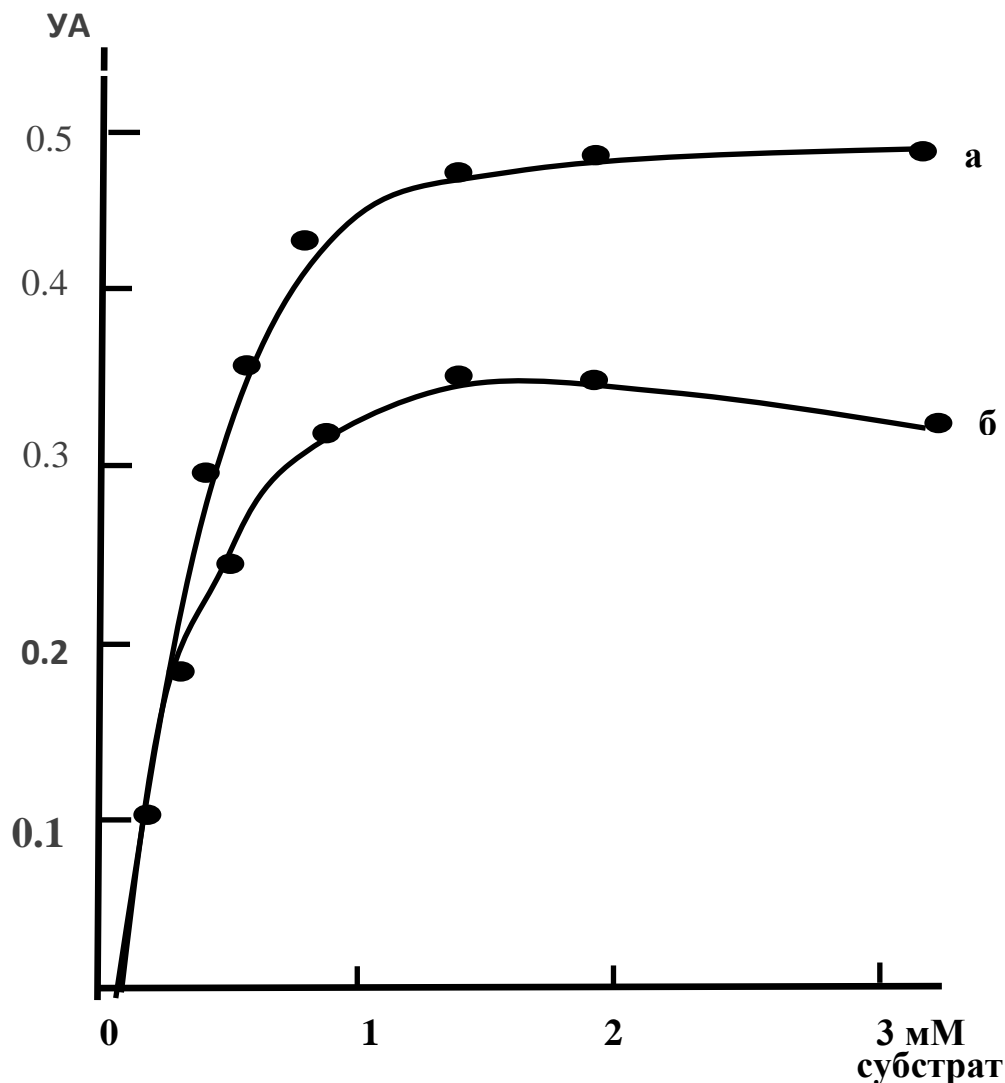
#### **4.3.3. Зависимость карбоксилазной активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса от концентрации субстрата в реакционной среде**

Влияние концентрации рибулозо-1,5-бисфосфата и рибозо-5-фосфата на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса изучено нами при содержании в мл реакционной среды 10 мкг белка и длительности реакции 1 минута.

Полученные результаты приведены на рис. 48 ниже.

На рис. 48 видно, что кривая зависимости карбоксилазной активности рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы от концентрации субстрата имели резкие загибы уже при 0,1 мМ субстрата. И при использовании рибулозо-1,5-бисфосфата, и в присутствии рибозо-5-фосфата максимальная активность фермента проявлялась при концентрации субстрата 1 мМ на мл реакционной среды.

При концентрации рибулозо-1,5-бисфосфата 1 мМ в мл реакционной среды скорость реакции достигала 0,31 мкмоль  $\text{CO}_2$ /мин на 1 мг белка, а при использовании такой же концентрации рибозо-5-фосфата скорость реакции составляла 0,45 мкмоль  $\text{CO}_2$ /мин на 1 мг белка, т.е. была выша на 45%. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводило к постепенному замедлению реакции. [87]

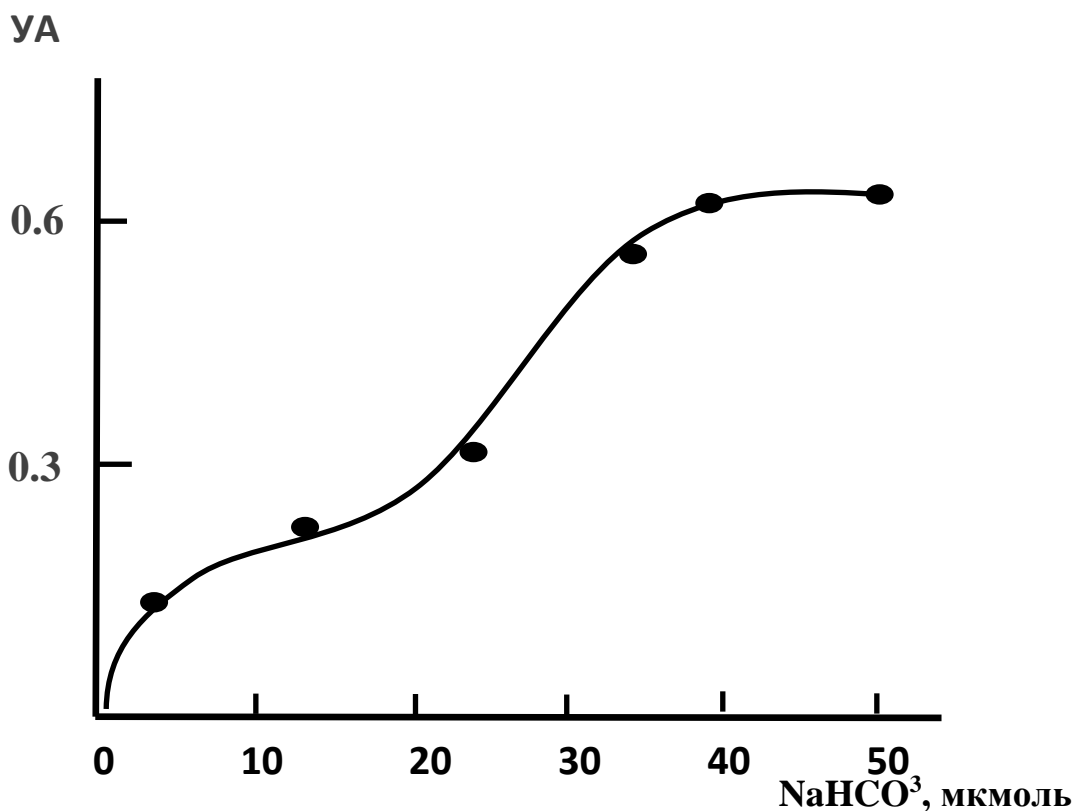


**Рисунок 48. Влияние различных концентраций рибозо-5-фосфата (а) или рибулозо-1,5-бисфосфата (б) на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.**

#### **4.3.4. Влияние углекислоты на карбоксилазную активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса**

На рис.49 приведены результаты изучения зависимости от концентрации углекислоты в реакционной среде карбоксилазной

активности рибулзобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.



**Рисунок 49.** Влияние концентраций углекислоты (NaHCO<sup>3</sup>) на карбоксилазную активность рибулзобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

На рисунке. 49 видно, что кривая зависимости от концентрации углекислоты в реакционной среде карбоксилазной активности мультиферментного комплекса имела очень сложную сигмоидообразную форму с четырьмя загибами – при 5, 15, 25 и 35 мкмоль углекислоты.

Максимальная карбоксилазная активность рибулзобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса проявлялась при содержании 40-50 мкмоль углекислоты в мл реакционной среды. Следовательно, при этой концентрации углекислоты фермент полностью



насыщен субстратом. В дальнейших исследованиях использовалось 50 мкмоль углекислоты на 1 мл реакционной среды.

#### 4.5. Резюме

Подобраны оптимальные условия реакционной среды для проявления рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозо**бис**фосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

Кинетические исследования показали, что для проявления максимальной активности каждого из трех ферментов мультиферментного комплекса достаточна длительность реакции 0.5-1 минута.

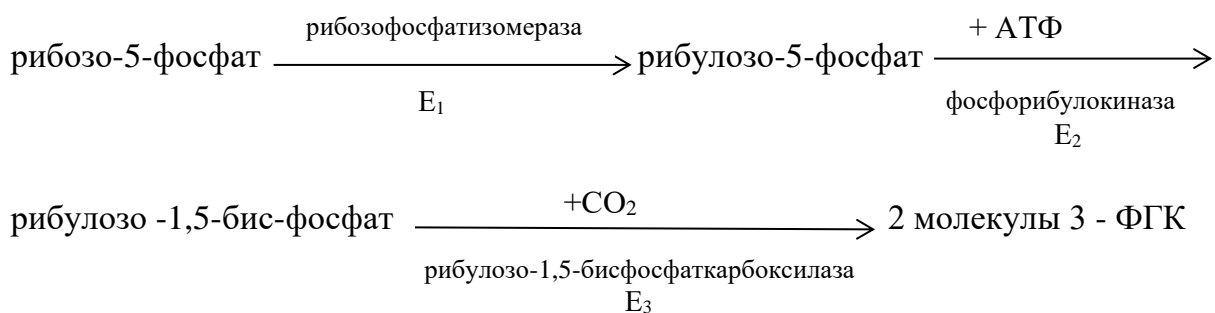
Кинетические кривые зависимости всех трех ферментативных активностей мультиферментного комплекса от количества белка и концентрации субстратов в реакционной среде имели очень сложные сигмоиднообразные формы с несколькими точками загибов, отражающих сложные конформационные изменения в молекулах ферментов.

При проявлении активности ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина характерны положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов.

Установлено, что для проявления максимальной рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности рибулозо-*бис*фосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф оптимальными в 1 мл реакционной среды являлись 5 мкг белка, 10 мкмоль рибозо-5-фосфата, 10 мкмоль АТФ, 50 мкмоль углекислоты и длительность реакции 0,5-1 минута.

## ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА *IN VITRO* НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ АРАБИДОПСИСА РАСЫ ЭНКХАЙМ И ЕГО МУТАНТОВ

Было установлено, что в экстрактах из листьев арабидопсиса (*Arabidopsis Thaliana*) и хлопчатника возрастала фиксация  $^{14}\text{CO}_2$  при добавлении кинетина в реакционную среду в присутствии рибозо-5-фосфата+АТФ [5,6,7,9]. Фиксация  $^{14}\text{CO}_2$  в присутствии рибозо-5-фосфата+АТФ свидетельствовала о наличии в экстрактах из листьев мультиферментного комплекса, проявляющего три ферментативные активности следующей последовательной цепи реакции:



Исследование влияния кинетина на активность каждого фермента в отдельности необходимо для выявления активируемого кинетином фермента мультиферментного комплекса, ответственного за фиксацию  $\text{CO}_2$  в хлоропластах.

### 5.1. Зависимость от различных способов добавления кинетина рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм

Установлено, что при выделении хроматина добавление кинетина в момент гомогенизации листьев приводило к активированию связанных с

хроматином ядерных РНК-полимеразы I и РНК – полимеразы II [28,78,79]. При определении активности фермента нами было исследовано влияние кинетина на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса расы Энкхайм в зависимости от способа добавления кинетина при получении гомогената или в реакционную смесь. В гомогенат из листьев кинетин был добавлен в концентрации 10 мкмоль/мл, а в реакционную смесь 1 мкмоль/мл. Проведено было четыре серии опытов: 1- определение активности рибозофосфатизомеразы в гомогенате (сырой ферментный препарат) без добавления кинетина в процессе получения гомогената и без добавления его в реакционную смесь при определении активности фермента; 2- кинетин добавляли только в реакционную смесь; 3 – кинетин добавляли в процессе получения гомогената при растирании листьев, но не добавляли в реакционную смесь; 4 – кинетин добавляли и в процессе получения гомогената, и в реакционную смесь. [76]

В таблице 5. приведены результаты определения рибозофосфатизомеразной активности без кинетина и с добавлением его при гомогенизации листьев растений арабидопсиса различного возраста, или в реакционную среду.

Из представленных в таблице 5 данных видно, что наибольшая активность рибозофосфатизомеразы характерна для мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев двадцативосьмидневных растений арабидопсиса расы Энкхайм. У более молодых растений - шестнадцатидневных рибозофосфатизомеразная активность была ниже, чем у двадцативосьмидневных на 31%.

**Таблица 5 - Активность рибозофосфатизомеразы (РФИ) в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм, в зависимости от добавления кинетина при гомогенизации листьев растений арабидопсиса различного возраста или в реакционную смесь**

Возраст растений, дни	Кинетин		Активность РФИ мкмоль Рн5Ф/мин на 1 мг белка	Активация, %
	гомогенизация	реакционная смесь		
16	-	-	2.14±0.3	100
	-	+	2.68±0.4	125
	+	-	2.46±0.5	115
	+	+	2.71±0.6	127
28	-	-	2.82±0.7	100
	-	+	3.01±0.9	128
	+	-	3.24±0.6	115
	+	+	3.35±0.8	119
38	-	-	2.13±0.7	100
	-	+	3.12±0.8	147
	+	-	2.94±0.6	138
	+	+	2.98±0.6	140

Активность рибозофосфатизомеразного характера, демонстрируемая растениями, с момента появления которых прошло 16 и 38 дней соответственно, не отличалась.

Всем сказанным выше обуславливается то, что имеет место зависимость онтогенетического типа в активности рибозофосфатизомеразы, показываемой полиферментным комплексом.

Как было определено при изучении того, как сказывается кинетин на активность рибозофосфатизомеразы, показываемой полиферментным образованием, при его внесении при гомогенизации листьев такая активность увеличивается в среднем на 15% (при этом между растениями, после появления которых на свет прошло 16 и 28 дней соответственно, не было зафиксировано какой-либо разницы в данном плане). Что касается того, как кинетин влияет на активность рибозофосфатизомеразы, показываемую полиферментным образованием, то в случае, если он применяется для обработки растения, находящегося в возрасте 38 дней, то его интенсифицирующее влияние имеет значение 38%.

