

Chenopodiaceae Və Poaceae Fəsilələrinin Bəzi Növlərində C₄-sikli Fermentlərinin Aktivliyinin Və Kinetik Parametrlərinin Tədqiqi

T.Y. Orucova*, U.A. Qurbanova, Ü.C. Mustafayeva, Ş.M. Bayramov

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Mətbuat prospekti 2A, Bakı AZ1073, Azərbaycan;

*E-mail: orujova.taliya@mail.ru

C₄-fotosintezin müxtəlif yarımtiplərinə aid olan *Salsola dendroides*, *Suaeda altissima*, *Neoa mucranata* (*Chenopodiaceae*) və *Sorghum bicolor* (*Poaceae*) növlərində fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEPC), alaninaminotransferaza (AIAT), aspartataminotransferaza (AsAT) fermentlərinin aktivliyi və kinetik parametrləri substratın qatılığından və temperaturdan asılı olaraq öyrənilmişdir. NADP-ME yarımtipinə aid olan *S. bicolor* və *N. mucranata* növlərində C₄-siklinin ilkin fermenti olan fosfoenolpiruvat karboksilazanın aktivliyi NAD-ME yarımtipinə aid olan *S. dendroides* və *S. altissima* növləri ilə müqayisədə daha yüksək olmuşdur. Göstərilmişdir ki, alaninaminotransferaza və aspartataminotransferaza üçün reaksiyanın maksimal sürəti (V_{max}) *S. dendroides* və *S. altissima* növlərində daha yüksəkdir. Təd-qiğ olunan növlərdə temperaturun 5°C-dən 15°C-yə qədər yüksəlməsi fosfoenolpiruvat karboksilaza fermentinin aktivliyinin 3-4 dəfəyə qədər artmasına səbəb olmuşdur. Müəyyən edilmişdir ki, fosfoenolpiruvat karboksilaza fermentinin maksimal aktivliyi 35-45°C intervalında dəyişir.

Açar sözlər: *Chenopodiaceae*, *Poaceae*, fosfoenolpiruvat karboksilaza, alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza

GİRİŞ

Ali bitkilərin 19 fəsiləsində fotosintezin C₄ yolu müşahidə olunur. C₄ fotosintezi həyata keçirən bitki növləri Azərbaycanın quraqlıq və yarımquraq ərazilərində yayılmış *Chenopodiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Portulacaceae*, *Zygophyllaceae* və *Polygonaceae* fəsilələrinin nümayəndələri arasında rast gəlinir. Həmçinin *Poaceae* (təxminən 4600 növ, ümumi miqdarın 61%), *Cyperaceae* (1330 növ, ümumi miqdarın 18%-i) və *Chenopodiaceae* (təxminən 550 növ, ümumi miqdarın 7%) fəsilələrinin əksər nümayəndələri fotosintezin C₄ yolunu həyata keçirirlər (Sage et al. 1999; Pyankov et al 2001). C₄ bitkilərin əksəriyyəti üçün karbonun fiksasiyasının karboksilləşmə və dekarboksilləşmə reaksiyalarının həyata keçirilməsində iki hüceyrə tipi-mezofil hüceyrələr (MH) və örtük topa hüceyrələri (ÖTH) iştirak edirlər (Offermann et al., 2015).

C₄-fotosintez dekarboksilləşdirici fermentlərin: NADP-dən asılı malik enzim (NADP-ME), NAD-dan asılı malik enzim (NAD-ME) və fosfoenolpiruvatkarboksikinazanın (PEP-KK) iştirakından asılı olaraq, üç yarımtipə bölünür: NADP-ME, NAD-ME və PEPCK (Fahnenstich et al., 2008; W. Yu et al., 2014). NADP-ME yarımtipinə aid olan bitkilər təbiətdə daha geniş yayılmışdır və fotosintetik toxumalar arasında mübadilənin əsas metabolitləri malat

və piruvatdır. NAD-ME yarımtipinə aid bitkilərdə isə aspartat və alanindir. PEPCK yarımtipinə aid olan bitkilərdə isə mübadilənin əsas metaboliti aspartatdır. PEPCK yarımtipinə aid olan bitkilərə təbiətdə az təsadüf olunur. Son dövrlərdə belə güman edilir ki, C₄ növlər arasında qarışıq yarımtiplər də mövcuddur və C₄ fotosintezin PEPCK yarımtipi ya NADP-ME və ya NAD-ME yarımtipi ilə birlikdə fəaliyyət göstərir (Furbank, 2011).

Karbonun fiksasiyasının ilkin karboksilləşmə reaksiyası MH-də baş verir və bütün C₄ bitkilərdə bu reaksiyanı həyata keçirən fosfoenolpiruvat karboksilaza (PEPC, EC 4.1.1.3) fermentidir (Sage, 2004; Sommer et al., 2012). PEPC ilkin karboksilaza kimi fəaliyyət göstərərək, CO₂ qazını fosfoenolpiruvatla (PEP) birləşdirərək dörd karbonlu iki əsaslı oksalo-asetat turşusu əmələ gətirir (Sage, 2004; Sommer et al., 2012). Sonra oksaloasetat malata və ya aspartata çevrilir. Karboksilləşmə mərhələsində əmələ gələn üzvi dikarbon turşularının (malat, aspartat) dekarboksilləşməsi isə ÖTH-də baş verir. ÖTH-a daşınan C₄-turşular dekarboksilazaların iştirakı ilə parçalanır, CO₂ ayrılır və Kalvin tsiklinə qoşulur. Hər iki karboksilləşmə reaksiyaları bir-biri ilə müsbət korrelyasiya təşkil edir (Furbank, 2011).

