

Fitoplazma İnfeksiyası Zamanı Üzüm (*Vitis vinifera*) Yarpaqlarında NAD-Malatdehidrogenaza, Aspartataminotransferaza Və Alaninaminotransferaza Fermentlərinin Tədqiqi

İ.M. Hüseynova^{1,2*}, G.Ş. Balakışiyeva¹, U.Ə. Qurbanova¹, N.C. Kosayeva^{1,2},
C.Y. Bayramova¹, İ.A. Məhərrəmov^{1,3}, C.Ə. Əliyev¹

¹AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiya İnstitutu, Mətbuat prospekti, 2A, Bakı AZ 1073, Azərbaycan; *E-mail: i_guseinova@mail.ru

²Bakı Dövlət Universiteti, akademik Z.Xəlilov küç., 23, Bakı AZ 1148, Azərbaycan

³Azərbaycan Dövlət Aqrar Universiteti, Heydər Əliyev prospekti, 159, Gəncə AZ 2000, Azərbaycan

Elmi-Tədqiqat Üzümçülük və Şərabçılıq İnstitutunun təcrübə sahəsində aparılmış fitopatoloji monitorinqlər zamanı müxtəlif üzüm sortlarından xarakterik fitoplazma simptomlarına malik yarpaq nümunələri toplanılmışdır. Universal R16F2/R16R1 və R16F2n/R16R2 praymer cütükləri ilə aparılan 16S r-DNT Nested PZR metodu ilə xəstə bitkilərdə fitoplazmalar deteksiya olunmuş və növ səviyyəsində taksonomik səciyyələndirilmişdir (Hüseynova et al., 2015). “*Candidatus Phytoplasma solani*” ilə yoluxmuş üzüm nümunələrində NAD-malatdehidrogenaza (NAD-MDH), aspartataminotransferaza (AsAT) və alaninaminotransferaza (AlAT) fermentləri tədqiq edilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, sağlam bitkilərlə müqayisədə fitoplazma ilə yoluxmuş bitkilərin yarpaqlarında hər üç metabolik fermentin fəallıqları artır. Fermentlərin fəallıqlarının fitoplazmanın təsirindən artmasını bitkinin infeksiyaya qarşı cavab reaksiyası kimi qiymətləndirmək olar.

Açar sözlər: *Vitis vinifera*, “*Candidatus Phytoplasma solani*”, NAD-malatdehidrogenaza, aspartataminotransferaza, alaninaminotransferaza

GİRİŞ

Üzüm (*Vitis vinifera*) bitkisinin fitoplazma xəstəlikləri ümumi şəkildə Grapevine Yellows – Üzümün sarılığı adlanır. Grapevine Yellows qrupuna ən azı doqquz müxtəlif fitoplazma növünün üzümde törətdiyi xəstəliklər aiddir. Avropada üzümün “Flavescence dorée” (FD) və Palatinate grapevine yellows (PGY, indiyədək yalnız Almaniyada aşkar edilmişdir) xəstəlikləri 16Sr V ribosomal təsnifat qrupuna daxil olan fitoplazma növləri ilə törədildiyi halda, “Bois noir” (BN) xəstəliyinin törədicisi isə 16Sr XII-A ribosomal subqrupuna daxil olan “*Ca. P. solani*” fitoplazmasıdır (Quaglino et al., 2013). Avstraliyada üzümün Australian grapevine yellows adlı xəstəliyini 16SrXII-B ribosomal subqrupuna daxil olan ‘*Ca. P. australiense*’ və 16Sr II ribosomal təsnifat qrupuna daxil olan ‘*Ca. P. aurantifolia*’ fitoplazma növləri, Virciniya ştatında Grapevine yellows xəstəliklərini 16Sr I-A subqrupuna daxil olan ‘*Ca. P. asteris*’ növünün müəyyən izolyatları və X-disease qrupu (16Sr III ribosomal təsnifat qrupu) fitoplazmaları, Çilidə ‘*Ca. P. fraxini*’, “*Ca. P. solani* və eləcə də 16SrIB və 16SrIC ribosomal subqruplarına daxil olan fitoplazmalar, İtalyada və Cənubi Afrikada ‘*Ca. P. asteris*’ (16SrIB) fitoplazma növünün izolyatları törədirlər (Belli et al., 2010). Grapevine yellows xəstəliklərindən ən təhlükəliləri “Flavescence do-

