

PACS: 582:539.1.047

TOXUMLARI QAMMA ŞÜALARLA İŞLƏNMİŞ QARĞIDALI VƏ NOXUD BİTKİLƏRİNİN ANTIOKSİDANT FERMENTLƏRİNİN FƏALİYYƏTİNİN MÜQAYİSƏLİ ÖYRƏNİLMƏSİ

C.R. Orucova, M.Z. Vəlicanova, E.S. Cəfərov

AMEA Radiasiya Problemləri İnstitutu
jamala.orujova@gmail.com

Xülasə: Təqdim olunan işdə toxumların müxtəlif dozalarda qamma şüalarla işlənməsinin qarğıdalı və noxud bitkilərinin antioksidant fermentlərin fəaliyyətinə təsirinin öyrənilməsinə dair nəticələr təqdim olunmuşdur. Müəyyən edilmişdir ki, tədqiq edilən bitkilərin kontrol nümunələri fərqli müdafiə potensialına malikdirlər və toxumların qamma şüalarla işlənməsi antioksidant fermentlərin fəaliyyətinə müxtəlif formada təsir göstərir. Bu zaman ferment aktivlikləri bitkinin növündən başqa, həm də şüalanma dozəsindən asılı olur.

Açar sözlər: radiasiya stresi, qarğıdalı (*Zea mays* L.), noxud (*Cicer arietinum* L.), katalaza, askorbatperoksidaza, superoksiddismutaza, antioksidant müdafiə sistemi.

1. Giriş

Bitkilər effektiv antioksidant müdafiə sisteminə malik olduqlarından onlar oksidləşdirici stresə qarşı dayanıqlıq göstərə bilirlər. Antioksidant müdafiə sisteminin əsas elementləri superoksiddismutaza, askorbatperoksidaza, katalaza kimi fermentativ antioksidantlardır. Qeyri - fermentativ oksidantların sayı isə kifayət qədər çoxdur. Bunlara askorbin turşusunu, qlutasyonu, karotinoidləri, antosionları, tokoferolu, ubixinonları, flavonoidləri, sisteini, prolini və bir çox digər birləşmələri misal göstərmək olar (Тодоров, 2003).

Müəyyən edilmişdir ki, antioksidant sistemin eyni bir stress təsirə cavab reaksiyası bitkilərin növündən, stresin təsir dərəcəsiindən və davam etmə müddətindən, bu faktorun xarakterindən, antioksidant sistemin vəziyyətindən, antioksidantların aktivliyinin ilkin səviyyəsindən, bitkinin yaşından və yetişmə şəraitindən asılı olur (Полесская, 2007). Buna görə də antioksidant sisteminin fəaliyyətinin daha dəqiq qiymətləndirilməsi üçün çoxlu sayda faktorlardan asılı olan bu prosesin hərtərəfli öyrənilməsinə böyük ehtiyac vardır (Чупахина, 2009).

Deyilənlər nəzərə alınaraq, təqdim etdiyimiz işdə qamma radiasiya ilə işlənməmiş qarğıdalı və noxud toxumlarından laboratoriya şəraitində yetişdirilmiş bitkilər tədqiq edilmiş və müqayisəli şəkildə antioksidant fermentlərin fəaliyyəti öyrənilmişdir.

2. Materiallar və metodlar

Tədqiqat obyektini olaraq, taxıllar fəsiləsindən olan qarğıdalı (*Zea mays* L.) və paxlahlılar fəsiləsindən olan noxud (*Cicer arietinum* L.) bitkiləri seçilmişdir. Cücərmə faizi 90% olan toxumlar biri kontrol, yeddisi təcrübə nümunəsi olmaqla, laboratoriya şəraitində disstillə suyunda cücərdilmişdir. Təcrübə nümunələrinə uyğun toxumlar 1, 5, 10, 50, 100, 200 və 300 Qr şüalanma dozalarında ^{60}Co şüalanma mənbəyindən istifadə edilməklə "RUXUND" qurğusunda