Alaninaminotransferaza (AIAT, EC 2.6.1.2) fermenti metabolitik proseslərdə həlledici rol oyna-

yan fermentlərdən biridir. Bu ferment alanin və 2-oksoqlütaratın piruvata və qlütamata çevrilməsini kataliz edir. Pirodoksalfosfatdan asılı olan bu ferment bitki metabolizmində, xüsusilə də ilkin karbon metabolizmində və amin turşuların sintezində açar rolunu oynayır (Kendziorok et al., 2012; Duff et al., 2012; McAllister et al., 2013). Həmçinin, alaninaminotransferaza fototənəffüsün və bəzi bitkilərdə peroksisomlarda və mitoxondridə metabolizmin tənzimlənməsində iştirak edir (Shrawat et al., 2008).

Aspartataminotransferaza (AsAT, EC 2.6.1.1) bikilərin müxtəlif hüceyrə kompartmentlərində əks transaminləşmə reaksiyasını həyata keçirərək, qlütamat və oksalasetatdan aspartat və 2-oksoqlütaratın əmələ gəlməsini kataliz edir (McAllister, 2016). AsAT-ın bir neçə izoformasını müxtəlif subhüceyrə orqanoidlərində, sitozolda, xloroplastlarda, mitoxondrilərdə və peroksisomlarda lokalizasiya olunmuşdur (Duff et al., 2012). AsAT fermenti azotun ilkin assimilyasiyasında, reduksiyaedici ekvivalentlərin nəqlində və karbon və azotun müxtəlif hüceyrə nəqlində və karbon və azotun müxtəlif hüceyrə komponentləri arasında paylanması mühüm rol oynayır (Torre, 2014; Gaufichon et al., 2015) *Che-nopodiaceae* və *Poaceae* fəsiləsinin nümayəndələri arasında strukturuna və metabolizmdə iştirak edən fermentlərin fiziki-kimyəvi parametrlərinə görə bir-birindən kəskin fərqlənən C₄ növlərə rast gəlmək mümkündür. *Chenopodiaceae* fəsiləsinin C₄ növləri arasında iki müxtəlif dekarboksilləşdirici yarım tipə rast gəlinir (Voznesenskaya et al. 2013, Rao 2016, Maier et al. 2011). Lakin bəzi C₄ növlərin hansı yarım tipə aid olması hələ də mübahisəlidir. Bu məqsədlə *S. dendroides*, *S. atissima*, *N. mucronata* (*Chenopodiaceae*) və *S. bicolor* (*Poaceae*) növlərində PEPC, AlAT və AsAT fermentlərinin aktivlikləri substratın qatılığından və temperaturdan asılı olaraq müqayisəli şəkildə öyrənilmişdir.

MATERIAL VƏ METODLAR

Abşeron yarımadasında təbii mühit şəraitində bitən *S. dendroides*, *S. atissima*, *N. mucronata* və süni iqlim şəraitində yetişdirilmiş *S. bicolor* bitkilərinin yarpaqları və digər fotosintetik orqanları tədqiqat materialı kimi istifadə olunmuşdur. Bitkilər inkişafın aktiv fazasında, iyul-avqust aylarında təcrübə üçün toplanmışdır. Maye azotda (77 K) dondurulmuş bitki materialı soyuq həvəngdəstədə kvars qumunun iştirakı ilə tərkibində 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM etilendiamintetra-asetat turşusu

(EDTA), 5 mM ditiotritol (DTT), 2 mM fenilmetilsulfonil flüorid (PMSF) və 2% (w/v) həll olmayan polivinilpirrolidon (PVP) olan homogenizasiya buferi əlavə edilməklə ferment pərəparatının alınması üçün istifadə edilmişdir. Alınan homogenat süzüləndən, sonra 5 dəqiqə ərzində 12000g-də sentrifüqalaşdırılmışdır. Alınan supernatant fermentlərinin aktivliklərinin təyini üçün istifadə olunmuşdur. Fermentləri aktivliyi spektrofotometrik üsulla (Ultrospec 3300 Pro, Amersham, USA) 340 nm dalğa uzunluğunda təyin olunmuşdur. Temperaturdan asılı olaraq fermentlərin aktivliyinin dəyişmə dinamikası hər 5°C-dən bir 5 dəqiqə inkubasiya edilməklə ölçülmüşdür.

Fosfoenolpiruvat karboksilaza fermentinin aktivliyini təyin etmək üçün reaksiya mühiti 1 ml-də tərkibində 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM MgCl₂, 2mM DTT, 10mM NaHCO₃, 0,2 mM NADH, 10 U/ml MDH, 10 mM PEP və 40µl ferment ekstraktı olan aktivlik buferindən ibarətdir. Sonda reaksiya mühitinə substrat (10 mM PEP) əlavə etməklə reaksiyanın başlanmasına start verilir (Pyankov 2000).

Alaninaminotransferaza aktivliyinin təyini üçün reaksiya mühitinin tərkibi aşağıdakı kimi olmuşdur: 100 mM Tris-HCl(8,5), 2 mM EDTA, 2,5 mM 2-oksoqlütarat, 10 µg/ml pirodoksalfosfat, 10 mM DTT, 12 U/ml laktat dehidrogenaza və 0,2 mM NADH, 20 µl yarpaq ekstraktı və 10 mM L-alanin ibarətdir. Reaksiya L-alanin əlavə edilməklə başlanır (Alfonso & Brüggemann, 2012).

Aspartataminotransferaza aktivliyinin təyini üçün reaksiya mühitinin tərkibi müvafiq olaraq, 100 mM HEPES-KOH (pH 7,4) və 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 2 mM EDTA, 2,5 mM 2-oksoqlütarat, 10µg/ml pirodoksalfosfat, 10 mM DTT, 12 U/ml MDH və 0,2 mM NADH, 20µl yarpaq ekstraktı və 2,5 mM L-aspartatdan ibarətdir. L-aspartatdan əlavə etdikdən sonra reaksiya başlanır (Alfonso & Brüggemann, 2012).

