

**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
BOTANİKA İNSTİTUTU**

Əlyazması hüququnda

ULDUZƏ ƏHMƏD QIZI QURBANOVA

**BUĞDA VƏ AMARANT YARPAQLARINDA NAD-
MALATDEHİDROGENAZANIN MÜQAYISƏLİ TƏDQIQI**

2406.02 – Biokimya

*Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi
dərəcəsi almaq üçün təqdim edilən dissertasiyanın*

AVTOREFERATI

Bakı – 2015

Dissertasiya işi Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Botanika İnstitutunun Bioloji məhsuldarlığın fundamental problemləri şöbəsinin Karbonun fotosintetik assimilyasiyasının enzimologiyası laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbər:

Biologiya üzrə elmlər doktoru,
AMEA-nın müxbir üzvü
N.M.Quliyev

Rəsmi opponentlər:

Biologiya üzrə elmlər doktoru,
professor **Z.M. Məmmədov**

Biologiya üzrə elmlər doktoru,
professor **Ə.Ə. Nəbiyev**

Aparıcı təşkilat:

**Azərbaycan Tibb
Universitetinin
Biokimya kafedrası**

Dissertasiyanın müdafiəsi «25» «sentyabr» 2015-ci il saat 11⁰⁰ - da AMEA Botanika İnstitutunun D.01.061. Dissertasiya Şurasının yığıncağında aşağıda göstərilən ünvanda keçiriləcəkdir.

Ünvan: Bakı şəhəri, AZ1073, Badamdar yolu, 40

Dissertasiya ilə AMEA Botanika İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq olar.

Dissertasiyanın avtoreferatı « 3 » « iyul » 2015-ci il tarixində göndərilmişdir.

**Dissertasiya Şurasının elmi katibi,
biologiya üzrə elmlər doktoru,
professor**

S.C. İBADULLAYEVA

İŞİN ÜMUMİ XARAKTERİSTİKASI

Mövzunun aktuallığı. Müasir dövrdə ətraf mühitin mühafizəsi, təbii sərvətlərdən səmərəli istifadə olunması, antropogen amillərin hava-torpaq-bitki örtüyünə zərərli təsiri nəticəsində ekoloji tarazlığın pozulmasının qarşısının alınması ən aktual problemlərdən biridir (Ndayishimiye et al., 2012). Temperaturun və duzluluğun artması, su çatışmazlığı və torpaq quraqlığının yaranması nəticəsində mədəni bitkilərin məhsuldarlığı normal su təminatı olan bitkilərlə müqayisədə 30-35% azalır (Boyer, 1982; Bray et al., 2000; Hoerling, Kumar, 2003; Rosegrant, Cline, 2003; Peters et al., 2004). Planetimizdə yaxınlaşan bu təhlükəni hiss edən səlahiyyətli təşkilatlar bunun qarşısını almaq üçün xarici mühitin əlverişsiz şəraitində yaşamaq və inkişaf etmək imkanlarına malik olan yüksək məhsuldar mədəni bitki sortlarının seleksiyasını vacib şərtlərdən biri hesab edirlər (Dyson, 1999; Mifflin, 2000). Birləşmiş Millətlər Təşkilatının Ərzaq və Kənd Təsərrüfatı Təşkilatının (FAO) proqnozuna görə, dünya əhalisini ərzaq məhsulları ilə təmin etmək üçün ərzaq istehsalını 2030-cu ilə qədər 40%, 2050-ci ilə qədər isə 70% artırmaq lazımdır. Hesablamalara görə, 2050-ci ilə qədər buğdaya olan tələbat təxminən 60% artacaq. Lakin abiotik və biotik stres amilləri buğda bitkisinin istehsalını təxminən 30% azalda bilər (Manickavelu et al., 2012). Buna görə də müasir tədqiqatlar ətraf mühitin əlverişsiz amillərinə qarşı davamlı sortların təkmilləşdirilməsinə istiqamətləndirilməlidir. Bu problemin müvəffəqiyyətli həlli üçün prosesdə iştirak edən fizioloji və biokimyəvi sistemlərin funksional rollarının və stressə cavab olaraq müdafiə və adaptasiya reaksiyalarının mexanizmlərinin tədqiq olunması vacib şərtlərdən biridir.

Bu baxımdan, bitki metabolizmində mühüm rol oynayan NAD-malatdehidrogenaza (NAD-MDH, L-malat: NAD⁺ oksidoreduktaza, EC 1.1.1.37) fermentinin öyrənilməsi xüsusi maraq kəsb edir. NAD-MDH fermenti mühüm aralıq metabolit olan malatın oksalasetata və əksinə çevrilməsi reaksiyalarını kataliz edir. Malat osmotik təzyiqin tənzimlənməsi vasitəsilə ağzıqların hərəkəti, hüceyrə pH-na nəzarət, redoks homeostaz və hüceyrə kompartimentləri arasında reduksiya olunmuş ekvivalentlərin nəqli və mübadiləsi kimi bir çox fizioloji proseslərdə iştirak edir (Lance, Rustin, 1984; Fahnenstich, 2007; 2008).

Canlı orqanizmlərin mühitin dəyişən şəraitinə cavab reaksiyası hüceyrənin konstruktiv və energetik mübadiləsində mühüm rol oynayan malatdehidrogenaza (MDH) sistemi fermentlərinin yeni izoformalarının əmələ gəlməsi ilə əlaqədar ola bilər (Сатар и др., 2010; Епринцев и др., 1996).

Bu baxımdan, stres amillərinin təsirinə qarşı həssas funksional sistemlərdən biri kimi fotosintezin ferment sistemlərinin öyrənilməsi böyük elmi və praktik əhəmiyyət kəsb edir.

Tədqiqatın məqsədi və vəzifələri. Təqdim olunan dissertasiya işində əsas məqsəd fotosintezin C_3 yoluna aid olan quraqlığa davamlılığına görə fərqlənən iki bərk (*Triticum durum* desf.) buğda və C_4 bitki amarant (*Amaranthus cruentus* L.) yarpaqlarında normal suvarılma və quraqlıq stresinin təsiri zamanı NAD-MDH fermentinin öyrənilməsindən ibarətdir.

Qarşıya qoyulan məqsədə nail olmaq üçün aşağıdakı tədqiqatların yerinə yetirilməsi planlaşdırılmışdır:

- Buğda genotiplərində və amarant yarpaqlarında NAD-MDH-in aktivliyinin təyini üçün optimal mühitin tapılması;
- Buğda genotiplərindən və amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici toxumaların və onların subhüceyrə fraksiyalarının ayrılması;
- Buğda genotiplərində və amarant yarpaqlarının müxtəlif subhüceyrə fraksiyalarında kontrol və quraqlıq şəraitində NAD-MDH-in bəzi fiziki-kimyəvi xassələrinin və kinetik parametrlərinin müqayisəli tədqiqi;
- Buğda genotiplərinin və amarant yarpaqlarının müxtəlif subhüceyrə fraksiyalarında inkişafın aktiv fazalarında kontrol və quraqlıq şəraitində NAD-MDH-in aktivliyinin dəyişmə dinamikasının müqayisəli tədqiqi;
- Buğda genotiplərində və amarant yarpaqlarının müxtəlif subhüceyrə fraksiyalarında inkişafın aktiv fazalarında kontrol və quraqlıq şəraitində nativ poliakrilamid gel-elektroforez üsulu ilə NAD-MDH-in izoferment spektrinin müqayisəli tədqiqi;
- Buğda genotiplərində və amarant yarpaqlarında bəzi aralıq metabolitlərin miqdarı analizinin aparılması;

İşin elmi yeniliyi. İlk dəfə olaraq, tarla şəraitində normal suvarılan və quraqlıq stresinə məruz qalmış buğda (Bərəkətli-95 və Qaraqılçiq-2) və amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici

toxumalarının subhüceyrə fraksiyaları ayrılaraq nativ gel-elektroforez üsulu ilə NAD-MDH-in izoferment spektri, onların aktivliyinin dəyişmə dinamikası tədqiq edilmişdir. NAD-MDH-in yüksək aktivlik göstərməsi üçün optimal reaksiya mühiti tapılmışdır. Müxtəlif subhüceyrə fraksiyalarında lokalizə olunmuş NAD-MDH-in izoformalarının molekul kütlələri, ləngimə faktorları (R_f), kinetik parametrləri və katalitik xüsusiyyətləri ilk dəfə olaraq təyin edilmişdir. NAD-MDH-in subhüceyrə izoformalarının, düzünə və əksinə gedən reaksiyaların substrata uyğunluğu, temperatur və pH optimumları müəyyənləşdirilmişdir.