şüalandırılmış və daha sonra su mühitində cüçərdilmişdir. Doza gücü bütün hallarda 0.048 Qr/san olmuşdur. Nümunələr becərilmə kamerasında (fitatronunda) 16/8 gündüz-gecə periodları yaradılmaqla, uyğun olaraq, 23°C / 15°C temperaturda, 55 % / 70% rütubətlik şərairdində 20 gün müşahidə altında saxlanılmışdır. Müşahidələrin sonunda noxud və qarğıdalı bitkilərindən yarpaq nümunələri götürülmüş və onlarda superoksiddismutaza (SOD), askorbatperoksidaza (APO) və katalaza (KAT) kimi antioksidant fermentlərin aktivlikləri müəyyən edilmişdir.

Tədqiqat metodları və cihazlar – spektrofotometriya, ⁶⁰Co γ – şüalanma mənbəyi, HIMAC –CT 15 RE (United Kingdom) markalı sentrifuqa, JENWAY – 67 Series (United Kingdom) markalı spektrofotometr.

Bitki nümunələrində askorbatperoksidaza (APO) fermentinin aktivliyinin təyini. Askorbatperoksidaza fermentinin aktivliyi Rios Gonzales və başq.-nin (Rios –Gonzales et al., 2002) təklif etdiyi metoda uyğun olaraq spektrofotometrik üsulla təyin olunmuşdur. Bu məqsədlə 14 q yaşıl yarpaq nümunəsi götürülmüş və 10 ml 50 mM kalium-fosfat bufferində (pH 7.6) homogeneziya olunmuşdur. Fermentin tərkibində çoxlu miqdarda –S-S- (disulfid) rabitələri olduğundan homogeneziya məhluluna bu rabitələrin oksidləşməsinin qarşısını almaq üçün PVP (polivinilpirrolidon) və askorbin turşusu əlavə edilmişdir. Sonra homogenat süzülmüş və 10 dəq ərzində 12000 g sürəti ilə çökdürülmüşdür. Daha sonra çöküntü atılmış, çöküntüüstü ekstrakt isə aktivliyə baxılmaq üçün istifadə edilmişdir. Reaksiya mühitinin yaradılması məqsədi ilə V=3 ml həcmli küvetə 2.55 ml 50 mM kalium - fosfat bufferi (pH 7.6), 50 mkl 0.1 mM EDTA (etilendiamin tetraasetat turşusu), 50 mkl 0.05 mM askorbin turşusu (M=176.1, 0.000176 + 2 ml su) və 50 mkl 0.1 mM H₂O₂ (3%) daxil edilmişdir. Daha sonra 300 mkl birki ekstraktı əlavə olunmaqla, reaksiyanın başlanmasına START verilmişdir. Optik sıxlığa dair ölçmələr t=30 san müddətində 290 nm dalğa uzunluğunda Ultraspec 3300 pro markalı (Amersham USA) spektrofotometrin köməyi ilə aparılmışdır. Aktivliyin ölçüsü olaraq reaksiyanın ilk 30 saniyəsi ərzində optik sıxlığın azalması götürülmüşdür.

Fermentin aktivliyi $mkmol/(mq \cdot dəq)$ vahidləri ilə $A = \Delta OS \frac{V}{\epsilon \cdot b}$ düsturu ilə hesablanmışdır. (Burada V - küvetin həcmi (3ml), ΔOS – optik sıxlıq, ε - ekstinksiya sabiti (ε = 2.8 mM⁻¹·sm⁻¹), b – ferment ekstraktının həcmidir ki, bu da 300 mkl -ə bərabərdir).

Nəzarət variantında ferment ekstraktı əvəzinə 300 mkl kalium - fosfat bufferi məhlulu əlavə edilmişdir.

