

На правах рукописи

Эсаналиева Шахноза Акрамовна

**ФОРМИРОВАНИЕ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЦИКЛА
КАЛЬВИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В
ЛИСТЬЯХ ХЛОПЧАТНИКА**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Душанбе – 2010

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной биологии и генной инженерии Института физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан

Научный руководитель: член-корреспондент АН Республики Таджикистан, доктор биологических наук, профессор **Алиев Курбон Алиевич**

Официальные оппоненты: член-корреспондент АН Республики Таджикистан, доктор биологических наук, профессор **Абдуллаев Абдуманон**,
доктор биологических наук, профессор **Юлдашев Химохиддин Юлдашевич**

Ведущая организация: Таджикский аграрный университет

Защита состоится «_____» _____ 2010 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета Д047.001.01 при Институте физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан. Адрес: 734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Индиры Ганди АН Республики Таджикистан.

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Б.Б.Джумаев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Исследования на различных уровнях – от молекулярного до биосферного – интеграции и регуляции физиологических процессов в течение жизни растения и его адаптации к окружающей среде стало в настоящее время одной из основных проблем физиологии и биохимии растений (Кузнецов, Дмитриева, 2006; Алёхина, Балнокин и др., 2007).

По современным представлениям, одним из ведущих регуляторных механизмов метаболизма на молекулярном уровне является образование разнообразных надмолекулярных комплексов ферментов (Фридрих, 1986; Курганов, Любарев, 1991; Ермаков, 1993).

Исследованиями М.А.Бабаджановой с сотрудниками (Бабаджанова, 1981, 1990; Бабаджанова и др., 1985, 1988, 1989, 1990, 1992) было установлено, что ферменты цикла Кальвина – рибозофосфатизомераза, фосфорibuлокиназа, рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа образуют структурно функциональный кластер с молекулярной массой 520 ± 20 кД.

Установлен механизм регуляции ферментативных активностей свободных мультиферментных комплексов с величинами молекулярных масс 520 ± 20 и 240 ± 10 кД (Бабаджанова, 2003; Бабаджанова и др., 2006). Мультиферментный комплекс с молекулярной массой 520 кД был выделен в условиях, не вызывающих диссоциацию белков. В клетке постоянно происходят изменения условий (рН, ионной силы, температуры, концентрации метаболитов и т.д.), когда белки-олигомеры диссоциируют на составляющие их компоненты. Поэтому при выделении мультиферментного комплекса с молекулярной массой 240 кД были специально подобраны денатурирующие условия. В связи с этим оставалось неясным, постоянен или меняется в течение вегетации растения состав и функциональная активность мультиферментных комплексов, выделенных в условиях, не вызывающих денатурацию (диссоциацию) белков. Большое количество исследований посвящено выделению и изучению структурной организации и кинетических свойств различных мультиферментных комплексов темновой фазы фотосинтеза (обзоры Романовой, Павловец, 1997; Gontero et al., 2002; Бабаджановой, 2003). Однако до настоящего времени не проводились исследования мультиферментных комплексов цикла Кальвина, выделенных в различные фазы развития растений.

Сложные изменения в организме эукариот, происходящие в процессе онтогенеза, осуществляются благодаря дифференциальной экспрессии генов, регулируемых на разных уровнях: от репликации до посттрансляционной модификации белков и сборки надмолекулярных структур (Лобашёв, Ватти, Тихомирова, 1979; Инге-Вечтомов, 1989; Кефели, 1991; Кузнецов, Дмитриева, 2006; Романов, 2009).

Всё вышеизложенное даёт основание считать, что исследование молекулярно-функциональных свойств мультиферментных комплексов цикла Кальвина в различные фазы развития растений, влияния на ферментативную активность гормонов и факторов окружающей среды является весьма актуальным.

«Эволюция в природе и селекция шли не по пути изменения самого фотосинтетического аппарата, а по пути перераспределения продуктов фотосинтеза внутри самого растения, менялась скорость оттока ассимилятов, соотношение автотрофных и гетеротрофных органов, способность к повторному использованию органических веществ (вторичный синтез). Эволюция и селекция шли не на клеточном, а на органном и организменном уровнях, поэтому клетка, структура и работа хлоропластов почти не менялись» (Кузнецов, Дмитриева, 2006).

В связи с этим представляло интерес определить, произошло ли изменение рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментных комплексов у линий хлопчатника, полученных при близкородственных скрещиваниях, и различающихся по морфобиологическим характеристикам листьев, показателям интенсивности фотосинтеза и продуктивности (Солиева, 2000; Бободжанова М.Д., 2007; Гиясидинов, 2007).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование образования различных мультиферментных комплексов цикла Кальвина в листьях хлопчатника в различные фазы развития растений, влияния фитогормонов на ферментативные активности мультиферментных комплексов, изучение изменений РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов в листьях различных генотипов хлопчатника.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие экспериментальные задачи:

- выделить в различные фазы развития растений свободные мультиферментные комплексы цикла Кальвина;

- определить у выделенных комплексов величины молекулярных масс и ферментативных активностей;
- изучить влияние кинетина на фосфорибулокиназную и РБФ-карбоксилазную активность ферментных препаратов различной степени очистки;
- выявить влияние кинетина *in vitro* на ферментативные активности мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев в зависимости от фазы развития растений;
- изучить изменение РБФ-карбоксилазной активности в экстрактах из листьев различных генотипов хлопчатника в различные фазы развития растений и сопоставить полученные данные с изменениями внешних факторов (температуры, освещённости и т.д.);
- выделить одновременно из листьев двух генотипов хлопчатника (сорт 108-Ф и линия Л-461), различающиеся по интенсивности фотосинтеза и продуктивности, мультиферментные комплексы с различной молекулярной массой и сравнить их содержание и функциональную активность.

Научная новизна. Впервые показано, что в зависимости от фазы развития растений в листьях хлопчатника образуются мультиферментные комплексы с различными величинами молекулярных масс и ферментативных активностей: в фазе 5-6 настоящих листьев – один с молекулярной массой 520 ± 20 кД, а в фазах бутонизации и цветения – два, с молекулярной массой 520 ± 20 кД и 480 ± 15 кД.

У выделенных комплексов определены рибозофосфатизомеразная, фосфорибулокиназная и рибулозобисфосфаткарбоксилазная активности.

Независимо от величины молекулярной массы мультиферментные комплексы проявляли наибольшие ферментативные активности в фазе цветения растений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что зависимость образования мультиферментных комплексов цикла Кальвина с различными функциональными свойствами от фазы развития растений обусловлена, по-видимому, возрастанием потребности эпигенетических процессов в ассимилятах в период формирования репродуктивных органов.