İşin praktiki əhəmiyyəti. Müxtəlif fotosintez yollarına malik olan bitkilərdə quraqlığın təsirinə qarşı adaptasiya mexanizmlərinin yaranmasında mühüm rola malik olan NAD-MDH fermentinin hüceyrə metabolizmində yerinə yetirdiyi fizioloji funksiyalarının və onun biokimyəvi xassələrinin öyrənilməsindən alınan nəticələr quraqlığa davamlı, məhsuldar yeni bitki sortlarının seleksiyasında və bir çox ekoloji problemlərin həllində istifadə oluna bilər.

İşin aprobasiyası. Dissertasiya işinin əsas nəticələri Minskdə keçirilən Теоретические и Прикладные аспекты Биохимии и Биотехнологии Растений” (2008), Antalyada keçirilən “Mechanisms and Consequences of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications” (2009), Kremeneçuk şəhərində keçirilən “Актуальные проблемы Ботаники и Экологии” (2009) konfranslarında, Moskvada keçirilən “Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования” VIII Beynəlxalq simpoziumunda (2009), Odessada keçirilən gənc alimlərin “Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция” (2009) IV Beynəlxalq konfransında, Bakıda keçirilən “Davamlı inkişaf üçün fotosintez tədqiqatları” Beynəlxalq konfransında (2011, 2013), Ulyanovski şəhərində keçirilən “Интродукция нетрадиционных и редких растений” (2012) konfransında, Moskvada keçirilən “Актуальные проблемы биологической и химической экологии” (2012) Beynəlxalq elmi-praktiki konfransda, Qrodnodada keçirilən “Актуальные проблемы экологии-2012” (2012) VIII Beynəlxalq elmi-praktiki konfransda, Moskvada keçirilən “Davamlı inkişaf üçün fotosintez tədqiqatları” Beynəlxalq konfransında (2014), AMEA Botanika İnstitutunun laboratoriya və şöbələrində, eyni zamanda institutda keçirilən elmi seminarlarda müzakirə olunmuşdur.

İşin nəşri. Dissertasiya işinə aid 11 məqalə və 10 tezis olmaqla, 21 əsər çap edilmişdir.

Dissertasiyanın quruluşu və həcmi. Dissertasiya işi giriş, 4 fəsil, yekun, nəticə və istifadə edilmiş ədəbiyyat siyahısından ibarət olmaqla ümumi həcmi 172 səhifə təşkil edir. İşdə 31 şəkil və 10 cədvəl verilmişdir. Alınan nəticələrin analizi zamanı 302 ədəbiyyat mənbəyinə istinad edilmişdir.

İŞİN MƏZMUNU

Ədəbiyyat icmalında C₃- və C₄-bitkilərin fizioloji-biokimyəvi xüsusiyyətləri, su stresinin bitki orqanizmlərinə təsirinin ekoloji-biokimyəvi xüsusiyyətləri və bitki metabolizmində malat və piruvatın rolu nəzərdən keçirilmişdir. Həmçinin, MDH sistemi fermentlərinin ümumi xarakteristikası, NAD-MDH-in bitkilərdə yayılması, subhüceyrə lokalizasiyası və izoferment tərkibi, fiziki-kimyəvi və kinetik xassələri, fermentin metabolitlər və ionlar səviyyəsində tənzimlənməsi və bitkilərin ətraf mühit şəraitinə adaptasiyasında onun rolu ətraflı işıqlandırılmışdır.

TƏDQIQATIN MATERIAL VƏ METODLARI

Tədqiqat obyekti olaraq, quraqlığa davamlılığına görə fərqlənən bərk buğdanın (*Triticum durum* desf.) Bərəkətli-95(davamlı) və Qaraqılçiq-2 (həssas) genotipləri və C₄-bitkilərin NAD-malik enzim yarımtpinə aid *Amaranthus* cinsinin *Amaranthus cruentus* L. növü götürülmüşdür. Buğda genotipləri Elmi-Tədqiqat Əkinçilik İnstitutunun Abşeron Təcrübə Bazasının əkin sahələrində yetişdirilmişdir. Amarant bitkisi isə süni iqlim kamerasında vegetasiya qablarında torpaqda əkilərək becərilmişdir.

NAD-MDH fermentinin aktivliyi reaksiya mühitinin optiki sıxlığının dəyişməsinə əsasən spektrofotometrik yolla (Ultrospec 3300 pro, Amersham, USA) 340 nm dalğa uzunluğunda 1 dəqiqə ərzində təyin olunmuşdur (Scheibe, Stitt, 1988). Yarpaq nümunələrində pıqmentlərin miqdarının təyini (Sims, Gomon, 2002), amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici toxumaların ayrılması (Quliyev et al., 2003), buğda yarpaqlarından mitoxondrilərin ayrılması (Hong, 2004) mənbələrinə uyğun həyata keçirilmişdir. Amarant yarpaqlarının

assimilyasiyaedici toxumalarından mitoxondrilərin ayrılması bizim tərəfimizdən obyektə uyğun olaraq modifikasiya olunmuş metodla yerinə yetirilmişdir. Ümumi həll olan zülalların miqdarı Sedmak və Grossbergə görə (Sedmak, et al., 1977) təyin olunmuşdur.

NAD-MDH-in izoferment spektri 7,5%-li nativ poliakrilamid gelində (PAAG) elektroforez (Sigma, USA, Mo 63178, Model E-4266) metodu (Davis, 1964), gəldə NAD-MDH-in rənglənməsi spesifik nitrotetrazol göyü metodu ilə (Гааль, 1982) yerinə yetirilmişdir. Malatın və piruvatın miqdarı (Детлаф, 1975), sərbəst prolinin miqdarı (Bates et al., 1973), MDA-nın miqdarı (Heath, Pasker, 1968) metodları ilə təyin olunmuşdur.

Bütün təcrübələr üç bioloji təkrarda aparılmışdır. Alınan nəticələr Microsoft Excel kompüter programının köməyi ilə statistik işlənilmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

1. Buğda və amarant yarpaqlarından NAD-malatdehidrogenazın ayrılması və aktivliyinin təyini üçün optimal mühitin tapılması. Məlumdur ki, fermentlərin aktivliyi homogenizasiya mühitin tərkibindən və müddətindən asılı olaraq dəyişir. Bu məqsədlə hər iki tədqiqat obyektini üçün homogenizasiya mühitinin tərkibi və homogenizasiyanın müddəti müəyyənləşdirilmişdir. Buğda yarpaqlarının homogenizasiya mühitinin tərkibi 100 mM Tris-HCl buferi, pH 8,0, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM etilendiamin tetraasetat turşusu (EDTA), 5 mM ditiotreitol (DTT) və 1 % polivinilpirrolidon (PVP), 0,6% Triton X-100, amarant yarpaqlarının homogenizasiya mühitinin tərkibi isə 100 mM Tris-HCl buferi, pH 7,8, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 5 mM DTT və 0,5% PVP olaraq müəyyən edilmişdir. Amarant yarpaqlarının iki dəqiqə müddətində 30 saniyə fasilə ilə homogenizasiyası zamanı fermentin daha yüksək aktivlik müşahidə olunmuşdur. Nisbətən uzun müddətli homogenizasiya isə əksinə fermentin aktivliyinin azalmasına səbəb olmuşdur.