Bitki nümunələrində katalaza (KAT) fermentinin aktivliyinin təyini. Katalaza fermentinin aktivliyi də Rios Gonzales və başq.-nin (Rios –Gonzales et al., 2002) təklif etdiyi metoda uyğun olaraq spektrofotometrik üsulla təyin olunmuşdur. Bunun üçün 1q yaşıl yarpaq və 10ml 50 mM kalium – fosfat buferindən (pH 7.0) ibarət homogenizat hazırlanmışdır. Yarpaq toxumaları dağıdıldıqdan sonra filtrasiya olunmuş və filtrat 10 dəq müddətində 8000 g sürəti ilə sentrifuqasiya olunmuşdur. Çöküntü atıldıqdan sonra təmiz ekstrakt tədqiqat məqsədi ilə istifadə olunmuşdur.

Reaksiya mühitinin tərkibinə 2.85 ml 50 mM kalium-fosfat bufferi, 60 mkl ferment ekstraktı və 90 mkl H₂O₂ daxil edilmişdir. Qarışığa 300 mkl birki ekstraktı əlavə olunaraq reaksiyaya START verilmişdir.

Optik sıxlığın təyininə dair ölçmələr V=3 ml həcmli küvetdə t=60 san müddətində 240 nm dalğa uzunluğunda Ultraspec 3300 pro markalı (Amersham USA) spektrofotometrin köməyi ilə aparılmışdır. Aktivliyin ölçüsü olaraq reaksiyanın ilk 60 saniyəsi ərzində optik sıxlığın azalması götürülmüşdür.

Fermentin aktivliyi $mkmol/(mq \cdot dəq)$ vahidləri ilə $A = \Delta OS \frac{V}{\epsilon \cdot b}$ düsturu ilə hesablanmışdır (burada V - küvetin həcmi (3ml), ΔOS – optik sıxlıq, ε - ekstinksiya sabiti (ε = 39.4 mM⁻¹·sm⁻¹), b – ferment ekstraktının həcmidir ki, bu da 300 mkl -ə bərabərdir).

Nəzarət variantında ferment ekstraktı əvəzinə 300 mkl kalium-fosfat bufferi məhlulu əlavə edilmişdir. Hesablamalar zamanı həm də aktivliyin şərti $mkmol /ml \cdot dəq$ vahidindən də istifadə edilmişdir.

Bitki nümunələrində superoksiddismutaza (SOD) fermentinin aktivliyinin təyini. Superoksiddismutaza (SOD) fermentinin aktivliyi *Giannopolites* və *Ries* -in (Giannopolites, Ries,1997) təklif etdiyi metoda uyğun olaraq spektrofotometrik üsulla öyrənilmişdir. Bu məqsədlə 300 mq yaşıl yarpaq nümunəsi götürülmüş və 20 ml 50 mM kalium-fosfat buferində (pH 7.8) homogenizasiya olunmuşdur. Alınan homogenat 2 qat tənzif süzgəcdən keçirildikdən sonra 15 dəq ərzində 7000 g sürəti ilə sentrifüqasiya olunmaqla, çökdürülmüşdür. Daha sonra çöküntü atılmış və çöküntüüstü mayedən SOD-un aktivliyini təyin etmək üçün istifadə olunmuşdur. Bu zaman 3 ml həcmli küvetdə aşağıdakı tərkibdə reaksiya mühiti yaradılmışdır:

2.65 ml ferment ekstraktı,

100 mkl 13 mM L-metionin ($M=149.2, 0.0388 q + 2 ml su$),

50 mkl 75 mM tetrazolium-xlorid ($M=817.6, 0.0000612+1 ml su$),

100 mkl 0.1mM EDTA,

100 mkl 2 mM riboflavin ($M=376.37, 0.000753+1 ml su$)

Ölçmələr hazırlanmış qarışıqın 20 dəq işıqda inkubasiya olunmasından sonra spektrofotometrə 560 nm dalğa uzunluğunda 5 dəq müddətində optik sıxlığın dəyişməsi əsasında aparılmışdır. Ölçmələr zamanı tam tərkibli E_1 təcrübə variantından, yarpaq-ferment ekstraktı əvəzinə 2.65 ml fosfat buferi daxil edilmiş E_2 yoxlama variantından və qaranlıqda saxlanıldıqdan sonra aktivliyinə baxılan E_3 yoxlama variantından istifadə edilmişdir.