Обнаружено, что активирующее действие кинетина в экстрактах из листьев на фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную активности терялась при очистке экстракта. Следовательно, при очистке экстракта происходит потеря рецептора кинетина и/или вторичного мессенджера, имеющих белковую природу.

Установлено, что наибольшее активирующее действие кинетина на ферментативные активности экстрактов из листьев хлопчатника проявлялось не в присутствии собственных специфических субстратов, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата + АТФ, первого субстрата метаболической последовательности ферментов рибозофосфатизомеразы, фосфорибулокиназы, рибулозобисфосфаткарбоксилазы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляция ферментативных активностей мультиферментного комплекса осуществляется по принципу единого целого и поэтому является более быстрой и эффективной.

Результаты сравнительного исследования контрастных по интенсивности фотосинтеза, продуктивности и морфобиологическим характеристикам листьев четырёх генотипов хлопчатника показали, что в различные фазы развития растений изменения содержания водорастворимых белков и РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев были специфическими для каждого генотипа.

Линия Л-461 в экстрактах из листьев превосходила на всех фазах развития растений три остальные генотипа хлопчатника по содержанию водорастворимых белков и по РБФ-карбоксилазной активности.

В фазе массового цветения – начала плодообразования из листьев хлопчатника сорта 108-Ф и линии Л-461 выделены электрофоретически гомогенные мультиферментные комплексы с молекулярной массой 520 ± 20 и 480 ± 15 кД. При очистке экстрактов и получении электрофоретически гомогенных препаратов мультиферментных комплексов различия между генотипами по содержанию мультиферментных комплексов и по их РБФ-карбоксилазной активности сохранились.

Практическая ценность работы. Установлено, что из четырех генотипов хлопчатника две инбредные линии – Л-461 и Л-601, оказались более адаптированными или более устойчивыми к продолжительному действию пониженных температур и освещенности. Эти линии являются перспективными для дальнейшей генетико-селекционной работы.

Определение содержания водорастворимых белков и РБФ-карбоксилазной активности можно использовать в качестве одного из физиолого-биохимических тестов при отборе растений с высокой активностью фотосинтетического аппарата в селекционной работе.

Результаты полученных экспериментальных исследований имеют значение для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции физиолого-биохимических процессов в течение жизни растения и его адаптации к постоянно меняющимся внешним факторам.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на ежегодных апрельских конференциях профессорско-преподавательского состава Таджикского национального университета (Душанбе, 2009, 2010), международной научной конференции «Достижения современной физиологии растений: теоретические и прикладные аспекты», посвященной памяти академика АН Республики Таджикистан Ю.С.Насырова (Душанбе, 2008), международной конференции «Состояние и перспективы развития биохимии в Таджикистане» (Душанбе, 2009).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 132 страницах и состоит из введения, 5 глав (обзор литературы; экспериментальная часть – объекты и методы исследований; три главы – результаты исследований), заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего в себя 184 источника, из них 69 иностранных авторов. Работа содержит 14 таблиц, 22 рисунка.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования служили листья хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L., семейство *Malvaceae*) сорта 108-Ф и инбредные линии Л-461, Л-3, Л-601 из генетической коллекции Ташкентского государственного университета, любезно предоставленные академиком АН Республики Узбекистан Д.А.Мусаевым и профессором М.Ф.Абзаловым. Листья этих четырёх генотипов хлопчатника являются контрастными по морфобиологическим характеристикам, показателям фотосинтеза и продуктивности.

Хлопчатник выращивался с выполнением всех агротехнических мероприятий в полевых условиях на экспериментальном участке Института физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан (Гиссарская долина, г. Душанбе, 830 м над ур. моря).

Определение содержания белка. Количественное содержание белка определяли с реактивом Бенедикта (Кочетов, 1980). Измерения велись при длине волны 330 нм на высокочувствительном спектрофотометре ULTROSPEC II (ЛКВ, Швеция) с полной шкалой от 0 до 0,001 экстинкции.

Определение ферментативных активностей мультиферментных комплексов. Рибозофосфатизомеразную активность определяли по модифицированному методу Аксельрода и Янга (Axelrod, Jang, 1954). Определение продукта реакции кетосахара рибулозо-5-фосфат проводили карбозольным методом по реакции Дише (Dische, Borenfreund, 1951).

Фосфорibuлокиназную активность определяли по методу Гурвитца и др. (Hurwitz et al., 1956). Количество щелочегидролизующего фосфора определяли по методу Фиске-Суббароу (Лоури-Лопес) в модификации Скулачева (Кочетов, 1980).

Активность РБФК/О определяли спектрофотометрически по методике Рэкера, модифицированной Романовой (1980).

Получение электроферетически гомогенных ферментных препаратов. При получении ферментных препаратов из листьев хлопчатника в соответствии со специфическими особенностями объектов использовали общепринятые приёмы очистки, модифицировав методику получения экстракта.

Определение гомогенности и молекулярной массы ферментных препаратов. Аналитический диск-электрофорез в 7.5% полиакриламидном геле использовали для определения гомогенности ферментных препаратов и их молекулярной массы. Молекулярную массу определяли по калибровочному графику, построенному по относительной электрофоретической подвижности белков-метчиков.

Полученные результаты обработаны статистически (Урбах, 1964; Методы биохимического анализа, 1978; Лакин, 1973).

Представленные данные достоверны при доверительной вероятности 97-99%.

ГЛАВА 3. ОБРАЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЦИКЛА КАЛЬВИНА В ЛИСТЬЯХ ХЛОПЧАТНИКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Выделение и очистку ферментных препаратов повторяли многократно в течение трёх лет. Содержание белка и ферментативные активности различных препаратов определяли ежегодно в двух биологических повторностях. Поскольку во всех случаях были получены очень близкие результаты, то нами приведены типичные примеры.

3.1. Зависимость ферментативной активности свободных мультиферментных комплексов от фазы развития растений

Ранее (Бабаджанова М.П., Бабаджанова М.А., Алиев, 2002, 2006) при выделении из листьев хлопчатника в фазах бутонизации и цветения мультиферментного комплекса в обычных щадящих условиях на профиле элюции свободных белков при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ–целлюлозе суммарный белок выходил в виде двух отчётливых пиков, резко различавшихся по содержанию белка. Фракция с наибольшим содержанием белка представляла собой мультиферментный комплекс с молекулярной массой 520 кД. У фракции с меньшим содержанием белков не были определены ни величина молекулярной массы, ни ферментативные активности.

На рис.1 представлен профиль элюции при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ - целлюлозе свободных белков, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 5-6 настоящих листьев. Видно, что суммарный белок выходил в виде одного отчётливого пика. Наибольшее количество белка элюировалось во фракциях 3, 4, 5 при концентрациях NaCl 100, 150 и 200 мМ соответственно.