Ümumi zülalların miqdarının təyini: Həllolan zülalın ümumi miqdarı spektrofotometrə 0,12%-li Coomassie Brilliant Blue G-250 məhlulunun köməyi ilə təyin olunmuşdur. (Sedmak & Grossberg, 1977). Cədvəl və qrafiklərdə verilən qiymətlər orta riyazi göstəricilər olub orta kvadratik kənara çıxmanı əks etdirirlər. Tədqiqatın nəticələrinin analizi zamanı orta riyazi səhvlər və kənarlanmalar (M±m) nəzərə alınmışdır. Ölçmələr bir neçə (üçdən az olmayaraq) bioloji və analitik təkrarlarda aparılmışdır. Standart səhvlər və kənarlanmalar Microsoft Office Excel proqramında hesablanmışdır ("Təsviri statistika" opsiyası).

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Fosfoenolpiruvat karboksilaza, alaninamino-transferaza, aspartataminotransferaza fermentlərinin kinetik parametrləri *Chenopodiaceae* fəsiləsinə aid olan bitən *S. dendroides*, *S. atissima*, *N. mucranata* və *Poaceae* fəsiləsinə aid olan *S. bicolor* bitkisinə də müqayisəli şəkildə tədqiq edilmişdir.

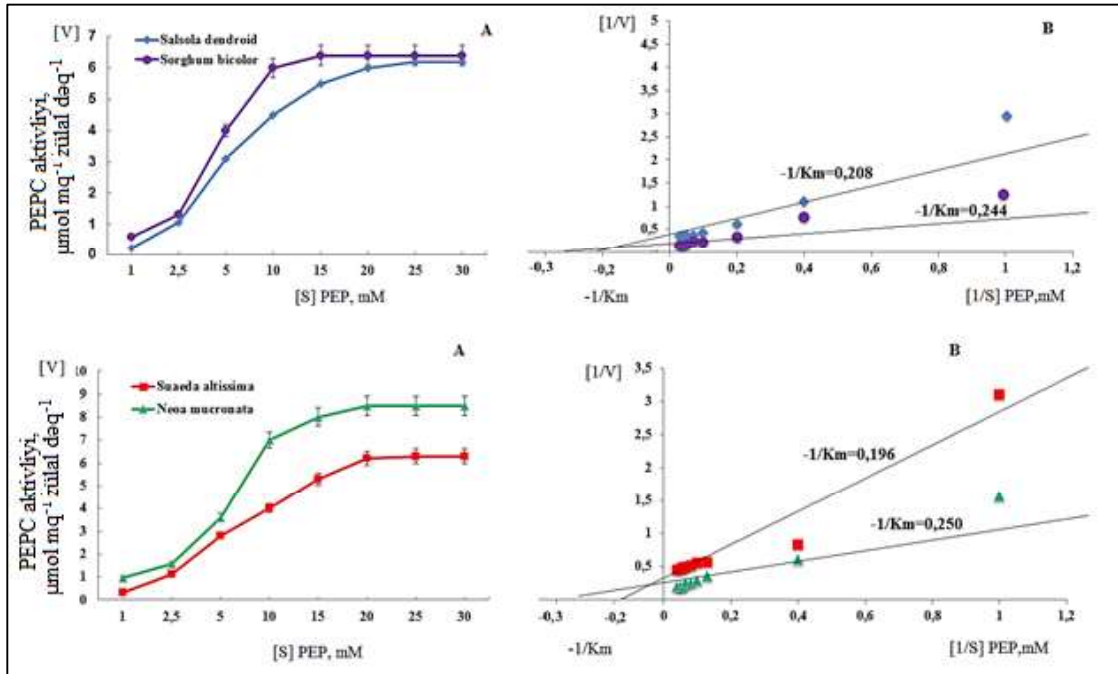
Bu məqsədlə, tədqiq olunan *Chenopodiaceae* və *Poaceae* fəsiləsinin nümayəndələrində inkişafın aktiv mərhələlərində PEPC fermentinin aktivliyi onun substratı olan PEP-dən (1-30 mM) asılı olaraq öyrənilmişdir (Şəkil 1). Şəkil 1-dən görüldüyü kimi, *S. dendroides*-in yarpaqlarından ayrılmış sitozol fraksiyasında substratın qatılığının dəyişməsindən asılı olaraq PEPC-nin kataliz etdiyi reaksiyanın kinetik sabitləri $K_m=4,8\pm 0,1$ mM, $V_{max}=5,8\pm 0,1$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mq}^{-1}$ zülal $\text{d}\text{əq}^{-1}$ olmuşdur. *S. altissima* yarpaqlarından ayrılmış sitozol fraksiyasında isə $K_m=5,1\pm 0,1$ mM, $V_{max}=6,3\pm 0,1$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mq}^{-1}$ zülal $\text{d}\text{əq}^{-1}$ olmuşdur. NADP-ME yarım tipinin hər iki nümayəndəsində isə yarpaqlarından ayrılmış sitozol fraksiyasında substratın qatılığının dəyişməsindən asılı olaraq PEPC-nin kataliz etdiyi reaksiyanın kinetik sabitlərinin qiyməti bir-birinə yaxın olmuşdur. Belə ki, *S. bicolor* və *N. mucranata* yarpaqlarının sitozol fraksiyasında PEPC-nin kataliz etdiyi reaksiyanın substratın qatılığının dəyişməsindən asılı olaraq kinetik sabitləri isə müvafiq olaraq $K_m=4,1$ mM və $K_m=4,0$ mM, $V_{max}=7,0\pm 0,15$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mq}^{-1}$ zülal $\text{d}\text{əq}^{-1}$ və $V_{max}=8,5\pm 0,2$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mq}^{-1}$ zülal $\text{d}\text{əq}^{-1}$ olmuşdur.

