

GLRaV 3 Virusunu ilə Yoluxmuş Üzüm (*Vitis vinifera* L.) Yarpaqlarında Fizioloji Göstəricilərin, Malat və Azot Metabolizmində İştirak Edən Fermentlərin Fəallıqlarının Tədqiqi

N.F. Sultanova*, N.K. Bayramova, D.R. Əliyeva, U.Ə. Qurbanova, İ.M. Hüseynova

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Mətbuat prospekti, 2A, Bakı AZ 1073, Azərbaycan; *E-mail: nargizsultanova@mail.ru

Salyan, İsmayilli və Abşeron rayonları ərazisində həyata keçirilən fitopatoloji monitorinqlər zamanı üzüm yarpaqlarının burulması xəstəliyinin xarakterik əlamətlərinə malik bitki nümunələrinin seroloji və molekulyar analizləri nəticəsində *Üzüm yarpaqlarının burulması virusu 3* (GLRaV 3) virusu aşkar edilmişdir. GLRaV 3 virusu ilə yoluxmuş bitkilərin yarpaqlarında NAD-malatdehidrogenaza (NAD-MDH), aspartataminotransferaza (AsAT) və alaninaminotransferaza (AlAT) fermentlərinin fəallıqları, quru biokütlə, nisbi su tutumu, həll olan zülalların və qlisin-betainin miqdarı tədqiq edilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, sağlam bitkilərlə müqayisədə virus patogenezi zamanı NAD-MDH fermentinin fəallığı əhəmiyyətli dərəcədə artdığı halda, AsAT və AlAT transferazaların fəallıqları azalır. Eyni zamanda, virusu ilə yoluxmuş nümunələrdə nisbi su tutumunun miqdarının azalması, quru biokütlənin, həll olan zülallar və qlisin - betainin miqdarının artması müşahidə edilmişdir.

Açar sözlər: *Vitis vinifera*, üzüm yarpaqlarının burulması virusu 3, NAD-malatdehidrogenaza, aspartataminotransferaza, alaninaminotransferaza, qlisin-betain

GİRİŞ

Müasir məlumatlara görə, dünyada üzüm bitkisini (*Vitis vinifera* L.) yoluxdurən 20 müxtəlif fəsiləyə aid 70-ə yaxın virus məlumdur (Hannan et al., 2016). Üzümün müxtəlif sortlarını yoluxdurən virus xəstəliklərinin sayı digər çoxillik meyvə ağaclarını yoluxdurən xəstəliklərə nisbətən daha çoxdur. Üzümün virus xəstəlikləri arasında üzüm yarpaqlarının burulması iqtisadi cəhətdən daha təhlükəli olub, 60%-ə qədər məhsul itkisinə səbəb olur (Borgo et al., 2003). Xəstəliklərlə yoluxma bitkinin inkişafının dayanmasına, meyvələrin və köklərin zədələnməsinə, müxtəlif orqanlarda piqmentləşmənin əmələ gəlməsinə və metabolizmin müxtəlif aspektlərinin (assimilyatların daşınması, tənəffüs, fotosintez və s.) pozulmasına səbəb olur və əksər hallarda bitkilərin məhv olmasına gətirib çıxarır (Cohen et al., 2003). Bəzi hallarda isə virus xəstəlikləri latent xarakter daşıyır. Ümumiyyətlə, üzümün virus xəstəlikləri sistemli və xroniki xarakter daşıyır: yoluxmuş bitkilərin vegetativ yolla çoxaldılması mütləq halda xəstə əkin materialının yaranması ilə nəticələnir ki, bu da xəstəliyin daha geniş ərazilərə yayılmasına şərait yaradır. Yoluxmuş bitkilərdə xloroz, sarılıq, yarpaqların burulub-qıvrılması və qırmızılıq kimi əlamətlər müşahidə olunur (Christov et al., 2007). Şiddətli yoluxma zamanı bitkilərin yarpaqlarında nekrotik ləkələrin əmələ gəlməsi müşahidə edilir və bu zaman əksər hallarda bitki məhv olur. Klosteviruslar içərisində GLRaV 3 virusu dünyanın əsas üzümçülük

regionlarında ağır iqtisadi ziyanə səbəb olur. GLRaV 3 Ampelovirus cinsinə daxil olan (ailə *Clasteroviri-dae*) floema ilə hərəkət edən və onunla məhdudlaşan, seroloji olaraq üzüm yarpaqlarının burulması virusu ilə əlaqəli müəyyən edilmiş doqquz xəstəlikdən biridir (Montero et al., 2016). Bu virusu ilə yoluxma üzüm bitkisinin məhsulunun azalması, məhsulun yetişməsinin gecikməsi, bərk maddələrin həll olmasının azalması, giləmeyvələrdə antosianinin miqdarının azalması və titirlənən turşuluğun yüksəlməsi kimi bir sıra fizioloji dəyişikliklərin əmələ gəlməsinə səbəb olur. GLRaV-3 virusu yalnız üzüm cinsindən olan bitkiləri yoluxduraraq ağ və qırmızı üzüm sortlarının hamısına təsir edir.

Ampelovirus cinsinə aid viruslar birtərkibli (monopartite), xətti, müsbət, 16,9-19,5 kb ölçüyə malik ssRNA tərkibli genomdan təşkil olunmuşdur. GLRaV-3 (NY-1 izolyatının) genomu 2004-cü ildə tam sekvens olunmuşdur. Onun genomu müvafiq olaraq 158 və 277 n.c. olmaqla translyasiya olunmayan UTR (untranslated region) sahə ilə 13 açığ oxunma çərçivəsindən ibarət (ORFs) 17919 n.c.-dən təşkil olunduğu müəyyən edilmişdir (Cohen et al., 2003).

Məlumdur ki, ətraf mühitin əlverişsiz amilləri hüceyrədə oksigenin fəal formalarının (OFF) əmələ gəlməsinə səbəb olur ki, bu da öz növbəsində oksidləşmə stressinə gətirib çıxarır. Müxtəlif təbiətli patogenlərə qarşı bitkinin davamlılıq dərəcəsi stress vəziyyətlərində bitkinin metabolizmində baş verən dəyişikliklərə və həyatilik qabiliyyətinə cavabdeh olan bir sıra fizioloji və biokimyəvi göstəricilərlə

təmin olunur (Gara et al., 2003). Bitkilərdə əlverişsiz mühit şəraitinə və biotik stressə cavab reaksiyasında malat və azot metabolizmində iştirak edən fermentlərin rolunun tədqiq edilməsi son zamanlar ən aktual problemlərdən hesab olunur.

Bu baxımdan, tədqiqat işinin məqsədi - sağlam və virusla yoluxmuş üzüm bitkisinin yarpaqlarında bəzi fizioloji göstəricilərin və NAD-malatdehidrogenaza, aspartataminotransferaza və alaninaminotransferaza fermentlərinin fəallıqlarının tədqiqinə həsr olunmuşdur.

MATERIAL VƏ METODLAR

Tədqiqatın obyekti. Tədqiqat işində Salyan, İsmayılı rayonlarından və Abşeron Elmi-Tədqiqat Üzümçülük və Şərabçılıq, Əkinçilik Elmi-Tədqiqat institutlarının təcrübə sahələrindən toplanılmış sağlam və xəstəlik simptomlarına malik üzüm bitkisinin (*Vitis vinifera* L.) yarpaqlarından istifadə edilmişdir.

Seroloji diaqnostika. Fitopatoloji monitorinqlərin nəticələrinə əsasən klostevirusların xarakterik simptomları müəyyən edilmiş və xəstə bitki nümunələri ilkin olaraq vizual qiymətləndirilmişdir. Vizual diaqnostikanın nəticələrinə uyğun olaraq virusla yoluxmuş üzüm nümunələri seroloji metodlardan (spesifik test-zolaqlardan və immunoferment analizdən) istifadə etməklə yoxlanılmışdır (Huseynova et al., 2016).

RNT-nin ekstraksiyası. Xəstə və sağlam bitkilərin yarpaq nümunələrindən 30-50 mq götürülərək ekstraksiya üçün nəzərdə tutulmuş xüsusi steril paketlərdə üzərinə 500 mkl ekstraksiya buferi (TRI-reagent) əlavə olunaraq homogen qarışıq alınandaək əzilmişdir və 10 dəq. müddətinə otaq temperaturunda saxlanılmışdır. Əmələ gəlmiş suspenziya pipetlə götürülərək 1 ml-lik nömrələnmiş tyublara keçirilmiş və üzərinə 100 mkl xloroform əlavə edilmiş, vorteksdən sonra yenidən 10 dəq müddətinə otaq temperaturunda saxlanılmışdır. 13500 dövr/dəq sürətlə 15 dəqiqə sentrifugalasdırılmışdır. Hər tyubdakı üst fazadan 900 µl götürülərək nömrələnmiş yeni steril 1,5 ml-lik tyublara keçirilmiş, üzərinə 250 µl izopropanol əlavə edilərək ehtiyatla qarışdırıldıqdan sonra 15 dəqiqə ərzində otaq temperaturunda saxlanılmış və 20 dəqiqə 13500 dövr/dəq sürətlə sentrifugalasdırılmışdır. Sentrifugalasdıqdan sonra supernatant kənarlaşdırılmış və tyubların dibinə çökmüş RNT 2 dəfə 75%-li etanolda yuyularaq otaq temperaturunda qurudulmuşdur. Ekstraksiya olunmuş RNT nümunələri həll olması üçün 30 dəq otaq temperaturunda saxlanılmış və istifadə edilmək üçün -80°C temperaturda soyuducuya qoyulmuşdur.

RNT-nin təmizlik dərəcəsinin və qatılığının spektrofotometrik təyini. Ekstraksiya edilmiş RNT nümunələrinin təmizlik dərəcəsi və qatılığı spektrofotometriya metodu ilə yoxlanılmışdır. Bunun üçün spektrofotometrə 260 və 280 nm dalğa uzunluqlarında RNT nümunələrinin optik sıxlıqları ölçülmüşdür. RNT-nin təmizlik dərəcəsi 260 və 280 nm-də optik sıxlıqlar arasındakı nisbətə (OS260/OS280) əsasən təyin edilmişdir.

RNT ekstraktlarının RT-PZR və PZR metodları ilə amplifikasiyası. Ekstraksiya edilmiş RNT nümunələri RT-PZR metodu ilə yoxlanılmışdır. Reaksiya üçün (1 nümunə üçün): 2 µl RNT, 1 µl LR3 8504v -3' praymer, 0,5 µl d NTP (2,5 mM), 4 µl RT (5x) buffer, 0,25 µl M-MLV (enzyme RT), 12,5 µl ddH₂O istifadə edilmişdir. Reaksiya 1 saat olmaqla 42°C-də aparılmışdır. Reaksiyanı dayandırmaq üçün nümunələr 10 dəqiqə 65°C-də saxlanılmışdır.

RT-PZR məhsulları 1,5 %-li aqaroza gəlində elektroforetik analiz olunduqdan sonra PZR metodu ilə amplifikasiya edilmişdir. Reaksiya üçün (1 nümunə üçün): 2 µl kDNT, 5 µl Tampon (5x), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl GLRaV-3 üçün spesifik praymer (LR3 8504v -3' və LR3 9445c -5'), 0,2 µl dNTP (25 mM), 15,1 µl dd H₂O və 0,2 µl Tag polymerase dan ibarət mix hazırlanmışdır. 1 nümunə üçün ümumi reaksiyanın həcmi 25 µl təşkil etmişdir. Reaksiya yığıldıqdan sonra nümunələr DNT Termal amplifikatora (Gene Amp PCR System 2720, Applied Biosystems) yerləşdirilmiş və protokola uyğun ardıcılıqda proqram tərtib olunaraq PZR həyata keçirilmişdir (İlkin olaraq reaksiya 94°C temperaturda 3 dəq. DNT zəncirinin denaturasiyası, 94°C-də 30 san., 55°C-də 30 san., 70 °C-də 50 san. olmaqla 35 tsikl elonqasiya aparılmış və 72°C də 10 dəqiqə sintez tamamlanmışdır). Amplifikasiyanın nəticələri 1,5%-li aqaroza gəlində elektroforetik analiz edilmişdir.

Quru biokütlənin təyini. Üzüm yarpaqlarında quru biokütlənin miqdarının ölçülməsi üçün əvvəlcə xəstə və sağlam yarpaq nümunələrindən eyni ölçülərdə kəsiklər hazırlanmış və elektron tərəzidə kütləsi təyin edilmişdir. Daha sonra hazırlanmış yarpaq nümunələri 80°C temperaturda 24 saat termostatda saxlandıqdan sonra yarpaqların quru çəkisi təyin olunmuşdur. Quru biokütləni hesablamaq üçün aşağıdakı düsturdan istifadə edilmişdir: $C = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%$. (C - kütləyə nəzərən quru maddə tərkibinin %-lə ifadəsi; m_1 - nümunənin qurudulmadan əvvəl çəkisi; m_2 - nümunənin qurudulmadan sonrakı çəkisi).

Nisbi su tutumunun təyini. Virusla yoluxmuş üzüm nümunələrində suyun nisbi miqdarı (Tambussi et al., 2005) metodikasına əsasən təyin edilmişdir. Virusla yoluxmuş və sağlam nümunələrin hər birinin yarpağının mərkəzi hissəsindən 5-10 sm²

hissə kəsilərək ilkin çəkisi ölçülmüşdür. Daha sonra nümunələr Petri kasalarında üzərini distillə suyu örtənədək soyuq temperaturda 24 saat saxlanılmışdır (suyu dondurmamaq şərti ilə). Yarpaqların doymuş çəkisini ölçdükdən sonra 80°C-də 24 saat onlar qurudulmuş və quru çəkisi də ölçülmüşdür. Su göstəriciləri aşağıdakı düsturla hesablanmışdır: $SNM=100\%(Mf-Md)/(Mt-Md)$ (Mf - ilkin çəki; Mt – su ilə doymuş çəki (yaş çəki); Md – quru çəki).

Bitki ekstraktlarının hazırlanması. Yarpaqlar gövdədən ayrılmış, distillə suyu ilə yuyulduqdan, filtr kağızı ilə qurudulduqdan sonra xırda hissələrə doğranılmış və həvəngdəstədə kvarts qumunun iştirakı ilə 2 dəqiqə müddətində 20 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% qliserin və 0,5% polovinilpirrolidon tərkibli, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) bufer məhlulunda homogenizasiya olunmuşdur. Bu əməliyyat 1 q yarpağa 5 ml bufer məhlulu əlavə etməklə +4°C temperaturda aparılmışdır. Alınan homogenat ikiqat kaprondan süzüləndən sonra nüvədən və parçalanmayan bitki toxumalarından azad olunmaq üçün əvvəlcə 10 dəq 10000 g sürəti ilə sentrifüqalasdırılmışdır. Çöküntü atıldıqdan sonra supernatant maye fermentlərin fəallıqlarının tədqiq olunması məqsədi ilə istifadə olunmuşdur.

NAD-malaldehidrogenaza (NAD-MDH, EC 1.1.1.37) fermentinin fəallığının təyini. Reaksiya mühiti 10 mM oksalasetat (OAA), 10 mg/ml öküzün zərədb albumini (BSA), 10 mM $MgCl_2$, 12 mM NAD·H və 10 µl ferment preparatı olan 100 mM, pH 8,0, Tris-HCl buferindən ibarətdir. NAD-MDH reaksiyası reaksiya mühitinə substrat (10 mM OAA) əlavə etməklə başlayır (Scheibe, 2004).

Aspartaminotransferaza (AsAT, 2.6.1.1) fermentinin fəallığının təyini. Reaksiya mühitinin tərkibi 1,0 ml üçün 2,5 mM 2-oksiqlutarat, 2,5 mM Na-aspartat, 5 µM piridoksal 5-fosfat, 0,2 mM NADH, 2 mM EDTA, 3U MDH and 25 mM Tris-HCl (pH8,5) və 25mkl ferment ekstraktı əlavə olunur (Alfonso and Brüggemann, 2012).

Alaninaminotransferaza (ALAT, 2.6.1.2) fermentinin fəallığının təyini. Reaksiya mühitinin tərkibi 1,0 ml 10 mM 2-oksiqlutarat, 0,28 mM NADH, 1,2 U LDH, 70 mM alanin və 100 mM Tris-Hcl (pH8,0) və 50 mkl ferment ekstraktı əlavə olunur (Horde and Rej, 1983).

Hər üç fermentin fəallığı spektrofotometrik (Ultrospec 3300 pro, Amersham, USA) metodla təyin olunmuşdur. Ölçmələr 1,0 ml həcmli spektrofotometrik küveytlərdə 340 nm dalğa uzunluğunda 1 dəqiqə ərzində aparılmışdır.

Zülalların miqdarının təyini. Həll olan zülalların ümumi miqdarı 0,12%-li Coomassie Brilliant Blue G-250 məhlulunun köməyi ilə spektrofotometrik yolla təyin olunmuşdur (Sedmak and Grossberg, 1977).