rée” (FD) və “Bois Noir” (BN) xəstəlikləridir. “Flavescence dorée” *Scaphoideus titanus*, “Bois Noir” isə *Hyalesthes obsoletus* həşərat vektoru ilə yayılır. Ağ üzüm sortlarında fitoplazma xəstəlikləri nəticəsində yarpaqlar xlorotik saralır, qızılı rəng alaraq burulur. Qırmızı üzüm sortlarında isə yarpaqlar purpur qırmızı rəng alır, bu qızartı əvvəlcə mərkəzi damarın kənarlarından başlayır və getdikcə yarpağın digər hissələrini də bürüyür. Üzüm salxımları büzüşür və yararsız hala düşür (Foissac, Maixner, 2013). Bu fenotipik dəyişikliklər fitoplazma infeksiyasının təsirindən bitkinin metabolizmində baş vermiş dəyişikliklərlə izah olunur.

Fitoplazmalar geniş tədqiq olunsada, onların təsirindən bitkilərdə müxtəlif səviyyələrdə baş verən dəyişikliklər zəif öyrənilmişdir. Son illərdə fitoplazma infeksiyalarının ot bitkilərinin ikincili metabolitlərinə, antioksdant müdafiə sisteminə təsiri, baş verən proteom və fosfoproteom dəyişikliklər müəyyən qədər tədqiq olunmuşdur (Choi et al., 2004; Musetti et al., 1999, 2004, 2005; Ahmad et al., 2013). Buna baxmayaraq, dünya ədəbiyyatında fitoplazma infeksiyalarının meyvə ağaclarında, xüsusilə də üzüm bitkisiində biokimyəvi və fizioloji səviyyədə təsiri haqda məlumatlar məhdud saydadır (Lepka et al., 1999; Musetti et al., 2007; Abdollahi et al., 2012; Margaria et al., 2013).

NAD-malatdehidrogenaza (I-malat-NAD-oksidoreduktaza, NAD-MDH, EC 1.1.1.37) bir çox

metabolik proseslərdə, məsələn, üçkarbonlu turşular və qlüksilat dövrənlərində, amin turşularının sintezində, qlükoneogenezdə və metabolitlərin sitozolla subhüceyrə orqanoidləri arasında mübadiləsində iştirak edir (Nicholls et al., 1992). NAD-MDH-in iştirakı ilə bitki metabolizmində yaranan malat müxtəlif proseslərə qoşulmaqla bitkilərdə həyati əhəmiyyət kəsb edən adaptiv reaksiyaların yaranmasında mühüm rol oynayır.

Aspartataminotransferaza (AsAT, EC 2.6.1.1) ilkin azot assimilyasiyasında, reduksiyaedici ekvivalentlərin nəqlində və hüceyrə subkompartmentləri arasında karbon və azot ehtiyatının qarşılıqlı mübadiləsində əsas rol oynayır (Gantt et al., 1992; Martins et al., 2002; de laTorre et al., 2014; Gaufichon et al., 2015). Bitkilərdə AsAT fermentinin subhüceyrə orqanoidlərində, sitozolda, xloroplastlarda, mitoxondrilərdə və peroksisomlarda bir neçə izoforması lokalizə olunur (Duff et al., 2012).

Alaninaminotransferaza (AlAT, EC 2.6.1.2) metabolik proseslərdə həlledici rol malik fermentlərdən biridir. AlAT fermenti alanin və 2-oksiqlutaratın piruvat və qlütamata çevrilməsi reaksiyasını kataliz edir. Bu pirodaksal-fosfat asılı ferment bitki metabolizmində əsasən karbonun ilkin mübadiləsində və amin turşuların sintezində mühüm rol oynayır (Kendziorek et al., 2012).. Bəzi bitkilərin peroksisomlarında və mitoxondrilərində bu ferment homoloji olaraq fototənəffüs və metabolizmin tənzimləməsində iştirak edir (Shrawat et al., 2008; Good et al., 2007; Niessen et al., 2012). Müxtəlif abiotik streslərə, virus və patogenlərə cavab reaksiyalarının formalaşmasında da AlAT mühüm rol oynayır (Sousa and Sodek, 2003; 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.