Şəkil 1-dən görüldüyü kimi, tədqiq olunan bütün bitkilərdə 15 mM PEP-in qatılığında bütün PEPC molekulları ferment-substrat qatılığı əmələ gətirərək fermentin aktiv mərkəzi tam doyma halına keçmişdir. Məhz buna görə də bu vəziyyətdə reaksiyanın sürətinin praktiki olaraq substratın qatılığından asılı olmadığı aydın görünür. Bu nəticələr Tovar-Méndez və əməkdaşlarının (Tovar-Méndez et al., 1998) apardığı tədqiqat işləri ilə uyğunluq təşkil edir. Belə ki, qarğıdalı (*Zea mays*) yarpaq-

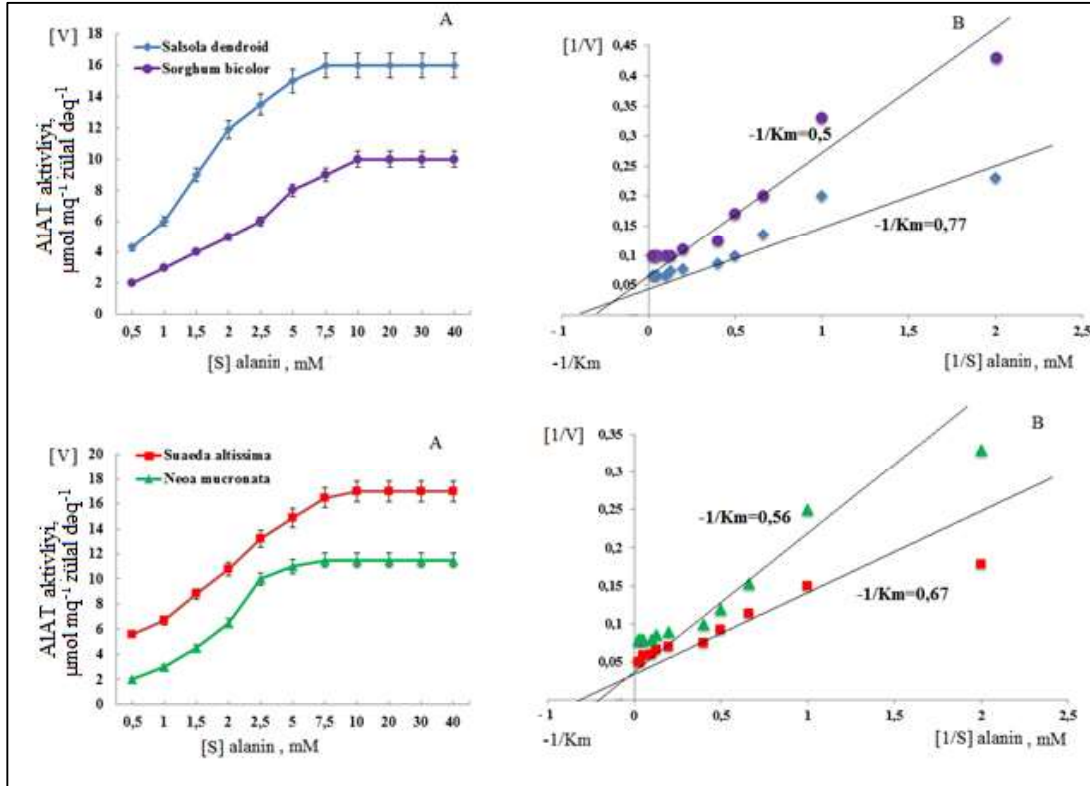
larında əgər substratın allosterik aktivatorlarının qatılıqları aşağı olarsa, substratın fizioloji qatılıqlarından asılı olmayaraq ferment inaktivləşir. Bu isə PEPC-nin əsas kinetik xüsusiyyətlərində dəyişikliklərə səbəb olur. Müxtəlif yarım tiplərə aid olan C_4 bitkilərdə PEPC-nin substratın qatılığından asılı olaraq və tənzimləyicilərin iştirakı ilə dəyişmə dinamikasının tədqiqi mühüm əhəmiyyət kəsb edir (Tovar-Méndez et al., 2000). Bəzi tədqiqatlarda göstərilir ki, allosterik effektorların və PEP-in sitozolik qatılıqlarında PEPC-ni analiz etməklə *in vivo* şəraitini imitasiya etmək lazımdır (Muramatsu, 2015; Takey et al., 2017).

PEPC-nin metabolitik effektorlarla (Doncaster and Leegood, 1987) və ya post transilyasion modifikasiya ilə tənzimlənməsi substratın doymamış qatılıqlarında müşahidə olunduğundan (Huber and Su-giyama, 1986; Echevarría et al., 1994), substratın yüksək qatılıqlarının istifadəsi *in vivo* da PEPC aktivliyinin və tənzimlənmə mexanizmlərinin düzgün qiymətləndirilməməsinə səbəb ola bilər (Alejandro Tovar-Méndez, 2000). PEPC allosterik fermentdir və onun aktivliyi müxtəlif metabolit effektorlarla tənzimlənir (O'Leary et al., 2011a).