Сказанное в предыдущем абзаце предоставляет возможность сделать вывод, в соответствии с которым отличающееся воздействие кинетина на полиферментные комплексы, подготовленные из растений, отличающихся по возрасту, обусловлено следующим: в зависимости от того, на какой стадии онтогенеза находится растение, наличие в нем гормонов, а также их соотношение между собой трансформируется. Установлено, что по мере продвижения растения к поздним стадиям онтогенеза количество цитокининов, содержащихся в их листьях, снижается [44,89]. В связи с этим представляется очевидным, что в листьях, имеющихся у растений, находящихся на ранних стадиях онтогенеза, содержится больше цитокининов в сопоставлении с растениями, приближающимися к поздним этапам существования. А это, в частности, обуславливает тот факт, что молодые растения не сталкиваются с недостатком цитокининов, используемых для повышения активности рибозофосфатизомеразы мультиферментного комплекса. И, соответственно, внесение дополнительного кинетина неспособно значительно повлиять на активность рибозофосфатизомеразы полиферментного образования.

Что касается растений, которые пребывают на более поздних стадиях онтогенеза, то при работе с ними внесение дополнительных цитокининов представляется более обоснованным. Связано это с уже упомянутым выше обстоятельством, по которому у стареющего растения, как правило, недостаточно цитокининов, чтобы самостоятельно активировать рибозофосфатизомеразу. А значит, оно нуждается во внесении дополнительных цитокининов, после получения которых активность рибозофосфатизомеразы, показываемая полиферментным образованием, становится больше.

Как было определено в результате описываемых исследований, действие, оказываемое кинетином в том случае, если он добавлялся и при гомогенизации листьев, и в реакционную смесь, являлось похожим на то влияние, что имело место после добавления кинетина в реакционную смесь. В частности, в последнем случае интенсифицирующее влияние кинетина составило 25%, а в первом – 28%.

Что касается наибольшего увеличения активности рибозофосфатизомеразного характера, показываемой полиферментным образованием, то она достигла отметки в 47%. Данный результат был получен после работы с ферментным препаратом, полученных из листьев арбидопсиса, находящихся в возрасте 38 дней. [77]

Таким образом, специфика гормонального гомеостаза на каждом этапе онтогенеза растения значительно отличается от предыдущих и последующих стадий. Из этого следует, что ответ, даваемый полиферментным комплексом на влияние разнообразных факторов, всегда будет уникальным.

## **5.2. Влияние кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина**

### **5.2.1. Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорибулокиназной активности в экстрактах из листьев исходной расы арабидопсиса расы Энкхайм и его мутанта 58/15**

Фосфорибулокиназа должна рассматриваться в качестве фермента, который демонстрирует наибольшую лабильность.

В процессе проведения работ в рамках настоящего научного исследования было подвергнуто воздействию, оказываемое кинетином (в разных количествах) на активность фосфорибулокиназы полиферментного комплекса. Для подготовки полиферментных комплексов использовались два экстракта. Один из них был получен в результате обработки листьев арабидопсиса, а второй – после выделения из листьев мутанта 58/15.

Результаты, полученные по итогам эксперимента, продемонстрированы в таблице 6.

Как свидетельствует информация, показанная в таблице 6, в зависимости от того, какое именно количество кинетина вносилось в среду осуществления реакции, фосфорибулокиназная активность полиферментного комплекса являлась разной. Это было характерно для обоих примененных экстрактов.

Наибольшая активация фосфорибулокиназной активности достигалась при добавлении в реакционную среду 2 мкмоль/мл кинетина. У исходной расы Энкхайм фосфорибулокиназная активность возрастала на 78%, а у мутанта 58/15 на 59%.

В экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм активация фосфорибулокиназной активности на 45% происходила уже при добавлении в реакционную среду 1 мкмоль/мл, в то время как фосфорибулокиназная активность в экстрактах из листьев мутанта 58/15 возросла всего лишь на 10%. Известно, что активация ферментативной

активности на 10% уже достаточна для изменения физиологического состояния организма [ 91].

**Таблица 6 - Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорibuлокиназной (ФРК) активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его низкопродуктивного мутанта 58/15 в фазе розеток (16-дневных растений)**

<b>Объект исследований</b>	<b>Концентрация кинетина, мкмоль/мл</b>	<b>Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка</b>	<b>Активация %</b>
Исходная раса Энкхайм	-	5.5±0.3	100
	1	8.0±0.1	145
	2	9.8±0.2	178
	4	7.1±0.3	129
	10	7.0±0.1	127
Мутант 58/15	-	6.1±0.2	100
	1	6.7±0.2	110
	2	10.7±0.3	159
	4	7.7±0.4	126
	10	7.3±0.3	120

Увеличение концентрации кинетина в реакционной среде до 4 и 10 мкмоль/мл такие привело к активации фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев обоих объектов, но степень активации была значительно ниже: у исходной расы Энкхайм 29-27% соответственно, а у мутанта 58/15 – на 26-20%

У обоих объектов оптимальной концентрацией кинетина в реакционной среде при определении фосфорibuлокиназной активности



мультиферментного комплекса оказалась 2 мкмоль/мл. Эта концентрация кинетина в реакционной среде была использована нами в дальнейших исследованиях. [75]

### **5.2.2. Зависимость от возраста растений арабидопсиса влияния кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина**

При добавлении кинетина в реакционную среду в концентрации 2 мкмоль/мл была изучена зависимость влияния кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев различного возраста растений. Для исследований использовались экстракты из листьев шестнадцати и двадцативосьмидневных растений арабидопсиса исходной расы Энкхайм, его высокопродуктивного мутанта триплекс и низкопродуктивного – 58/15.

Полученные результаты представлены в таблице 7.

Из приведенных в таблице 7 данных, видно, что кинетин оказывал наибольшее активирующее действие в два раза или – 203% на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев шестнадцатидневных растений арабидопсиса расы Энкхайм.

Добавление кинетина в экстракты из листьев шестнадцатидневных растений высокопродуктивного мутанта триплекс также вызывало возрастание фосфорibuлокиназной активности, но в меньшей степени – на 153%. В экстрактах из листьев шестнадцатидневных растений низкопродуктивного мутанта 58/15 добавление кинетина в реакционную среду оказывало на фосфорibuлокиназную активность наименьшее активирующее влияние – 142%.

**Таблица 7 - Влияние кинетина на фосфорibuлокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса исходной расы Энкхайм и его мутантов**

Объект исследований	Возраст растений, дни	Активность ФРК, мкмоль			
		РБФ/мин на 1 мг белка реакционная среда без (-) и с (+) кинетином			
		-	%	+	%
Исходная раса Энкхайм	16	3,1±0.1	100	6,3±0.2	203
	28	4,1±0.2	100	4,4±0.2	107
Мутанты: высокопродуктивной триплекс	16	3,4±0.2	100	5,2±0.3	153
	28	4,5±0.3	100	4,9±0.4	110
Низкопродуктивный 58/15	16	3,1±0.1	100	4,4±0.2	142
	28	3,4±0.2	100	4,1±0.2	119

Активность фосфорibuлокиназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев двадцативосьмидневных растений арабидопсиса расы Энкхайм не изменялась при добавлении кинетина в реакционную среду. У двадцативосьмидневных растений мутанта триплекс кинетин вызывал возрастание фосфорibuлокиназной активности на 10%, а у мутанта 58/15 – на 19%. Полученные данные дают основание считать, что шестнадцатидневные растения арабидопсиса расы Энкхайм содержали наименьшее количество эндогенных цитокининов. У двадцативосьмидневных же растений эндогенное количество цитокининов в листьях было достаточным для воздействия на фосфорibuлокиназную

активность мультиферментного комплекса. Поэтому экзогенный кинетин не оказывал активирующего воздействия на фермент.

У шестнадцатидневных растений обоих мутантов эндогенное содержание цитокининов было, по-видимому значительно выше, чем у растений исходной расы Энкхайм. Поэтому степень активации кинетином фосфорibuлокиназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев этих растений была ниже -53% - у мутанта триплекс и 42% у мутанта 58/15.

У двадцативосьмидневных растений наименьшим содержанием эндогенных цитокининов обладали листья низкопродуктивного мутанта 58/15. Листья же этого возраста исходной расы Энкхайм и высокопродуктивного мутанта триплекс имели вероятно, достаточное количество эндогенных цитокининов. Поэтому активность фосфорibuлокиназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев этих растений при добавлении экзогенного кинетина в реакционную среду возрастала всего на 10% у мутанта триплекс, и на 7% - у исходной расы Энкхайм.

Таким образом, обнаружена онтогенетическая зависимость активирующего действия экзогенного кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы Энкхайм и его мутантов триплекс и 58/15, связанную, по-видимому, с эндогенным содержанием цитокининов в листьях различного возраста [25].

### **5.3. Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм**

Ранее рядов авторов (Володарский, Кулаева, 1981) было показано, что экзогенный кинетин оказывает стимулирующее действие на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в изолированных семядолях тыквы.

Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина было изучено в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм в фазе розеток. Полученные результаты приведены в таблице 8.

**Таблица 8 - Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм в фазе розеток(16-дневных растений)**

Концентрация кинетина, мкмоль/мл	Активность РБФК/О, мкмоль СО <sub>2</sub> в мин на 1 мг белка	Активация, %
-	0,065±0,003	100
0,25	0,068±0,004	105
0,50	0,073±0,003	113
1,0	0,075±0,004	115
1,5	0,125±0,005	193
2,0	0,195±0,005	300
3,0	0,111±0,004	171
5,0	0,091±0,003	140
7,5	0,091±0,003	140
10,0	0,079±0,003	121

Как видно из представленных в таблице 8 данных, кинетин оказывал активирующее действие на карбоксилазную активность

рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм в пределах концентраций кинетина в мл реакционной среды от 0,25 до 10,0 мкмоль. Наибольшее – 300% в три раза активирующее действие кинетина на карбоксилазную активность, рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы проявилось при концентрации в реакционной среде 2 мкмоль/мл. При концентрации кинетина 10 мкмоль на мл реакционной среды его активирующее действие на фермент снизилось до 21%.

#### 5.4. Резюме

Проведены сравнительные исследования влияния различных способов добавления кинетина в процессе гомогенизации листьев, в реакционную среду, или и в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду на проявление рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса расы Энкхайм. Из трех способов наибольшее активирующее действия кинетина проявлялось при добавлении его в реакционную среду. При этом активация кинетином рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса не зависела от возраста растений.

У шестнадцатидневных и двадцативосьмидневных растений арабидопсиса расы Энкхайм добавление кинетина в процессе гомогенизации листьев вызывало незначительное – на 15% возрастание рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина, а у тридцативосьмидневных значительную активацию фермента – на 38%.

Добавление кинетина и в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду независимо от возраста растений не вызывало значительной активации рибозофосфатизомеразной активности

мультиферментного комплекса в сравнении с добавлением его только в реакционную среду. Полученные результаты дают основание предполагать, что кинетин без посредников оказывает прямое активирующее действие на фермент мультиферментного комплекса.

Установлена онтогенетическая зависимость от возраста растений активности рибозофосфатизомеразы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм.

Степень активирующего действия кинетина на рибозофосфатизомеразную активность в экстрактах из листьев арабидопсиса зависела от возраста растений. Независимо от способа добавления кинетина наибольшая степень активации фермента проявлялась у старых, тридцативосьмидневных растений.

Изучение влияния концентрации кинетина в реакционной среде на активность фосфорибулокиназы мультиферментного комплекса показало, что наибольшее активирующее действие на фермент оказывало 2 мкмоль/мл и в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы Энкхайм, и его низкопродуктивного мутанта 58/15. Степень же активации фермента кинетином была разной: у исходной расы – 78%, у мутанта – 59%.

В экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм и его мутантов – высокопродуктивного-триплекс и низкопродуктивного – 58/15 изучена зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде активности фосфорибулокиназы мультиферментного комплекса растений различного возраста. Обнаружена зависимость от возраста степени активирующего действия кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина: наибольшая активация фермента проявлялась у шестнадцатидневных растений, наименьшая – у зрелых, двадцативосьмидневных растений. Следовательно, в листьях

зрелых двадцатидневных растений содержалось по-видимому достаточное количество эндогенных цитокининов.

Обнаружено, что наибольшее активирующее действие – 300% кинетин оказывал в концентрации 2 мкмоль/мл реакционной среды на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм в фазе розеток.

Установлена общая закономерность для трёх ферментов мультиферментного комплекса: наибольшее активирующее действие кинетин оказывал в концентрации 2 мкмоль в 1 мл реакционной среды.

## **ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КИНЕТИНА *IN VITRO* НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА**

В данной главе приведены результаты изучения влияния кинетина при его добавлении в реакционную среду на скорость фосфорibuлокиназной и карбоксилазной реакций в ферментных препаратах различной степени очистки, которые были выделены из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в возрасте растений 4-5 настоящих листьев.

В экстрактах из листьев растений хлопчатника сорта 108-Ф различного возраста (5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения) было определено влияние добавления кинетина в реакционную среду на скорость фосфорibuлокиназной и карбоксилазной реакций.

Дважды определялась каждая ферментативная активность в присутствии собственных специфических субстратов ферментов – для фосфорibuлокиназы – рибулозо-5-фосфата+АТФ и для рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы-рибулозо - 1,5-бисфосфата и при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ.

### **6.1. Влияние кинетина на ферментативные активности в препаратах различной степени очистки из листьев хлопчатника**

Было установлено [5,6,7,9,]. что в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника добавление кинетина в реакционную среду вызывало возрастание фиксации  $^{14}\text{CO}_2$  при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ. На наличие мультиферментного комплекса цикла Кальвина, проявляющего три ферментативные



активности – рибозофосфатизомеразную, фосфорибулокиназную и карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы указывала фиксация  $^{14}\text{CO}_2$  экстрактами из листьев в присутствии рибозо-5-фосфата+АТФ.

Чтобы выяснить механизм действия кинетина на ферменты, ответственные за фиксацию  $\text{CO}_2$  в хлоропластах, нами было изучено в препаратах различной степени очистки влияние кинетина на активность каждого фермента в отдельности.

### **6.1.1. Зависимость от степени очистки ферментного препарата из листьев хлопчатника активирующего действия кинетина *in vitro* на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса**

Исследовано влияние добавления 2 мкмоль кинетина в мл реакционной среды на скорость фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций в ферментных препаратах различной степени очистки, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

Результаты определения скорости фосфорибулокиназной реакции без кинетина и при добавлении его в реакционную среду в ферментных препаратах различной степени очистки, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в возрасте 4-5 настоящих листьев, приведены в таблице 9 [ 15].

