



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2201671
(22) 26.04.2022
(46) Бюл. 191, 2022
(71)(73) Таджикский национальный Университет (TJ)
(72) Бободжонова М.А. (TJ); Сайфудинов А.К. (TJ)
(54) **СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОТОСИНТЕЗА ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА**
(56) 1. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2001, 336 с. Приложение к журналу "Защита и карантин растений"
2. Чернядьев И.И. и соавт. Влияние 6-бензиламинопурина, тидиазурина и картолина-2 на продуктивность многолетних злаков / Чернядьев И.И., Козловских А.Л.; Образцов А.С., Лукашевич П.И. //Агрохимия. - 1989. - № 7. - С. 102-106.
3. Муромцев Г.С. и соавт. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений /Муромцев Г.С., Чкаников Д.И., Кулаева О.Н., Гамбург К.З. - М.: Агропромиздат, 1987. - 384 с.
4. Letham D.S., Palni L.M.S. The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins (Биосинтез и метаболизм цитокининов) //Annu. Rev. Plant Physiol. And Plant Mol. Biol. 1983. V. 34. - P.163-197.
(57) Изобретение относится к биологии, а именно к биотехнологии и биохимии растений получению растений хлопчатника сорта 108-Ф с повышенной активностью ключевых ферментов фотосинтеза - рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы,

2

фосфорибулокиназы, рибозофосфатизомеразы и образующих их мультиферментный комплекс.

Техническое решение представляет собой способ повышения активности мультиферментного комплекса с помощью добавления различных концентраций кинетина в экстракты из листьев хлопчатника, выделенные в разные фазы развития растений – 5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения.

Технический результат достигается тем, что с помощью добавления различных концентраций кинетина в экстракты из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, выделенные в разные фазы развития растений, 5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения повышается активность мультиферментного комплекса.

Для всех фаз развития растений оптимальной концентрацией кинетина оказалось 3 мкмоль/мл реакционной среды. В фазе развития растений 5-6 настоящих листьев и бутонизации активирующее действие кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса несколько снизилась при концентрации кинетина 4-5 мкмоль/мл реакционной среды.

В фазе же цветения активирующее действие кинетина оставалось на одном уровне при концентрациях кинетина 3,4 и 5 мкмоль/мл реакционной среды. Следовательно, в фазе цветения у растений хлопчатника повышена потребность в кинетине.

Изобретение относится к биологии, а именно к биотехнологии и биохимии растений получению растений хлопчатника сорта 108-Ф с повышенной активностью ключевых ферментов фотосинтеза - рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, фосфорибулокиназы, рибузофосфатизомеразы и образующих их мультиферментный комплекс.

По современным представлениям фотосинтезу принадлежит ведущая роль в продукционном процессе. Интенсивность же фотосинтеза обусловлена активностью ключевых ферментов фотосинтеза рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (КФ 4.1.1.39) фосфорибулокиназы (КФ 2.7.1.19) и рибузофосфатизомеразы (КФ 5.3.1.6.). Фосфорибулокиназа катализирует конечную реакцию регенерации акцептора углекислоты - рибулозо - 1,5 бисфосфата.

Известно, что фитогормоны повышают интенсивность фотосинтеза, оказывают влияние на структурную организацию пластид, индуцируют синтез белка в хлоропластах и способствуют накоплению в них хлорофилла (1).

Главной мишенью цитокининов в растительной клетке являются пластиды, цитокинины способствуют превращению этиопластов в хлоропласты, формированию системы внутренних мембран и сборке компонентов электрон-транспортной цепи хлоропластов, возрастанию синтеза хлорофилла, синтеза многих ферментов, особенно рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (2- 4).

Очень успешно цитокинины находят практическое применение. В агропроизводстве их используют для усиления кущения растений, изменения формы и увеличения размеров ряде плодов, повышения доли женских цветков (огурцы и др.), всхожести семян, устойчивости к абиотическим стрессом и болезням, предуборочной дефолиации (хлопчатник и др.) и т.д. Совместно с ауксинами цитокинины применяют в биотехнологии при выращивании клеточных и каллусных линий в стерильной культуре и при получении трансгенных растений.

Работы по созданию растений с направленными изменениями гормональной регуляции имеют огромные перспективы для получения новых форм полезных растений с хорошей защитной реакцией.

Техническим результатом изобретения является способ повышение активности ключевых ферментов фотосинтеза листьев хлопчатника.

Технический результат достигается тем, что с помощью добавления различных концентраций кинетина в экстракты из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, выделенные в разные фазы развития растений, 5-6 настоящих листьев, бутонизации и цветения повышается активность мультиферментного комплекса.

Для определения влияния кинетина на ферменты мультиферментного комплекса цикла Кальвина экстракты из листьев растений хлопчатника различного возраста инкубировали в течение 20 мин с 2мкмоль кинетина и реакционной смесью без субстрата при температуры 25°C. Реакция начиналась при добавлении субстрата - рибулозо-5-фосфат. Продолжительность реакции 1 мин. Реакция останавливали 6% трихлоруксусной кислотой (ТХУ). При переходе растительного организма с одной стадии развития на другую изменяется его гормональный гомеостаз. Фитогормоны в онтогенезе растений являются тем инструментом, который геном управляет процессами роста, развития и покое растений. При этом фитогормоны участвуют и в регуляции таких физиологических процессов, как фотосинтез, транспорт веществ и отложение их в запас.

Для успешного получения растений с направленными изменениями гормональной регуляции необходимы углубленные исследования их действия на активность и синтез фотосинтетических ферментов, ответственных за фиксацию углекислоты и синтез первичных органических соединений, т.е. ферментов цикла Кальвина. Ведь при участии фотосинтеза происходит синтез фитогормонов, с которым связаны первичные механизмы роста.

Пример 1. Для изучения влияния различных концентраций кинетина в реакционной среде на карбоксилазную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев. Субстрат – рибулозо -5 - фосфат+АТФ

Результаты определения карбоксилазной активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы мультиферментного комплекса в экстракт из листьев хлопчатника сорта 108-Ф, выделенного в фазе развития растений 5-6 настоящих листьев приведены в табл. 1.

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность РБФК/О, 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 табл.1 видно, что в ситуации, при которой кинетин вносился в реакционную среду в концентрациях 1 мкмоль/мл, карбоксилазная активность РБФК/О становилась на 24% больше. А в ситуации, при которой кинетин вносился в реакционную среду в концентрациях 1,5 мкмоль/мл, карбоксилазная активность РБФК/О становилась на 51% больше. Что касается ситуации, при которой кинетин вносился в реакционную среду в концентрациях 2-3 мкмоль/мл, то карбоксилазная активность РБФК/О увеличивалась более чем на 200%. Если же использовались такие концентрации кинетина, которые превышали 3 мкмоль/л, то здесь активирующее воздействие, с которым сталкивался фермент, не-

сколько снижалось и составляло 212 - 192-141% соответственно.

Результаты определения фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе 5-6 настоящих листьев при добавлении различных концентраций кинетина в реакционную среду при использовании собственного специфического субстрата фермента рибулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата+АТФ - субстрата первого фермента мультиферментного комплекса – рибозофосфатизомеразы приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Зависимость от использования различных субстратов влияния разных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстракте из листьев хлопчатника сорта 108-Ф (фаза развития растений 5-6 настоящих листьев)

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка			
	Рибулозо-5-фосфат	Активация, %	Рибозо-5-фосфат	Активация, %
-	16.5±0.23	100	18.1±0.27	110
0.5	19.5±0.27	112	22.0±0.30	133
1	20.0±0.30	121	24.0±0.34	145
2	20.5±0.28	124	24.5±0.33	148
3	28.0±0.40	170	31.6±0.44	191
4	25.6±0.35	155	28.1±0.39	170
5	20.1±0.28	122	22.2±0.31	134
10	15.7±0.21	-	16.5±0.28	-
15	12.5±0.17	-	14.1±0.19	-

Из представленных в табл. 2 данных видно, что независимо от использованного субстрата фосфорибулокиназная активность возрастала при концентрации кинетина 0,5-5 мкмоль/мл реакционной среды. Величины же активирующего действия кинетина зависят от использованного субстрата. В присутствии собственного специфического субстрата – рибулозо-5-фосфата наибольшее активирующее действие кинетина проявлялось при концентрации кинетина 3-4 мкмоль/мл реакционной среды -170-155% соответственно, при применении рибозо-5-фосфата в качестве субстрата величины фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса при всех концентрациях кинетина были значительно выше 133-191%. В присутствии рибулозо-5-фосфата + АТФ кинетин в концентрации 1 мкмоль/мл реакционной среды увеличивая фосфорибулокиназную активность на 21%, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата + АТФ – на 45%. При содержании кинетина в реакционной среде 2 мкмоль/мл реакционной среды фосфорибулокиназная активность в присутствии собственного специфического субстрата рибулозо-5-фосфата + АТФ возрастала на 24%, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата + АТФ – на 48%. При концентрации кинетина 3 мкмоль/мл реакционной среды фосфорибулокиназная активность в присутствии рибулозо-5-фосфата + АТФ увеличивалась на 70%, а при использовании в качестве субстрата рибозо-5-фосфата + АТФ на 91%. Концентрация кинетина 4 мкмоль/мл реакционной среды вызывала возрастание фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса

при использовании рибулозо-5-фосфата + АТФ на 55%, а в присутствии рибозо-5-фосфата + АТФ на 70% концентрация кинетина 5 мкмоль/мл реакционной среды приводила к возрастанию фосфорибулокиназной активности в присутствии рибулозо-5-фосфата + АТФ на 22%, а при использовании рибозо-5-фосфата + АТФ на 34%.

Независимо от использованного субстрата при концентрациях кинетина 10 и 15 мкмоль/мл реакционной среды происходило ингибирование фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что мультиферментный комплекс обладает большей чувствительностью к кинетину, значительное активирующее действие которого проявляется уже при концентрациях 1-2 мкмоль/мл реакционной среды.

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

Пример 2. На основании полученных результатов дальнейшие исследования проводились при использовании в качестве субстрата фосфорибулокиназы рибозо - 5 - фосфата + АТФ.

Результаты определения при добавлении в реакционную среду различных концентраций кинетина фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в фазе бутонизации растений приведены в табл. 3.

Таблица 3.

Влияние различных концентраций кинетина в реакционной среде на фосфорибулокиназную (ФРК) активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника сорта 108-Ф в фазе бутонизации растений (субстрат: рибозо-5-фосфат+АТФ)

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	
	Бутонизация	Активация, %
-	20.4±0.30	100
0.5	23.6±0.35	117
1	25.5±0.38	126
2	27.4±0.41	136
3	38.5±0.58	191
4	33.7±0.50	167
5	21.2±0.31	105
10	18.4±0.28	-
15	14.3±0.21	-

При сравнении величин фосфорибулокиназной активности мульти ферментного комплекса в фазе развития хлопчатника 5-6 настоящих листьев и в фазе бутонизации, активность в фазе бутонизации возросла на 30%.

Добавление кинетина в реакционную среду в концентрации 1-2 мкмоль/мл реакционной среды в фазе бутонизации растений вызвало активацию фосфорибулокиназной активности на 26-36% соответственно.

При концентрации же кинетина 3 мкмоль/мл реакционной среды фосфорибулокиназная активность возросла на 91%.

При концентрации кинетина 4 мкмоль/мл реакционной среды активирующее действие кинетина несколько снижалось и достигало 67%.

Концентрация кинетина 5 мкмоль/мл реакционной среды не оказывала влияния на фосфорибулокиназную активность мульти ферментного комплекса.

Концентрации кинетина 10-15 мкмоль/мл реакционной среды подавляли фосфорибулокиназную

активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника.

Пример 3. Результаты определения при добавлении в реакционную среду различных концентраций кинетина на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев хлопчатника, выделенных в фазе цветения представлены табл. 4.

Сравнение величин фосфорибулокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев, выделенных в фазе бутонизации растений и в фазе цветения выявили значительные различия в действии кинетина при концентрациях 4-5 мкмоль/мл реакционной среды.

В концентрации 4 мкмоль/мл реакционной среды кинетин оказывал активирующее действие на 67% на фосфорибулокиназную активность мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев, выделенных в фазе бутонизации растений.

Концентрация же 5 мкмоль/мл реакционной среды не оказывала никакого влияния, т.е. не увеличивала и не подавляла фосфорибулокиназную активность.

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

Кинетин, мкмоль/мл реакционной среды	Активность ФРК, мкмоль РБФ/мин на 1 мг белка	
	Цветение	Активация, %
-	21.2±0.32	100
0.5	30.5±0.45	143
1	30.8±0.46	145
2	31.4±0.47	148
3	40.1±0.60	189
4	38.6±0.58	182
5	38.2±0.57	180
10	19.3±0.29	-
15	15.5±0.23	-

Добавление кинетина в концентрации 4-5 мкмоль/мл реакционной среды приводила к активации фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса в экстрактах из листьев растений, выделенных в фазе цветения на 82-80% соответственно.

Для всех фаз развития растений оптимальной концентрацией кинетина оказалось 3 мкмоль/мл реакционной среды. В фазе развития растений 5-6 настоящих листьев и бутонизации активирующее действие кинетина на фосфорibuлокиназную активность мультиферментного комплекса несколько снижалась при концентрации кинетина 4-5 мкмоль/мл реакционной среды.

В фазе же цветения активирующее действие кинетина оставалось на одном уровне при концентрациях кинетина 3,4 и 5 мкмоль/мл реакционной среды. Следовательно, в фазе цветения у растений хлопчатника сорта 108-ф повышена потребность в кинетине.

Таким образом, полученные результаты дают основание считать, что в сравнении с фазой развития растений 5-6 настоящих листьев в фазах бутонизации и цветения для значительной активации (от 40 до 90%) фосфорibuлокиназной активности мультиферментного комплекса необходимы более высокие концентрации кинетина.

Формула изобретения

Способ повышения активности ключевых ферментов фотосинтеза в экстрактах, из листьев хлопчатника выделенных в фазе бутонизации и цветения и 5-6 настоящих листьев, путем воздействия на

них раствором кинетина в концентрации 3-5 мкмоль/мл.

Компьютерный набор: Нигораи А.