NAD-MDH-in kataliz etdiyi düzünə və tərsinə reaksiyaların reaksiya mühitlərinin tərkibi və optimal pH-ı müəyyən edilmişdir. Oksalasetatın malata çevrilməsi reaksiyasının reaksiya mühitinin tərkibi 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM oksalasetat, 10 mg/ml öküzün

zərdab albumini (BSA), 10 mM MgCl_2 , 0,15 mM $\text{NAD}^+\cdot\text{H}$ -dan ibarətdir. Reaksiya reaksiya mühitinə 1 mM oksalasetat əlavə edilməsi ilə başlanır. Malatın oksalasetat çevrilməsi reaksiyasının mühiti 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 30 mM malat, 0,2 mM NAD^+ -dan ibarətdir. Reaksiya reaksiya mühitinə 30 mM malatın əlavə edilməsi ilə başlanır.

2. Buğda və amarant yarpaqlarından subhüceyrə fraksiyalarının ayrılması və təmizlənməsi. Buğda genotiplərinin flaq yarpaqlarında NAD-MDH -in subhüceyrə paylanması tədqiq etmək üçün yarpaq mexaniki üsulla dağıdılmış və onun subhüceyrə fraksiyaları ayrılmışdır. Bunun üçün $+4^\circ\text{C}$ temperaturda 20 q kiçik hissələrə kəsilmiş yarpaq materialının üzərinə 80 ml 30 mM [N-morfolin]propan sulfat (MOPS), pH 7,4, 0,2 M saxaroza, 4 mM sistein, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 0,2% BSA, 1% PVP və 10 mM KCl (A buferi) əlavə edilərək mexaniki dezintegratorda 4-5 san müddətində homogenizasiya olunmuşdur. Alınan homogenat filtrasiya olunduqdan sonra çöküntü atılmışdır. Supernatantın $+4^\circ\text{C}$ temperaturda 2 dəqiqə 5000g sürətlə sentrifüqalaşdırılmasından alınan çöküntü xloroplast fraksiyasından ibarətdir. Çöküntünü (xloroplast fraksiya) $+4^\circ\text{C}$ temperaturda A buferində həll etdikdən sonra üzərinə 1 ml 1% Triton X-100 məhlulu əlavə edilmiş və 1 saat sonra NAD-MDH -in aktivliyi ölçülmüşdür.

Mitoxondri fraksiyasını ayırmaq məqsədilə ümumi homogenatdan alınmış supernatant yenidən $+4^\circ\text{C}$ temperaturda 5 dəqiqə 20000g sürətlə sentrifüqalaşdırılmış və çöküntünün yuyulması üçün üzərinə B buferi (20 mM MOPS buferi, pH 7,4, 0,3 M mannitol, 0,2% BSA) əlavə etdikdən sonra yenidən $+4^\circ\text{C}$ temperaturda 5 dəqiqə müddətində 20000g-də sentrifüqalaşdırılmışdır. Alınmış çöküntü mitoxondri və peroksisom fraksiyalarından ibarətdir. Onların üzərinə 2,5-3,5 ml B buferi və 0,6 % Triton X-100 məhlulu əlavə edilmiş və 1 saatdan sonra alınan ekstraktlar üzərində 18, 23, 35% (10 ml) perkol qradienti yaradılmışdır. Hər bir perkol məhluluna 10 mM MOPS buferi, pH 7,4, 0,2 M saxaroza və 0,2% BSA əlavə olunmuşdur. 23 və 35% perkol qradienti olan qatlara 100 mM 1,2-propandiol əlavə olunduqdan sonra 30 dəqiqə 40000g-də sentrifüqalaşdırılmışdır. Alınmış çöküntünün (mitoxondri fraksiyasının) üzərinə 1,5-2 ml bufer A və 0,6%-li Triton X-100 əlavə etdikdən 1 saat sonra NAD-MDH -in aktivliyi təyin edilmişdir (Guillot-Salmon et al., 1997).

Amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici toxumaların ayrılması üçün (Guliyev et al., 2003) yarpaqlar 25 mM, pH 7,8, (4-(2-oksietil)-1-piperazinetsulfat turşusu (HEPES) buferində, 0,3 M saxaroza, 1 mM EDTA, 15-20 mM 2-merkaptetanol tərkibinə malik olan bufer məhlulunda (bufer A) dezintegratorda (MPW-302, Polşa) 4 san 7000 dövr/dəq sürətilə homogenizasiya olunmuşdur. Həll olan fraksiya süzüləndən sonra məsamələrinin diametri 80 µm olan Şotov qığında filtrasiya edilmişdir. Filtratın +4°C temperaturda 15 dəqiqə 300g-də sentrifugalaşdırılmasından alınan həll olan fraksiya mezofil hüceyrənin (MH) sitozol fraksiyasından ibarətdir. Çöküntü (MH-in xloroplast fraksiyası) üzərinə 10 ml saxaroza olmayan A buferi əlavə olunmuş və 15 dəqiqə müddətində 300 g-də sentrifugalaşdırılmışdır. Bu şəraitdə osmotik şokla xloroplastlar membran və stroma fraksiyalarına ayrılmışdır.

Filtirdə qalan çöküntü (mezqa) A buferi ilə bir neçə dəfə yuyulmuş, əvvəlcə 60 san 6000 dövr/dəq, sonra 80 san 8000 dövr/dəq sürəti ilə homogenizasiya olunmuşdur. Alınan ekstraktın məsamələrinin diametri 211 µm olan Şotov qığında filtrasiya olunmasından əmələ gələn filtrat MH və örtük topa hüceyrənin (ÖTH) qarışığından ibarətdir. Çöküntü A buferində suspenziyalasdırıldıqdan sonra əvvəlcə 60 san 6000 dövr/dəq, onun ardınca isə 15 san 8000 dövr/dəq sürəti ilə homogenizasiya olunmuşdur. Alınmış supernatant diametri 211 µm olan Şotov qığında filtrasiya olunmuş və filtrat 20 dəqiqə 10000g-də sentrifugalaşdırılmışdır. Həll olan fraksiya ÖTH-in sitozol, çöküntü isə xloroplast fraksiyadan ibarətdir. Çöküntü saxaroza olmayan A buferində suspenziyalasdırılmış və 20 dəqiqə müddətində 10000g-də çökdürülmüşdür. MH və ÖTH-in xloroplastları 2 saat 0,6% Triton X-100 məhlulunda saxlanıldıqdan sonra NAD-MDH-in aktivliyi təyin edilmişdir.

MH və ÖTH-in mitoxondri fraksiyalarını ayırmaq üçün filtrat 2,5 dəqiqə müddətində 5000g-də sentrifugalaşdırılmışdır. Çöküntü atıldıqdan sonra həll olan fraksiya 2,5 dəqiqə 27000g-də sentrifugalaşdırılmışdır. Çöküntünün üzərinə 0,3 M saxaroza, 1 mM EDTA, 15-20 mM merkaptetanol (2-ME), 25 mM HEPES, pH 7,8 buferi əlavə edilərək 2,5 dəqiqə müddətində 27000g-də təkrar sentrifugalaşdırılmışdır. Alınan çöküntülər MH və ÖTH-in təmiz mitoxondrilərindən ibarətdir. Mitoxondri çöküntüsünün üzərinə yenidən 25 mM HEPES, pH 7,8, 0,3 M saxaroza, 0,2% BSA, 4-5 mM

sistein, 1mM EDTA, və 0,6% Triton X-100 məhlulu əlavə edilmiş və 1 saatdan sonra yenidən çökdürülmüşdür. Həll olan fraksiyada fermentin tədqiqi davam etdirilmişdir.

3. Reaksiya mühitinin pH-nın NAD-MDH-in aktivliyinə təsiri. NAD-MDH hər iki bitkidə geniş pH optimumuna malikdir. Qaraqılçiq-2 genotipinin stresə məruz qalmış yarpaqlarında sitozol fraksiyada optimal pH 8,0-8,5 olduğu halda, normal suvarılmış variantlarda 7,5-8,0-ə bərabərdir. Bərəkətli-95 genotipinin normal suvarılan və quraqlığa məruz qalmış yarpaqlarının sitozol fraksiyasında pH 7,7-8,2 intervalında NAD-MDH daha yüksək aktivlik göstərir. Bərəkətli-95 genotipində normal suvarılan və quraqlığa məruz qalmış yarpaqların xloroplast və mitoxondri fraksiyasında reaksiya mühitinin pH 8,0-8,5, Qaraqılçiq-2 genotipində isə 7,7-8,2 olduqda ferment maksimal aktivlik göstərir.

Amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-larında oksalasetatın malata çevrilməsi reaksiyası sitozol fraksiyasında mühitin pH 7,5-8,5, MH-nin xloroplast fraksiyasında həm normal suvarılan, həm də quraqlıq variantda pH 7,7-8,2, ÖTH-in mitoxondri fraksiyasında pH 8,0-9,0 olduqda ferment maksimal aktivlik göstərir.

Buğda genotiplərində malatın oksalasetata çevrilməsinin reaksiyası sitozol fraksiyasında mühitin pH 8,8-9,5, xloroplast və mitoxondri fraksiyalarında pH 8,5-9,0, Qaraqılçiq-2 genotipinin sitozol fraksiyasında isə pH 9,0-9,7 olduqda ferment maksimal aktivlik göstərir.

Amarant yarpaqlarının MH-in subhüceyrə fraksiyalarında malatın oksalasetata çevrilməsi reaksiyası sitozol fraksiyasında mühitin optimal pH-ı 9,2-9,7 olduğu halda, ÖTH-da pH 9,0-9,5, xloroplast fraksiyada normal suvarılan variantda pH 8,5-8,9, stresə məruz qalmış variantlarda 8,2-8,7, MH və ÖTH mitoxondri fraksiyada isə pH 8,8-9,2 intervalında dəyişir.

4. Temperaturun NAD-MDH aktivliyinə təsiri. Temperatura həssaslıq zülalların vacib xassələrindən biridir. Hüceyrə daxilində ferment sistemlərinin aktivliyinin tənzimində, biokimyəvi çevrilmələrdə, ferment molekulu ilə ferment-substrat kompleksi arasında tarazlığın yaranmasında temperatur mühüm rol oynayır (Cook, Cleland, 2007; Fersht, 1999; Cornish-Bowden, 2012).

Buğda və amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH fermentinin kataliz etdiyi

reaksiyaların sürəti temperaturdan ciddi asılıdır. Normal suvarılan və quraqlıq stresinə məruz qalmış variantlarda bütün subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-in aktivliyi temperaturun 4-40°C arasında tədricən artmış, 40-50°C temperaturda maksimuma çatmış, 60-70°C temperaturda isə aktivlik bütün fraksiyalarda kəskin azalmışdır.

Quraqlığın təsirindən temperatura davamlılığın artmasını fermentin yeni izoformalarının induksiya olunması ilə izah etmək olar. Alınan nəticələr hər iki bitkidə NAD-MDH-in becərilmə şəraitindən asılı olmayaraq yüksək termostabilliyə malik olduğunu göstərir.

5. Düzünə və tərsinə gedən reaksiyalarda NAD-MDH aktivliyinə substratların qatılığından asılılıq sabitinin və reaksiyanın maksimal sürətlərinin təyini. Məlumdur ki, biokimyəvi reaksiyaların sürəti fermentin reaksiyaya daxil olan substratlarının qatılığından birbaşa asılıdır (Cornish-Bowden, 2012). Tədqiqat obyektlərindən ayrılmış subhüceyrə fraksiyaları $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -la çökdürülmüş, gel xromatoqrafiya üsulundan istifadə edərək qismən təmizlənmiş və əldə edilmiş ferment preparatıda kinetik parametrlər tədqiq edilmişdir (Cədvəl 1 və 2).

Cədvəl 1.

Buğda yarpaqlarının subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-in kataliz etdiyi reaksiyaların bəzi kinetik parametrləri.

Genotip	Fraksiya	Variant	Oksalasetat (1-10 mM)		Malat (5-100 mM)		NADH (0,02-1 mM)		MgCl ₂ (1-50 mM)		ATF (0,1-3 mM)	
			K _m	V _{max}	K _m	V _{max}	K _m	V _{max}	K _m	V _{max}	K _m	V _{max}
Barakatlı -95	SP	K	1,23	8,9	17,0	32,3	0,13	5,6	5,1	18,8	0,8	4,16
		Q	2,0	10,5	16,8	37,0	0,13	6,2	6,2	17,4	0,8	4,32
	XP	K	1,53	1,9	6,0	3,2	0,14	4,8	2,8	3,79	0,5	2,03
		Q	1,33	2,53	4,9	4,8	0,16	6,4	2,0	5,61	0,7	2,40
	MX	K	1,56	17,9	7,5	4,2	0,09	31,7	4,9	67,7	0,7	27,5
		Q	1,33	19,9	8,0	6,5	0,1	35,2	3,5	84,4	0,6	35,0
Quraqlıq-2	SP	K	0,9	17,6	18,0	37,7	0,16	5,0	7,5	28,1	0,9	3,17
		Q	1,11	13,9	19,1	35,2	0,15	6,11	8,0	24,2	0,8	3,3
	XP	K	1,25	1,64	7,0	4,5	0,15	6,34	2,8	8,6	0,6	2,7
		Q	1,28	1,54	6,3	4,8	0,15	6,13	2,9	8,5	0,8	2,0
	MX	K	2,1	29,2	6,4	4,8	0,13	44,0	2,8	77,9	0,6	32,3
		Q	1,6	19,0	5,9	5,0	0,12	38,7	3,4	81,3	0,7	32,5

*Qeyd: SP-sitozol fraksiya, XP-xloroplast fraksiya, MX-mitoxondri fraksiya.
(V_{max}-mkmol OA/zülmət dəq; K_m-mM ilə ifadə olunmuşdur).*

Amarantın ÖTH-da $V_{\max}$ OA MH-dakı $V_{\max}$ OA-dan yüksək olmuşdur. K_m qiymətlərinin müqayisəsi göstərir ki, sitoplazmatik NAD-MDH malata oksalasetat ilə müqayisədə az uyğunluq göstərir.

Cədvəl 2.

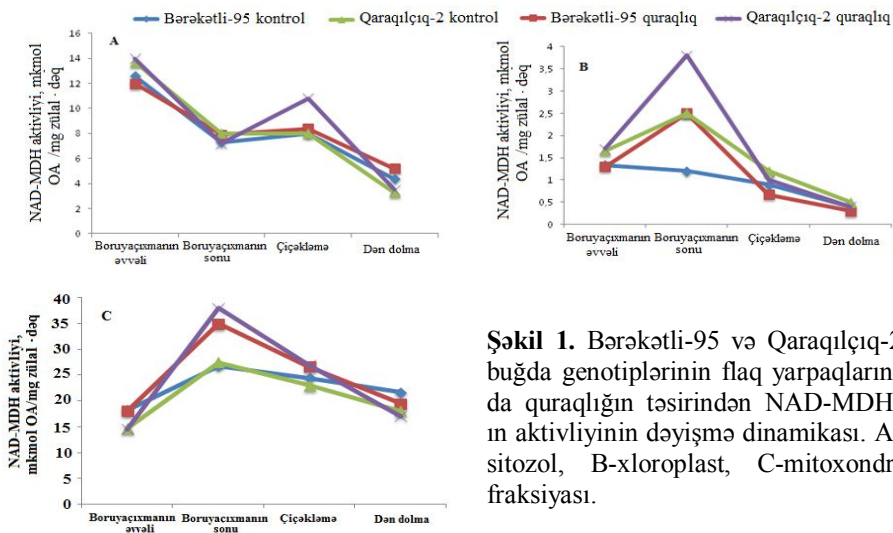
Amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-ın subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-in kataliz etdiyi reaksiyaların bəzi kinetik parametrləri.