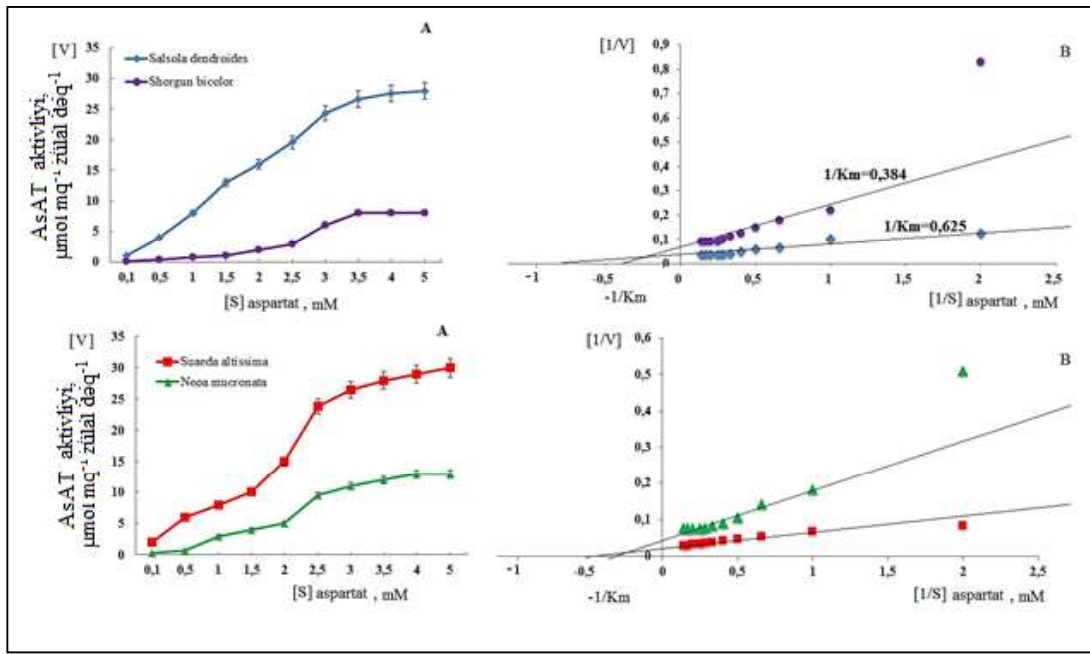
S. dendroides, *S. altissima*, *N. mucranata* və *S. bicolor* bitkilərinin sitozol fraksiyasından alınmış homogenatda PEPC-nin substratdan asılılığının Mi-xaelis-Menten və Laynuver-Berk əyrisi qurulmuşdur. Laynuver-Berk əyrisindən görünür ki, substratın yüksək qatılıqlarında müəyyən kənarlanmalar vardır. Bu substrat ingibirləşməsinin mövcudluğunun əsas göstəricisidir. *S. bicolor* və *N. mucranata* bitkilərində ferment PEP-in daha aşağı konsentrasiyasında 15 mM-da, *S. dendroides* və *S. altissima* bitkilərində isə 20-25 mM ferment doyma halına çatır. *S. bicolor* və *N. mucranata* bitkilərində PEPC-nin aktivliyi *S. dendroides* və *S. altissima* bitkiləri ilə müqayisədə daha yüksək olması bitkilərin fizioloji vəziyyəti ilə izah etmək olar.



Şəkil 1. Substratın qatılığının dəyişməsindən asılı olaraq *N. mucronata*, *S. dendroides*, *S. altissima* və *S. bicolor* bitkilərində fosfoenolpiruvat karboksilaza aktivliyinin dəyişmə dinamikası (Laynuver-Berkə görə)



Şəkil 2. Substratın qatılığının dəyişməsindən asılı olaraq *N. mucronata*, *S. dendroides*, *S. altissima* və *S. bicolor* bitkilərində ALAT aktivliyinin dəyişmə dinamikası (Laynuver-Berkə görə)

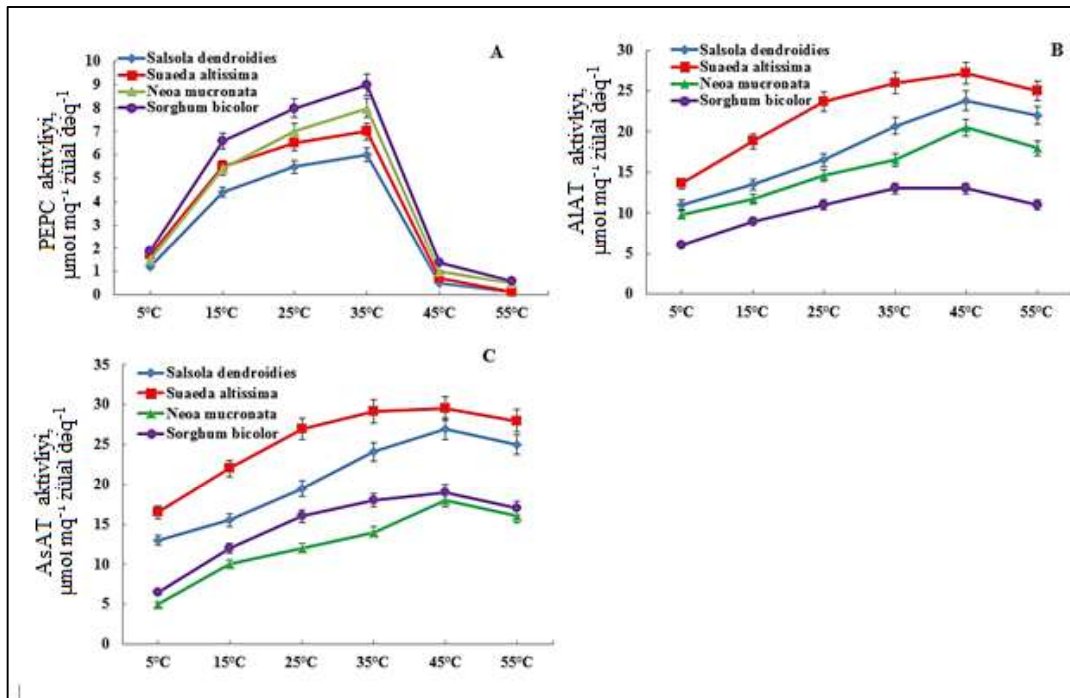


Şəkil 3. Substratın qatılığının dəyişməsindən asılı olaraq *N. mucronata*, *S. dendroides*, *S. altissima* və *S. bicolor* bitkilərində AsAT aktivliyinin dəyişmə dinamikası (Laynuver-Berkə görə)