Qlisin-betainin miqdarının təyini. Qlisin-betainin miqdarı (Grieve and Grattan, 1983) metoduна əsasən təyin edilmişdir. Rənglənmiş məhlulun optik sıxlığı spektrofotometrde 365 nm dalğa uzunluğunda ölçülmüşdür. Qlisin betainin miqdarı standart şəkildə qlisinbetain kommersiya preparatından (Serva, Almaniya) istifadə etməklə kolibr ayrısına əsasən müəyyən olunmuşdur.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

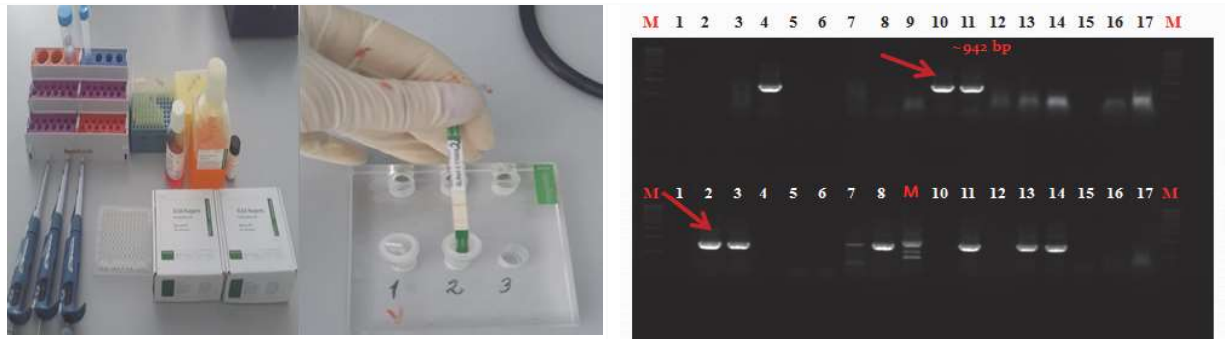
Fitopatoloji monitorinqlər zamanı qırmızı üzüm sortlarının yarpaqlarında virus xəstəliklərinin əsas əlamətləri olan ana damar və əsas damarlar yaşıl qalarkən damar aralarında qırmızı və tünd qırmızı ləkələrin əmələ gəlməsi, yarpaq ayasının mərkəzi hissəsində damardaxili laminaların qızarması və kənarlara doğru yaşıl damarların olması, yarpaqların kənarlarının aşağıya doğru burularaq qayıqabənzər forma alması müşahidə edilmişdir. Ağ üzüm sortlarının yarpaqlarında isə sarımtıl və mozaik-sarı ləkələrin əmələ gəlməsi, bəzi hallarda yarpaqların burulması, yarpaq ayasının səthində kələkötürlük, yarpaqda nekroz ləkələrin əmələ gəlməsi kimi xarakterik əlamətlər müşahidə edilmişdir (Şəkil 1). Toplanmış üzüm nümunələri vizual diaqnostikanın nəticələrinə uyğun olaraq, müxtəlif indikator-seroloji metodlarla analiz olunmuş və nəticədə üzüm bitkisinin dünyə üzrə geniş yayılmış, ciddi xəstəliklərə səbəb olan üzüm yarpaqlarının burulması virusu3 (GLRaV 3) Saperavi və Narçiçəyi qara üzüm sortlarında aşkar edilmişdir.

Üzüm bitkisinin aşkar olunmuş virus xəstəliklərinin molekulyar diaqnostikasını həyata keçirmək məqsədilə seroloji analizlərin nəticələrinə görə pozitiv nümunələrdən RNT ayrılmış və RT-PZR metodu ilə yoxlanılmışdır. RT-PZR amplifikasiyası zamanı üzüm yarpaqlarının burulması virusu üçün spesifik praymerlər olan LR3 8504v (3' – ATGGCATTGAACTGAAATT-5') və LR3 9445c (5'-CTACTTCTTTTGCAATAGTT-3') seçilmişdir. Nəticədə gözlənilən ölçüdə 942 bp uzunluğunda fraqment sintez olunmuşdur (Şəkil 2).

Müxtəlif abiotik və biotik stres amillərinin təsiri zamanı bitkidə ən çox öyrənilən fizioloji göstəricilərdən biri də quru biokütlənin miqdarıdır. Quru biokütlə bioloji materialda suyun olduğunu istisna etdiyi üçün bitkilərin kütləsini göstərən ən düzgün göstərici sayılır. Ümumi quru biokütlə çox vaxt bitkinin inkişafının və böyüməsinin qeydə alınması üçün ölçülür, çünki vegetativ orqanların (kök, gövdə, yarpaq) quru biokütləsi, ümumiyyətlə, reproduktiv kütlə ilə sıx əlaqəlidir. Quru biokütlə, eyni zamanda bitki materialının keyfiyyətini qiymətləndirən əsas göstəricilərdən biridir.



Şəkil 1. Üzümün yarpaqlarının burulması virusu 3 ilə yoluxmuş üzüm nümunələrində müşahidə olunan xarakterik simptomlar. A, B - qara üzüm sortları, C, D - ağ üzüm sortları.



Şəkil 2. Müxtəlif üzüm nümunələrində Üzüm yarpaqlarının burulması virusu 3 virusunun seroloji (immunostrip və ELİSA) və molekulyar (RT- PZR metodu) diaqnostikası. M -100 bp DNA ladder.

Bu baxımdan, quru biokütlənin bitkinin fizioloji vəziyyətini qiymətləndirən göstəricilərdən biri olduğunu nəzərə alaraq, tədqiqat zamanı Üzüm yarpaqlarının burulması virusu 3 ilə yoluxmuş üzüm nümunələrində quru biokütlə təyin edilmişdir.

Tədqiqatlar nəticəsində virusla yoluxmuş nümunələrdə sağlam nümunələrlə müqayisədə quru biokütlənin əhəmiyyətli dərəcədə artması müşahidə edilmişdir (Cədvəl 1). Suyun nisbi miqdarı və quru

biokütlənin ölçülməsi zamanı əldə edilmiş nəticələr bir-birini tamamlamışdır. Belə dəyişikliklər virusların təsirindən bitkidə yaranan stres zamanı yarpaqlarda tənəffüsün artması və fotosintetik aktivliyin azalması ilə əlaqədar ola bilər (Gonçalves et al., 2013). Digər tədqiqat işlərində patogenlərin bitkidə CO₂ assimilyasiyasına neqativ təsir etməsi ilə yanaşı yarpaqlarda su tutumuna da mənfi təsir göstərması müşahidə olunmuşdur (Montero et al., 2016).

Cədvəl 1. GLRaV 3 ilə yoluxmuş bitki nümunələrində quru biokütlə, suyun nisbi tutumu, qlisin-betain və həll olan zülalların miqdarı.

Üzüm sortları		Quru biokütlə, %	Nisbi su tutumu, %	Həll olan zülallar, mq/ml	Qlisin-betain, mq/q quru kütlə
Saperavi	I	28	86	15,00±1,76	32,00±1,27
	II	44	75	18,00±0,88	48,00±0,58
Narçiçəyi	I	36	82	22,00±2,51	21,00±1,02
	II	47	68	24,00±2,04	42,00±1,09

I - sağlam bitki; II – GLRaV 3 ilə yoluxmuş bitki

Bəzi müəlliflər virusların təsiri zamanı bitkidə baş verən fizioloji dəyişiklikləri bitkinin stresə qarşı hipersensitiv cavab reaksiyaları ilə əlaqələndirirlər (Radwan et al., 2007; Hannan et al., 2016).

Suyun nisbi miqdarı (SNM) fizioloji nöqtəyi nəzərdən, hüceyrədə su qıtlığı və ya çatışmamazlığı kimi qiymətləndirilir. SNM yarpağın tam hidratlaşmış və tamamilə məhv olmuş vəziyyətindəki suyun tutumu olub müxtəlif əlverişsiz amillərinin təsirinə qarşı bitkidə suyun vəziyyətini öyrənməyə kömək edən göstəricidir. Aparılan tədqiqatlar zamanı virusla yoluxmuş yarpaq nümunələrində SNM göstəricisi sağlam nümunələr ilə müqayisədə xeyli aşağı olmuşdur (Cədvəl 1). Oxşar nəticələr TMV virusu ilə yoluxdurulmuş bibər bitkisinin də əldə edilmişdir (Synková et al., 2006; Al-Saleh et al., 2007). Üzümün bir neçə sortu üzərində tədqiqatlarda GLRaV 3 ilə yoluxmuş bitkilərdə sağlam nümunələrlə müqayisədə vegetativ orqanların inkişafının zəifləməsi, yarpaqların səthinin kiçilməsi, nisbi su tutumunun azalması müşahidə edilmişdir (Marković et al., 2014). GLRaV 3 virusu (Cui et al., 2015), Grapevine leafroll virusları (Tanne et al., 1996) və Grapevine fanleaf virus (GFLV) (Abraçeva et al., 1994) ilə yoluxmuş üzüm nümunələri ilə *in vitro* şəraitdə aparılan tədqiqatlarda da oxşar nəticələr alınmışdır.

Mühitin əlverişsiz amilləri olan müxtəlif abiotik və biotik stress faktorların bitkilərdə həll olan zülalların miqdarına təsir göstərməsi məlumdur. Virus infeksiyalarının da bitkilərdə həll olan zülalların miqdarına təsir etməsi çoxlu sayda tədqiqatlarda müəyyən olunmuşdur. GFLV və GLRaV 3 virusları ilə yoluxmuş yarpaqlarda həll olan zülalların miqdarının artması müəyyən edilmişdir (Sampol et al., 2003). Eyni zamanda, GLRV virus infeksiyasının təsirinə üzümde həll olan zülalların miqdarının artması baş verir (Bertamini et al., 2004; Moutinho-Pereira et al., 2012). BBTV virusu ilə yoluxmuş banan bitkisinin (Haq et al., 2012), PLRV və ya PVY virusları ilə yoluxmuş kartof bitkisinin (Li et al., 2013) anaoloji nəticələr əldə edilmişdir.

Cədvəl 1-dən göründüyü kimi, GLRaV 3 virusu üzüm yarpaqlarında həll olan zülalların miqdarının artmasına səbəb olmuşdur. Guman olunur ki, həll olan zülalların miqdarının artması virus infeksiyasının təsirinə bitkidə yaranan oksidləşdirici

stresə cavab olaraq zülalların ümumi sintez proseslərinin artması ilə əlaqədar ola bilər (Maroco et al., 2002).

GLRaV 3 infeksiyasının təsirinə üzüm bitkisinin baş verən biokimyəvi dəyişikliklərin tədqiqi mühüm əhəmiyyətə malikdir. Bu məqsədlə bitkilərdə metabolizm proseslərində mühüm rol oynayan bəzi fermentlərin (NAD-MDH, AsAT və AlAT) fəallıqları sağlam və virusla yoluxmuş üzüm sortlarının yarpaqlarında müqayisəli şəkildə öyrənilmişdir. NAD-malatdehidrogenaza (l-malat-NAD-oksido-reduktaza) bir çox metabolik proseslərdə, məsələn, üçkarbonlu turşular və qlüksilat dövrələrində, amin turşularının sintezində, qlükoneogenezdə və metabolitlərin sitozolla subhüceyrə orqanoidləri arasında mübadiləsində iştirak edir (Nicholls et al., 1992). Bitkilərdə geniş yayılmış NAD-malatdehidrogenaza fermentinin iştirakı ilə bitki metabolizmində yaranan malat müxtəlif proseslərə qoşulmaqla, bitkilərdə həyati əhəmiyyət kəsb edən adaptiv reaksiyaların yaranmasında mühüm rol oynayır. Bu ferment aralıq metabolitlərdən olan malatın oksaloasetata və əksinə çevrilmə reaksiyasını həyata keçirir. Eyni zamanda, mitoxondriyərdə Krebs tsiklinin komponenti, sitozol, peroksisomlarda və qlükosomlarda malat-aspartat mübadiləsində iştirak edir (Nunes et al., 2005; Schertl, 2014; Scheibe, 2004). Buna görə də virus infeksiyasının bitkinin metabolizminə təsirinə aydınlaşdırılması baxımından NAD-MDH fermentinin fəallığı xəstə və sağlam üzüm bitkilərində müqayisəli tədqiqi xüsusilə əhəmiyyətlidir. Müxtəlif üzüm sortlarının xəstə və sağlam yarpaqlarında NAD-MDH fəallığı spektrofotometrik yolla təyin edilmişdir (Cədvəl 2). Sağlam üzüm sortları ilə müqayisədə virus infeksiyasının təsirinə tədqiq edilən nümunələrin hamısında NAD-MDH fəallığı artmışdır.

Məlumdur ki, azot metabolizmi fermentlərinin fəallığı transkripsiya səviyyəsində tənzimlənir və infeksiya xəstəliklər zamanı mühüm rol oynayır (Ward et al., 2010). Aspartataminotransferaza ilkin azot assimilyasiyasında, reduksiyaedici ekvivalentlərin nəqlində və hüceyrə subkompartimentləri arasında karbon və azot ehtiyatının qarşılıqlı mübadiləsində əsas rol oynayır (Gantt et al., 1992; Martins M., 2002; Torre, 2014; Gaufichon et al., 2015).

Cədvəl 2. Üzüm yarpaqlarının burulması virusu 3 ilə yoluxmuş bitki nümunələrində NAD-MDH, AsAT və AlAT fermentlərinin fəallığı

Üzüm sortları		NAD-MDH mkmol OA/mg zülal. dəq	AsAT U/mg zülal	AlAT U/mg zülal
Saperavi	I	1,53±0,92	0,42±0,84	0,92±0,96
	II	1,84±1,05	0,26±0,98	0,66±1,08
Narçiçəyi	I	1,42±0,86	0,61±1,04	0,81±1,02
	II	1,85±1,02	0,56±0,84	0,76±0,94

I - sağlam bitki; II – GROV 3 ilə yoluxmuş bitki

Bitkilərdə AsAT fermentinin subhüceyrə orqanoidlərində, sitozolda, xloroplastlarda, mitoxondrilərdə və peroksisomlarda bir neçə izoforması lokalizə olunur (Duff, et al 2012). AsAT fermentinin fəallığında isə xəstə bitkilərdə sağlam yarpaq nümunələri ilə müqayisədə əhəmiyyətli dərəcədə dəyişikliklər müşahidə olunmamışdır (Cədvəl 2).

Alaninaminotransferaza metabolik proseslərdə həlledici rola malik fermentlərdən biridir. AlAT fermenti alanin və 2-oksiquutaratın piruvat və qlütamata çevrilməsi reaksiyasını kataliz edir. Bu pirodaksal-fosfat asılı ferment bitki metabolizmində, əsasən, karbonun ilkin mübadiləsində və amin turşularının sintezində mühüm rol oynayır (Kendziorek et al., 2012). Bəzi bitkilərin peroksisomlarında və mitoxondrilərində bu ferment homoloji olaraq fototənəffüs və metabolizmin tənzimlənməsində iştirak edir (Shrawat et al., 2008; Good, 2007; Niessen et al., 2012). Müxtəlif abiotik streslərə, virus və patogenlərə cavab reaksiyalarının formalaşmasında da AlAT mühüm rol oynayır (Kim et al., 2005; Miyashita et al., 2007). Alanin və AlAT fermentinin bitkilərdə əlverişsiz mühit şəraitinə və biotik stressə cavab reaksiyasında rolunun tədqiqi son zamanlar ən aktual problemlərdən hesab olunur. Virus infeksiyasının üzüm bitkisinde yaratdığı metabolik dəyişikliklərin göstəricisi kimi, alaninaminotransferaza fermentinin fəallığı da xəstə və sağlam yarpaqlarda müqayisəli şəkildə təyin edilmişdir (Cədvəl 2). Virus infeksiyasının təsirindən bütün xəstə üzüm sortlarında AlAT fermentinin aktivliyinin azalması müşahidə edilmişdir. Saperavi sortunda Narçiçəyi sortuna nisbətən hər iki amino-transferazanın fəallığı daha çox azalmışdır. İnfeksiyanın təsirindən bitki yarpaqlarının floema borularında amin turşularının nəqlində məhdudiyətlər yaranır ki, bu da onların toplanmasına gətirib çıxarır. Amin turşuların nəqlinin inhibirləşməsinin yüksək həddində AlAT və AsAT-ın aktivliyinin azalması müşahidə edilir, bu isə bitkinin böyüməsinə və məhsuldarlığa mənfi təsir göstərir. Beləliklə, aparılan tədqiqat işi göstərmişdir ki, Narçiçəyi sortu Saperavi sortuna nisbətən GLRaV 3 infeksiyasına qarşı daha davamlıdır. Qarğıdalı ilə aparılan tədqiqatlarda xarici mühitin abiotik amillərinin və eləcə də patogenlərin təsirindən AlAT fermentinin fəallığının dəyişilməsi göstərilmişdir (Subbaiah, Sachs, 2003). AlAT fermentinin metabolik proseslərdə əsas rolu karbon metabolizmi

ilə nitrat metabolizmi arasında əlaqənin təmin edilməsi və piruvatın hüceyrə daxilində nəqlinin həyata keçirilməsi, müxtəlif abiotik və biotik stressə cavab reaksiyasıdır.

Qlisin-betain (QB) dördlü ammonium birləşmələri qrupuna aiddir. QB qlisinin məhsuludur və hüceyrə membranının fosfolipidlərinin sintezində aktivator rolunu oynayır. Onun bakteriya və bitkilərdə sintez olunmasında əsas rolu xolin və iki ferment (xolin monooksigenaza və betain dialdehid dehidrogenaza) oynayır. Bir sıra biotik və abiotik stress amillərinin təsirindən onun yarpaqlarda toplanması halları müşahidə olunur. Osmolit və protektor rolunu oynayan qlisin betain hüceyrə daxilində osmotik balansını tənzimləməklə bitkinin stressdən müdafiəsində (Robinson and Jones, 1986; Ma и др., 2007), antioksidant fermentlərin və 2-ci FS-in oksigen ayıran kompleksinə aid membran zülallarının quruluşunun stabilləşməsində (Rajasekaran et al., 1997) iştirak edir. Bir çox müəlliflərin fikrincə, stress şəraitində QB fotosintetik aparatın fəaliyyətini tənzimləməklə, bitki hüceyrələrini zədələnmələrdən qoruyur. Belə ki, digər kiçik molekullu azotlu birləşmələrlə müqayisədə, QB Rubisko və FSII-nin oksigen ayıran kompleksini daha effektiv müdafiə edir (Sakamoto, Murata, 2002; Allahverdiev et al., 2003). Bizim tədqiqatlarda qlisin betainin miqdarı virusla yoluxmuş nümunələrdə sağlam bitkilərlə müqayisədə yüksək olmuşdur və bu artım ikinci nümunədə (~2 dəfə) daha nəzərəçarpandır (Cədvəl 2).

Alınan nəticələr əsasında belə qənaətə gəlmək olar ki, üzüm bitkisinde virus infeksiyası zamanı baş verən fizioloji və biokimyəvi dəyişikliklər bitkinin infeksiyaya qarşı cavab reaksiyası kimi qiymətləndirilə bilər.

MİNNƏTDARLIQ

Tədqiqat işi Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı Fondunun maliyyə dəstəyi ilə yerinə yetirilmişdir (qrant N (EIF-2013-9(15)-46/28/3-M-14)).

ƏDƏBİYYAT

Ma С.Л., Ван Я.Ц., Си С.Л., Ван Ч., Ван В. (2007) Обработка глицин бетаином снижает

- вредное влияние засухи на растение. *Физиология растений*, **54**: 534-541
- Abracheva P., Rozenova L., Todorova M.** (1994). The influence of grapevine fanleaf virus and stem pitting on *in vitro* grapevine cultures. *Vitis*, **33**: 181-182.
- Alfonso S.U., Brüggemann W.** (2012) Photosynthetic responses of a C3 and three C4 species of the genus *Panicum* (s.l.) with different metabolic subtypes to drought stress. *Photosynthesis Research*, **112**: 175-191.
- Allakhverdiev S.I., Hayashi H., Nishiyama Y., Ivanov A.G., Aliev J.A., Klimov V.V., Murata N., Carpemtier R.** (2003) Glycinebetaine protects the D1/D2/Cyt *b* 559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation. *J Plant Physiol.*, **160**: 41-49
- Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N.** (2004) Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field-grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. Cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology*, **152**(3): 145-152.
- Borgo M., Angelini E., Flamini R.** (2003) "Effects of grapevine leafroll associated virus 3 on main characteristics of three vineyards." *L'Enologo* **3**: 99-110.
- Christov I., Stefanov D., Velinov T., Goltsev V., Georgieva K., Abracheva P.** (2007) The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown *in vitro* plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *J. Plant Physiol.* **164**: 1124-1133.
- Cohen D., van den Brink R.** (2003) Leafroll virus movement in grapevines. *HortResearch Client Report 11871 for Winegrowers of New Zealand*.
- Cui Z. H., Bi W. L., Chen P., Xu Y., Wang Q. C.** (2015) Abiotic stress improves *in vitro* biological indexing of Grapevine leafroll-associated virus-3 in red grapevine cultivars. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **21**: 490-495.
- Duff S.M.G., Rydel T.J., McClerren A.L., Zhang W., Li J.Y.** (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, **518**(1): 90-101.
- Gantt J.S., Larson R.J., Farnham M.W., Pathirana S.M., Miller S.S., Vance C.P.** (1992) Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.*, **98**: 868-878.
- Gara L. D., de Pinto M. C., Tommasi F.** (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.*, **41**: 863-870.
- Gaufichon L., Steven J.R., Akira S.** (2015) Asparagine metabolic pathways in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, doi: 10.1093/pcp/pcv184.
- Gonçalves L.S.A., Rodrigues R., Diz M.S.S., Robaina R.R., de Amaral Júnior A.T., Carvalho A.O.** (2013) Peroxidase is involved in Pepper yellow mosaic virus resistance in *Capsicum baccatum* var. Pendulum. *Genet. Mol. Res.*, **12**: 1411-1420.
- Good A.G., Johnson S.J., De Pauw M., Carroll R.T., Savidov N.** (2007) Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany*, **85**: 252-62.
- Haq I.U., Nazia P., Muhammad T.R., Muhammad U.D.** (2012) Comparative characteristics of micropropagated plantlets of banana from BBTV-infected explants to its normal and saline stressed cultures. *Pak. J. Bot.*, **44**: 1127-1130.
- Hörder M., Rej R.** (1983) Alanine aminotransferase. In: Methods of enzymatic analysis (H.U.Bergmeyer, J.Bergmeyer, M.Grabl, eds.). 3rd Ed. Germany: Chemie, Weinheim, Verlag, **3**: 444-456.
- Huseynova İ.M., Aliyeva D.R., Sultanova N.F., Bayramova N., Allahverdiyev T.İ., Aliyev J.A.** (2016) Effects of grapevine leafroll associated virus 3 on the photosynthesis and antioxidant compounds in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. *7th International Meeting "Photosynthesis Research for Sustainability - 2016" in honor of Nathan Nelson and T. Nejat Veziroglu, Pushchino*, p.21.
- Kendziorok M., Paszkowski A., Zagdanska B.** (2012) Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant cell reports*, **31**: 1105-1117.
- Kim K.J., Park C.J., An J.M., Ham B.K., Lee B.J., Paek K.H.** (2005) CaAlaAT1 catalyzes the alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper. *Planta*, **221**: 857-867.
- Li J.W., Wang B., Song X.M., Wang R.R., Zhang H., Zhang Z.B.** (2013) Potato leafroll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY) influence vegetative, physiological metabolism of *in vitro*-cultured shoots of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Tiss.*, **114**: 313-324.
- Marković Z., Preiner D., Bošnjak A. M., Safner T., Stupić D., Andabaka Ž.** (2014) *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grapevine cultivars. *Cent. Eur. J. Biol.*, **9**: 1087-1098.
- Maroco J. P., Rodrigues M. L., Lopes C., Chaves M.** (2002) Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought: metabolic and modeling approaches. *Funct. Plant Biol.*, **29**: 451-459.

- Martins M.L.L., de Freitas B.M.M.P., de Varenese M.A.P.A.** (2002) Characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from leaves of *Lupinus albus* L. cv Estoril. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**: 220-227.
- Miyashita Y., Dolferus R., Ismond K.P., Good A.G.** (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **49**: 1108-1121.
- Montero R., Pérez-Bueno M.L., Baron F., Tohge T., Fernie A.R.** (2016) Alterations in primary and secondary metabolism in *Vitis vinifera* 'Malvasia de Banyalbufar' upon infection with Grapevine leafroll-associated virus 3. *Physiologia Plantarum*, **157**: 442-452.
- Moutinho-Pereira J., Correia C. M., Gonclve B., Bacelar E. A., Coutinho J. F., Ferreira H. F.** (2012) Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and -3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar 'Touriga Nacional' growing under field conditions. *Annu. Appl. Biol.*, **160**: 237-249.
- Nicholls D.J., Miller J., Scawen M.D., Clarke A.R., Holbrook J.J.** (1992) The importance of arginine 102 for the substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**: 1057-1062.
- Niessen L., Gräfenhan T., Vogel R.F.** (2012) ATP citrate lyase 1 (acl1) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **158**: 171-185.
- Nunes N.A., Carrari F., Lytovchenko A., Smith A.M., Loureiro M.E.** (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.*, **137**: 611-622.
- Radwan D.E.M., Fayez K.A., Mahmoud S.Y., Hamad A., Lu G.Q.** (2007) Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. *Plant Physiol. Biochem.*, **45**: 480-489.
- Rajasekaran I.R., Kriedemann P.F., Aspinnall D., Paleg I.G.** (1997) Physiological significance of proline and glycinebetaine: Maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat. *Photosynthetica*, **34**: 357-366.
- Robinson S.P., Jones G.P.** (1986) Accumulation of glycine betaine in chloroplast provides osmotic adjustments during salt stress. *Aust. J Plant Physiol.*, **13**: 659-668.
- Sampol B., Bota J., Riera D., Medrano H., Flexas J.** (2003) Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytol.*, **160**: 403-412.
- Scheibe R.** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.*, **120**: 21-26.
- Schertl P., Braun H.P.** (2014) Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Front. Plant Sci.*, **5**: 163.
- Sedmak J., Grossberg S.** (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.*, **79**: 544-552.
- Shrawat A.K., Carroll R.T., DePauw M., Taylor G.J., Good A.G.** (2008) Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotechnol J.*, **6**: 722-732.
- Subbaiah C.C., Sachs M.M.** (2003) Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Ann Bot.*, **91**: 119-127.
- Synková H., Semorádová S., Schnablová R., Müller K., Pospíšilová J.** (2006) Effects of biotic stress caused by *Potato virus Y* on photosynthesis in ipt transgenic and control *Nicotiana tabacum* L. *Plant Science*, **171**:607-616.
- Tambussi E.A., Nogués S., Araus J.L.** (2005) Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. *Planta*, **221**: 446-458.
- Tanne E., Spiegel-Roy P., Shlamovitz N.** (1996) Rapid *in vitro* indexing of grapevine viral diseases: the effect of stress-inducing agents on the diagnosis of leafroll. *Plant Dis.*, **80**: 72-974.
- Torre F., Cañas R.A., Pascual B.M., Avila C., Cánovas F.M.** (2014) Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants. *J. Exp. Bot.*, **65**: 19.
- Ward J, Forcat S, Beckmann M, et al.** (2010) The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant Journal*, **63**: 443-457.

**Исследование Физиологических Показателей и Активности Ферментов,
Связанных с Метаболизмом Малата и Азота в Листьях Винограда
(*Vitis vinifera* L.), Зараженных Вирусом GLRaV 3**

Н.Ф. Султанова, Н.К. Байрамова, Д.Р. Алиева, У.А. Гурбанова, И.М. Гусейнова

Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАН Азербайджана

При проведении фитопатологических мониторингов в Сальянском, Исмаиллинском и Апшеронском районах были собраны растения винограда с характерными признаками болезни скручивания листьев винограда. В результате анализа растительного материала с помощью серологических и молекулярных методов диагностики был выявлен вирус скручивания листьев винограда 3 (GLRaV 3). Одновременно была исследована активность ферментов НАД-малатдегидрогеназы (NAD-MDH), аспаратаминотрансферазы (AsAT) и аланинаминотрансферазы (AlAT), а также некоторые физиологические параметры, такие как содержание растворимых белков, сухого вещества, относительное содержание воды (ОСВ) и глицин бетаина. Выявлено, что активность NAD-MDH значительно повышается, в то время как активность трансфераз AsAT и AlAT уменьшается в зараженных листьях по сравнению со здоровыми. Также обнаружено повышение содержания растворимых белков, сухого вещества и глицина бетаина и уменьшение ОСВ. Обнаруженные физиологические и биохимические изменения можно оценить, как ответные реакции растения на заражение вирусом.

Ключевые слова: Виноград, вирус скручивание листьев винограда 3, малатдегидрогеназа, аспарат-аминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, глицин бетаин

**Study Of Physiological Traits And Activities of Enzymes Linked to Malate And
Nitrogen Metabolism of *GLRaV 3* Infected Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Leaves**

N.F. Sultanova, N.K. Bayramova, D.R. Aliyeva, U.A. Qurbanova, I.M. Huseynova

Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Azerbaijan NAS

During phytopathological surveys plant samples with grapevine leaf roll virus disease symptoms were collected from Salyan, Ismayilli and Absheron regions. Detection of Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) was detected in the collected symptomatic leaves using serological and molecular methods. At the same time, activities of some enzymes linked to malate and nitrogen metabolism such as malate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase and changes in the content of glycine betaine, soluble proteins, relative water content and dry biomass were also investigated. It was found that activities of NAD-MDH were increased during pathogenesis compared to healthy plants and the activities of two transferases were reduced. It was also determined that virus infection caused an increase of glycine betaine, content of soluble proteins, relative water content and decrease of dry biomass amount.

Keywords: *Vitis vinifera*, Grapevine leafroll virus 3, malate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, glycine betaine