Приведенные в таблице 9 данные показывают, что при добавлении кинетина в реакционную среду скорость фосфорибулокиназной реакции возросла на 33%. В ферментном препарате частично очищенном фракционированием сульфатом аммония фосфорибулокиназная активность увеличилась на 13%. Способность фосфорибулокиназы активироваться кинетином терялась при очистке этого ферментного

препарата с помощью гель-фильтрации на Сефадексе G-50 и гель-хроматографии на Сефадексе G-200 [ 15].

**Таблица 9 - Влияние кинетина при добавлении в реакционную среду на фосфорibuлокиназную (ФРК) активность ферментных препаратов различной степени очистки, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф на стадии развития растений 4-5 настоящих листьев субстрат-рибозо-5-фосфат+АТФ**

Стадия очистки	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	
	Кинетин	
	-	+
Экстракт	12,1 ± 0,18 100%	16,2 ± 0,24 133%
Осаждение белков при насыщении 35-50% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	23,4 ± 0,35 100%	26,4 ± 0,39 113%
Гель-фильтрация на Сефадексе G-50	34,5 ± 0,52 100%	35,8 ± 0,54 103%
Гель-хроматография на Сефадексе G-200	12,2 ± 0,73 100%	13,1 ± 0,74 102%

**6.1.2. Влияние кинетина *in vitro* на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в препаратах различной степени очистки из листьев хлопчатника**

В таблице 10 приведены результаты изучения скорости карбоксилазной реакции рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы без кинетина и с добавлением его в реакционную среду при определении в ферментных препаратах различной степени очистки, выделенных из

листьев растений хлопчатника сорта 108-Ф в возрасте 4-5 настоящих листьев.

Результаты приведенные в таблице 10 показывают, что добавление кинетина в реакционную среду приводило в экстракте и частично очищенном ферментном препарате к значительному возрастанию скорости карбоксилазной реакции. Добавление кинетина в реакционную среду при определении активности фермента в экстракте из листьев приводило к наибольшему увеличению карбоксилазной активности рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы - 268%.

В ферментном препарате, полученном при осаждении белков в экстракте из листьев с помощью сульфата аммония в пределах 35-50% насыщения с последующим обессоливанием на колонке с Сефадексом G-50, наблюдалось снижение активации кинетином скорости карбоксилазной реакции с 268% до 145%.

Способность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы активироваться кинетином терялась при очистке ферментного препарата из листьев хлопчатника с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-200.

Потеря ферментами способности активироваться фитогормоном при очистке с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-200 свидетельствует о том, что активация кинетином фосфорibuлокиназной активности и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы была опосредованной.

Колонка с Сефадекс G-200, представляет собой молекулярное сито «наоборот», т.е. вначале проходят вниз белки с молекулярной массой более 500 кД. Белки же с меньшей молекулярной массой задерживаются («застревают»), причем чем меньше молекулярная масса, тем белки застревают дольше и вверху колонки.

**Таблица 10 - Влияние кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в процессе очистки экстракта из листьев хлопчатника сорта 108-Ф на стадии развития растений 4-5 настоящих листьев. Субстрат - рибозо-5-фосфат+АТФ**

Стадия очистки	Активность РБФК, мкмоль CO <sub>2</sub> /мин на 1 мг белка	
	Кинетин	
	-	+
Экстракт	0,045±0,001 100%	0,121±0,002 268%
Осаждение белков при 35-50% насыщении (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,660±0,001 100%	0,96±0,002 145%
Гель-хроматография на Сефадексе G-200	0,0951±0,002 100%	0,0930±0,002 -

Полученные данные указывают на то, что в экстрактах из листьев хлопчатника могут существовать рецепторы кинетина белковой природы или кофакторы его действия на активность фосфорилбулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы [14,15].

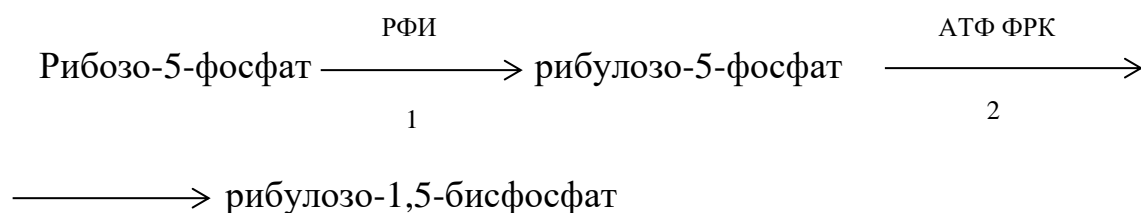
На основании полученных результатов изучение влияния кинетина на скорость ферментативных реакций мультиферментного комплекса цикла Кальвина в зависимости от возраста растений проводились на экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

**6.2. Зависимость от фазы развития растений влияние кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника**

### 6.2.1. Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса при использовании различных субстратов

В связи с результатами, представленными в разделе 6.1 возникает вопрос: оказывает ли кинетин активирующее действие непосредственно на каждый фермент в отдельности или выполняет роль эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к изменению таких кинетических параметров как максимальная скорость реакции  $V_{\max}$  и константа  $K_M$  (рис ) у фермента фосфорibuлокиназы, действующего вторым после рибозофосфатизомеразы.

Для ответа на данный вопрос необходимо было определить влияние добавления в реакционную среду различных концентраций кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса при использовании различных субстратов – рибулозо-5-фосфата-собственного специфического субстрата фермента и рибозо-5-фосфата-субстрата рибозофосфатизомеразы (РФИ) действующей первой в данной последовательности реакции:



В таблице 11 представлены результаты определения скорости фосфорibuлокиназной реакции мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф при добавлении в реакционную среду различных концентраций кинетина в присутствии собственного

специфического субстрата фермента-рибулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата+АТФ.

**Таблица 11 - Зависимость от использования различных субстратов влияния разных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф (фаза развития растений 5-6 настоящих листьев)**

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка			
	Рибулозо-5- фосфат	Активация, %	Рибозо-5- фосфат	Активация, %
-	16,5±0.23	100	18,1±0,27	110
0.5	19,5±0.27	112	22,0±0,30	133
1	20,0±0.30	121	24,0±0,34	145
2	20,5±0.28	124	24,5±0,33	148
3	28,0±0.40	170	31,6±0,44	191
4	25,6±0.35	155	28,1±0.39	170
5	20,1±0.28	122	22,2±0,31	134
10	15,7±0.21	-	16,5±0,28	-
15	12,5±0.17	-	14,1±0,19	-

Приведенные в таблице 11 данные показывают, что при концентрациях кинетина 0,5–5 мкмоль/мл реакционной среды фосфорибулокиназная активность возрастала независимо от использованного субстрата. От использованного субстрата зависели величины активирующего действия кинетина. При концентрациях кинетина 3- 4 мкмоль/мл реакционной среды в присутствии собственного специфического субстрата – рибулозо-5-фосфата проявилось его наибольшее активирующее действие - 170-155% .

При всех концентрациях кинетина величины фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса были значительно выше 133-191% при использовании рибозо-5-фосфата+АТФ в качестве субстрата. Кинетин в концентрации 1 мкмоль/мл реакционной среды присутствии рибулозо-5-фосфата+АТФ увеличивал фосфорибулокиназную активность на 21%, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ – на 45%.

Фосфорибулокиназная активность в присутствии собственного специфического субстрата рибулозо-5-фосфата+АТФ возрастала на 24% при содержании кинетина в реакционной среде 2 мкмоль/мл реакционной среды, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ – на 48%. Скорость фосфорибулокиназной реакции в присутствии рибулозо-5-фосфата при концентрации кинетина 3-4 мкмоль/мл реакционной среды увеличивалась на 70%, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ – на 91%.

При использовании рибулозо-5-фосфата и концентрации кинетина 4 мкмоль/мл реакционной среды фосфорибулокиназная активность мультиферментного комплекса возрастала на 55%, а в присутствии рибозо-5-фосфата – на 70%. Концентрация кинетина 5 мкмоль/мл реакционной среды приводила к возрастанию фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в присутствии рибулозо-5-фосфата на 22%, а при использовании рибозо-5-фосфата – на 34%.

Ингибирование фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса происходило при концентрациях кинетина 10 и 15 мкмоль/мл в реакционной среде независимо от использованного субстрата.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что мультиферментный комплекс обладает большой чувствительностью к кинетину, так как уже при концентрациях кинетина 1-2 мкмоль/мл

реакционной среды проявляется значительное активирующее действие кинетина на фосфорibuлокиназную активность.

Следовательно, регуляция кинетином активности фосфорibuлокиназы встроенной в мультиферментный комплекс, при использовании первого субстрата метаболической цепи является более быстрой и эффективной. Таким образом, кинетин выполняет в данном случае роль аллостерического эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости фосфорibuлокиназной реакции.

Рибозо-5-фосфат+АТФ использовался в качестве субстрата фосфорibuлокиназы в дальнейшие исследованиях.

### **6.2.2. Влияние кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса в зависимости от фазы развития растений**

Гормональный гомеостаз растительного организма при переходе его с одной стадии развития на другую значительно изменяется. Инструментом, которым геном управляет процессами роста, развития и покоя растений, являются фитогормоны. Фотосинтез, транспорт веществ и отложение их в запас регулируются фитогормонами. Процессами устойчивости растений к стрессовым воздействиям также управляют фитогормоны [40].

Получены данные о значительной активации кинетином *in vitro* (т.е. при добавлении в реакционную среду) ключевых, характеристических ферментов фотосинтеза – фосфорibuлокиназы и рибулозобисфосфаткарбок-силазы/оксигеназы в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, выделенных в фазе развития растений 4-5 настоящих листьев. Сохраняется ли на других стадиях развития растений способность этих ферментов активироваться кинетином и зависит ли их активация от концентрации кинетина? Чтобы ответить на эти вопросы, необходимо было изучить



влияние кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную и карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, выделенных в фазах развития растений 5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения.

В таблице 12 приведены данные, полученные при определении влияния различных концентрации кинетина в реакционной среде на скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в фазе бутонизации растений.

При сравнении величин фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса, выделенного в фазе развития хлопчатника 5-6 настоящих листьев таблица 11 и в фазе бутонизации, видно, что активность фермента в фазе бутонизации возросла на 30%.

Добавление кинетина в реакционную среду в концентрации 1-2 мкмоль/мл реакционной среды на стадии развития хлопчатника 5-6 настоящих листьев, вызывало активацию фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса на 45-48%, а в фазе бутонизации растений – на 26-36% соответственно.

При концентрации же кинетина в реакционной среде 3 мкмоль/мл реакционной среды скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса в экстракте из листьев растений, выделенного в фазе развития 5-6 настоящих листьев возросла на 91% и в фазе бутонизации – на 91%, т.е. одинаково.

Активирующее действие кинетина несколько снижалось при его концентрации 4 мкмоль/мл реакционной среды. Скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса, выделенного из листьев растений в фазе 5-6 настоящих листьев возросла на 70%, а в фазе бутонизации – на 67%, т.е. почти одинаково.

**Таблица 12 - Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорibuлокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе бутонизации растений (субстрат: рибозо-5-фосфат+АТФ)**

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	
	Бутонизация	Активация, %
-	20,4 ± 0,30	100
0,5	23,6 ± 0,35	117
1	25,5 ± 0,38	126
2	27,4 ± 0,41	136
3	38,5 ± 0,58	191
4	33,7 ± 0,50	167
5	21,2 ± 0,31	105
10	18,4 ± 0,28	-
15	14,3 ± 0,21	-

Фосфорibuлокиназная активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев увеличивалось на 34% при концентрации кинетина 5 мкмоль/мл реакционной среды, а в фазе бутонизации это концентрация кинетина не оказывала влияния.

Концентрации кинетина 10-15 мкмоль/мл реакционной среды во всех вариантах опытов снижала скорость фосфорibuлокиназной реакции мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника [75].

В таблице 13 приведены данные, полученные при определении при добавлении в реакционную среду различных концентраций кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в фазе цветения.

**Таблица 13 - Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорibuлокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе цветения растений (субстрат: рибозо-5-фосфат+АТФ)**

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	
	Цветение	Активация, %
-	21,2 ± 0,32	100
0,5	30,5 ± 0,45	143
1	30,8 ± 0,46	145
2	31,4 ± 0,47	148
3	40,1 ± 0,60	189
4	38,6 ± 0,58	182
5	38,2 ± 0,57	180
10	19,3 ± 0,29	-
15	15,5 ± 0,23	-

При количестве кинетина 4-5 мкмоль/мл реакционной среды выявлены значительные различия в скорости фосфорibuлокиназной реакции мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев, выделенных в фазе бутонизации растений и в фазе цветения.

В фазе бутонизации растения кинетин в концентрации 4 мкмоль/мл реакционной среды активировал на 67% фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев.

Концентрация же кинетина 5 мкмоль/мл реакционной среды не оказывала никакого влияния, т.е. не увеличивала и не подавляла фосфорибулокиназную активность.

В экстрактах из листьев растений, выделенных в фазе цветения, кинетин в концентрации 4-5 мкмоль/мл реакционной среды активировал фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса, на 82-80%, соответственно.

Таким образом, полученные результаты дают основание считать, что в сравнении с фазой развития растений хлопчатника 5-6 настоящих листьев в фазах бутонизации и цветения для значительной активации (от 40 до 90%) фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса необходимы более высокие концентрации кинетина [16,19,20] .

### **6.2.3. Зависимость от различных концентраций кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф**

Результаты определения карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, выделенного в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев приведены в таблице 14.

Как показывают данные, что продемонстрированы в таблице 14, в ситуации, при которой кинетин вносился в реакционную среду в концентрациях 1 мкмоль/мл, карбоксилазная активность РБФК/О становилась на 24% больше. А в ситуации, при которой кинетин вносился в реакционную среду в концентрациях 1,5 мкмоль/мл, карбоксилазная активность РБФК/О становилась на 51% больше.

**Таблица 14 - Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев. Субстрат – рибозо-5-фосфат+АТФ**

<b>Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды</b>	<b>Активность РБФК/О, мкмоль СО<sub>2</sub>/мин на 1 мг белка</b>	<b>Активация, %</b>
-	0,042 ± 0,001	100
0,5	0,045 ± 0,001	109
1,0	0,051 ± 0,001	124
1,5	0,062 ± 0,001	151
2,0	0,101 ± 0,002	246
2,5	0,105 ± 0,002	250
3,0	0,098 ± 0,002	238
3,5	0,087 ± 0,002	212
4,0	0,078 ± 0,001	192
5,0	0,056 ± 0,001	141

Что касается ситуации, при которой кинетин вносился в реакционную среду в концентрациях 2-3 мкмоль/мл, то карбоксилазная активность РБФК/О увеличивалась более чем на 200%.