Fermentin aktivliyi faizlərlə $A = \frac{[E_n - E_t]}{E_n} \cdot 100 \%$ düsturunun köməyi ilə hesablanmışdır (burada E_n – nəzarət, E_t – təcrübə variantlarının optik sıxlıqları, $\Delta E = E_n - E_t$ – optik sıxlığın dəyişməsidir). $E_n = E_3 - E_2$, $E_t = E_1 - E_2$ kimi təyin edilmişdir. SOD-un aktivliyinin vahidi olaraq formazanın yaranmasının 50% ingibirləşməsi qəbul olunmuşdur.

Təcrübələr 3 analitik təkrarlanma yolu ilə aparılmışdır.

Alınmış təcrübə nəticələrinin riyazi-statistik hesablanması Lakinə (Лакин, 1990) görə aparılmışdır.

Alınmış nəticələr və onların təhlili

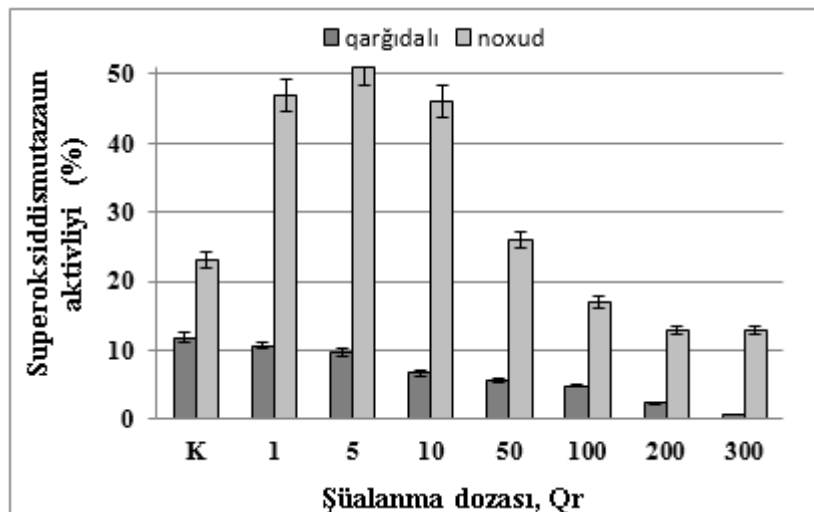
Təxümlərin müxtəlif dozalarda qamma şüalarla işlənməsinin tədqiq etdiyimiz bitkilərdə antioksidant fermentlərin aktivliklərinə təsirinə dair aldığımız nəticələr 1, 2 və 3-cü şəkillərdə öz əksini tapmışdır.

Nəticələrin təhlili göstərir ki, noxud bitkisinin kontrol nümunəsi qarğıdalı ilə müqayisədə daha yüksək ferment aktivliyinə malik olur. Belə ki, hər üç fermentin aktivliyi noxud bitkisinin təxminən 2 dəfəyə qədər yüksək olur. Çox yəqin ki, bunun səbəbi noxud bitkisinin daha fəal antioksidant müdafiə sistemində malik olmasıdır (şəkil 1).

Təxümlərin qamma şüalarla işlənməsinin ferment aktivliyinə təsirinə dair nəticələr özünəməxsusluğu ilə seçilir. Belə ki, bu halda ferment aktivliyi bitkinin növündən başqa, həm də şüalanma dozəsindən asılı olur.

Maraq kəsb edən nəticələrdən biri də odur ki, superoksiddismutaza fermentinin aktivliyi noxud bitkisinin bütün doza oblastında qarğıdalıdakından yüksəkdir.

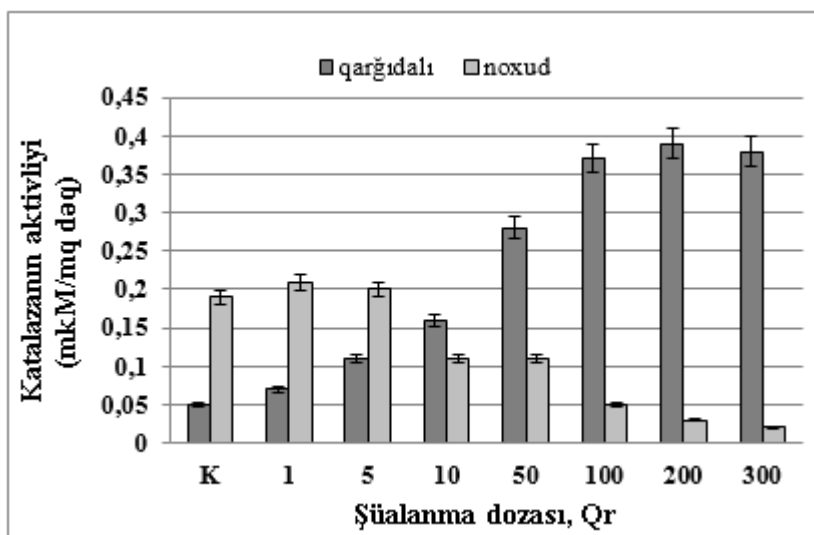
Digər maraqlı faktlardan biri də odur ki, aşağı dozalarda şüalanma dozasının artması noxud bitkisinin əvvəlcə fermentin aktivliyinin artmasına (~2 dəfə) səbəb olursa, sonra bu, ferment aktivliyinin müntəzəm olaraq azalması ilə nəticələnir.



Şək. 1. Qarğıdalı və noxud bitkilərində superoksiddismutaza fermentinin aktivliyinin şüalanma dozasından asılılığı

Qarğıdalı bitkisinə gəldikdə isə superoksiddismutaza fermentinin aktivliyi aşağı doza oblastında, demək olar ki, dəyişmir, şüalanma dozasının sonrakı artımı isə bu fermentin aktivliyinin azalmasına gətirib çıxarır. 300 Qr –ə bərabər yüksək şüalanma dozasında superoksiddismutaza fermenti tam fəaliyyətsiz olur (aktivliyi sifıra yaxın qiymət alır).

Katalaza fermentinin aktivliyi superoksiddismutazanın aktivliyindən fərqli dəyişmə dinamikasına malikdir. Belə ki, bu fermentin aktivliyi noxud bitkisinə 1 və 5 Qr şüalanma dozalarında təxminən kontrolla eyni olduğu halda, sonrakı doza oblastında şüalanma dozasının artması ilə bu fermentin aktivliyi əhəmiyyətli azalmaya məruz qalır və bu halda da 300 Qr –ə bərabər şüalanma dozasında tamamilə fəaliyyətsiz olur (şəkil 2).



Şək. 2. Qarğıdalı və noxud bitkilərində katalaza fermentinin aktivliyinin şüalanma dozasından asılılığı

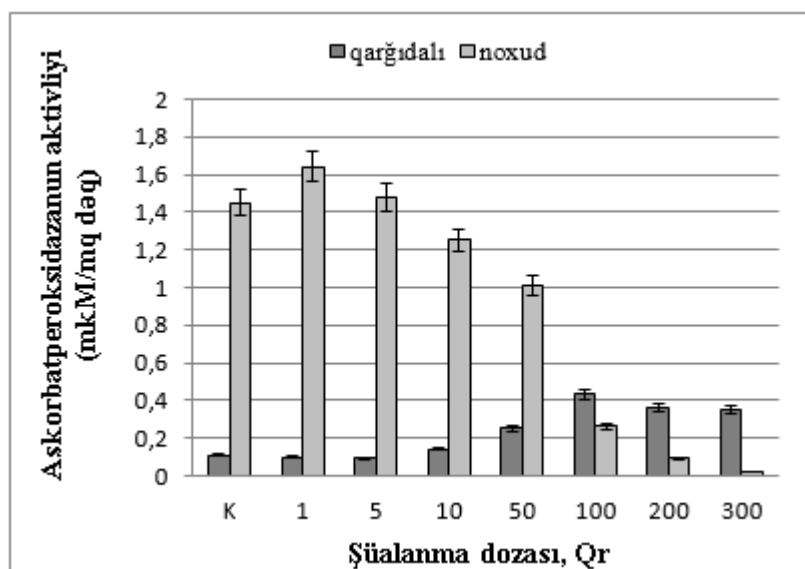
Qarğıdalı bitkisinə isə katalaza fermentinin aktivliyinin şüalanma dozasından asılılığı noxud bitkisinəki aktivliyindən fərqlənir. Bu fermentin aktivliyi qarğıdalıda 1 – 100 Qr –ə bərabər şüalanma dozası oblastında kontrolla nəzərən şüalanma dozasının artması ilə müntəzəm artır. Bu doza oblastında ferment aktivliyinin şüalanma dozasından xətti asılılığı müşahidə

olunur. 100 Qr -dən yüksək dozalarda isə bu fermentin aktivliyinin artmasında müəyyən stabilləşmə müşahidə olunur.

Burada bir faktı da qeyd etmək yerinə düşərdi. Belə ki, katalaza fermentinin aktivliyi 1 və 5 Qr şüalanma dozalarında noxud bitkisinə qarşıdalıya nisbətən çox olduğu halda, şüalanma dozasının 10 Qr -dən böyük qiymətlərindən isə bu fermentin aktivliyi, əksinə, qarşıdalı bitkisinə noxuda nisbətən yüksək olur.

Nəticələrə əsaslanaraq, hesab etmək olar ki, katalaza fermenti noxud bitkisi üçün aşağı doza oblastında yüksək fəallıq göstərdiyi halda, qarşıdalı bitkisi üçün o, yuxarı doza oblastında daha fəal olur.

Askorbatperoksidazanın aktivliyinə dair aldığımız nəticələrdən aydın olur ki, qarşıdalı bitkisinə bu ferment katalaza fermentinə oxşar formada fəaliyyət göstərir. Belə ki, bu halda da şüalanma dozasının artması ilə bu fermentin aktivliyi artaraq müəyyən maksimal qiymətə çatır. Şüalanma dozasının sonrakı artımı isə ferment aktivliyini dəyişdirmir. Şüalanma dozasının 50 Qr qiymətində bu fermentin aktivliyində 2 dəfəyə, 100 Qr qiymətində 4 dəfəyə qədər artım müşahidə olunur (şəkil 3).



Şək. 3. Qarşıdalı və noxud bitkilərində askorbatperoksidaza fermentinin aktivliyinin şüalanma dozasından asılılığı

Noxud bitkisinə askorbatperoksidazanın aktivliyinin təyininə dair aldığımız nəticələrdən isə ən çox diqqəti cəlb edən bu bitkinin kontrol nümunəsinin qarşıdalının kontrol nümunəsi ilə müqayisədə çox yüksək (təqribən 10 dəfə) aktivliyə malik olmasıdır. Digər maraqlı fakt isə bütün doza oblastında şüalanma dozasının artması ilə bu fermentin aktivliyində azalma tendensiyasının müşahidə olunmasıdır. Bu halda 1 - 50 Qr -ə bərabər doza oblastında fermentin aktivliyində zəif, 50-300 Qr doza oblastında isə sıfıra yaxınlaşmaqla kəskin azalma müşahidə olunur.

İndi də aldığımız nəticələrin əsasında müxtəlif fəsilədən olan qarşıdalı və noxud bitkilərində antioksidant fermentlərin aktivliklərinə dair paralellər aparmaqla, ümumiləşmiş fikirlər söyləməyə cəhdlər edək.