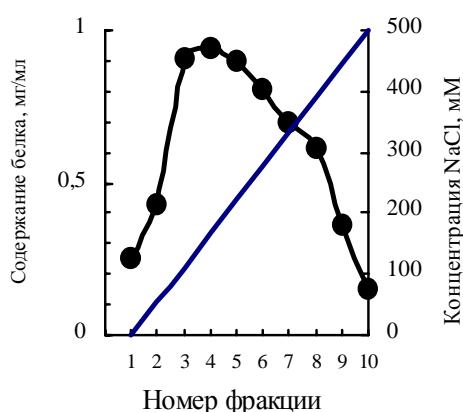


Рис.1. Профиль элюции белков, выделенных из листьев хлопчатника в фазе 5-6 настоящих листьев, при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с линейным градиентом NaCl.

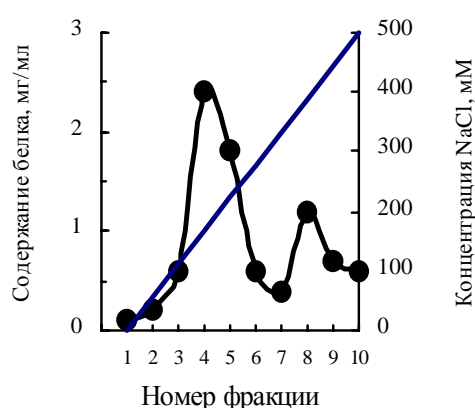


Рис.2. Профиль элюции белков, выделенных из листьев хлопчатника в фазе бутонизации, при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с линейным градиентом NaCl.

На рис. 2 изображен профиль элюции при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе свободных белков, выделенных из листьев растений в фазе массовой бутонизации. Видно, что белки элюировались в виде двух отчетливых пиков, резко различавшихся по содержанию белка.

В первом пике наибольшее количество белка элюировалось при концентрации NaCl 150–160 мМ (фракция 4), а во втором пике – при концентрации NaCl 370–380 мМ (фракция 8). При выделении свободного мультиферментного комплекса из листьев хлопчатника в фазе массового цветения профиль элюции белков был такой же, как на рис.2. Белки фракций 4 и 8 (рис. 2) отбирали для определения молекулярной массы и активности ферментов.

Для определения величин молекулярных масс белковые фракции 4 и 8 по отдельности и их смесь подвергали диск-электрофорезу в 7.5% ПААГ. На рис. 3а видно, что смесь белков фракций 4 и 8 (рис. 2) разделилась на две полосы. Белки фракции 4, а также фракции 8, нанесенные по отдельности, проявились в виде одной полосы (рис. 3б и 3в). Молекулярная масса белков фракции 4 (рис. 3б) составляла 520 ± 20 кД. Белок фракции 8 (рис. 2) имел бóльшую электрофоретическую

подвижность по сравнению с белком фракции 4 (рис. 3б), и его молекулярная масса равнялась 480 ± 15 кД.

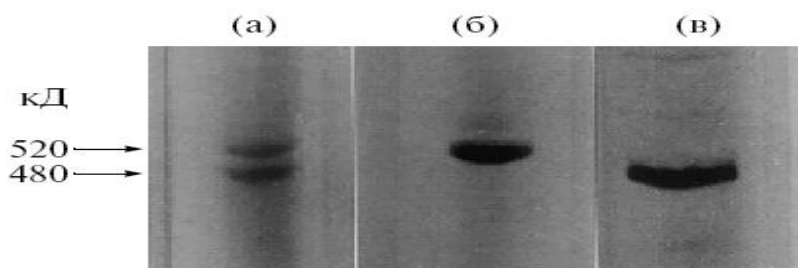


Рис.3. Электрофорез в 7.5% ПААГ белков, выделенных при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе из листьев хлопчатника в фазе бутонизации.

а – смесь белков фракций 4 и 8; **б** – фракция 4; **в** – фракция 8.

В табл. 1 приведены результаты определения ферментативной активности мультиферментных комплексов с молекулярной массой 520 и 480 кД, выделенных из листьев хлопчатника в различные фазы развития растений. Из представленных в табл. 1 данных видно, что на всех фазах развития растений активности ФРК и РБФК/О мультиферментных комплексов были выше при использовании рибозо-5-фосфата в сочетании с АТФ, а не в присутствии собственных специфических субстратов – рибулозо-5-фосфата + АТФ и РБФ.

По сравнению с фазой 5–6 настоящих листьев в фазе массовой бутонизации активность РФИ мультиферментного комплекса с молекулярной массой 520 кД возросла на 16%. Величина активности ФРК этого мультиферментного комплекса при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата + АТФ была выше на 20%, а в присутствии собственного специфического субстрата рибулозо-5-фосфата + АТФ – на 15%. Карбоксилазная активность мультиферментного комплекса в присутствии рибозо-5-фосфата + АТФ увеличилась на 39%, при использовании же собственного специфического субстрата рибулозо-1,5-бисфосфата – на 36%.

В фазах массовой бутонизации и цветения появлялся также второй мультиферментный комплекс с молекулярной массой 480 кД, который не был обнаружен в листьях растений в фазе 5–6 настоящих листьев.

Таблица 1

Ферментативная активность мультиферментных комплексов с различными величинами молекулярных масс, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в различные фазы развития растений

Мо.м., кД	Тип активности	Субстрат	Активность в различные фазы, мкмоль продукта/мин на 1мг белка		
			5-6 настоящих листьев	бутонизация	цветение
520	рибозофосфат-изо- меразная (РФИ)	рибозо-5-фосфат	2673 ± 16	3080 ± 18	3376 ± 20
480			не обнаружена	3041 ± 17	3345 ± 20
520	фосфорибуло- киназная (ФРК)	рибозо-5-фосфат + АТФ	3490 ± 21	4185 ± 26	4432 ± 28
480			не обнаружена	3597 ± 21	3794 ± 25
520		рибулозо-5-фосфат + АТФ	3122 ± 19	3604 ± 24	3715 ± 23
480			не обнаружена	3412 ± 20	3518 ± 22
520	рибулозобисфосфат- карбоксилазная (РБФК)	рибозо-5-фосфат + АТФ	1.38 ± 0.01	1.92 ± 0.01	2.33 ± 0.01
480			не обнаружена	1.68 ± 0.01	2.11 ± 0.01
520		РБФ	1.14 ± 0.01	1.55 ± 0.01	1.86 ± 0.01
480			не обнаружена	1.45 ± 0.01	1.74 ± 0.01

По сравнению с фазой бутонизации в фазе цветения активность РФИ у обоих мультиферментных комплексов увеличилась на 10%. Активность же ФРК у обоих мультиферментных комплексов как в присутствии рибозо-5-фосфата с АТФ, так и при использовании собственного специфического субстрата почти не изменилась. Активность РБФК/О в мультиферментном комплексе с мол. м. 520 кД независимо от субстрата была выше на 7–10%, чем в комплексе с мол. м. 480 кД. При этом активность комплекса 520 кД в присутствии собственного специфического субстрата также увеличилась на 20%, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата в сочетании с АТФ – на 26%.