Cədvəl. *S. dendroides*, *S. altissima*, *N. mucronata* və *S. bicolor* bitkilərində PEPK, ALAT, AsAT-ın kataliz etdiyi reaksiyanın substratın qatılığından asılı olaraq dəyişməsinin bəzi kinetik parametrləri

| Species | PEP (1-30) mM | | Alanin (0,5-40) mM | | Aspartat (0,1-5) mM | |
|-------------------------|---------------|----------|--------------------|----------|---------------------|----------|
| | V_{max} | K_m | V_{max} | K_m | V_{max} | K_m |
| <i>S.dendroides</i> | 5,8±0,1 | 4,8±0,1 | 16±0,65 | 1,3±0,02 | 28,0±0,7 | 1,6±0,1 |
| <i>S.bicolor</i> | 7,0±0,15 | 4,1±0,09 | 10±0,20 | 2,0±0,08 | 8,0±0,3 | 2,6±0,1 |
| <i>Suaeda altissima</i> | 6,3±0,1 | 5,1±0,12 | 17±0,70 | 1,5±0,02 | 30,0±0,8 | 2,0±0,1 |
| <i>Neoa mucronata</i> | 8,5±0,2 | 4,0±0,09 | 11,5±0,25 | 1,8±0,02 | 13,0±0,3 | 2,4±0,15 |

Qeyd: (V_{max} -µmol mq⁻¹ zülal dəq⁻¹; K_m -mM ilə ifadə olunmuşdur).



Şəkil 4. PEPK (A), AsAT(B), ALAT (C) fermentlərinin aktivliklərinin temperaturdan asılı olaraq dəyişməsi

C₄ bitkilərdə AlAT fermentinin mühüm fizioloji rolu nəzərə alınaraq *Chenopodiaceae* və *Poaceae* fəsilələrinin tədqiq olunan bütün nümayəndələrində alaninin müxtəlif qatılıqlarında AlAT-ın kinetik parametrləri tədqiq olunmuşdur. Şəkil 2-dən görüldüyü kimi alanin qatılığı artdıqca reaksiyanın sürəti proporsional olaraq yüksəlir. *S. dendroid* və *S. altissima* bitkilərində reaksiyanın maksimal sürəti müvafiq olaraq $V_{\max} = 16,0 \pm 0,65 \mu\text{mol} \cdot \text{mq}^{-1} \cdot \text{zülal} \cdot \text{d} \cdot \text{d} \cdot \text{q}^{-1}$ və $V_{\max} = 17,0 \pm 0,70 \mu\text{mol} \cdot \text{mq}^{-1} \cdot \text{zülal} \cdot \text{d} \cdot \text{d} \cdot \text{q}^{-1}$ $K_m = 1,3 \pm 0,02$ və $K_m = 1,5 \pm 0,02$ olmuşdur. *S. bicolor* və *N. mucronata* bitkilərində isə kinetik sabitlər müvafiq olaraq $K_m = 2,0 \pm 0,08$ mM, $V_{\max} = 10,0 \pm 0, \mu\text{mol} \cdot \text{mq}^{-1} \cdot \text{zülal} \cdot \text{d} \cdot \text{d} \cdot \text{q}^{-1}$, $K_m = 1,8 \pm 0,02$ mM, $V_{\max} = 11,5 \pm 0,25 \mu\text{mol} \cdot \text{mq}^{-1} \cdot \text{zülal} \cdot \text{d} \cdot \text{d} \cdot \text{q}^{-1}$ olmuşdur. AlAT-ın fizioloji rolu ilə əlaqədar olaraq *S. dendroides* və *S. altissima* bitkilərində V_{\max} qiyməti *S. bicolor* və *N. mucronata* nisbətən daha yüksəkdir.

Şəkil 3-dən görüldüyü kimi, tədqiq olunan bitkilərdə *S. dendroides* AsAT aktivliyinin substratın 0,1-5,0 mM qatılıqlarında dəyişməsi tədqiq olunub. Aspartatın qatılığı artdıqca (4 mM qədər) bütün tədqiq olunan bitkilərdə reaksiyanın maksimal sürəti paralel olaraq yüksəlir. *S. dendroides* və *S. altissima* bitkilərində müvafiq olaraq $V_{\max} = 28,0 \pm 0,7$ və $V_{\max} = 30,0 \pm 0,8$, *N. mucronata* və *S. bicolor* bitkilərinin yarpaqlarından ayrılmış sitozol fraksiyasında müvafiq olaraq $V_{\max} = 8,0 \pm 0,3$ və $V_{\max} = 13,0 \pm 0,3$ olmuşdur (Cədvəl). *S. dendroides* və *S. altissima* bitkilərində V_{\max} qiyməti *N. mucronata* və *S. bicolor* ilə müqayisədə ~2 dəfə yüksək olması AsAT-ın bu bitkilərdə fizioloji rolu ilə izah oluna bilər. Bu nəticələr digər müəlliflərin məlumatları ilə uyğunluq təşkil edir (Griffith and Vance, 1989; Turano et al., 1992; Yagi et al., 1985).

Ətraf mühitin temperaturundan asılı olaraq, fermentlərin kinetikasında müxtəliflik müşahidə olunmuşdur. PEPC fermentinin aktivliyi tədqiq olunan növlərdə 5-35°C temperturda artsada, 45°C azalmağa başlayır. Daha yüksək aktivlik *S. altissima* bitkisinin müşahidə olunmuşdur. *S. dendroides* yarpaqlarında AsAT fermentinin aktivliyi oxşar şəkildə dəyişmişdir.

