

ТАДЖИКСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

УДК:581.137.31.4

ББК:28.57

С-14

САЙФУДИНОВ АХЛИДДИН КИЁМОВИЧ

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

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук
по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений**

Душанбе – 2023

Диссертационная работа выполнена на кафедре физиология растений
Таджикского национального Университета

Научный консультант: **Бабаджанова Мухаббат Абдурахмоновна** - доктор биологических наук, профессор кафедры физиология растений Таджикского национального университета, Заслуженный работник Таджикистана

Официальные оппоненты: **Ниязмухамедова Мукадам Бабаджановна** - доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник Института ботаники, физиологии и генетики растений НАН Таджикистана
Усмонов Рустам Махмудович - доктор биологических наук, профессор Институт генетики и экспериментальной биологии растений АН Руз
Абдурахмонов Нуриддин Атакузиевич - доктор биологических наук, заведующий кафедрой Медицинская биология с основами генетики Медико - социальный институт Таджикистана

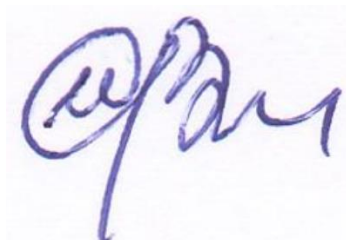
Ведущая организация: Таджикский аграрный университет им. Шириншох Шотемур

Защита состоится «___» -го _____ 2023 года в «10:00» часов на разовом заседании Диссертационного совета 6D.KOA-038 при Таджикском национальном университете по адресу: 734025, г. Душанбе, улица Буни Хисорак, корпус 16. E- mail: sayram75@mail.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной библиотеке Таджикского национального университета по адресу: 734025, г. Душанбе, пр. Рудаки, 17 и на официальном сайте ТНУ www.tnu.tj

Автореферат разослан «___» _____ 2023

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Ибрагимова С.И.

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; Haberer, Kieber, 2002].

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; Эргашев, Сайфудинов 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, Мокронос, 1976; Хохлова, 1977; Мокронос, 1983; Муромцев и др., 1987; Кефели, 1991; Алиев, 1998;].

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 ключевыми ферментами цикла Кальвина – рибозофосфатизомеразой, фосфорibuлокиназой и рибулозобисфосфаткарбокxилазой/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 изучают 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;

Изучение 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.

Задачи исследования:

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

2. 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;

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

4. 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;

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

Объект исследования были выбраны 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 влияния кинетина на активность мультиферментного комплекса ключевых ферментов карбоксилирующей фазы фотосинтеза (цикла Кальвина) в онтогенезе растений

Методы исследования. Количественное содержания белка определяли с реактивом Бенедикта по методике, описанной Кочетовым (1980). Измерения велись при длине волны 330 нм на высокочувствительном спектрофотометре ULTROSPEC II (ЛКВ, Швеция) с полной шкалой от 0 до 0,001 экстинкции, 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 препаратов 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 20 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, фосфорибулокиназы 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 результатов.

Научная новизна исследования. Впервые проведено сравнительное изучение зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов фотосинтеза рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы/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 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) 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 фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную 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 ферменты 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 механизм действия кинетина заключается в том, что он выполнял роль аллостерического эффектора, вызывающего координированные конформационные изменения в мультиферментном комплексе, ведущие к возрастанию максимальной скорости рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной 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 фосфорибулокиназную активность мультиферментных комплексов цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф. Показано, что для значительной активации (80%) фосфорибулокиназной 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, фосфорилбулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы /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 , фосфорибулокиназой – E_2 и рибулозобисфосфаткарбоксихлаза/ оксигеназой – E_3 , кинетин выполняет роль аллостерического эффектора для всех трёх ферментов. Вызванные рибозо-5-фосфатом положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами субъединиц рибозофосфатизомеразы усиливаются кинетином и передаются на фосфорибулокиназу и рибулозобисфосфаткарбоксихлазу/оксигеназу. 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, написании статей, монографии, 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 2013-2019), 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 30 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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ РАБОТЫ

В первой главе дан обзор литературы, представлены данные об общих свойствах фитогормонов и специфических функциях цитокининов и их практическом применении. Рассмотрены рецепторы кинетина, способствующие действию кинетина на биосинтез белков, в том числе на биосинтез ключевого фермента фотосинтеза-рибулозобисфосфат-карбоксилазу. Широко производства, биотехнологии и даже медицине.

В второй главе представлены объекты и методы исследования.

В третьей и четвертой главах приведены результаты.

В третьих –шестых главах приведены результаты экспериментальных исследований.

Результаты кинетические исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника

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, т.е. кинетические исследования.

Кинетические исследования ферментативных активностей мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и хлопчатнике сорта 108-Ф.

Выявление оптимальных условий реакционной среды для проявления ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника.

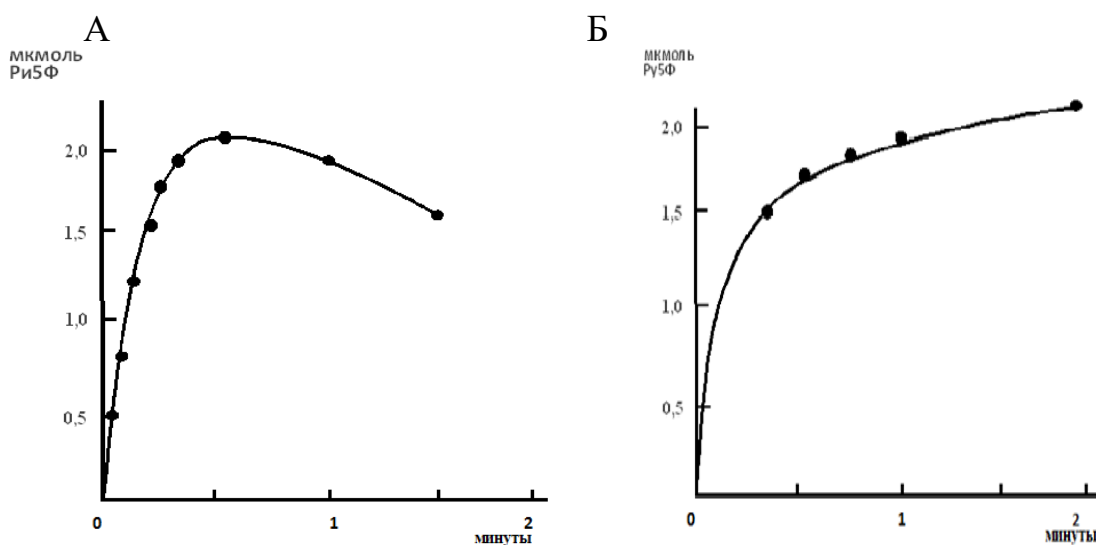


Рисунок 1. Зависимость от длительности реакции рибозофосфат-изомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм [А] и хлопчатника сорта 108-Ф.[Б]

На рис.1 представлены результаты изучения зависимости от длительности реакции накопления продукта рибозофосфатизомеразной реакции – рибулозо-5-фосфата при использовании экстракта из листьев арабидопсиса (А) и хлопчатника (Б).

Как видно на рисунке, форма кривых не была гиперболической, характеризовалась высокой начальной скоростью и резким выходом на плато при 0,25 мин. Стационарное состояние реакции сохраняется в течение 0,25-0,5 минуты. Затем у арабидопсиса наблюдалось постепенное снижение рибозофосфатизомеразной реакции, а у хлопчатника – возрастание активности фермента в течение 0,5-2 минут.

На основании полученных данных в дальнейших исследованиях определение активности трех ферментов рибозофосфатизомеразы (РФИ), фосфорibuлокиназы (ФРК) и рибулозо**бис**фосфат-карбокxилазы/оксигеназы (РБФК/О) проводилось в течение 0,5-1 минуты.

Изучение влияния зависимости от количества белка в реакционной среде рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса (А) и хлопчатника (Б).

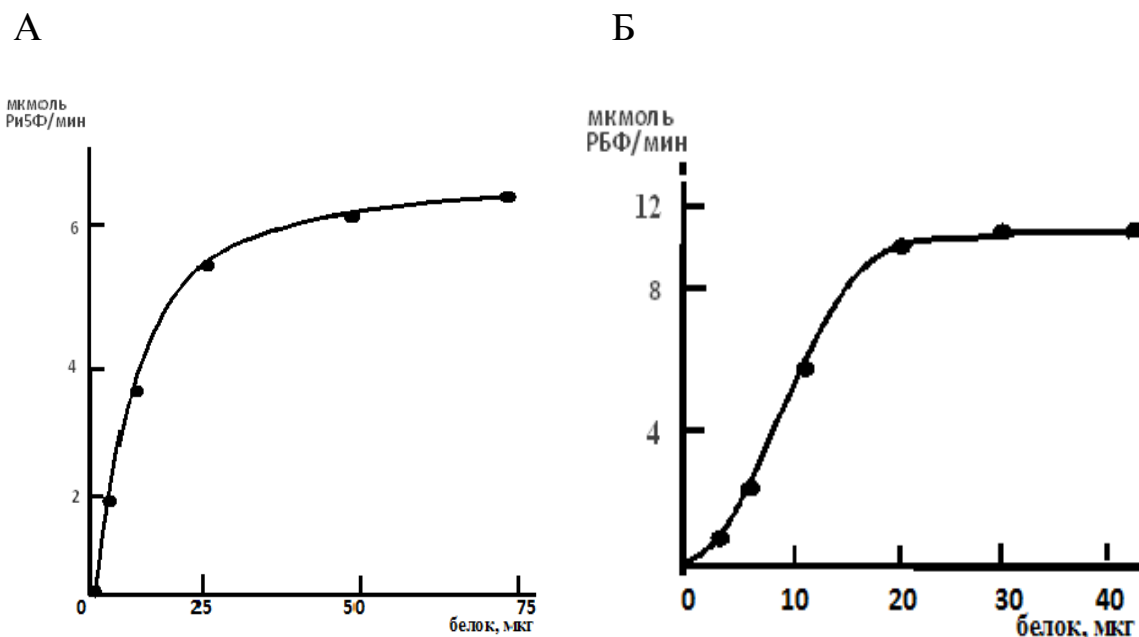


Рисунок 2. Зависимость от количества белка в реакционной среде рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайд (А) и хлопчатника сорта 108-Ф (Б).

На рисунке 2. видно, что кинетические кривые не имели классическую гиперболическую форму. У арабидопсиса при увеличении количества белка от 1 до 2,5 мкг белка наблюдалось прямо пропорциональное возрастание активности фермента. Дальнейшее увеличение количества белка в реакционной среде приводило к загибу кинетической кривой, что свидетельствовало о снижении рибозофосфатной скорости реакции.

У хлопчатника кинетическая кривая имела классическую сигмоидную форму. Начальный ход кривой свидетельствовал о том, что в пределах концентраций белки от 1 до 5 мкг при связывании субстрата происходило кооперативное взаимодействие между субъединицами фермента, что приводило к возрастанию скорости реакции.

На рисунке четко видно, что активность фермента из листьев хлопчатника значительно превосходит активность фермента из листьев арабидопсиса.

На основании полученных результатов в дальнейших исследованиях нами использовалось 10 мкг белка в 1 мл реакционной среды.

Аналогичные результаты получены при изучении зависимости от количества белка в реакционной среде скорости фосфорибулокиназной и карбоксилазной реакции.

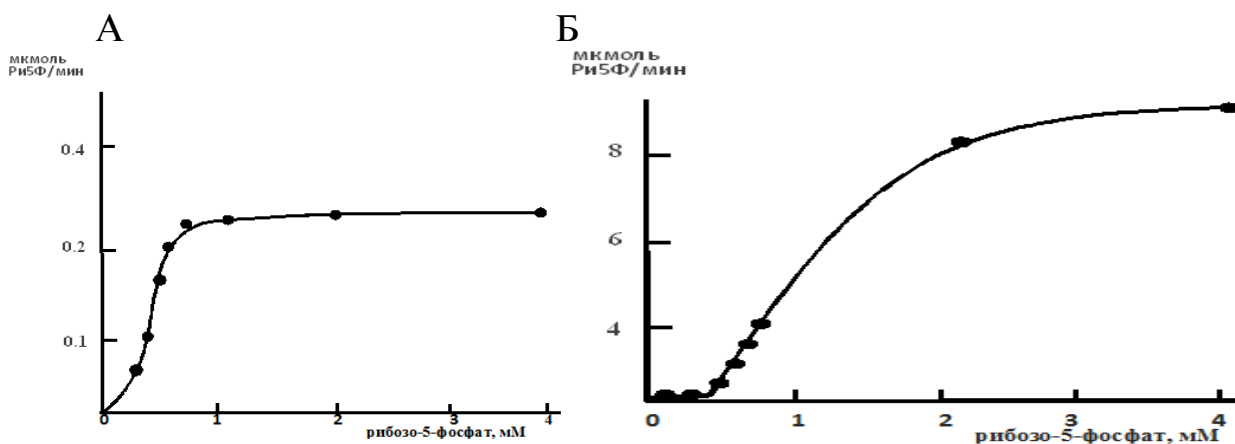


Рисунок 3. Зависимость от концентрации субстрата в реакционной среде рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса в экстракте из листьев арабидопсиса-А и хлопчатника-Б.

На рисунке. 3 представлены результаты исследования зависимости от концентрации субстрата в реакционной среде рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса в экстракте из листьев арабидопсиса (А) и хлопчатника (Б).

Как видно на рисунке 3. кинетические кривые имели сложную сигмоидную форму- у арабидопсиса с одной точкой загиба, а у хлопчатника, тремя точками загиба, свидетельствующие о кооперативном взаимодействии между разными субъединицами фермента, что привело к возрастанию скорости реакции.

На основании полученных данных в дальнейших исследованиях нами использовалось 10 мкмоль рибозо-5фосфата в мл реакционной среды.

На рис.4 представлены результаты исследования влияния концентрации рибозо 5-фосфата в реакционной среде на фосфорилбулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника.

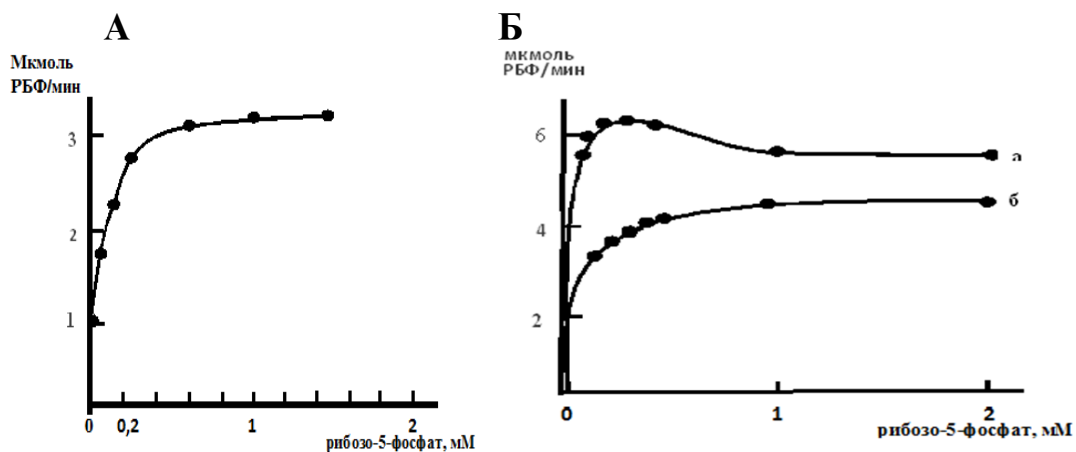


Рисунок 4. Зависимость от концентрации рибозо-5-фосфата в реакционной среде фосфорилбулокиназной активности мульти ферментного комплекса в экстракте из листьев арабидопсиса -А и хлопчатника-Б.

Как видно на рисунке 4 (А) форма кинетической кривой отличается от гиперболической и характеризуется быстрым насыщением фермента субстратом уже при концентрации субстрата 0,25мМ и последующим выходом на плато, т.е. постоянный уровень.

На рисунке 4 (Б) приведены результаты исследования зависимости активности фосфорибулокиназы в экстракте из листьев хлопчатнике от концентрации собственного специфического субстрата- рибулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата-субстрата рибозофосфат изомеразы.

При использовании рибулозо -5-фосфата максимальная активность достигалась уже при концентрации 0,25мМ, затем наблюдался загиб кривой, обусловленный быстрым насыщением фермента субстратом при концентрации 0,5мМ. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата до 1-2мМ скорость реакции оставалась постоянной.

При использовании рибозо-5-фосфата форма кинетической кривой была иной, величины активности фермента были значительно выше величин, полученных при применении рибулозо-5-фосфата.

Полученные 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.

Связывание рибозо-5-фосфата с аллостерическим центром рибозафосфатизомеразы –Е₁ вызывает конформационные изменения и у второго фермента – Е₂–фосфорибулокиназы.

Вследствие этого возрастает скорость фосфорибулокиназной реакции.

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

Результаты изучения зависимости от концентрации АТФ в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника представлены на рис 5.

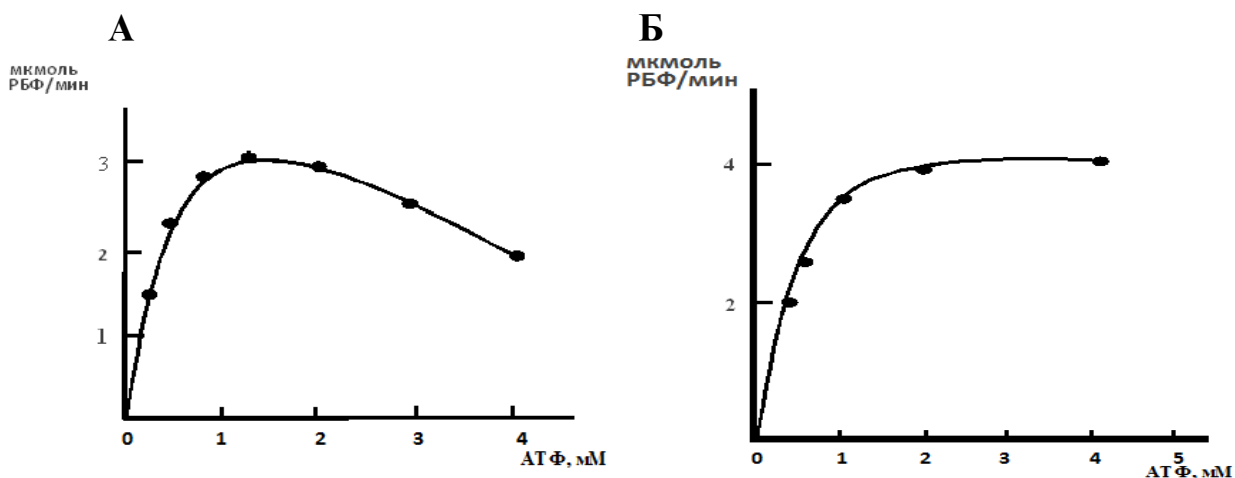


Рисунок 5. Влияние концентрации АТФ в реакционной среде на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса -(А), хлопчатник -(Б).

На рисунке 5-А видно, что кинетическая кривая не имела сильных загибов.

В пределах концентраций от 1мМ до 2мМ АТФ наблюдалось насыщение фермента субстратом. При концентрации АТФ выше 2мМ активность фосфорibuлокиназы снижалась.

На рисунке 5-Б видно, что кинетическая кривая характеризовалась сильным загибом уже при концентрации АТФ 1мМ, максимальная активность фермента достигалась при 2мМ АТФ, затем оставалась постоянной до 4мМ АТФ.

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

Результаты изучения зависимости от концентрации рибозо-5-фосфаткарбоксилазной активности РБФК/О в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника приведены на рис 6.

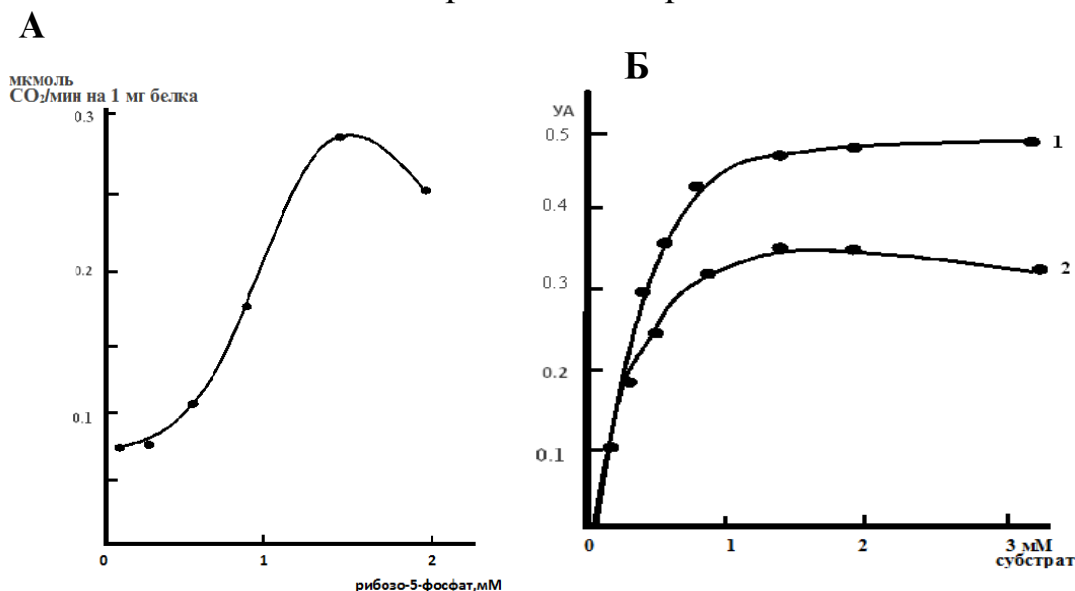


Рисунок 6. Влияние концентрации рибозо-5-фосфата на карбоксилазную активность РБФК/О в экстрактах из листьев арабидопсиса- (А) и хлопчатника - (Б)

Как видно на рисунке 6-А кинетическая кривая имела сложную сигмоидную форму с лаг-периодом при содержании в реакционной среде 0,1- 0,3мМ рибозо-5-фосфата. Лаг- период свидетельствует об индуцируемом субстратом кооперативных взаимодействиях между активными центрами субъединиц РБФК/О.

При увеличении содержания рибозо-5-фосфата в реакционной среде до 0,5 -1мМ начиналось возрастание карбоксилазной активности фермента. При 1,5мМ субстрата проявлялась максимальная карбоксилазная активность фермента, при содержании 2мМ активность фермента снижалась.

На рисунке 6- Б у фермента из листьев хлопчатника видно, что кинетические кривые имели одинаковую форму как при использовании

рибулозо-1,5-бисфосфат, так как и при использовании рибозо-5-фосфата. Кинетические кривые имели резкие загибы уже при 0,1мМ субстрата. В обоих случаях максимальная активность проявлялась при концентрации субстрата 1мМ на мл реакционной среды, но величины активности фермента были значительно выше при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата.

При концентрациях субстрата 1-3мМ скорость реакции оставалась постоянной.

На основании полученных результатов в дальнейших исследованиях использовали 1мМ рибозо -5 фосфат на мл реакционной среды.

Результаты изучения влияния концентрации углекислоты (NaHCO_3) на карбоксилазную активность РБФК/О мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника приведены на рис 7.

Как видно на рисунке 7-А-кинетическая кривая имеет классическую сигмоидную форму, а на рисунке 7-Б сложную сигмоидообразную форму с четырьмя загибами –при 5,15,25 и 35мкмоль углекислоты, отражающими сложные конформационные изменения. Максимальная карбоксилазная активность РБФК/О в обоих случаях проявлялась при 40-50 мкмоль. При этой концентрации углекислоты фермент полностью насыщен субстратом.

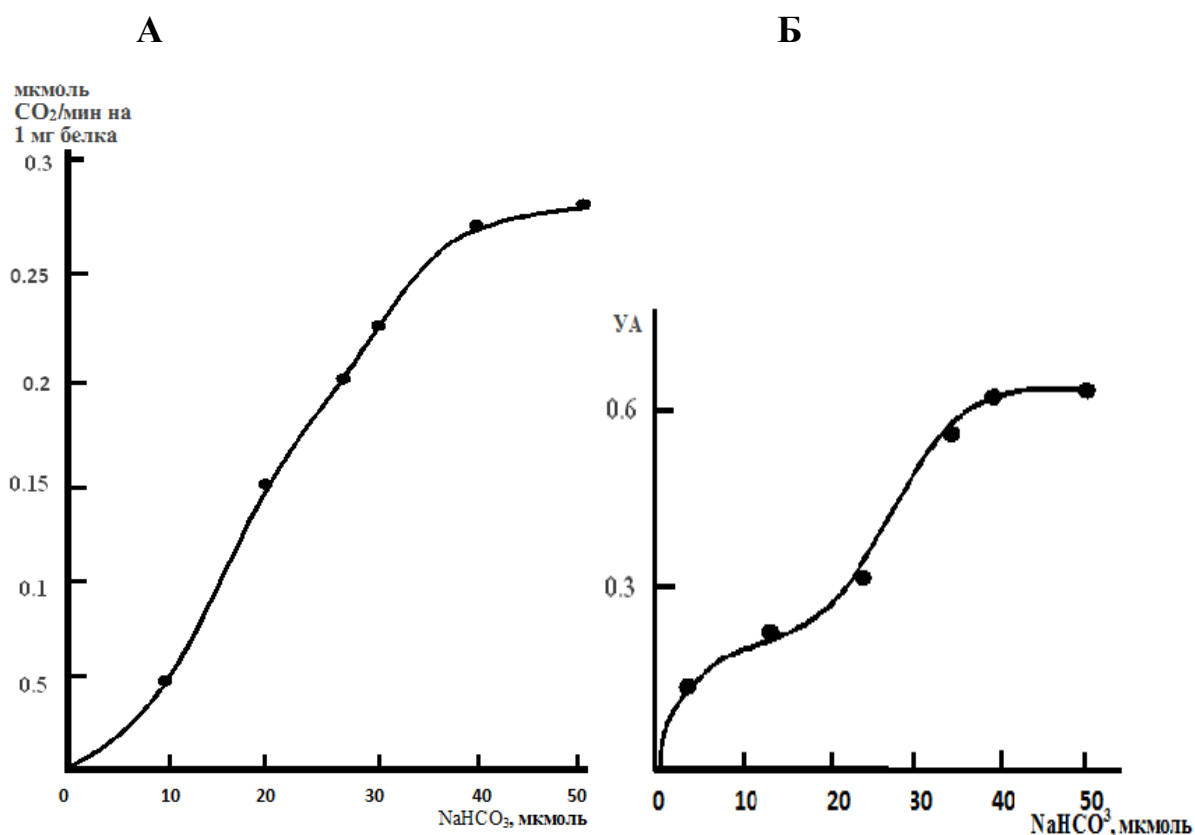


Рисунок 7. Зависимость от концентрации углекислоты в реакционной среде карбоксилазной активности РБФК/О мультиферментного комплекса в экстракте - А из листьев арабидопсиса, Б- хлопчатника.

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

Таким образом, нами подобраны оптимальные условия реакционной среды для проявления рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и карбоксилазной активности РБФК/О мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника.

Влияние кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса

Ранее М.А.Бабаджановой с соавторами [Бабаджанова, Хаитова, Насыров, 1971; Бабаджанова, Горенкова, 1972; Бабаджанова, 1981] было установлено, что в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника при добавлении кинетина в реакционную среду возрастала фиксация $^{14}\text{CO}_2$ в присутствии рибозо-5-фосфата+АТФ. Фиксация $^{14}\text{CO}_2$ в присутствии рибозо-5-фосфата+АТФ свидетельствовала о наличии в экстрактах из листьев мультиферментного комплекса, проявляющего три ферментативные активности цикла Кальвина- рибозофосфатизомеразную, фосфорибулокиназную и карбоксилазную.

Для выявления активируемого кинетином фермента мультиферментного комплекса ответственного за фиксацию CO_2 в хлоропластах, необходимо было исследовать влияние кинетина на активность каждого фермента в отдельности.

Нами была изучена зависимость от различных способов добавления кинетина рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса расы Энкхайм.

Было проведено 4 серии опытов:

- 1- кинетин не добавляли ни при гомогенизации листьев, ни 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. В таблице 1. приведены полученные результаты.

Из представленных в таблице 1. данных видно, что наибольшей рибозофосфатизомеразной активностью обладал мультиферментный комплекс в экстрактах из листьев двадцативосьмидневных растений. У более молодых растений – шестнадцатидневных активность фермента была ниже, чем у двадцативосьмидневных на 31%.

Таблица 1. - Влияние способа добавления кинетина на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм

Возраст растений, дни	Кинетин		Активность РФИ мкмоль Ри5Ф/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

У шестнадцатидневных и тридцативосьмидневных растений рибозофосфатизомеразная активность имела одинаковую величину.

Таким образом, нами установлена онтогенетическая зависимость рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса.

Добавление кинетина при гомогенизации листьев показало, что стимулирующее действие кинетина на активность фермента одинаково у шестнадцатидневных и двадцативосьмидневных растений и составляет 15%, а у тридцативосьмидневных растений составляет 38%, т.е. в 2,5 раза выше.

Это связано, по-видимому, с тем, что в листьях молодых растений эндогенная концентрация цитокининов выше, чем в стареющих листьях, что совпадает с литературными данными.

Результаты, полученные при добавлении кинетина и в процессе гомогенизации листьев независимо от возраста растений, и в реакционную смесь показали, что величины активирующего действия кинетина на рибозофосфатизомеразную активность мультиферментного комплекса была сравнимы с действием кинетина, добавленного только в реакционную смесь.

При добавлении кинетина в реакционную смесь с ферментным препаратом, выделенным из листьев шестнадцатидневных и

двадцативосьмидневных растений происходила значительная - на 25% -28% повышение активности фермента.

Наибольшая 47%-ная активация рибозофосфатизомеразной активности мультиферментного комплекса наблюдалась из листьев тридцативосьмидневных растений арабидопсиса.

Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что каждый этап развития растений различается по «гормональному гомеостазу» от предыдущего, что обуславливает различные специфические ответы на воздействия внутренних и внешних факторов.

Нами было изучено влияние различных концентраций кинетина при добавлении его в реакционную среду на активность фосфорибулокиназы мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайм и его низкопродуктивного мутанта 58/15 в фазе розеток. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Из представленных в табл 2. данных видно, что наибольшая активация фосфорибулокизной активности достигалась при добавлении в мл реакционную среду 2 мкмоль/ кинетина. У исходной расы Энкхайм фосфорибулокиназная активность возрастала на 78%, а у мутанта 58/15 на 59%. Увеличение концентрации кинетина в реакционной среде до 4 и 10 мкмоль/мл проводила к активации активности фермента в экстрактах из листьев исходной расы Энкхайм на 29-27% соответственно, а у мутанта 58/15 – на 26-20%

Таблица 2.-Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса исходной расы Энкхайм и его низкопродуктивного мутанта 58/15

Объект исследований	Концентрация кинетина, мкмоль/мл	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	Активация %
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

У обоих объектов оптимальной концентрацией кинетина в реакционной среде оказалась 2 мкмоль/мл. Эта концентрация кинетина в реакционной среде была использована нами в дальнейших исследованиях.

В таблице 3. представлены результаты изучения зависимости влияния кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев различного возраста растений арабидопсиса исходной расы Энхайдм и его мутантов триплекс и 58/15.

Таблица 3.-Влияние возраста растений на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энхайдм и его мутантов триплекс и 58/15 с кинетином и без кинетин

Объект исследований	Возраст растений, дни	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка			
		Реакционная среда без (-) и с (+) кинетином			
		-	%	+	%
Исходная раса Энхайдм	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

Как видно из представленных таблице 3. результатов кинетин оказывал наибольшие активизирующие действие в экстрактах из листьев шестнадцатидневных растений арабидопсиса – расы Энкхайм на - 203%, высокопродуктивного мутанта триплекс на -153%, низкопродуктивного мутанта 58/15 – на 142%.

Фосфорибулокиназная активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев двадцативосьмидневных растений арабидопсиса расы Энкхайм не изменялась при добавлении кинетина в реакционную среду, у мутанта триплекс кинетин вызывал возрастание фосфорибулокиназной активности на 7%, 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 фосфорибулокиназную 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 активирующего действия кинетина на фосфорибулокиназную активность 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 фосфорибулокиназная активность 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 фосфорибулокиназную 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 растений различного возраста.

В таблице 4. представлены результаты изучения зависимости от различных концентрации кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозо бисфосфат карбоксилазы /оксигеназы (РБФК/О) мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев арабидопсиса расы Энкхайма в фазе разеток.

Таблица 4.- Влияние концентрации кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/ -оксигеназы (РБФК/О) мультиферментного комплекса в экстракте и листьях арабидопсиса расы Энкхайм

Концентрация кинетина, мкмоль/мл	Активность РБФК/О, мкмоль СО ₂ 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 приведенных в таблице 4. данных, кинетин оказывал активирующее действие на карбоксилазную активность рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы в пределах концентраций кинетина в мл реакционной среды от 0.25 до 10.0 мкмоль. Наибольшее – 300% активирующее действие кинетина 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%.

В таблице 5. представлены результаты изучения зависимости от степени очистки ферментного препарата из листьев хлопчатника в фазе 4-5 настоящих листьев активирующего действия кинетин *in vitro* на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина.

Таблица 5.-Зависимость от степени очистки ферментного препарата из листьев хлопчатника сорта 108-Ф активирующего действия кинетина *in vitro* на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса цикла Кальвина (фаза развития растений 4-5 настоящих листьев)

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 ₄) ₂ SO ₄	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±0.74 107%

Из приведенных данных в табл 5. видно, что наибольшее -33% активирующее действие кинетин оказывал в экстрактах из листьев.

В частично очищенном фракционированном сульфатом аммония ферментном препарате фосфорibuлокиназная активность возрастала на 12%. Очистка этого ферментного препарата с помощью гель-фильтрации на Сефадексе G-50 и гель-хроматографии на Сефадексе G-200 приводила к потере способности фосфорibuлокиназы активироваться кинетином.

Аналогичные результаты получены при изучении зависимости от степени очистки ферментного препарата из листьев хлопчатника активирующего действия кинетина на карбоксилазную активность рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы РБФК/О мультиферментного комплекса.

Таблица 6.-Зависимость от степени очистки ферментного препарата из листьев хлопчатника сорта 108-Ф активирующего действия кинетина на карбоксилазную активность РБФК/О мультиферментного комплекса цикла Кальвина

Стадия очистки	Активность РБФК, мкмоль CO ₂ /мин на 1 мг белка	
	Кинетин	
	-	+
Экстракт	0.045±0.001 100%	0.121±0.002 268%
Осаждение белков при 35-50% насыщении (NH ₄) ₂ SO ₄	0.660±0.001 100%	0.96±0.002 145%
Гель-хроматография на Сефадексе G-200	0.951±0.002 100%	0.930±0.002 -

Полученные результаты указывают на то, что при гель-хроматографии на сефадекса G-200 происходило застраивание (задержка) или рецептора кинетина, или вторичного мессенджера (усилителя сигнала), имеющих молекулярную массу намного меньше 500кД.

В связи с полученными результатами дальнейшие исследования проводились на экстрактах из листьев растений.

В связи с этим нами была изучена зависимость влияния различных концентраций 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.

Полученные результаты представлены на рис 8.

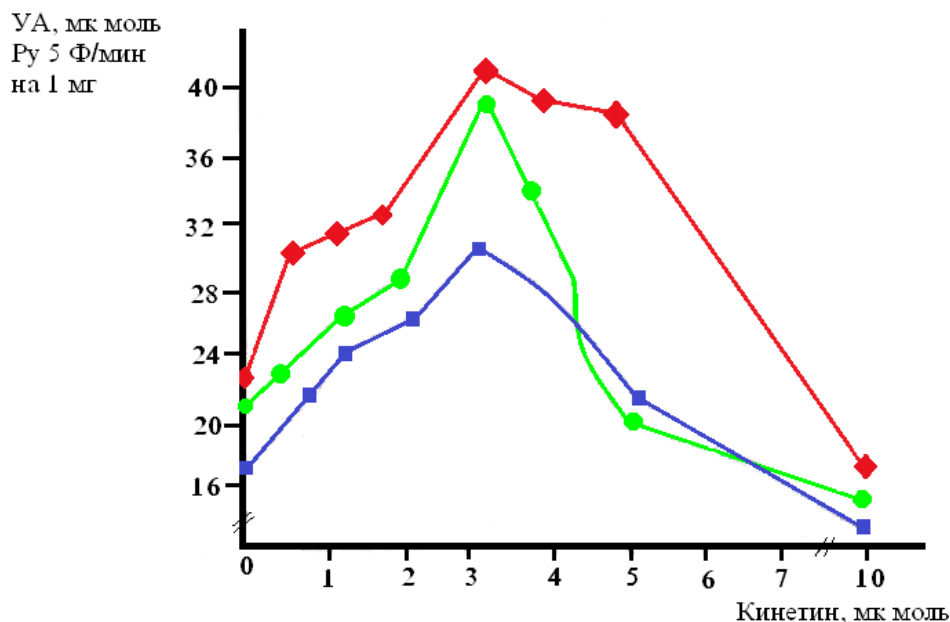


Рисунок 8. -Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде и фазы развития растений фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

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

Как видно из приведенных на рис 8. данных формы кривых зависимости фосфорibuлокиназной 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. При содержании в реакционной среде 4-5 мкмоль кинетина фосфорibuлокиназная активность мультиферментного комплекса снижалась, 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. В фазе бутонизации при всех концентрациях кинетина в реакционной среде величины фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса были выше, чем в экстрактах из листьев растений хлопчатника в фазе 5-6 настоящих листьев.

В фазе цветения растений хлопчатника форма кривой зависимости от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса были 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 ингибировали фермент.

Величины фосфорибулокиназной 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. [Сайфудинов, Бабаджанова, 2019]. Следовательно, в добавлении экзогенного кинетина растения хлопчатника особенно остро нуждаются в фазе цветения.

Полученные результаты подтверждают данные других авторов [Абзалов, Наджимов, 1985; Кефели, 1991] 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 фосфорибулокиназной 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.

На рис. 9. приведены результаты изучения зависимости от концентрации кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности мультиферментного комплекса при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата+АТФ.

Как видно из представленных на рис. 8 и рис.9 данных формы кривых зависимости карбоксилазной и фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса от концентрации кинетина в реакционной среде имели S-образные формы, но с максимумами активности при различных концентрациях кинетина.

Максимальная фосфорибулокиназная 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 проявлялась при концентрации кинетина 2 мкмоль/мл в 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.

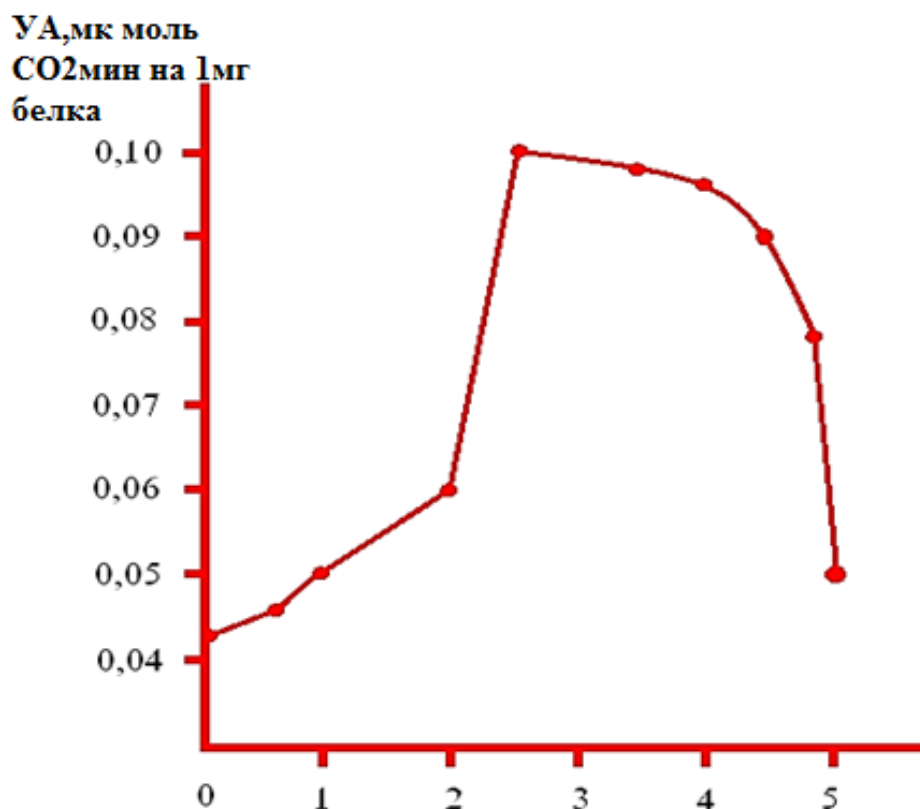


Рисунок 9. - Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы / оксигеназы мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 5-6 настоящих листьев.

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-фосфат +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 (Фридрих, 1986).

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

Чтобы понять механизм действия экзогенного кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина, на рис 10. приведены данные о зависимости активности от концентрации кинетина фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф при использовании собственного субстрата-рибулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата-субстрата рибозофосфатизомеразы.

Из представленных на рис 10. данных четко видны различия в форме кривых зависимости от концентрации кинетина в реакционной среде фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в присутствии различных субстратов.

Кривая зависимости фосфорибулокиназной 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 фосфорибулокиназная активность снижалась, а при 10 мкмоль активность фермента ингибировалась. Таким образом, полученные данные соответствуют характеру проявления действия - фитогормонов в низких концентрациях они оказывают активирующее действие, а в высоких – ингибирующее, вызывая даже апоптоз (гибель). Форма кривой зависимости фосфорибулокиназной 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.

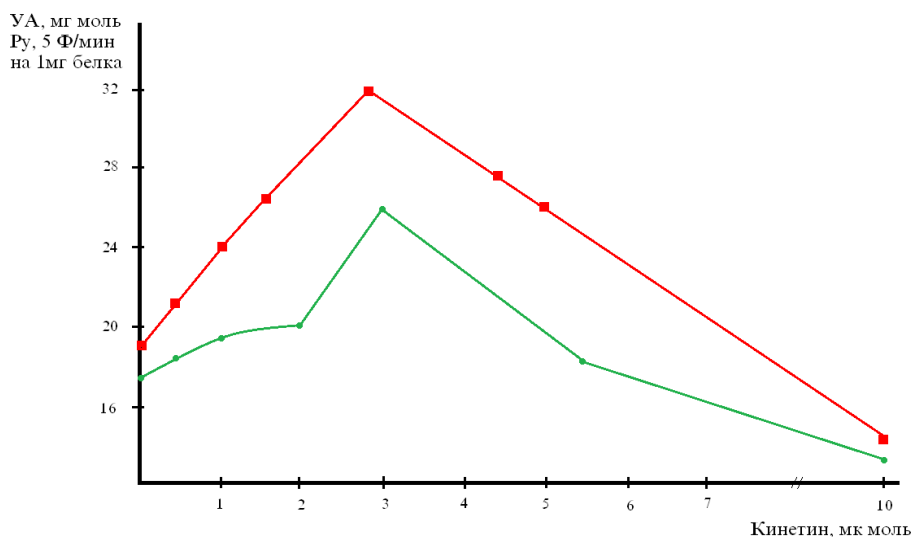


Рисунок 10. -Зависимость от концентрации кинетина в реакционной среде при использовании различных субстратов фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, фаза развития растений 5-6 настоящих листьев.

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

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 фосфорибулокиназной реакций. [Бабаджанова, Сайфудинов, 2019].

Таким образом, установлен механизм действия кинетина на активность ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Для подбора оптимальных условий реакционной среды при проявлении активности этих ферментов впервые проведены сравнительные кинетические исследования рибозофосфатизомеразной, фосфорибулокиназной и рибулозо**бис**фосфат-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].

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 активизирующее 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 активизирующего 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].

Рекомендации по практическому применению результатов

Определена стадия развития растений хлопчатника, наиболее чувствительный к недостатку содержания цитокининов в листьях. Для повышения урожайности хлопчатника листья растений следует обработать раствором кинетина в фазах бутонизации и цветения растений.

Список публикаций соискателя ученой степени

Статьи в рецензируемых научных журналах :

[1-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина на активность фосфорибулокиназы в экстрактах из листьев хлопчатника / Бабаджанова М.А, Мирзорахимов А.К, Нарзуллоев М.С. // Доклады Академии наук Республики Таджикистан.- Душанбе – 2007а, том 50, № 4. С.382-385.

[2-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.

[3-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина in vitro на рибулозобисфосфаткарбоксилазную 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.

[4-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.

[5-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина *in vitro* на фосфорибулокиназную 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.

[6-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

[7-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.

[8-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.

[9-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.

[10-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.

[11-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.

[12-A]. 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.

[13-A]. 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.

[14-A]. 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.

Тезисы в сборниках научных конференций

[15-A]. 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 .

[16-A]. 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.

[17-A]. Сайфудинов А.К. Влияние фитогармонов *in vivo* и *in vitro* на активность ферментов мультиферментного комплекса цикла Кальвина 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.

[18-A]. 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.

[19-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.

[20-А]. Сайфудинов А.К. Влияние кинетина и аденина *in vitro* на фосфорибулокиназную 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.

[21-А]. Сайфудинов А.К. Влияние условий реакционной среды на фосфорибулокиназную 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.

[22-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.

[23-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.

[24-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.

[25-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.

[26-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.

[27-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.

[28-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.

Монографии и методические пособия

[29-А] Сайфудинов А.К. Фитогормоны, теоретические и практические аспекты [Текст] / М.А.Бабаджанова. –Душанбе: Типография Министерства образования и науки РТ, 2022. 58с.

[30-А] Бабаджанова М.А., Большой практикум по физиология и биохимии растений с основами энзимологии [Текст] / Мирзорахимов А.К, Сайфудинов А.К., Эсаналиева Ш.А –Душанбе: Типография Министерства образования и науки РТ, 2017. 136с.

Авторские свидетельства

1. Авторское свидетельство № ТЈ 1329 «Способ повышения активности ключевых ферментов фотосинтез листьев хлопчатника» от 26.04.2022г/ Бабаджанова М.А., Сайфудинов А.К.-Душанбе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВПФЦ- Восстановительный пентофосфатный цикл или цикл Кальвина
АДФ-Аденозиндифосфат
Ру5Ф- рибулозо-1,5-бисфосфат
РБФ-рибулозо-5-фосфат
3-ФГК-3-фосфоглицериновая кислота
ПВП-Поливинилпирролидон
ТХУ-трихлоруксусная кислота
ДТТ-Дитиотрейтол
ЭДТА-Этилендиаминтетраацетат
кДа-Килодальтон
А-активность мкмоль продукта в минуту
УА-удельная активность, мкмоль продукта или субстрата в минуту в расчете на 1 мг белка
V_{max} -максимальная скорость реакции
Е- Фермент
S-Субстрат
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.

ДОНИШГОҶИ МИЛЛИ ТОҶИКИСТОН

Ба ҳукми дастнавис

УДК:581.137.31.4

ББК:28.57

С-14

САЙФУДИНОВ АҲЛИДДИН ҚИЁМОВИЧ

**ТАЪСИРИ КИНЕТИН БА ФАЪОЛНОКИИ
ФЕРМЕНТАТИВИИ МАҶМУИ МУЛТИФЕРМЕНТИИ
ОЗОДИ СИКЛИ КАЛВИНИ БА РҶҶОИ РАСТАНИҶОИ ОЛӢ**

АВТОРЕФЕРАТИ

диссертатсия барои дарёфти дараҷаи илмии доктори илмҳои биологӣ

аз рӯи ихтисоси 03.01.05 - Физиология ва биохимияи растаниҳо

ДУШАНБЕ-2023

Таҳқиқотҳои илми дар кафедраи физиология растаниҳои Донишгоҳи милли Тоҷикистон иҷро шудааст

Мушовири илмӣ: **Бобочонова Муҳабат Абдурахмоновна** - доктори илмҳои биология, профессори кафедраи физиологияи растаниҳои Донишгоҳи милли Тоҷикистон, корманди шоистаи Ҷумҳурии Тоҷикистон

Муқарризи расмӣ: **Ниязмухамедова Муқадам Бабаджановна** - доктори илмҳои биологӣ, профессор, ходими калони илмии Институти ботаника, физиология ва генетикаи растаниҳои АМИТ

Усмонов Рустам Маҳмудович - доктори илмҳои биология, профессори Институти генетика ва биологияи эксперименталии растаниҳои АИ Ҷумҳурии Узбекистон

Абдурахмонов Нуритдин Атакузиевич - доктори илмҳои биология мудири кафедраи биологияи тибӣ бо асосҳои генетикаи Институти тибби иҷтимоии Тоҷикистон

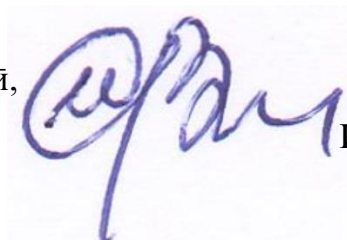
Муассисаи пешбар: Донишгоҳи аграрии Тоҷикистон ба номи Шириншоҳ Шохтемур

Ҳимояи диссертатсия “ ” соли 2023 соати 10:00 дар ҷаласаи Шӯрои яқдафъаинаи диссертатсионии 6D.KOA -038 назди Донишгоҳи миллии Тоҷикистон баргузор мегардад. Суроғ: 734025, ш. Душанбе, к. Буни Ҳисорак, бинои 16. E- mail: sayram75@mail.ru

Ба диссертатсия ва автореферат дар китобхонаи марказии Донишгоҳи милли Тоҷикистон бо суроғи: 734025, шаҳри Душанбе, хиёбони Рӯдакӣ, 17 ва дар сомонаи интернетии www.tnu.tj шинос шудан мумкин аст.

Автореферат санаи «___» _____ соли 2023 ирсол карда шудааст.

Котиби илмии шӯрои диссертатсионӣ,
номзади илмҳои биологӣ



Иброгимова С.И.

МУҚАДДИМА

Мубрамияти мавзӯи таҳқиқот. Ситокининҳо дар катори дигар фитогормонҳои дар танзими равандҳои физиологичу-биохимиявии зиёд, иштирок намуда барномаҳои пурраи физиологӣ ва морфогенетикиро дар тӯли ҳамаи давраи онтогенези растаниҳо танзим мекунанд [Кулаева, 1973; Полевой, Саламатова, 2001; Haberger, Kieber, 2002].

Ситокининҳо тақсимшавӣ ва инкишофи ҳучайраҳоро, гуногунсозии пластидҳоро, ташаккулёбии аппарати митохондриялӣ ва ретикулуми эндоплазматикӣ шаҳшӯро пурзӯр мекунанд, пиршавии баргҳоро ба таъхир меандозанд, ҷоришавии метаболитҳо ва инчунин пайдо шудани навдаҳоро аз каллусҳо дар зироат фаъол мегардонанд, дар мутобиқшавии растаниҳо ба шароити беруна иштирок мекунанд, архитектоникаи умумии растаниро бо нигоҳ доштани мувозинати муносиби байни ҳаҷми қисмҳои рӯизаминӣ ва зеризаминии растаниро муайян мекунанд, пайдошавии беҳмеваро дар зироатҳои лӯбиғӣ танзим мекунанд ва имконоти зиёди дар биотехнология, соҳаи кишоварзӣ, тиб ва ҳатто дар атриёт татбиқшавиро доранд [Уоринг, Филлипс, 1983; Кефели, 1991; Ломин ва диг., 2012; Рахмихудоев, Сайфудинов, 2015; Долгих ва диг., 2016; Эргашев, Сайфудинов ва диг., 2016].

Ҳадафи асосии ситокининҳо дар ҳучайраи растани пластидҳо мебошанд. Ситокининҳо ба табдилёбии этиопластҳо ба хлоропластҳо, ташаккулёбии системаи мембранаҳои дохилӣ ва чамъоварии қисматҳои занҷири электрон-интиқолдиҳии хлоропластҳо, фаъолгардонии фотофосфорикунонии даврӣ, афзуншавии синтези хлорофилл, синтези ферментҳои зиёд, хусусан ферменти калидии фотосинтез-рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа мусоидат мекунанд [Борзенкова, Мокроносов, 1976; Хохлова, 1977; Мокроносов, 1983; Муромтсев ва диг., 1987; Кефели, 1991; Алиев, 1998].

Чунин таъсири гуногуншакли ситокининҳо ба хлоропластҳо иштироқи онҳоро дар танзими экспрессияи генҳои сафедаҳои пластиди ки ҳам бо генҳои ядрӣ ва ҳам пластидӣ рамзшавандаанд таъмин гардонидани шудааст [Schmulling et al., 1997; Zubo et al., 2005].

Генҳои зиёди пластома маҳсулоти бевосита ё бавоситаеро рамз мекунад, ки бо дастгоҳи фотосинтетикӣ алоқаманд аст. Генҳои бевосита бо ситокинин фаъолшавандаи арабидопсис ва чуворимакка соли 1998 дар лабораторияҳои Ҷ.Кибер (ИМА) ва Т.Сугияма (Brendstatter, Kieber, 1998; Taniguchi et al., 1998) пайдо карда шуданд.

Дар арабидопсис се ретсептори ситокинин ошкор карда шудааст. Ба Романов А.Г. (2009; 2011) муяссар гардид, ки сохтори ин ретсепторҳоро рамзкушоӣ кунад ва ҳатто доимиҳои шабоҳати ситокининҳои гуногунро ба ретсепторҳо ҳисобӣ кард. Хосиятҳои ретсепторҳо ва хусусияти сигналинги ситокининҳо таҳқиқ шуда истодаанд. Суръати

транскрипсионии гурӯҳи генҳои пластомаи *Arabidopsis Thaliana* муайян карда мешавад.

Аз гуфтаҳои боло бармеояд, ки дар даҳсолаи охир таҳқиқи механизми амали ситокининҳо дар сатҳи молекулавӣ тадричан рушд меёбад.

Ситокининҳо бештар татбиқи амалии худро ёфта истодаанд. Дар истеҳсолоти кишоварзӣ онҳоро барои тақвият додани панчазании растаниҳо, тағйир додани шакл ва калон кардани андозаҳои як қатор меваҳо, афзун кардани ҳиссаи гулҳои занона (бодиринг ва ғ.), қобилияти сабзиши тухмиҳо, устуворӣ ба стрессҳо ва касалиҳои абиотикӣ, дефолиатсияи пеш аз ғунучин (пахта ва ғ.) ва ғ. истифода мебаранд. Дар биотехнологияи парвариши хатҳои ҳуҷайравӣ ва каллусии дар муҳитҳои таъмизшуда ҳангоми ба даст овардани растаниҳои трансгенӣ ситокининҳо якҷоя бо ауксин истифода мебаранд.

Тибқи тасаввуроти муосир яке аз механизмҳои танзимкунии пешбарандаи метаболизми ҳуҷайра дар сатҳи молекулавӣ ба вучуд омадан ва амал кардани маҷмӯҳои ферментҳои боломолекулавии гуногун мебошад [Фридрих, 1986; Курганов, Любарев, 1991; Ермаков, 1993; Романова, Павловетс, 1997; Gontero et al., 2002].

Аз ҷониби ферментҳои калидӣ ба вучуд омадани сикли Калвин – рибозофосфатизомераза, фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназаи маҷмӯи мултиферментӣ бо массаи молекулавии 520 кДа дар таҳқиқоти Бобочонова бо ҳамкорон муқаррар карда шудааст [Бобочонова, 1981; 1990; Бобочонова, Носиров, 1992; Бобочонова ва диг., 2002; 2006; 2010].

Дарачаи таҳияи мавзӯи таҳқиқот. Ситокининҳо бо муваффақият дар таҷрибаҳои илмӣ, истеҳсолоти, кишоварзӣ ва биотехнологияи муосир бо таври васеъ истифода мешаванд. Вале бо гуногуншаклии таъсири ситокининҳо ба фотосинтез нигоҳ накарда, дар адабиёт маълумот дар бораи омӯзиши таъсири бевоситаи онҳо ба фаъолнокӣ ва синтези маҷмуаҳои мултиферментии сикли Калвин дар онтогенези растаниҳо мавҷуд нестанд.

Вобаста ба нуқтаҳои болозикр таҳқиқи механизмҳои таъсири бевоситаи кинетини экзогенӣ (6-БАП) ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментии ферментҳои фазаи карбоксилшавии фотосинтези (сикли Калвин) баргҳои растаниҳои олии синну соли гуногун мувофиқи матлаб мебошад.

Робитаи кор бо барномаҳои илмӣ (лоихаҳо) ва мавзӯҳо.

Таҳқиқотҳо дар доираи корҳои илмии таҳқиқотии мавзӯҳои кафедраи физиологияи растаниҳо ва биотехнологияи Донишгоҳи милли Тоҷикистон таҳти №0107ТД 612 “ Маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин танзим ва фаъолнокии вобаста ба расиш инкишофёби ва ҳосилнокӣ”, №0110РК 134 “ Механизмҳои тадқиқотӣ танзими физиологӣ- биохимияви тобоварӣ растаниҳо ба шароитҳои гуногуни муҳит”, №0116ТJ00748 “ Механизмҳои физиологӣ- биохимиявии устуворӣ растаниҳо ба омилҳои стрессорӣ”

Қарори ҳукумати Тоҷикистон аз 30.03.2013 №7 “Ҷамъовари нигоҳдори ва истифодаи захираҳои генетикии растаниҳо” иҷро карда шудааст.

ТАВСИФИ УМУМИИ ТАҲҚИҚОТ

Мақсади таҳқиқот: Таҳқиқоти кинетикии қиёсии таъсири фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта ҳар яке дар алоҳидагӣ; омӯзиши таъсири кинетин (6-БАП) *in vitro* ба фаъолноки ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар онтогенези растаниҳои арабидопсис ва пахта, барои муайянкунии марҳилаи инкишофи растаниҳои ба норасоии мавҷудияти ситокининҳо дар баргҳо бештар ҳассос, муайян кардани механизми таъсири кинетин ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ.

Вазифаҳои таҳқиқот:

1. гузаронидани таҳқиқоти кинетикии фаъолноки рибозофосфатизомеразӣ, фосфорибулокиназӣ ва рибулозобисфосфат-карбоксилазии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта ҳангоми истифодаи субстратҳои гуногун;

2. омӯхтани таъсири концентратсияҳо ва тарзҳои гуногуни иловакунии кинетин ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ва мутантҳои он дар онтогенези растаниҳо;

3. муайянкунии таъсири кинетини экзогенӣ ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар препаратҳои дараҷаи гуногуни тозакунии аз баргҳои пахта;

4. омӯхтани таъсири концентратсияҳои гуногуни кинетини *in vitro* ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои пахта ҳангоми истифодаи субстратҳои гуногун вобаста аз фазаи инкишофи растаниҳо;

5. омӯзиши механизмҳои таъсири кинетин ба фаъолнокии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин.

Объекти таҳқиқот баргҳои арабидопсиси (*Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh*), авлоди Энкхайм, мутантҳои он – триплекс ва 58/15, ва пахтаи миёнанаҳи (*Gossypium hirsutum* L., оилаи *Malvaceae*) навъи 108-Ф буд. Маводи тухмии арабидопсис ва инчунин маълумот дар бораи табиати мутатсияҳо аз академики АИ ҶТ П.Д.Усмонов гирифта шуданд, ки аз ӯ мо хеле миннатдорем.