Bu baxımdan, təqdim edilən işin əsas məqsədi bitki-fitoplazma patosisteminin biokimyəvi aspektləri ilə bağlı məlumatı əldə etmək üçün fitoplazma infeksiyasının təsirinə məruz qalmış üzüm bitkisinin yarpaqlarında NAD-malatdehidrogenaza, aspartataminotransferaza və alaninaminotransferaza fermentlərinin tədqiqi olmuşdur.

MATERIAL VƏ METODLAR

Fitoplazma infeksiyasının deteksiyası və identifikasiyası. Toplanmış təzə üzüm bitkisinin yarpaqlarının mərkəzi damarlarından (1q) klassik CTAB metodu ilə total DNT ayrılmışdır (Maixner et al., 1995). Ekstraksiya edilmiş DNT nümunələrinin təmizlik dərəcəsi və qatılığı spektrofotometrik metodla yoxlanılmışdır. PZR üçün yararlı olan DNT nümunələri fitoplazmalar üçün universal

R16mF2 / R16mR1 və R16F2n / R16R2 praymer cütükləri ilə 16S rDNT Nested PZR metodu ilə amplifikasiya edilmişdir (Gundersen and Lee, 1996). Nested PZR-in nəticələri 1%-li aqaroza gəlində elektroforetik analiz edilmişdir. Amplifikasiya məhsulları AluI, RsaI və TaqI fermentləri ilə RFLP analiz edilmişdir (Hüseynova et al., 2015).

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 MgCl₂·6H₂O, 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 proses 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 10000g sürəti ilə sentrifugalasdırılmışdır. Çöküntü atıldıqdan sonra çöküntüyü maye fermentlərin fəallıqlarının tədqiq olunması məqsədi ilə istifadə olunmuşdur.

NAD-malatdehidrogenaza (NAD-MDH) fermentinin fəallığının təyini. Reaksiya mühiti 10 mM oksalasetat (OAA), 10 mg/ml öküzün zərdab albumini (BSA), 10 mM MgCl₂ (2 M), 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 and Stitt, 1988).

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

Alaninaminotransferaza (AlAT) fermentinin fəallığının təyini. Reaksiya mühitinin tərkibi 1,0 ml 10 mM 2-oksiqlutarat, 0,28 mM NADH, 1,2U LDH, 70 mM alanin və 100 mM Tris-Hcl (pH 8,0) və 50 mkl ferment ekstraktı əlavə olunur (Horder, Rej, 1983).

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

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

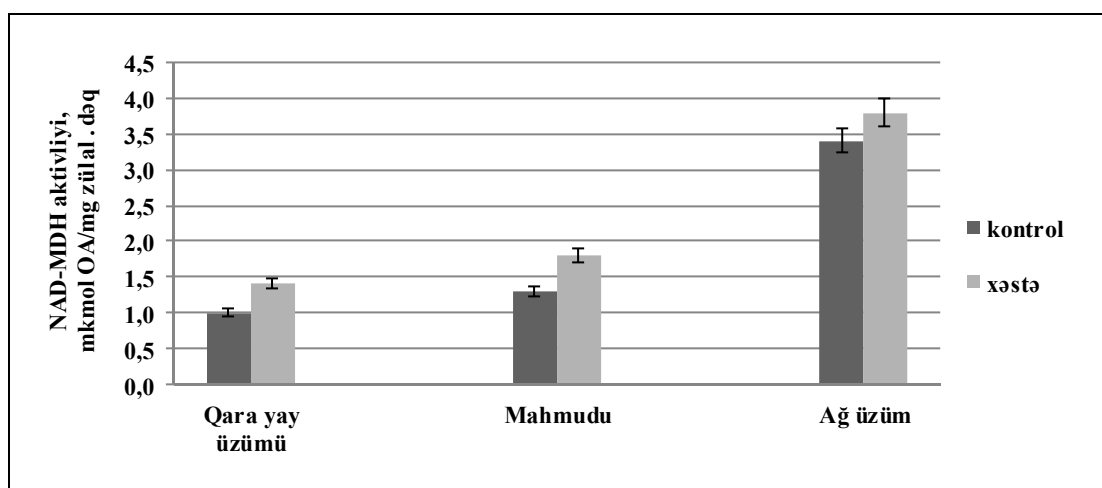
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Elmi-Tədqiqat Üzümçülük və Şərabçılıq İnstitutunun təcrübə sahəsində aparılan fitopatoloji monitorinqlər zamanı ağ üzüm sortlarında yarpaqların saralması, qızılı rəng alaraq burulması, qırmızı üzüm sortlarında isə yarpaqların pürpur qırmızı rəng alması, burulması kimi fitoplazmaların üzüm bitkisinde yaratdığı xəstəlik əlamətləri müşahidə olunmuş və simptomatik bitkilərdən yarpaq nümunələri toplanmışdır. Xəstə bitki nümunələri ilə paralel olaraq, hər bir sort üçün müqayisə məqsədilə kontrol kimi sağlam bitkilərdən də yarpaq nümunələri toplanmışdır. Toplanmış bitki nümunələrindən CTAB metodu ilə ekstaksiya edilmiş total DNT nümunələri fitoplazmalar üçün universal olan R16F2/R16R1 praymer cütü ilə başlayıb nested PZR-də R16F2n/R16R2 cütükləri ilə davam etdirilən PZR metodu ilə analiz edilmişdir. Nəticədə simptomatik bitkilərdəki xəstəliyin fitoplazma təbiətli olduğu təsdiq edilmişdir (Hüseynova et al., 2015). Fitoplazmaların növ səviyyəsində taksonomik səciyyələndirilməsi nəticəsində üzüm sortlarının "*Candidatus Phytoplasma solani*" ilə yoluxduğunu müəyyən edilmişdir.

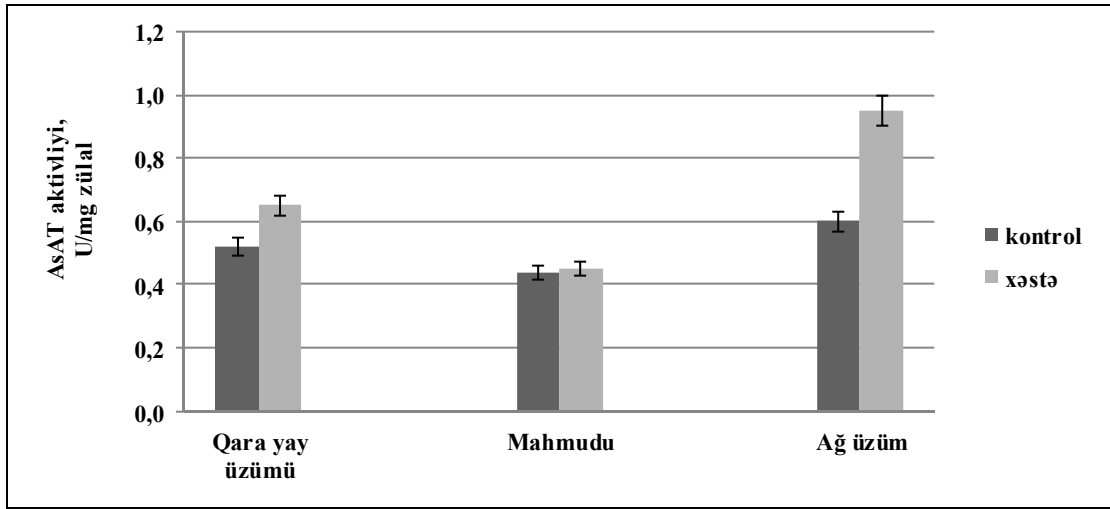
"*Candidatus Phytoplasma solani*" infeksiyasının təsirindən üzüm bitkisinde baş verən biokimyəvi dəyişikliklərin tədqiqi mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Bu məqsədlə bitkilərdə metabolizm proseslərində mühüm rol oynayan bəzi fermentlərin (NAD-MDH, AsAT və A1AT) fəallıqları sağlam və fitoplazma ilə yoluxmuş üzüm sortlarının yarpaqlarında müqayisəli şəkildə öyrənilmişdir. Bitkilərdə geniş yayılmış NAD-malatdehidrogenaza (NAD-MDH) fermenti bitki orqanellalarının əksəriyyətin-

də başlıca rola malik olmaqla, aralıq metabolitlərdən olan malatın oksaloasetata və əksinə çevrilmə reaksiyasını həyata keçirir. Bu ferment mitoxondriyədə Krebs tsiklinin komponenti, sitozol və peroksisomlarda malat-aspartat şatlları və qlioksisomlarda β -oksidləşmədə reduksiyaedici ekvivalentlərin mübadiləsində iştirak edir (Nunes-Nesi, 2005; Schertl and Braun, 2014; Scheibe, 2004). Buna görə də fitoplazma infeksiyasının bitkinin metabolizminə təsirinin 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 (Şəkil 1). Şəkildən görüldüyü kimi, sağlam üzüm sortları ilə müqayisədə fitoplazma infeksiyasının təsirindən tədqiq edilən sortların hamısında NAD-MDH fəallığı artmışdır. Ağ üzüm sortunda artım digərlərdən daha yüksək olmuşdur. Bu onu göstərir ki, tədqiq edilən sortlar arasında Ağ üzüm sortunda ümumi metabolik proseslərin sürəti daha yüksəkdir.

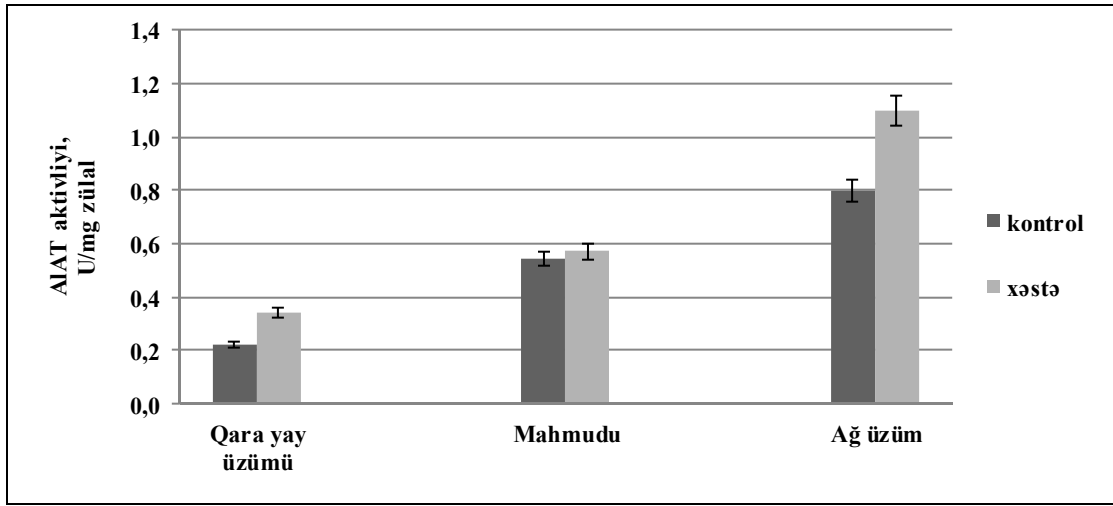
Aspartataminotransferaza (AsAT) fermenti azotun ilkin assimilyasiyasında, reduksiyaedici ekvivalentlərin nəqlində, eləcə də hüceyrə subkompartimentləri arasında karbon və azot ehtiyatının qarşılıqlı mübadiləsində əsas rol oynadığı üçün, fitoplazma infeksiyasının təsirindən üzüm bitkisinde AsAT fermentinin fəallığının tədqiqi vacibdir. NAD-MDH fermenti kimi, AsAT fermentinin fəallığı da xəstə bitkilərdə sağlam yarpaq nümunələri ilə müqayisədə daha yüksək olmuşdur. Bu zaman yenə də fermentin ən yüksək fəallığı Ağ üzüm sortunda müşahidə edilmişdir.



Şəkil 1. "*Candidatus Phytoplasma solani*" ilə yoluxmuş müxtəlif üzüm sortlarında NAD-MDH fermentinin fəallığı



Şəkil 2. *Candidatus Phytoplasma solani* ilə yoluxmuş üzüm sortlarında ASAT fermentinin fəallığı.