Şəkil 4 (A)-dan görüldüyü kimi *Chenopodiaceae* fəsilələrinin bəzi nümayəndələrində temperaturun 5-15°C qiymətlərində PEPC-nin aktivliyi 3-4 dəfəyə qədər yüksəlir. 35°C qədər PEPC maksimal aktivlik nümayiş etdirir. Ədəbiyyat məlumatlarına əsasən C₄ fotosintez yüksək temperatur optimumuna (20-40°C) malikdir. (Dwyer et al., 2007; Sage et al., 2011). *Chenopodiaceae* fəsilələrinin tədqiq olunan bütün nümayəndələrində 45°C-də fermentativ reaksiyanın sürəti kəskin azalır. Bu nəticə digər tədqiqat işləri ilə üstünlük təşkil edir. Temperaturun dəyişməsindən asılı olaraq maksimal sürətin dəyişməsi digər tədqiqatlardan alınmış nəticələrlə uy-

ğunluq təşkil edir (Massad et al., 2007; Boyd, 2015). Şəkildən görüldüyü kimi, temperaturun 45°C-yə qədər olan qiymətlərində bütün tədqiq olunan bitkilərdə transferazaların maksimal sürət (V_{\max}) artır. 55°C-də alaninaminotransferaza və aspartataminotransferaza fermentlərinin aktivliyi azalır.

Fermentlərin yüksək temperaturda aktivlik göstərməsi, görünür transferazaların termostabillik xüsusiyyəti ilə bağlıdır (Turano et al., 1992). AlAT və AsAT fermentləri temperaturun aşağı qiymətlərində daha az aktivlik göstərir və buna müvafiq olaraq aktivləşmə enerjisinin (E_a) qiyməti də aşağı olur.

Alınan nəticələrə əsasən, fermentin aktivliyi ilə mühitin işıq və temperatur amilləri arasında korrelyasiyanın mövcud olduğu göstərilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, *Chenopodiaceae* və *Poaceae* fəsilələrinin bəzi nümayəndələrində PEPC, AlAT, AsAT fermentləri üçün reaksiyanın maksimal sürəti (V_{\max}) fərqli dəyişir. Bu isə C₄ fotosintezin tədqiq olunan NAD-ME və NADP-ME yarım tipinə aid bitkilərin metabolizmində baş verən adaptiv dəyişikliklərin mühitə adaptasiyası ilə izah oluna bilər.

ƏDƏBİYYAT

- Alejandro T-M., Carlos M-J., Rosario A.M-C.** (2000) Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology*, **123**: 149-160.
- Alfonso S.U., Brüggemann W.** (2012) Photosynthetic responses of a C₃ and three C₄ species of the genus *Panicum* (s.l.) with different metabolic sub-types to drought stress. *Photosynthesis Research*, **112**: 175-191.
- De la Torre F., Cañas R.A., Pascual B.M., Avila C., Cánovas F.M.** (2014) Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants. *J. Exp. Bot.*, **65**: 19
- Doncaster H.D., Leegood R.C.** (1987) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.*, **84(1)**: 82-87.
- Duff S.M.G., Rydel T.J., McClerren A.L., Zhang W., Li J.Y. et al.** (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, **518(1)**: 90-101.
- Fahnenstich H., Saigo M., Niessen M. et al.** (2008) Malate and fumarate emerge as key players in primary metabolism: *Arabidopsis thaliana* overexpressing C4-NADP-ME offer a way to manipulate the levels of malate and to analyse the physiological consequences. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun* (eds. J.F.Allen, E.Gantt, J.H.Golbeck, B.Osmond). Springer-Verlag: p. 971-975.

- Furbank R.** (2011) Evolution of the C₄ photosynthetic mechanism: are there really three C₄ acid decarboxylation types? *Journal of Experimental Botany*, **62**: 1-6
- Gaufichon L. et al.** (2016) Asparagine metabolic pathways in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, **57**(4): 675-689.
- Griffith S.M., Vance C.P.** (1989) Aspartate amino-transferase in alfalfa root nodules: I. Purification and partial characterization. *Plant Physiol.*, **90**(4): 1622-1629.
- Huber S.C., Sugiyama T.** (1986) Changes in sensitivity to effectors of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transitions. *Plant Physiol.*, **81**: 674-677.
- Kendziorek M., Paszkowski A., Zagdanska B.** (2012) Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant cell reports*, **31**: 1105-1117.
- Maier A., Zell M.B., Maurino V.G.** (2011) Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C₄ and C₃ photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **62**: 3061-3069.
- McAllister C.H., Good A.G.** (2015) Alanine aminotransferase variants conferring diverse NUE phenotypes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **10**: 1-27
- McAllister C.H., Facette M., Holt A., Good A.G.** (2013) Analysis of the enzymatic properties of a broad family of alanine aminotransferases. *PLoS ONE*, **8**: e55032
- McAllister C.H., Wolansky M., Good A.G.** (2016) The impact on nitrogen-efficient phenotypes when aspartate aminotransferase is expressed tissue-specifically in *Brassica napus*. *New Negatives in Plant Science*, **3-4**: 1-9.
- Muramatsu M., Suzuki R., Yamazaki T., Miyao M.** (2015) Comparison of plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases from rice: identification of two plant-specific regulatory regions of the allo-steric enzyme. *Plant Cell Physiol.*, **56**(3): 468-480.
- O'Leary B., Park J., Plaxton W.C.** (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem. J.*, **436**: 15-34.
- Offermann S., Friso G., Doroshenko K.A., Sun Q. et al.** (2015) Developmental and subcellular organization of single-cell C₄ photosynthesis in *Bie-nertia sinuspersici* determined by largescale proteomics and cDNA assembly from 454 DNA sequencing. *J. Proteome Res.*, **14**: 2090-2108.
- Pyankov V., Ziegler H., Kuz'min A., Edwards G.** (2001) Origin and evolution of C₄ photosynthesis in the tribe *Salsoleae* (*Chenopodiaceae*) based on anatomical and biochemical types in leaves and cotyledons. *Plant Systematics and Evolution.*, **230**: 43-74.
- Pyankov V.I., Voznesenskaya E.V., Kuz'min A.N. et al.** (2000). Occurrence of C₃ and C₄ photosynthesis in cotyledons and leaves of *Salsola* species (*Chenopodiaceae*). *Photosynth. Res.*, **63**: p. 69-84.
- Rao X., Dixon R.A** (2016) The differences between NAD-ME and NADP-ME subtypes of C₄ photosynthesis: more than decarboxylating enzymes. *Front. Plant Sci.*, **7**: 1525.
- Sage R.F.** (2004) The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytologist.*, **161**: 341-370.
- Sage R.F., Wedin D.A., Li M.** (1999) The biogeography of C₄ photosynthesis. In: *C₄ Plant Biology* (eds. R.F.Sage, R.K.Monson). USA: Academic Press, p. 313-373.
- Sage R.F., Christin P.A., Edwards E.J.** (2011) The C₄ plant lineages of planet Earth. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 3155-3169.
- Sedmak J., Grossberg S.** (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.*, **79**: 544-552.
- Shrawat A.K., Carroll R.T., DePauw M., Taylor G.J., Good A.G** (2008) Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotechnol J.*, **6**: 722-732.
- Sommer M., Bräutigam A., Weber A.P.M.** (2012) The dicotyledonous NAD malic enzyme C₄ plant *Cleome gynandra* displays age-dependent plasticity of C₄ decarboxylation biochemistry. *Plant Biology*, **14**: 621-629.
- Takeya M., Okota M.YH., Osanai T.** (2017) Allosteric inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylases is determined by a single amino acid residue in cyanobacteria *Sci. Rep.*, **7**: 41080.
- Tovar-Méndez A., Rodríguez-Sotres R., López-Valentín D., Muñoz-Clares R.A.** (1998) Re-examination of the roles of PEP and Mg²⁺ in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*: effects of the activators glucose 6-phosphate and glycine. *Biochem. J.*, **332**: 633-642.
- Tovar-Méndez A., Mújica-Jiménez C.** (2000) Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylases. *American Society of Plant Physiologistsvol.*, **123**(1): 149-160.
- Turano F.J., Weisemann J.M., Matthews B.F.** (1992) Identification and expression of a cDNA clone encoding aspartate aminotransferase in carrot. *Plant Physiol.*, **100**: 374-381.