Toxuma	Fraksiya	Variant	Oksalasetat (0,1-10 mM)		Malat (5-100 mM)		NADH (0,02-1 mM)		MgCl ₂ (1-50 mM)		ATF (0,1-3 mM)	
			K_m	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$
MH	SP	K	1,5	80,72	17,0	205,0	0,16	80,0	3,9	42,0	1,5	38,0
		Q	1,9	91,03	20,0	219,0	0,16	130,0	4,2	99,0	2,1	98,0
	XP	K	3,2	12,02	9,0	22,0	0,25	71,0	6,5	13,6	3,0	10,5
		Q	2,9	9,53	11,0	19,5	0,20	62,0	6,3	10,6	2,8	9,32
	MX	K	2,5	30,8	12,0	101,0	0,17	140,0	2,8	128,0	1,3	127,1
		Q	3,3	40,01	11,0	185,0	0,2	160,0	4,0	134,0	1,2	131,2
ÖTH	SP	K	1,9	80,76	24,0	230,0	0,15	80,0	4,8	79,1	1,3	75,0
		Q	1,7	100,2	22,5	239,0	0,15	99,0	4,5	99,1	2,3	96,0
	XP	K	1,3	23,03	11,5	35,0	0,30	24,0	4,2	22,8	1,6	21,6
		Q	1,4	23,61	11,8	42,2	0,25	34,0	4,1	20,96	1,4	20,6
	MX	K	1,5	134,2	4,3	123,0	0,18	140,0	4,7	131,2	1,2	127,0
		Q	2,0	141,7	5,2	149,0	0,16	160,0	6,0	137,9	0,9	133,6

Qeyd: MH-mezofil hüceyrə; ÖTH-örtük topa hüceyrə; SP-sitozol fraksiya, XP-xloroplast fraksiya, MX-mitoxondri fraksiya. ($V_{\max}$ -mkmol OA/zülal·dəq; K_m -mM ilə ifadə olunmuşdur).

Mitoxondri NAD-MDH-ı sitozol NAD-MDH ilə müqayisədə NADH-in yüksək qatılığına daha çox həssaslıq göstərir. MH və ÖTH-in mitoxondrilərində fermentin lokalizasiya olunan izoformalarının aktivliyi artmışdır. K_m və $V_{\max}$ qiymətləri bitkinin növündən, mübadilənin tipindən, hüceyrə daxilində yerinə yetirdiyi funksiyasından və böyümə şəraitindən asılı olaraq müxtəlif dəyişir.

6. Buğda və amarant yarpaqlarında NAD-malatdehidrogenazının izoformalarının aktivliyinin, lokalizasiyasının və izoferment spektrinin tədqiqi. Buğdanın yarpaq hüceyrələrinin sitozol fraksiyasında ən yüksək aktivlik boruyaçıxma fazasının əvvəlində qeydə alınmışdır (Şəkil 1).

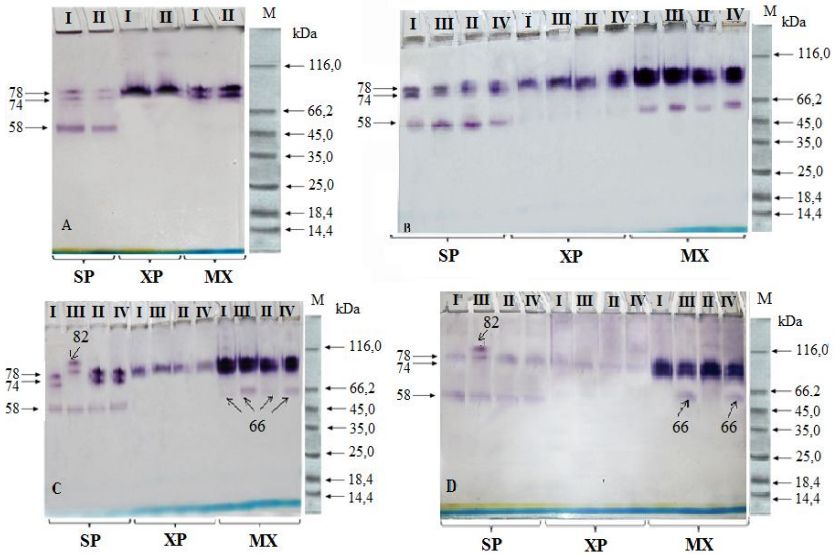


Şəkil 1. Bərəkətli-95 və Qaraqılçiq-2 buğda genotiplərinin flaq yarpaqlarında quraqlığın təsirindən NAD-MDH-in aktivliyinin dəyişmə dinamikası. A-sitozol, B-xloroplast, C-mitoxondri fraksiyası.

Boruyaxıxma fazasının sonunda kəskin azalma müşahidə olunsada, çiçəkləmə fazasında aktivlik yenidən pik həddə çatmışdır. Bu fazada ən yüksək aktivlik Qaraqılçiq-2 genotipinin quraqlıq variantında müşahidə olunmuşdur. Boruyaxıxma fazasının sonunda Qaraqılçiq-2 genotipinin mitoxondri fraksiyasında quraqlıq stresinə məruz qalmış variantlarda digərləri ilə müqayisədə ən yüksək aktivlik müşahidə edilmişdir. Bərəkətli-95 genotipində vegetasiyanın sonlarına doğru aktivliyin Qaraqılçiq-2 genotipinə nisbətən yüksək olmasını onun quraqlığa davamlı olması ilə izah etmək olar.

Nativ gel-elektroforez metodundan istifadə edərək buğda genotiplərinin yarpaqlarında NAD-MDH-in izoferment spektri analiz edilmişdir (Şəkil 2). Boruyaxıxma fazasının əvvəlində sitozol fraksiyasında NAD-MDH-in 58, 74, 78 kDa, xloroplast fraksiyasında yalnız 78 kDa, mitoxondri fraksiyasında isə 74 və 78 kDa molekul kütləyə malik izoformalar aşkar olunmuşdur.

Çiçəkləmə fazasında Bərəkətli-95 genotipində quraqlığın təsirindən sitozol fraksiyada NAD-MDH-in 82 kDa molekul kütləli yeni izoforması əmələ gəlmiş, Qaraqılçiq-2 genotipində isə bu izoforma müşahidə olunmamışdır. Quraqlığın təsirindən hər iki genotipin mitoxondri fraksiyasında 66 kDa molekul kütləli induktiv izoforma nəzərə çarpmışdır.

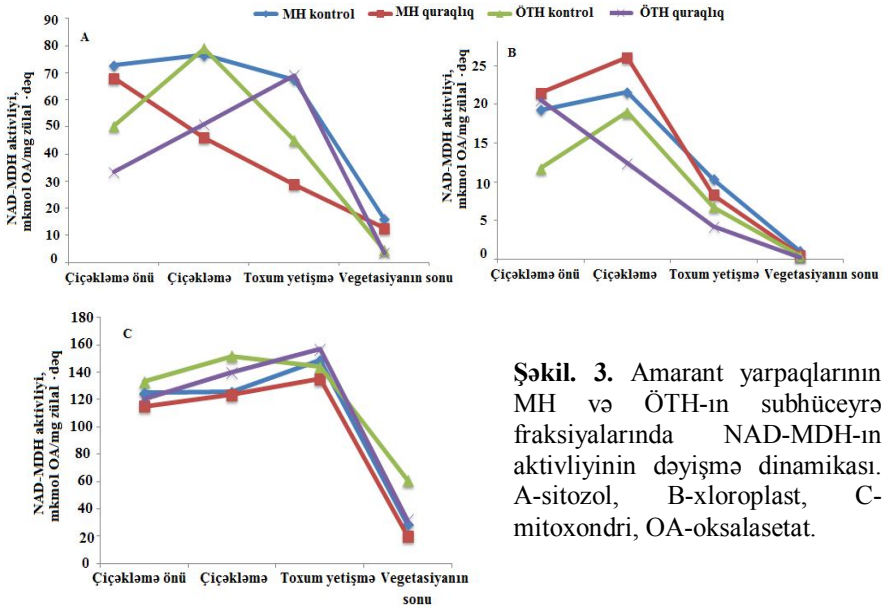


Şəkil 2. Bərəkətli-95 və Qaraqılçıq-2 genotiplərinin flaq yarpaqlarının subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-in izoformalarının nativ gel-elektroforez üsulu ilə təyini. A-Boruyacıxmanın əvvəli; B-Boruyacıxmanın sonu; C-Çiçəkləmə; D-Dən dolma. I-Bərəkətli-95 kontrol; II-Qaraqılçıq-2 kontrol; III-Bərəkətli-95 quraqlıq; IV-Qaraqılçıq-2 quraqlıq. SP-sitozol, XP-xloroplast, MX-mitoxondri.