Если же использовались такие концентрации кинетина, которые превышали 3 мкмоль/л, то здесь активирующее воздействие, с которым сталкивался фермент, несколько снижалось и составляло 212 – 192-141% соответственно [ 20].

### **6.3. Резюме**

В рамках настоящего исследования определено, как изменяется фосфорилбулокиназная активность полиферментного образования, изготовленного из хлопчатниковых листьев, в зависимости от увеличения или уменьшения количества кинетина. В ходе экспериментальных

исследований использовались как рибулозо-5-фосфат, так и рибозо-5-фосфат. Таким образом, было выявлено, что при применении рибозо-5-фосфата кинетин оказывал значительно более существенное активирующее влияние. Из этого следует, что кинетин выполняет в данном случае роль эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости и рибозофосфатизомеразной, и фосфорibuлокиназной реакций.

В ходе работы с препаратами ферментного характера, отличающимися друг от друга по качеству очистки (и изготовленных с применением листьев хлопчатника), было определено следующее. Самой значительным влиянием на активность ферментов кинетин оказывал в том случае, когда применялись листовые экстракты. А после того, как экстракт очищался посредством белкового фракционирования, воздействие кинетина существенно уменьшалось. После того, как проводилась гель-хроматография, кинетин полностью утрачивал способность оказывать интенсифицирующее воздействие на активность, показываемую ферментами. Из этого следует, что в процессе осуществления гель-хроматографии происходит такое явление, как «застривание» (оно представляет собой задержку либо рецептора кинетина, либо усилителя сигнала).

Кроме того, научные разработки позволили определить существование онтогенетической зависимости активирующего влияния, оказываемого кинетином на фосфорibuлокиназную активность, демонстрируемую полиферментным комплексом. Для значительной (80%) активации фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса в фазе цветения растений в сравнении с фазой 5-6 настоящих листьев и бутонизации необходимы были более высокие концентрации кинетина.

#### **6.4. Рекомендация производству**

Для увеличения количества завязей и урожайности листа хлопчатника необходимо обрабатывать раствором кинетина в фазе цветения растений.

## ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

Арабидопсис и хлопчатник относятся к эволюционно далеким друг от друга семействам и сильно различаются по кариотипу.

Арабидопсис имеет 5 пар хромосом ( $2n=10$ ), хлопчатник – 26 пар хромосом ( $2n=52$ ), относящихся к двум геномам – AA старого света ( $2n=26$ ) и ДД нового света ( $2n=26$ ) [85].

Арабидопсис имеет 24 – 24000 генов, хлопчатник же – огромное число генов.

В связи с этим представляло большой интерес провести сравнительные кинетические исследования каждой в отдельности ферментативной активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев обоих растений и влияния кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса. Это позволило бы выявить как общие закономерности кинетического поведения ферментов в мультиферментном комплексе цикла Кальвина в экстрактах из листьев столь различных растений, так и их специфические видовые особенности. Получение таких данных необходимо было для изучения влияния кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев в зависимости от возраста растений.

Кривые зависимости от концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде рибозо-фосфатизомеразной активности мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника имели четкий лаг-период, затем скорость реакции возрастала пропорционально увеличению концентрации субстрата до 0,5 мМ. Замедление скорости рибозофосфатизомеразной реакции мультиферментного комплекса из листьев арабидопсиса начиналась при

концентрациях рибозо-5-фосфата в реакционной среде 0,5-1 мМ, затем оставалась постоянной в пределах концентраций 1-4 мМ.

Скорость рибозофосфатизомеразной реакции мультиферментного комплекса из листьев хлопчатника возрастала пропорционально увеличению концентрации субстрата в реакционной среде в пределах 0.5-1 мМ, затем в пределах концентраций рибозо-5-фосфата 1-2 мМ скорость реакции увеличивалась в два раза и оставалась постоянной в пределах 2-4 мМ.

Величины рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса из листьев хлопчатника были в два раза выше величин активности фермента мультиферментного комплекса из листьев арабидопсиса при концентрациях субстрата 1-2 мМ.

Совокупность полученных результатов подтверждает наличие «тунельного» или «направленного переноса метаболитов» в мультиферментных комплексах. Это означает, что субстрат – рибозо-5-фосфат связывается один раз с ферментом  $E_1$  – рибозофосфатизомеразой, образовавшийся продукт реакции рибулозо-5-фосфат, не выходя за пределы микрокомпартамента мультиферментного комплекса, сразу же связывается с ферментом  $E_2$ -фосфорibuлокиназой. Продукт второй реакции рибулозо-1,5-бисфосфат также не выходит за пределы микрокомпартамента мультиферментного комплекса, а связывается с ферментом  $E_3$ -рибулозобисфосфаткарбокxилазой/оксигеназой.

Результатом «направленного» переноса метаболитов является более быстрый ответ метаболических процессов на изменения в концентрации субстрата или эффектора, так как благодаря ему уменьшается предстационарный период, за счет уменьшения времени перехода увеличивается общая скорость реакции.

Кинетическое поведение фосфорibuлокиназы и рибулозобисфосфаткарбокxилазы/оксигеназы мультиферментного



комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника изучали при использовании собственных специфических субстратов рибулозо-5-фосфата для фосфорибулокиназы и рибулозо-1,5-бисфосфата – для рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы и в присутствии рибозо-5-фосфата-субстрата рибозофосфатизомеразы, фермента, действующего первым в данной последовательности метаболической цепи реакций.

Кинетические кривые зависимости от длительности реакции фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса при использовании собственного субстрата – рибулозо-5-фосфата и в присутствии рибозо-5-фосфата сильно различались. В присутствии рибулозо-5-фосфата ход кинетической кривой был плавным, уже при длительности реакции 15 секунд, наблюдалась замедление скорости реакции, а к 0,5-1 минуте – кривая плавно выходила на плато.

При использовании же рибозо-5-фосфата наблюдался всплеск начальной скорости фосфорибулокиназной реакции. При длительности реакции 15-30 секунд фосфорибулокиназная активность была выше на 80% в сравнении с реакцией в присутствии рибулозо-5-фосфата. При длительности реакции 0,5- 0,75 минут скорость реакции оставалась постоянной, затем в течение 1-2 минут несколько снижалась. Таким образом, ход кинетической кривой не был плавным, а был всплеск скорости реакции до 0,5 минут, затем наблюдалось постепенное снижение скорости с выходом на плато.

Ход кинетических кривых зависимости скорости фосфорибулокиназной реакции от концентрации в реакционной среде рибулозо-5-фосфата или рибозо-5-фосфата был идентичен ходу кинетических кривых, зависимости скорости реакции от её длительности. При содержании 0,5 мм рибозо-5-фосфата в реакционной среде величина скорости фосфорибулокиназной реакции превосходила величину активности фермента в присутствии рибулозо-5-фосфата на 55%.

Изучение зависимости от количества белка в реакционной среде фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф при использовании собственных субстратов ферментов – рибулозо-5-фосфата и рибулозо-1,5-бисфосфата соответственно и в присутствии рибозо-5-фосфата позволило обнаружить, что положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц ферментов эффективнее при использовании рибозо-5-фосфата.

Кинетические исследования зависимости от концентрации субстрата фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм были проведены при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата.

Ход кривых также не был гиперболической формы, но имел классическую S-образную сигмоидную форму без всплесков и загибов, характерных для кинетически кривых ферментов мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника.

В мультиферментных комплексах может осуществляться координированная регуляция активности ферментов, т.е. активация и ингибирование за счет конформационных изменений, вызванных субстратом одного фермента и переданных с помощью различных контактов на другой фермент.

Совокупность полученных нами результатов кинетических исследований свидетельствуют также о проявлении в мультиферментных комплексах координированных регуляторных эффектов. Одним из проявлений этих эффектов является повышение субстратом первого фермента комплекса – рибозо-5-фосфатом сродства к продукту реакции – рибулозо-5-фосфату фосфорибулокиназы

являющейся вторым ферментом комплекса вследствие этого повышалась максимальная скорость последующих реакций и средство к соответствующим субстратам последовательно действующих в данном метаболическом пути, цикле Кальвина, ферментов.

Таким образом, полученные результаты позволили обнаружить для мультиферментных комплексов цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника не только свойства, характерные для всех мультиферментных комплексов, но и специфические для каждого вида растений особенности кинетического поведения каждого в отдельности фермента комплекса.

Нами было исследовано влияние кинетина на ферментативные активности мультиферментных комплексов цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника при условиях реакционной среды, оптимальных для каждого вида растения.

При изучении рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев растений арабидопсиса различного возраста, нами установлена онтогенетическая зависимость активности фермента. Наибольшая активность фермента проявлялась у 28-дневных растений. У более молодых растений – 16-дневных и более старых – 38-дневных рибозофосфатизомеразная активность комплекса имела одинаковую величину и была ниже, чем у 28-дневных растений на 31%.

Исследование влияния различных способов добавления кинетина: I – при гомогенизации листьев, II – при гомогенизации листьев, и в реакционную среду, III – только в реакционную среду на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев растений арабидопсиса различного возраста позволило обнаружить, что наибольшее активирующее действие на фермент кинетин оказывал при добавлении только в реакционную среду,

причем независимо от возраста растений. Полученные результаты дают основание предполагать, что кинетин без посредников оказывает прямое активирующее влияние на ферменты мультиферментного комплекса.

Степень же активирующего влияния кинетина на фермент комплекса зависела от стадии онтогенеза растений. Добавление кинетина в реакционную смесь с экстрактом из листьев 16-дневных и 28-дневных растений приводило к возрастанию рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса на 25% и 28% соответственно. Наибольшая – 47%-ная активация фермента наблюдалась у 38-дневных растений, что связано по-видимому, со снижением уровня эндогенных цитокининов в стареющих листьях [ 44,89].

Для трех ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина установлена общая закономерность: наибольшее активирующее действие кинетина проявлялось в концентрации 2 мкмоль в 1 мл реакционной среды. При этой концентрации кинетина в реакционной среде проводились дальнейшие исследования.

В экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм и его мутантов – высокопродуктивного – триплекс и низкопродуктивного – 58/15, исследовано влияние кинетина в реакционной среде на скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса.

У всех трёх объектов обнаружена зависимость от возраста растений активирующего действия кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина: наибольшая активация фермента проявлялась у 16-дневных растений, наименьшая – у зрелых, 28-дневных растений. Следовательно, в листьях зрелых, 28-дневных растений содержалось, по-видимому, достаточное количество эндогенных цитокининов. [ 24].

При сравнении активации кинетином трех ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев

16-дневных растений арабидопсиса расы Энкхайм установлено, что кинетин оказывал в разной степени активирующее действие: рибозофосфатизомеразная активность возрастала на 25%, фосфорибулокиназная – на 203%, а карбоксилазная – на 300%.

Воздействие, которое оказывается кинетином при его добавлении в реакционную среду, проверялось как с применением рибулозо-5-фосфата, так и с использованием рибозо-5-фосфата. Определено, что использование последнего предоставляет возможность значительно больше повысить показываемую полиферментным комплексом активность.

В связи с этим на ферментных препаратах различной степени очистки, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе развития растений 4-5 настоящих листьев, влияние кинетина при добавлении в реакционную среду на фосфорибулокиназную и карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/-оксигеназы мультиферментного комплекса было изучено при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ. Наибольшее активирующее действие на ферментативные активности кинетин оказывал в экстрактах из листьев. Очистка экстракта с помощью фракционирования белков сульфатом аммония и гель-фильтрацией через колонку с Сефадекс G-50 приводила к значительному снижению активирующего действия кинетина на ферментативные активности. При гель-хроматографии же на колонке с Сефадекс G-200 способность ферментов активироваться кинетином полностью терялась. Полученные результаты указывают на то, что при гель-хроматографии на Сефадексе G-200 происходит застревание-задержка или рецептора кинетина или «вторичного» мессенджера (усилителя сигнала), имеющих белковую природу, молекулярная масса которых намного меньше 500 кД.

В связи с полученными результатами, влияние кинетина при добавлении в реакционную среду на скорость фосфорibuлокиназной и карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в зависимости от стадии онтогенеза растений хлопчатника сорта 108-Ф было изучено на экстрактах из листьев.

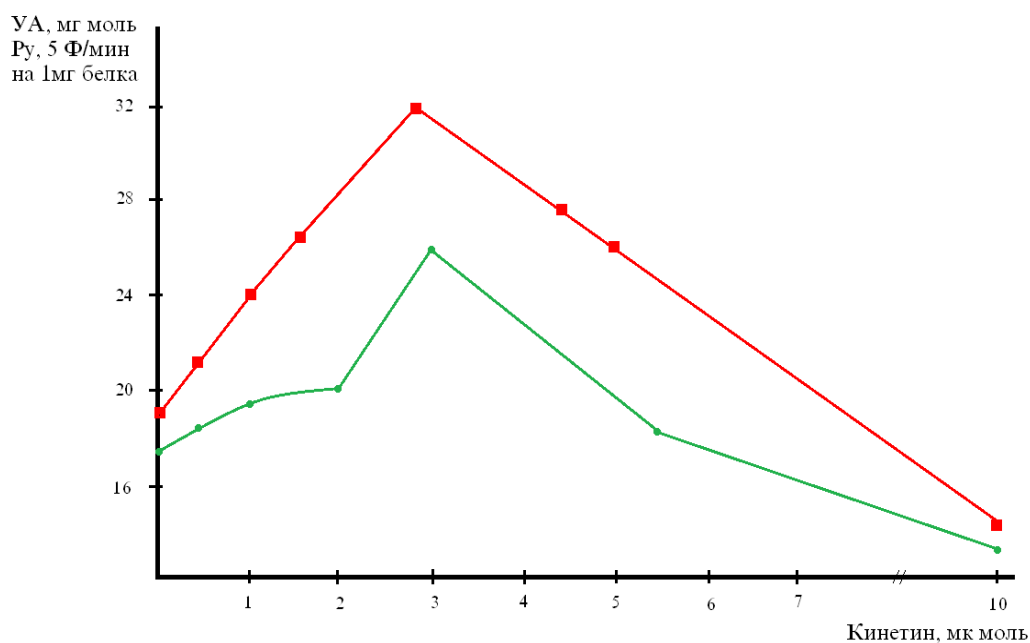
Установлена онтогенетическая зависимость фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев, например, в фазе цветения активность фермента была выше на 17% в сравнении с фазой 5-6 настоящих листьев.

Степень интенсифицирующего влияния кинетина зависела от его концентрации в реакционной среде и фазы развития растений хлопчатника сорта 108-Ф. При содержании 2 мкмоль кинетина в 1 мл реакционной среды скорость фосфорibuлокиназной реакции мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника в фазе 4-5 настоящих листьев возросла на 33%, в фазе 5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения – на 46-48%.

Увеличение количества кинетина до 4 мкмоль/мл реакционной среды снижало на 20-24% фосфорibuлокиназную активность в экстрактах из листьев в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев и бутонизации, а в фазе цветения в пределах концентраций 3-5 мкмоль/мл реакционной среды активирующее действие кинетина было на одном уровне. При содержании 3 мкмоль кинетина в 1 мл реакционной среды скорость ферментативной реакции в фазе 5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения увеличилась на 90-91%.

Следовательно, в добавлении экзогенного кинетина растения хлопчатника особенно остро нуждаются в фазе цветения. Чтобы понять механизм действия экзогенного кинетина на скорость ферментативных реакций мультиферментного комплекса цикла Кальвина, на рис. 50 была

изображена зависимость активности от количества кинетина фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф при использовании собственного субстрата - рибулозо-5-фосфата и рибулозо-5-фосфата - субстрата рибулозофосфатизомеразы.



**Рисунок 50 - Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде при использовании различных субстратов фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, фаза развития растений 5-6 настоящих листьев.**

● ● ● - рибулозо-5-фосфат  
 ■ ■ ■ - рибулозо-5-фосфат

Из представленных на рис. 50 данных четко видны различия в форме кривых зависимости от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в присутствии различных субстратов.

Кривая зависимости фосфорibuлокиназной активности при использовании собственного субстрата-рибулозо-5-фосфата в пределах концентраций кинетина в реакционной среде 0,5-2 мкмоль имела лаг-период, затем при увеличении концентрации кинетина до 3 мкмоль активность фермента резко возрастала. Начиная с содержания кинетина в реакционной среде 4-5 мкмоль фосфорibuлокиназная активность снижалась, а при 10 мкмоль активность фермента ингибировалась. Таким образом, полученные данные соответствуют характеру проявления действия фитогормонов в низких концентрациях они оказывают интенсифицирующее действие, а в высоких – подавляющее, вызывая даже апоптоз (гибель).

Форма кривой зависимости фосфорibuлокиназной активности от концентрации кинетина в реакционной среде в присутствии рибозо-5-фосфата была совершенно иной- на кривой не было лаг-периода, в пределах концентраций кинетина 0,5-3 мкмоль кривая как бы выпрямлялась из-за значительного возрастания ферментативной активности. Затем в пределах концентраций кинетина 4-5 мкмоль активность фермента снижалась, а при содержании 10 мкмоль гормона в реакционной среде ферментативная активность ингибировалась.

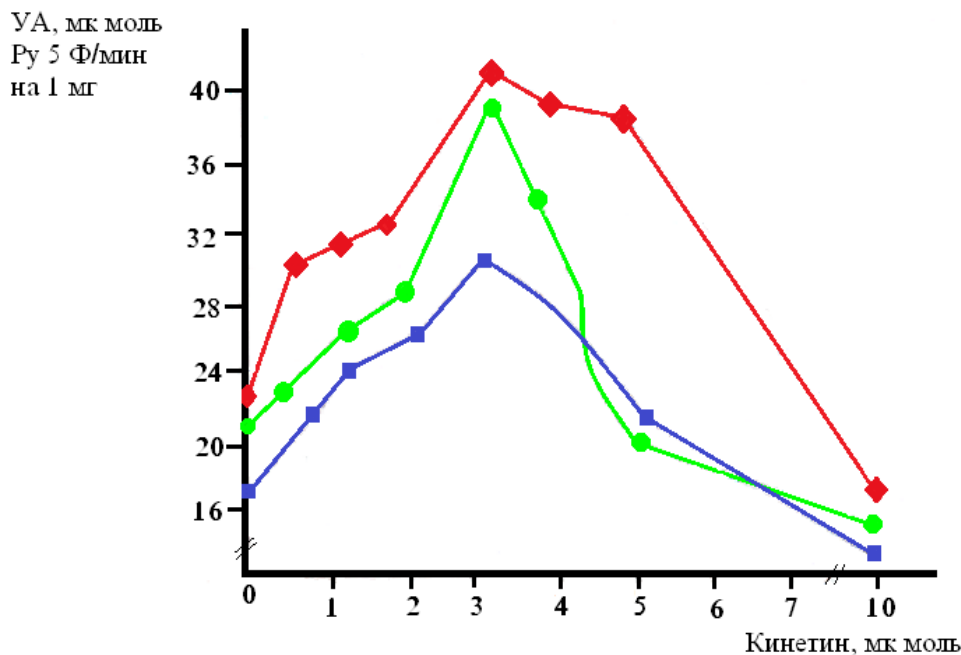
Полученные результаты дают основания полагать, что кинетин в присутствии рибозо-5-фосфата выполняет роль аллостерического эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости и рибозофосфатизомеразной, и фосфорibuлокиназной реакций [ 22,23].

Исходя из полученных результатов, была изучена зависимость влияния различных количеств кинетина в реакционной среде на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев растений хлопчатника сорта 108-Ф в



разной фазе развития при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ.

Данные, полученные в результате этих экспериментов, представлены на рис. 51 ниже.



**Рисунок 51 - Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде и фазы развития растений фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.**

- ◆ ◆ - фаза развития растений 5-6 настоящих листьев.
- ● - фаза бутанизации.
- ◆ ◆ - фаза цветения.

Как видно из приведенных на рис. 51 данных, формы кривых зависимости фосфорибулокиназной активности от концентрации кинетина и фазы развития растений не имели гиперболической формы и сильно отличались друг от друга.

В фазе развития растений хлопчатника 5-6 настоящих листьев форма кривой в пределах концентраций 0,5-3 мкмоль имела сигмоидную форму. Скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса снижалась при содержании в реакционной среде 4-5 мкмоль кинетина, а 10 мкмоль кинетина ингибировали фермент.

В фазе бутонизации растений хлопчатника форма кривой зависимости фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса от концентрации кинетина 0,5-3 мкмоль в реакционной среде выпрямлялась при содержании в среде 3 мкмоль кинетина активность фермента резко возрастала, в пределах концентраций кинетина 4-5 мкмоль фосфорибулокиназная активность резко снижалась, а 10 мкмоль кинетина ингибировали фермент. При всех концентрациях независимо от количества кинетина в реакционной среде в фазе бутонизации скорости фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса были выше, чем в экстрактах из листьев растений хлопчатника в фазе 5-6 настоящих листьев.

Форма кривой зависимости фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса от концентрации кинетина в реакционной среде была в фазе цветения растений хлопчатника совсем иной, чем в фазе бутонизации и 5-6-настоящих листьев. В пределах концентраций кинетина 0,5-2 мкмоль кривая имела четкий лаг-период, при увеличении содержания кинетина до 3 мкмоль фосфорибулокиназная активность резко возрастала и оставалась постоянной в пределах концентраций кинетина 3-5 мкмоль. Дальнейшее увеличение содержания кинетина в реакционной среде приводило к снижению активности фермента, а 10 мкмоль кинетина ингибировала фермент.

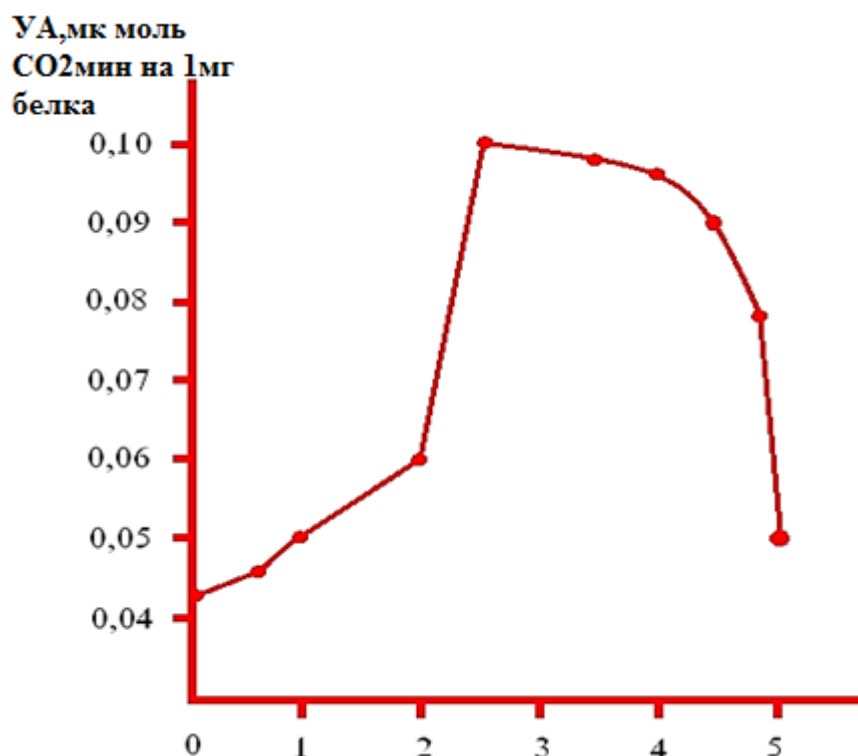
Величины фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса в фазе цветения растений при всех концентрациях кинетина в реакционной среде значительно превосходили величины активности фермента в фазах 5-6 настоящих листьев и бутонизации [75].

Полученные результаты подтверждают данные других авторов [1,40] о том, что в процессе формирования репродуктивных органов и цветения фитогормоны выполняют двойную нагрузку, регулируя ростовые процессы вегетативных и репродуктивных органов, следовательно, необходимы их большие количества или концентрации.

Поскольку рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа действует третьей в данной последовательности метаболической цепи реакций, представляло интерес сравнить форму кривой зависимости от концентрации кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности мультиферментного комплекса в сравнении с фосфорibuлокиназной активностью в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в одной и той же фазе развития растений.

Для сравнения была выбрана фаза развития растений хлопчатника 5-6 настоящих листьев.

Результаты исследования зависимости от различных количеств кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности мультиферментного комплекса в присутствии в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ представлены на рис 52.



**Рисунок 52.** Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 5-6 настоящих листьев.

Из приведенных на рис. 51 и рис. 52 данных видно, что формы кривых зависимости карбоксилазной и фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса от концентрации кинетина в реакционной среде имели S-образные формы, но с максимумами активности при различных концентрациях кинетина.

Максимальная фосфорibuлокиназная активность комплекса проявлялась при содержании 3 мкмоль кинетина в реакционной среде, при 4-5 мкмоль кинетина активность фермента снижалась.

Максимальная карбоксилазная активность рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса наблюдалась

при количестве кинетина 2 мкмоль/мл реакционной среде, оставалась постоянной в пределах концентраций кинетина 2-3,5 мкмоль, т.е. кривая имела плато. При концентрациях кинетина 4-5 мкмоль/мл реакционной среды карбоксилазная активность комплекса также снижалась.

Полученные данные о более эффективной и быстрой активации кинетином фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций при использовании первого субстрата метаболической цепи свидетельствует, о большей чувствительности к кинетину мультиферментного комплекса.

Наибольшая активация при одних и тех же концентрациях кинетина фосфорибулокиназной реакции при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ составляла 174%, а РБФ-карбоксилазной реакции -246%. Более эффективная или высокая активация кинетином рибулозобисфосфаткарбоксилазной реакции указывает на проявление в мультиферментном комплексе координированной регуляции активности ферментов, когда конформационные изменения, вызванные активатором или ингибитором с одного фермента комплекса фосфорибулокиназы передаются с помощью различных контактов на другой фермент комплекса – рибулозобисфосфаткарбоксилазу [ 90].

Таким образом, совокупность полученных нами результатов свидетельствует о том, что для кинетина характерны общие для всех фитогормонов свойства, а именно поливалентность и полифункциональность действия.

## ВЫВОДЫ

1. Для подбора оптимальных условий реакционной среды при проявлении активности этих ферментов впервые проведены сравнительные кинетические исследования рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфат-карбоксилазной реакций мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайд и хлопчатника сорта 108-Ф. У обоих объектов кривые зависимости всех трех ферментативных активностей мультиферментного комплекса от длительности реакции, количества белка и концентрации субстратов имели разнообразные и сложные сигмоидные формы с несколькими загибами отражающие более высокую степень положительных кооперативных взаимодействий между активными центрами субъединиц ферментов и конформационных изменений молекул. Формы кинетических кривых ферментативных активностей мультиферментного комплекса из листьев арабидопсиса и хлопчатника различались. У хлопчатника кинетические кривые имели более сложную сигмоидную форму. Вследствие этого, величины всех ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника были значительно выше, чем у комплекса из листьев арабидопсиса [9-А, 10-А, 11-А, 12-А, 20-А, 24-А, 25-А, 27-А].

2. Рибозо-5-фосфат является эффектором фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, что подтверждается результатами, полученными при изучении зависимости скоростей фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакций мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника от концентрации собственных специфических субстратов – рибулозо-5-фосфата и рибулозо-1,5-бисфосфата соответственно и при использовании рибозо-5-фосфата – субстрата рибозофосфатизомеразы. Поэтому скорости их ферментативных

реакций были значительно выше в присутствии в качестве субстрата рибозо-5-фосфата [3-А,17-А].

3. Проведены сравнительные исследования влияния различных способов добавления кинетина – в процессе гомогенизации листьев, в реакционную среду или и в процессе гомогенизации листьев, и в реакционную среду на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса расы Энкхайм. Из трех способов наибольшее активирующее действие кинетина проявлялось при добавлении его в реакционную среду, причем независимо от возраста растений [5-А,14-А].
4. Установлено, что в процессе очистки экстракта из листьев хлопчатника с помощью фракционирования сульфатом аммония и гел-хроматографией на сефадексе G-200 приводила к потере способности фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы активироваться кинетином [2-А].
5. Обнаружена зависимость от стадии развития растений скорости рибозофосфатизомеразной реакции мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм. Степень интенсифицирующего влияния активирующего кинетина на активность фермента зависела от возраста растений. Наибольшая степень активации фермента проявлялась у старых, тринадцативосьмидневных растений. Это обусловлено, по-видимому, низким содержанием в них эндогенных цитокининов [6-А].
6. Установлена зависимость от возраста растений влияния кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм и его мутантов: высокопродуктивного – триплекс и низкопродуктивного –

- 58/15. Независимо от объекта, наибольшая активация фермента кинетином обнаружена у шестнадцатидневных растений, наименьшая у зрелых двадцативосьмидневных растений. Следовательно, в листьях зрелых растений содержалось, по-видимому, достаточное количество эндогенных цитокининов [8-А].
7. Обнаружено, что из трех ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина наибольшее активирующее действие -300% (три раза) кинетин оказывал на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм в фазе розеток [7-А,12-А].
  8. Установлена зависимость от возраста растений активирующего влияния кинетина на скорость фосфорибулокиназной реакции мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника. Обнаружено, что для значительной (80%) активации фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в фазе цветения растений необходимы более высокие концентрации кинетина в сравнении с фазами 5-6 настоящих листьев и бутонизации [1-А,4-А,14-А,15-А].
  9. Для арабидопсиса и хлопчатника характерна общая закономерность на поздних стадиях онтогенеза цветение для увеличения ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина необходима добавление повышенных концентрации экзогенного кинетина. Это обусловлено, по-видимому, недостаточным содержанием в растениях эндогенных цитокининов [14-А,15-А,18-А,20-А].
  10. Установлен механизм действия кинетина, кинетин выполняет роль аллостерического эффектора ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений[13-А].



## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Абзалов А.А., Наджимов У.К., Мусоев Д.А., Фатхулаева Г.Н. Генетические аспекты роста растений хлопчатника // Кишинев, Штиинцаб 1985. – С. 5-10.
- [2] Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Ложникова В.Н., Голяновская С.А., Гукасян И.А., Гатс К., Романов Г.А. Фотопериодическая и гормональная зависимость клубнеобразования у картофеля, трансформированного геном РНУВ *Arabidopsis* // Физиология растений. – 2005. - Т. 52. – С. 701-707.
- [3] Алёхина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. // Физиология растений, под ред. И.П.Ермакова. – 2-е изд., - М.: Академия, 2007. – 640с.
- [4] Алиев К.А. Молекулярные механизмы биогенеза фотосинтетического аппарата растений. Душанбе, «Дониш», 1998, 72 с.
- [5] Бабаджанова М.А., Хаитова Л.Т., Насыров Ю.С. Влияние кинетина на фиксацию  $^{14}\text{CO}_2$  бесклеточными препаратами *Arabidopsis thaliana* // ДАН. ТаджССР. – 1971. – т.15, №8. – С.62.
- [6] Бабаджанова М.А., Горенкова Л.Г. Effect of kinetine and leucine on the  $^{14}\text{CO}_2$  fixation by enzyme preparation from wild and mutant forms *Arabidopsis thaliana* // Тез.докл. Душанбе. – 1972. – С. 41-42.
- [7] Бабаджанова М.А. Влияние цитокинина на активность анзимов карбоксилирующей фазы фотосинтеза из листьев хлопчатника и резушки Таля: Тез. докл. I-ой Всесоюзной конф. «Регуляторы роста и развития растений». – Москва, 1981. – С. 17-18.
- [8] Бабаджанова М.А., Насыров Ю.С. Мультиферментный комплекс ключевых ферментов фотосинтеза // Физиология растений. – 1992. – т.39Б, вып.4, - С.753-759.

- [9] Бабаджанова М.А., Бакаева Н.П., Бабаджанова М.П. Функциональные свойства мультиферментных комплексов ключевых ферментов цикла Кальвина // Тез. докл. науч. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. А.А.Прокофьева «Фотосинтез, продукционный процесс и регуляция плодоношения у хлопчатника». – Душанбе, 1996. – С. 6-7.
- [10] Бабаджанова М.А., Бакаева Н.П., Бабаджанова М.П. Функциональные свойства мультиферментных комплексов ключевых ферментов цикла Кальвина // Физиология растений. - 2000. – т.47, №1, – С. 27-36.
- [11] Бабаджанова М.П., Бабаджанова М.А., Алиев К.А. Свободный и мембраносвязанный мультиферментные комплексы цикла Кальвина листьев хлопчатника // Физиология растений. – 2002. – т.49, №5, - С.663-667.
- [12] Бабаджанова М.П. Свободные и мембраносвязанный мультиферментные комплексы цикла Кальвина и регуляция их ферментативных активностей: Автореф. дис. докт. биол. наук. Душанбе, 2003. – 45с.
- [13] Бабаджанова М.А., Бабаджанова М.П., Алиев К.А. Онтогенетические изменения ферментативных активностей свободных мультиферментных комплексов цикла Бенсона-Кальвина // Физиология растений. 2006. –т.53. - №1, - С.38-44.
- [14] Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Нарзуллоев М.С., Эсаналиева Ш.А., Нематова Н., Сайфидинов А.К. Влияние кинетина на активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в ферментных препаратах различной степени очистки // Докл. АН РТ, 2007а, т.50, №8, С. 711-715.
- [15] Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Нарзуллоев М.С., Эсаналиева Ш.А., Нематова Н., Сайфидинов А.К. Влияние кинетина на

активность фосфорibuлокиназы в экстрактах из листьев хлопчатника // Докл. АН РТ, 2007, т.50, №4, С. 382-385.

[16] Бабаджанова М.А., Эсаналиева Ш.А., Мирзорахимов А.К. Влияние кинетина на активность мультиферментного комплекса цикла Бенсона-Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника // Состояние и перспективы развития биохимии в Таджикистане. Материалы межд. конф., посвящ. 35-кафедры биохимии ТНУ: тез. докл. – Душанбе, 2009, С.31-33.

[17] Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Бабаджанова М.П., Эсаналиева Ш.А. Онтогенетическая зависимость образования различных мультиферментных комплексов цикла Бенсона-Кальвина в листьях хлопчатника // Физиология растений. – 2010. – т.57, №2, - С. 186-191.

[18] Бабаджанова М.А., Нарзуллоев М.С., Эсаналиева Ш.А., Нематова Н., Сайфудинов А.К. Влияние кинетина на активность рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в ферментах препаратах различной степени очистки // Доклады АН РТ. – 2007. – т. 50. - № 8. – С. 711-715.

[19] Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Нарзуллоев М.С., Эсаналиева Ш.А., Нематова Н., Сайфидинов А.К. Влияние кинетина на активность фосфорibuлокиназы в экстрактах из листьев хлопчатника // Докл. АН РТ, 2007а, т.50, №4, С. 382-385.

[20] Бабаджанова М.А., Эсаналиева Ш.А., Мирзорахимов А.К., Нарзуллоев М.С., Нематова Н., Сайфудинов А.К. Влияние кинетина *in vitro* на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника // Докл. АН РТ, 2014, т.57, №5, С. 408-412.

[21] Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Сайфудинов А.К., Эргашев А.Э., Эсаналиева Ш.А., Ниматова К.Н. Большой практикум по

физиология и биохимии растений с основами энзимологии. Методическая пособия для лабораторных занятий. Душанбе, 2017. С136.

[22] Бабаджанова М.А., Сайфудинов А.К. Кинетическое поведение рибозофосфатизомеразы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм // Доклад АН РТ, 2019. – т.62, №7.- С.464-468.

[23] Бабаджанова М.А., Сайфудинов А.К. Кинетическое исследование фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника // Доклад АН РТ, 2019. – т.62, № 9-10 –С.576 -580.

[24] Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Сайфудинов А.К. Влияние кинетина *in vitro* на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса // Изв. АН РТ, Отдел-е биол. наук – 2019, №1(204). - С.52-55.

[25] Бабаджанова М.А., Сайфудинов А.К. Онтогенетическая зависимость влияния кинетина *in vitro* на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его мутантов // Изв. АН РТ, Отдел-е биол. наук – 2019, №4(207). - С.57-61.

[26] Бакаева Н.П., Бабаджанова М.А., Бабаджанова М.П. Различные формы структурно-функциональной организации ферментов цикла Кальвина // Докл. Академии наук Республики Таджикистан – 1994. – т.37, №9-10. – С. 41-44.

[27] Борзенкова Р.А., Мокраносов А.Т. Роль фитогормонов в биогенезе хлоропластов // Физиология растений. – 1976, т.23, №3. – С. 490-496.

- [28] Бурханова З.А., Федина А.Б., Дмитриева Г.Н., Кулаева О.Н. Влияние цитокинина на активность РНК-полимеразы в ядрах, выделенных из протопластов // Биохимия. – 1980. С.488-491.
- [29] Васинская А.Н., Коробова А.В., Кудоярова Г.Р. Зависимость роста побегов и корней, а также содержания и метаболизма цитокининов от чувствительности растений арабидопсиса к этилену // Известия Самарского научного центра российской академии наук, 2011, т.13, № 5(3), с. 14-16.
- [30] Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высш. шк., 1975. – 392с.
- [31] Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений – М., Мир, 1986. – 393с.
- [32] Данилова М.Н., Кудрякова Н.В., Оельмюллер Р., Кузнецов В.В., Кулаев О.ОН. Участие мембранных рецепторов цитокинина в регуляции транскрипции хлоропластных генов // Вестник РУДН, серия Агронимия и животноводство, 2012, №4, с. 23-32.
- [33] Данилова М.Н., Дорошенко А.С., Зобродин Д.А., Кудрякова Н.В., Оельмюллер Р., Кузнецов В.В. Мембранные рецепторы цитокинина регулируют накопление транскриптов хлоропластных генов // Физиология растений, 2017, т.64, №3, с. 16-21.
- [34] Долгих Е.А., Куменко А.Н., Лепянен И.В., Долгих А.В. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Сообщение I. Цитокинины // Сельскохозяйственная биология, 2016, т.51, №3, с. 285-298.
- [35] Ермаков Г.Л. Надмолекулярная организация ферментных систем I. Структурный аспект проблемы // Биохимия. – 1993. – т.58, вып.5. – С.659-674.

- [36] Зверева С.Д., Романов Г.А. Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования // Физиология растений. 2001. т. 47. С. 479-488.
- [37] Каган З.С. Аллостерическая регуляция ферментов и регуляторные энзимопатии // Итоги науки и техники. Серия биологическая химия. – М.: ВИНТИ, 1989, - т.28. – 148с.
- [38] Капрельянц А.С. Пространственно-динамическая организация ферментов в клетке и регуляция метаболизма // Биол. науки. - 1988. - №6. – С. 5-12.
- [39] Каташов Д.А., Хрянин В.Н. Влияние фитогормонов и селената натрия на содержание пигментов и продуктивность растений рапса сорта «ротник» (BRussila NAPUS) // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион . Естественные наук №1(5), 2014. с 25-34
- [40] Кефели В.И. Фотоморфогенез фотосинтеза и рост как основа продуктивности растений. Пушчено: ОНТИ ПНЦ АН СССР, 1991. – 133с.
- [41] Клячко Н.Л. Посттранскрипционная регуляция синтеза белка фитогормонами. Дисс...докт. биол. наук. М.: ИФР РАН, 1986. 335с.
- [42] Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Выс.шк., 1980, 272 с.
- [43] Кривоников Д.М. Исследования взаимодействия слигондалии цитокининов рецепторов арабидопсиса и кукурузы. Автореф. М. – 2012.
- [44] Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений // 2-е изд., М.: Высш.шк., 2006. – 742с.
- [45] Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функция // М.: Наука. – 1973. – 263с.
- [46] Курганов Б.И., Сугрובה Н.П., Мильман Л.С. Надмолекулярная организация ферментов гликолиза // Молекуляр. биол. – 1986. – т.20, вып. 1. – С.41-52.

- [47] Курганов Б.И. Принципы интеграции клеточного метаболизма // Молекуляр. биология. – 1986. – т.20, вып.2. – С.369-386.
- [48] Курганов Б.И. Роль мультиферментных комплексов в интеграции клеточного метаболизма // Молекулярная биология. 1986а, т.20, вып.6. с. 1530-1538.
- [49] Курганов Б.И., Любарев А.Е. Принципы организации и функционирования микрокомпартамента метаболона // Биохимия. – 1989. – т.54, вып.5. – С.716-718.
- [50] Курганов Б.И., Любарев А.Е. Проблемы биохимической организации // Биохимия. 1991, т.56, вып. 1. с. 19-32.
- [51] Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов. М.: Наука, 1992, с. 62 (46-ое Баховское чтение).
- [52] Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. – 343с.
- [53] Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – т.1. – 353 с.
- [54] Ломин С.Н., Романов Г.А. Анализ гормон-рецепторного взаимодействия. Теоретические и практические аспекты // Физиология растений. 2008, т. 55. С. 283-299.
- [55] Ломин С.Н. Лиганд-связывающие свойства и субклеточная локализация цитокининовых рецепторов: Дисс... канд. биол. наук. М.: ИФР РАН, 2008. 190 с.
- [56] Ломин С.Н., Кривошев Д.М., Стехлов М.Ю., Осолодкин Д.И., Романов Г.А. Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов // Физиология растений, 2012, т. 4, №3, с. 34-48.
- [57] Лось Д.А. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов // Соросовский образовательный журнал. 2001.- т.7, с. 1-9.

- [58] Любарев А.Е., Курганов Б.И. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот // Молекуляр. биология. – 1987. – т. 21, вып. 5, - С. 1286-1296.
- [59] Люкевич Т.В., Кузнецов В.В., Каравайко Н.Н., Кулаева О.Н., Селиванкина С.Ю. Изучение функциональных свойств зеатин – связывающего белка, участвующего в гормон – зависимой регуляции транскрипции хлоропластного генома // Физиология растений, 2002, т.49. – С.105-112.
- [60] Мокроносков А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. – М.: Наука, 1981, - 196с.
- [61] Мокроносков А.Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. – М.: Наука, 1983. – 64с.
- [62] Мокроносков А.Т. Фотосинтез и продукционный процесс // Физиология растений на службе продовольственной программы. – М.: Знание, 1988. – 64с.
- [63] Мокроносков А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез, физиолого-экологические и биохимические аспекты. – М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1992. – 320 с.
- [64] Муромцев Г.С., Кулаева О.Н., Гамбург К.З., Чкаников Д.И. Регуляторы роста растений // М.: «Агропромиздат». – 1987. – С.384.
- [65] Полевой В.В. Физиология растений. – М.: Высш.школа.1989 – 464 с.
- [66] Полевой В.В. Фитогормоны. Л.: ЛГУ. 1982. 249 с.
- [67] Романов Г.А. Рецепторы фитогормонов // Физиология растений. 2002. т. 49. С. 615-625.
- [68] Полевой В.В.,Саламатов Т.С. Живое состояние клетки и биология старение /В.В. Полевой, Т.С.Саламатова // Монография. С-Петербург. гос.ун-т. 2004



- [69] Романов Г.А., Медведев С.С. Ауксины и цитокинины в развитии растений. Последние достижения в исследовании фитогормонов // Физиология растений. 2006. т.53. С. 309-319.
- [70] Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. – 2009. – т. 56. – С. 293-319.
- [71] Романов Г.А. Открытие рецепторов и биосинтеза цитокининов: как это было (к 10-летней годовщине события) // Физиология растений. 2011.т. 58, с. 1-5.
- [72] Рахмихудоев Г., Сайфудинов А.К., //Биотехнологияи растаниҳо. Дастури таълимӣ – методӣ. Душанбе-2015.74с
- [73] Романова А.К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука, 1980. 160с.
- [74] Романова А.К., Павловец В.В. Надмолекулярные комплексы ферментов автотрофной ассимиляции углекислоты при фотосинтезе // Физиология растений. – 1997. – т.44. – С. 264-274.
- [75] Сайфудинов А.К., Бабаджанова М.А., Эсаналиева Ш.А. Влияние кинетина *in vitro* на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев растений хлопчатника различного возраста // Земледелец. Таджикский аграрный университет. Теоретический и научно-практический журнал.– Душанбе, 2019б. №1 (81) С 46- 48.
- [76] Сайфудинов А.К., Бабаджанова М.А. Влияние способов добавление кинетина *in vitro* на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм //Земледелец. Таджикский аграрный университет. Теоретический и научно-практический журнал.– Душанбе, 2019а. - №2(82). - С 61- 63.

- [77] Сайфудинов А.К., Бабаджанова М.А. Онтогенетическая зависимость влияния кинетина *in vitro* на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы энкхайм // Извст АН РТ, 2018, №4 (203) С 48-52.
- [78] Селиванкина С.Ю., Романко Е.Т., Куроедов В.А., Кулаева О.Н. Повышение активности связанной с хроматином РНК-полимеразы под действием цитокинина при его добавлении в ходе выделения хроматина // Физиология растений. – 1979, т.26, вып.1 – С. 41-47.
- [79] Селиванкина С.Ю., Романко Е.Т., Кулаева О.Н. Внехроматиновые факторы регуляции активности РНК-полимеразы в листьях ячменя разного возраста // Физиология растений. – 1980, т.27, вып.3 – С. 560-566.
- [80] Селиванкина С.Ю., Каравайко Н.Н., Черепнёва Г.Г., Принщепова А.Е., Вузнецов В.В., Кулаева О.Н. Биологический активный зеатин связывающий белок из хлоропластов листьев ячменя // ДАН, 1997, т.356, С. 830-832.
- [81] Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. Шевелухи В.С. М.: Высш. шк., 2003. 470 с.
- [82] Тарасова О.В., Медведев С.С. Влияние бензиламинопурина на жирнокислотный состав и соотношение фосфолипидов в колеотиях и корнях проростков кукурузы // Вестник Санкт-Петербургского университета, 2008, сер.3., вып. 2, с. 85-89.
- [83] Усманов Т.П. Влияние мутантных генов в различной генотипической среде на физиологические функции *Arabidopsis Thaliana* (L). Автореф. дисс...канд. наук. - Душанбе, 2007. – 23 с.
- [84] Усманова О.В. Генетическая коллекция арабидопсиса (*Arabidopsis Thaliana*). – Атлас. – Душанбе, 2010. – 196 с.
- [85] Усманов П.Д. Радиобиология хлопчатника. – Душанбе, 2015. – 121 с.

- [86] Урбах В.Ю. Биометрические методы – М.: «Наука». 1964. 415с.
- [87] Фархади З.Н., Алиев К.А., Васильева В.Н. Онтогенетические изменения содержания и функции рибулозодифосфаткарбоксилазы листьев хлопчатника // Докл. АН Тадж. ССР. – 1983. – т. 26, №10. – С. 662-665.
- [88] Фёршт Э. Структура и механизм действия ферментов // М.: Мир. 1980. – 432 с.
- [89] Физиология растений // Н.Д.Алёхина, Ю.В.Балнокин, В.Ф.Гавриленко и др.; под ред. И.П.Ермакова. – 2-е изд., - М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 640с.
- [90] Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. – М.: Мир, 1986. – 374с.
- [91] Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. – 398с.
- [92] Якубова М.М., Юлдошев Х.Ю. Фотосинтетический метаболизм углерода в онтогенезе листа хлопчатника // Научные доклады высшей школы, сер. биол. наук. – 1984. - №6. – С.60-63.
- [93] Anantharaman V., Aravind L. The CHASE Domain: A Predicted Ligand-Binding Module in Plant Cytokinin Receptors and Other Eukaryotic and Bacterial Receptors // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 579-582.
- [94] Axelrod B., Jang R. Purification and properties of phosphoribulokinase from alfalfa // J. Biol. Chem. – 1954. – V. 209. – N 2. – P. 847-855.
- [95] Babajanova M.A., Mirzorakhimov A.K., Babajanova M.P., Esanalieva Sh. Development of the enzyme complex associated with Benson – Calvin cycle in cotton leaves // Rus.Plant Physiol. 2010, V.57, № 2, p. 175-180.
- [96] Barkan A., Goldschüdt – Clermont H. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression // Biochimie, 2000, V.82, - P. 559-572.

- [97] Bencova E., Witters E., van Dongen W., Kolar L., Motyka V., Brozobohaty B., van Onckelen H.A., Machckva L. Cutocinins in tobacco and Wheat chloroplasts. Occurrence and Changes Due to Light/Dark Treatment // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P.245-251.
- [98] Brandstatter I., Kieber J.J. Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in Arabidopsis // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1009-1020.
- [99] Brenner W., Romanov G.A., Köllmer I., Burkle L., Schmülling T. Immediate-Early and Delayed Cytokinin Response Genes of Arabidopsis thaliana Identified by a Genome-Wide Expression Profiling Reveal Novel Cytokinin-Sensitive Processes and Suggest Cytokinin Action through Transcriptional Cascades // *Plant J.* 2005. V. 44. P. 314-333.
- [100] Corbesier L., Prinsen E., Jackmard A., Lejeune P., van Onckelen H., Perilleux C., Bernier G. Cytokinin Levels in Leaves, Leaf Exudate and Shoot Apical Meristem of Arabidopsis thaliana during Floral Transition // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2511-2517.
- [101] D'Agostino I., Deruère J., Kieber J.J. Characterization of the Response of the Arabidopsis ARR Gene Family to Cytokinin // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 1706-1717.
- [102] Dische Z., Borenfreund E.A. A new spectrophotometric method for the detection and determination of the ketosugars and trioses // *J.Biol.Chem.* – 1954. – V. 192. – N2. – P. 583-587.
- [103] Du L., Jiao F., Chu J., Chen M., Wu P. The Two-Component Signal System in Rice (*Oryza sativa* L.): A Genome-Wide Study of Cytokinin Signal Perception and Transduction // *Genomics.* 2007. V. 89. P. 697-707.
- [104] Gontero B., Cardenas M.L., Ricard J.A. A functional five-enzyme complex of chloroplast involved in the Calvin cycle // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – V. 173. – P. 437-443.

- [105] Gontero B., Guidici-Ortoni M., Ricard J.A. The modulation of enzyme complexes. 2. Information transfer within a chloroplast multi-enzyme complex containing ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – V. 226. – P. 999-1006.
- [106] Gontero B., Lebreton S. Multienzyme complexes involved in the Benson-Calvin cycle and in fatty acid metabolism // *Dans. Ann. plant. Reviews / V.7.* – Acad. Press. – 2001. – P. 120-150.
- [107] Gontero B., Lebreton S., Graciet E. Multienzyme Complexes Involved in the Benson-Calvin Cycle and in Fatty Acid Metabolism // *Ann. Plant. Reviews. Ads. Mc. Manus M.T., Laing W et Allan A.Sheffield. Acad. Press.* 2002. v. 7. p. 120-150.
- [108] Gontero B., Mullert G., Rault M., Guidici-Ortoni M.-T., Ricard J.A. Structural and functional properties of a multi-enzyme complex from spinach chloroplasts. 2. Modulation of the kinetic properties of enzymes in the aggregated state // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 217. – P. 1075-1082.
- [109] Grossmann K. Induction of Leaf Abscission in Cotton Is a Common Effect of Urea- and Adenine- Type Cytokinins // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 234-237.
- [110] Higuchi M., Pischke M.S., Machonen A.P. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family // *PNAS.* – 2004. – V. 101. - № 23. – P. 8821-8826.
- [111] Hirose N., Takei K., Kamada\_Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. Regulation of Cytokinin Biosynthesis, Compartmentalization and Translocation // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 75-83.
- [112] Hurwitz J., Weissbach A., Horecker B.L., Smythiotis P.Z. Spinach phosphoribulokinase // *J. Biol. Chem.* – 1956. – V. 218. – N. 2. – P. 769-783.

- [113] Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. Identification of CRE-1 as a Cytokinin Receptor from Arabidopsis // Nature. 2001. – V. 409. – P. 1060-1063.
- [114] Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y. Control of Differentiation and Apoptosis of Human Myeloid Leukemia Cells by Cytokinin Nucleosides, Plant Redifferentiation – Inducing Hormones // Cell Growth Diff. 2002. V. 13. P. 19-26.
- [115] Kakimoto T. CKII, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction // Science. 1996. V. 274. P. 982-985.
- [116] Kakimoto T. Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate: ATF/ADP Isopentenyltransferases // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 677-685.
- [117] Keleti T., Ovadi J., Batke J. Kinetic and Physico-chemical Analysis of Enzyme Complexes and their Possible Role in the Control of metabolism // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1989. V. 53. P.105-152.
- [118] Kulaeva O.N., Karavaiko N.N., Selivanrina S.Yu., Kusnetsov V.V., Zemlyachenko Ya.V., Cherepneva G.V., Maslova G.G., Lurevich T.V., Smith A.R., Hall M.A. Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcriptional regulation // Plant. Growth Regul., 2000. V. 32. P. 329-335.
- [119] Kusnetsov V.V., Orlmüller R., Sarvat M.I., Porfirova S.A., Cherepneva G.V., Herrman R.G., Kulaeva O.N. Cytokinin, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast protein in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels // Plantf. 1994. V. 194. P. 318-327.
- [120] Letham D.S. Zeatin, a factor inducing Cell Division Isolated from Zea mays // Life Sci. 1963. V.2. P. 569-573.
- [121] Letham D.S., Shannon J.S., McDonald I.R. The structure of Zeatin, a factor Inducing Cell Division // Proc. Chem. Soc. London. 1964. P. 230-231.

- [122] Li X., Mo X., Shou H., Wu P. Cytokinin-Mediated Cell Cycling Arrest of Pericycle Founder Cells in Lateral Root Initiation of Arabidopsis // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. P.1112-1123.
- [123] Li C.-H., Yu N., Jiang S.-M., Shanguan X.-X., Wang L.-J., Chen X.-Y. Down-Regulation of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Reveals a Role of Cytokinin in Promoting Transmethylation Reactions // *Planta.* 2008. V. 228. P. 125-136.
- [124] Mendes P., Kell D., Westerhoff H.V. Chemneling can decrease pool size // *Eur. J.Biochem.* – 1982. – V. 204. – P. – 257-266.
- [125] Miller C.O., Skoog F., von Saltza N.M., Strong F.M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid // *J. Am. Chem. Soc.* - 1955. - V. 77. - P. 1329-1334.
- [126] Miller C.O., Skoog F., Ocumura F., van Saltra M., Strong F. Isolation Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Ctl Division // *J.Am. Chem. Soc.* 1956. V. 78. P.1375-1384.
- [127] Mizuno T., Nakamichi N. Pseudo-response regulators (prrs) or true oscillator components (toes). // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 677-685.
- [128] Mougel C., Zhulin I.B. CHASE: An Extracellular Sensing Domain Common to Transmembrane Receptors from Prokaryotes, Lower Eukaryotes and Plants // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 582-584.
- [129] Murray J.D., Karas B.J., Sato S., Tabata S., Amyot L., Szczyglowski K. A Cytokinin Perception Mutant Colonized by Rhizobium in the Absence of Nodule Organogenesis // *Science.* 2007. V. 315. P. 101-104.
- [130] Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 1365-1377.

- [131] Ovadi J. Physiological significance of metabolic chaneling // *Theor. Biol.* 1991 Sep 7; 152 (1) :1-22.
- [132] Pareek A., Singh A., Kumar M., Kushwaha H.R., Lynn A.M., Singla-Pareek S.L. Whole-Genome Analysis of *Oryza sativa* Reveals Similar Architecture of Two-Component Signaling Machinery with *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 380-397.
- [133] Lure K., Weihe A., Borner T. The transcription nucliheries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation // *J. Plant Physiol.* – 2011. – V. 168. – P. 1345-1360.
- [134] Rashotte A.M., Carson S.D.B., To J.P.C., Kieber J.J. Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 1998-2011.
- [135] Rault M., Giudici-Ortoni M.-T., Gontero B., Ricard J. Structural and functional properties of multi-enzyme complex from spinach chloroplasts. 1. Stoichiometry of the polypeptide chains // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 217. – P. 1065-1073.
- [136] Redman J.C., Haas B.J., Tanimoto G., Town C.D. Development and Evaluation of an *Arabidopsis* Whole Genome Affymetrix Probe Array // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 545-561.
- [137] Rieffer M., Novak O., Strnad M., Schmölling T. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development and cytokinin metabolism // *Plant Cell.* 2006. V. 18. P. 40-54.
- [138] Riou-Khamlichi, C. Huntley, R.Jacqmard, A.Murray, J.A.H. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, 1999, V. 283, P. 1541-1544.



- [139] Romanov G.A. A Model for Bipolar Plant-type Growth: Role of Auxin-Cytokinin Countercurrent // Progress in Plant Growth Regulation / Eds Karssen C.M. et al. Dordrecht: Kluwer, 1992. P. 459-463.
- [140] Romanov G.A., Getman I.A., Schmulling T. Investigation of early cytokinin effects in a rapid *Amaranthus* seedling test. // Plant Growth. Regul. 2000/ V. 32, P. 337-344.
- [141] Romanov G.A., Kieber J.J., Schmülling T. A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in Cytokinin Signalling // FEBS Lett. 2002. V. 515. P. 39-43.
- [142] Romanov G.A., Lomin S.N., Rakova N.Yn., Heye A., Schmülling T. Does NO Play a Role in Cytokinin Signal Transduction // FEBS Lett. – 2008. – V. 582. – P. 874-880.
- [143] Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 4051-4058.
- [144] Sainis J.K., Harris G.C. The association of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with phosphoriboisomerase and phosphoribulokinase // Biochem. And Biophys. Res. Commun. – 1986. – V. 139. – N 3. – P.947-954.
- [145] Sainis J.K., Marriam K., Harris G.C. The association of d-ribilose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase with phosphoribulokinase // Plant Physiol. – 1989. – V. 89. – N 1. – P. 368-374.
- [146] Sakai H., Aoyama T., Bono H., Oka A. Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif // Plant Cell Physiol., 1998. V. 39. P. 1232-1239.
- [147] Sakai H., Aoyama T., Oka A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. // Plant J. 2000. V. 24. P. 703-711.

- [148] Sakakibara H. Cytokinin Biosynthesis and Metabolism // Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. Davies P.J. Dordrecht: Kluwer, 2004. P. 95-114.
- [149] Schäfer S., Krolzik S., Romanov G.A., Schmölling T. Cytokinin-Regulated Transcripts in Tobacco Cell Culture // Plant Growth Regul. 2000. V. 32. P. 307-313.
- [150] Schmölling T., Schäfer S., Romanov G.A. Cytokinins as Regulators of Gene Expression // Physiol. Plant. 1997. V. 100. P. 505-517.
- [151] Sherameti I., Shahollari B., Landsberger M., Westermann M., Cherepneva G., Kusnetsov V., Oelmüller R. Cytokinin Stimulates Polyribosome Loading of Nuclear-Encoded mRNAs for the Plastid ATP Synthase in Etioplasts of *Lupinus luteus*: The Complex Accumulates in the Inner-Envelope Membrane with the CF1 Moety Located towards the Stromal Space // Plant J. 2004. V. 38. P. 578-593.
- [152] Shudo K. Chemistry of Phenylurea Cytokinins // Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function / Eds Mok D.W.S., Mok M.C. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC, 1994. P. 35-42.
- [153] Srere P.A. The metabolon // Trends Biochem. Sci. – 1985. – V. 10. P. 109-110.
- [154] Suss K.-H., Arcona C., Manteuffel R., Adler K. Calvin Cycle Multienzyme Complexes are bound to chloroplast thylacoid Membranes of higher plants in situ // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 5514-5518.
- [155] Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. The Arabidopsis Sensor His-Kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 107-113.
- [156] Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 26405-26410.

- [157] Taniguchi M., Kiba T., Sakakibara H., Ueguchi C., Mizuno T., Sugiyama T. Expression of Arabidopsis Response Regulator Homologs Is Induced by Cytokinins and Nitrate // *FEBS Lett.* 1998. V. 429. P. 259-262.
- [158] Testerink C., Dekker H.L., Lim Z.-Y., Johns M.K., Holmes A.B., de Koster C.G., Ktistakis N.T., Munnik T. Isolation and Identification of Phosphatidic Acid Targets from Plants // *Plant J.* 2004. V. 39. P. 527-536.
- [159] Tirichine L., Sandal N., Madsen L.H., Radutoiu S., Albrechtsen A.S., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Stougaard J. A Gain-of-Function Mutation in a Cytokinin Receptor Triggers Spontaneous Root Nodule Organogenesis // *Science.* 2007. V. 315. P. 104-107.
- [160] To J.P., Kieber J.J. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci.*, 2008, 13, 85-92.
- [161] Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 42, (2001a), 231-235.
- [162] Uschiroyama T., Fuhushima T., Styre J.D., Spivay H.O. Substrate chaneling of NADH in nutochondrial redox processes // *Curr. Top. Cell regul.* – 1992. – V. 33. – P. 297-307.
- [163] Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as osmosensor. *Plant Cell*, 11, (1999), 1743-1754.
- [164] Urao T., Miyata S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPt domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 478, (2000), 227-232.
- [165] Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. Molecular Characterization of Cytokinin-Responsive Histidine Kinases in Maize. Differential Ligand Preferences and Response to cis-Zeatin // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1654-1661.

- [166] Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Jshikawa K., Mira K., Yamashino T., Mizino T. The Arabidopsis ANKU Histegin Kinase Js a Cytokinin – Bindug Receptor that Transduces Cytokinin Signals across the membrane // *Plant Cell Physiol.* – 2001. – V. 42. – P. 1017-1-23.
- [167] Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., F D.S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 244. P. 771-786.
- [168] Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmulling T. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, (2001) 10487-10492.
- [169] Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H., Schmülling T. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Development Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 2532-2550.
- [170] Werner T., Schmulling T. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol.*, (2009), 12, 527-538.
- [171] Wulfetonge K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmulling T. The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.*, 156, (2011b), 1808-1818.

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЁНОЙ СТЕПЕН**

### **1) Монографии**

- [1-А] Сайфудинов А.К. Фитогормоны, теоретические и практические аспекты [Текст] / М.А.Бабаджанова. – Душанбе: Типография Министерства образования и науки РТ, 2022. 60 с.
- [2-А] Сайфудинов А.К. Большой практикум по физиология и биохимии растений с основами энзимологии [Текст] / Бабаджанова

М.А., Мирзорахимов А.К., Эсаналиева Ш.А – Душанбе: Типография Министерства образования и науки РТ, 2017. 136с.

## **2) Статьи в рецензируемых журналах при президента РТ**

[3-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина на активность фосфорibuлокиназы в экстрактах из листьев хлопчатник / Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К, Нарзуллоев М.С. // Доклады Академии наук Республики Таджикистан.- Душанбе – 2007а, том 50, № 4. С.382-385.

[4-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина на активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы /оксегеназы в ферментативных препаратах различной степени очистки / Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К. // Доклады Академии наук Республики Таджикистан.- Душанбе – 2007б, том 50, № 8. С.711-715.

[5-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина *in vitro* на рибулозобисфосфат-карбоксилазную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника / Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К, Нарзуллоев М.С. // Доклады Академии наук Республики Таджикистан.- Душанбе - 2014, том 57, № 5. С 408-411.

[6-А]. Сайфудинов А.К. Онтогенетическая зависимость влияния кинетина *in vitro* на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Бабаджанова М.А. // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. – Душанбе. – 2018 г. - №1 (203). – С.84-52. ISSN 0002-3477.

[7-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина *in vitro* на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса

цикла Кальвина в экстрактах из листьев растений хлопчатника различного возраста / Бабаджанова М.А., Эсаналиева Ш.А. // Кишоварз (Земледелец) Таджикского аграрного университета им. Ш. Шотемура. – Душанбе. 2019. №1(81) С. 46- 48. ISSN 2074-5435.

[8-А]. Сайфудинов А.К. Влияние способов добавления кинетина *in vitro* на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Бабаджанова М.А. // Кишоварз (Земледелец) Таджикского аграрного университета им. Ш. Шотемура. – Душанбе. – 2019. №2.- С. 61-63. ISSN 2074-5435

[9-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина *in vitro* на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса / Бабаджанова М.А, . Мирзорахимов А.К. // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. – Душанбе. – 2019 г. - №1 (204). – С.52-55. ISSN 0002-3477.

[10-А]. Сайфудинов А.К. Онтогенетическая зависимость влияния кинетина *in vitro* на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его мутантов / Бабаджанова М.А. // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. – Душанбе. – 2019 г. - №4 (207). – С.57-61. ISSN 0002-3477.

[11-А]. Сайфудинов А.К. Кинетическое поведение рибозофосфатизомеразы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Бабаджанова М.А. // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. – Душанбе. – 2019г.-том 62,- № 7-8- С.464-468.- ISSN 0002 -3469.

[12-А]. Сайфудинов А.К. Кинетическое исследование фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника / Бабаджанова М.А. // Доклады Академии наук Республики Таджикистан.- Душанбе.- 2019г.-том 62,- № 9-10- С.576- 580.- ISSN 0002 -3469.

[13-А]. Сайфудинов А.К. Влияние различных факторов на активность фосфорибулокиназы в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм // Вестник педагогического университета. Серия естественных наук. 2021,-№ 3-4(11-12). - С. 376-380.

[14-А]. Сайфудинов А.К. Кинетическое исследование рибозофосфат-изомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника / Бабаджанова М.А. // Доклады национальной Академии наук Таджикистан.- Душанбе.- 2022г.-том 65,- № 3-4- С.264- 268.- ISSN 2791 -1489.

[15-А]. Сайфудинов А.К. Кинетин – аллостерический эффектор ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина из листьев хлопчатника / Бабаджанова М.А., Алиев К.А. // Доклады национальной Академии наук Таджикистан.- Душанбе.- 2022г.-том 65,- № 7-8- С.550- 554.- ISSN 2791 -1489.

### **3) Статьи в зарубежных рецензированных научных изданиях**

[16-А]. Saifuddinov A.K. Dependence on various factors of ribulose biphosphate carboxylase/ oxygenase activity in extracts from the leaves of Arabidopsis of the enkheim race. /Mirzorakhimov AK, Babadzhanova MA // Research Article volum7 Issue2-March 2022.pp 1- 4.

### **4) Тезисы в сборниках научных конференций**

[17-А]. Сайфудинов А.К. Онтогенетическая зависимость активирующего влияния кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина в листьях хлопчатника

/ Мирзорахимов А.К., Бабаджанова М.А., Эсаналиева Ш.А., Нарзуллоев М.С. // Физиология растений и проблемы развития растениеводства в Таджикистане» Материалы республиканской конференции.-Душанбе, 2011г. С 77-78 .

[18-А]. Сайфудинов А.К. Онтогенетическая зависимость регуляции фитогармонами фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев хлопчатника / Нарзуллоев М.С., Бабаджанова М.А // Материалы пятой международной конференции «Экологические особенности биологического разнообразия» Худжанд-2013г. С 203-204.

[19-А]. Сайфудинов А.К. Влияние фитогармонов *in vivo* и *in vitro* на активность ферментов мультиферментного комплекса цикла Калвина и продуктивность растений хлопчатника / Бабаджанова М.А, Нарзуллоев М.С. Эсаналиева Ш.А. // Материалы шестой международной конференции «Экологические особенности биологического разнообразия» Душанбе-2015г. С75-76.

[20-А]. Сайфудинов А.К. Зависимость от концентрации кинетина *in vitro* рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Эсаналиева Ш.А // Республиканской научно-теоретической конференции «Влияние глобального изменения климата на продуктивность агроэкологических систем Таджикистана» посвященная международному десятилетию действия « Вода для устойчивого развития на 2018-2028г.», 70- летию Таджикского национального Университета» Душанбе 2018. С. 4-5.

[21-А]. Сайфудинов А.К. Зависимость от возраста влияния кинетина *in vitro* рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Бабаджанова М.А,



Мирзорахимов А.К, Эсаналиева Ш.А. // Республиканской научно - теоретической конференции «Влияние глобального изменения климата на продуктивность агроэкологических систем Таджикистана» посвященная международному десятилетию действия «Вода для устойчивого развития на 2018-2028г.», 70- летию Таджикского национального Университета» Душанбе 2018. С. 5- 6.

[22-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина и аденина *in vitro* на фосфорibuлокиназную активность в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К., Эсаналиева Ш.А. // Республиканской научно- теоретической конференции «Влияние глобального изменения климата на продуктивность агроэкологических систем Таджикистана» посвященная международному десятилетию действия «Вода для устойчивого развития на 2018-2028г.», 70- летию Таджикского национального Университета» Душанбе 2018. С. 7-8.

[23-А]. Сайфудинов А.К. Влияние условий реакционной среды на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм / Сайфудинов А.К. // Республиканской научно –теоретической конференции профессорско-преподавательского состава и сотрудников ТНУ, посвященной «Годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021гг)» и « 400-летию Миробида Саййдо Насафи» Душанбе -2019.С.139-140.

[24-А]. Сайфудинов А.К. Механизм действия кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина / Бабаджанова М.А. // Республиканская научная конференция «Адаптация живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды» Душанбе-2019. С 81-83.

[25-А]. Сайфудинов А.К. Определение фаз развития растений хлопчатника, нуждающихся в обработке экзогенными цитокининами / Бабаджанова М.А., Мирзорахимов А.К. // Республиканская научная конференция «Адаптация живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды» Душанбе-2019. С. 59-61.

[26-А]. Сайфудинов А.К. Применение экзогенных цитокининов в стресс - чувствительный или стресс не устойчивый фазы развития растений / Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К. // Материалы VIII – ой международной конференции «Экологические особенности биологического разнообразия» (Таджикистан, г. Худжанд, 3-4 октября 2019г.) Душанбе 2019.-С. 193-194.

[27-А]. Сайфудинов А.К. Зависимость кинетического поведения ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина от генотипов растений / Бабаджанова М.А // Материалы VIII –ой международной конференции «Экологические особенности биологического разнообразия» (Таджикистан, г. Худжанд, 3 - 4 октября 2019г.) Душанбе 2019.- С. 136-137.

[28-А]. Сайфудинов А.К. Сравнительные исследования кинетического поведения ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений / Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К.// Республиканская научная конференция «Достижения современной биохимии в Таджикистане» Душанбе-2020. –С.23-25.

[29-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетин на активность рибозофосфат – изомеразы мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев растений арабидопсиса расы Энкхайм различного возраста /Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К.// Республиканская

научная конференция «Достижения современной биохимии в Таджикистане» Душанбе-2020. – С.25-27.

[30-А]. Сайфудинов А.К. Кинетические исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев арабидопсиса и хлопчатника /Бабаджанова М.А //Материалы международной научной конференции «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» Душанбе 2022.- С. 31-32.



ҶУМҲУРИИ  
ТОҶИКИСТОН



ИДОРАИ  
ПАТЕНТӢ

## ШАҲОДАТНОМА

Шаҳрванд Сайфудинов А.К.

муаллифи ихтирон *Тарзи баланд кардани фаъолнокии ферментҳои калидии фотосинтез дар барги пахта*

Ба ихтироъ  
нахустпатенти № ТҶ 1329 дода шудааст.

Дорандаи  
нахустпатент Донишгоҳи миллии Тоҷикистон

Сарзамин Ҷумҳурии Тоҷикистон  
Ҳаммуаллиф(он) Бобочонова М.А.

Аввалияти ихтироъ 26.04.2022

Таърихи рӯзи пешниҳоди ариза 26.04.2022

Аризаи № 2201671

Дар Феҳристи давлатии ихтироъҳои Ҷумҳурии Тоҷикистон

27 декабри с. 2022 ба қайд гирифта шуд

Нахустпатент

этибор дорад аз 26 апрели с. 2022 то 26 апрели 2032 с.

Ин шаҳодатнома ҳангоми амали гардонидани ҳукуку имтиёзхое, ки барои муаллифони ихтироот бо қонунгузори чорӣ муқаррар гардидаанд, нишон дода мешавад

ДИРЕКТОР

Исмоилзода М.