- Voznesenskaya E. V., Koteyeva N.K., Akhani H., Roalson E.H., Edwards G.E. (2013) Structural and physiological analyses in *Salsola* (*Che-nopodiaceae*) indicate multiple transitions among C₃, intermediate and C₄ photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **64**: 3583–3604.
- Wang Y., Brautigam A., Weber A., Zhu X. (2014) Three distinct biochemical subtypes of C₄ photosynthesis? A modeling analysis. *J. of Exp. Botany.*, **53**(7): 3568-3578
- Yagi T., Kagamiyama H., Nozaki M., Soda K. (1985) Glutamate-aspartate transaminase from microorganisms. *Methods Enzymol*, **113**: 83–89.
- Dwyer S.A., Ghannoum O., Nicotra A., Von Cammerer S. (2007) High temperature acclimation of C₄ photosynthesis is linked to changes in photosynthetic biochemistry. *Plant, Cell and Environ.*, **30**: 53-66.
- Massad R.S., Tuzet A., Bethenod O. (2007) The effect of temperature on C₄-type leaf photosynthesis parameters. *Plant Cell Environ.*, **30**: 1191–1204.
- Boyd R.A., Gandin A., Cousins A.B. (2015) Temperature response of C₄ photosynthesis: biochemical analysis of Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in *Setaria viridis*. *Plant Physiology*, **169**: 1850-1861.

Исследование Активности И Кинетических Параметров Ферментов C₄ Цикла У Некоторых Видов Семейства *Chenopodiaceae* И *Poaceae*

Т. Я. Оруджева, У.А. Курбанова, У.Дж. Мустафаева, Ш.М. Байрамов

Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана

Проведено сравнительное изучение кинетических параметров РЕРС, АІАТ и АsАТ в *S. dendroidies*, *S. atissima*, *S. bicolor* и *N. mucranata* в зависимости от концентрации субстрата и температуры. Активность РЕРС была выше у *S. bicolor* и *N. mucranata* по сравнению с *S. dendroidies* и *S. altissima*. Максимальная скорость реакции (V_{max}) для аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы была выше у *S. bicolor* и *N. mucranata* по сравнению с *S. dendroidies* и *S. altissima*. В изученных видах семейства *Chenopodiaceae* повышение температуры от 5°C до 15°C вызывало приблизительно 3-4-х кратное увеличение активности РЕРС. Максимальная активность РЕРС наблюдалась в интервале 35-45°C. В отличие от РЕРС, в связи с термостабильностью трансфераз, активность АІАТ и АsАТ резко снижалась при 55°C.

Ключевые слова: *Chenopodiaceae*, *Poaceae*, фосфоенолпируваткарбоксилаза, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза

The Study Of C₄ Cycle Enzyme Activities And Kinetic Properties In Some Species Of The *Chenopodiaceae* And *Poaceae* Families

T.Y. Orujova, U.A. Gurbanova, U.J. Mustafayeva, Sh.M. Bayramov

Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences

Kinetic parameters of РЕРС, АІАТ and АsАТ in the *S. dendroidies*, *S. atissima*, *S. bicolor* and *N. mucranata* species have been studied comparatively depending on the substrate concentration and temperature. РЕРС activity was higher in *S. bicolor* and *N. mucranata* compared with *S. dendroidies* and *S. altissima*. The maximum reaction rate (V_{max}) for alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase was higher in *S. bicolor* və *N. mucranata* compared with *S. dendroidies* and *S. altissima*. In the studied species of the *Chenopodiaceae* family the rise in temperature from 5°C to 10°C caused approximately 3-4 fold increase in РЕРС activity, and ~1.2-1.3 fold increase was detected for every 10°C rise in temperature. Maximum РЕРС activity was observed at 35°C. Contrary to РЕРС due to the thermostability of transferases АІАТ and АsАТ activities sharply decreased at 55°C.

Keywords: *Chenopodiaceae*, *Poaceae*, phosphoenolpyruvate carboxylase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase