

FİTOPLAZMA İLƏ YOLUXMUŞ ÜZÜM YARPAQLARINDA HİDROGEN PEROKSİDİN VƏ BƏZİ ANTIOKSİDANT METABOLİTLƏRİN TƏDQIQI

Mədətli A.M^{1.}, Hüseynova S.Ə^{2.}, Məmmədova R. M^{1.}, Əliyeva D.R^{1.}

¹AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu

²Azərbaycan Dövlət Aqrar Universiteti

e-mail: aliyeva-1965@inbox.ru

Azərbaycanın Quba və Şabran rayonlarında aparılan monitorinqlər zamanı müxtəlif üzüm sortlarından xarakterik fitoplazma simptomlarına malik xəstə bitki və eyni zamanda neqativ kontrol kimi sağlam bitki nümunələri toplanılmışdır. Fitoplazmalar üçün universal olan R16F2/R16R1 praymer cütlikləri ilə başlayıb nested PZR-də R16F2n/R16R2 cütlikləri ilə davam etdirilən PZR nəticəsində müxtəlif üzüm sortlarında fitoplazma aşkar olunmuşdur. Sağlam və fitoplazma infeksiyası ilə yoluxmuş üzüm bitkisinin yarpaqlarında hidrogen peroksidin, həll olan zülalların, tokoferolların miqdarı, eyni zamanda bitkilərin stresə davamlılığının markeri hesab edilən peroksidaza fermentinin fəallığı tədqiq edilmişdir. Peroksidaza hüceyrədə H₂O₂-nin və üzvi peroksidlərin miqdarının tənzimlənməsinə nəzarət edir. Müəyyən edilmişdir ki, parogenez zamanı fitoplazma ilə yoluxmuş üzüm yarpaqlarında stresin indikatoru sayılan H₂O₂-nin miqdarı sağlam bitki nümunələri ilə müqayisədə ~3-5 dəfə artır. Fitoplazma patogenezini zamanı nümunələrdə peroksidazanın fəallığı yüksək olmuş, tokoferolların miqdarı kəskin artmış, həll olan zülalların miqdarı isə sağlam nümunələrlə müqayisədə azalmışdır. Bu hal fitoplazma infeksiyasının təsirindən sahib bitki hüceyrəsinin metabolizmində əmələ gələn dəyişikliklərlə izah oluna bilər. Beləliklə, peroksidazanın fəallığını təyin etməklə bitkinin ilkin inkişaf dövründə onun patogenə davamlılığını müəyyən etmək və beləliklə də davamsız sortları aradan götürməklə seleksiya işlərini sürətləndirmək olar.

Açar sözlər: fitoplazma, antioksidant fermentlər, hidrogen peroksid, tokoferol, həllolan zülallar

Giriş

Fitopatogenlər bitkilərin biomüxtəlifliyinə mənfi təsir göstərən biotik stress amillərindəndir. Fitoplazma xəstəliyi bitkilərdə bir sıra morfo-fizioloji dəyişikliklərə səbəb olur. Buna yarpaqların saralması, qızarması, göyümtül bənövşəyi rəng alması, xırdayarpaqlılıq, fillodiya, xlorotik burulma, soluxma və budaqların gövdənin ucunda toplanaraq witches' broom-“küpəgirən qarının süpürgəsi” formasını almasını misal göstərmək olar [9]. Grapevine Yellows (GY) – üzümün sarılığı xəstəliyi, üzüm bitkisiindəki fitoplazma xəstəliyinin ümumi adıdır. GY qrupuna müxtəlif fitoplazma növünün üzümdə törətdiyi oxşar əlamətlərə malik olan çoxsaylı xəstəliklər aiddir [7]. Avropanın əsas bağçılıq sahələrindəki ən geniş yayılmış xəstəlikləri “flavescence dorée” (FD) və “bois noir” (BN) fitoplazmaları törədir. FD ən çox üzüm yetişdirilən ölkələrdə geniş yayılmışdır və bir neçə izolyatı vardır [11].