Таким образом, независимо от величины молекулярной массы ферментативная активность мультиферментных комплексов была наибольшей в фазе цветения растений.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА IN VITRO НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА

4.1. Влияние кинетина на ферментативные активности в препаратах различной степени очистки

М.А.Бабаджановой с соавторами (Бабаджанова, Хаитова, Насыров, 1971; Бабаджанова, Горенкова, 1972; Бабаджанова, 1981; Бабаджанова, Бакаева, Нарзуллаев, 1996) было установлено, что при добавлении кинетина в реакционную среду возрастала фиксация $^{14}\text{CO}_2$ в присутствии рибозо-5-фосфата + АТФ экстрактами из листьев арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) и хлопчатника. Фиксация $^{14}\text{CO}_2$ в присутствии рибозо-5-фосфата + АТФ свидетельствовала о наличии мультиферментного комплекса, проявляющего три ферментативные активности – рибозофосфатизомеразную, фосфорибулокиназную и рибулозобисфосфаткарбоксилазную.

Для выяснения механизма действия кинетина на ферменты, ответственные за фиксацию CO_2 в хлоропластах, необходимо было исследовать влияние кинетина на активность каждого фермента в отдельности в препаратах различной степени очистки.

В табл. 2 представлены результаты определения фосфорибулокиназной и РБФ-карбоксилазной активностей без кинетина и с добавлением его (2 мкмоль) в реакционную среду в ферментных препаратах различной степени очистки, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 4-5 настоящих листьев.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что добавление кинетина в реакционную среду приводило к активации ферментативных активностей мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника и в частично очищенном фракционированием сульфатом аммония ферментном препарате. Очистка ферментного препарата из листьев хлопчатника с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-200 приводила к потере способности ферментов активироваться кинетином.

Таблица 2

Влияние кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную (ФРК) и РБФ-карбоксилазную активности мультиферментного комплекса в процессе очистки экстракта из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 4-5 настоящих листьев (субстрат: рибозо-5-фосфат + АТФ)

Стадия очистки	ФРК – активность, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка		РБФ – активность, мкмоль CO_2 /мин на 1 мг белка	
	Кинетин		Кинетин	
	—	+	—	+
Экстракт	12.1 ± 0.18 100%	16.2 ± 0.24 133%	0.045 ± 0.001 100%	0.121 ± 0.002 268%
Осаждение белков 35-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	23.4 ± 0.35 100%	26.4 ± 0.39 113%	0.660 ± 0.001 100%	0.96 ± 0.002 145%
Гель-хроматография на сефадексе G-200	52.2 ± 0.73 100%	53.1 ± 0.74 102%	0.951 ± 0.002 100%	0.93 ± 0.002 —

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация кинетином фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активностей была опосредованной,

поскольку очистка с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-200 приводила к потере ферментами способности активироваться фитогормонами.

4.2. Активность мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в различные фазы развития растений, при добавлении кинетина в реакционную среду

Известно, что переход растительного организма с одной фазы развития на другую сопровождается значительным изменением его гормонального статуса. Фитогормоны в онтогенезе растений являются тем инструментом, посредством которого геном управляет процессами роста, развития и покоя растений. При этом фитогормоны участвуют в регуляции таких физиологических процессов, как фотосинтез, транспорт веществ и отложение их в запас. Кроме того, фитогормоны управляют и процессами устойчивости растений к стрессовым воздействиям (Кефели, 1991).

Поскольку в процессе роста и развития растений происходит изменение реакции клетки на действие гормона и на его концентрацию, то возникает вопрос, сохраняется и поддерживается ли способность фосфорибулокиназы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы активироваться кинетином на всех стадиях развития растений и зависит ли их активация от концентрации кинетина?

В табл. 3 представлены результаты определения фосфорибулокиназной активности в экстрактах из листьев хлопчатника при добавлении различных концентраций кинетина в реакционную среду при использовании собственного специфического субстрата и рибозо-5-фосфата + АТФ.

Из представленных в табл. 3 данных видно, что наибольшее активирующее действие кинетина в присутствии собственного специфического субстрата – рибулозо-5-фосфата, проявлялось при концентрациях 3-4 мкмоль/мл реакционной среды. При использовании рибозо-5-фосфата + АТФ в качестве субстрата величина фосфорибулокиназной активности при всех концентрациях кинетина была значительно выше.

Следовательно, регуляция кинетином активности фосфорибулокиназы, встроенной в мультиферментный комплекс, при использовании первого субстрата метаболической цепи является более быстрой и эффективной.

Таблица 3

Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника при использовании различных субстратов (фаза 5-6 настоящих листьев)

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	
	рибулозо-5-фосфат	рибозо-5-фосфат
—	16.5 ± 0.24 100%	18.1 ± 0.27 100%
0.5	19.5 ± 0.29 118	22.0 ± 0.33 121
1	20.0 ± 0.30 121	24.5 ± 0.37 135
2	20.5 ± 0.31 124	24.0 ± 0.36 132
3	28.1 ± 0.42 170	31.6 ± 0.47 174
4	25.6 ± 0.38 155	28.5 ± 0.42 157
5	20.1 ± 0.30 122	22.2 ± 0.33 120
10	15.7 ± 0.23 —	16.5 ± 0.25 —
15	12.5 ± 0.19 —	14.1 ± 0.21 —

Поэтому влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на рибулозобисфосфаткарбоксилазную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из

листьев хлопчатника определяли при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфат в сочетании с АТФ.

В табл. 4 представлены результаты определения рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в фазе 5-6 настоящих листьев, при добавлении в реакционную среду различных концентраций кинетина.

Таблица 4

Влияние кинетина на РБФ-карбоксилазную активность мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 5-6 настоящих листьев (субстрат: рибозо-5-фосфат + АТФ)

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность РБФК, мкмоль CO ₂ /мин на 1 мг белка	Активация, %
—	0.042 ± 0.001	100
0.5	0.045 ± 0.001	109
1.0	0.051 ± 0.001	124
1.5	0.062 ± 0.001	151
2.0	0.101 ± 0.002	246
2.5	0.105 ± 0.002	250
3.0	0.098 ± 0.002	238
3.5	0.087 ± 0.002	212
4.0	0.078 ± 0.001	192
5.0	0.056 ± 0.001	141

Из представленных в табл. 4 данных видно, что при концентрациях кинетина 1-5 мкмоль/мл реакционной среды, рибулозобисфосфаткарбоксилазная активность мультиферментного комплекса значительно возрастала. Наибольшее активирующее действие кинетина (246-212%) проявлялось при концентрациях 2-3.5 мкмоль/мл реакционной среды.

В табл. 5 представлены результаты определения фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в фазах бутонизации и цветения растений, при добавлении в реакционную среду различных концентраций кинетина.

Таблица 5

Влияние кинетина в реакционной среде на фосфорibuлокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в различные фазы развития растений (субстрат: рибозо-5-фосфат + АТФ)

Кинетин мкмоль/мл реакционной среды	Бутонизация		Цветение	
	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на:			
	мг белка	Активация, %	мг белка	Активация, %
—	20.4±0.30	100	21.2±0.32	100
0.5	23.8±0.35	117	30.5±0.46	143
1	25.7±0.38	126	30.8±0.46	145
2	27.9±0.41	136	31.4±0.47	148
3	38.9±0.58	191	40.1±0.60	189
4	34.2±0.50	167	38.6±0.58	182
5	21.4±0.32	105	38.2±0.57	180
10	18.4±0.27	—	19.3±0.29	—
15	14.3±0.21	—	15.5±0.23	—

Из представленных в табл. 5 данных видно, что в сравнении с фазами 5-6 настоящих листьев и бутонизации в фазе цветения фосфорibuлокиназная активность мультиферментного комплекса уже при концентрации кинетина 0.5 мкмоль/мл реакционной среды возрастала на 43%, а при концентрации кинетина 5 мкмоль/мл реакционной среды – на 80% (Бабаджанова и др., 2009).

ГЛАВА 5. РИБУЛОЗОБИСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ У РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ХЛОПЧАТНИКА

5.1. Изменение содержания водорастворимых белков и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев различных генотипов хлопчатника в разные фазы развития растений

Нами было проведено сравнительное изучение изменения в различные фазы развития растений рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности в листьях хлопчатника сорта 108-Ф и трёх инбредных линий, различающихся по интенсивности фотосинтеза и продуктивности (Бободжанова М.Д., 2007; Гиясидинов, 2007).

На рис. 4 представлены результаты определения содержания водорастворимых белков в экстрактах из листьев различных генотипов хлопчатника в различные фазы развития растений.

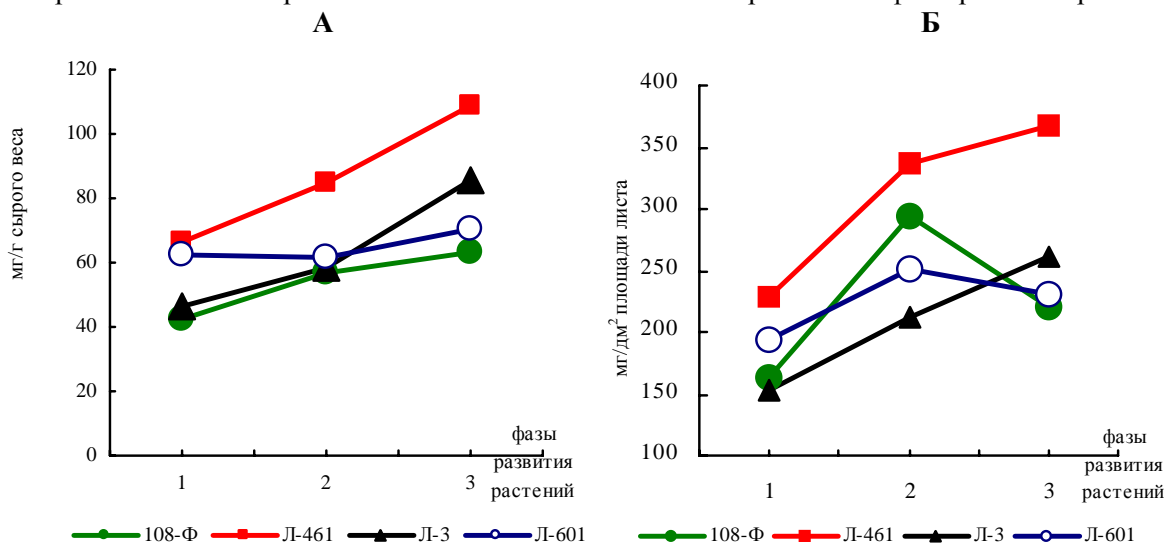


Рис. 4. Содержание водорастворимых белков в экстрактах из листьев различных генотипов хлопчатника в различные фазы развития растений (А-мг белка/г сырого веса, Б - мг белка/дм² площади листа). Фазы развития растений: 1-бутонизация, 2-плодообразование, 3-начало созревания коробочек.

Сравнение изменения в различные фазы развития растений содержания водорастворимых белков в экстрактах из листьев каждого генотипа хлопчатника показало, что независимо от расчётов содержания белка в мг на г сырого веса листьев или единицу площади листа у линий Л-461, Л-3, Л-601 наибольшее содержание водорастворимых белков было в фазе начала созревания коробочек. В экстрактах же из листьев хлопчатника сорта 108-Ф наибольшее содержание белка в расчёте на единицу площади листа пришлось на фазу массового плодообразования.

На рис. 5А представлены результаты определения удельной РБФ-карбоксилазной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев различных генотипов хлопчатника в различные фазы развития растений, на рис. 5Б - активность фермента в расчёте на один дм² площади листа.

Как видно из рис.4, чёткие различия между генотипами хлопчатника по содержанию водорастворимых белков и по РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов (рис.5) выявлялись при расчёте на единицу площади листа. Изменения в различные фазы развития растений РБФ-карбоксилазной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев были специфичными для каждого генотипа. На всех фазах развития растений по содержанию водорастворимых белков и РБФ-карбоксилазной активности в расчёте на единицу площади листа линия Л-461 значительно превосходила все остальные три генотипа хлопчатника.