Nəticələrdən aydın olur ki:

- tədqiq olunan bitkilər fərqli ilkin müdafiə potensialına malik olurlar;
- tədqiq etdiyimiz bitkilərin antioksidant müdafiə sistemi radiasiya stressi şəraitində müxtəlif formada fəaliyyət göstərir;

- bütün doza oblastında katalaza və askorbatperoksidaza fermentləri hər iki bitkidə oxşar formada fəaliyyət göstərir. Daha dəqiq desək, qarğıdalı bitkisi üçün aşağı dozalarda katalaza və askorbatperoksidaza fermentləri nisbətən kiçik, yuxarı dozalarda isə nisbətən yüksək aktivlik nümayiş etdirir. Noxud bitkisində isə, əksinə, aşağı dozalarda bu fermentlər yüksək, yuxarı dozalarda isə kiçik aktivliyə malik olurlar;
- superoksiddismutaza fermenti tədqiq etdimiz bitkilərdə fərqli formada fəallıq göstərir. Daha dəqiq desək, qarğıdalı bitkisində 1və 5 Qr dozalarda bu fermentin aktivliyi kontrol nümunənin aktivliyindən, demək olar ki, fərqlənir. Noxud bitkisində isə bu dozalarda superoksiddismutazanın aktivliyi kəskin artır, yuxarı doza oblastında isə fermentin aktivliyi hər iki bitkidə kiçik olur.

Qeyd edək ki, tədqiq etdiyimiz bitkilərin fərqli müdafiə potensialına malik olması faktı tamamilə başadüşüləndir. Belə ki, bitkilərdə təkamül prosesində antioksidant müdafiə sisteminin formalaşmasında ətraf mühit şəraiti müstəsna rola malik olur. Bu baxımdan onlarda fərqli potensiala malik müdafiə sistemi formalaşır ki, bu da onların ətraf mühit dəyişmələrinə davamlılığını müəyyən edir.

Katalaza və askorbatperoksidaza fermentlərinin müəyyən şəraitlərdə oxşar formada fəaliyyət göstərə bilmələri faktını isə bu fermentlərin hər ikisinin hidrogen peroksidin zərərsizləşdirilməsində oxşar rola malik olmaları ilə izah etmək mümkündür.

Ədəbiyyat

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., изд-во «Высшая школа», 1990, 293 с
2. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007, 137 с.
3. Тодоров И.Н., Тодоров Г.И. Стресс и старение и их биохимическая коррекция. М.: Наука, 2003. 249 с.
4. Чупахина Г.Н.. Абиотические факторы, определяющие пул антиоксидантов растений. Вестник Российского гос. университета им. И. Канта. Сер. Естественные науки. 2009, Вып.7. с. 55-63
5. Rios -Gonzales K., Erdei L., Lips S.H. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources // Plant sci., 2002, v. 162, p. 923-930.
6. Giannopolites C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants // Plant Physiol., 1997, v. 59, №2, p. 309-315.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ КУКУРУЗЫ И ГОРОХА, СЕМЕНА КОТОРЫХ ПОДВЕРГЛИСЬ ПРЕДПОСЕВНОМУ γ –ОБЛУЧЕНИЮ

Дж. Р. Оруджева, М.З. Велиджанова, Э.С. Джафаров

Резюме: В работе представлены результаты исследования влияния предпосевного гамма облучения в разных дозах на функционирование антиоксидантных ферментов в растениях кукурузы и гороха.

Установлено, что контрольные образцы этих растений обладают разными защитными потенциалами и предпосевное гамма облучение по-разному влияет на активность антиоксидантных ферментов. При этом активности ферментов кроме вида растений зависит также от дозы облучения.

Ключевые слова: радиационный стресс, кукуруза, горох, каталаза, аскорбатпероксидаза, супероксиддисмутаза, антиоксидантная система защиты

COMPARATIVE STUDY OF THE FUNCTIONING OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN MAIZE AND PEA PLANTS, THE SEEDS OF WHICH HAVE UNDERGONE PRESOWING GAMMA IRRADIATION

J.R. Orujova, M.Z. Velijanova, E.S. Jafarov

Abstract: The paper presents the results of a study of the effect of presowing gamma irradiation in different doses on the functioning of antioxidant enzymes in maize and pea plants.

It has been established that the control samples of these plants have different protective potentials and the presowing gamma irradiation affects the activity of antioxidant enzymes in different ways. In this case, the activity of enzymes besides the plant species also depends on the radiation dose.

Key words: radiation stress, maize, pea, catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, antioxidant defense system