

# AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

*Əlyazması hüququnda*

## **DƏNLİ BİTKİLƏRDƏ İŞIQLA İNDUKSIYA OLUNAN PROTEOM VƏ METABOLOM DƏYİŞİKLİKLƏRİ**

İxtisas: 2415.01 – Molekulyar biologiya

Elm sahəsi: Biologiya

İddiaçı: **Aynurə Nağı qızı Paşayeva**

Fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi  
almaq üçün təqdim edilmiş dissertasiyanın

### **AVTOREFERATI**

**Bakı – 2022**

Dissertasiya işi AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun Proteomiks beynəlxalq laboratoriyasında və Pusan Milli Universitetinin Molekulyar Biologiya Departamentində yerinə yetirilmişdir (Koreya Respublikası).

Elmi rəhbər: biologiya üzrə fəlsəfə doktoru  
**İsmayıl Söhbət oğlu Zülfüqarov**

Rəsmi opponetlər: biologiya elmləri doktoru, professor,  
Ukrayna MEA-nın müxbir üzvü  
**Viktor Anatolyeviç Kunax**

biologiya elmləri doktoru, dosent  
**İrina Vasilyevna Goldenkova-Pavlova**

fizika-riyaziyyat elmləri doktoru,  
professor  
**Rövşən İbrahimxəlil oğlu Xəlilov**

Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən ED 1.25 Dissertasiya şurası.

Dissertasiya şurasının sədri: biologiya elmləri doktoru,  
professor, AMEA-nın həqiqi üzvü  
**İradə Məmməd qızı Hüseynova**

Dissertasiya şurasının elmi katibi: biologiya üzrə fəlsəfə doktoru,  
dosent  
**Ulduzə Əhməd qızı Qurbanova**

Elmi seminarın sədri: biologiya elmləri doktoru,  
AMEA-nın müxbir üzvü  
**İlham Əliyev oğlu Şahmuradov**



## İŞİN ÜMUMİ XARAKTERİSTİKASI

**Mövzunun aktuallığı və işlənmə dərəcəsi** Fotosintez - sianobakteriyalardan tutmuş bitkilərə qədər fotosintetik orqanizmlər tərəfindən günəş enerjisini kimyəvi enerjiyə çevirən təbii prosesdir. Bitkilərin daim dəyişən işıq mühitinə səmərəli uyğunlaşması fotosintetik aparatın tənzimləyici çevikliyi və çoxlu sayda adaptiv mexanizmlərin formalaşmasını tələb edir. Fotosintetik aparat tərəfindən həddindən artıq udulmuş günəş enerjisi oksigenin fəal formalarının (OFF) artmasına səbəb ola bilər ki, bu da xloroplastlarda zülal sintezinin ləngiməsinə və fotosintezin sürətinin azalmasına gətirib çıxara bilər. Buna görə də, bitkilər dəyişən işıqlandırma şəraitində iki fotosistem arasında işıq enerjisinin paylanmasına imkan yaradan və fotosintetik aparatı qoruyan fotoqoruyucu mexanizmlər inkişaf etdirmişlər. Xlorofil flüoresensiyasının qeyri-fotokimyəvi sönməsi (QFS) və tilakoid zülallarının fosforlaşması vaskulyar (damarlı) bitkiləri artıq işıq enerjisinin təsirindən və fotozədələnmədən mühafizə edən iki qısa müddətli cavab mexanizmidir. Dəyişən işıq şəraitində fotosistem (FS) II-nin nüvə (core complex) və işıq toplayan (antena) kompleksi (İTK) II-nin zülallarının geri dönmə fosforlaşması və istilik enerjisinin yayılmasında iştirak edən PsbS zülalının protonlaşması FSI və FSII arasında enerji paylanmasını tənzimləyir<sup>1</sup>. Son illərin tədqiqatları göstərmişdir ki, PsbS zülalının çatışmazlığı OFF sintezinin artmasına səbəb olur, həmçinin işıqlandırma nəticəsində İTKII zülallarının fosforlaşmasını sürətləndirə bilər. Məsələn, FSII-nin PsbS zülalı çatışmayan *Arabidopsis* bitkiləri (*npq4-1*) yabani növ bitkiyə (YN) nisbətən işıqlanma zamanı İTKII-nin fosforlaşmasını daha yüksək səviyyədə saxlayır və bununla da, OFF-nin əmələ gəlməsində dəyişiklik yaradır<sup>2</sup>. PsbS zülalı çatışmayan düyü bitkisi

<sup>1</sup> Pashayeva, A. Role of thylakoid protein phosphorylation in energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in rice plants / A.Pashayeva, G.Wu, I.Huseynova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences, – 2021, 22(15), – p. 7978.

<sup>2</sup> Breitholtz, H. LHC II protein phosphorylation in leaves of *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in non-photochemical quenching / H.Breitholtz, R.Srivastava, E.Tyystja [et al.] // Photosynthesis Research, – 2005, 84(1), – p. 217–223.

də (PsbS-KO) OFF-nın yüksək səviyyədə yaranmasını nümayiş etdirir<sup>3</sup>.

Bütün bu tədqiqatlar belə bir fərziyyə yaratmışdır ki, təbii şəraitdə vaskulyar bitkilərdə QFS və tilakoid zülallarının fosforlaşması sinxron işləyir<sup>4</sup> və qeyri-sabit işıqlandırma şəraitinə uyğunlaşmaq üçün bitkilərin nüvə və antena zülallarının geri dönən fosforlaşması ilə yanaşı QFS-nin (əsasən enerjidən asılı - qE komponenti) uyğunlaşdırılmış fəaliyyətinə ehtiyacı vardır.

Bu istiqamətdə tədqiqatların sayının artmasına baxmayaraq, QFS ilə tilakoid membran zülallarının fosforlaşması arasında əlaqəni aydınlaşdıran tədqiqat işləri və eksperimental məlumatlar kifayət qədər deyil. Buna əsaslanaraq, dissertasiya işinin əsas istiqaməti müxtəlif işıq intensivliklərinin təsiri altında tilakoid membran zülallarının fosforlaşma dinamikası ilə QFS-nin əsas komponenti olan qE arasında əlaqənin öyrənilməsi olmuşdur.

**Tədqiqatın məqsəd və vəzifələri.** Bitkilərdə proteom və metabolom dəyişikliklərini tədqiq etməklə, müxtəlif stres şəraitinə adaptasiya mexanizmlərinin öyrənilməsi və QFS-nin enerjidən asılı komponenti (qE) ilə fosforlaşma prosesi arasında qarşılıqlı əlaqənin aydınlaşdırılması. Bu məqsədə nail olmaq üçün aşağıdakı vəzifələr qarşıya qoyulmuşdur:

- Yüksək işıq intensivliyinin təsiri altında FSII-nin nüvə və İTK-nın ayrı-ayrı zülalları səviyyəsində dəyişiklikləri müəyyən etmək;
- FSII kompleksində PsbS zülalının lokalizasiyasını identifikasiya etmək;
- Düyü bitkisinde PsbS zülalının çatışmamazlığının tilakoid membran lipid və piqment tərkibinə təsiri təyin etmək;
- Düyü bitkisinde zülalların fosforlaşması ilə QFS arasında olan qarşılıqlı əlaqəni müəyyən etmək;
- Tilakoid membran zülallarının fosforlaşma səviyyəsinin qE-dən

---

<sup>3</sup> Zulfugarov, I.S. Production of superoxide from Photosystem II in a rice (*Oryza sativa* L.) mutant lacking PsbS / I.S.Zulfugarov, A.Tovuu, Y.J.Eu [et al.] // BMC Plant Biology, – 2014, 14(1), – p. 1–15.

<sup>4</sup> Gollan, P.J., Aro, E.M. Photosynthetic signalling during high light stress and recovery : targets and dynamics // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, – 2020, 375(1801), – p. 3–5.

asıllığını aydınlaşdırmaq;

- Quraqlıq və təkrar suvarmanın quraqlığa davamlılığına görə fərqlənən buğda genotiplərinin proteom profilinə təsirini qiymətləndirmək;
- OFF-nin əmələ gəlmə sürətinin FSII-də PsbS zülalının iştirakından asılılığını qiymətləndirmək;
- Müxtəlif spektral tərkibli işığın piqment-zülal komplekslərə təsirini qiymətləndirmək;

#### **Müdafiəyə çıxarılan əsas müddəalar:**

- FSII kompleksin tərkibində PsbS zülalının olmaması mutant bitkilərin yüksək intensivlikli işığa daha həssas olmasına səbəb olur;
- PsbS zülalına görə mutant bitkilərin İTKII-si, ehtimal ki, ilkin olaraq qeyri-fotokimyəvi sönmə vəziyyətində olur;
- PsbS zülalının çatışmazlığı ilə əlaqəli OFF-nin intensiv sintezi FSII zülallarının fosforlaşma səviyyəsinin artmasına səbəb ola bilər;
- Qeyri-fotokimyəvi sönmənin relaksasiya kinetikasi FSII-nin antenasında zülalların fosforlaşmasına təsir göstərə bilər;
- Müxtəlif spektral tərkibli işıqla induksiya bitkilərdə FSII-nin effektivliyinə təsir göstərə bilər.

**Tədqiqatın elmi yeniliyi.** Dissertasiya işində ilk dəfə olaraq yerli yumşaq buğda sortlarında qaranlığa uyğunlaşma və işığın təsirindən sonra QFS-nin induksiya və relaksasiyasının müqayisəli kinetikasi təqdim olunmuşdur. Quraqlığa davamlı və həssas buğda sortlarından istifadə etməklə rehidratasiya prosesindən əvvəl və sonra piqment-zülal komplekslərinin paylanma dinamikası aydınlaşdırılmışdır.

İlk dəfə olaraq, FSII ilə zəngin tilakoid membranı fraqmentlərindən (BBY hissəcikləri) istifadə etməklə, düyü bitkilərində PsbS zülalının lokalizasiyası müəyyən edilmişdir.

İlk dəfə olaraq müxtəlif işıq intensivliyində düyü bitkilərində QFS-nin qE komponentindən asılı olaraq, tilakoid membranı zülallarının fosforlaşma dinamikası göstərilmişdir.

**Tədqiqatın nəzəri və praktiki əhəmiyyəti.** Dünyada ərzaq məhsullarına olan tələbatın ödənilməsi üçün əsas problemlərdən biri xarici mühitin stres faktorlarına qarşı davamlı və məhsuldar kənd

təsərrüfatı bitkilərinin yaradılmasıdır. Fotosintez prosesinin optimallaşdırılması bu problemin həlli yollarından biridir. Dissertasiya işində işığa qısa müddətli uyğunlaşma zamanı fotosintetik pigment-zülal komplekslərinin dinamik təbiəti haqqında əldə etdiyimiz nəticələr qida məhsulları və bioenerji istehsalında gələcək problemlərin qlobal həlli üçün istifadə oluna bilər. İşığın intensivliyində dinamik dəyişikliklər zamanı zülalların fosforlaşması ilə QFS arasındakı əlaqəyə dair əldə edilən nəticələr, bitkilərin əlverişsiz ətraf mühit amillərinə qarşı müqavimətinin artırılmasında, habelə kənd təsərrüfatı bitkilərinin yeni yüksək məhsuldar sortlarının əldə edilməsində istifadə oluna bilər.

**Aprobasiyası və tətbiqi.** Dissertasiya işinin əsas elmi nəticələri “Elm, İnnovasiya və Texnologiyaların İnkişafında Gənc Alimlərin Rolu” mövzusunda 2-ci Beynəlxalq Konfransı (Düşənbə, Tacikistan, 2017); “Biomüxtəlifliyin qorunmasına innovativ yanaşmalar” Beynəlxalq Konfrans (Bakı, 2016); Gənc Alim və Tələbələrin Konfransı, Qlobal çağırışların həlli üçün biologiya və kənd təsərrüfatında innovasiyalar (Bakı, 2018); Gənclər gününə həsr olunmuş “Müasir biologiyanın aktual problemləri” mövzusunda elmi-praktiki konfrans (Bakı, 2019); Ümummilli lider Heydər Əliyevin anadan olmasının 96-cı ildönümünə həsr olunmuş Tələbələrin I Respublika Elmi Konfransı (Bakı, 2019); Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyasının 75 illik yubileyinə həsr olunmuş “Fundamental və tətbiqi elmlərin müasir problemlərinin həllində multidissiplinar yanaşma” mövzusunda Gənc Alim və Mütəxəssislərin ikinci Beynəlxalq Elmi Konfransı (Bakı, 2020), həmçinin AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun laboratoriya və elmi seminarlarında təqdim edilərək müzakirə olunmuşdur

**Nəşrlər.** Dissertasiya işinin nəticələri üzrə 14 elmi əsər nəşr olunmuşdur ki, onlardan 8-i respublika və beynəlxalq jurnallarda elmi məqalələr və 6-sı məruzə tezisi.

**Dissertasiyanın quruluşu və həcmi.** Dissertasiya işi giriş, 3 fəsil, tədqiqatların yekun təhlili, nəticələr, ixtisarlara siyahısı və 303 adda istinad olunan ədəbiyyat siyahısından ibarətdir. Tədqiqat işinə, 32 şəkil və 19 cədvəl daxil olmaqla ümumi həcmi 172 səhifədən ibarətdir.

# İŞİN ƏSAS MƏZMUNU

## I FƏSİL. ƏDƏBİYYAT İCMALI

Bu fəsildə dissertasiyanın mövzusunə uyğun olaraq ədəbiyyat icmalı təqdim olunmuşdur. Bitkilərin hüceyrə homeostazının bərpası, toksik birləşmələrin kənar edilməsi, zədələnmiş zülalların və başqa tərkib elementlərinin müdafiə və bərpası üçün aktivləşən stresə cavab reaksiyalarının əsas mexanizmləri analiz olunmuşdur.

Tilakoid membranına aid olan piqment-zülal komplekslərinin, FSI və FSII, onların uyğun antena komplekslərinin ümumi təşkili, həmçinin enerji çevrilmə reaksiyalarının funksiyasını və tənzimlənməsini anlamaq üçün fotosintez mexanizmlərinin qarşılıqlı təsirinə ümumi icmalı verilmişdir. Bitkilərin abiotik streslərə qısa müddətli uyğunlaşmasının əsas mexanizmləri və OMİKS istiqamətlərinin rolu təsvir edilmişdir.

## II FƏSİL. TƏDQIQATIN OBYEKTİ VƏ METODLARI

Tədqiqat obyektini olaraq yabani növ (YN) və *PsbS* geninə görə nokaut olan *PsbS-KO* və *npq4-1* mutant düyü (*Oryza sativa* L.) və arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) bitkiləri, uyğun olaraq, istifadə olunmuşdur. Həmçinin, quraqlığa davamlılığına görə fərqlənən yerli yumşaq buğdanın (*Triticum aestivum* L.) Qobustan və Tale-38 sortları istifadə olunmuşdur.

Eksperimental bitkilər tilakoid membranı təcrid etməzdən əvvəl qaranlığa uyğunlaşdırılmış (kontrol) və həmçinin aşağı intensivlikli işıqla (Aİ:  $50 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 10 dəqiqə və 1 saat ərzində və ya yüksək intensivlikli işıqla (Yİ:  $700 - 1500 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 10 dəqiqə və 1 saat ərzində işlənmişdirlər.

Quraqlığın və rehidratasiyanın təsiri mum fazasında adi buğda nümunələrinin aşağıdakı suvarma rejimlərindən birinə məruz qalması yolu ilə öyrənilmişdir: suvarılan (K), quraqlıq (Q) və təkrar suvarılma (R).

Tilakoid membranının zülal komplekslərinin nativ halda ayrılması üçün mavi nativ (BN) gel-elektroforez metodundan istifadə

olunmuşdur<sup>5</sup>. Zülalların polipeptidlərə fraksiyalaşdırılması üçün natrium dodesilsulfat istifadə etməklə denaturasiya şəraitində poliakrilamid gel-elektroforez metodu tətbiq edilmişdir (SDS-PAGE)<sup>6</sup>.

Ayrılmış polipeptidlər Vestern blot analizi üçün poliviniliden flüorid (PVDF) membranına köçürülmüşdür<sup>7</sup>. BN-PAGE-dən birbaşa köçürülmə üsulu ilə immunoblotting Peng və digərlərinə (2009) uyğun olaraq həyata keçirilmişdir<sup>8</sup>.

Flüoresent parametrlər tədqiq olunan nümunələrin yarpaqlarında İmaging PAM flüorimetri (Walz Co., Germany) vasitəsilə ölçülmüşdür<sup>9</sup>.

Piçmentlərin ayrılması yüksək performanslı maye xromatoqrafiya (HPLC) (HP 1100 seriyası, Hewlett-Packard, Waldbronn, Almaniya) sistemində aparılmışdır. Xromatoqrammalar 440 nm-də optiki sıxlığın funksiyası kimi qeydə alınmışdır<sup>10</sup>.

Lipidlərin ayrılması Somersalo və digərlərinə (1986) uyğun olaraq sabit silikagel təbəqəsi olan lövhələrdə (0.25 mm) iki ölçülü nazik təbəqə xromatoqrafiyası (TLC) vasitəsi ilə həyata keçirilmişdir<sup>11</sup>.

Oksigenin fəal formalarının (OFF) səviyyəsinin eksperimental

---

<sup>5</sup> Järvi, S. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: Novel super- and mega-complexes / S.Järvi, M.Suorsa, V.Paakkanen [et al.] // *Biochemical Journal*, – 2011, 439 (2), – p. 207–214.

<sup>6</sup> Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, – 1970, 227 (5259), – p. 680–685.

<sup>7</sup> Tovuu, A. Rice mutants deficient in ω-3 fatty acid desaturase (FAD8) fail to acclimate to cold temperatures / A.Tovuu, I.S.Zulfugarov, G.Wu [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*, – 2016. 109, – p. 525–535.

<sup>8</sup> Peng, Z. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat / Z.Peng, M.Wang, F.Li [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*, – 2009, 8(12), – p. 2676–2686.

<sup>9</sup> Zulfugarov, I.S. Practical guide to measure chlorophyll fluorescence in plants and calculate main chlorophyll fluorescence parameters regulation of PSII repair / I.S.Zulfugarov, A.Pashayeva, Z.M.Okhlopkova [et al.] // *ВЕСТНИК СВФУ*, – 2018, 2(64), – p. 35–44.

<sup>10</sup> Zulfugarov, I.S. Effect of oxygen on the non-photochemical quenching of vascular plants and potential oxygen deficiency in the stroma of PsbS-knock-out rice / I.S.Zulfugarov, G.Wu, A.Tovuu [et al.] // *Plant Science*, – 2019. 286, – p. 1–6.

<sup>11</sup> Somersalo, S., Karunen, P., Aro, E.M.. The acyl lipid composition of wheat leaves and moss protonemata using a new, non- carcinogenic extraction solvent system // *Physiologia Plantarum*, – 1986, 68(3), p. 467-470.



bitkilərin yarpaqlarından təyini histokimyəvi rənglənmə və spektrofotometrik üsulla aparılmışdır<sup>12</sup>.

Statistik cəhətdən əhəmiyyətli fərqlər Microsoft Excel proqramından (one-way ANOVA) istifadə etməklə hesablanmışdır. Bütün şəkillər ImageJ proqramından istifadə etməklə rəqəmsallaşdırılmışdır. Bioloji və analitik təkrarların sayı ən azı üç olmuşdur<sup>13</sup>.

### III FƏSİL. NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

#### 3.1. Müxtəlif intensivlikli işıqın düyü bitkilərinin piqment-zülal komplekslərinin paylanma dinamikasına təsiri

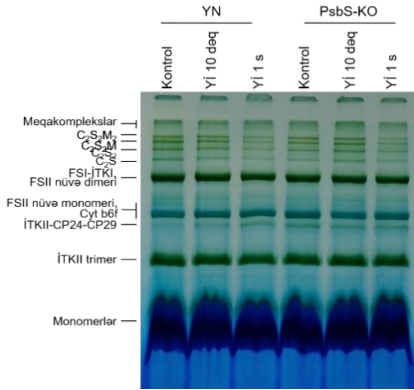
Yabanı növ (YN) və PsbS-KO mutant düyü bitkilərinin BN-PAGE analizinin nəticəsi 10 dəqiqə ərzində yüksək intensivlikli işıqın (Yİ, 700  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) təsirindən sonra superkomplekslərin miqdarında əhəmiyyətli dəyişiklik müşahidə olunmamasına baxmayaraq, PsbS-KO mutantlarında eyni şəraitdə superkompleks zolaqlarının intensivliyi əhəmiyyətli dərəcədə yüksək olmuşdur (Şəkil 1).

İTKII-CP24-CP29 kompleksinə uyğun gələn zolağın intensivliyi YN-də işıqın intensivliyinə uyğun tədricən artmış, mutant nümunələrdə isə qaranlıqda adaptasiya olunmuş kontrol nümunələrə nisbətən azalmışdır. 1 saat müddətində yüksək intensivlikli işıqın (Yİ, 1500  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) təsirinə məruz qaldıqda istər yabanı növ, istərsə də PsbS-KO nümunələrində superkomplekslərə uyğun gələn zolaqların intensivliyi azalmışdır. YN nümunələrində FSII dimerinə uyğun zolaqların intensivliyində əhəmiyyətli dəyişikliklər müşahidə olunmamasına baxmayaraq, mutant nümunələrdə işıqla işlənmədən sonra FSII dimerinin intensivliyi artmışdır. Həmçinin, istər yabanı, istərsə də mutant nümunələrdə 700  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  intensivlikli işıqın təsirinə məruz qaldıqda İTKII trimerinin intensivliyinin artması da müşahidə edilib.

---

12 Zulfugarov, I.S. Production of superoxide from Photosystem II in a rice (*Oryza sativa* L.) mutant lacking PsbS / I.S.Zulfugarov, A.Tovuu, Y.J.Eu [et al.] // BMC Plant Biology, – 2014, 14(1), – p. 1–15.

13 Pashayeva, A. Role of thylakoid protein phosphorylation in energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in rice plants / A.Pashayeva, G.Wu, I.Huseynova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences, – 2021, 22 (15), – p. 7978.



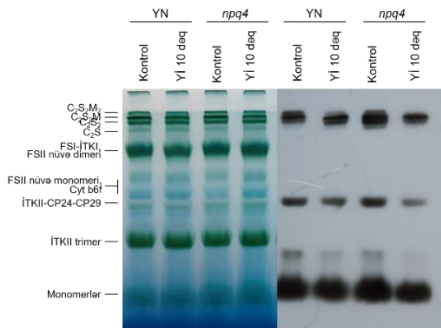
**Şəkil 1.** YN və PsbS-KO düyü bitkilərinin tilakoid pigment-zülal komplekslərinin BN-PAGE analizi.

FSII-nin yüksək işıq intensivliyinə qarşı daha çox həssas olduğunu nəzərə alaraq, növbəti mərhələdə, FSII-nin müəyyən zülalları səviyyəsində fərqləri aşkar etmək üçün, FSII-nin bir sıra zülallarına qarşı anticisimlər istifadə etməklə immunoblot analizi aparılmışdır.

## 3.2. FSII-nin zülallarına yüksək intensivlikli işığın təsirinin öyrənilməsi

### 3.2.1. CP29 zülalının səviyyəsinin işıqla induksiya olunan dəyişməsi

Arabidopsisin YN və *npq4-1* mutant bitkilərində FSII-nin CP29 zülalının paylanması dinamikasının BN-PAGE-dən birbaşa transfer üsulu ilə Vestern blot analizi əsasında öyrənilməsi YN və *npq4-1* nümunələri arasında CP29 zülalının paylanmasında əhəmiyyətli fərqlərin olduğunu göstərmişdir (Şəkil 2).

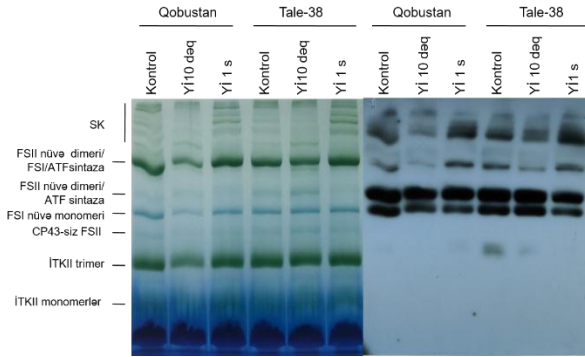


**Şəkil 2.** YN və *npq4-1* Arabidopsis bitkilərinin tilakoid zülallarının BN-PAGE (solda) və immunoblot (sağda) analizləri. Vestern blot analiz üçün CP29 zülalına qarşı anticisimlərdən istifadə edilmişdir.

Təcrübə nəticələri göstərdi ki, CP29 zülalının miqdarı *npq4-1* qaranlığa uyğunlaşmış kontrol bitkilərində yabani növə nisbətən çox olmuşdur. Yüksək intensivlikli işıqla təsir mutant nümunələrdə CP29 zülalının daha çox azalması ilə nəticələnmişdir. Yİ-in təsirindən sonra istər yabani, istərsə də mutant nümunələrdə yüksək molekulyar kütləli superkomplekslərdə CP29 zülalının miqdarında azalma, aşağı molekulyar kütləli superkomplekslərdə isə artma aşkar olunmuşdur. İTK trimeri, monomeri və İTKII-CP24-CP29 zolaqlarında CP29 zülalının miqdarı Yİ-in təsirindən həm yabani, həm də mutant nümunələrdə azalmışdır. PsbS-KO-nun kontrol nümunələrində CP29 zülalının miqdarı yüksək olsa da, yüksək intensivlikli işığın təsirindən sonra onun miqdarı YN-də artmışdır. Mutant PsbS-KO nümunələrində daha çox dəyişikliyin izlənməsi mutant bitkilərin yüksək intensivlikli işıq stresinə yabani növə nisbətən daha həssas olduğunu göstərir. Bundan başqa, yüksək işıq intensivliyində CP29 zülalının miqdarının İTKII-CP24-CP29 zolağında istər İTK trimer, istərsə də monomerlərində azalması bu zülalın FSII kompleksləri ilə zəif əlaqə yaratması və ya nümunələrin hazırlanması prosesində zülalların bir hissəsinin detergentlə yuyulması ilə əlaqələndirilə bilər. Aldığımız nəticə CP29 zülalının fotosistemlər arasında işıq enerjisinin paylanması tənzimlənməsində oynadığı rolu təsdiq etməyə imkan verir.

### **3.2.2. FSII növə kompleksinin D1 zülalının səviyyəsinin işıqla induksiya olunan dəyişməsi**

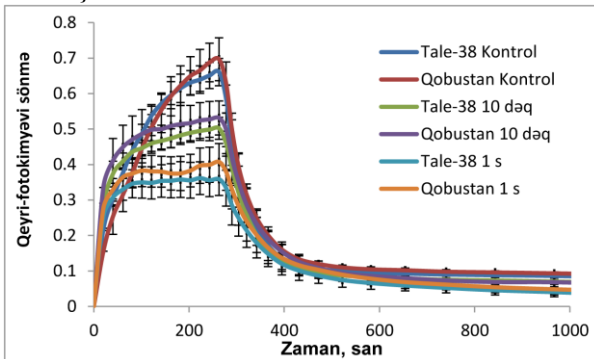
Yumşaq buğda sortları - Qobustan və Tale-38-in tilakoid membran zülal komplekslərinin BN-PAGE analizi əsasında müəyyən edilmişdir ki, kontrol nümunələrinə yüksək işıq intensivliyi ilə 10 dəqiqə müddətində təsir etdikdən sonra Qobustan genotipində superkomplekslərə uyğun zolaqların intensivliyinin zəifləməsi, 1 saatdan sonra isə artması müşahidə edilmişdir (Şəkil 3). Qaranlığa adaptasiya olunduqdan və 1 saat müddətində Yİ təsirinə məruz qaldıqdan sonra FSII dimeri, FSII monomeri, İTKII trimerinə uyğun gələn zolaqlarda əhəmiyyətli dəyişikliklər aşkar olunmasa da, 10 dəqiqə işığın təsirinə məruz qaldıqdan sonra həmin zolaqların intensivliyinin azalması müşahidə olunmuşdur.



**Şəkil 3.** Qobustan və Tale-38 buğda sortlarının BN- PAGE (sol tərəf) və Vestern blot analizləri (sağ tərəf). İmmunoblot analizi üçün D1 zülalına qarşı anticisimlər istifadə olunmuşdur.

Tale-38 nümunəsində 10 dəqiqəlik işıqlanmadan sonra superkomplekslərə uyğun olan zolaqların intensivliyində azalma, FSII dimer zolağının intensivliyində isə artım aşkar edilmişdir. Bir saatlıq işıqlanmadan sonra superkomplekslərə və FSII dimer/FSI/ATF-sintaza kompleksi zolağının intensivliyinin artması, FSII nüvə-dimerin zolağının isə demək olar ki, tamamilə itməsi izlənmişdir.

D1 zülalına qarşı anticisimlərin (Şəkil 3) istifadəsi ilə aparılan immunoblot analiz nəticəsi göstərdi ki, hər iki buğda sortunda istər 10 dəqiqəlik, istərsə də 1 saatlıq işıqlanmadan sonra komplekslər arasında D1 zülalının paylanmasında nəzərəçarpan dəyişikliklər baş vermişdir.



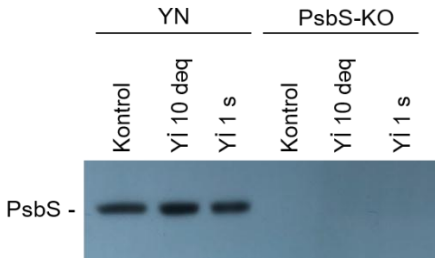
**Şəkil 4.** Müxtəlif işıq intensivliyi ilə təsir edilmiş yumşaq buğda nümunələrində QFS inkişafı.

Qobustan və Tale-38 yumşaq buğda genotiplərində qaranlığa adaptasiya və işıqlanmadan ( $YI\ 700\ \text{mkmol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $1500\ \text{mkmol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 1 saat müddətində) sonra QFS-nin (Şəkil 4)

induksiya və relaksasiyasının tədqiqi istər genotip səviyyəsində, istərsə də işığın intensivliyindən asılı olaraq fərqlərin olduğunu göstərmişdir. Qobustan sortunun nümunələri hər üç təcrübə qrupunda 5 dəqiqəlik işıqlanmadan sonra Tale-38 sortuna nisbətən daha yüksək QFS nümayiş etdirmişlər. Bu zaman hər iki genotipdə işıqlanma müddəti artdıqca QFS-nin azalması izlənmişdir. Beləliklə, alınan nəticələr göstərdi ki, quraqlığa davamlı sortlar işıq stresinə qarşı da davamlı, zülal kompleksləri isə daha dinamik olurlar.

### 3.2.3. FSII-nin PsbS zülalının səviyyəsinin işıqla induksiya nəticəsində dəyişməsi

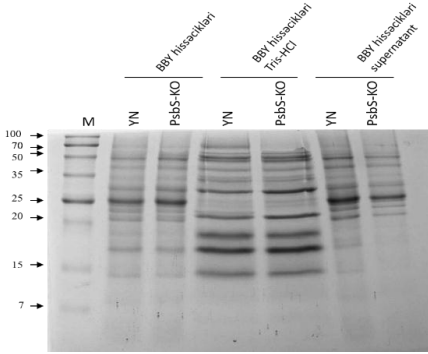
PsbS zülalına qarşı anticisimlərdən istifadə etməklə aparılan immunoblot analiz, PsbS-KO nümunələrində PsbS zülalını aşkar etməmişdir ki, bu da istifadə olunan metodun yüksək həssaslığını təsdiqləyir. Yabanı növ nümunələrində 10 dəqiqə müddətində işıqla ( $700 \text{ mkmol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) təsirdən sonra PsbS zülalının miqdarının artması, 1 saatlıq işıqlanmadan ( $1500 \text{ mkmol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) sonra isə azalması müşahidə edilmişdir. Alınan nəticələrə əsasən güman edilmişdir ki, QFS-nin qE komponenti 10 dəqiqə müddətində yüksək işıq intensivliyinə məruz qaldıqdan sonra daha çox intensivlik nümayiş etdirir (Şəkil 5).



**Şəkil 5.** Yabanı növ (YN) və mutant (PsbS-KO) bitkilərdən SDS- PAGE üsulu ilə ayrılmış tilakoid membran zülallarının PsbS zülalına qarşı anticisimlər istifadə etməklə immunoblot analizi.

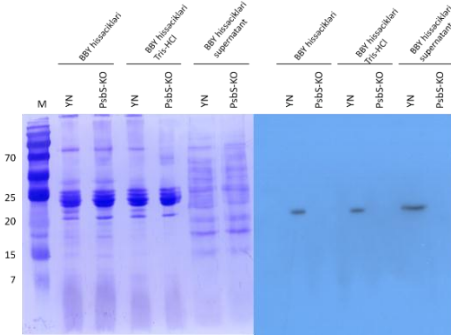
### 3.3. Düyü bitkisinde FSII həddlərində PsbS zülalının lokalizasiyasının təyini

YN və PsbS-KO mutant bitkilərinin FSII ilə zəngin membran fraqmentlərinin (BBY) elektroforeqram nəticəsi göstərdi ki, YN düyü bitkisi nümunələrində mutant nümunələri ilə müqayisədə zolaqların intensivliyi daha yüksək olmuşdur.



**Şəkil 6.** YN və PsbS-KO düyü bitkilərinin yarpaqlarından hazırlanmış BBY hissəciklərinin polipeptid tərkibi.

BBY hissəcikləri, Tris-HCl (pH 8.0) buferi ilə yuyulmuş BBY hissəcikləri və yuyulduqdan sonra alınan supernatantın polipeptid tərkibinin müqayisəli təhlili tədqiq edilən nümunələr arasında əhəmiyyətli fərqlər olduğunu göstərmişdir (Şəkil 6). Tərkibində FSII-nin oksigen-ayırıcı kompleksi daxil olan supernatanta uyğun gələn elektroforetik zolaqların təhlili göstərdi ki, Tris-HCl ilə yuyulma təkcə su oksidləşdirici kompleks zülallarını deyil, həm də daha yüksək molekulyar çəkiyə malik zülalları da yuyur. Müəyyən edilmişdir ki, Tris-HCl ilə yuyulmuş və tərkibində FSII/İTKII qarışığı olan PsbS-KO nümunələrində ~22 kDa ölçüsündə zolaq yoxdur ki, bu da PsbS zülalına uyğundur. PsbS zülalının FSII-yə bağlanma dərəcəsini qiymətləndirmək üçün YN və PsbS-KO nümunələrinin FSII ilə zəngin membran və supernatantı PsbS zülalına qarşı ilkin anticislərdən istifadə etməklə Vestern blot üsulu ilə tədqiq edilmişdir (Şəkil 7).



**Şəkil 7.** YN və PsbS-KO yarpaqlarından alınan BBY preparatlarının SDS- PAGE analizi (sol panel). Nümunələr gellərə 2 µg xlorofil ekvivalentində yüklənib. PsbS zülalına qarşı anticislərdən istifadə etməklə BBY preparatlarının immunoblot analizi (sağ panel).

PsbS zülalına qarşı anticislərdən istifadə etməklə əldə olunmuş Vestern blot nəticəsi göstərmişdir ki, YN nümunələrində PsbS zülalının

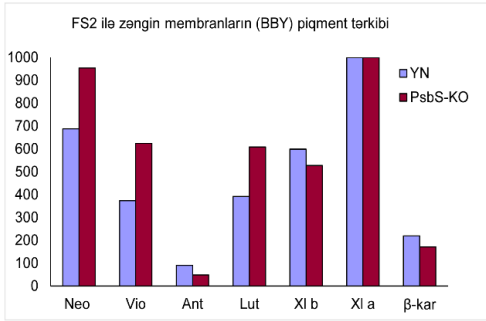
miqdarı Tris-HCl ilə yuyulmuş BBY hissəciklərində azalır, supernatantda isə artır (Şəkil 7). Tris-HCl FSII nümunələrindən PsbS zülalını qismən çıxara bildiyini nəzərə alaraq, PsbS zülalının FSII nüvə kompleksinə zəif bağlandığı gözlənilmişdir. Tris-HCl ilə yuyulduqdan sonra PsbS zülalının müəyyən bir hissəsi yuyulsa da, digər hissəsi FSII ilə əlaqəli olaraq qalmışdır. Bundan əlavə, supernatantda PsbS zülalının olması onu göstərir ki, PsbS zülalı, çox güman ki, FSII nüvəsi və nüvə ilə zəif əlaqədə olan L-İTKII arasında yerləşir.

### **3.4. PsbS zülalından asılı olaraq düyü bitkisinde lipidlərin və fotosintetik piqmentlərin miqdarında baş verən dəyişikliklər**

Müəyyən edilmişdir ki, yabanı növ ilə müqayisədə mutant PsbS-KO nümunələrində monoqalaktosil-diasilqliserol (MGDG), diqalaktosil-diasilqliserol (DGDG), sulfoxinovosil-diasilqliserol (SQDG) və fosfatidilqliserol (PG) əsas lipidlərinin miqdarı daha yüksək olmuşdur. Beləliklə, YN bitkilərdə ümumi lipidlərin miqdarı 252,9 nmol/q, PsbS-KO mutantında isə 354,8 nmol/q təşkil etmişdir. YN-də MGDG/DGDG nisbəti 1,6, mutant PsbS-KO bitkilərdə isə 1,8 olaraq müəyyən edilmişdir. Əsas fərq, mutant formalarda bu göstərici 195 nmol/q-a uyğun gələn MGDG-nın miqdarında qeyd olunmuşdur ki, bu da yabanı növdən 49% yüksəkdir. PsbS-KO mutant formalarındakı PG miqdarı yabanı növü 27% (23 nmol/q) üstələmişdir. DGDG və SQDG miqdarı baxımından mutant bitkilər YN-i müvafiq olaraq 27% və 44% qədər üstələmişdir.

FSII ilə zəngin membranların (BBY) piqment analizi (Şəkil 8), PsbS-KO mutant bitkilərində neoksantin (Neo), violaksantin (Vio) və luteinin (Lut) yüksək miqdarını göstərmişdir. Bununla yanaşı, antosianin, Xl b və  $\beta$ -karotinin tərkibi YN-də daha yüksək olmuşdur. Bu PsbS-KO mutantlarına aid BBY-da YN ilə müqayisədə daha yüksək Neo miqdarı ilə əlaqələndirilir.

FSII ilə zəngin membranların (BBY) piqment analizi (Şəkil 8) göstərdi ki, Neo, Vio, Lut miqdarı PsbS-KO mutant bitkilərində daha yüksək olsa da, anth, Xl b və  $\beta$ -karotinin miqdarı YN nümunələrdə daha yüksək olmuşdur. PsbS-KO mutant bitkilərinin BBY preparatları YN bitkilərə nisbətən daha yüksək Neo miqdarına malik olmuşdurlar.



**Şəkil 8.** YN və PsbS-KO mutant bitkilərin FSII ilə zəngin membranlarında (BBY) fotosintetik piqmentlərin tərkibi.

Neoksantin İTKII zülallarında geniş miqyaslı konformasiya dəyişikliklərinə səbəb olsa da, daha yüksək neoksantin tərkibli sönməmiş İTKII elektron həyəcanının deaktivasiyasının molekulyar mexanizmini anlamağa kömək edir. Bu kontekstdə əldə etdiyimiz nəticələr göstərir ki, PsbS-KO mutant bitkilərində İTKII əvvəldən sönmüş vəziyyətdə ola bilər. Beləliklə, PsbS-KO mutant bitkilərinin tilakoid membranının əsas kütləsində membranın axıcılığına səbəb PsbS zülalının olmamasıdır ki, bu da lipidlərin miqdarının artması ilə kompensasiya olunur.

### **3.5. Düyü bitkilərində xlorofil flüoressensiyasının enerjiddən asılı sönməsində tilakoid zülallarının fosforlaşmasının rolunun öyrənilməsi**

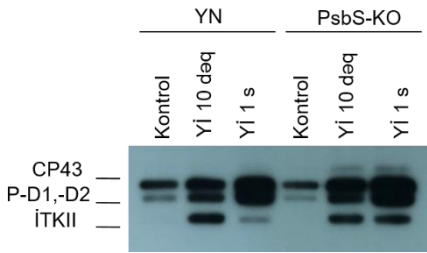
Tədqiqatın məqsədi müxtəlif işıq intensivliyində düyü bitkilərində QFS-nin qE komponentinin mövcudluğu/yoxluğundan asılı olaraq tilakoid membran zülallarının fosforlaşmasının dinamikasında fərqləri müəyyən etmək olmuşdur. Mutant PsbS-KO nümunələrində oksigenin fəal formalarının (OFF) daha çox əmələ gəlməsi işıqla təsirdən sonra PsbS-KO bitkilərində FSII-nin nüvə zülallarının və İTKII antena zülallarının fosforlaşmasını artırma biləcəyi ehtimal edilmişdir.

#### **3.5.1. Düyü bitkilərində tilakoid membranının fosfoproteomlarına yüksək intensivlikli işığın təsiri**

Yüksək intensivlikli işıqla təsirdən sonra həm YN, həm də PsbS-KO mutant bitkilərdə FSII-nin əsas fosfoprotein zolaqlarının (CP43, D1 və D2) intensivliyinin artdığı aşkar edilmişdir (Şəkil 9).

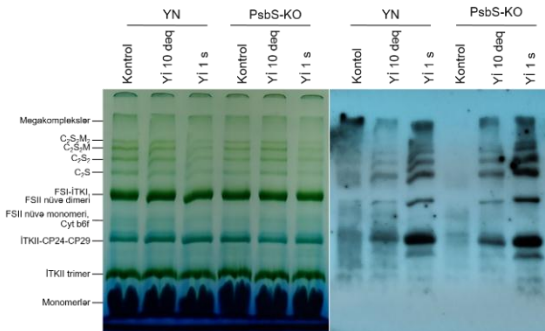


Ümumiyyətlə, P<sub>sbS</sub>-KO mutant bitkilərində işıqla təsirdən sonra FSII-nin nüvə zülallarının fosforlaşma səviyyəsi YN ilə müqayisədə bir qədər yüksək olmuşdur. CP43 zülalının fosforlanmış formalarının miqdarı müvafiq mutant nümunələrindən fərqli olaraq, qaranlıq şəraitə uyğunlaşdırılmış YN bitkilərində daha yüksək olmuşdur. Hər iki genotipdə 10 dəqiqəlik işıqlandırmadan sonra (Yİ 700 m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) İTKII-nin güclü fosforlaşması müşahidə edilmiş, YN tilakoid membranlarında işığın intensivliyin və ekspozisiya zamanının artırılması (Yİ 1500 m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 1 saat) nəticəsində fosforlanmış (p) - İTKII səviyyəsi azalmış, P<sub>sbS</sub>-KO-da isə dəyişməz qalmışdır. Əldə edilən nəticələr göstərir ki, P<sub>sbS</sub>-KO düyü bitkilərində P<sub>sbS</sub> zülalının olmaması, tilakoid zülallarının fosforlaşma qabiliyyətini əhəmiyyətli dərəcədə stimullaşdırır.



**Şəkil 9.** SDS- PAGE üsulu ilə YN və mutant P<sub>sbS</sub>-KO düyü bitkilərindən ayrılan tilakoid membran zülallarının fosfotreoninə spesifik anticisimlərlə immunoblot analizi (Anti-P-Thr, Agrisera AB, Vännas, İsveç).

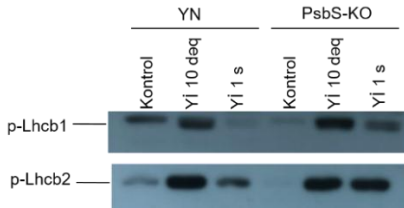
Anti-phospho-Thr anticisimlərindən istifadə etməklə eyni eksperimental şəraitdə BN-PAGE-dən sonrakı Vestern blot analizinin nəticəsi göstərmişdir ki, işığın təsirinə məruz qalmış P<sub>sbS</sub>-KO nümunələrində tilakoid membran zülallarının fosforlaşma səviyyəsi YN ilə müqayisədə daha yüksəkdir (Şəkil 10).



**Şəkil 10.** Fosfotreoninə spesifik (Anti-P-Thr) anticisimlərdən istifadə etməklə YN və mutant P<sub>sbS</sub>-KO düyü nümunələrinin tilakoid membran komplekslərində fosfoproteinlərin immunolokalizasiyası.

Nisbətən kiçik superkomplekslərdə fosforlaşma səviyyəsi daha böyük superkomplekslərlə müqayisədə yüksək olmuşdur. Beləliklə, M-trimeri olmayan superkompleks zolaqlarının (C2S2 və C2S) fosforlaşması həm YN, həm də PsbS-KO nümunələrində M-trimeri olan (C2S2M və C2S2M2) superkomplekslərdən daha yüksək olmuşdur.

Yüksək intensivlikli işığın təsirindən sonra İTKII fosforlaşmasının dinamikasını qiymətləndirmək üçün fosforlanmış Lhcb1 (P-Lhcb1) və Lhcb2 (P-Lhcb2) zülallarına qarşı anticismlərdən istifadə etməklə immunodeteksiya aparılmışdır (Şəkil 11). Lhcb1 zülalının fosforlaşma səviyyəsi 10 dəqiqəlik işıq təsirindən sonra hər iki genotipdə artdığı halda, 1 saat ərzində işıqlandırmadan yabanı növ bitkilərdə demək olar ki, tamamilə defosforlanmış, PsbS-KO mutantlarda isə zəif fosforlaşaraq qalmışdır.

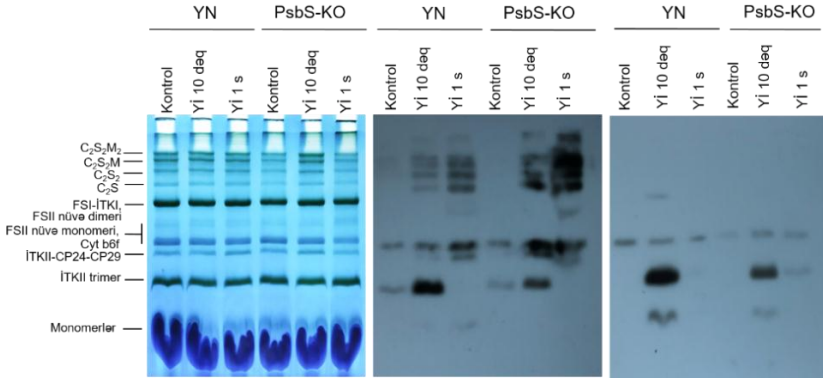


**Şəkil 11.** Lhcb1 və Lhcb2 zülallarının fosforlanmış formalarının müəyyən edilməsi.

Lhcb2 zülalının fosforlaşmasının ümumi patterni Lhcb1 zülalı ilə oxşar olmasına baxmayaraq, bəzi fərqlər müəyyən edilmişdir. Qaranlığa uyğunlaşdırılmış yabanı növ bitkilərdə P-Lhcb2 zülalları çox aşağı səviyyədə müşahidə edildiyi halda, PsbS-KO nümunələrində ümumiyyətlə aşkar edilməmişdir. Bundan əlavə, 1 saat işıqlandırmadan sonra, Lhcb2 yabanı növdə əhəmiyyətli dərəcədə defosforlanmış, lakin PsbS-KO nümunələrində demək olar ki, eyni fosforlaşma səviyyəsində qalmışdır. Beləliklə, qaranlığa uyğunlaşdırılmış YN bitkilərində P-Lhcb1 və P-Lhcb2 zolaqları aşkar edilmiş, PsbS-KO mutant bitkilərində isə P-Lhcb1 zülalına uyğun zolaq zəif aşkarlanmış, P-Lhcb2 isə tamamilə müşahidə olunmamışdır. Bu iki genotipdəki İTKII zülallarının fərqli fosforlaşması, İTKII-nin fosforlaşmasının QFS-də, xüsusən də enerjiden asılı olan hissəsində rol oynaya biləcəyini göstərir.

Lhcb1 və Lhcb2 fosforlaşmasının QFS proseslərində ehtimal olunan rolunu və onların tilakoid membranların kompleksləri daxilində paylanmasını aydınlaşdırmaq üçün P-Lhcb1 və P-Lhcb2-

nin fosforlaşma səviyyələri həmçinin BN-PAGE üsulu ilə tilakoid zülal komplekslərində tədqiq edilmişdir. Lhcb1 və Lhcb2-nin fosforlaşması patterni superkomplekslərdə, FSII nüvə monomeri və İTKII-CP29-CP24 komplekslərində yüksək işığa məruz qaldıqda, Lhcb1-nin fosforlaşma səviyyəsinin ekspozisiya zamanının artması ilə tədricən artmasını nümayiş etdirmişdir (Şəkil 12).



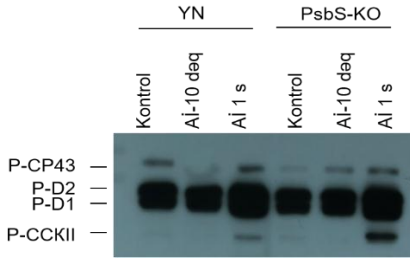
**Şəkil 12.** P-Lhcb1 və P-Lhcb2 anticisimlərinin istifadə etməklə YN və PsbS-KO mutant düyü tilakoid membran zülallarının Western blot analizi. Soldan sağa: BN- PAGE; P-Lhcb1-ə ilə immunoblot; P-Lhcb2 ilə immunoblot.

YN nümunələrində 10 dəqiqəlik işıqlandırmadan sonra müşahidə edilən İTKII trimerinin intensiv P-Lhcb1 zolağı 1 saatlıq işıq təsirindən sonra yox olmuşdur. Işıqlandıqdan sonra FSI-İTKI, İTK trimerlərində və monomerlərində P-Lhcb2 zolağının görünməsi, FSI və FSII komplekslərinin qarşılıqlı təsirində vasitəçilik etməkdə "mövqe keçidlərində" (ingilis dilində "state transitions"), eləcə də işıq intensivliyində dinamik dəyişikliklərlə FSI ilə İTKII assosiasiyasında Lhcb2 fosforlaşmasının rolunu təsdiqləyir.

### 3.5.2. Düyü bitkilərində tilakoid membranının fosfoproteomlarına aşağı intensivlikli işığın təsiri

Növbəti mərhələdə aşağı intensivlikli işıqda (Aİ, 50  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 10 dəqiqə ərzində qısamüddətli təsir yabanı növ nümunələrində FSII-nin əsas fosfoprotein zolaqlarının (CP43, D1, D2) intensivliyinin azalmasına səbəb olmuşdur. Aİ təsirinin müddətinin 1 saata qədər uzadılması nəticəsində həmin zolaqların

intensivliyi yenidən artmışdır. Işığa məruz qalma zamanının artması ilə PsbS-KO mutant nümunələrində FSII əsas-kompleks zülallarının fosforlaşma səviyyəsi də xətti olaraq artmışdır (Şəkil 13). Qaranlığa uyğunlaşdırılmış PsbS-KO nümunələrində İTKII trimerinin az miqdarda fosforlaşmasını müşahidə etsək də, Aİ ilə 10 dəqiqəlik təsirdən sonra İTKII-nin fosforlaşması tamamilə yox olmuş və 1 saatlıq təsirdən sonra əhəmiyyətli dərəcədə artmışdır.



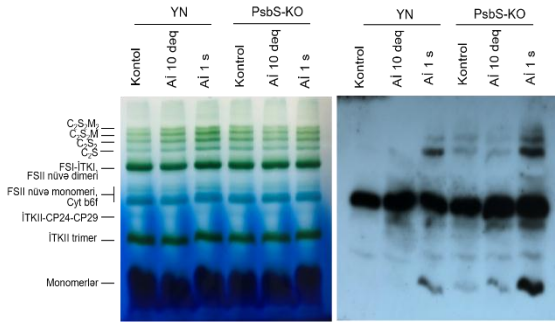
**Şəkil 13.** SDS- PAGE ilə YN və PsbS-KO bitkilərdən ayrılmış tilakoid membran zülallarının fosforlaşmasının Vestern blot analizi (2 mkq xlorofil).

Beləliklə, FSII-nin nüvə zülallarının fosforlaşma səviyyəsi YN nümunələrində daha yüksək olduğu halda, PsbS-KO mutant bitkilərində isə İTKII zülallarının fosforlaşma səviyyəsi daha yüksək olmuşdur. D1 və D2-nin fosforlaşma səviyyəsi mutant nümunələrdə CP43 zülalından fərqli olaraq həm qaranlıqda, həm də işıqda daha aşağı olmuşdur (Şəkil 13).

BN-PAGE analizi vasitəsilə müəyyən edilmişdir ki, aşağı intensivlikli ( $50 \text{ mkmol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) işığın 10 dəqiqə və 1 saat ərzində təsiri nəticəsində YN və PsbS-KO mutant bitkiləri arasında zülalların komplekslər arasında paylanmasında müəyyən fərqlər vardır (Şəkil 14). P-Thr üçün spesifik anticisimlərdən istifadə etməklə BN-PAGE-dən birbaşa köçürmə yolu ilə immunoblot analizi, YN və PsbS-KO mutantlarının tilakoid membran zülallarının fosforlaşma səviyyələrində fərqlər olduğunu göstərmişdir (Şəkil 14).

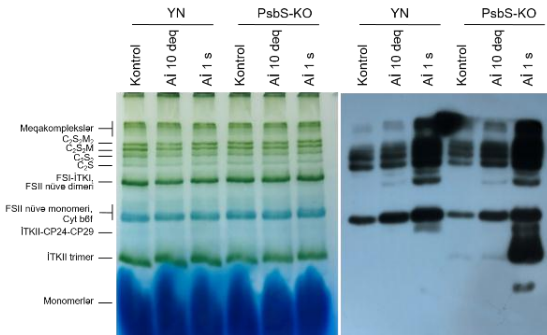
PsbS-KO düyü bitkilərində fosforlaşmış tilakoid membran zülallarının səviyyəsi statistik cəhətdən daha əhəmiyyətli olmuşdur (Şəkil 14). Qaranlığa uyğunlaşdırılmış PsbS-KO nümunələrindəki zülalların fosforlaşma səviyyələri ilə 1 saat ərzində Aİ təsirinə məruz qalan YN nümunələrdəki zülalların fosforlaşma səviyyələri arasında oxşarlıq müşahidə edilmişdir.  $\text{C}_2\text{S}_2$  zolağının və İTKII monomerlərinin fosforlaşması nisbətən daha aşağı səviyyədə

olmuşdur. 1 saat ərzində Al təsirinə məruz qalmış PsbS-KO bitkiləri, qaranlığa uyğunlaşdırılmış və Al ilə təsir edilmiş PsbS-KO nümunələrə və bütün yabanı növ nümunələrə nisbətən zülalların fosforlaşma səviyyələrində daha güclü artım göstərmişlər.



**Şəkil 14.** Fosfotreoninə spesifik anticisimlərdən istifadə edərək düyü bitkilərinin tilakoid protein komplekslərində fosfoproteinlərin immunolokalizasiyası (Anti-P-Thr).

P-Lhcb1-ə qarşı anticisimlərdən istifadə etməklə aparılan Vestern blot analizi FSII nüvəsinin superkomplekslərində və monomerində Al ilə 1 saatlıq təsirdən sonra Lhcb1-in fosforlaşmasının artdığı göstərilmişdir (Şəkil 15); lakin, həm YN genotipində, həm də PsbS-KO genotipində İTKII-CP29-CP24 zolağının fosforlaşması aşağı intensivlikli işıq altında 1 saat sonra ortaya çıxmışdır.



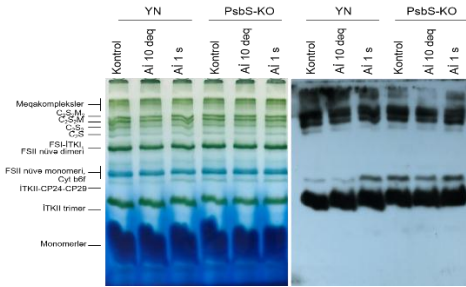
**Şəkil 15.** YN və PsbS-KO yarpaqlarından ayrılmış tilakoid membran zülallarının BN- PAGE və Vestern blot analizi (P-Lhcb1 anticisimləri).

İTKII trimer zolağının fosforlaşması yalnız PsbS-KO nümunələrində aşkar edilmişdir, burada 1 saat ərzində Al ilə təsir olunan bitkilərdə İTKII trimer zolağının ən yüksək fosforlaşması müşahidə edilmişdir. Alınan nəticələrin təhlili göstərir ki, PsbS-KO

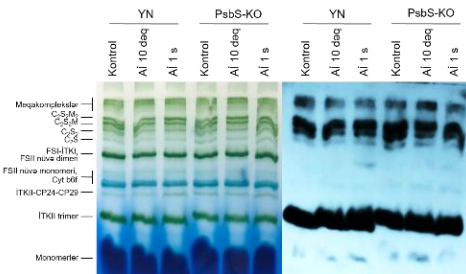
bitkilərində İTKII trimerlərinin güclü fosforlaşması bu bitkilərdə PsbS zülalının çatışmazlığını kompensasiya edə bilər. Bununla birlikdə, bu fərqin PsbS-KO bitkilərində tilakoid membranının fərqli makroorganizasiyası ilə də əlaqəli olma ehtimalı var.

Lhcb1 (Şəkil 16) və Lhcb2 (Şəkil 17) anticismlərdən istifadə etməklə BN-PAGE-dən birbaşa köçürmə üsuluna əsaslanan immunodeteksiya göstərmişdir ki, aşağı intensivlikli işıqlandırmadan sonra Lhcb1 zülalının səviyyəsi PsbS-KO mutantlarında YN ilə müqayisədə daha yüksəkdir. PsbS-KO mutant nümunələrində İTKII - CP24-CP29 kompleksinin daha aydın zolaqları müşahidə edilmişdir.

Superkomplekslərin təhlili YN nümunələri ilə müqayisədə mutant nümunələrin daha çox fosforlaşmasını göstərmişdir. Eyni zamanda, İTKII trimerləri səviyyəsində heç bir fərq müşahidə edilməmişdir. P-Lhcb1 ilə aparılan təcrübədə (Şəkil 16), PsbS-KO ilə müqayisədə YN nümunələrində Lhcb1 zülalının daha intensiv zolaqlarının müşahidə edildiyini nəzərə alaraq, aşağı işıq intensivliyində Lhcb1 zülalının çox hissənin fosforlanmış formaya keçdiyini ehtimal etmək olar.



**Şəkil 16.** Lhcb1 zülalına qarşı (anti-Lhcb1) anticismlərdən istifadə etməklə YN və PsbS-KO-nun tilakoid zülallarının BN- PAGE və Vestern blott analizləri.

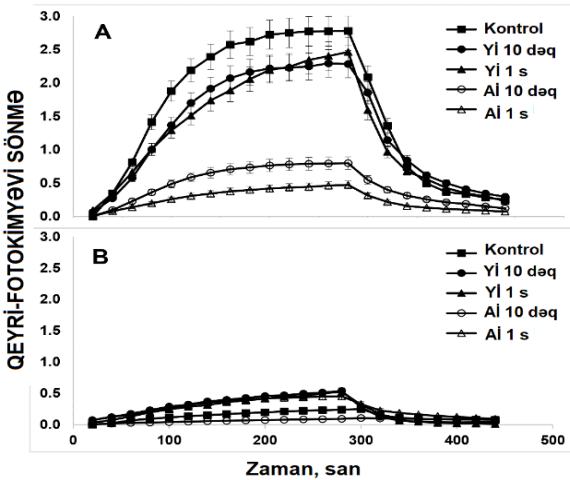


**Şəkil 17.** Lhcb2 zülalına qarşı (anti-Lhcb2) anticismlərdən istifadə etməklə YN və PsbS-KO-nun tilakoid zülallarının BN- PAGE və Vestern blott analizləri.

Aşağı işıq intensivliyində Lhcb2 zülalının (Şəkil 17) təcrübə şəraitindən asılı olaraq nümunələr arasında əhəmiyyətli fərqlər göstərmədiyi təsbit edilmişdir. Buna əsaslanaraq, PsbS-KO bitkilərində PsbS zülalının olmaması səbəbindən P-Lhcb1-in kompensasiya edici rolunu oynaya biləcəyi ehtimalı irəli sürülmüşdür.

### 3.5.3. Düyü bitkilərinin yarpaqlarında qaranlığa adaptasiya və işıqlanmadan sonra QFS-nin induksiya və relaksasiya kinetikasının öyrənilməsi

YN və PsbS-KO genotiplərində zülalların fosforlaşması ilə QFS-nin induksiya və relaksasiya kinetikasi arasındakı əlaqənin öyrənilməsi göstərdi ki, həm 10 dəq, həm də 1 saat müddətində Yİ ilə təsir edilmiş düyü bitkilərində 5 dəqiqəlik aktinik işıqlandırmadan sonra Aİ-la təsir edilmiş bitkilərə nisbətən daha yüksək QFS baş verib (Şəkil 18A). PsbS-KO bitkiləri də oxşar tendensiya göstərmişdir, lakin QFS göstəricisi daha aşağı olmuşdur (Şəkil 18B).



Şəkil 18. Müxtəlif intensivlikli işıq təsirinə məruz qalan bitkilərdə QFS inkişafı Yabarı növ (YN) (A) və PsbS -KO mutant (B).

QFS-nin induksiya və relaksasiya kinetikasının ölçülməsi əsasında əldə edilən məlumatlar Lhcb1 və Lhcb2 zülallarının fosforlaşmasının QFS-nin sürətli relaksasiyası ilə, həmçinin yüksək fotosintez sürəti ilə yaxından əlaqəli olduğunu göstərir. QFS kinetikasının qE relaksasiya fazası ( $\tau_1$ ) YN bitkilərində Yİ ilə 10 dəqiqəlik təsirdən sonra digər eksperimental şəraitlərə nisbətən daha

yavaş olmuşdur. Ümumiyyətlə, əldə edilən məlumatlara əsasən, Lhcb1 və Lhcb2-nin fosforlaşmasının qE relaksasiya kinetikaşında iştirak etdiyi qənaətinə gəlmək olar. 1 saat ərzində Yİ ilə təsir edilmiş PsbS-KO yarpaqlarının superkomplekslərində və həmçinin Aİ ilə təsir edilmiş superkomplekslərdə, İTKII trimer və monomerlərində P-Lhcb1-in yığılmasını nəzərə alsaq, PsbS-KO yarpaqlarında müşahidə edilən bəzi qüsurların Lhcb1-in defosforlaşmasını inhibirə edə biləcəyi fikrinə gəlmək olar. Belə ki, yüksək intensivlikli işıqlandırma şəraitində PsbS-KO yarpaqlarında yaranan OFF buna səbəb ola bilər.

### **3.6. Işıq intensivliyi və molekulyar oksigenin düyü**

#### **bitkilərində reaktiv oksigen növlərinin əmələ gəlməsinə təsiri**

Müəyyən olunmuşdur ki, 1000 mkmol foton  $m^{-2}s^{-1}$  intensivliyində işığın təsirindən sonra arabidopsis bitkilərinin *npq4-1* mutant yarpaqlarında YN yarpaqlarına nisbətən daha çox superoksid toplanır. Eynilə, *npq4-1* yarpaqlarında işığın təsirindən sonra YN-ə nisbətən daha çox hidrogen peroksid aşkar edilmişdir. Işığın təsirinə məruz qalan bitkilərdə fotozədələnmə sürəti qaranlığa uyğunlaşdırılmış nümunələrə nisbətən daha yüksəkdir.

YN və PsbS-KO mutant bitkilərdən ayrılmış tilakoidlərdə müxtəlif qaz mühitinin (kontrol, hava (H), aşağı konsentrasiyalı oksigen (AO), yüksək konsentrasiyalı oksigen (YO) təsiri nəticəsində əmələ gələn superoksid anion-radikalının qiymətləndirilməsi göstərmişdir: 1) molekulyar oksigenin miqdarından asılı olmayaraq, PsbS-KO mutantının tilakoidlərində superoksidin əmələ gəlmə səviyyəsi həmişə daha yüksəkdir; 2) AO və YO təsirindən sonra PsbS-KO tilakoidlərində superoksid səviyyələri demək olar ki, eynidir, lakin AO təsiri zamanı YN bitkilərin tilakoidlərində YO təsirinə nisbətən daha çox superoksid əmələ gəlir; 3) Ən aşağı superoksid səviyyəsi hava ilə təsir olunan tilakoidlərdə aşkar edilmişdir; 4) Qaz mühiti superoksid istehsalını azaldır.

### **3.7. Işıq intensivliyi və molekulyar oksigenin müxtəlif**

#### **konsentrasiyalarının ksantofil tsiklinin piqment tərkibinə təsiri**

Məlum olmuşdur ki, güclü işıqla uzunmüddətli təsirdən sonra, həm YN-də, həm də mutant PsbS-KO bitkilərində əhəmiyyətli



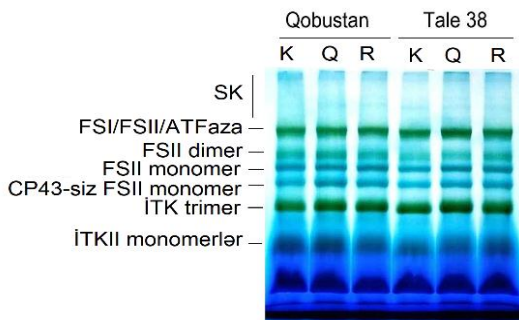
zeaksantin (Zea) toplanması baş verir. 2 saat ərzində 4°C-də yüksək intensivlikli işıqla (1000 mkmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) yarpaq seqmentlərinə təsir zamanı YN yarpaqlarında nisbi Zea miqdarı violaksantin tsiklinin ümumi tərkibinin təxminən 65%-nə qədər sürətlə artmışdır. PsbS-KO yarpaqlarında Zea toplanma sürəti bir qədər yavaş olmuşdur, lakin ümumi violaksantin tsikli təxminən 70%-ə çatmışdır. Aşağı konsentrasiyalı oksigen (AO) ilə təsirdən sonra həm YN, həm də PsbS-KO bitkilərində əhəmiyyətli dərəcədə anteroksantin (Ant) yığılması müşahidə edilmişdir.

Yüksək konsentrasiyalı oksigen (YO) şəraitində yüksək işıq intensivliyi ilə təsirdən sonra YN və PsbS-KO mutantları arasında əhəmiyyətli fərqlər müşahidə edilməmişdir. YO şəraitində YN bitkilərində Ant-ın miqdarı bir qədər azalmış, PsbS-KO-da isə tədricən artmışdır. Kontrol bitkilərində işığın təsirindən sonra Ant-ın miqdarı əhəmiyyətli dərəcədə artmış olsa da, PsbS-KO mutantlarında Ant miqdarında Zea-nın sürətli artımı ilə kompensasiya olunan zəif artım müşahidə edilib.

### **3.8. Buğda sortlarının piqment-zülal komplekslərinin yayılmasına quraqlığın və rehidratasiyanın təsiri**

Əvvəl aldığımız nəticələr göstərmişdir ki, quraqlığa davamlı sortlar işıq stresinə də davamlı, zülal kompleksləri isə daha dinamik olurlar. Bu müddəanı təsdiq etmək üçün quraqlığa və yenidən suvarmaya məruz qalmış buğda genotiplərində zülal komplekslərinin davamlılıqdan asılı dinamikası tədqiq edilmişdir. Tilakoid membran zülallarının BN-PAGE ilə ayrılmış zolaqların intensivliyinin kəmiyyətcə qiymətləndirilməsi göstərdi ki, quraqlığa davamlı Qobustanın genotipində FSII dimerinin və CP43 olmayan FSII monomerinin zolaqlarının intensivliyi quraqlıq stresindən sonra artıb, rehidratasiyadan sonra isə yenidən bərpa olunub. Quraqlığa həssas Tale-38 genotipində isə daha köklü dəyişikliklər baş vermişdir (Şəkil 19).

Beləliklə, FSII dimer zolağı istisna olmaqla, quraqlıq stresindən sonra bütün digər komplekslərin zolaqlarının intensivliyi əhəmiyyətli dərəcədə artmışdır. Bu zolaqların intensivliklərinin çoxu yenidən suvarmadan sonra bərpa olunsa da, FSII dimer zolağının intensivliyi 30% artmışdır.



**Şəkil 19.** Yumşaq buğda genotiplərinin tilakoid membranı zülallarının BN-PAGE analizi.

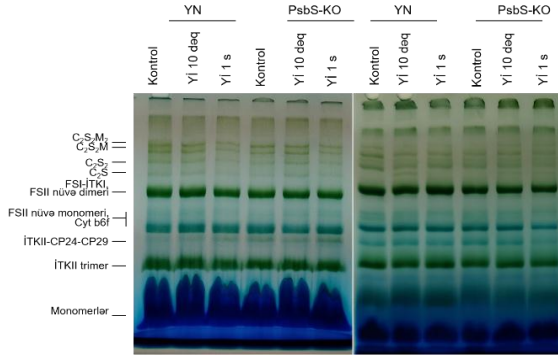
Beləliklə, əldə edilən məlumatlar quraqlığa davamlı Qobustan genotipinin fotosintetik aparatının quraqlıqdan sonra rehidratasiyaya daha dinamik cavab verdiyini göstərir.

### **3.9. Yabani növ və PsbS-KO mutant düyü nümunələrinin piqment-zülal komplekslərinin dinamikasına fərqli spektral tərkibli işıqın təsiri**

Düyü bitkilərinin fərqli spektral tərkibli işıqla işlənməsi göstərmişdir ki, 10 dəqiqə yüksək intensivlikli (Yİ - 700 mkmol foton  $m^{-2}s^{-1}$ ) ağ işıqla şüalanmadan sonra, həm yabani, həm də PsbS-KO mutant nümunələrin superkomplekslər bölgəsində əhəmiyyətli dəyişikliklər müşahidə edilməmişdir. Bununla belə, mavi işıqla şüalanan nümunələrdə əlavə zolaq meydana çıxdı ki, bu da FSI-İTKII kompleksini təmsil edir və kriptomun - mavi işıq fotoreseptorunun mümkün aktivləşməsi ilə əlaqələndirilir. YN nümunələrdə işıqla təsirin müddətinin 1 saata qədər artması nəticəsində (Yİ 1500 mkmol foton  $m^{-2}s^{-1}$ ), bu zolaq yenidən yox olmuş, lakin mutant nümunələrdə qalmışdır (Şəkil 20).

Ağ işıqla təsir edilən bitkilərlə müqayisədə, mavi işıqla təsir edildikdən sonra FSI-İTKI, FSII monomerinin daha intensiv zolaqları müşahidə edilmişdir. Həmçinin, İTKII-CP29-CP24-ə uyğun olan zolaqda da nümunələr arasında fərqlər müşahidə edilmişdir. Ağ işıqın təsirinə məruz qalmış YN nümunələrdə bu zolağın intensivliyi PsbS-KO nümunələri ilə müqayisədə daha aşağı olmuş və mavi işığa məruz qaldıqca tədricən artmışdır. PsbS-KO nümunələrində, bu zolağın intensivliyi mavi işıqla 1 saat təsirdən sonra azalmışdır. Mavi işığa məruz qaldıqdan sonra İTKII trimerinə uyğun olan zolağın daha

aşağı miqdarına baxmayaraq, İTKII monomerlərinin miqdarında artım müşahidə edilmişdir (Şəkil 20).



**Şəkil 20.** Müxtəlif işıq keyfiyyətinin təsiri nəticəsində tilakoid membranlarının piq-ment-zülal kompleks-lərinin BN-PAGE analizi.

Beləliklə, əldə edilən məlumatlar yüksək işıq intensivliyində mavi LED işıqların FSII və FSII-nin nüvə komplekslərinin normal formalaşmasına səbəb olduğunu təsdiqləyir. Yuxarıda qeyd olunanlara əsaslanaraq belə nəticəyə gəlmək olar ki, yüksək işıq intensivliyində mavi LED-lərin istifadəsi xloroplast zülallarının funksional vəziyyətdə qalmasına şərait yaratmaqla təbii mühitdə fotosintetik effektivliyin yüksəlməsini təmin edə bilər.

## NƏTİCƏLƏR

1. Işığın təsiri altında FSII zülallarının səviyyəsində müşahidə olunan daha böyük kəmiyyət dəyişməsi PsbS-KO mutant bitkilərinin yüksək intensivlikli işığa YN ilə müqayisədə daha həssas olduğunu göstərir [1, 3, 5, 6, 8].
2. Müəyyən edilmişdir ki, FSII ilə zəngin membran fraqmentləri (BBY) vasitəsilə PsbS zülalı FSII-nin nüvə kompleksi ilə zəif birləşir. Güman edilir ki, PsbS zülalı FSII-nin nüvəsi ilə zəif əlaqəli L-İTKII arasında yerləşir [9, 14].
3. PsbS-KO mutant bitkilərinin tilakoid membranının axıcılığına səbəb PsbS zülalının olmamasıdır və bu da lipidlərin miqdarının artması ilə kompensasiya olunur [13].
4. Neoksantin PsbS-KO mutant bitkilərində yüksək miqdara malik olması, İTKII-nin zülallarında konformasiya dəyişiklikləri

- yaradır ki, bu da PsbS zülalına görə mutant bitkilərində İTKII-nin əvvəldən sönmüş vəziyyətdə olmasını ehtimal etməyə əsas verir [13].
5. FSII-nin nüvəsinin və Lhcb1/Lhcb2 zülallarının işıqla induksiya olunan fosforlaşması düyünün PsbS-KO mutant bitkilərində güclənir ki, bu da həmin mutantda OFF-nın əmələ gəlməsinin artması ilə əlaqədar ola bilər [12].
  6. On dəqiqə müddətində yüksək işıq intensivliyinə məruz qaldıqdan sonra YN bitkilərdə qE relaksasiyası ( $\tau_1$ ) yavaşlayır ki, bu da eyni təcrübə şəraitdə İTKII trimerlərində Lhcb1 və Lhcb2 zülallarının fosforlaşması ilə korrelyasiya edir [2, 4, 12].
  7. Quraqlıq və təkrar suvarmadan sonra yumşaq buğda genotiplərinin pigment-zülal komplekslərinin paylanması dəyişikliklərin qiymətləndirilməsi göstərmişdir ki, quraqlığa davamlı sortlar işıq stresinə də davamlı olurlar və onların pigment-zülal kompleksləri də daha yüksək dinamikliyə malikdirlər [10].
  8. Göy işığın təsiri nəticəsində müxtəlif pigment-zülal komplekslərinin miqdarında baş verən dəyişikliklərdən başqa FSII superkomplekslərində FSI-İTKII kompleksinə uyğun olan əlavə elektroforetik zolaq əmələ gəlir. Bu əlavə zolağın əmələ gəlməsi kriptoxromun - göy işığın fotoreseptorunun mümkün aktivləşməsi ilə əlaqədar ola bilər [7, 11].

## **DİSSERTASIYA İŞİNƏ AİD ÇAP EDİLMİŞ ELMİ NƏŞRLƏRİN SİYAHISI**

1. Pashayeva, A.N., Zulfugarov, I.S. Non-photochemical quenching dependent proteome changes in thylakoid membranes // International Conference Innovative Approaches to Conservation of Biodiversity, - Baku: - October 2-4, – 2016, – p. 56.
2. Zulfugarov, I.S., Pashayeva, A.N., Lee, C-H., Chlorophyll fluorescence measurements to quantify photosynthesis in crop plants // Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS, – 2017. 1, – p. 133-138.
3. Пашаева, А.Н., Зулфугаров, И.С. Изменения в распределении

- белков фотосинтетических комплексов, ответственных за нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла // Вторая международная научно-практическая конференция «Роль молодых ученых в развитии науки, инноваций и технологий», – Душанбе, Таджикистан: –11-12 Мая, – 2017, – с. 90-91.
4. Zulfugarov I.S., Practical guide to measure chlorophyll fluorescence in plants and calculate main chlorophyll fluorescence parameters / I.S.Zulfugarov, A.N.Pashayeva, Z.M.Okhlopkova [et al.] // Вестник СВФУ, 2(64), – 2018, – р. 35-44.
  5. Pashayeva, A.N., Zulfugarov, I.S. Omics’technologies for investigation plants’ response to abiotic stresses // Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS, 2, –2018. – р. 44-54.
  6. Pashayeva, A.N. Light-induced dynamics of distribution of photosystem II proteins in the thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana* plants // Conference of Young Scientists and Students, Innovations in biology and agriculture to solve global challenges, Baku: - October 31, – 2018, – р. 39.
  7. Pashayeva, A.N. The effect of different light quality treatments on plants pigment-protein complexes dynamics // Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS, 3, – 2019. – р. 85-89.
  8. Пашаева, А.Н., Зулфугаров, И.С. Изменения в распределении белковых комплексов тилакоидной мембраны в ответ на свет высокой интенсивности // Gənclər gününə həsr olunmuş "Müasir biologiyanın aktual problemləri" mövzusunda elmi-praktiki konfrans, – Bakı: - 5 fevral, – 2019, с. 62-63
  9. Pashayeva, A.N. The localisation of PsbS protein and light-dependent structural changes in photosystem II of vascular plants // First National Students Scientific Conferences dedicated to the 96<sup>th</sup> anniversary of the National Leader of Azerbaijan Heydar Aliyev, Baku: - April 15-19, – 2019, – р. 125-126.
  10. Aliyeva, D.R. Photosynthetic machinery and antioxidant status of wheat genotypes under drought stress followed by rewatering /

- D.R. Aliyeva, L.M.Aydinli, A.N.Pashayeva [et al.] // *Photosynthetica*, – 2020, 58(5), – p. 1217-1225.
11. Pashayeva, A.N. Comparative analysis of the thylakoid membrane pigment-protein complexes after different quality light treatments // Second International Scientific Conference of Young Scientists and Specialists Multidisciplinary approaches in solving modern problems of fundamental and applied sciences, Dedicated to the 75th anniversary of Azerbaijan National Academy of Sciences,- Baku: 3-6 March, – 2020, – p. 123-124.
  12. Pashayeva, A.N. Role of thylakoid protein phosphorylation in energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in rice plants / A.N.Pashayeva, G.Wu, I.M.Huseynova [et al.] // *International journal of molecular sciences*, – 2021, 22(15), - 7978. <https://doi.org/10.3390/ijms22157978>
  13. Pashayeva, A.N. PsbS dependence in lipid and pigment composition in rice plants // *Bulletin of Science and Practice*, – 2021. 7(9), – p. 59-68. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/70/05>
  14. Pashayeva, A.N. Localization of the PsbS protein within the photosystem II in rice plants // *Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies*, – 2021. 5, – p. 58-62.

Dissertasiyanın müdafiəsi 28 fevral 2022-ci il tarixində saat 11:00 -da AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən ED 1.25 Dissertasiya şurasının iclasında keçiriləcək.

Ünvan: AZ1073, Bakı şəh., İzzət Nəbiyev küçəsi, 11.

Dissertasiya ilə AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq olar.

Dissertasiya və avtoreferatın elektron versiyaları AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun rəsmi internet saytında (<https://www.imbb.az/>) yerləşdirilmişdir.

Avtoreferat 28 yanvar 2022-ci il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa imzalanıb: 26.01.2022

Kağızın formatı: A5

Həcm: 39939

Tiraj: 30