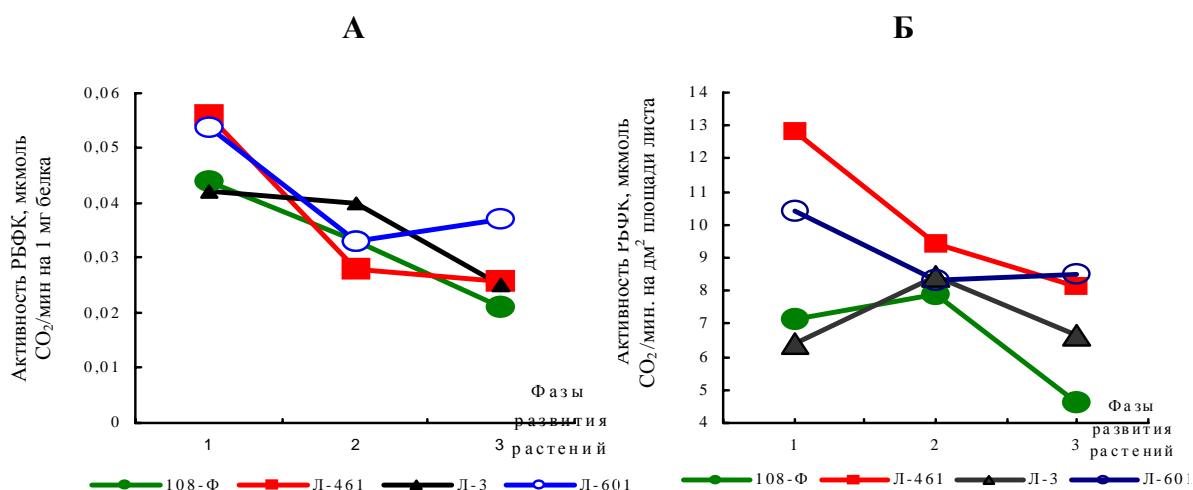


Рис. 5. РБФ-карбоксилазная активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев различных генотипов хлопчатника в расчёте на мкмоль CO₂/мин на 1 мг белка (А) и (Б) на единицу площади листа. Фазы развития: 1-бутонизация, 2-плодообразование, 3-начало созревания коробочек.

В 2009 г. были неблагоприятные погодные условия весной, поэтому хлопчатник пришлось пересевать. В связи с этим фаза массовой бутонизации хлопчатника наступила в 2009 г. в конце июля, массового плодообразования – в конце августа, а начала созревания коробочек – в начале октября. За этот период времени произошло постепенное снижение температуры окружающей среды и освещённости. Нами были сопоставлены данные об изменениях в различные фазы развития растений РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов, температуры воздуха и освещённости в течение 3-5 суток при выделении экстрактов из листьев.

В период с 24 по 31 августа в сравнении с концом июля резко снизилась температура воздуха, максимальная температура была ниже на 6°C, а освещённость из-за пыльной бури («афганец») – на 40%. В середине октября в сравнении с концом августа температура воздуха была ниже на 12-14°C, а освещённость – на 30% (данные Каспаровой И.С., Давлятназаровой З.Б., прибор: НОВО station «США»). Снижение температуры и освещённости в период массового плодообразования привело к значительному увеличению (в 1.5 раза) содержания водорастворимых белков у всех четырёх генотипов хлопчатника. Аналогичные данные для хлопчатника были получены другими авторами (Бакаева и др., 1984; Абдуллаев, 1994). Известно, что при низкой температуре и освещённости происходит накопление аминокислот и белков. РБФ-карбоксилазная активность мультиферментных комплексов снизилась у всех генотипов, кроме линии Л-3. Снижение активности ферментов на 10% приводит к изменению физиологического состояния растения.

Снижение температуры окружающей среды приводит к конформационным изменениям ферментов, что влечёт за собой изменения каталитических свойств ферментов. Изменения каталитических свойств ферментов являются одним из важнейших типов приспособительных реакций организмов к изменяющимся температурным условиям и происходят в результате модификации молекул ферментов. Изменения свойств ферментов происходят уже при понижении температуры на 6-8°C. Постепенное и одновременное снижение температуры воздуха и интенсивности освещения облегчает адаптацию растений к изменяющимся условиям.

При значительном снижении температуры и освещённости в период начала созревания коробочек в сравнении с фазой плодообразования РБФ-карбоксилазная активность мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев линий Л-461 и Л-601 осталась почти на прежнем уровне, а у сорта 108-Ф и линии Л-3 снизилась.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о специфических для каждого генотипа изменениях РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов в соответствии с фазой развития растений и изменениями внешних факторов.

В связи с вышеизложенным возникает вопрос, сохраняются ли различия между генотипами при очистке экстрактов и получении электрофоретически-гомогенных препаратов мультиферментных комплексов?

Поэтому нами из листьев различающихся по продуктивности двух генотипов хлопчатника в фазе массового цветения – начала плодообразования, одновременно были выделены электрофоретически гомогенные препараты свободных мультиферментных комплексов и определена их рибулозобисфосфаткарбоксилазная активность.

Профиль элюции свободных белков из листьев хлопчатника сорта 108-Ф и линии Л-461 при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с линейным градиентом NaCl представлен на рис.6.

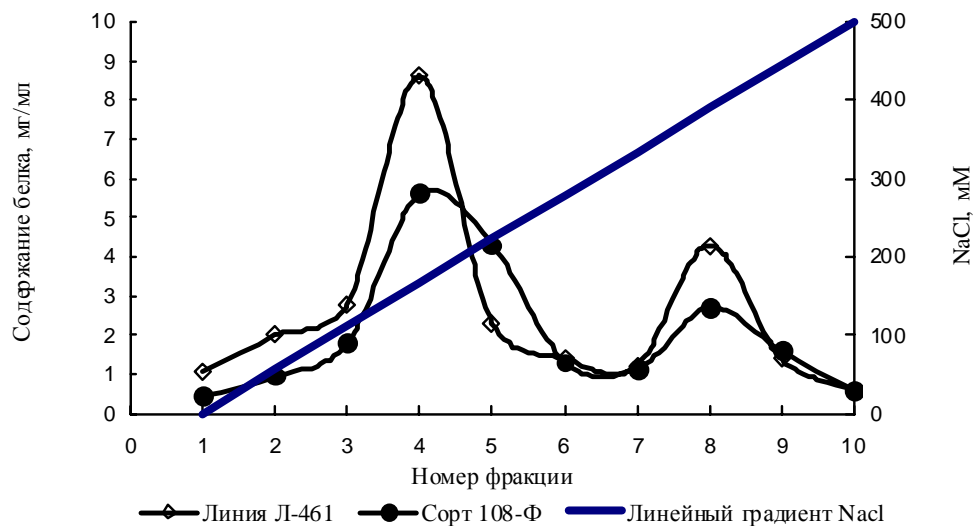


Рис.6. Профиль элюции свободных белков, выделенных из листьев хлопчатника сорта 108-Ф и линии Л-461, при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с линейным градиентом NaCl.