Мавзӯи таҳқиқот. Омӯзиши таъсири кинетин ба фаъолнокии маҷмӯи ферментҳои калидии даври торикии фотосинтез (сикли Калвин) дар онтогенези растаниҳо.

Усулҳои таҳқиқот. Муайянкунии мавҷудияти миқдории сафедаро бо реактиви Бенедикт бо методикаи Кочетов (1980) гузаронидем. Ҷенкуниҳо дар дарозии мавҷи 330 нм дар спектрофотометри баландҳассоси ULTROSPEC II (ЛКВ, Шведсия) бо шкалаи пурраи аз 0 до 0,001 воҳиди экстинсия ё фотоэлектроколориметр Speesord гузаронида шуданд.

Муайянкунии фосфори ғайриорганикӣ бо усули Фиске-Суббароу (Лоури-Лопас) дар модификатсияи Скулачев гузаронида шуд [Кочетов, 1980].

Муайянкунии фаъолнокӣ рибозофосфатизомеразӣ бо усули модификатсияшудаи Акселрод ва Янг [Axelrod, Jang, 1954] гузаронида шуд. Фаъолнокӣ рибозофосфатизомеразиро бо мкмол рибулозо-5-фосфат дар дақиқа бо ҳисобии ба 1 мг сафеда ифода кардем.

Муайянкунии фаъолнокӣ фосфорибулокиназӣ бо усули Гурвитс ва диг [Hurwitz et al., 1956]. Фаъолнокӣ фосфорибулокиназиро бо мкмол рибулозо-1,5-бис-фосфат дар дақиқа (Е) бо ҳисобӣ ба 1 мг сафеда ифода кардем.

Фаъолнокии рибулозобисфосфаткарбоксилаза/ оксегенеза (РБФК/О) бо усули спектрофотометрикӣ бо методикаи Рэккери аз тарафи А.К.Романова [Романова, 1980] муайян намудем.

Чудокардани намунаҳои ферментҳои озодӣ сикли Калвин дар баргҳои растаниҳои дараҷаи олій. Ҳангоми ҳосилкунии препаратҳои ферментӣ аз баргҳои пахта тарзҳои тозакунии мақбули умум истифода шуданд, вале мувофиқи хусусиятҳои хоси ин баргҳо методикаи ба даст овардани экстрактеро модификатсия карда шуд.

Экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ҳамин тариқ чудо карда шуданд, вале дар буфер поливинилпиралидон илова накардем.

Ҳангоми тоза кардани перепаратҳои ферментативӣ фраксияҳои сульфати аммони, гел-филтрация дар Сефадекси G-50 ва гелхроматография дар Сефадекси G-200 истифода гардид.

Натиҷаҳои ҳосилшуда [Урбах, 1964] бо формулаҳои дар маҷмӯи усулҳои биохимиявии таҳлили растаниҳо таҳти таҳрири [В.В.Полевой ва Г.Б.Максимов 1978] ва инчунин дар китоби Г.Ф.Лакин пешниҳодшуда [1990] коркарди оморӣ шуданд.

Маълумоти пешниҳодшуда бо эҳтимолияти бовариноки 97-99% ҳаққониянд.

Соҳаи таҳқиқот. Диссертатсия тибқи шиносномаи ихтисоси ҚОА назди Президенти Ҷумҳурии Тоҷикистон 03.01.05-физиология ва биохимия растаниҳо аз рӯи нуқтаҳои зерин мувофиқ аст: 1 Фотосинтез ва нафаскаши растаниҳо, алоқамандии маҳсулнокӣ ва ҳосилнокӣ, механизмҳои фотофизикӣ, фотохимиявӣ ва биохимиявии фотосинтез; 3. Барномаи онтогенетикии расиш ва морфогенези растанӣ, эмриогенез, сабзиши вегетативӣ, расиши генеративӣ, тухмҳосилкуни, пиршавӣ.

Марҳилаҳои таҳқиқот тӯли 15 соли омӯзиши назариявӣ ва амалиро дар бар мегиранд.

Дар марҳилаи аввали мавзӯи таҳқиқот, мақсад ва вазифаҳои он, интиҳоби объектҳои таҳқиқот, таҳия карда шудаанд, равишҳо ва ҷустуҷӯи адабиётҳо гузаронида шуд.

Марҳилаи дуюм омӯзиши хусусиятҳои кинетикӣ вобаста аз компонентҳои муҳити реакционии ферментҳои калиди сикли Калвина – рибозофосфатизомераза, фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфаткар-

боксилазаи маҷмуи мултиферментии шираи барги пахта ва арабидопсисро дарбар мегирифт. Марҳилаи сеюм ин гузаронидани таҷрибаҳо дар давраҳои онтогенези растаниҳо, таъсири концентратсияҳо гуногун, усулҳои таъсири кинетин ба фаъолноки маҷмуи комплекси ферментии шираи барги арабидопсис авлоди Энкхайм, мутантҳои он гузаронида шуд. Марҳилаи чорум таъсири кинетин ба фаъолнокии маҷмуи мултиферментӣ дар перепаратҳои дараҷаи тозакуни гуногун дар барги пахта муайян гардид. Марҳилаи панҷум таҳқиқот вобаста ба истифодабарии субстратҳои гуногун (рибозо-5-фосфат, рибулозо-5-фосфат ё рибулозобисфосфат) таъсири кинетин *in vitro* ба давраҳои гуногуни расиши растани пахта гузаронида, моҳияти таъсири кинетин муайян кард шуда. Марҳилаи шашум иборат аз навиштани рисола, санҷиши он ва муҳокима он буд.

Заминаи асосии иттилоотӣ ва таҳқиқотӣ аз маъхазҳои адабиётӣ, нашрияҳои илмӣ, интернет, маводҳои конфронсҳо, яъне китобхонаҳои илмӣ ва захираҳои интернетӣ ва инчунин аз таҳқиқотҳои озмоишгоҳи ва саҳроӣ иборат буд.

Эътимоднокии натиҷаҳои рисола: Эътимоднокии маълумотҳои таҷрибавӣ, ки дар асоси усулҳои муосири биохимиявӣ, физиологӣ бо истифодаи таҷҳизоти тасдиқшуда ба даст оварда шудаанд, бо такрорёбии кофӣ ва коркарди дурусти натиҷаҳои оморӣ тасдиқ карда мешаванд.

Навгониҳои илмӣ таҳқиқот: Бори аввал омӯзиши қиёсии вобастагии ферментҳои калидии фотосинтез рибулозофосфатизомераза, фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназаи маҷмуи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта вобаста ба генотипи растаниҳо хусусиятҳои кинетикӣ омӯхта шудааст.

Параметрҳои кинетикӣ ҳар яке аз реаксияҳои ферментативии бо маҷмуи мултиферментӣ аз баргҳои пахта катализшаванда дар қиёс бо маҷмуъ аз баргҳои арабидопсис қимматҳои нисбатан баланд доранд. Ин бо он алоқаманд аст, ки барои маҷмуи мултиферментӣ аз баргҳои пахта таъсири мусбӣи кооперативии нисбатан мураккаб ва тез байни марказҳои фаъоли зервоҳидҳои ферментҳо хос мебошанд. Дар натиҷаи ин дар вақти нисбатан камтар, фаъолнокии баланди каталитикӣ аз суръати максималии реаксияҳои маҷмуи мултиферментӣ аз баргҳои арабидопсис ба даст омадаанд.

Муқаррар карда шудааст, ки аз се тарзи озмудашудаи иловакунии кинетини экзогенӣ: дар раванди гомогенизатсияи баргҳо, дар муҳити реаксионӣ ё ҳам дар раванди гомогенизатсияи баргҳо ва ҳам дар муҳити реаксионӣ барои фаъолгардонии фаъолнокӣ ферментативии маҷмуи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис новобаста ба синну соли растаниҳо иловакунии он ба муҳити реаксионӣ беҳтар будааст.

Вобастагии концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ аз фаъолнокии ферментативии маҷмуи мултиферментӣ дар маҷмуи мултиферментии авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутанти каммаҳсули он

58/15 омӯхта шудааст. Таъсири фаъолгардонандаи зиёдтаринро ба фаъолноки ферментативӣ новобаста аз объект, кинетин ба концентратсияи 2 мкмол/мл муҳити реаксионӣ расонидааст. Таъсири фаъолгардонандаи бештарин - 300% ё ба се маротиба кинетин ба фаъолнокӣ рибулозобисфосфаткарбоксилази маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ва 2,5 маротиба дар барги пахта расонид.

Вобастагии онтогенетикии таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокии ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутантҳои он – сермаҳсул - триплекс ва каммаҳсул - 58/15 ошкор карда шудааст. Дараҷаи таъсири фаъолгардонандаи зиёдтарини кинетин ё дар растаниҳои хеле ҷавон – шонздаҳрӯза ё дар растаниҳои хеле пир – сиюхаштрӯза зоҳир шудааст. Ин зоҳиран, бо мавҷудияти нокифояи ситокининҳои эндогенӣ ҳам дар баргҳои растаниҳои хеле ҷавон ва ҳам дар баргҳои растаниҳои пир алоқаманд мебошад.

Муқаррар карда шудааст, ки ҳангоми тозакунии экстрактҳо аз баргҳои пахта дар марҳилаи гел-хроматография дар калонка бо Сефадекс G-200 қобилияти бо кинетин фаъолгардии ферментҳои маҷмӯи мултиферментӣ пурра аз байн рафтааст. Натиҷаҳои ҳосилшуда аз он гувоҳӣ медиҳанд, ки ҳангоми гел-хроматография дар Сефадекс G-200 дармондан (таъхир кардан) ё (ва) ретсептори кинетин ё (ва) мессенҷери «дуюмбора» (тақвиятдиҳандаи сигнал) руҳ медиҳад, ки табиати сафедагӣ дошта массаи молекулавии онҳо аз 500 кДа хеле кам мебошад.

Ҳангоми муайянкунии таъсири концентратсияҳои гуногуни кинетин дар муҳити реаксионӣ ба фаъолнокӣ фосфорибулокиназӣ ва фаъолнокӣ рибулозобисфосфат-карбоксилазаи маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстракт аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф бо иштироки субстратҳои махсуси худӣ ва ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибозо-5-фосфат ошкор карда шудааст, ки дараҷаи таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фермент на бо иштироки рибулозо-5-фосфат ё рибулозо-1,5-бисфосфат, балки ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибозо-5-фосфат хеле баланд буд. Натиҷаҳои ҳосилшуда асос барои фарз кардан мегарданд, ки кинетин дар ин ҳолат нақши эффектору аллостерикиро иҷро кардааст, ки дар маҷмӯи мултиферментии ба афзуншавии суръати максималии реаксияҳои рибозофосфатизомеразӣ, фосфорибулокиназӣ ва рибулозобис-фосфаткарбоксилаза баранда тағйироти конформатсионии мутобиқро ба вучуд меорад. Механизми таъсири фитогармонҳои дигар метавонад нисбати кинетин пасттар бошад. Дар оянда гузаронидани таҳқиқоти махсус ҳатмии зарур мебошад.

Вобастагии онтогенетикии таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯҳои мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф муқаррар карда шудааст. Нишон дода шудааст, ки барои фаъолгардонии аҳамиятнокӣ

(80%) фаълнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯъҳои мултиферментӣ дар фазаи гулкунии растаниҳо дар қиёс бо фазаи 5-6 баргҳои ҳақиқӣ ва шонабандӣ консентратсияи нисбатан баланди кинетин зарур мебошанд. Маълумоти бадастомада аз он шаҳодат медиҳанд, ки дар фазаи шонабанди ва гулкунӣ растани пахта ба миқдори иловагии кинетин ниёз дорад.

Аҳамияти назариявии таҳқиқот. Натиҷаҳои бадастovarдашудаи таҳқиқотҳо нишон дод, ки омӯзиш бо генотипи растаниҳо вобаста ба хусусиятҳои кинетикии ферментҳои калидии даври торикӣ фотосинтез – рибозофосфатизомераза, фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксегенеза, аҳамияти назарияви доранд.

Омӯзиши онтогенетикии фаъолияти ферменттативии комплекси бисёрферментии даври Калвин барои омӯзиши минбадаи механизмҳои танзими равандҳои физиологӣ ва биохимиявӣ дар давоми ҳаёти растаниҳо ва мутобиқшавии онҳо ба омилҳои доимии беруна муҳим аст.

Маълумотҳои таҷрибавии ба даст овардашуда оид ба вобастагии таъсири кинетини экзогенӣ ба генотип дар марҳилаи инкишофи растани ба консентратсия дараҷаи тозакунии перепаратҳои ферменти барои ҳалли як қатор масъалаҳои назариявӣ ва амалии физиологӣ ва биохимиявии равандҳои маҳсулнокии растаниҳо аҳамияти калон дошта ҳангоми коркард дар қорҳои биотехнологӣ ва селекционӣ ва баҳодиҳӣ ба маҳсулнокӣ устувории растаниҳои хоҷагии қишлоқ истифода мешаванд.

Мазмуни натиҷаҳои таҳқиқоти таҷрибавӣ барои инкишофи катализи ферментӣ аҳамияти калони назариявӣ дорад.

Аҳамияти амалии таҳқиқот. Натиҷаҳои таҳқиқоти таҷрибавии гузаронидашуда барои фитотехника ҳангоми усулҳои коркарди растаниҳо бо ситокининҳои экзогенӣ ё бо аналогҳои онҳо дар ҳамон фазаи инкишофи растаниҳо, ки ба онҳо мавҷудияти фитогормонҳои эндогении худӣ нокифоя аст, дар натиҷаи ин онҳо ҳангоми омилҳои экологӣ номусоид (хушксолӣ, шӯразанӣ, зери об мондан ва ғ.) стресс-ҳассос ё стресс-ноустувор мегарданд истифода мешаванд. Инчунин барои қорҳои биотехнологӣ ва селекционӣ тибқи созмондиҳии растаниҳо бо тағйироти самтдори системаҳои танзими гормоналӣ ва бо реаксияҳои муҳофизавии хуб, барои фаҳмидан ва омӯзиши баъдинаи механизмҳои танзими ситокининҳо барои амали кардани аппарати фотосинтетикии растаниҳои олий аҳамияти муҳим доранд.

Яъне барои бадаст овардани ҳосили баланд зарур аст, барги пахтаро бо маҳлули кинетин дар давраи гулкунӣ коркард намудан.

Маълумоти бадастомадаро барои хондани лексияҳо аз курсҳои умумии биохимия, физиология ва биотехнологияи растаниҳо, курсҳои махсуси фотосинтез, фитогормонҳо, энзимология дар факултетҳои биологии МТО-ҳо тавсия кардан ва инчунин ҳангоми гузаронидани таҷрибаҳои лаборатории гуногун, иҷро кардани қорҳои дипломӣ, магистрӣ ва диссертатсионӣ истифода бурдан мумкин аст.

Нуктаҳои барои химоя пешниҳодшаванда:

1. Амал кардани маҷмӯъҳои мултиферментии даври Калвин аз намуди растаниҳо, яъне хусусияти намуди – ин бо гуногунии хусусияти рафтори кинетикии ферментҳо дар маҷмӯи мултиферментӣ вобаста аст. Рафтори кинетикии ферментҳои маҷмӯи мултиферментии даври Калвини баргҳои арабидопсис аз рафтори ферментҳои маҷмӯи мултиферментии баргҳои пахта куллан фарқ мекунад. Барои маҷмӯи мултиферментии баргҳои пахта таъсири мусбии кооперативии нисбатан мураккаб ва тез байни марказҳои фаъоли зервоҳидҳои ферментҳо хос мебошанд, дар натиҷаи ин дар вақти нисбатан камтар шабоҳати зиёд ба субстрат, фаъолноки каталитикии нисбатан баланди аз суръати максималии реаксияҳои маҷмӯи мултиферментии баргҳои арабидопсис хеле зиёд ба даст омадаанд;

2. Таъсири кинетини *in vitro*-и экзогенӣ ба фаъолноки ферментативии маҷмӯи мултиферментии даври Калвини баргҳои арабидопсис ва пахта аз консентратсияи он ба муҳити реаксионӣ ва синну соли растаниҳо вобаста мебошад, ки зоҳиран бо мавҷудияти ҳархелаи ситокининҳои эндогенӣ дар фазаҳои гуногуни инкишофи растаниҳо алоқаманд аст, ба иловакунии кинетин фазаи гулкунии растаниҳо бештар ҳассос будааст.

3. Дар пайдарпайҳои реаксияҳои бо се ферментҳои маҷмӯи мултиферментии даври Калвин – рибозофосфатизомераза – E1, фосфорибулокиназа – E2 ва рибулозобисфосфаткарбоксилаза-/оксигеназа – E3 кинетин нақши аллостерикии эффекторҳоро барои ҳамаи се ферментҳо иҷро мекунад. Таъсири мусбии кооперативии байни марказҳои фаъоли зервоҳидҳои рибозофосфатизомераза тариқи рибозо-5-фосфат бавучудоянда бо кинетин тақвият меёбанд ва ба фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа дода мешаванд, натиҷаи ин таъсирот байни марказҳои фаъоли ферментҳо афзуншавии аҳамиятноки ҳар як фаъолноки ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ мебошад.

Саҳми шахсии довталаби дарёфти дараҷаи илмӣ. Саҳми шахсии довталаб аз таҳияи ҳадаф ва вазифаҳои омӯзиш, интиҳоби объектҳои таҳқиқотӣ, таҳия ва татбиқи таҷрибаҳо, коркард, таҳлил ва тафсири маълумоти бадастомада, навиштани мақолаҳо, монографияҳо, гузоришҳои илмӣ иборат аст.

Таъйиди (апробатсия)-и рисола ва иттилоот оид ба истифодаи натиҷаҳои он.

Натиҷаҳои таҳқиқоти гузаронидашуда дар конференсияҳои ҳарсолаи апрелии илмӣ – амалии ҳайати профессорӣ - омӯзгории Донишгоҳи миллии Тоҷикистон арз карда шудаанд (Душанбе 2013-2019), маводҳои конференсияи илмӣ бахшида ба 60-солагии таъсисёбии Академияи илмҳои ҶТ «Физиологияи растаниҳо ва мушкilotи рушди растанипарварӣ дар Тоҷикистон» (Душанбе, 2011), дар конференсияи 5-уми байналхалқии «Мушкilotи экологӣ ва истифодаи самараноки захираҳои табиӣ» (Душанбе 2012); «Хусусиятҳои экологии гуногунии биологӣ» (Хучанд, 2013), маводҳои конференсияи ҷумҳуриявии «Дастовардҳои биохимияи

муосир: чанбаҳои назариявӣ ва амалӣ» (Душанбе, 2016), маводҳои конференсияи ҷумҳуриявӣ илмӣ-назариявӣ кафедраи ботаникаи ДМТ «Мушкилоти таксономияи растаниҳои Тоҷикистон» (Душанбе, 2017), маводҳои конференсияи ҷумҳуриявӣ «Дастовардҳои биологияи муосир дар Тоҷикистон» (Душанбе, 2017), конференсияи ҷумҳуриявӣ илмӣ-назариявӣ «Таъсири тағйирёбии глобалии иқлим ба маҳсулнокии системаҳои агроэкологӣ дар ҷумҳурии Тоҷикистон», бахшида ба даҳсолаи Байналхалқии «Об барои рушди устувор дар сс. 2018 - 2028», 70-солагии Донишгоҳи миллии Тоҷикистон (Душанбе, 2018), маводи конференсияи VIII-уми байналмилалӣ «Хусусиятҳои экологии гуногунии биологӣ» (Тоҷикистон, ш. Хучанд, 3-4 октябри соли 2019), конференсияи ҷумҳуриявӣ «Дастовардҳои биохимияи муосир дар Тоҷикистон» (Душанбе, 2020), маводи конференсияи байналмилалӣ илмӣ «Ташаккулёбӣ ва рушди биологияи эксперименталӣ дар Тоҷикистон» (Душанбе, 2022), маводи конференсияи байналмилалӣ илмӣ «Ташаккулёбӣ ва рушди биологияи эксперименталӣ дар Тоҷикистон» (Душанбе, 2022)

Интишори натиҷаҳои рисола. Аз рӯи натиҷаҳои мавзӯи диссертатсия 30 кори илми ба чоп расидааст, ки 14-тои он ба рӯйхати Комиссияи олии аттестатсионии назди Президенти Ҷумҳурии Тоҷикистон дохил мешавад, инчунин як монография ва як таҳияи методи нашр шудааст. Муаллифи 1 шаҳодатнома ва 2- санад мебошам, ки дар давоми тадқиқот ба даст оварда шудаанд.

Сохтор ва ҳаҷми рисола. Диссертатсия ба забони русӣ, дар ҳаҷми 220 саҳифаи матни компютерӣ навишта шудааст, он аз муқаддима, 6 боб, натиҷаҳо, хулоса, рӯйхати адабиёти овардашуда иборат аст, ки 171 номгӯйро ташкил медиҳад, ки замима, 14 ҷадвал ва 52 расмро дар бар мегирад.

ҚИСМИ АСОСИИ ТАҲҚИҚОТ

Дар боби якум баррасии адабиётҳо, пешниҳоди натиҷаҳо оиди таркиби фитогормонҳо, вазифаҳои маҳсули ситокининҳо ва истифодаи онҳо дар таҷрибаҳо. Ба назар гирифтани рецептори кинетин, таъсири амалии кинетин ба биосинтези сафеда аз ҷумла ба биосинтези ферменти калидии фотосинтез рибулозобисфосфаткарбоксилаза. Истифодаи васеи ситокинин дар соҳаҳои агротехника, биотехнология ва тиб.

Дар боби дувум мавод ва усулҳои тадқиқот.

Дар боби сеюм ва чорум натиҷаҳои тадқиқот.

Дар боби сеюм ва шашум натиҷаҳои экспериментали тадқиқот нишон дода шудааст.

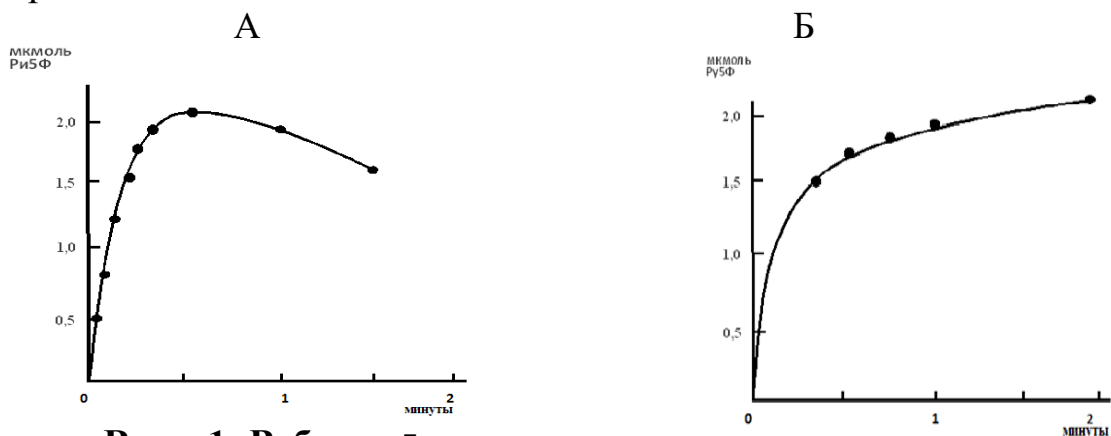
Натиҷаҳои таҳқиқоти кинетикии фаъолноки ферментативии маҷмӯи мултиферментии сикли калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм

Азбаски мақсади ин кор омӯзиши таъсири кинетин ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳо буд, дар

аввал ошкор кардани концентратсияи қисматҳои муҳити реаксионӣ ва шароите зарур буд, ки ҳангоми он бояд фаъолнокии максималии ҳар яке аз ферментҳои маҷмӯи мултиферментӣ дар алоҳидагӣ зоҳир шавад, яъне таҳқиқоти кинетикӣ гузаронида шавад.

Таҳқиқотҳои кинетикӣ фаъолнокии ферментҳои маҷмӯи мултиферментии даври Кальвин дар экстрактҳои баргҳои арабидопсис ва пахтаи навъи 108Ф.

Ошкор кардани шароити муносиби муҳити реаксионӣ барои зоҳир кардани фаъолнокии маҷмӯи мултиферментии дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта.

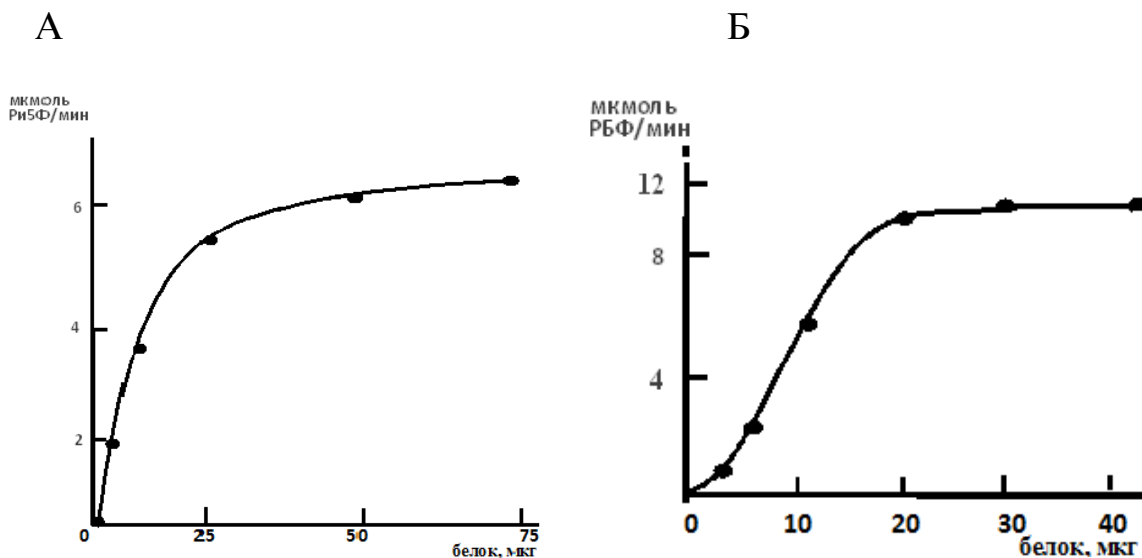


Расми 1.-Вобастагӣ аз давомнокии реаксияи фаъолнокии рибозофосфат-изомеразии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм(А) ва пахтаи навъи 108Ф.(Б)

Дар расми 1. натиҷаҳои омӯзиши вобастагӣ аз давомнокии маҳсулнокии реаксияи рибозофосфатизомеразии бо истифодаи рибулозо-5-фосфат дар экстрактҳои барги арабидопсис (А) ва пахта (Б) оварда шудааст.

Чи тавре аз расми дида мешавад, шакли хати қабл гиперболавӣ намебошад ва ин тавсифи баланд, суръати ибтидоии ва баромади яқбора ба ҳамворӣ дар 0.25 дақ. мебошад. Ҳолати доимии реаксия дар давоми 0.25- 0.5 дақиқа нигоҳ дошта мешавад. Баъд дар арабидопсис тадриҷан пастшавии фаъолнокии реаксияи рибозофосфатизомеразии мушоҳида гардида, вале дар пахта баландшавии фаъолнокии фермент дар мудати 0,5-2 дақ. тавсиф мешавад.

Дар асоси маълумоти ҳосилшуда дар таҳқиқоти баъдина муайянкунии фаъолнокии се фермент рибозофосфатизомераза (РФИ), фосфорibuлокиназа (ФРК) ва рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигенеза (РБФК/О) маҷмӯи мултиферментиро дар давоми 0,5 -1 дақиқа гузаронидем. Омӯзиши вобастагии миқдори сафеда дар муҳити реаксионӣ аз фаъолнокии рибозофосфатизомеразии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм(А) ва пахтаи навъи 108-Ф (Б).



Расми 2.- Вобастагии миқдори сафеда дар муҳити реаксионӣ аз фаъолнокӣ рибозофосфатизомеразии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм(А) ва пахтаи навъи 108-Ф (Б).

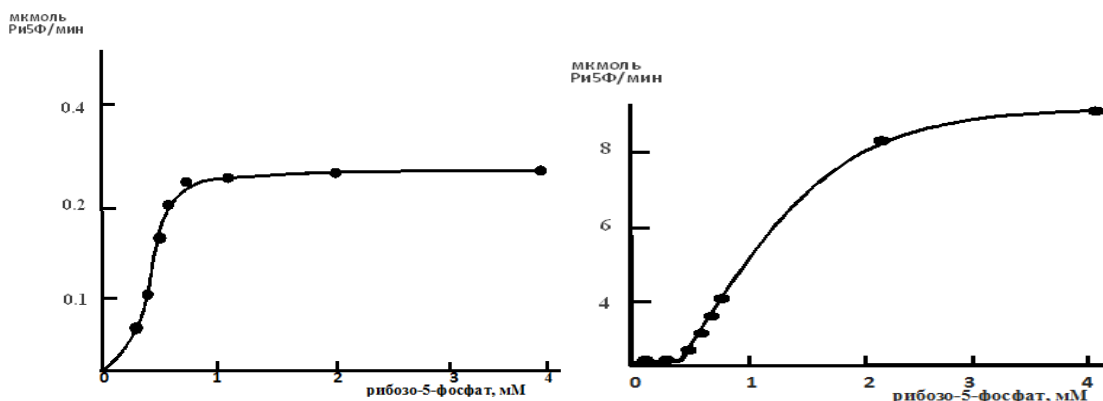
Дар расми 2. дида мешавад, ки хати қачи кинетики шакли классикии гиперболавӣ надорад. Дар арабидопсис дар ҳудуди баланди миқдори сафеда аз 1 то 2,5 мкг будан мутаносиби рости афзуншавии фаъолнокӣ фермент мушоҳида мешавад. Зиёдшавии миқдори сафеда дар муҳити реаксионӣ ба пастшавии фаъолнокии хати қачи кинетики сурати реаксияи рибозофосфати оварда мерасонад.

Дар барги пахта, хати қачи шакли сигмоидии классикӣ дорад. Равиши ибтидоии хати қач аз он шаҳодат меод, ки дар ҳудуди концентратсияҳои сафеда аз 1 то 5 мкг ҳангоми пайвасти шудани субстрат таъсири кооперативӣ байни субвоҳидҳои фермент рӯй дод, ки ба афзуншавии шабоҳати фермент ба субстрат овард, дар натиҷаи ин суръати реаксияи зиёд шуд. Дар расм хуб дида мешавад, ки фаъолнокии ферменти барги пахта нисбат ба фаъолнокии барги арабидопсис бартаридорад. Натиҷаҳои ҳамшабеҳӣ ҳангоми омузиши вобастагии миқдори сафеда дар муҳити реаксионӣ, суръати фосфорилбулокиназӣ ва карбоксилазӣ ба даст омадааст.

Дар асоси натиҷаҳои ба даст омада дар таҳқиқоти баъдина аз тарафи мо 10 мкг сафеда ба 1 мл муҳити реаксионӣ истифода шуд.

А

Б



Расми 3.- Вобастаги консентратсияи субстрат дар муҳити реаксионӣ ба фаълнокии рибозофосфатизомеразии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳои баргҳои арабидопсиси (А) ва пахта (Б).

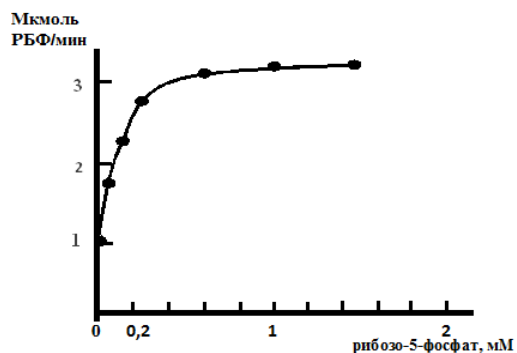
Дар расми 3. натиҷаҳои таҳқиқотҳои вобаста аз консентратсияи субстрати муҳити реаксионии рибозофосфатизомеразии фаълнокии маҷмӯи мултиферментии экстрактҳои баргҳои арабидопсис (А) ва пахта (Б) нишон дода шудааст.

Чихеле, ки аз расми 3. дида мешавад хати қачи кинетикии шакли мураккаби сигмоидӣ дошта, дар арабидопсис як нуқтаи хамшавӣ, дар пахта бошад се нуқтаи хамшавӣ дорад, ки ин аз он шаҳодат медиҳад, ки байни субвоҳидҳои фермент таъсири кооперативӣ мавҷуд буда бо баланд шудани суръати реаксия оварда мерасонад.

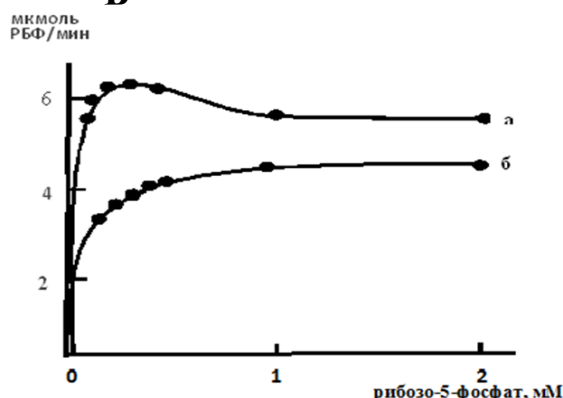
Дар асоси натиҷаҳои ба даст омада, дар таҳқиқотҳои оянда 10 мкмол/мл рибозо-5-фосфат дар мл муҳити реаксионӣ истифода шуд.

Дар расми 4. натиҷаҳои тадқиқоти таъсири консентратсияҳои рибозо 5-фосфат ба муҳити реаксионии фосфорibuлокиназии фаълнокии маҷмуаи комплекси экстрактҳои баргҳои арабидопсис ва пахта оварда шудааст.

А



Б



Расми 4.- Вобастаги консентратсияи рибозо-5-фосфат дар муҳитҳои реаксионии фосфорibuлокиназии маҷмӯи мултиферментии экстрактҳои баргҳои арабидопсис (А) ва пахта (Б).

Тавре аз маълумоти дар расми 4 (А) овардашуда дида мешавад, шакли хати қачи кинетики аз гиперболавӣ фарқ мекунад ва сершавии тези

фермент бо субстрат аллақай ҳангоми концентратсияи субстрат 0.25 мМ будан ва баромади баъдина ба ҳамворӣ, яъне сатҳи доимӣ тавсиф мешавад.

Дар расми 4 (Б) натиҷаҳои таҳқиқоти вобастаги фаълноки фосфорибулокинази дар экстракти аз барги пахта вобаста ба субстрати махсус, рибулозо -5- фосфат ва рибулозо -5-фосфат – рибулозофосфатизомераза гузаронида шуд.

Ҳангоми истифодаи субстрати махсуси ферменти - рибулозо-5-фосфат фаълнокии максималӣ аллақай ҳангоми концентратсияи 0,25 мМ ба вучуд омадааст, баъд ҳамшавии хати қач мушоҳида шудааст, ки бо сершавии тези фермент бо субстрат ҳангоми концентратсияи 0,5 мМ алоқаманд мебошад. Ҳангоми афзуншавии баъдинаи концентратсияи субстрат то 1-2 мМ суръати реаксия доимӣ боқӣ мондааст.

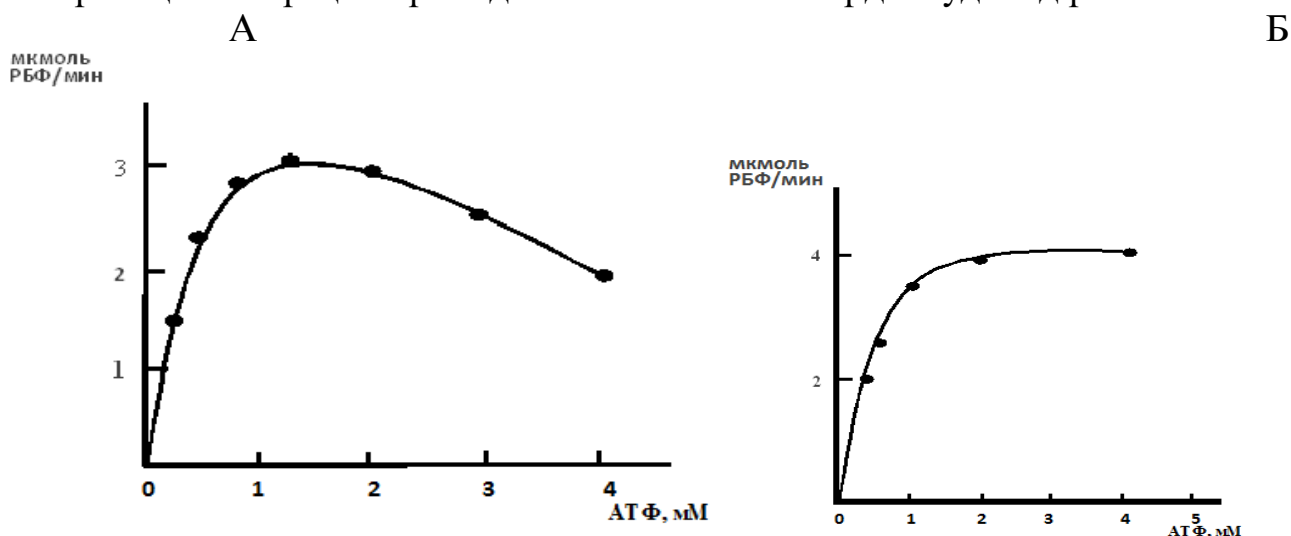
Ҳангоми истифодаи рибулозо-5-фосфат шакли хати қачи кинетикӣ дигар буд, яъне фаълнокии фермент нисбат ба фаълнокии ферменте, ки ҳангоми истифодаи рибулозо-5-фосфат хеле баланд буданд.

Натиҷаҳои ҳосилшуда барои рибулозо-5-фосфат суръати реаксияи фосфорибулокинази баъди реаксияи рибулозофосфатизомеразӣ дар ин занҷири метаболикии даври Калвин дуюм бударо зиёд мекунад, яъне нақши эффекторро иҷро мекунад, асос шуда метавонад.

Алоқамандии рибулозо-5-фосфат бо маркази аллостерикӣ рибулозофосфатизомераза - E_1 тағйироти конформатсионии мутобиқро ва дар ферменти E_2 – фосфорибулокиназаро ба вучуд меоварад.

Дар натиҷаи ин параметрҳои кинетикии суръати фосфорибулокиназа тағйир меёбанд. Дар асоси натиҷаҳои бадастомада дар таҳқиқоти баъдина концентратсияи рибулозо-5-фосфат 0.5-1 мМ дар мл муҳити реаксионӣ истифода шуд.

Натиҷаҳои омӯзиши вобастагии концентратсияи АТФ дар муҳити реаксионӣ аз фаълнокии фосфорибулокинази маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси ва пахта оварда шудаанд расми 5.



Расми 5.- Таъсири концентратсияи АТФ дар муҳити реаксионӣ аз фаълнокии фосфорибулокинази маҷмӯи мултиферментӣ экстрактҳои аз баргҳои арабидопсиси (А) ва пахта (Б).

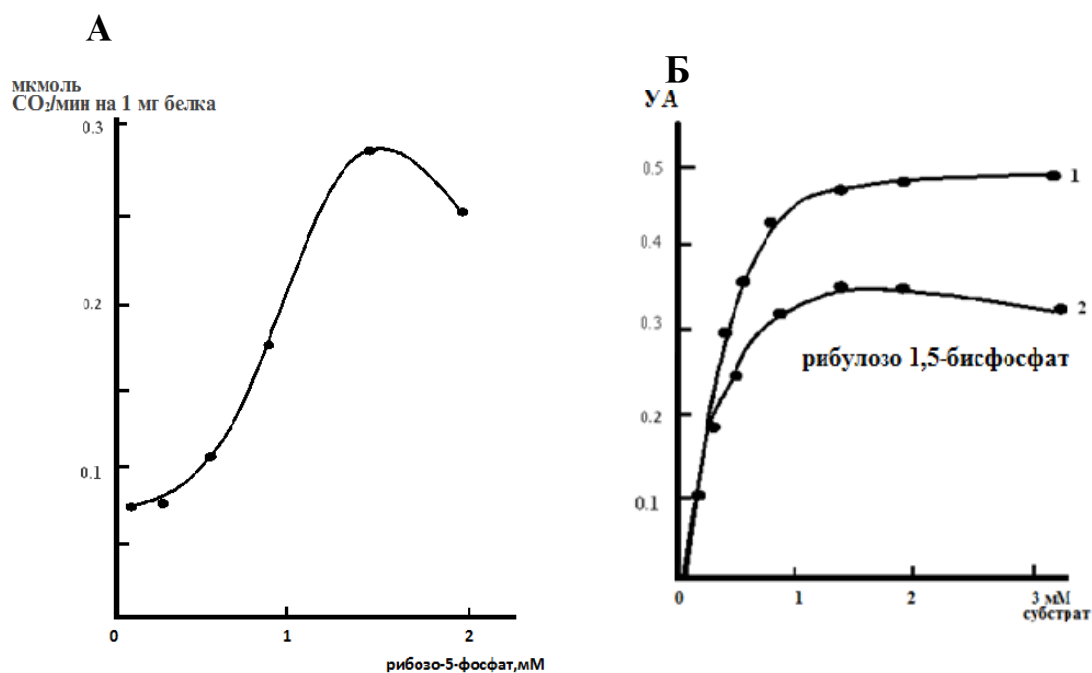
Дар расми 5 (А) дида мешавад, ки хати качи кинетики хамшавии аҳамиятнок мавҷуд нест.

Дар ҳудуди концентратсияҳои аз 1 мМ то 2 мМ АТФ будан сершавии фермент бо субстрат мушоҳида шуд. Ҳангоми концентратсияи АТФ, зиёда аз 2 мМ будан, фаъолнокии фосфорибулокиназӣ паст шуд.

Тавре дар расми 5 (Б) дида мешавад, шакли хати качи кинетикӣ, аллакай бо хамшавӣ ҳангоми концентратсияи АТФ 1 мМ будан тавсиф шудааст, ҳангоми 2 мМ АТФ ба вучуд омадааст, баъд то 4 мМ АТФ доимӣ боқӣ мондааст.

Натиҷаҳои бадаст оварда барои ҳисобидани АТФ натанҳо субстрати реаксия, балки фаъолкунандаи фосфорибулокиназаи маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис асос мешаванд.

Натиҷаҳои омӯзишии вобастагии аз концентратсияи рибозо-5-фосфаткарбоксилаза ва фаъолнокии РБФК/О дар экстрактҳои барги арабидопсис ва пахта дар расми 6. оварда шудааст.



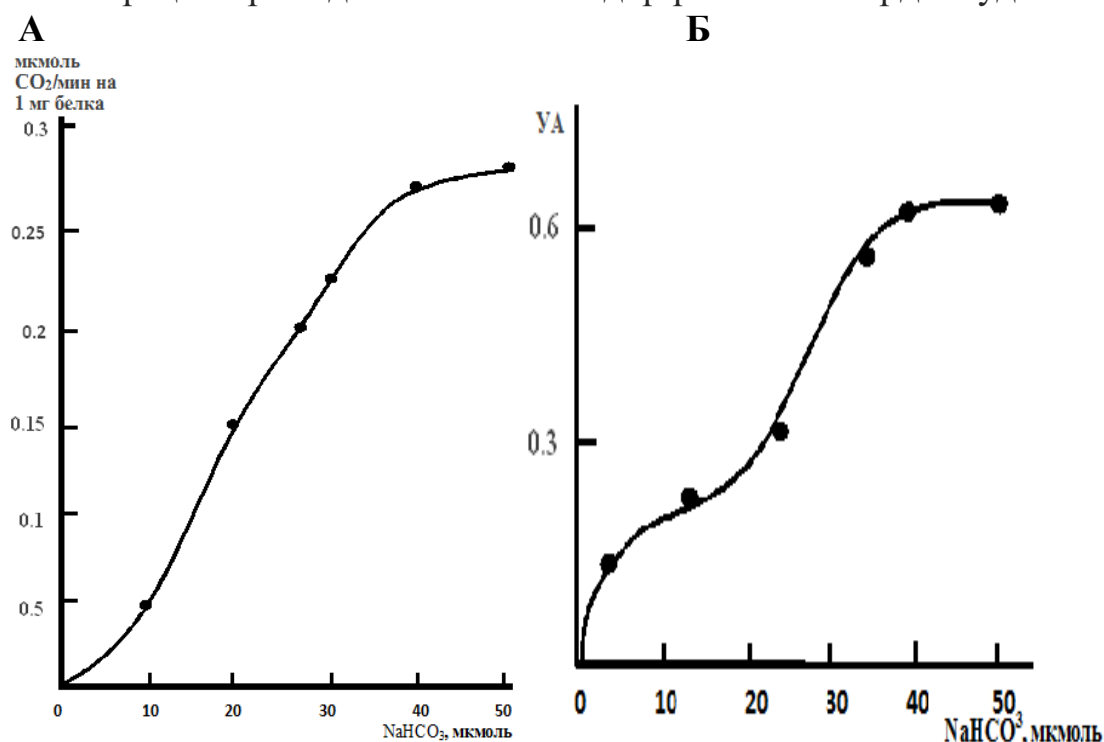
Расми 6. - Таъсири концентратсияи рибозо – 5 - фосфат ба фаъолнокии карбоксилазии рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РБФК/О) дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис - (А) ва пахта - (Б)

Чӣ тавре, ки аз расми.6 (А) дида мешавад, ҳангоми дар муҳити реаксионӣ мавҷуд будани 0,1-0,3 мМ субстрат хати качи кинетики шакли сигмоидии мураккаб бо лаг-давра дорад. Лаг – давра оид ба таъсири кооперативӣ байни марказҳои фаъоли зервоҳидҳои ферменти РБФК/О бо субстрат шаҳодат медиҳад. Ҳангоми афзуншавии миқдори рибозо-5-фосфат дар муҳити реаксионӣ то 0,5-1 мМ афзуншавии фаъолнокии ферменти карбоксилазӣ сар шуд. Ҳангоми афзудани субстрат то 1,5 мМ ба афзуншавии суръати максималии реаксияи карбоксилазӣ оварда расонида, вале ҳангоми 2мМ фаъолнокии фермент паст шуд.

Дар расми 6 (Б). ферменти барги пахта ба хати қачи кинетикии шакли якхела дошта ҳангоми истифодаи рибулозо-1,5-бисфосфат, инчунин бо иштироки рибозо-5-фосфат дида мешавад. Хати қачи кинетики аллақай ҳангоми 0.1 мМ будани субстрат ҳамшавии якбора доранд. Дар ҳарду ҳолат фаълнокӣ максималии фермент ҳангоми консентратсияи субстрат 1 мМ/ мл муҳити реаксионӣ захира мешавад вале фаълнокии фермент ҳангоми истифодаи субстрати рибозо-5-фосфат ниҳоят баланд гардида буд. Ҳангоми консентратсияи субстрат 1-3мМ суръати реаксия доимӣ мемонад.

Дар асоси натиҷаҳои бадаст омада дар таҳқиқотҳои оянда 1мМ рибозо-5 фосфат/мл муҳитҳои реаксионӣ истифода намудем.

Натиҷаҳои омӯзиши таъсири консентратсияи ангидриди карбон ба фаълнокии карбоксилазии РБФК/О-и комплекси мултиферменти экстракти баргҳои арабидопсис ва пахта дар расми 7. оварда шудааст.



Расми 7. - Вобастаги консентратсияи NaHCO_3 дар муҳити реаксионӣ ба фаълнокӣ карбоксилазии рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназаи маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис (А) ва пахта (Б).

Дар расми 7 (А) хати қачи кинетикии шакли класикии сигмоидӣ дорад. Дар расми 7 (Б) шакли хати қачи кинетикӣ хеле мураккаб буда, бо чор ҳамшавӣ – ҳангоми 5, 15, 25 ва 35 мкмол ангидриди карбон тағироти мураккаби конформатсионӣ дорад. Фаълнокии максималии карбоксилазии рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназаи маҷмӯи мултиферментӣ ҳангоми мавҷудияти 40-50 мкмол зоҳир шудааст. Зимнан, ҳангоми ин консентратсияи ангидриди карбон фермент бо субстрат пурра сер шудааст.

Дар таҳқиқоти баъдина 50 мкмол ангидриди карбон дар 1 мл муҳити реаксионӣ истифода шуд.

Ҳамин тавар шароити муносиби муҳити реаксионӣ барои ошкор кардани фаъолнокии рибозофосфатизомерази, фосфорибулокинази ва фаъолнокии карбоксилази рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигенази маҷмӯи мултиферментии ҳалқаи Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта интиҳоб карда шуданд.

Таъсири кинетини *in vitro* ба фаъолнокии ферментативии маҷмӯи мултиферментии сикли калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси

Пештар аз ҷониби М.А.Бобочонова бо ҳаммуаллифон [Бобочонова, Ҳайтова, Носиров, 1971; Бобочонова, Горенкова, 1972; Бобочонова 1981] муқаррар карда шудааст, ки дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта ҳангоми ба муҳити реаксионӣ илова кардани кинетин фиксатсияи $^{14}\text{CO}_2$ бо иштироки рибозо-5-фосфат+АТФ баланд мешавад. Фиксатсияи $^{14}\text{CO}_2$ бо иштироки рибозо-5-фосфат+АТФ аз дар маҷмӯи мултиферментӣ мавҷуд будани маҷмӯи мултиферментии се фаъолнокии ферментативии ҳалқаи Калвин – рибозофосфатизомераза, фосфорибулокиназа ва карбоксилазаро зоҳиркунанда шаҳодат медиҳад.

Барои ошкор кардани ферменти бо кинетин фаъолшавандаи маҷмӯи мултиферментии барои дараҷи CO_2 дар хлоропластҳо масъул, таҳқиқи таъсири кинетин ба фаъолнокии ҳар як фермент дар алоҳидагӣ зарур буд.

Вобаста ба ин аз ҷониби мо таъсири кинетин ба фаъолнокии рибозофосфатизомерази маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои растаниҳои синну соли гуногуни арабидопсиси авлоди Энкхайм омӯхта шуд.

Чор силсилаи озмоишҳо:

1- бе иловакунии кинетин дар раванди ба даст овардани гомогенат ва бе илова кардани он дар омехтаи реаксионӣ ҳангоми муайянкунии фаъолнокии фермент;

2- илова кардани кинетин танҳо дар омехтаи реаксионӣ;

3 –илова кардани кинетин дар раванди ба даст овардани гомогенат ҳангоми соида майда кардани баргҳо, вале бе илова кардан ба омехтаи реаксионӣ;

4 – илова кардани кинетин ҳам дар раванди ба даст овардани гомогенат ва ҳам дар омехтаи реаксионӣ гузаронида шудаанд.

Дар ҷадвали 1. натиҷаҳои таҳқиқотҳо оварда шудааст.

Аз маълумоти дар ҷадвали 1. овардашуда аён аст, ки фаъолнокии зиёдтарини рибозофосфатизомераза дар маҷмӯи мултиферментӣ дар экстракти баргҳои растаниҳои бистухаштрӯзаи арабидопсиси авлоди Энкхайм зоҳир мешавад. Дар растаниҳои нисбатан ҷавон - шонздаҳрӯза фаъолнокии рибозофосфатизомерази нисбат ба растаниҳои бистухаштрӯза ба 31% кам буд.

Ҷадвали 1. -Таъсири усулуҳои иловакунии кинетин ба фаъолнокӣ рибозо-фосфатизомеразӣ (РФИ) маҷмуи мултиферменти сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм

Синну соли растаниҳо, рӯзҳо	Кинетин		Фаъолнокӣ РФИ мкмол Рн5Ф/дақ дар 1 мг сафеда	Фаъолгардонӣ, %
	гомогенизатсия	омехтаи реаксионӣ		
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

Дар растаниҳои шонздаҳрӯза ва сиюҳаштрӯза фаъолнокӣ рибозофосфатизомеразӣ бузургии яхела дошт.

Ҳамин тариқ, аз тарафи мо вобастагии онтогенетикии фаъолнокӣ рибозофосфатизомеразии маҷмуи мултиферментии ҳалқаи Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсис муқаррар карда шудааст.

Омӯзиши таъсири кинетин ба фаъолнокии рибозофосфатизомеразии маҷмуи мултиферментӣ ҳангоми илова кардани он ба раванди гомогенизатсияи баргҳо нишон дод, ки таъсири мусоидаткунандаи кинетин ба фаъолнокии ферментативӣ дар растаниҳои шонздаҳ- ва бистухаштрӯза яхела буда 15%-ро ва растаниҳои сиюҳаштрӯза 38%-ро тартиб медиҳад, яъне ба 2,5 маротиба зиёд мебошад.

Вобаста ба ин муқаррар карда шудааст, ки дар баргҳои нисбатан ҷавони растаниҳо концентратсияи эндогении ситокининҳо нисбат ба баргҳои пиршаванда зиёд мебошад.

Натиҷаҳои ҳангоми илова кардани кинетин ҳам дар раванди гомогенизатсияи баргҳо новобаста ба синну соли растаниҳо ва ҳам ба омехтаи реаксионӣ ҳосилшуда нишон доданд, ки бузургҳои таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокии рибозофосфатизомеразии маҷмуи

мултиферментӣ бо таъсири кинетин танҳо ба омехтаи реаксионӣ иловашуда қиёсшаванда буданд.

Ҳангоми илова кардани кинетин ба омехтаи реаксионӣ бо препарати ферментии аз баргҳои растаниҳои шонздаҳрӯза ва бистухаштрӯза ҷудо кардашуда ба 25% - 28% зиёд будани фаъолнокӣ фермент оварда расонд.

Фаъолгардонии бештарини 47%- и фаъолнокӣ рибозофосфатизомеразии маҷмӯи мултиферментӣ дар препарати ферментии аз баргҳои растаниҳои сиюхаштрӯзаи арабидопсис ҷудо кардашуда мушоҳида шуд. Натиҷаҳои маълумоти ҳосилшуда онро тасдиқ мекунанд, ки ҳар як марҳилаи инкишофи растаниҳо тибқи «гомеостази гормоналӣ» аз пешина фарқ мекунад, ки боиси ҷавобҳои махсуси гуногун ба таъсири ин ё он омилҳо мисли дохилӣ ва берунӣ мегардад.

Аз ҷониби мо таъсири концентратсияҳои гуногуни кинетин ҳангоми илова кардани он ба омехтаи реаксионӣ ба фаъолнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ва мутанти каммаҳсули он 58/15 дар фазаи поябаргӣ омӯхта шуд.

Маълумоти бадастомада дар ҷадвали 2. пешниҳод шудаанд.

Аз маълумоти дар ҷадвали 2. овардашуда аён аст, ки фаъолгардонии бештарини фаъолнокии фосфорибулокиназӣ ҳангоми ба муҳити реаксионӣ илова кардани 2 мкмол/мл кинетин ба вучуд омадааст. Дар авлоди ибтидоии Энкхайм фаъолнокӣ фосфорибулокиназӣ ба 78% ва дар мутанти 58/15 ба 59% афзун шуд.

Зиёдшавии концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ то 4 ва 10 мкмол/мл ба фаъолгардонии фаъолнокии ферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои авлоди ибтидоии Энкхайм –29-27% ва дар мутанти 58/15 – 26-20%.баробар буд.

Ҷадвали 2. - Вобастагии концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ аз фаъолнокӣ фосфорибулокиназии (ФРК) маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ва мутанти каммаҳсули он 58/15

Объекти таҳқиқот	Концентратсияи кинетин, мкмол/мл	Фаъолнокӣ ФРК, мкмол РБФ/дақ дар 1	Фаъолгардонӣ %
Авлоди ибтидоии 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
Мутанти 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

Дар ҳарду объектҳо консентратсияи муносиби кинетин дар муҳити реаксионӣ ҳангоми муайянкунии фаъолнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ 2 мкмол/мл будааст. Ин консентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ аз тарафи мо дар таҳқиқоти баъдина истифода шуд.

Дар ҷадвали 3. натиҷаҳои омузишӣ вобастаги таъсири кинетин ба фаъолнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ сикли Калвин дар экстратҳо аз баргҳои растаниҳои синну соли гуногуни арабидопсиси авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутантҳои он 58/15 оварда шудааст.

Ҷадвали 3. Таъсири кинетин ба фаъолнокии фосфорибулокиназии (ФРК) маҷмӯи мултиферментӣ ҳалқаи Калвин дар экстратҳо аз баргҳои растаниҳои синну соли гуногуни арабидопсиси авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутантҳои он 58/15 ба кинетин ва бо кинетин

Объекти таҳқиқот	Синну соли растаниҳо, рӯзҳо	Фаъолнокӣ ФРК, мкмол Мкмол РБФ/дақ дар 1 мг сафеда			
		Муҳити реаксионӣ ба (-) ва бо (+) кинетин			
		-	%	+	%
Авлоди ибтидоии Энкхайм	16	3.1±0.1	100	6.3±0.2	203
	28	4.1±0.2	100	4.4±0.2	107
Мутантҳо: сермаҳсул триплекс	16	3.4±0.2	100	5.2±0.3	153
	28	4.5±0.3	100	4.9±0.4	110
Каммаҳсул 58/15	16	3.1±0.1	100	4.4±0.2	142
	28	3.4±0.2	100	4.1±0.2	119

Тавре аз маълумоти дар ҷадвали 3. овардашуда дида мешавад, кинетин таъсири фаъолгардонандаи зиёдтарин расонидааст. Дар экстратҳо аз баргҳои шонздаҳрӯзаи растаниҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ба-203%, мутанти сермаҳсули триплекс 153%, мутанти каммаҳсули 58/15–142% .

Фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстратҳо аз баргҳои растаниҳои бистухаштрӯзаи арабидопсиси авлоди Энкхайм ҳангоми илова кардани кинетин ба муҳити реаксионӣ тағйир наёфтааст, дар мутанти триплекс кинетин афзуншавии фаъолнокии фосфорибулокиназиро ба 10% ва дар мутанти 58/15 – ба 19% ба вучуд овард.

Маълумоти бадастомада барои растаниҳои шонздаҳрӯзаи арабидопсиси авлоди Энкхайм миқдори камтарини ситокининҳои эндогенӣ дошта асос ҳисобида мешаванд. Дар растаниҳои бистухаштрӯза миқдори эндогении ситокининҳо дар баргҳо барои таъсир ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ кофӣ буд. Бинобар ин кинетини экзогенӣ ба фермент таъсири фаъолгардонанда нарасонидааст. Дар растаниҳои шонздаҳрӯзаи

ҳарду мутантҳо миқдори эндогении ситокининҳо зоҳиран, нисбат ба растаниҳои авлоди ибтидоии Энкхайм хеле баланд буд. Бинобар ин дараҷаи таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои ин растаниҳо кам – 53% дар мутанти триплекс ва 42% дар мутанти 58/15 буд.

Дар растаниҳои бистухаштрӯза миқдори камтарини ситокининҳои эндогенӣ дар баргҳои мутанти каммаҳсули 58/15 мавҷуд буд. Баргҳои ин синну соли авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутанти сермаҳсули триплекс эҳтимол, миқдори кифояи ситокининҳои эндогенӣ доштанд. Бинобар ин фаъолнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои ин растаниҳо ҳангоми илова кардани кинетини экзогенӣ ба муҳити реаксионӣ ҳамагӣ ба 10% дар мутанти триплекс, ва ба 7% - дар авлоди ибтидоии Энкхайм афзун шуд.

Ҳамин тариқ, вобастагии онтогенетикии таъсири фаъолгардонандаи кинетини экзогенӣ ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутантҳои он триплекс ва 58/15-и зоҳиран, бо миқдори эндогении ситокининҳои дар баргҳои синну соли гуногун алоқаманд ошкор карда шудааст.

Дар ҷадвали 4. таҳқиқоти омузиши вобастагии концентратсияҳои гуногуни кинетин дар муҳити реаксионӣ аз фаъолнокии карбоксилазии рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназаи маҷмӯи мултиферментии ҳалқаи Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм дар фазаи поябаргӣ омӯхта шуд.

Ҷадвали 4.-Таъсири концентратсияҳои гуногуни кинетин дар муҳити реаксионӣ ба фаъолнокӣ карбоксилазии рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназаи (РБФК/О) маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм

Концентратсияи кинетин, мкмол/мл	Фаъолнокӣ РБФК/О, мкмол CO ₂ дар дақ. дар	Фаъолгардонӣ, %
-	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

Тавре аз маълумоти дар чадвали 4. пешниҳодшуда дида мешавад, кинетин ба фаъолнокии карбоксилази рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа дар ҳудуди концентратсияҳои кинетин дар мл муҳити реаксионӣ аз 0,25 то 10,0 мкмол таъсири фаъолгардонанда расонидааст. Таъсири фаъолгардонандаи зиёдтарини 300%-а, дар муҳити реаксионӣ 2 мкмол/мл будан зоҳир шудааст. Ҳангоми концентратсияи кинетин 10 мкмол дар мл муҳити реаксионӣ будан таъсири фаъолгардонандаи он ба фермент то 21% паст шудааст.

Дар чадвали 5. натиҷаҳои омӯзиши вобастагии дараҷаи тозакуни маводҳои ферментативӣ аз барги пахта дар марҳилаи 4-5 барга, таъсири фаъоли кинетин *in vitro* ба фаъолнокии фосфорибулокинази мултиферментии маҷмӯаи ҳалқаи Калвин оварда шудааст.

Чадвали 5.-Вобастаги аз дараҷаи тозакуни маводи ферментативии барги пахтаи навъи 108-Ф таъсири фаъоли кинетин *in vitro* ба фаъолнокии фосфорибулокинази мултиферментии маҷмӯаи ҳалқаи Калвин (дар марҳилаи инкишофи 4-5 баргҳои растаниҳо)

Марҳилаи тозакуни	Фаъолнокӣ ФРК, мкмол РБФ/дақ дар 1 мг сафеда	
	Кинетин	
	-	+
Экстракт	12.1±0.18 100%	16.2±0.24 133%
Таҳшиншавии сафедаҳо ҳангоми сершавии 35-50% (NH ₄) ₂ SO ₄	23.4±0.35 100%	26.4±0.39 113%
Гел-филтратсия дар Сефадекс G-50	34.5±0.52 100%	35.8±0.54 103%
Гел-хроматография дар Сефадекс G-200	12.2±0.73 100%	13.1±0.74 102%

Аз маълумоти дар чадвали 5. овардашуда аён аст, ки - 33% фаъолгардонии фаъолнокии кинетин дар экстракти баргҳо нишондода шудааст. Дар препарати ферментии тариқи фраксионӣ кардан бо сулфати аммоний қисман тозакардашуда фаъолнокии фосфорибулокиназӣ ба 12% афзун шуд. Тозакунии ин маводи ферментӣ бо усули гел-филтратсия дар Сефадекс G-50 ва гел-хроматография дар Сефадекс G-200 ба талаф ёфтани қобилятии бо кинетин фаъолгардии фосфорибулокиназа овард.

Натиҷаҳои ҳамшабеҳи ба даст омада ҳангоми омӯзиши вобастагии аз дараҷаи тозакуни маводҳои ферментативии барги пахта, фаолкунии таъсири кинетин ба фаъолнокии карбоксилазии рибулозобисфосфат-карбоксилаза/ оксигеназа РБФК/О маҷмуи мултиферменти дар ҷадвали 6. оварда шудааст.

Натиҷаҳои ҳосилшуда ба он ишорат мекунанд, ки ҳангоми гел-хроматография дар Сефадекс G-200 дармондан-таъхир кардан ё (ва) ретсептори кинетин ё (ва) мессенҷери «дуюмбора» (тақвиятдиҳандаи сигнал) рух медиҳад, ки массаи молекулавии онҳо аз 500 кДа хеле кам мебошад.

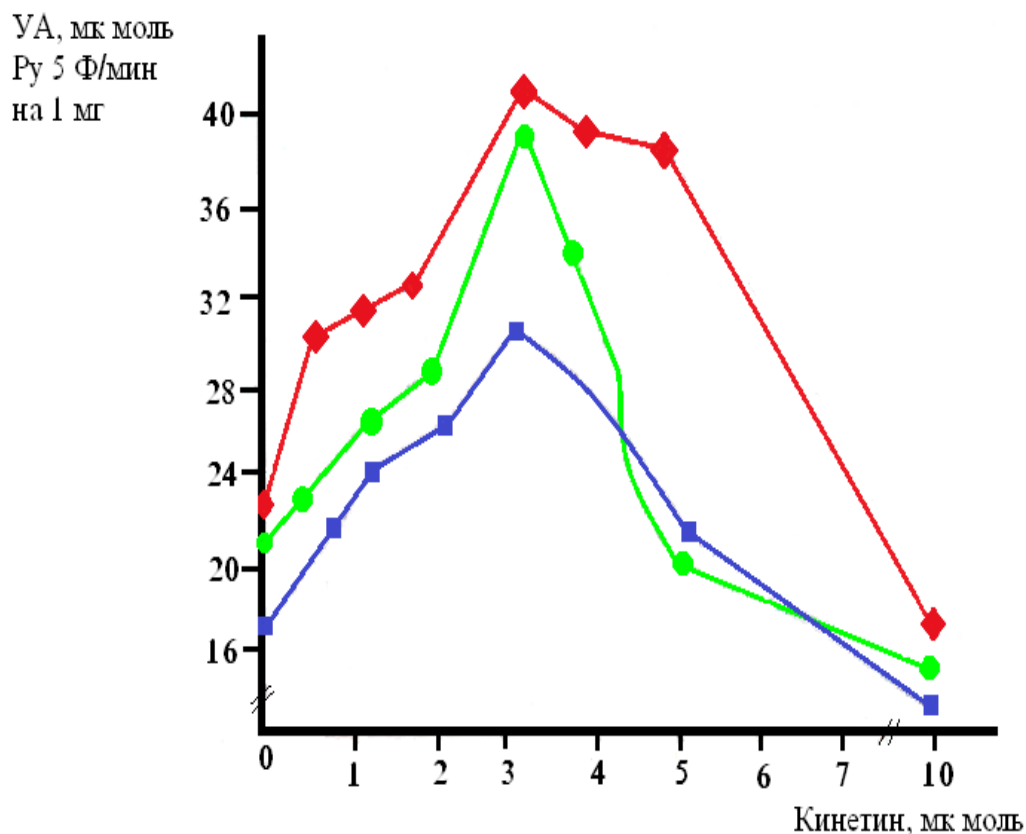
Ҷадвали 6. – Вобастагии аз дараҷаи тозакуни маводҳои ферментативии аз барги пахтаи навъи 108-Ф фаолкунии таъсири кинетин ба фаъолнокии карбоксилазии рибулозобисфосфаткарбоксилаза/ оксигеназа РБФК/О маҷмуи мултиферменти ҳалқаи Калвин

Мархилаи тозакуни	Фаъолнокӣ РБФК, мкмол CO ₂ /дақ дар 1 мг сафеда	
	Кинетин	
	-	+
Экстракт	0.045±0.001 100%	0.121±0.002 268%
Таҳшиншавии ҳангоми 35-50% (NH ₄) ₂ SO ₄ сафедаҳо сершавии	0.660±0.001 100%	0.96±0.002 145%
Гел-хроматография дар Сефадекс G-200	0.951±0.002 100%	0.930±0.002 -

Вобаста ба натиҷаҳои бадаст омада таҳқиқотҳои оянда дар экстрактҳои барг гузаронида шуд.

Вобаста ба ин аз тарафи мо вобастагии таъсири концентратсияҳои гуногуни кинетин дар муҳити реаксионӣ ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмуи мултиферментии ҳалқаи Калвин дар маҷмуи мултиферментии растаниҳо пахтаи навъи 108-Ф дар давраҳои гуногуни инкишоф, ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибозо-5-фосфат+АТФ, омӯхта шудааст.

Натиҷаҳои ҳосилшуда дар расми .8 пешниҳод шудаанд.



Расми 8.- Вобастагии фаълнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф. аз консентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ ва фазаи инкишофи растаниҳо

- ◆ ◆ - давраи инкишофи растаниҳо бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ
- ● - давраи шонабандӣ
- ◆ ◆ - давраи гулкунӣ.

Тавре аз маълумоти дар расми.8 пешниҳодшуда дида мешавад, шаклҳои хатҳои қачи вобастагии фаълнокии фосфорибулокиназӣ аз консентратсияи кинетин ва фазаи инкишофи растаниҳо шакли гиперболавӣ надоранд ва аз якдигар ниҳоят фарқ мекунанд.

Дар давраи инкишофи растаниҳои пахта бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ хати қач дар ҳудуди консентратсияҳои 0,5-3 мкмол шакли сигмоидӣ дошт. Ҳангоми дар муҳити реаксионӣ мавҷуд будани 4-5 мкмол кинетин фаълнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ паст шуд ва дар 10 мкмол кинетин ферментро бозмедорад.

Дар давраи шонабандӣ растаниҳои пахта шакли хати қачи вобастагии фаълнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ аз консентратсияи

кинетин дар худуди 0,5-3 мкмол дар муҳити реаксионӣ рост шуд ва ҳангоми дар муҳит 3 мкмол кинетин будан фаъолнокии фермент якбора афзун шуд, дар худуди концентратсияҳои кинетин 4-5 мкмол будан фаъолнокии фосфорибулокинази якбора паст шуд ва 10 мкмол кинетин ферментро бозмедорад.

Дар давраи шонабандӣ ҳангоми ҳамаи концентратсияҳои кинетин дар муҳити реаксионӣ бузургҳои фаъолнокӣ фосфорибулокинази маҷмӯи мултиферментӣ, нисбат ба маҷмӯи мултиферментии растаниҳои пахта дар давраи бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ баланд буданд.

Дар давраи гулкунии растаниҳои пахта шакли хати қачи вобастагии фаъолнокӣ фосфорибулокинази маҷмӯи мултиферментӣ аз концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ нисбат ба давраҳои бо 5-6-баргҳои ҳақиқӣ ва шонабанди тамоман дигар буд. Дар худуди концентратсияҳои кинетин 0.5-2 мкмол будан хати қач лаг-давраи мураттаб дошт, ҳангоми афзуншавии мавҷудияти кинетин то 3 мкмол фаъолнокӣ фосфорибулокинази якбора афзун шуд ва дар худуди концентратсияҳои кинетин 3-5 мкмол будан доимӣ боқӣ монд. Зиёдшавии баъдинаи мавҷудияти кинетин дар муҳити реаксионӣ ба пастшавии фаъолнокии фермент овард ва 10 мкмол кинетин ферментро бозмедорад.

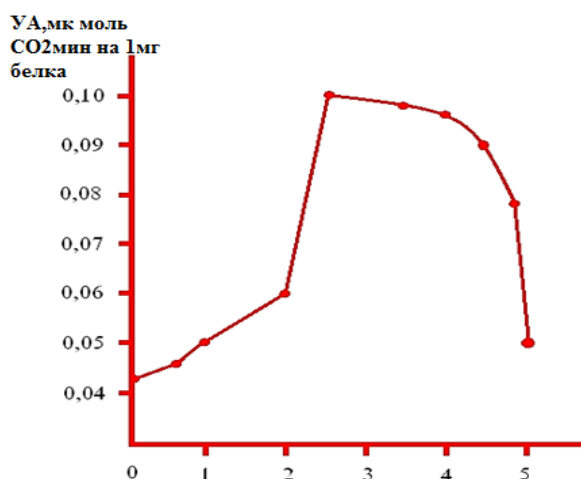
Бузургҳои фаъолнокии фосфорибулокинази маҷмӯи мултиферментӣ дар фазаи гулкунии растаниҳо ҳангоми ҳамаи концентратсияҳои кинетин дар муҳити реаксионӣ аз бузургҳои фаъолнокии фермент дар давраҳои бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ ва шонабандӣ хеле зиёд буданд.

Натиҷаҳои ҳосилкардаи муаллифон (Абзалов, Начимов, 1985; Кефели, 1991) онро тасдиқ мекунанд, ки дар раванди ташаккулёбии таносули узвҳо ва гулкунӣ фитогормонҳо бо танзим кардани равандҳои афзоишии вегетативӣ ва таносули узвҳо кори дучандаро иҷро мекунанд, бинобар ин, миқдор ё концентратсияи зиёди онҳо зарур мебошад.

Азбаски рибүлозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа дар ин пайдарпайҳои занҷири реаксияҳои метаболитикӣ сеюмӣ шуда таъсир мерасонад, муқоиса кардани шакли хати қачи вобастагии фаъолнокӣ карбоксилази маҷмӯи мултиферментӣ аз концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ дар қиёс бо фаъолнокии фосфорибулокинази дар экстрактҳо аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф дар ҳамон як давраи инкишофи растаниҳо аҳамият дошт.

Барои муқоиса давраи инкишофи растаниҳои пахта бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ интихоб шуд.

Дар расми. 9 натиҷаҳои омӯзиши вобастагии фаъолнокии карбоксилази маҷмӯи мултиферментӣ аз концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ, ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибозо-5-фосфат+АТФ, оварда шудаанд.



Расми 9.- Вобастагии фаълноки карбоксилазии рибулозобисфосфат-карбоксилаза / оксигеназаи маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф аз консентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ дар фаза бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ

Тавре аз маълумоти дар расми. 8 ва расми.9 пешниҳодшуда дида мешавад, шаклҳои хатҳои қачи вобастагии фаълнокии карбоксилазӣ ва фосфорибулокиназаи маҷмӯи мултиферментӣ аз консентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ шаклҳои S-монанд, вале бо максимумҳои фаъолият ҳангоми консентратсияҳои гуногун кинетин доранд.

Фаълнокии максималии фосфорибулокиназаи маҷмӯъ ҳангоми мавҷудияти 3 мкмол кинетин дар муҳити реаксионӣ зоҳир шудааст, ҳангоми 4-5 мкмол кинетин фаълнокии фермент паст шуд.

Фаълнокии максималии карбоксилазии рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназаи маҷмӯи мултиферментӣ ҳангоми консентратсияи кинетин 2 мкмол/мл муҳити реаксионӣ будан зоҳир шудааст, дар ҳудуди консентратсияҳои кинетин 2-3,5 мкмол доимӣ боқӣ мондааст, яъне хати қач ҳамворӣ дорад. Инчунин ҳангоми консентратсияҳои кинетин 4-5 мкмол/мл муҳити реаксионӣ будан фаълнокии карбоксилазии маҷмӯъ паст шуд.

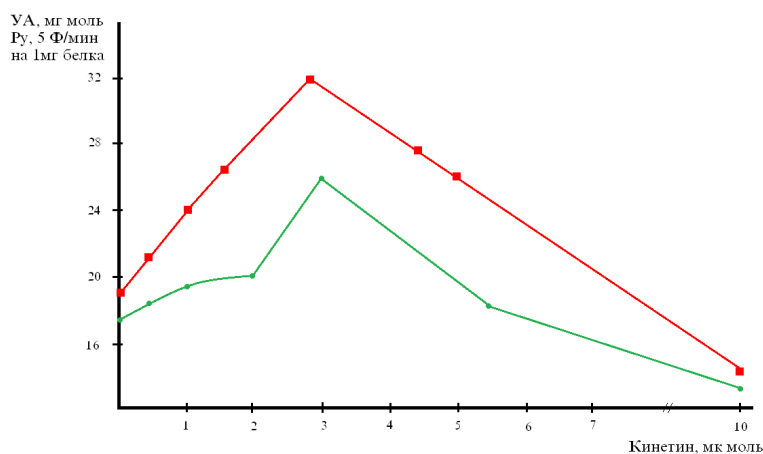
Маълумоти ҳосилшуда дар бораи бо кинетин фаългардони босамартар ва тези реаксияҳои фосфорибулокиназӣ ва карбоксилазӣ ҳангоми истифодаи субстрати якумини занҷири метаболитикӣ ва оид ба ҳассосияти зиёди маҷмӯи мултиферментӣ ба кинетин шаҳодат медиҳад.

Фаългардони бештарини реаксияи фосфорибулокиназӣ дар ҳамон як консентратсияҳои кинетин ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибозо-5-фосфат+АТФ 174% ва РБФ- карбоксилазӣ реаксияи -246%-ро нишон дод. Фаългардони босамартар ё баланди реаксияи рибулозобисфосфаткарбоксилаза бо кинетин ба ошкор кардани танзими фаълнокии ферментҳо дар маҷмӯи мултиферментии мутобиқшуда ишора мекунад, дар вақте ки тағйироти конформатсионии фаълкунанда ё боздоранда бо як ферменти маҷмӯи фосфорибулокиназа бо кӯмаки алоқаҳои

гуногун ба дигар ферменти маҷмӯи – рибулозобисфосфаткарбоксилаза бавучудомада гузаронида мешаванд (Фридрих, 1986).

Ҳамин тавр натиҷаҳои илмӣ ба даст омада дар бораи он, ки кинетин чун дигар фитогормонҳо тавсифи умумии таъсири поливаленти ва бисёрвазифагӣ хос будан шаҳодат медиҳад.

Барои фаҳмидани механизми таъсири кинетини экзогенӣ ба фаъолнокӣ ферментативии маҷмӯи мултиферментии ҳалқаи Калвин, дар расми.10 вобастагии фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментии ҳалқаи Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф ҳангоми истифодаи субстрат рибулозо-5-фосфат ва рибозо-5-фосфат-субстрати рибозофосфатизомераза аз консентратсияи кинетин тасвир ёфтааст.



Рисми10.- Вобастагии фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментии сикли Калвин дар экстракт аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф аз консентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ ҳангоми истифодаи субстратҳои гуногун, фазаи инкишофи растаниҳо ҳангоми 5-6 баргҳои ҳақиқӣ.

● ● ● - рибулозо-5-фосфат

■ ■ ■ - рибозо -5-фосфат

Аз маълумоти дар расми.10 овардашуда фарқият дар шакли хатҳои қачи вобастагии фаъолнокӣ фосфорибулокиназии маҷмӯи мултиферментӣ бо иштироқи субстратҳои гуногун аз консентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ аниқ дида мешавад.

Хати қачи вобастагии фаъолнокӣ фосфорибулокиназӣ ҳангоми истифодаи субстрати худӣ-рибулозо-5-фосфат дар ҳудуди консентратсияҳои кинетин дар муҳити реаксионӣ 0,5-2 мкмол лаг-давра дошт, баъд ҳангоми афзуншавии консентратсияи кинетин то 3 мкмол фаъолнокӣ фермент якбора афзун шуд. Аз 4-5 мкмол мавҷудияти кинетин дар муҳити реаксионӣ сар карда фаъолнокӣ фосфорибулокиназӣ паст шуд ва ҳангоми 10 мкмол будан

фаъолнокӣ фермент паст шуд. Ҳамин тарик, маълумоти бадастомада ба хусусияти зоҳиршавии таъсири фитогормонҳо дар концентратсияҳои паст мувофиқат мекунад, онҳо таъсири фаъолгардонанда мерасонанд, вале дар концентратсияҳои баланд – боздорандаҳо, ҳатто ба апоптоз (марг) меоваранд.

Шакли хати қачи вобастагии фаъолнокии фосфорибулокиназӣ аз концентратсияи кинетин дар муҳити реаксионӣ бо иштироки рибозо-5-фосфат тамоман дигар буд - дар хати қач лаг-давра мавҷуд набуд, дар ҳудуди концентратсияҳои кинетин 0,5-3 мкмол будан хати қач бо сабаби афзуншавии зиёди фаъолнокӣ ферментативӣ гӯё рост шуд.

Баъд дар ҳудуди концентратсияҳои кинетин 4-5 мкмол будан фаъолнокии фермент паст шуд ва ҳангоми мавҷудияти 10 мкмол гормон дар муҳити реаксионӣ фаъолнокии ферментативӣ паст шуд.

Натиҷаҳои ҳосилшуда асос барои он мегарданд, ки кинетин бо иштироки рибозо-5-фосфат нақши эффе́ктори аллостерикиро иҷро мекунад, ки дар маҷмӯи мултиферментии ба афзуншавии суръати максималии реаксияҳои ҳам рибозофосфатизомеразӣ ва ҳам фосфорибулокиназӣ баранда тағйироти конформатсионии мутобиқро ба вучуд меорад (Бобочонова, Сайфудинов, 2019).

Ҳамин тавр, раванди таъсири кинетин ба фаъолнокии маҷмуи мултиферментҳои ҳалқайи Калвин муаян карда шуд.

ХУЛОСАҲО

Натиҷаҳои асосии илмӣ дисертатсия

1. Барои интиҳоби шароити оптималии муҳити реакциони ҳангоми ошкор кардани фаъолнокии ин ферментҳо бори аввал таҳқиқоти кинетикии қиёсии рибозофосфатизомеразӣ, фосфорибулокиназӣ ва рибулозобисфосфаткарбоксилазии реаксияҳои маҷмӯи мултиферментии ҳалқайи Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ва пахтаи навъи 108-Ф гузаронида шудаанд. Дар ҳарду объектҳо хатҳои қачи вобастагии ҳамаи се фаъолнокии ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ аз давомнокии реаксия, миқдори сафеда ва концентратсияи субстратҳо шаклҳои сигмоидии гуногун ва мураққаб бо якҷанд ҳамшавиҳои дараҷаи нисбатан баланди мусбии таъсири кооперативӣ байни марказҳои фаъоли зервоҳидҳои ферментҳо ва тағйироти конформатсионии молекулаҳои инъикоскунанда нашошанд. Шаклҳои хатҳои қачи кинетикии фаъолнокии ферментативии маҷмӯи мултиферментии баргҳои арабидопсис ва пахта фарқ мекарданд. Дар пахта хатҳои қачи кинетикӣ шакли нисбатан мураққабии сигмоидӣ дорад. Дар натиҷаи ин, бузургиҳои ҳамаи фаъолнокии ферментативии маҷмӯи мултиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои пахта, нисбат ба маҷмӯъ аз баргҳои арабидопсис аҳамиятнок баланд буданд [9-А, 10-А, 11-А, 12-А, 20-А, 24-А, 25-А, 27-А].

2. Натиҷаҳои ҳангоми омӯзиши вобастагии фаъолнокии фосфорибулокиназӣ ва фаъолнокӣ карбоксилазии маҷмӯи

мультиферментӣ дар экстрактҳо аз баргҳои пахта аз концентратсияи субстратҳои махсуси худӣ – мувофиқан рибулозо-5-фосфат ва рибулозо-1,5-бисфосфат ва ҳангоми истифодаи рибозо-5-фосфат – субстрат рибулозо-фосфатизомераза бадаст оварда аз он шохидӣ медиҳанд, ки рибулозо-5-фосфат эффеқтори фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа мебошад. Бинобар ин бузургҳои ферментативии фаъолноки онҳо ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибулозо-5-фосфат хеле баланд мебошанд[3-А,17-А].

3. Таҳқиқоти қисми таъсири тарзҳои гуногуни иловакунии кинетин – дар раванди гомогенизатсияи баргҳо, дар муҳити реаксионӣ ё ҳам дар раванди гомогенизатсияи баргҳо ва дар муҳити реаксионӣ ба фаъолнокии рибулозофосфатизомеразии маҷмӯи мультиферментии ҳалқаи Калвин дар маҷмӯи мультиферментии растаниҳои арабидопсиси авлоди Энкхайми синну соли гуногун гузаронида шудаанд. Аз се тарзи таъсири фаъолгардонандаи кинетин зиёдтарини он ҳангоми илова кардани он ба муҳити реаксионӣ, илова бар ин новобаста ба синну соли растаниҳо зоҳир шудааст[5-А].

4. Муайян карда шуд, ки дар раванди тозакуни аз экстракти барги пахта бо ёри фракцияи сулфати аммони ва гел хроматография дар сефадекси G-200 бо талаф ёфтани қобилияти бо кинетин фаъолгардии фосфорибулокинази ва рибулозобисфосфаткарбоксилази оварда шуд. [2-А].

5. Вобастагии онтогенетикии фаъолнокии рибулозофосфатизомеразии маҷмӯи мультиферментии ҳалқаи Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм ошқор карда шудааст. Дарачаи таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокии фермент аз синну соли растаниҳо вобаста будааст. Дарачаи фаъолгардонии зиёдтарини фермент дар растаниҳои пири сиюҳаштрӯза зоҳир шудааст. Ин зоҳиран бо мавҷудияти миқдори ками ситокининҳои эндогенӣ дар онҳо вобаста аст[6-А].

6. Вобастагии таъсири кинетин ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мультиферментии сикли Калвин дар маҷмӯи мультиферментии авлоди ибтидоии Энкхайм ва мутантҳои он аз синну соли растаниҳо муқаррар карда шудааст: сермахсул – триплекс ва каммахсул – 58/15. Новобаста ба объект, фаъолгардонии бештарини фермент бо кинетин дар растаниҳои шонздаҳрӯза, фаъолгардонии камтарини – дар растаниҳои пухтаи бистухаштрӯза ошқор карда шудааст. Бинобар ин, дар баргҳои пухтаи растаниҳо зоҳиран, миқдори кифояи ситокининҳои эндогенӣ мавҷуд аст[8-А].

7. Ошқор карда шудааст, ки аз се ферментҳои маҷмӯи мультиферментии ҳалқаи Калвин таъсири фаъолгардонии зиёдтарин -300%-ро кинетин ба фаъолнокӣ рибулозобисфосфаткарбоксилазӣ дар экстрактҳо аз баргҳои арабидопсиси авлоди Энкхайм дар фазаи поябаргӣ расонидааст[7-А].

8. Вобастагии онтогенетикии таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмӯи мультиферментии сикли Калвин дар экстрактҳо аз баргҳои пахта муқаррар карда шудааст. Ошқор карда

шудааст, ки барои фаългардони аҳамиятноки (80%) фаълнокӣ фосфорибулокинази маҷмӯи мултиферментӣ дар давраи гулкунӣ растаниҳо концентратсияи нисбатан баланди кинетин дар қиёс бо давраҳои шонабандӣ ва бо 5-6 баргҳои ҳақиқӣ зарур мебошад [1-А,4-А,14-А,15-А].

9. Барои арабидопсис ва пахта қонуниятҳои умумӣ дар марҳилаҳои дерии онтогенези гулкунӣ хос аст. Барои зиёдшавии фаълнокии ферментативии маҷмӯи мултиферментии ҳалқаи Калвин иловакунии концентратсияи баланди кинетини экзогенӣ зарур мебошад. Ин зоҳиран, бо мавҷудияти нокифи ситокининҳои эндогенӣ дар растаниҳо вобаста аст [14-А,15-А,18-А,20-А]

10. Барқароршавии механизми таъсири кинетин. Кинетин вазифаи аллостерикӣ эфекториро дар маҷмуаи мултиферменти ҳалқаи Кальвин дар барги растаниҳои олий иҷро менамояд [13-А]

Тавсияҳо оид ба татбиқи амалии натиҷаҳо

Муайян намудани давраи инкишофёбии растани пахта ба норасоӣ ва ҳасоснок будан ба миқдори ситокинин дар барг. Барои баланд бардоштани ҳосилнокии пахта, барги онро бо маҳлули кинетин дар давраи гулкунӣ растани коркард карданд.

РУЙҲАТИ ИХТИСОРОТ

ВПФЦ- Восстановительный пентофосфатный цикл или цикл Кальвина

АДФ-Аденозиндифосфат

АТФ-Аденозинтрифосфат

Ру5Ф- рибулозо-1,5-бисфосфат

РБФ-рибулозо-5-фосфат

3-ФГК-3-фосфоглицериновая кислота

ПВП-Поливинилпирролидон

ТХУ-трихлоруксусная кислота

ДТТ-Дитиотрейтол

ЭДТА-Этилендиаминтетраацетат

кДа-Килодальтон

A-активность мкмоль продукта в минуту

УА-удельная активность, мкмоль продукта или субстрата в минуту в расчете на 1 мг белка

V_{max} -максимальная скорость реакции

E- Фермент

S-Субстрат

P- продукт реакции

pH- концентрация водородных ионов

ФСК- фермент-субстратный комплекс

МФК-мультиферментный комплекс

АЦ-активный центр

АлЦ-аллостерический центр

Кинетин-6-фурфуриламинопурин (6-БАП)

мол. масса-молекулярная массам.

АННОТАЦИЯ

автореферата диссертации Сайфудинова Ахлиддина Киёмовича на тему «Влияние кинетина на ферментативные активности свободного мультиферментного комплекса цикла Кальвина листьев высших растений» представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений.

Ключевые слова: кинетин – ферменты – активность – мультиферментный комплекс – цикл Кальвина – высшие растения.

Цель исследования: 1. Сравнительные кинетические исследования влияния каждой в отдельности ферментативной активности мультиферментного комплекса цикла Кальвина в экстрактах из листьев арабидопсиса и хлопчатника; 2. Изучения влияния кинетина (6-БАП) *in vitro* на ферментативные активности мультиферментного комплекса в онтогенезе растений арабидопсиса и хлопчатника; 3. Определение стадий развития растений, наиболее чувствительных к недостатку содержания цитокининов в листьях; 4. Выявление механизма действия кинетина на ферментативные активности мультиферментного комплекса.

Материалы и методы исследования: Объектом исследований были листья средневолокнистого хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L., семейство *Malvaceae*) сорта 108-Ф, и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) *Heunh*), семейство *Cruciferae*) расы Энкхайм, его мутантов – триплекс, 58/15, высокопродуктивного триплекс. Были использованы современные физиологические и биохимические методы.

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

Установлено, что кинетические параметры каждой из ферментативных реакций, катализируемых мультиферментным комплексом из листьев хлопчатника - имеют более высокие значения в сравнении с комплексом из листьев арабидопсиса.

- При определении влияния различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную 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. Механизм действия кинетина заключается в том, что он

выполняет роль аллостерического эффектора.

- Установлена онтогенетическая зависимость активирующего действия кинетина на фосфорилбулокиназную активность мультиферментных комплексов цикла Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Результаты полученных экспериментальных исследований показали важность и необходимость изучения зависимости от генотипа растений кинетического поведения ключевых ферментов темновой фазы фотосинтеза.

Данные о зависимости влияния экзогенного кинетина от генотипа, фазы развития растений, от его концентрации степени очистки ферментных препаратов необходимы для решения 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.

Применение полученных результатов: Результаты проведенных экспериментальных исследований имеют важное значение 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.). Листья хлопчатника для сохранения завязей и получения высоких урожаев необходимо обрабатывать раствором кинетина в фазе бутонизации и 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.

АННОТАЦИЯ

автореферати диссертатсияи Сайфудинов А.Қ. дар мавзӯи «Таъсири кинетин ба фаъолнокии ферментативии маҷмуи мултиферментии озоди сикли Калвини баргҳои растаниҳои олі» барои дарёфти унвони илмии доктори илмҳои биология аз рӯи ихтисоси 03.01.05 –Физиология ва биохимияи растениҳо.

Калимаҳои калидӣ: кинетин, фермент, фаъолнокии, маҷмуи мултиферменти, халқайи Калвин, растаниҳои олі.

Ҳадафи тадқиқот: гузаронидани таҳқиқотҳои кинетики дар алоҳидагӣ ба фаъолнокии маҷмуи мултиферментии халқайи Калвин дар экстракҳои барги арабидопсис ва пахта.

- омӯхтани таъсири кинетин (6-БАП) *in vitro* ба фаъолнокии маҷмуи мултиферменти дар давраи онтогенези растани арабидопсис ва пахта;

- муайян намудани марҳилаҳои сабзиши растани вобаста ба ҳассоснок будан ё норасоии миқдори ситокинин дар баргҳо;

- омӯзиши механизмҳои таъсири кинетин ба фаъолнокии маҷмуи мултиферментӣ.

Мавод ва усулҳои таҳқиқот: объекти таҳқиқот баргҳои пахтаи миёнаҳа (*Gossypium hirsutum* L., оилаи *Malvaceae*) навъи 108-Ф, ва арабидопсис (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh), авлоди *Cruciferae*), раси Энкхайм, ва мутантҳои он – триплекс, 58/15. усулҳои хозиразамони физиологӣ ва биохимияви истифода карда шуд.

Навгони илмӣ таҳқиқот: Бори аввал омӯзиши қиёсии вобастагии ферментҳои калидии фотосинтези рибозофосфатизомераза, фосфорибулокиназа ва рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигенезаи маҷмуи мултиферментии халқайи Калвин дар экстракҳо аз баргҳои арабидопсис ва пахта вобаста ба генотипи растаниҳо, хусусиятҳои кинетики омӯхта шудааст.

Параметри кинетикӣ ҳар яке аз реаксияҳои ферментативӣ бо маҷмуи мултиферменти аз баргҳои пахта катализшаванда дар қиёс бо маҷмуи аз баргҳои арабидопсис қимматҳои нисбатан баланд доранд.

Ҳангоми муайянкунии таъсири концентратсияи гуногуни кинетин дар муҳити реаксионӣ ба фаъолнокии фосфорибулокиназа ва фаъолнокии рибулозобисфосфат-карбоксилазаи маҷмуи мултиферменти халқайи Калвин дар экстракт аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф бо иштироки субстратҳои махсуси худ ва ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардан рибозо-5-фосфат ошкор карда шудааст, ки дараҷаи таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фермент на бо иштироки рибулозо -5-фосфат ё рибулозо -1,5-бисфосфат, балки ҳангоми ба сифати субстрат истифода кардани рибозо-5-фосфат хеле баланд буд. Натиҷаҳои ҳосилшуда асос барои он мегарданд, ки кинетин нақши эффеқтори аллостерикиро иҷро кардааст.

Вобастагии антогенетикии таъсири фаъолгардонандаи кинетин ба фаъолнокии фосфорибулокиназии маҷмуи мултиферментии халқайи Калвин дар экстракҳои аз баргҳои пахтаи навъи 108-Ф муқарар карда шудааст.

Аҳамияти назарияви ва амалии таҳқиқот.

Натиҷаи бадастовардашудаи таҳқиқотҳо нишон дод, ки омӯзиш бо генотипи растанӣҳо вобаста ба хусусиятҳои кинетикии ферментҳои калидии даври торики фотосинтез аҳамиятан заруранд. Маълумоти таҷрибавии ба даст овардашуда оид ба вобастагии таъсири кинетини экзогенӣ ба генотип, марҳилаи инкишофи растани ба концентратсия, дараҷаи тозакунии перепаратҳои ферменти барои ҳалли як қатор масъалаҳои назариявӣ ва амалии физиологӣ ва биохимиявӣ равандҳои маҳсулнокии растанӣҳо, ҳангоми коркард дар корҳои биотехнологӣ ва селекционӣ ва баҳодиҳӣ ба маҳсулнокии устувории растанӣҳои хоҷагии қишлоқ вобастаст.

Истифодаи натиҷаҳои бадаст оварда шуда: Натиҷаҳои таҳқиқотҳои таҷрибавии гузаронидашуда ҳангоми коркарди растанӣҳо бо ситокининҳои экзогенӣ ё бо аналогҳои онҳо дар давраи инкишофи растанӣҳо, вақто, ки ба онҳо мавҷудияти фитогормонҳои эндогенӣ худ ноқофианд ё ҳангоми омилҳои экологии номусоид (хушксоли, шуразани, зери об мондан) аҳамияти муҳим доранд.

Барги пахтаро барои нигоҳдори ва гирифтани ҳосили баланд зарур аст, ки дар давраҳои шонабанди ва гулкуни бо маҳлули кинетин коркард намуд. Маълумоти бадастомадаро барои хондани лексияҳо аз курсҳои умумии биохимия, физиология ва биотехнологияи растанӣҳо, курсҳои махсуси фотосинтез, фитогормонҳо, энзимология дар факултетҳои биологии МТО-ҳо тавсия кардан ва инчунин ҳангоми гузаронидани таҷрибаҳои лаборатории гуногун, иҷро кардани корҳои дипломӣ, магистрӣ ва диссертатсионӣ истифода бурдан мумкин аст.

ANNOTATION

of the dissertation abstract of Saifudinov Akhliddin Kiyomovich on the topic “Influence of kinetin on the enzyme activity of the free Calvin cycle multienzyme complex in the higher plants leaves ” submitted for a doctoral degree in the specialty 03.01.05 - plants physiology and biochemistry

Key words: kinetin - enzymes - activity, multienzyme complex - Calvin cycle - higher plants.

Purpose of the study: 1. Comparative kinetic investigations of the effect of each individual enzyme activity of the Calvin cycle multienzyme complex in extracts from *Arabidopsis* and cotton leaves; 2. Study of the kinetin effect (6-BAP) *in vitro* on enzyme activity of the multienzyme complex in *Arabidopsis* and cotton plants ontogenesis; 3. Determination of the plants development stages that are most sensitive to the lack of cytokinins in the leaves; 4. Revealing the kinetin effect mechanism on multienzyme complex enzyme activities.

Materials and research methods: The object of research were leaves of medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L., family *Malvaceae*), variety 108-F, and *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh), family *Cruciferae*) of the Enkheim race, its mutants - triplex, 58/15, high productive triplex. Modern physiological and biochemical methods were used.

Scientific novelty of the research: For the first time, a comparative study of the plant genotype dependence of the kinetic behavior of the key photosynthesis enzymes ribose phosphate isomerase, phosphoribulokinase and ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase of the Calvin cycle multienzyme complex in extracts from *Arabidopsis* and cotton leaves was carried out.

It has been revealed, that the kinetic parameters of each of the enzyme reactions catalyzed by the multienzyme complex from cotton leaves have higher values in comparison with the complex from *Arabidopsis* leaves.

When determining the effect of various kinetin concentrations in the reaction medium on phosphoribulokinase and ribulose biphosphate carboxylase activity of the Calvin cycle multienzyme complex in an extract from the cotton variety 108-F leaves in the presence of its own specific substrates and when using ribose-5-phosphate as a substrate, it was found that the extent of the kinetin activating effect on enzyme was significantly higher when ribose-5-phosphate was used as a substrate, and not in the presence of ribulose-5-phosphate or ribulose-1,5-biphosphate. The mechanism of kinetin effect is that it acts as an allosteric effector

An ontogenetic dependence of the kinetin activating action on the phosphoribulokinase activity of the Calvin cycle multienzyme complexes in extracts from cotton leaves (108-F variety) was determined.

Research theoretical and practical significance: Results of the obtained experiments showed the importance and necessity of studying the dependence of the kinetic behavior of the key enzymes of the photosynthesis dark phase of the plant genotype.

Data on the dependence of the exogenous kinetin effect on the genotype, the phase of plant development, and its concentration, on the purification degree of enzyme preparations are necessary for solving theoretical and practical objectives of physiology and biochemistry of the plants production process , when developing tests in biotechnological and breeding work to assess the productivity and stability of agricultural plants.

Application of the obtained results: The results of the experimental studies carried out are of great importance in the development of methods for treating plants with exogenous cytokinins or their analogues in those phases of plant development when they lack the content of their own endogenous phytohormones. Due this conditions they become stress-sensitive or stress-unstable under adverse environmental factors (drought, salinity, flooding, etc.). Cotton leaves have to be treated with a kinetin solution in the flowering phase of plants to preserve the ovaries and obtain high yields.

The obtained data can be recommended for lectures on general courses of plants biochemistry, physiology and biotechnology, special courses on photosynthesis, phytohormones, enzymology at the universities biological faculties, as well as for use in various laboratory workshops, development of graduation, master studies and dissertations.