İnkişafın aktiv mərhələlərində amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-in aktivliyinin dəyişmə dinamikası tədqiq edilmişdir (Şəkil 3).

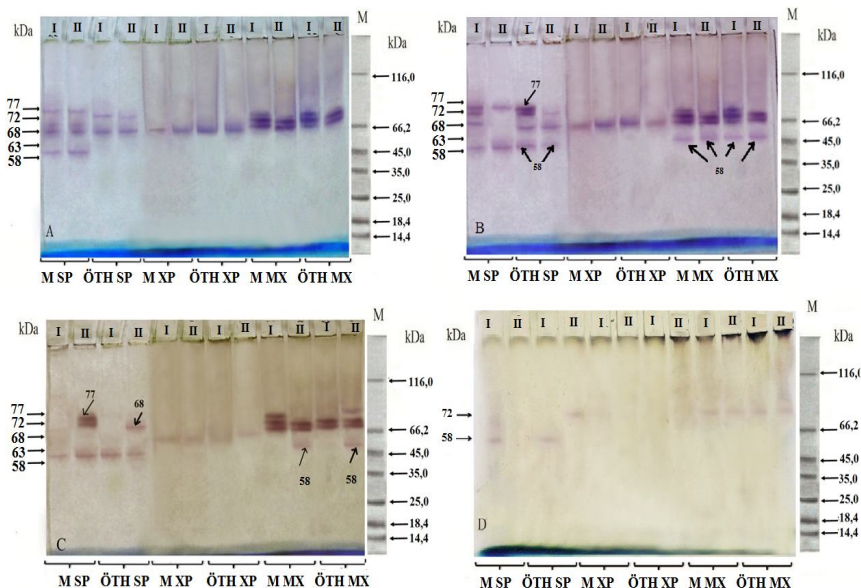
Amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-in sitozol fraksiyalarında kontrolda NAD-MDH-in aktivliyi çiçəkləmə fazasının əvvəlində quraqlığın təsirinə məruz qalmış variantlarla müqayisədə yüksək olmuşdur. Amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarının (MH və ÖTH) xloroplast fraksiyalarında NAD-MDH aktivliyinin dəyişmə dinamikası Şəkil 3B-də verilmişdir. NAD-MDH-in aktivliyinin MH-in xloroplastlarında ümumi aktivliyindən az olmasına baxmayaraq, quraqlıq variantlarda fermentin aktivliyi bütün fazalarda normal suvarılan variantlardan yüksək olmuşdur. Amarant yarpaqlarının hər iki assimilyasiyaedici toxumalarının mitoxondri fraksiyalarında (Şəkil 3C) NAD-MDH fermentinin aktivliyi bütün

tədqiq olunan fazalarda sitozol (Şəkil 3A) və xloroplast (Şəkil 3B) fraksiyalarına nisbətən xeyli yüksək olmuşdur. Ehtimal ki, bu NAD-ME yarım tip C₄-bitkilərdə çoxlu miqdarda mitoxondrilərin olması ilə əlaqədardır.



Şəkil. 3. Amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-in subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-in aktivliyinin dəyişmə dinamikası. A-sitozol, B-xloroplast, C-mitoxondri, OA-oksalsasetat.

Amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici toxumaların subhüceyrə fraksiyaları ayrılaraq nativ gel-elektroforez metodu ilə izoferment spektri tədqiq edilmişdir (Şəkil 4). Çiçəkləmə fazasında yarpağın subhüceyrə fraksiyalarında fermentin molekulyar kütlələri 58, 63, 68, 72 və 77 kDa olan 5 izoformasının olduğu müşahidə edilmişdir. Bu izoformalar subhüceyrə fraksiyaları üzrə: kontrolda 58, 63, 68 və 77 kDa molekulyar kütləli izoformalar MH-in sitozolunda, 72 və 63 kDa molekulyar kütləli izoformalar ÖTH-in sitozolunda, 63 kDa-luq izoforma MH və ÖTH-in xloroplastında, 63, 68 və 77 kDa molekulyar kütləli izoformalar isə MH və ÖTH-in mitoxondri fraksiyalarında lokalizasiya olunmuşdur. Quraqlıq variantında isə molekulyar kütlələri 58 və 77 kDa olan 2 izoforma ilə yanaşı, 72 kDa molekulyar kütləli induktiv izoforma da əmələ gəlmişdir.



Şəkil 4. Amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-in subhücrə fraksiyalarında NAD-MDH-in izoformalarının nativ gel-elektroforez üsulu ilə təyini. A-Çiçəkləmənin əvvəli, B-Çiçəkləmə, C-Toxum yetişmə, D-Vegetasiyanın sonu. M-mezofil hücrə, ÖTH-örtük topa hücrə. SP-sitozol, XP-xloroplast, MX-mitoxondri; I-kontrol, II-quraqlıq.

Amarant yarpaqlarında mitoxondri NAD-MDH-ı oksalasetatın malata çevrilməsi reaksiyasını kataliz edir. Güman etmək olar ki, onun aktivliyinin azalması ÖTH-larda CO₂-nin mənbəyi rolunu oynayan malatın miqdarının azalmasına səbəb ola bilər.

NƏTİCƏLƏR

1. Buğda və amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarını və onların subhücrə fraksiyaları - sitozol, xloroplast və mitoxondriləri ayırmaq üçün modifikasiya olunmuş metod işlənilib hazırlanmış və bu fraksiyalarda NAD-MDH-in yüksək aktivlik göstərməsi üçün optimal şərait tapılmışdır.
2. Buğda genotiplərinin və amarantın yarpaqlarında NAD-MDH fermenti bütün fraksiyalarda geniş pH optimumuna malikdir. Malatın

oksidləşmə reaksiyasının pH optimumunun qələviliyə doğru dəyişməsinin NAD-MDH-in tənzimləyici funksiyası ilə bağlı olduğu güman edilir.

3. Buğda genotiplərinin yarpaqlarının bütün subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH fermenti 45-50°C, amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında isə 50-55°C temperaturda optimal aktivliyə malikdir.
4. Müəyyən edilmişdir ki, kinetik xassələrinə görə buğda genotiplərinin sitozol, amarantın isə mezofil və örtük topa hüceyrənin sitozol və mitoxondri fraksiyalarında olan NAD-MDH izoformaları oksalasetatın malata çevrilməsi reaksiyasını həyata keçirir. Buğda genotiplərində xloroplast və mitoxondri, amarantın mezofil hüceyrənin xloroplast və mitoxondri, eləcə də örtük topa hüceyrənin xloroplast fraksiyasında lokalizasiya olunan izoformalar isə malatın oksalasetata çevrilməsi reaksiyasını kataliz edir.
5. Buğda və amarantın subhüceyrə fraksiyalarında lokalizasiya olunan NAD-MDH izoformalarının sayı və intensivlikləri ilə onların ümumi aktivlikləri arasında müsbət korrelyasiya aşkar olunmuşdur. Lakin, buğda və amarantın subhüceyrə fraksiyalarından ayrılmış NAD-MDH-in kinetik parametrləri bir-birindən fərqlənilir.
6. NAD-MDH-in izoformalarının sayı bitki yarpaqlarının inkişaf mərhələlərindən, toxuma tipindən və subhüceyrə fraksiyalarından asılı olaraq müxtəlif cür paylanmışlar. Çiçəkləmə və dən dolma fazalarında quraqlığın təsirindən buğdanın hər iki genotipində yarpaqların mitoxondri fraksiyasında 66 kDa molekul kütləli yeni izoforma induksiya olunmuş və yalnız Bərəkətli-95 genotipinin sitozol fraksiyasında NAD-MDH-in 82 kDa molekul kütləli yeni izoformasını əmələ gəlmişdir. Amarantda isə vegetasiyanın sonuna qədər quraqlığın təsirindən yeni izoformanın induksiyası baş vermir.
7. NAD-ME fermentinin aktivliyi ilə piruvatın miqdarı arasında müsbət, malatın miqdarı arasında isə mənfi korrelyasiya müşahidə olunur.
8. Quraqlıq stresinə məruz qalmış bütün variantlarda vegetasiyanın sonunda lipidlərin oksidləşməsi Qaraqılçiq-2, prolinin miqdarının isə Bərəkətli-95 genotipində daha kəskin artır. Alınmış nəticələr Qaraqılçiq-2 genotipinin Bərəkətli-95 genotipinə nisbətən quraqlığa qarşı daha həssas olduğunu göstərir.