Bitki orqanizmlərinin ətraf mühitin toksiki amillərinin zərərli təsirindən qorunması üçün ən zəruri yol qeyri-spesifik immun sistemini aktivləşdirməklə onun adaptasiya xüsusiyyətlərini yüksəltməkdən və əmələ gələn, yaxud da aktivləşən oksigenin fəal formalarının (OFF) zədələyici təsirini bilavasitə neytrallaşdırmaqdan ibarətdir. Metabolik proseslərin tənzimlənməsində fermentlərin və metabolitlərin xüsusi rolu vardır. Hal-hazırda bu mikroorqanizmlərin təsirindən bitkilərdə baş verən biokimyəvi və fizioloji dəyişikliklərlə bağlı araşdırmalara çox az rast gəlinir. Sərbəst radikalların iştirakı ilə gedən reaksiyaları tənzimləyən antioksidant müdafiə sistemlərinin öyrənilməsi canlı hüceyrələrin fizioloji-biokimyəvi problemlərinin həllində mühüm yollardan biri ola bilər. Belə maddələr – antioksidantlar üzvü maddələrin istər sintezi və çevrilməsi, istərsə də parçalanması və resintezi reaksiyalarını həyata keçirən, metabolik və molekulyar prosesləri tənzimləyən əsas mexanizmlərdən biridir. Tədqiqatlar göstərir ki, fitoplazma bitki toxumlarında bir

çox metabolik birləşmələrin miqdarını və antioksidant fermentlərin aktivliyini dəyişə bilər [6]. Xəstə bitki yarpaqlarında antioksidant fermentlərin aktivliyinin artması bitki orqanizminin fitoplazma infeksiyasına cavab reaksiyasıdır. Biotik stresin təsirindən hüceyrələrdə xlorofilin və auksinin miqdarının azalması fitoplazmanın fotosintezə mənfi təsiri ilə izah olunur. Təqdim olunan işin əsas məqsədi fitoplazma ilə yoluxmuş üzüm bitkisinin yarpaqlarında bəzi biokimyəvi dəyişikliklərin öyrənilməsi olmuşdur.

Material və metodlar

Azərbaycanın Quba və Şabran rayonlarında aparılan monitorinqlər zamanı müxtəlif üzüm (*Vitis vinifera* L.) sortlarından xarakterik fitoplazma simptomlarına malik xəstə bitki və eyni zamanda neqativ kontrol kimi sağlam bitki nümunələri toplanılmışdır. Fitoplazmalar üçün universal olan R16F2/R16R1 praymer cütü ilə başlayıb nested PZR-də R16F2n/R16R2 cütü ilə davam etdirilən PZR nəticəsində müxtəlif üzüm sortlarında fitoplazma aşkar olunmuşdur. Fitoplazma aşkar olunan nümunələrdə bəzi biokimyəvi analizlər aparılmışdır.

Hidrogen peroksidin miqdarının təyini: Hidrogen peroksidin miqdarı 390 nm dalğa uzunluğunda spektrofotometrik metodla təyin edilmişdir [14].

Həll olan zülalların miqdarının təyini: Həll olan zülalların miqdarı Bredford metoduna əsasən müəyyən olunmuşdur [4]. Kalibr əyrisini qurmaq üçün standart zülal kimi öküz zərdabından (BSA) istifadə edilmişdir.

Tokoferolların miqdarının təyini: Bitki materialında tokoferolların miqdarı dəmir atomlarının tokoferolların iştirakı ilə dəmir ionlarına reduksiya olunması ilə müəyyən edilmişdir [13]. Nümunələrdə tokoferolun miqdarı aşağıdakı düsturla təyin edilmişdir:

$$\text{Tokoferollar } (\mu\text{q/mq yaş çəki}) = ((\text{Nümunə A520-A460})/\text{Standart A520}) \times 0.29 \times 0.15$$

Qvayakol-peroksidazanın (QPO, EC 1.11.1.7) aktivliyinin təyini: QPO-nun aktivliyi spektrofotometrik üsulla 3 dəq müddətində 470 nm dalğa uzunluğunda təyin edilmişdir [10]. Ekstinsiya əmsalı $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Nəticələr və onların müzakirəsi

Bitkilərin hüceyrə səviyyəsində biotik stressə, o cümlədən də, patogenlə yoluxmaya ilkin cavab reaksiyalarından biri oksigenin fəal formalarının ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$) çoxalması hesabına oksidləşmə potensialının dəyişməsidir. Müəyyən edilmişdir ki, patogeneza zamanı fototənəffüsün intensivliyinin artması OFF-nin, o cümlədən hidrogen peroksidin (H_2O_2) yaranmasının əsas səbəblərindən biridir. H_2O_2 OFF arasında ən stabil birləşmədir və bitkinin stressə cavab reaksiyalarında siqnal rolunu oynayır. Fitoplazma ilə yoluxmuş üzüm bitkisinin yarpaqlarında hidrogen peroksidin miqdarı sağlam bitki ilə müqayisədə $\sim 3\div 5$ dəfə artıq olmuşdur (Cədvəl 1).

Cədvəl 1

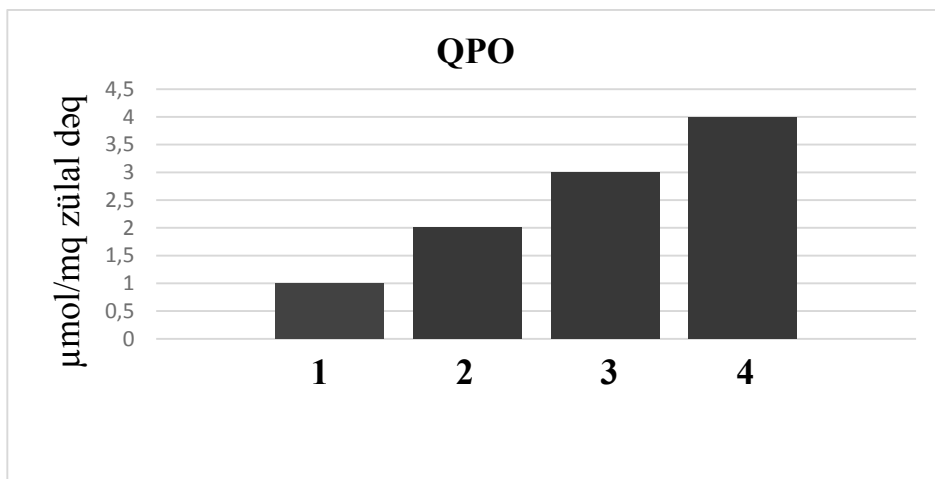
Sağlam və fitoplazma ilə yoluxmuş üzüm yarpaqlarında hidrogen peroksidin, həll olan zülalların və tokoferolların miqdarı.

| Bitki nümunələri | Həll olan zülallar (mq/q yaş çəki) | Tokoferollar ($\mu\text{q/q}$ yaş çəki) | Hidrogen peroksid (nq/ml) |
|------------------|------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|
| Nəzarət | 5.27 ± 0.26 | 31.57 ± 0.05 | 3.76 |
| Xəstə bitkilər | | | |
| № 1 | 4.32 ± 0.21 | 54.02 ± 0.09 | 11.25 |
| № 2 | 4.06 ± 0.20 | 44.90 ± 0.06 | 11.42 |
| № 3 | 3.46 ± 0.70 | 35.78 ± 0.08 | 16.48 |

Tokoferollar hüceyrələrin lipid fazasının fenollu antioksidantlarından hesab olunur. Tokoferolun sintezi plastidlərin membranında baş verir. Onun əsas funksiyası oksidləşdirici stresin təsirindən hüceyrənin lipid fazasında əmələ gələn oksigenin fəal formalarını zərərsizləşdirməkdən ibarətdir. Bir tokoferol molekulu 120 sinqlet oksigen molekulunu neytrallaşdırmaq qabiliyyətinə malikdir. Hüceyrədə tokoferolun sintezi müxtəlif stressorlar və fitohormonlar tərəfindən induksiya olunur. Bir sıra müəlliflərin işlərində onun biosintezinin fotosintez prosesində əmələ gələn OFF tərəfindən tənzimləndiyi qeyd olunur. Fotosintez edən orqanizmlərdə quraqlığın, ağır metalların, duzun, yüksək intensivlikli işıqın təsirindən tokoferolun miqdarı dəyişir. Bizim analizlər göstərdi ki, fitoplazma ilə yoluxmuş üzüm yarpaqlarında tokoferolların miqdarı sağlam bitkilərlə müqayisədə 1-ci nümunədə 1.7 dəfə, 2-ci nümunədə 1.4 dəfə, 3-cü nümunədə isə 1.1 dəfə artmışdır (Cədvəl). Beləliklə, tokoferollar OFF-nin zərərsizləşdirilməsində müdafiə funksiyasını yerinə yetirirlər. OFF ilə qarşılıqlı təsirdə olaraq α -tokoferol α -tokoferolxinə çevrilir ki, bu da öz növbəsində xloroplastda yenidən α -tokoferola reduksiya olunur.

Bizim təcrübələrdə xəstə bitkilərdə həll olan zülalların miqdarı sağlam bitki yarpaqları ilə müqayisədə aşağı olmuşdur. Bu hadisə fitoplazmanın təsirindən bitki hüceyrələrində baş verən biokimyəvi dəyişikliklərlə izah oluna bilər. Əldə olunan nəticələr ədəbiyyat məlumatları ilə uzlaşır. Bəzi ki, stolbur xəstəliyinə yoluxmuş tomat bitkisinə [5], bois noir [2] və ya flavescence doree [12] ilə yoluxmuş üzüm bitkisinə fitoplazmanın təsirindən ümumi həll olan zülalların miqdarının azalması müşahidə edilmişdir.

Bitki-patogen münasibətləri bitkinin funksional vəziyyətindən asılı olub ilk növbədə özünü fermentativ fəallıqda göstərir [1]. Bitkinin biotik stressdən müdafiəsini təmin edən əsas fermentlərdən biri peroksidazdır. Müxtəlif faktorların təsiri nəticəsində fermentin yeni molekulyar formaları sintez olunur. Buna görə də peroksidazlara orqanizmin stres vəziyyətinin markeri kimi baxmaq olar. Müəyyən olundu ki, sağlam bitkilərlə müqayisədə fitoplazmaya yoluxmuş bitkilərdə qvayakol peroksidazının fəallığı uyğun olaraq 96%, 68% və 128% artmışdır (Şəkil 1).



Şəkil 1. Sağlam (1) və fitoplazma ilə yoluxmuş (2, 3, 4) üzüm yarpaqlarında peroksidaza fermentinin fəallığı.

Analoji olaraq, Lin və Kao, Borden [3] və Higgins [8] antioksidant fermentlərin fəallığının artması ilə bitkinin patogenə davamlılığı arasında korrelyasiyanın olmasını müşahidə etmişlər.

Beləliklə, peroksidazının fəallığını təyin etməklə bitkinin ilkin inkişaf dövründə onun patogenə davamlılığını müəyyən etmək və beləliklə də davamsız sortları aradan götürməklə seleksiya işlərini sürətləndirmək olar.

Minnətdarlıq

Bu iş Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı Fondunun maliyyə yardımı ilə yerinə yetirilmişdir (Qrant EIF-2014-9(24)-KETPL-14/11/3).

Ədəbiyyat

1. **Anjana G.**, Kini K.R., Shetty H.S., Prakash H.S. Changes in peroxidase activity in sunflower during infection by necrotrophic pathogen *Alternaria helianthini*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 41(8): 2008, p 586– 596.
2. **Bertamini M.**, Nedunchezian N., Tomasu F, Grando S Phytoplasma [Stolbur subgroup (Bois-Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. Physiol. Mol Plant Pathol., 61: 2002, p 357-366
3. **Borden S**, Higgins VJ. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defense response of tomato to *Cladosporicem fulvum* . Physiological and Molecular Plant Pathology. 61:2002, p 227–236.
4. **Bradford M A** rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Anal Biochem 72, 1976, p 248- 254
5. **Favali M.A.**, di Toppi L.S., Vestena C, Fossati F, Musetti R Phytoplasmas associated with tomato stolbur disease. Acta Hortic 551:2001, p 93-99
6. **Hameed A**, Akhtar KP, Saleem MY, Asghar M.. Correlative evidence for prooxidase involvement in disease resistance against Alternaria leaf blight of tomato. Acta Physiologiae Plantarum. 32:2010, p 1171–1176
7. **Hren M**, Nikolić P, Rotter A, Blejec A, Terrier N, Ravnikar M, et al. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. BMC Genomics. 2009; 10: p 460.
8. **Lin C.C.**, Kao C.H. Cell wall peroxidase activity, hydrohen peroxide level and NaCl-inhibited root growth in rice seedlings. Plant Soil, 230:2001, p 135-143
9. **Lin CC**, Kao CH Effect of NaCl stress on H2O2 metabolism in rice leaves. Plant Growth Regul 30: 2000, p 151-155
10. **Liu LYD**, Tseng HI, Lin CP, Lin YY, Huang YH, Huang CK, et al. High-Throughput transcriptome analysis of the leafy flower transition of Catharanthus roseus induced by Peanut Witches'-Broom phytoplasma infection. Plant Cell Physiol. 55: 2014, p 942–957
11. **Mahalingam, R., Shah, N., Scrymgeour, A., and Fedoroff, N.** Temporal evolution of the *Arabidopsis* oxidative stress response. Plant Mol. Biol., 57: 2005, p709-730
12. **Morone C**, Boveri M, Giosue S, Gotta P, Rossi V, Scapin I, Marzachi C. Epidemiology of Flavescence dorée in vineyards in northwestern Italy. Phytopathology. 97:2007, p 1422–1427.
13. **Musetti R.**, Marabottini R., Badiani M., Martini M., di Toppi L.S., Borselli S., Borgo M., Osler R On the role of H2O2 in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* L.Prosecco) from Flavescence doree disease. Funct Plant Biol., 34; 2007, p 750-758
14. **Rosenberg HR.** Chemistry and physiology of the vitamins. New York: Interscience Publishers; 1992. p. 452–453.
15. **Velikova V**, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151:2000, p 59–66.

Мадатлы А.М., Гусейнова С.А., Мамедова Р.М., Алиева Д.Р.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И НЕКОТОРЫХ
МЕТАБОЛИТОВ-АНТИОКСИДАНТОВ НА ЗАРАЖЕННЫЕ ФИТОПЛАЗМОЙ
ЛИСТЬЯ ВИНОГРАДА**

Во время мониторинга в Кубинском и Шабранском районах Азербайджана были собраны образцы различных сортов винограда с характерными симптомами больных растений и в качестве негативного контроля здоровых растений. В результате PZR анализа, проведенного универсальной для фитоплазм парой праймеров R16F2/R16R1, и продолженного парой nested PZR-дә R16F2n/R16R2, в различных сортах винограда была обнаружена фитоплазма. Было проведено измерение количества пероксида водорода, растворимых белков, токоферолов, а также исследована активность фермента пероксидазы, признанной маркером стрессоустойчивости растений, в листьях здоровых и зараженных фитоплазмой растений винограда. Пероксидаза контролирует регуляцию содержания в клетке H_2O_2 и органических пероксидов. Было обнаружено, что вовремя перогенеза в листьях винограда, зараженного фитоплазмой, содержание H_2O_2 , признанного индикатором стресса, возрастало в ~3-5 раз по сравнению с содержанием в образцах здоровых растений. В образцах с патогенезом фитоплазмы возрастала активность пероксидазы, резко возрастало количество токоферолов, а содержание растворимого белка по сравнению со здоровыми образцами снижалось. Это состояние может объясняться изменениями, происходящими в метаболизме клетки растения-хозяина под воздействием инфекции фитоплазмы. Таким образом, с помощью определения активности пероксидазы на ранних этапах развития можно определить устойчивость растения к патогену и, исключая неустойчивые сорта, ускорить таким образом селективные работы.

Ключевые слова: фитоплазма, ферменты-антиоксиданты, пероксид водорода, токоферол, растворимые белки

Madatli A.M., Huseynova S.A., Mammadova R.M., Aliyeva D.R.

**THE STUDY OF HYDROGEN PEROXIDE AND SOME ANTIOXIDANT
ENZYMES IN LEAVES OF GRAPE PLANTS INFECTED WITH PHYTOPLASMA**

During the monitoring conducted in the Guba and Shabran regions of Azerbaijan, samples of grape plants with characteristic phytoplasma symptoms and healthy plants as a negative control were collected. Phytoplasma was detected in the grape varieties as a result of the PCR performed with R16F2/R16R1 primer pairs universal for phytoplasmas and continued with nested R16F2n/R16R2 pairs. Amounts of hydrogen peroxide, soluble proteins, tocopherol and the activity of peroxidase, which is considered as a marker of plant stress tolerance were studied in phytoplasma-infected grape leaves. Peroxidase controls the regulation of the amounts of H_2O_2 and organic peroxides in the cell. It was found that during pathogenesis amounts of H_2O_2 , which is considered as a stress indicator increased ~3-5 times in phytoplasma-infected grape leaves compared with the control. Moreover, the peroxidase activity and amounts of tocopherols increased sharply, whereas, amounts of soluble proteins decreased compared with the healthy samples. This can be attributed to the changes in the metabolism of host plant cells caused by phytoplasma infection. Thus, the selection process can be accelerated by determining the peroxidase activity, establishing plant tolerance to pathogens and consequent elimination of sensitive varieties.

Keywords: phytoplasma, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, tocopherol, soluble proteins

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 4.XII.2018