На рис. 6 видно, что белки элюировались в виде двух отчётливых пиков, резко различающихся по содержанию белка. Белок фракции 4 (I пик) – мультиферментный комплекс с молекулярной массой 520 кД, а белок фракции 8 (II пик) – мультиферментный комплекс с молекулярной массой 480 кД.

В табл. 7 приведены результаты определения рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментных комплексов с молекулярной массой 520 и 480 кД.

Из приведенных в табл. 7 данных видно, что мультиферментный комплекс с молекулярной массой 520 кД, выделенный из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, превосходил по рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментный комплекс с молекулярной массой 480 кД на 60%. Рибулозобисфосфаткарбоксилазная активность мультиферментного комплекса с молекулярной массой 520 кД, выделенного из листьев линии Л-461, была на 28% выше в сравнении с активностью мультиферментного комплекса с молекулярной массой 480 кД.

Таблица 7

Рибулозобисфосфаткарбоксилазная активность мультиферментных комплексов цикла Кальвина из листьев различающихся по продуктивности генотипов хлопчатника.

Фаза развития растений: массовое цветение – начало плодообразования.

Объект	РБФ - карбоксилазная активность МФК, мкмоль CO ₂ /мин на 1 мг белка	
	520 кД	480 кД
Сорт 108-Ф	2.19 ± 0.01	1.36 ± 0.01
Линия Л-461	2.73 ± 0.01	2.13 ± 0.01

Полученные данные свидетельствуют о функциональной значимости диссоциативного механизма регуляции карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, встроенной в мультиферментные комплексы с различной молекулярной массой. Мультиферментный комплекс с молекулярной массой 520 кД (I пик, фракция 4), выделенный из линии хлопчатника Л-461, по рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности превосходил сорт 108-Ф на 24%. Величина рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментного комплекса с молекулярной массой 480 кД (II пик, фракция 8), выделенного из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, была меньше на 56% в сравнении с активностью такого же мультиферментного комплекса, выделенного из листьев продуктивной линии Л-461.

Таким образом, различия между генотипами по содержанию мультиферментных комплексов и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности сохранились при очистке экстрактов и получении электрофоретически гомогенных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным условием роста и развития организма (эпигенеза) является сохранение постоянства его внутренней среды (гомеостаза) и приспособление к постоянно изменяющимся условиям окружающей среды.

Адаптация организма происходит с помощью регуляторных механизмов двух типов – механизмов поддержания клеточного гомеостаза и механизмов слежения, которые тесно связаны между собой. Благодаря этим регуляторным механизмам при адаптации происходит значительное изменение скорости протекания различных процессов.

У растений основным процессом, обеспечивающим их жизнедеятельность, является фотосинтез. Фотосинтез не только обеспечивает синтез органических веществ, но и обеспечивает онтогенетические особенности растений.

Анализ литературы показывает, что изучению онтогенетических изменений ферментативных активностей мультиферментных комплексов посвящено только одно исследование (Бабаджанова и др., 2006).

Нами изучена зависимость образования свободных мультиферментных комплексов цикла Кальвина от различных фаз развития растений с использованием метода, не вызывающего денатурацию белков. В фазе 5-6 настоящих листьев выделен один электрофоретически гомогенный препарат мультиферментного комплекса с молекулярной массой 520 ± 20 кД, а в фазе бутонизации и цветения – два: с молекулярной массой 520 ± 20 кД и 480 ± 15 кД. Различия мультиферментных комплексов по молекулярной массе, фосфорибулокиназной и РБФ-карбоксилазной активностей указывают на различия мультиферментных комплексов по структурной организации. Установлена структурная организация мультиферментного комплекса с молекулярной массой 520 кД (Rault et al., 1993).

Изучение структурной организации мультиферментного комплекса с молекулярной массой 480 кД, исследование кинетических параметров и регуляции активности является задачей дальнейших исследований.

Обнаруженная нами зависимость от фазы развития растений образования мультиферментных комплексов цикла Кальвина с различными величинами молекулярных масс и разными функциональными свойствами связана, по всей вероятности, с действием различных уровней механизмов дифференциальной экспрессии генов, обусловленной возрастанием потребности эпигенетических процессов в ассимилятах в период формирования репродуктивных органов.

Исследование влияния кинетина при добавлении в реакционную среду на фосфорибулокиназную и РБФ-карбоксилазную активностей в ферментных препаратах различной степени очистки показало, что активирующее действие кинетина в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф теряется при их очистке. Следовательно, при очистке экстрактов теряется рецептор кинетина и (или) вторичный мессенджер, имеющие белковую природу (Бабаджанова и др., 2007). Выделение их и изучение структурной организации является предметом дальнейших исследований.

В связи с вышеизложенным влияние кинетина при добавлении в реакционную среду на ферментативные активности в зависимости от фазы развития хлопчатника было изучено на экстрактах из листьев. Величины ферментативных активностей и активирующего действия кинетина были значительно выше при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата + АТФ. Полученные результаты являются веским доказательством наличия в экстрактах из листьев

мультиферментного комплекса, регуляция ферментативных активностей которого осуществляется по принципу единого целого и поэтому является более быстрой и эффективной.

Установлено, что в фазе цветения необходимы более высокие концентрации кинетина для значительной активации (до 80%) фосфорibuлокиназной активности мультиферментных комплексов (Бабаджанова и др., 2007).

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, и следовательно, необходимы большие их концентрации и активность.

При одновременном выделении в различные фазы развития растений экстрактов из листьев средневолокнистого хлопчатника сорта 108-Ф и инбредных линий Л-3, Л-461, Л-601, контрастных по показателям фотосинтеза и морфобиологическим характеристикам (Солиева, 2000; Гиясидинов, 2007), установлены различия между генотипами по содержанию водорастворимых белков и РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов. Изменения на разных фазах развития растений РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов были специфичными для каждого генотипа.

В 2009 г. были неблагоприятные погодные условия весной, поэтому хлопчатник пришлось пересевать. В связи с этим фаза массовой бутонизации наступила в конце июля, массового плодообразования – в конце августа, а начала созревания коробочек – в начале октября. За это время произошло постепенное снижение температуры воздуха и интенсивности освещения.

При значительном снижении температуры и освещённости в фазе начала созревания коробочек в сравнении с фазой плодообразования РБФ-карбоксилазная активность мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев линий Л-461 и Л-601 осталась почти на прежнем уровне, а у сорта 108-Ф и линии Л-3 снизилась.

Полученные результаты дают основание считать, что ферментная система ключевой стадии темновой фазы фотосинтеза у линии Л-461 и Л-601 лучше адаптируется, более устойчива к продолжительному действию положительных пониженных температур и освещённости, компенсируя их влияние на скорость реакций мультиферментного комплекса двумя путями – снижением каталитической активности ферментов в пределах физиологической нормы и увеличением содержания ферментов в единице площади листа.

Можно полагать, что у линий хлопчатника, полученных при близкородственных скрещиваниях, произошли какие-то изменения на уровне клетки хлопчатника. Доказательство этого предположения требует дальнейших исследований.

Полученные нами результаты подтверждают современные представления о том, что механизмы адаптации представляют собой сложную систему, включающую изменения функциональной организации растения от молекулярного уровня до уровня целого организма. Исследование механизмов адаптации на уровне структурно-функциональной организации мультиферментных комплексов и регуляции их ферментативной активности у растений хлопчатника представляет большой теоретический и прикладной интерес.

До настоящего времени не проводилось сравнительных исследований структурно-функциональных особенностей мультиферментных комплексов фотосинтетического цикла у различных по продуктивности и устойчивости к стрессовым факторам среды генотипов растений. Для таких исследований можно было бы использовать различные по происхождению сорта и гибриды сельскохозяйственных культур. Возможно, среди них имеются генотипы с усиленной карбоксилазной функцией рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, непосредственно связанной с соотношением ферментов в мультиферментном комплексе. В будущем такие генотипы можно было бы использовать в биотехнологических исследованиях с целью выяснения роли мультиферментных комплексов в регуляции продуктивности и адаптивности растений в разных стрессовых условиях.

ВЫВОДЫ

1. Установлена зависимость образования мультиферментных комплексов цикла Кальвина с различными величинами молекулярных масс и ферментативных активностей от фазы развития растений. В фазе 5-6 настоящих листьев был выделен один мультиферментный комплекс с

молекулярной массой 520 ± 20 кД. Начиная с фазы бутонизации растений, был выявлен второй мультиферментный комплекс с молекулярной массой 480 ± 15 кД.

2. Сравнительные исследования ферментативных активностей показали, что наибольшие величины активности мультиферментных комплексов, как и интенсивности фотосинтеза, характерны для фаз формирования репродуктивных органов – бутонизации и цветения. В этих фазах развития растений мультиферментные комплексы почти не различались по величине рибозофосфатизомеразной активности. По величинам фосфорибулокиназной и рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментный комплекс с молекулярной массой 520 кД превосходил комплекс с молекулярной массой 480 кД на 14-17%.

3. Зависимость образования мультиферментных комплексов цикла Кальвина с различными функциональными свойствами от фазы развития растений, по всей вероятности, регулируется дифференциальной экспрессией генов и обусловлена возрастанием потребности эпигенетических процессов в ассимилятах в период формирования репродуктивных органов.

4. Установлено, что активирующее действие кинетина на фосфорибулокиназную и РБФ-карбоксилазную активности мультиферментных комплексов в экстракте из листьев теряется при очистке экстракта. Следовательно, при очистке экстракта происходит потеря рецептора кинетина и (или) вторичного мессенджера, имеющих белковую природу.

5. Показано активирующее действие кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментных комплексов в зависимости от фазы развития растений и от концентрации кинетина. Это связано, вероятно, с возрастанием потребности в гормоне в период формирования репродуктивных органов и цветения, так как фитогормоны в этот период выполняют двойную нагрузку, регулируя ростовые процессы вегетативных и репродуктивных органов.

6. Сравнительные исследования четырёх генотипов хлопчатника по содержанию водорастворимых белков и РБФ-карбоксилазной активности мультиферментных комплексов в экстрактах из листьев показали, что их изменения в зависимости от фазы развития растений являются специфичными для каждого генотипа.

7. Установлено, что продуктивная линия Л-461 превосходит сорт 108-Ф по содержанию электрофоретически гомогенных мультиферментных комплексов с молекулярной массой 520 ± 20 и 480 ± 15 кД и по их РБФ-карбоксилазной активности.

8. Выявлено, что из четырех генотипов хлопчатника две продуктивные линии Л-461 и Л-601 лучше адаптированы к продолжительному действию пониженных температур и освещённости. Эти две инбредные линии хлопчатника Л-461 и Л-601 являются перспективными для дальнейшей направленной селекции при выведении высокопродуктивных сортов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

2. М.А.Бабаджанова, А.К.Мирзорахимов, М.С.Нарзуллоев, Ш.А.Эсаналиева, Н.Нематова, А.К.Сайфидинов. Влияние кинетина на активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы в ферментных препаратах различной степени очистки // Докл. АН РТ, 2007, т.50, № 8, с. 711-715.

3. М.А.Бабаджанова, А.К.Мирзорахимов, М.П.Бабаджанова, Ш.А.Эсаналиева, К.А.Алиев. Активность мультиферментных комплексов цикла Кальвина листьев различающихся по продуктивности форм хлопчатника // Докл. АН РТ, 2007, т. 50, № 9-10, с.798-801.

4. М.А.Бабаджанова, А.К.Мирзорахимов, Ш.А.Эсаналиева. Образование различных мультиферментных комплексов в онтогенезе растений хлопчатника // Достижения современной физиологии растений: теоретические и практические аспекты. Материалы научной конференции, посвященной памяти академика АН РТ Ю.С.Насырова: Тез. докл. – Душанбе, 2008, с.15-17.

5. М.А.Бабаджанова, Ш.А.Эсаналиева, А.К.Мирзорахимов. Влияние кинетина на активность мультиферментного комплекса цикла Бенсона-Кальвина в экстрактах из листьев хлопчатника // Состояние и перспективы развития биохимии в Таджикистане. Материалы Международной конференции, посвящённой 35- летию кафедры биохимии Таджикского национального университета: Тез.докл. – Душанбе, 2009, с.31-33.

6. М.А.Бабаджанова, А.К.Мирзорахимов, М.П.Бабаджанова, Ш.А.Эсаналиева, К.А.Алиев. Выделение свободных мультиферментных комплексов цикла Кальвина в онтогенезе растений хлопчатника // Докл. АН РТ, 2009, т. 52, №2, с. 150-157.

7. Ш.А. Эсаналиева, М.А. Бабаджанова, К.А. Алиев, Б.А.Солиева. Онтогенетические изменения рибулозобисфосфаткарбоксилазной активности мультиферментных комплексов цикла Кальвина листьев различающихся по продуктивности форм хлопчатника // Докл. АН РТ, 2009, т. 52, № 10, с.806-811.

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

9. М.А.Babajanova, A.K.Mirzorakhimov, M.P.Babajanova, Sh.A.Esanalieva. Development pattern in the formation of various myltienzyme complex associated with Benson-Kalvin cycle in cotton leaves // Rus.Plant Physiol. 2010, т.57, №2, p.175-180.