Dissertasiya mövzusu üzrə çap olunmuş elmi əsərlərin siyahısı

1. Мехвалыева У.А., Гулиев Н.М., Бабаев Г.Г., Байрамов Ш.М., Халыгзаде М.Н. Некоторые эколого-физиологические особенности и функционирование ферментов метаболизма углерода у двух видов амаранта // Сборник Научных Трудов III Международной Научной Конференции "Теоретические и Прикладные аспекты Биохимии и Биотехнологии Растений". Минск, 2008, с. 455-458.
2. Мехвалыева У.А., Бабаев Г.Г., Байрамов Ш.М., Халыгзаде М.Н., Гулиев Н.М. Влияние засухи на активность, содержания белка и изоформ малатдегидрогеназы листьев пшеницы в онтогенезе // Материалы Международной Конференции Молодых ученых «Актуальные проблемы Ботаники и Экологии», Украина, г. Каменец-Подольская, 2008, с. 235-236.
3. Мехвалыева У.А., Бабаев Г.Г., Байрамов Ш.М., Новрузов Е.А., Алиева Д.Р., Халыгзаде М.Н., Гулиев Н.М. НАД-малатдегидрогеназа, очищенная из митохондрий листьев пшеницы, в условиях почвенной засухи // Научные Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, Том XXIX, 2009, с. 560-569.
4. Mehvaliyeva U. Effect of water stress on protein content of some Calvin cycle enzymes in different wheat genotypes // "Mechanisms and Consequences of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications", Antalya, 2009, p. 46.
5. Мехвалыева У.А., Бабаев Г.Г. Исследование активности НАД-малатдегидрогеназы листьев пшеницы под действием водного стресса // Материалы Международной Конференции Молодых ученых «Актуальные проблемы Ботаники и Экологии», Украина, г. Кременец, 2009, с. 194-195.
6. Бабаев Г.Г., Мехвалыева У.А. Выделения ассимиляционных тканей и их субклеточных фракций листьев амаранта // Материалы VIII Международного Симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», Москва, 2009, Том III, с. 23-26.
7. Mehvaliyeva U.A., Babayev H.G., Khaligzade M.N., Guliyev N.M. Effect of light intensity on C₄-enzymes of *Amaranthus cruentus* L. plants // Материалы IV Международная Конференция Молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция», Одесса, 2009, с. 46.

8. Мехвалиева, У.А., Бабаев Г.Г. Адаптивный роль некоторых ферментов малатдегидрогеназного комплекса ассимиляционных тканей листьев амаранта в условиях солевого стресса // Аграрная Наука Азербайджана, 2009, № 5 (215), с. 39-41.
9. Мехвалиева У.А., Бабаев Г.Г., Алиева М.Н., Гулиев Н.М. Активность ключевых ферментов фотосинтеза у C_3 - и C_4 -растений в условиях водного стресса // Известия НАН Азербайджана (биологические науки), 2011, Том 66, № 3, с. 91-96.
10. Мехвалиева У.А., Бабаев Г.Г. Влияние продолжительной почвенной засухи на активность и изоформ НАД-зависимой малатдегидрогеназы листьев *Amaranthus cruentus* L. в онтогенезе // Сборник Материалов Международной Научно-практической Конференции «Актуальные проблемы биологической и химической экологии», МГОУ, Москва, 2012, с. 78-79.
11. Бабаев Г.Г., Мехвалиева У.А., Халилова Х.Дж., Алиева М.Н., Гулиев Н.М. Активность НАД-малатдегидрогеназы в митохондриях, выделенных из ассимиляционных тканей листьев амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) // Материалы X Международной Научно-методической Конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений», Ульяновск-2012, Том 1, с. 144-152.
12. Мехвалиева У.А., Бабаев Г.Г., Байрамов Ш.М., Алиева Д.Р., Гулиев Н.М. Влияние продолжительной почвенной засухи на активность ферментов, участвующие в метаболизме CO_2 в фотосинтезирующих органах C_4 -растения амаранта (*Amaranthus cruentus* L.) // Материалы VIII Международную Научно-практическую Конференцию «Актуальные проблемы экологии-2012», Белоруссия, Польша, Гродно, 2012, Том 1, с. 170-171.
13. Бабаев Г.Г., Байрамов Ш.М., Мехвалиева У.А., Гулиев Н.М., Гусейнова И.М., Алиев Д.А. Активность ферментов C_4 -фотосинтеза у различных генотипов пшеницы в условиях продолжительной почвенной засухи // Известия НАН Азербайджана (биологические и медицинские науки), 2012, Том 67, № 3, с.14-23.
14. Babayev H.G., Bayramov Sh.M., Mehvaliyeva U.A., Aliyeva M.N., Guliyev N.M., Huseynova I.M., Aliyev J.A. Activities of C_4 -photosynthetic enzymes in different wheat genotypes under continuous soil drought conditions // Journal of Biochemistry Research, 2013, Vol. 1 (1), p. 7-16.

15. Guliyev N.M., Mehvaliyeva U.A., Babayev H.G., Bayramov Sh.M., Aliyeva M.N., Feyziyev Y. Localization, physical, chemical and kinetic properties of NADP-Malate dehydrogenase izoforms in wheat leaves under drought // Abstracts of International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability: *in honor of Jalal Aliyev*", Baku, Azerbaijan, 2013, p. 101.
16. Babayev H.G., Mehvaliyeva U.A., Aliyeva M.N., Khasumova F.I., Feyziyev Y. Guliyev N.M., Localization, some physical-chemical and kinetic characteristics of NADP-Malate dehydrogenase in amaranth leaves under drought // Abstracts of International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability: *in honor of Jalal Aliyev*", Baku, Azerbaijan, 2013, p. 99.
17. Bayramov Ş.M., Babayev H.Q., Mehvaliyeva U.A., Əliyeva M.N., Quliyev N.M. Işığın intensivliyinin, temperaturun və quraqlığın buğda yarpaqları malatdehidrogenazasının aktivliklərinin tənzimində rolu // Azərbaycan MEA Botanika İnstitutunun Elmi Əsərləri, Bakı, 2013, Cild XXXIII, s. 164-171.
18. Бабаев Г.Г., Мехвалиева У.А., Алиева М.Н. Влияние засухи на параметры газового обмена, количества интермедиатов и малик энзимов в листьях C₄-растения амаранта // Материалы III Международной Научной Конференции Студентов, Аспирантов и Молодых ученых "Фундаментальные и прикладные достижения в биологии", Донецьк, Украина, 2014, с. 73.
19. Quliyev N.M., Babayev H.Q., Mehvaliyeva U.Ə., Əliyeva M.N., Feyziyev Y. Quraqlığın amarant yarpaqlarında qaz mübadiləsi parametrlərinə və dekarboksilləşdirici malatdehidrogenazalara təsiri // AMEA-nın Məruzələri, Bakı, Elm, 2014, Cild LXX, № 1, s. 46-50.
20. Gurbanova U., Babayev H., Aliyeva M., Feyziyev Y., Guliyev N. Effects of drought on mitochondrial NAD-malatedehydrogenase in *Amaranthus cruentus* L. during ontogenesis // Abstracts and Programme of International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability: *in honor of Vladimir Shuvalov*", Moscow, Russia, 2014, p. 109.
21. Babayev H., Mehvaliyeva U., Aliyeva M., Feyziyev Y. and Guliyev N. The study of NAD-malik enzyme in *Amaranthus cruentus* L. under drought // Plant Physiology and Biochemistry, 2014, Vol. 81, p. 84-90.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НАД-МАДАТДЕГИДРО-
ГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ И АМАРАНТА**

РЕЗЮМЕ

Физиологические функции и биохимические свойства НАД-МДГ, играющие важную роль в создании адаптивных механизмов против водного стресса у высших растений, которые обладают различными механизмами фотосинтеза, были исследованы в представленной диссертации.

Впервые, изучали изоферментный спектр НАД-МДГ с использованием нативного гель-электрофореза, в изолированных субклеточных фракциях ассимиляционных тканей листьев C_3 -растения пшеницы (генотипы Баракатли-95 и Гарагылчыг-2) и C_4 - растения *A. cruentus* L., выращенных в полевых условиях при нормальном водообеспечении и в условиях засухи. Оптимальные условия были подобраны для гомогенизации и максимальной активности НАД-МДГ в различных субклеточных фракциях.

Было установлено, что активность НАД-МДГ заметно выше в митохондриальных фракциях по сравнению с цитозольными и хлоропластными фракциями мезофильных и обкладочных клеток флаговых листьев пшеницы, а также в листьях *A. cruentus* L. при всех этапах онтогенеза. Как в пшенице, так и в амаранте, изоформы НАД-МДГ, локализованные в цитозоле, катализируют реакцию превращения оксалоацетата в малат, в то время как изоформы, локализованные в хлоропластах, более активно катализируют превращение малата в оксалоацетат. Было обнаружено, что митохондриальная изоформа фермента более активно катализирует превращение малата в оксалоацетат в мезофильных клетках и превращение оксалоацетата в малат в клетках обкладки. Широкий спектр изоферментной специфичности НАД-МДГ был выявлен с помощью нативного электрофореза в ПААГ (7,5%). Изоформы НАД-MDH распределяются по-разному в листьях растений в зависимости от стадии развития, типа ткани и субклеточных фракций.

В каждой субклеточной фракции были определены молекулярные массы и R_f изоформ фермента. При водном стрессе, в фазе

цветения и созревания зерна новая изоформа с молекулярной массой 82 кДа образуется в цитозольной фракции засухоустойчивого генотипа Баракатли-95 в отличие от чувствительного к засухе генотипа Гарагылчыг-2. Новая изоформа с молекулярной массой 66 кДа индуцируется только в митохондриальных фракциях обоих изоформ при засухе. У растения *A. cruentus* L., не наблюдается индукция новой изоформы под действием засухи до конца вегетации. Обнаружена корреляция между количеством и интенсивностью изоформ НАД-МДГ, локализованных в субклеточных фракциях амаранта и пшеницы.

Некоторые физико-химические параметры и каталитические свойства изоформ НАД-МДГ, значения K_m для субстратов фермента (малат и оксалоацетат) и V_{max} прямой и обратной реакции были определены в каждой субклеточной фракции. Было изучено влияние концентрации НАДН, температуры и pH реакционной среды на активность фермента. Оптимальные значения pH реакции превращения оксалоацетата в малат в хлоропластных и митохондриальных фракциях пшеницы и амаранта были сходны, соответственно для обоих вариантов. Однако они отличались в цитозольной фракции. В хлоропластных и митохондриальных фракциях генотипов пшеницы и в митохондриальной фракции амаранта оптимальные значения pH реакции превращения малата в оксалоацетат, катализируемая посредством НАД-МДГ подобны в обоих вариантах, тогда как в цитозольной фракции генотипов пшеницы и в цитозольных и хлоропластных фракциях обоих фотосинтетических тканей амаранта они отличались. Оптимальная температура НАД-МДГ во всех субклеточных фракциях генотипов пшеницы и в субклеточных фракциях обоих ассимиляционных тканей амаранта составляла 45-50°C и 50-55°C, соответственно.

Полученные результаты показывают, что изученный фермент имеет сложный изоферментный спектр и играет важную роль в различных метаболических процессах, в том числе в процессах адаптации у высших растений, в распределении углерода и энергии.

**COMPARATIVE STUDY OF NAD-MALATE
DEHYDROGENASE IN WHEAT AND AMARANTH LEAVES**

SUMMARY

Physiological functions and biochemical properties of NAD-MDH playing an important role in the creation of adaptive mechanisms against water stress in higher plants having different photosynthetic mechanisms have been investigated in the presented dissertation.

For the first time, using native gel-electrophoresis, the NAD-MDH isoenzyme spectrum was studied in isolated subcellular fractions of assimilating leaf tissues from a C₃ plant wheat (genotypes Barakatli-95 and Garagilchig-2) and a C₄ plant *A. cruentus* L. grown in the field under normal water supply and drought conditions. Optimum conditions were found for homogenization and maximum activity of NAD-MDH in different subcellular fractions.

It was established that NAD-MDH activity was markedly higher in mitochondrial fractions compared with cytosolic and chloroplast fractions of mesophyll (M) and bundle sheath cells (BSC) in flag leaves of wheat genotypes as well as in *A. cruentus* L. leaves during all phases of ontogenesis. In both wheat and amaranth, NAD-MDH isoforms localized in cytosol catalyzed oxaloacetic acid conversion into malate while the isoforms localized in chloroplasts catalyzed more actively the conversion of malate into oxaloacetic acid. The mitochondrial isoform of the enzyme was detected to catalyze more actively the conversion of malate into oxaloacetic acid in M cells and the conversion of oxaloacetic acid into malate in BSC. Wide specificity of NAD-MDH isoenzymes was revealed by native gel electrophoresis in 7.5 % PAAG. NAD-MDH isoforms were found to be distributed differently in plant leaves depending on the development stage, tissue type and subcellular fractions. Molecular mass and R_f of NAD-MDH isoforms were determined for each subcellular fraction. In anthesis and grain ripening phases, in the cytosolic fraction of the drought tolerant Barakatli-95 genotype a new 82kD isoform was formed under water stress, contrary to the drought sensitive Garagilchig-2 genotype. A new 66 kD isoform was induced

only in the mitochondrial fractions of both isoforms under drought. In *A. cruentus* L. a new isoform was not induced under drought till the end of the vegetation. A correlation was observed between amounts and intensities of NAD-MDH isoforms localized in subcellular fractions of Amaranth and wheat.

Some physicochemical parameters and catalytic properties of NAD-MDH isoforms, values of K_m for NAD-MDH substrates (malate and oxaloacetate) and V_{max} of direct and reverse reactions were determined in each subcellular fraction. Effects of NADH concentration, temperature and pH of the reaction medium on NAD-MDH activity were studied.

pH optimums of the conversion reaction of oxaloacetic acid into malate were similar in the chloroplast and mitochondrial fractions of wheat and amaranth for both variants, respectively, but they differ in the cytosolic fraction. In the chloroplast and mitochondrial fractions of wheat genotypes and the mitochondrial fraction of Amaranth, pH optimums of the conversion reaction of malate into oxaloacetic acid, catalyzed by NAD-MDH, were similar in both variants, whereas in cytosol of wheat genotypes and in the cytosolic and chloroplast fractions of both photosynthetic tissues of Amaranth they differed. Optimum temperature of NAD-MDH in all subcellular fractions of the wheat genotypes and in subcellular fractions of both assimilating tissues of Amaranth was in the range 45-50°C and 50-55°C, respectively.

The obtained results show that the studied enzyme has a complex isoenzyme spectrum and play an important role in various metabolic processes, including adaptive processes in higher plants, in distribution of carbon and energy.

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

На правах рукописи

Улдуза Ахмед гызы Гурбанова

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НАД-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ И АМАРАНТА**

2406.02 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискание ученой степени доктора
философии по биологии*

Баку – 2015