Şəkil 3. *Candidatus Phytoplasma solani* ilə yoluxmuş üzüm sortlarında AIAT fermentinin fəallığı.

Şəkil 1 və 2-dən görüldüyü kimi, Ağ üzüm sortunda ümumi metabolik proseslərin sürəti daha yüksəkdir. AsAT qlütamat və oksalasetat arasında transaminləşmə reaksiyalarını, aspartat və 2-oksiqlutarat əmələ gəlməsinə qədər kataliz edir, eləcə də bütün canlı orqanizmlərdə, azotun qlütamattan aspartata daşınmasında həlledici rola malikdir (Buchanan et al., 2015; Gauficho, 2015). Fitoplazma infeksiyasının təsirindən bu fermentin fəallığının artmasını bitkinin biotik stresə qarşı özünü müdafiə mexanizminin işə düşməsi ilə izah etmək olar.

Fitoplazma infeksiyasının üzüm bitkisinə yaratdığı metabolik dəyişikliklərin göstəricisi kimi, Alaninaminotransferaza (AIAT) fermentinin fəallığı da xəstə və sağlam yarpaqlarda müqayisəli şəkildə təyin edilmişdir (Şəkil 3).

Fitoplazma infeksiyasının təsirindən bütün xəstə üzüm sortlarında AIAT fermentinin aktivliyinin artması müşahidə edilmişdir. Qarğıdalı ilə

aparılan tədqiqatlarda xarici mühitin abiotik amillərinin və eləcə də patogenlərin təsirindən AIAT fermentinin fəallığının dəyişməsi göstərilmişdir (Subbaiah and Sachs, 2003). AIAT 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 stresə cavab reaksiyasıdır (Mello, 2015). Fitoplazma infeksiyaları sahib bitkilərdə amin turşularının nəqlinə mənfi təsir göstərir. Lepka və əməkdaşlarının apardıqları təcrübələr “*Ca. P. mali*” fitoplazma növü ilə yoluxmuş tütün və “Ash yellows” fitoplazma infeksiyalı *C. roseus* bitkilərinin yarpaqlarında amin turşularının miqdarının yüksəldiyini göstərmişdir (Lepka et al., 1999). Fitoplazma infeksiyasının təsirindən bitki yarpaqlarının floema borularında amin turşularının nəqlində məhdudiyətlər yaranır ki, bu da onların toplanmasına gətirib çıxarır. Amin turşularının nəqlinin inhibirlənməsi bitkinin böyüməsinə mənfi təsir

göstərir və cırdanboyluluğun yaranmasına səbəb olur. Belə ki, amin turşuları böyümə üçün zəruri element olan qeyri-üzvi azotun sürətli mənimsəniləsi üçün böyük əhəmiyyət kəsb edir. İnkişaf etməkdə olan yarpaqlar, meristema toxuması və reproduktiv orqanlar da daxil olmaqla, əksər toxumalar amin turşuların nəqli ilə əlaqəlidir. Böyümə və inkişaf proseslərindən başqa, amin turşularının qocalma proseslərində də iştirak etdiyi ehtimal olunur. Beləliklə, fitoplazma infeksiyaları zamanı müşahidə olunan meyvələrin büzüşməsi, erkən ölmə əlamətlərini də amin turşularının artıq miqdarının toplanması ilə izah etmək olar. Biokimyəvi dəyişikliklərə uyğun olaraq, Carginale və əməkdaşlarının apardıqları təcrübələrdə mRNT-nin diferensial display analizi “*Ca P. Prunorum*” fitoplazma növü ilə yoluxmuş ərik yarpaqlarının toxumalarında amin turşu nəqlinə cavabdeh olan genlərin ekspresiyasının zəiflədiyini göstərmişdir (Carginale et al., 2004)

Beləliklə, aparılan tədqiqat işi göstərmişdir ki, sağlam üzüm yarpaqları ilə müqayisədə xəstə üzüm yarpaqlarında fitoplazma infeksiyasının təsirindən NAD-MDH, AsAT, AlAT fermentlərinin fəallığı artmışdır. Müxtəlif abiotik və biotik stresə cavab reaksiyasını təmin edən bu metabolik fermentlərin fəallığının fitoplazma xəstəliklərinin təsirindən dəyişməsinə bitkinin infeksiyaya qarşı cavab reaksiyası kimi qiymətləndirmək olar.

MİNNƏTDARLIQ

EIF-2013-9(15)-46/28/3-M-14 sayılı grant vasitəsilə göstərdiyi maliyyə dəstəyinə görə Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı Fonduna minnətdarlığımızı bildiririk.

ƏDƏBİYYAT

Ahmad J. N., Garcion C., Teyssier E., Hernould M., Gallusci P., Pracros P., Renaudin J., Eveillard S. (2013) Effects of stolbur phytoplasma infection on DNA methylation processes in tomato plants. *Plant Pathology*, **62(1)**: 205-216.

Abdollahi F., Niknam V., Ghanati F., Masroor F., Noorbakhsh S.N. (2012) Biological effect of weak electromagnetic field on healthy and infected lime (*Citrus aurantifolia*) trees with phytoplasma. *The Sci. World J.* doi: 10.1100/2012/716929.

Alfonso S.U., Brüggemann W. (2012) Photosynthetic responses of a C3 and three C4 species of the genus *Panicum* (s.l.) with different meta-

bolic subtypes to drought stress. *Photosynthesis Research*, **112**: 175-191.

Belli G., Bianco P., Conti M. (2010) Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology*, **92**: 303-326.

Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2015) Biochemistry and molecular biology of plants. 2nd ed. Wiley: Blackwell (USA), 1280 p.

Carginale V., Capasso M.G., Ionata E., la Cara F., Pastore M., Bartaccini A., Capasso A. (2004) Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene*, **332**: 29-34.

Choi Y.H., Tapias E.C., Kim H.K., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Verhoeven J.T.J., Brzin J., Zel J., Verpoorte R. (2004) Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using HNMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology*, **135**: 2398-2410.

de la 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.

Duff S.M.G., Rydel T.J., McClerren A.L., Zhang W., Li J.Y., Sturman E.J., Halls C., Chen S., Zeng J., Peng J., Kretzler C.N., Evdokimov A. (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.

Foissac X., Maixner M. (2013) Spread of grapevine phytoplasma diseases in Europe. *Phytopathogenic Mollicutes*, **3(1)**: 47-50.

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 Physiology*, **98**: 868-878.

Gaufichon L., Steven J.R., Akira S. (2015) Asparagine metabolic pathways in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, doi: 10.1093/pcp/pcv184.

Good A.G., Johnson S.J., De Pauw M., Carroll R.T., Savidov N., Vidmar J., Lu Z., Taylor G., Strocher V. (2007) Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany*, **85**: 252-62.

Gundersen D.E., Lee I.-M. (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, **35**: 114-151.

Hörder M., Rej R. (1983) Alanine aminotransferase. In: Methods of enzymatic analysis (H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Gräbl, eds.). 3rd Ed. Germany: Chemie, Weinheim, Verlag, **3**: 444-456.

- Huseynova I.M., Balakishiyeva G.Sh., Mammadov A.Ch., Salar P., Foissac X.** (2015) 'Bois Noir' phytoplasma disease in grapevine in Azerbaijan. Proceedings of 18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine. Ankara. 7-11 September 2015, p. 124-125.
- 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.
- Lepka P., Stitt M., Moll E., Seemuller E.** (1999) Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 59-68.
- Maixner, M., Ahrens, U. & Seemuller, E.** (1995). Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 241-250.
- Margarita P., Abbà S. & Palmano S.** (2013) Novel aspects of grapevine response to phytoplasma infection investigated by a proteomic and phospho-proteomic approach with data integration into functional networks. *BMC Genomics*, **14**:38
- 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.
- Mello J.P.F.D.** (2015) Amino acids in higher plants. CABI Publishing, 632 p.
- 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.
- Musetti R., Favali M.A., Pressacco L.** (2000) Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios.*, **102**: 133-147.
- Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanita di Toppi L., Borselli S., Borgo M., Osler R.** (2007) On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera*, cv. Prosecco) from Flavescence doree disease. *Functional Plant Biology*, **34**: 750-758.
- Musetti R., Sanita di Toppi L., Ermacora P., Favali M.A.** (2004) Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, **94**: 203-208.
- Musetti R., Sanita di Toppi L., Martini M., Ferrini F., Loschi A., Favali M.A., Osler R.** (2005) Hydrogen peroxide localisation and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European stone fruit yellows. *European Journal of Plant Pathology*, **112**: 53-61.
- Musetti R., Scaramagli S., Vighi C., Pressacco L., Torrigiani P., Favali M.A.** (1999) The involvement of polyamines in phytoplasma-infected periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) plants. *Plant Biosystems*, **133**: 37-45.
- Nicholls D.J., Miller J., Scawen M.D., Clarke A.R., Holbrook J.J., Atkinson T., Goward C.R.** (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., Ratcliffe R.G., Sweetlove L.J., Fernie A.R.** (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.*, **137**: 611-622.
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P., Wei W., Davis R.-E.** (2013) Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63** (8): 2879-2894.
- Scheibe R.** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.*, **120**: 21-26.
- Scheibe R., Stitt M.** (1988) Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, Q_A reduction and O₂ evolution in spinach leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, **26**: 473-481.
- 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.

Sousa C.A.F., Sodek L. (2003) Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system & subsequent return to normoxia. *Environ.*

Exp. Bot., **50**: 1–8.

Subbaiah C.C., Sachs M.M. (2003) Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Ann Bot.*, **91**: 119-127.

Исследование Ферментов НАД-Малатдегидрогеназы, Аспартатаминотрансферазы и Аланинаминотрансферазы В Листьях Винограда При Фитоплазменной Инфекции

И.М. Гусейнова^{1,2*}, Г.Ш. Балакишиева¹, У.А. Гурбанова¹, Н.Д. Косаева^{1,2},
С.Ю. Байрамова¹, И.А. Магаррамов^{1,3}, Д.А. Алиев¹

¹Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАНА

²Бакинский государственный университет

³Азербайджанский государственный аграрный университет

Во время фитопатологических мониторингов на экспериментальной базе Научно-исследовательского института виноградарства и виноделия были собраны образцы листьев разных сортов винограда с характерными симптомами фитоплазмы. Методом 16S рДНК Нестед ПЦР с использованием универсальных пар праймеров R16F2/R16R1 и R16F2n/R16R2 проведена детекция фитоплазм у больных растений и определена таксономическая характеристика на уровне вида (Huseynova et al., 2015). У образцов винограда, инфицированных “*Candidatus Phytoplasma solani*”, исследована активность ферментов НАД-малатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы. Определено, что по сравнению со здоровыми растениями, в листьях инфицированных растений наблюдается повышение активности исследованных ферментов. Повышение активности ферментов под влиянием фитоплазмы, можно рассматривать как ответную реакцию растений против инфекции.

Ключевые слова: *Vitis vinifera*, “*Candidatus Phytoplasma solani*”, НАД-малатдегидрогеназа, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза

Study of NAD-Malate dehydrogenase, Aspartate aminotransferase And Alanine aminotransferase Enzymes During Phytoplasma Infection In Grapevine (*Vitis vinifera*) Leaves

I.M. Huseynova^{1,2}, G.Sh. Balakishiyeva¹, U.A. Qurbanova¹, N.J. Kosayeva^{1,2},
J.Y. Bayramova¹, I.A. Maharramov^{1,3}, J.A. Aliyev¹

¹ Institute of Molecular Biology and Biotechnology, ANAS

² Baku State University

³ Azerbaijan State Agrarian University

During phytopathological surveys conducted in the experimental fields of Research Institute of Viticulture and Winemaking leaf samples from different grapevine varieties with the phytoplasma symptoms have been collected. Phytoplasmas in diseased plants were detected by 16S-rDNA nested PCR method with the universal primers for phytoplasmas R16mF2 / R16mR1 and R16F2n/R16R2 and taxonomically characterized (Huseynova al., 2015). NAD-malate dehydrogenase (NAD-MDH) aspartate aminotransferase (AsAT) and alanine aminotransferase (AlAT) have been investigated in grapevine samples infected with “*Candidatus Phytoplasma solani*”. Activities of all three metabolic enzymes increased in the leaves of infected plants compared with healthy plants. The increase of the enzymes activities caused by phytoplasma influence could be valued as plant response to infections.

Key words: *Vitis vinifera*, “*Candidatus Phytoplasma solani*”, NAD-malate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase