

На правах рукописи

НАРГИЗ ФАХРАДДИН ГЫЗЫ СУЛТАНОВА

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАСТЕНИЙ В
АЗЕРБАЙДЖАНЕ, ИХ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ**

2415.01 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискание ученой степени доктора
философии по биологии*

Баку – 2014

Работа выполнена в лаборатории Биоадаптации отдела Фундаментальных проблем биологической продуктивности Института ботаники НАН Азербайджана.

Научный руководитель:

**доктор биологических наук,
профессор, член-корр. НАН
Азербайджана
И.М. ГУСЕЙНОВА**

Официальные оппоненты:

**доктор биологических наук,
профессор Т.Г. МАМЕДОВ**

**доктор биологических наук
Д.Н. АГАЕВА**

Ведущая организация:

**Институт микробиологии
НАН Азербайджана, отдел
микологии**

Защита состоится «30» «июня» 2014 г. в «11⁰⁰» часов на заседании Диссертационного Совета Д.01.061 при Институте ботаники НАН Азербайджана.

Адрес: AZ 1073, г. Баку, Проспект Матбуата, 2а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института ботаники НАН Азербайджана.

Автореферат разослан «29» «мая» 2014 г.

**Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук,
профессор**

С.Д. ИБАДУЛЛАЕВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В процессе жизнедеятельности растения часто подвергаются воздействию целого ряда природных факторов, которые лимитируют их рост, продуктивность и видовое распространение. Уже на ранних этапах онтогенеза растения подвергаются нападению со стороны различных организмов, являющихся возбудителями заболеваний. Основными группами фитопатогенов являются грибы, актиномицеты, бактерии, фитоплазмы и вирусы (Barba et al., 2014). В последние годы во всем мире в значительной мере возросло не только количество и распространение, но и экономическое значение вирусов, поражающих растения, в частности сельскохозяйственные культуры. Отдельные виды вирусов стали серьезной угрозой для овощных, зерновых культур и всего сельского хозяйства (Britton et al., 2010).

В Азербайджане также большинство вегетативно размножаемых продовольственных, кормовых, технических и цветочно-декоративных культур заражаются вирусами, что приводит к ощутимым потерям урожая и понижению качества сельскохозяйственной продукции. Нужно отметить, что среди выявленных за последнее время новых инфекционных фитозаболеваний почти половина имеет вирусную природу (Shahid et al., 2014). При этом, количество известных вирусов непрерывно растет, а глобальное потепление способствует расширению ареалов насекомых-переносчиков и увеличению их численности. Как правило, при комплексном поражении растений вирусной инфекцией происходит усиление вредоносности. Вирусы, являясь облигатными паразитами и воздействуя на метаболизм растения, вызывают нарушение физиологических процессов, в результате чего происходит снижение не только продуктивности сорта, но и его семенных и товарных качеств (Bradley et al., 2012). Степень влияния вирусной инфекции на хозяйственно ценные признаки зависит от устойчивости сорта, наличия в растении других патогенов, почвенно-климатических условий и воздействия многих факторов окружающей среды (Barba et al., 2014). Для контроля оздоровления и отбора здоровых культур, сертификации посадочных материалов и мониторинга вирусных болезней, с целью выявления и ликвидации инфекционных очагов, а также ограничения ареалов распространения вирусов и их переносчиков, необходимо располагать чувствительными молекулярными методами диагностики вирусных болезней. Молекулярная диагностика вирусных заболеваний также необходима для обеспечения селекционных и генно-инженерных работ по получению сортов, устойчивых к вирусам. Установлено, что многие физиолого-биохимические показатели, отвечающие за сохранение жизнеспособности и перестройку метаболизма у растений в стрессовых условиях, определяют степень устойчивости растений к вирусным

инфекциям. Нужно отметить, что на сегодняшний день защита растений от патогенов и разных вредителей является экономически значимой проблемой и важным направлением научных исследований.

Цель и задачи работы. Целью настоящей диссертационной работы являлось изучение вирусных болезней растений, распространенных в Азербайджане, проведение их молекулярной диагностики с помощью серологических и молекулярных методов, а также исследование структурно-функциональных особенностей зараженных растений.

Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

- Проведение мониторинговых обследований в разных регионах Азербайджана на основе потенциальных симптомов вирусного поражения с целью выявления вирусных заболеваний растений;
- Проведение иммуноферментного анализа (ИФА) для быстрой диагностики РНК- и ДНК-геномных вирусов растений;
- Проведение начальной идентификации ДНК геномных вирусов методами RCA, RFLP и ПЦР анализа с использованием специфических праймеров;
- Проведение гистохимического анализа для определения супероксидного-аниона и перекиси водорода в листьях инфицированных вирусами растений;
- Изучение активности и изоферментного состава основных антиоксидантных ферментов (каталазы (КАТ), аскорбатпероксидазы (АПО), супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР), гваяколпероксидазы (ГПО)) в листьях инфицированных растений;
- Определение роли антиоксидантной защитной системы в детоксификации радикалов при вирусном патогенезе;
- Изучение негативного воздействия вирусного заражения на потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II (отношение F_v/F_m), фотохимическую активность и спектры флюоресценции хлоропластов растений;
- Определение общего содержания белков и фотосинтетических пигментов в листьях растений с потенциальными симптомами вирусного заражения;
- Анализ белкового состава тилакоидной мембраны различных культур, зараженных вирусами.

Научная новизна работы. Диссертация является первой научно-исследовательской работой, посвященной комплексному изучению вирусных заболеваний овощных и бобовых культур в Азербайджане. Впервые в результате мониторинговых обследований овощных (томат, перец, огурец, баклажан, тыква, дыня) и бобовых (нут, фасоль, горох, чечевица) растений, выращиваемых в разных регионах страны на основе

выявленных потенциальных симптомов вирусного поражения растений и тест - системы ИФА были обнаружены РНК-геномные (ToCV, TMV, CMV, CYSDV, CVYV, CCYV, MNSV, BCMV, BLRV, BYMV) и ДНК-геномные (TYLCV и нановирусы) вирусы. Впервые в Апшеронском полуострове, Масаллинском, Лерикском и Исмаиллинском районах у фасоли, нута, гороха, чечевицы и томата при помощи молекулярных методов были выявлены одноцепочечные ДНК-геномные вирусы (ssDNA) - геминивирусы (TYLCV, CrCDV) и нановирусы (FBNYV vs FBNSV) и проведена их идентификация посредством RFLP анализа RCA продуктов.

Впервые комплексно изучено влияние вирусной инфекции на структурно-функциональные свойства растений. Детально исследованы образование свободных радикалов (супероксидного аниона ($O_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода (H_2O_2)) и система антиоксидантной защиты (КАТ, АПО, СОД, ГР, ГПО) у растений, инфицированных вирусами. В результате изменения экспрессии генома при вирусном патогенезе обнаружены новые изоформы антиоксидантных ферментов, а также определена важная роль этих изоформ в детоксификации радикалов.

Анализом тилакоидных мембран растений перца и томата, инфицированных TMV вирусами, выявлено, что содержание полипептидов в области 47 кДа, 33 кДа, 29-24 кДа и 17-15 кДа, входящих в состав комплекса ФС II значительно уменьшается по сравнению с незараженными растениями, что может быть связано со структурными нарушениями в комплексе ФС II. Патогенез приводит к существенному снижению фотохимической активности ФС II и потенциальному квантовому выходу ФС II (отношение Fv/Fm), что может быть связано с нарушениями в электронном транспорте через ФС II. В спектре флуоресценции (77 К) хлоропластов из инфицированных нановирусами листьев нута и чечевицы увеличивается интенсивность коротковолновых форм при 687 и 695 нм и одновременно стимулируется отношение 687/730 нм, что свидетельствует о перераспределении энергии возбуждения между ФС II и ФС I.

Практическая значимость. Впервые в Азербайджане было изучено распространение вирусных заболеваний растений, вследствие чего которой была создана доступная система для проведения визуальной, серологической и молекулярной диагностики вирусных заболеваний. На основе полученных результатов был опубликован буклет, где подробно описаны основные симптомы вирусного поражения, ареалы распространения основных вирусов овощей и бобовых культур и меры борьбы с ними, а также были даны рекомендации фермерам, агрономам и студентам сельскохозяйственных университетов.

Апробация работы. Работа была представлена на 15-ом Международном конгрессе по фотосинтезу (Пекин, 2010), на Международной конференции

"Photosynthesis Research for Sustainability" (Баку, 2011), на Международном тренинге по фотосинтезу «The International Workshop on Photosystem II» (Пекин, 2011), на VI Съезде Российского фотобиологического общества (Москва, 2011), на ежегодной научной конференции аспирантов (Баку, 2009-2011), на Международных научных конференциях «Actual problems of the use of useful plants» (Баку, 2011) и «Diversity, characterization and utilization of plant genetic resources for enhanced resilience to climate change» (Баку, 2011), на Международной конференции молодых ученых «VI International Conference on Legume Genetics and Genomics» (Хидерабад, 2012), на Международном тренинге «International workshop environmental changes and conservation of plant diversity» (Баку, 2013), на Международной конференции «Photosynthesis Research for Sustainability: *in honor of Jalal A. Aliyev*» (Баку, 2013), и на 16-ом Международном конгрессе по фотосинтезу (Сент-Луис, 2013).

Публикации. По материалам диссертации в отечественных и зарубежных изданиях опубликованы 34 работы и один буклет.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, общего заключения, выводов и списка цитируемых работ, состоящего из 304 наименований. Работа изложена на 205 страницах, содержит 62 рисунка и 24 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы включает современные данные и общие понятия о биотическом стрессе, где большое внимание отведено вирусным заболеваниям растений. Подробно изложены основные симптомы вирусных заболеваний растений, их распространение, векторные переносчики – насекомые. Рассмотрено также экономическое значение вирусов и представлены сведения о топ вирусах. Большое внимание уделено фитоиммунитету и разным биохимическим аспектам болезнеустойчивости растений.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования служили овощные и бобовые растения, выращиваемые в различных регионах Азербайджана, а также дикие виды нута и чечевицы. В 2009-2013 гг. в наиболее благоприятное время для выявления потенциальных симптомов вирусного поражения растений - в июне, июле, августе и сентябре - в различных регионах Азербайджана были проведены экспедиции, во время которых были собраны образцы зараженных растений, а также здоровые растения в качестве негативного контроля.

Для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с целью начальной диагностики вирусов растений, использовали специальные наборы реактивов для ИФА (DAS-ELISA, TAS-ELISA), изготовленные фирмами LCA - biotest (Франция) и DSMZ (Германия). Выделение ДНК проводили по методу Эдвардса с некоторыми модификациями (Edwards, 1991). Концентрация и

чистота ДНК была определена спектрофотометрически (ULTROSPEC 3300 PRO («Amersham», США).

Для идентификации одноцепочечных ДНК-геномных вирусов растений впервые в Азербайджане был проведен RCA (Rolling cycle amplification) анализ (по протоколу TempliPhi™ («GE Health Care», США)). Для рестрикции RCA продуктов был использован RFLP анализ, который проводили с помощью ферментов рестрикции *Bam*HI, *Xba*I, *Sau*3A и *Hind*III. Продукты RFLP анализировали электрофоретически на 2%-ном агарозном геле. Молекулярная диагностика одноцепочечных ДНК-содержащих вирусов растений осуществлена путем ПЦР анализа с использованием 7 геном-специфичных праймеров («Eurogentec», США). Продукты амплификации ДНК анализировали электрофоретическим методом на 1,5%-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали на УФ-свете с помощью «Gel Documentation System UVITEK» (Англия).

Гистохимический метод для определения супероксид анионного радикала и перекиси водорода был осуществлен согласно по методам (Kariola et al., 2005; Mahalingam et al., 2006). Активность КАТ (КФ 1.11.1.6) определяли спектрофотометрическим методом (Kumar and Knowles, 1993), АПО (КФ 1.11.1.11) согласно (Nakano and Asada, 1981). Активность ГР (КФ 1.6.4.2) определяли по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм в результате окисления НАДФН в присутствии окисленного глутатиона (Yannarelli, 2007). Активность ГПО (КФ 1.11.1.7) определяли по изменению оптической плотности при 470 нм реакционной смеси за 3 минуты (Mahalingam et al., 2005). Для определения активности СОД (КФ 1.15.1.1) использовали специальный кит (SOD Assay Kit-WST, «Sigma-Aldrich», США). Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Качественные изменения активности ферментов определяли с использованием вертикального ПААГ электрофореза (7%-ный гель для КАТ и ГПО, 10%-ный для АПО) по методу Леммли (Lemml, 1970) с некоторыми модификациями. Электрофорез был проведен в течение 3 часа при 4°C при стабильном токе 30 мА, используя прибор SE 250 (Amersham Biosciences, США). Визуализации линий КАТ осуществляли по методу Андерсона и др. (Anderson et al., 1995), АПО по методу Миттлера и Зилинскаса (Mittler and Zilinskas, 1993), ГПР по методу Радотика и др. (Rodotik et al., 2000).

Градиентный гель-электрофорез в ПААГ проводили по методу (Huseynova et al., 2007). Полипептидный состав тилакоидных мембран растений был анализирован в денатурирующих условиях в присутствии 0,1% SDS, используя 10-25% градиентный полиакриламидный гель в комбинации с буферной системой Леммли (Lemml, 1970).

Количественное определение белков проводили по методике (Sedmak and Grossberg, 1977). Концентрацию хлорофилла определяли спектрофотометри-

чески в 80%-ном ацетоновом экстракте (McKinney, 1941; Arnon, 1949). Для определения каротиноидов в суммарной вытяжке пигментов использовали формулу Веттштейна (Wettstein, 1957).

Измерения низкотемпературных спектров флуоресценции (*F*) хлоропластов при 77 К проводили на спектрофлуориметре Hitachi-850 (Япония). Измерения квантового выхода ФС II проводили при комнатной температуре, как описано в работе (Klimov et al., 1982). Фотохимическую активность хлоропластов определяли полярографическим методом (Guseinova et al., 2001).

Все опыты были проведены в трехкратной повторности. Полученные результаты были статистически обработаны при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Визуальная диагностика вирусных болезней растений по характерным им симптомам. В разных странах мира от болезней растений теряется 15–20%, а в некоторых случаях - до 90% урожая. Для построения рациональной экологически безопасной системы защитных мероприятий и предотвращения недобора урожая большое значение имеет своевременная и качественная диагностика болезней. В большинстве случаев в производственных условиях широко распространенным методом является визуальная диагностика, которая базируется на всестороннем знании симптомов заболеваний на разных этапах патологического процесса. В данной диссертационной работе в результате многочисленных маршрутных обследований посевов и насаждений, образцы овощных и бобовых растений, собранные в регионах Азербайджана были сгруппированы на основе визуальной диагностики вирусов и проверены тест-системой ИФА.

2. Начальная диагностика РНК- и ДНК-геномных вирусов на основе иммуноферментного анализа (ИФА). Достоинствами тест-системы ИФА являются чувствительность и специфичность, стабильность компонентов субстрата и возможность достоверной визуальной оценки результатов анализа, быстрота в проведении одновременной диагностики разных вирусов в большом количестве образцов. Для анализа были использованы полистероловые платы, в лунки, которых добавляли сыворотку и антитела, которые получены на основе тестируемых вирусов. Затем в лунки были внесены исследуемые вытяжки растений (экстракт листьев). В качестве контрольного варианта были взяты незараженные растения, выращенные в идентичных условиях. Концентрацию вирусов в образцах растений определяли спектрофотометрическим путем на основе оптического поглощения продуктов ферментативной реакции при длине волны 405 нм. Положительными, т.е. содержащими вирус считались образцы, средняя

арифметическая величина оптической плотности которых в три и более раз превышала значение оптической плотности в отрицательном контроле. На основе характерных потенциальных симптомов вирусных заболеваний и иммуноферментного анализа были выявлены РНК-геномные ToCV, TMV, CMV, CYSDV, CVYV, CCYV, MNSV, BCMV, BLRV, BYMV и ДНК-геномные вирусы TYLCV и нановирусы у овощных культур томата, перца, огурца, баклажана, дыни и тыквы, а также у бобовых растений фасоли, нута, гороха, чечевицы, собранных из различных регионов Азербайджана (Апшеронский полуостров, Нахчыван, Гянджа, Самух, Газах, Исмаиллы, Гейчай, Губа, Хачмаз, Масаллы, Лерик, Джалилабад).

3. Молекулярная диагностика одноцепочечных ДНК-геномных вирусов растений методами RCA и ПЦР. Молекулярная диагностика и идентификация одноцепочечных ДНК-геномных вирусов, геминивирусов (TYLCV, CrCDV) и нановирусов (FBNYV и FBNSV) была проведена у растений фасоли, нута, гороха, чечевицы и томата, собранных в Апшеронском полуострове, Масаллинском, Лерикском и Исмаиллинском районах с использованием двух молекулярных методов: RCA и ПЦР. 2 образца ДНК томата, 2 образца ДНК чечевицы, 3 образца ДНК нута дали амплифицированные RCA продукты (Рис.1).

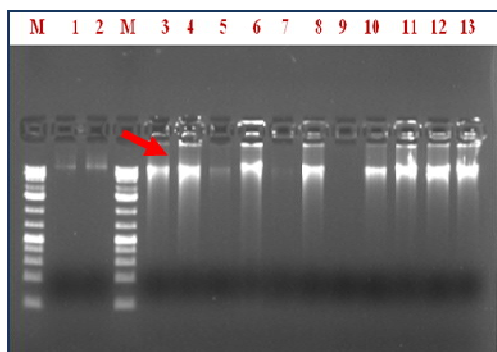


Рис. 1. Электрофоретический анализ RCA-амплифицированных ДНК растений в 1,5%-ом агарозном геле из Масаллы. М- 1Kb DNT ladder (Invitrogen). Красной стрелкой отмечены ампликоны вирусных ДНК (продукты RCA). 1, 2, 3, 4 – томат, 5, 6, 7, 8 - чечевица, 9, 10, 11, 12 - нут, 13-фасоль. Образцы ДНК (1, 2, 5, 7, 9); RCA продукты (3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13).

Электрофоретический анализ RCA продуктов бобовых растений показал присутствие одноцепочечных ДНК-геномных вирусов у нута, фасоли, чечевицы и гороха (Рис. 2).

Для таксономической характеристики вирусов растений, амплифицированные (RCA) продукты вирусных ДНК были проверены RFLP методом (Рис. 3). Идентификация геминивирусов была осуществлена с использованием рестрикционных ферментов *x*BaI и *Hind*III, дающих сайт-специфические фрагменты размером 2,7-2,8 Kb, а для идентификации нановирусов проведен RFLP анализ с использованием рестрикционных ферментов *Hind*III и *Aat*II, дающих сайт-специфические фрагменты размером 1Kb.

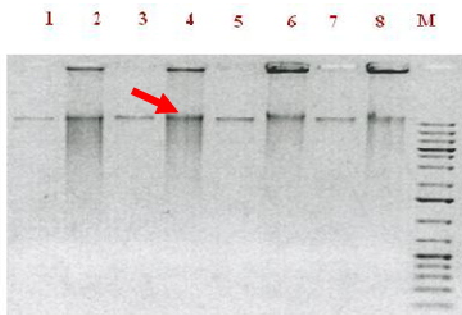


Рис. 2. Электрофоретический анализ RCA-амплифицированных ДНК бобовых растений в 1,5%-ом агарозном геле (Лерик). М - 1Kb DNT ladder (Invitrogen). Красной стрелкой отмечены ампликоны вирусных ДНК. 1,2– нут, 3, 4 - чечевица, 5, 6- горох, 7, 8 - фасоль. Нечетными номерами обозначены ДНК, четными – RCA продукты.

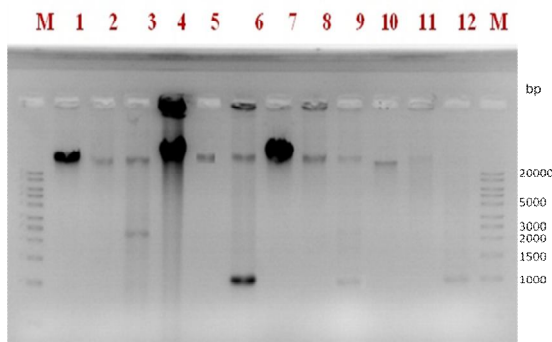


Рис. 3. RFLP анализ RCA продуктов с использованием рестрикционного фермента HindIII. М- 1Kb DNT ladder (Invitrogen). 1, 2, 3 - томат, 4, 5, 6 - чечевица, 7, 8, 9 - горох, 10,11,12 - нут. Образцы ДНК (2, 5, 8, 11); RCA продукты (1,4,7,10); продукты рестрикции с HindIII (3, 6, 9, 12).

В результате проведенных исследований было обнаружено, что растения томата, собранные из Онджагала (Масаллы), инфицированы вирусом TYLCV, а растения нута и чечевицы, собранные из Пештатюк (Лерик) инфицированы FBNYV и FBNSV вирусами. В то же время RFLP анализом идентифицировано 2 различных FBNYV вируса у образцов фасоли, собранных из Исмаиллы.

Для точной молекулярной диагностики и идентификации вирусов, позитивные ДНК растений томата, собранных из Масаллы, были также проверены методом ПЦР с использованием 5 геном-специфичных праймеров MA13 F/MA26 R; MA17 F/MA27 R; OTYA3 F/OTYA6 R; V61 F/C473 R; V781/C1256R. В результате ПЦР анализа были амплифицированы продукты ожидаемых размеров – 1200, 1900, 650, 400, 450 bp, соответственно (Рис. 4).

Полученные данные подтвердили видовую принадлежность вируса желтой курчавости листьев томата – TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) в этих образцах.

Позитивные ДНК образцы чечевицы, собранные из Лерика, были проверены с использованием универсального для ДНК R компонента нановирусов Nano F103/Nano R101 и специфичного для FBNYV C5F/C5R праймера (Рис.5).

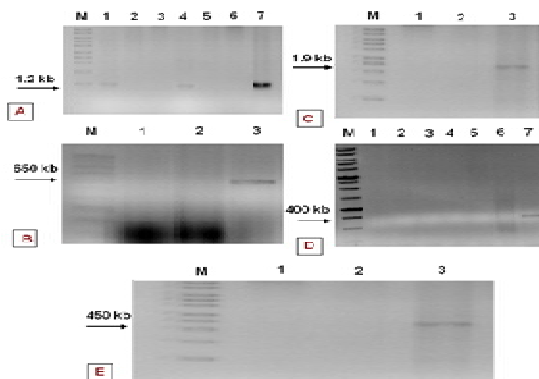


Рис. 4. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов с использованием специфических для TYLCV праймеров. М - DNT ladder 1 kb и 100 bp (Invitrogen), А - МА 13F/МА 26R; В – МА 17F/МА 27 R; С – ОТЯА 3F/ОТЯА 6R; D – V 61F/C 473R; E – V 781F/C 1256R. 1-7- разные образцы томата; стрелкой показаны амплифицированные методом ПЦР продукты.

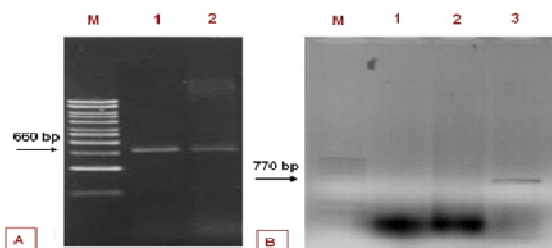


Рис. 5. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов чечевицы. М - 100 bp DNT ladder (Invitrogen). Стрелкой показаны амплифицированные методом ПЦР продукты.

В результате ПЦР анализа были амплифицированы 660 и 770 bp фрагменты, что подтвердило присутствие нановирусов FBVYV и FBNSV в исследуемых образцах чечевицы.

4. Активные формы кислорода и антиоксидантная защитная система при вирусном патогенезе. Известно, что в условиях биотического стресса ускоряется образование активных форм кислорода (АФК) и происходит окислительный стресс. В защите растений от АФК ведущую роль играют антиоксидантные системы.

Путем гистохимического анализа было изучено образование активных форм кислорода, таких как супероксидный-анион и пероксида водорода в инфицированных вирусом листьях растений (Рис. 6). Образование свободных радикалов было определено изменением окраски в местах накопления инфекции. Для определения супероксидного-аниона гистохимическим методом был использован нитросинийтетразолий (НСТ), а для пероксид водорода – диаминобензидин (ДАБ). Обнаружена более высокая интенсивность накопления свободных радикалов в образцах растений, инфицированных вирусами. Повышение накопления свободных радикалов в разных местах листьев указывает на процесс окислительного стресса, протекающего в клетках при патогенезе.



Рис. 6. Гистохимическое определение супероксидного аниона (слева) и пероксида водорода (справа) в листьях инфицированных вирусами растений.

А – *V. faba* L. В – *C. sativus* L., С – *S. lycopersicum* L. В обеих панелях справа расположены инфицированные вирусом листья.

Известно, что растительная клетка обладает сильной защитной системой против окислительного стресса, возникающего при инфицировании вирусами. В работе исследованы основные ферменты антиоксидантной системы растений – каталаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза и гваяколпероксидаза (Рис. 7). Как видно из рис.7 (I), активность КАТ во всех инфицированных вирусом овощных растениях была повышена. Активность фермента в зараженных растениях томата по сравнению с контролем увеличиваясь в 1,3 раза составляла 0,32 ммоль/мг·мин. В растениях баклажана и перца активность КАТ по сравнению с контролем увеличивалась на 11% и 22%, соответственно. В инфицированных вирусом растениях огурца также наблюдалось резкое повышение (на 69%) активности КАТ.

Активность АПО также увеличивалась во всех зараженных растениях. У инфицированных растений томата активность фермента по сравнению с контролем увеличивалась в 1,6 раз и составляла 0,36 ммоль/мг·мин. А в растениях баклажана и перца активность АПО по сравнению с контролем, увеличивалась на 11% и 22%, соответственно. У инфицированных растений огурца активность фермента увеличивалась на 44% по сравнению с контролем (Рис. 7 (I)).

Активность ГПО у инфицированных растений томата по сравнению с контролем увеличивалась в 1,5 раза и составила 0,52 ммоль/мг·мин. У зараженного огурца и перца активность ГПО незначительно увеличивалась и составляла 22% и 17%, соответственно. В листьях баклажана активность ГПО при патогенезе увеличивалась приблизительно в 2,6 раз (Рис. 7 (I)).

Во всех инфицированных вирусом растениях активность ГР также повышалась. Особенно сильное увеличение наблюдалось у инфицированных растений перца и составляло 69% по сравнению с контролем. Однако, у зараженных растений в активности СОД существенных изменений не наблюдалось.

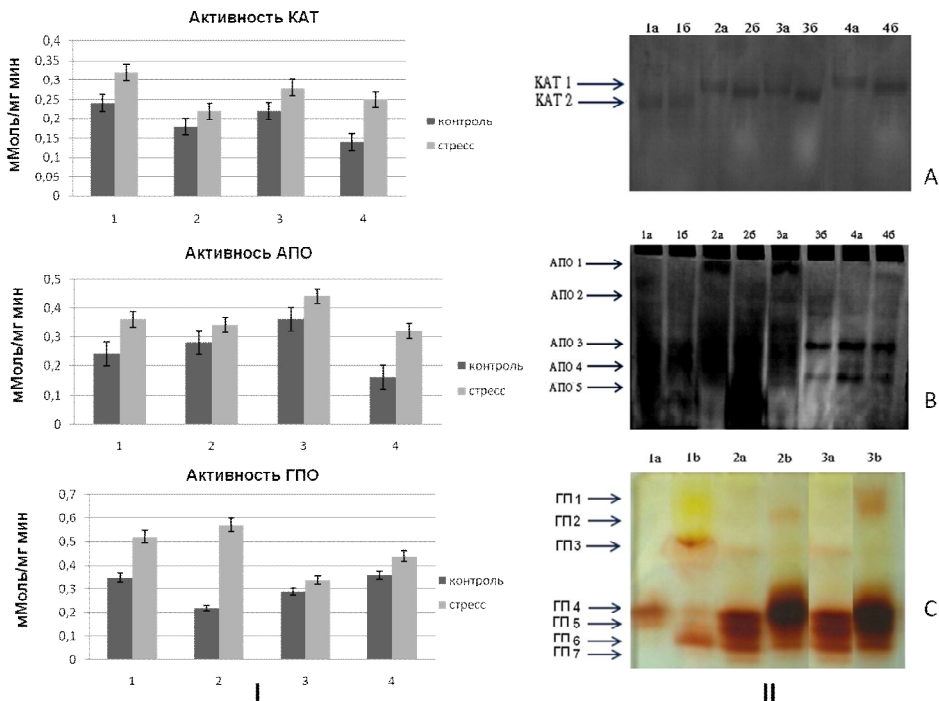


Рис. 7. Активность (панель I) и изоферментный состав (панель II) КАТ, АПО, ГПО у инфицированных вирусом растений; в I панели: 1 - *Solanum lycopersicum* L., 2 - *Solanum melongena* L., 3 - *Piper longum* L., 4 - *Cucumis sativus* L.; во II панели: А и В – 1 – *Solanum lycopersicum* L., 2 – *Solanum melongena* L., 3 – *Piper longum* L., 4 – *Cucumis sativus* L.; С-1 – *Vicia faba* L., 2 – 3 – *Piper longum* L.

Полученные результаты указывают на наличие между антиоксидантными ферментами тесной функциональной связи, имеющей генетическую основу, при формировании ответной реакции растений на стресс.

Одновременно были изучены качественные изменения в антиоксидантных ферментах (Рис. 7 II). В результате электрофоретического анализа КАТ были обнаружены 2 отличающиеся друг от друга по массе изоформы (КАТ1 и КАТ2). Количество изофермента КАТ2 во всех инфицированных вирусом растениях было более интенсивным. В пораженных растениях наблюдались существенные изменения в изоферментном составе АПО по сравнению с контролем. В здоровых растениях томата наблюдаются 3 изоформы, а в инфицированных вирусом растениях образовывались еще 2 новые высокомолекулярные изоформы, и таким образом всего выявлялось 5 изоформ. Количество конститутивной АПО в инфицированных вирусом растениях баклажана по сравнению с контролем, также отличалось. В здоровых растениях

выявлялись 3 изоформы (1 высокомолекулярная и 2 низкомолекулярные). В инфицированных вирусом растениях баклажана АПО1 и АПО4 исчезали и вместо них образовывалась низкомолекулярная интенсивная АПО5 изоформа. У инфицированных растений перца исчезала высокомолекулярная форма АПО1, а интенсивность низкомолекулярных форм (АПО3 и АПО5) повышалась. В то время как, в здоровых растениях фасоли наблюдались 2 низкомолекулярные изоформы ГПО (ГПО4 и ГПО5), в инфицированных вирусом растениях образовывались 2 новые изоформы (ГПО3 и ГПО6), и таким образом всего наблюдалось 4 изоформы. Количество конститутивной ГПО в инфицированных вирусом растениях перца, по сравнению с контролем, было повышено. В здоровых растениях перца наблюдалась 1 средномолекулярная и 4 низкомолекулярные изоформы, а в инфицированных вирусом растениях перца исчезала ГПО3, образовывались 2 новые высокомолекулярные изоформы (ГПО 1 и ГПО 2), и одновременно повышалась интенсивность изоформы ГПО4 и ГПО5. Изменение изоферментного состава ГПО в инфицированных вирусом растениях может быть связано с повышением содержания фенольных соединений в клетке при стрессе.

5. Структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата растений, инфицированных вирусами. Изучение структурно-функциональных перестроек в организме, выявление особенностей функционирования фотосинтетических систем, регулирующих адаптацию растений, является актуальной проблемой современной биологии и приобретает особую важность также при вирусном патогенезе. Исходя из этого, были изучены структурные и функциональные характеристики хлоропластов из инфицированных вирусами растений.

Наблюдались значительные изменения в функциональной активности фотосинтетического аппарата на уровне фотохимических реакций хлоропластов. Более заметные изменения в фотохимической активности ФС II обнаружены у инфицированных геминовирусами и нановирусами растениях томата, фасоли и нута (Табл.1). При этом активность ФС II составляла, соответственно 41%, 43% и 46% от такого значения контроля. Причиной инактивации ФС II в обоих растениях может быть подавление синтеза белка 32 кД (Д1- белок РЦ ФС II), который является носителем фотохимически активной формы Хл а Р₆₈₀, и/или нарушение переноса электронов от феофитина – промежуточного переносчика электрона на первичный хиноновый акцептор (Q_A) в нециклическом транспорте электронов. Все еще возможно, что вирусное инфицирование ингибирует перенос энергии от молекул Хл через ядерные комплексы ФС II (Huseypova, 2012).

Патогенез приводит к уменьшению (хотя и незначительному) фотохимической активности ФС I.

Таблица 1. Активность ФС I и ФС II хлоропластов инфицированных геминовирусами и нановирусами растений ($\mu\text{моль O}_2 \cdot \text{мг}^{-1} \text{Хл} \cdot \text{ч}^{-1}$); I - здоровые растения; II - зараженные растения.

Образцы растений	Варианты	Фотосистема II $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	в %	Фотосистема I $\text{ДХФИФ} \cdot \text{Н} \rightarrow \text{МВ}$	в %
<i>S. lycopersicum</i> L.	I	85 ± 6	100	242 ± 12	100
	II	35 ± 4	41	189 ± 9	78
<i>V. faba</i> L.	I	57 ± 4	100	250 ± 12	100
	II	25 ± 3	43	225 ± 9	90
<i>C. arietinum</i> L.	I	65 ± 4	100	158 ± 6	100
	II	30 ± 3	46	114 ± 6	72

Величины флуоресцентных параметров, характеризующих функциональное состояние фотосинтетического аппарата зараженных растений представлены на рис. 8А. Потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II (отношение F_v/F_m) претерпевает значительные изменения по сравнению со здоровыми растениями. Уменьшение фотохимической эффективности (F_v/F_m) при вирусном патогенезе можно рассматривать, как свидетельство повреждения фотосинтетических реакционных центров и может быть связано с нарушениями в электронном транспорте через ФС II и/или ФС I.

При исследовании низкотемпературных (77 К) спектров флуоресценции у инфицированных нановирусами растений нута и чечевицы выявлено 3 основных пика при 687 нм, 695 нм и 730 нм (Рис. 8Б). Показано, что коротковолновые полосы при 687 нм и 695 нм (флуоресценция CP47 и CP43 ядерных комплексов) остаются неизменными по расположению, но их интенсивность у зараженных растений значительно увеличивается. При этом наблюдается перераспределение полос и ослабление флуоресценции в области 730 нм. Стимулируется отношение F_{687}/F_{730} , что свидетельствует о перераспределении энергии возбуждения между ФС II и ФС I.

Тилакоидные мембраны, изолированные из здоровых растений томата и перца содержат приблизительно 22 полипептидов с M_r от 123 до 10 кДа. Инфицирование растений TMV вызывает существенные изменения в составе и содержании белков хлоропластной мембраны (Рис. 9).

Значительно снижается синтез полипептидов в области 47 кДа (ядерный белок ФС II), 33 кДа (белок кислород-выделяющего комплекса), 29-24 кДа (белки светособирающего комплекса ФС II (LHCP II) и 17-15 кДа (периферические белки). Известно, что 17-15 кДа периферические белки необходимы для нормального функционирования кислород-выделяющего комплекса ФС II. Обнаруженные изменения в структуре пигмент-белкового комплекса ФС II могут быть вследствие повреждения хлоропластов или при ингибировании белкового синтеза.

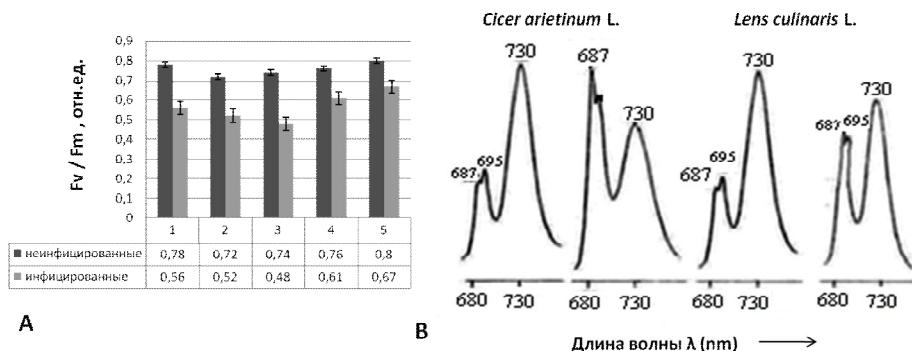


Рис. 8. (А) Потенциальный квантовый выход ФС II (отношение F_v/F_m) и (Б) спектры флуоресценции при 77 К хлоропластов из инфицированных нановирусами растений; 1- *Solanum lycopersicum* L.; 2 - *Vicia faba* L.; 3 - *Cicer arietinum* L.; 4 - *Lens culinaris* L.; 5 - *Pisum sativum* L.

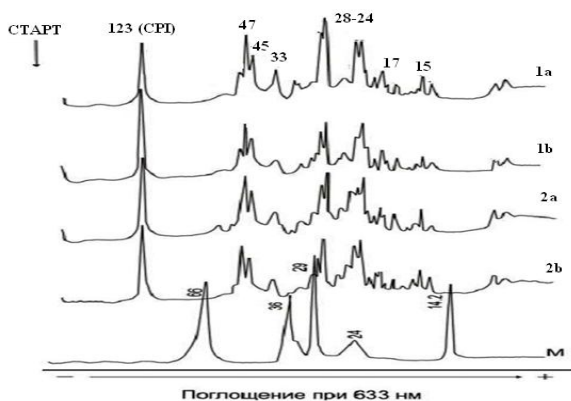


Рис.9. Денситограмма белков тилакоидных мембран хлоропластов в 10-25%-ом Ds-Na-ПААГ из TMV инфицированных растений. 1- *Piper longum* L., 2 -*Solanum lycopersicum* L. (а – здоровые растения; б- зараженные), М - стандартные белки-маркеры (кДа).

Содержание фотосинтетических пигментов и белков в листьях из инфицированных вирусами растений значительно снижается. В инфицированных одноцепочечными ДНК-геномными вирусами образцах томата снижение общего содержания хлорофилла было в 3,1 раз, у фасоли - 2,5 раза, у нута - 1,8 раз, в чечевице -2,2 раза и в горохе в 3,2 раза по сравнению со здоровыми растениями. Уменьшение содержания хлорофилла (Хл а и Хл б) в инфицированных листьях может быть результатом увеличения активности хлорофиллазы или же ингибированием синтеза хлорофилла.

Итак, структурно-функциональные изменения, обнаруженные в инфицированных вирусами растениях, могут составить основу защитно-адаптивных процессов, направленных на повышение устойчивости растений к биотическому стрессу.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в результате мониторинговых обследований овощных и бобовых культур в разных регионах Azerbaijan, на основе характерных симптомов вирусного поражения и тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА) были выявлены РНК-геномные вирусы у томата (*Solanum lycopersicum* L.) и перца (*Piper longum* L.) – *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato mosaic virus* (TMV); огурца (*Cucumis sativus* L.) – *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV); дыни (*Cucumis melo* L.) – *Melon necrotic spot virus* (MNSV); тыквы (*Cucurbita* sp.) – *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) и *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV);, а также ДНК-геномные вирусы у томата – *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) и нановирусы у бобовых растений.
2. Впервые с использованием метода RCA (Rolling Circle Amplification) была проведена молекулярная диагностика одноцепочечных ДНК-геномных вирусов растений – геминивирусов и нановирусов. Путем RFLP анализа RCA продуктов осуществлена таксономическая характеристика одноцепочечных ДНК-геномных вирусов растений. В результате у зараженных растений томата и нута были идентифицированы 2 вида геминивирусов: *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) и *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV), а у бобовых растений чечевицы, гороха, нута и фасоли 3 разных вида нановирусов (2 вида *Faba bean necrotic yellow virus* (FBNYV) и *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV)).
3. Методом ПЦР с использованием 5 специфических праймеров проведена молекулярная диагностика вируса TYLCV, обнаруженного у растений томата (собранного в районе Масаллы), а также вируса FBNYV у растений чечевицы (собранных в районе Лерик) с использованием универсальных для DNA-R генома праймеров – NanoF103/NanoR101, и специфичных для нановирусов праймеров – C5F/C5R.
4. Гистохимический анализ определения образования свободных радикалов в листьях исследованных растений выявил, что содержание перекиси водорода (H_2O_2) и супероксидного аниона ($O_2^{\cdot-}$) у всех зараженных растений увеличивается. Возможно, они вовлекаются во взаимодействие хозяин-патоген и в умеренных концентрациях могут индуцировать адаптивные реакции.
5. Изучена активность и изоферментный состав антиоксидантных ферментов (КАТ, АПО, ГР, ПО и СОД) в листьях исследованных растений. Установлено, что активность ферментов при вирусном патогенезе существенно увеличивается по сравнению с контрольным вариантом, что может быть связано с изменением экспрессии генома и с синтезом

- соответствующих белков. Изоферментный состав этих ферментов также отличается от спектра здоровых растений.
6. По электрофоретическим спектрам каталазы в инфицированных вирусами листьях растений были выявлены 2 изоформы фермента (КАТ1 и КАТ2). Патогенез приводит к усилению их интенсивности, что может свидетельствовать о том, что количественные изменения молекулярных форм каталазы обеспечивают способность сохранять жизненные функции в экстремальных условиях.
 7. При анализе электрофоретического спектра аскорбатпероксидазы в контрольном варианте листьев *Solanum lycopersicum* L. были обнаружены 3 изоформы. Патогенез под влиянием TMV инфекции сопровождается увеличением числа изоформ АПО до 5 с образованием двух новых высокомолекулярных форм фермента. Также в здоровых листьях *Solanum melongena* L. выявлены 3 (1 высокомолекулярная и 2 низкомолекулярные) изоформы АПО. При инфицировании CCYV изоформы АПО1 и АПО4 исчезают и появляется дополнительная интенсивная низкомолекулярная изоформа – АПО5. В зараженных TMV листьях *Piper longum* L. исчезают высокомигрирующая изоформа АПО1 и увеличивается интенсивность изоформ АПО3 и АПО5.
 8. В здоровых растениях *Phaseolus vulgaris* L. были обнаружены 2 изоформы гваякол-пероксидазы (ГПО4 и ГПО5). Инфицирование растений FBNYV сопровождается увеличением числа изоформ ГПО до 4 с образованием 2-х новых форм фермента (ГПО3 и ГПО6). В нормальном состоянии у *Piper longum* L. наблюдаются 1 среднемолекулярная и 4 низкомолекулярные изоформы. При TMV вирусной инфекции увеличивается интенсивность медленномигрирующих изоформ (ГПО4 и ГПО5), исчезает среднемигрирующая ГПО3 и появляются высокомолекулярные изоформы ГПО1 и ГПО2 фермента. Синтез и резкое повышение активности гваякол-пероксидазы при патогенезе могут быть связаны с увеличением содержания фенольных соединений.
 9. Градиентный электрофорез белков тилакоидной мембраны растений перца и томата, инфицированных TMV вирусами, показал, что содержание полипептидов в области 47, 33, 29-24 и 17-15 кДа, входящих в состав субмолекулярного комплекса ФС II и кислородвыделяющего комплекса значительно уменьшается по сравнению с незараженными растениями, что может быть связано со структурными нарушениями в комплексе ФС II.
 10. При изучении функциональной активности хлоропластов исследуемых растений выявлено, что патогенез приводит к существенному снижению фотохимической активности ФС II, при этом активность ФС I не испытывает значительных изменений. Потенциальный квантовый выход ФС II (отношение Fv/Fm) также значительно уменьшается, что может быть связано

с нарушениями в электронном транспорте через ФС II и/или ФС I.

11. Показано, что в низкотемпературном спектре (77К) флуоресценции хлоропластов, выделенных из зараженных нановирусами листьев нута и чечевицы, увеличивается интенсивность коротковолновых форм при 687 и 695 нм и стимулируется отношение F687/F730, что свидетельствует о перераспределении энергии возбуждения между ФС II и ФС I.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Sultanova N.F., Məmmədov Ə.Ç. Biotik stresə davamlılığın bəzi aspektləri / “Biologiyada elmi nailiyyətlər” Respublika elmi konfransının materialları, BDU, Bakı, 2009, s.17-18.
2. Sultanova N.F. Biotik stres zamanı bitkilərdə molekulyar səviyyədə baş verən dəyişikliklər /Aspirantların elmi konfransının materialları, Bakı, 2009, s.223-225.
3. Sultanova N.F., Hüseynova İ.M., Məmmədov Ə.Ç. Bitkilərin fitopatogenlərə və ziyanvericilərə qarşı davamlılığının molekulyar əsasları / Bakı Dövlət Universitetinin 90-illik yubileyinə həsr olunmuş beynəlxalq elmi konfransın materialları, BDU, Bakı, 2009, s.400-401.
4. Гусейнова И.М., Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч., Алиев Д.А. Первое сообщение о кольцевой одноцепочечной ДНК вирусов овощей в Азербайджане: Быстрое определение методом RCA и молекулярная характеристика // Доклады НАН Азербайджана, 2009, т. LXV, № 6, с. 106-113.
5. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Mammadov A.Ch. Detection of tomato yellow leaf curl virus in Azerbaijan and partial characterization of biochemical properties of naturally infected plants / Abstracts of the 15th International Congress of Photosynthesis, Beijing, China, 2010, p. 257.
6. Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч., Гусейнова И.М. Молекулярное определение ДНК-содержащих вирусов, вызывающих болезни овощей в Азербайджане /Akademik A. Qarayevin anadan olmasının 100 illik yubileyinə həsr olunmuş «XXI əsrdə biologiyanın aktual problemləri» mövzusunda Respublika elmi konfransının materialları, Bakı, 2010, s. 333-334.
7. Grigoras I., Vetten H.J., Sultanova N.F., Winter S., Huseynova I.M., Mamedov A.Ch., Kheyr-Pour A., Gronenborn B. Single stranded DNA plant viruses in Azerbaijan: the state of the art // Proceedings of ANAS (Biological Sciences), 2010, v.65, № 5-6, p. 152-157.
8. Султанова Н.Ф. Изучение активности антиоксидантных ферментов томата (*Solanum Lycopersicum* L.) при инфицировании геминивирусами / Aspirantların elmi konfransının materialları, Bakı, 2010, s. 210-213.
9. Султанова Н.Ф. Изучение вирусных инфекций овощных культур на территории Азербайджана /«Gənc alimlərin və tədqiqatçıların “Müasir biologiyanın nəzəri və tətbiqi problemləri” mövzusunda beynəlxalq elmi konfransının

- materialları, BDU, Bakı, 2011, s.25.
10. Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч., Гусейнова И.М. Антиоксидантная система у инфицированных нановирусами бобовых растений // Современные проблемы науки и образования (электронный научный журнал ISSN1817-6321), 2011, Москва, № 6, <http://www.science-education.ru/100-4934>.
 11. Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч., Гусейнова И.М. Молекулярная идентификация нановирусов бобовых растений культивируемых в Азербайджане / "Gənc alimlərin I Elm Festivalı" elmi simpoziumunun materialları, Bakı, 2011, s. 106-110.
 12. Султанова Н.Ф., Гусейнова И.М. Активность антиоксидантных ферментов и функциональное состояние фотосинтетического аппарата бобовых растений инфицированных нановирусами // Доклады НАН Азербайджана, 2011, т. LXVI, № 3, с. 97-104.
 13. Султанова Н.Ф., Гусейнова И.М. Оценка функционального состояния фотосинтетического аппарата бобовых растений инфицированных нановирусами / Материалы VI Съезда российского фотобиологического общества, Москва, 2011, с. 70.
 14. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Mammadov A.Ch. Detection of tomato yellow leaf curl virus in Azerbaijan and partial characterization of biochemical properties of naturally infected plants // Proceedings of the 15th International Congress on Photosynthesis. Beijing, China, 2011. In: Photosynthesis Research for Food, Fuel and Future (eds. by Tingyun Kuang, Congming Lu and Lixin Zhang), 2013, Springer, pp. 556- 559.
 15. Султанова Н.Ф. Определение вируса желтой курчавости листьев томата (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) методом ПЦР / Aspirantların elmi konfransının materialları, Bakı, 2011, s. 102-105.
 16. Sultanova N.F., Huseynova I.M. Some photosynthesis parameters and antioxidant defense systems of nanovirus infected faba bean leaves / Abstract book of the International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability", Baku, 2011, p. 134.
 17. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Aliyev J.A. Functional state of photosynthetic apparatus of nanovirus-infected faba bean (*Vicia faba* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) leaves / Abstract book of the International Workshop on Photosystem II, Chengdu, China, 2011, p.34.
 18. Гусейнова И.М., Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч. Молекулярная диагностика одноцепочечных ДНК геномных вирусов овощных культур выращенных в условиях Азербайджана // Transactions of the International Conference "Actual problems of the use of useful plants", Baku, Azerbaijan, 2011, p. 200-205.
 19. Huseynova I.M., Mamedov A. Ch., Sultanova N.F., Aliyev J.A. Molecular identification of *Faba bean necrotic yellow virus* in Azerbaijan and some

- properties of naturally infected plants / Proceedings of International Conference “Diversity, characterization and utilization of plant genetic resources for enhanced resilience to climate change”, Baku, Azerbaijan, 2011, p. 125-128.
20. Гусейнова И.М., Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч. Определение и идентификация вирусных болезней овощных культур методом иммуноферментного анализа в «Сэндвич» формате (Das-Double Antibody Sandwich) // Доклады НАН Азербайджана, 2011, т. LXVII, №5, с. 113-122.
 21. Гусейнова И.М., Султанова Н.Ф., Мамедов А.Ч. Определение одноцепочечных ДНК геномных вирусов овощных растений методом ПЦР // Известия НАН Азербайджана (биологические науки), 2011, т. 66, №2, с. 5-12.
 22. Султанова Н.Ф., Гусейнова И.М. Одноцепочечные ДНК-содержащие вирусы растений: Молекулярные механизмы системной устойчивости // Известия НАН Азербайджана (биологические науки), 2011, т. 66, №3, с. 5-12.
 23. Guliyeva F.B., Agayeva A.Q., Sultanova N.F. Molecular detection of tomato-infecting begamovirus (TYLCV) in Azerbaijan / IABS International Scientific Workshop on “New cells, new vaccines VI”, Delaware, Wilmington, USA, 2012.
 24. Султанова Н.Ф., Агаева А.Г., Гусейнова И.М. Определение супероксид-аниона в инфицированных вирусами листьях овощных растений // Azərbaycan Elmi-Tədqiqat Əkinçilik İnstitutunun elmi əsərləri məcmuəsi, 2012, XXIII, s. 117-121.
 25. Sultanova N.F., Mammadov A.Ch., Huseynova I.M. Viral diseases infecting legume crops in Azerbaijan / Abstract book of VI th International Conference on Legume Genetics and Genomics, Hyderabad, India, 2012, p. 14.
 26. Sultanova N.F., Huseynova I.M. Determination of superoxide anion radical and antioxidant enzymes activities of in viral infected vegetable plants // Proceedings of ANAS (biological and medical sciences), 2012, v. 67, №1, p. 13-19.
 27. Агаева А.Г., Султанова Н.Ф. Молекулярная диагностика вируса желтой курчавости листьев томата методом RCA (Rolling Circle Amplification) / М.А. Ахундовун anadan olmasının 110-cu ildönümünə həsr olunmuş gənc alimlərin və tədqiqatçıların “Müasir biologiyanın innovasiya problemləri” mövzusunda Beynəlxalq elmi konfransının materialları, BDU, Bakı, 2012, s. 34-36.
 28. Гусейнова И.М., Султанова Н.Ф., Маммадов А.Ч., Алиев Д.А. Вирусные заболевания, поражающие овощные культуры в Азербайджане / Баку: Элм, 2012, 118 с.
 29. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Aliyev J.A. Histochemical evidence for generation of reactive oxygen species and antioxidant response to viral infections of vegetable crops / Abstract book of International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability: in honor of Jalal A. Aliyev”, Baku, Azerbaijan, 2013, p. 89.
 30. Grigoros I., Timchenko T., Ginzo A.I., Sultanova N., Mamedov A., Huseynova İ., Aliyev J., Romero J., Vetten H.-J. and Gronenborn B. Nanoviruses from Sweden to Azerbaijan: Known and novel species in Europe and their genetic relation-

- ship / Abstract book of International Conference “ Photosynthesis Research for Sustainability: in honor of Jalal A.Aliyev”. Baku, Azerbaijan, 2013, p. 92.
31. Sultanova N.F., Huseynova I.M. Occurrence and detection of some single stranded (ssDNA) plant viruses in Azerbaijan / Abstract book of International Workshop “Environmental changes and conservation of plant diversity”, Baku, 2013, p.21.
 32. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Mamedov A. Ch., Aliyev J.A. Photosynthetic responses of different virus-infected vegetable crops grown in Azerbaijan / Abstract book of the 16th International Congress on Photosynthesis, St.Louis, USA, 2013, p.235.
 33. Султанова Н.Ф., Алиева Д.Р., Гусейнова И.М. Активность и изоферментный спектр антиоксидантных ферментов, инфицированных вирусами овощных растений //Научные труды Института ботаники НАН Азербайджана, т. XXXIII, Баку, 2013, с. 144-152.
 34. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Aliyev J.A. Histochemical visualization of ROS and antioxidant response to viral infections of vegetable crops grown in Azerbaijan //Plant Physiology and Biochemistry, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.002>
 35. Huseynova I.M., Sultanova N.F., Mamedov A. Ch., Suleymanov S.Y., Aliyev J.A. Biotic stress and crop improvement //In: Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes, Chapter IV, Springer, 2014, v.2, <http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/book/978-1-4614-23-1>.

AZƏRBAYCANDA BİTKİLƏRDƏ VIRUS XƏSTƏLİKLƏRİNİN YAYILMASI, MOLEKULAR DİAQNOSTİKASI VƏ STRUKTUR- FUNKSIONAL XÜSUSİYYƏTLƏRİ

XÜLASƏ

Təqdim olunan dissertasiya Azərbaycanda bitkilərdə yayılmış virus xəstəliklərinin molekulyar diaqnostikası və struktur-funksional xüsusiyyətlərinin öyrənilməsinə həsr edilmiş ilk tədqiqat işidir. Azərbaycanın əksər bölgələrində aparılan çoxsaylı fitopatoloji monitorinqlər zamanı virus xəstəliyinin xarakterik simptomlarına əsaslanan vizual diaqnostika və İFA test-sistemi əsasında tərəvəz və paxlalı bitkilərdə RNT-genomlu (ToCV, TMV, CMV, CYSDV, CVYV, CCYV, MNSV, BCMV, BLRV, BYMV) və DNT-genomlu (TYLCV və nanoviruslar) viruslar aşkar olunmuşdur. İlk dəfə olaraq, Abşeron yarımadasında, Masallı, Lerik və İsmayilli rayonlarında müxtəlif molekulyar metodlardan (RCA, RFLP və spesifik praymerlərlə aparılan PZR) istifadə etməklə lobya, nut, noxud, mərcimək və tomat bitkilərində birzəncirli DNT genomuna malik geminoviruslar və nanoviruslar aşkar edilmiş və onların növ səviyyəsində identifikasiyası aparılmışdır.

İlk dəfə olaraq viruslarla yoluxmuş bitkilərin struktur-funksional xüsusiyyətləri kompleks tədqiq edilmişdir. Patogeneza zamanı sərbəst radikalların yaranması və antioksidant müdafiə sistemləri ətraflı öyrənilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, viruslarla yoluxmuş bitkilərdə H_2O_2 -nin və superoksid anionun (O_2^-) miqdarı artır və antioksidant fermentlərin (KAT, APO, SOD, QR, QPO) fəallıqlarında və elektroforetik spektrlərində əhəmiyyətli dəyişikliklər baş verir.

Viruslarla yoluxmuş bitkilərin tilakoid membranlarının elektroforetik spektri analiz edilmiş və 47, 33, 29-24 və 17-15 kDa molekul kütləsinə malik polipeptidlərin miqdarının əhəmiyyətli dərəcədə azalması müəyyən edilmişdir.

Viruslarla yoluxmuş nut (*Cicer arietinum* L.) və mərcimək (*Lens culinaris* L.) bitkilərindən ayrılmış xloroplastların aşağı temperaturu (77 K) flüoressensiya spektrlərində 687 və 695 nm-də yerləşən qısa dalğalı zolaqların intensivliyi əhəmiyyətli dərəcədə artmış və eyni zamanda F687/F730 nisbəti stimullaşmışdır. Fotosintetik aparatın funksional fəallığının öyrənilməsi nəticəsində göstərilmişdir ki, viruslarla yoluxmuş bitkilərdə FS II-nin fotokimyəvi fəallığı və FS II-nin potensial kvant çıxımı (Fv/Fm nisbəti) əhəmiyyətli dərəcədə azalır, lakin FS I-in fotokimyəvi fəallığında əsaslı dəyişikliklər baş vermir.

THE DISTRIBUTION OF VIRAL DISEASES IN PLANTS IN AZERBAIJAN, THEIR MOLECULAR DIAGNOSIS AND STRUCTURAL-FUNCTIONAL PECULIARITIES

SUMMARY

The first researches dedicated to the study of the distribution of viral diseases in plants in Azerbaijan, their molecular diagnosis and structural-functional peculiarities are present in the thesis. During the multiple phytopathological monitoring surveys in many regions of Azerbaijan, the RNA-genomic (ToCV, TMV, CMV, CYSDV, CVYV, CCYV, MNSV, BCMV, BLRV, BYMV) and DNA-genomic (TYLCV and nanoviruses) viruses were identified in vegetable and legume crops using the ELISA test system and visual diagnosis based on the characteristic symptoms of viral infection. For the first time, geminiviruses with single-stranded DNA were identified using different molecular techniques (RCA, RFLP and PCR with specific primers) in fababean, cheakpea, lentil and tomato plants collected from Absheron peninsula, Masalli, Lerik and Ismayilli districts, and their species-level identification was carried out.

For the first time, the multisite study of structural-functional peculiarities of virus-infected plants were performed. The emergence of free radicals during pathogenesis and antioxidant defence system were studied comprehensively. It was determined that amount of H_2O_2 and superoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) increases in virus-infected plants and significant changes occur in the activity of antioxidant enzymes (CAT, APX, SOD, GR, GPX) and their electrophoretic spectra.

Electrophoretic spectrum of thylakoid membranes from chloroplasts of virus-infected plants was analyzed and significant decrease in the quantity of polypeptides with molecular weight of 47, 33, 29-24 and 17-15 kDa was detected.

The intensity of short wavelength bands at 687 and 695 nm in the low temperature spectrum of fluorescence (77 K) in chloroplasts from virus-infected cheakpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) sharply increased, and at the same time, the ratio F687/F730 was stimulated. As a result of the study of functional activity of photosynthetic apparatus, it was shown that the photochemical activity of PS II and potential quantum yield of PS II (Fv/Fm ratio) significantly decreased, however no significant changes were detected in the photochemical activity of PS I.

Kağız formatı 60x84,1/16
Tiraj 100
AMEA-nın mətbəəsində çap olunmuşdur.

Əlyazması hüququnda

NƏRGİZ FƏXRƏDDİN QIZI SULTANOVA

**AZƏRBAYCANDA BİTKİLƏRDƏ VİRUS XƏSTƏLİKLƏRİNİN
YAYILMASI, MOLEKULYAR DİAQNOSTİKASI VƏ STRUKTUR-
FUNKSIONAL XÜSUSİYYƏTLƏRİ**

2415.01 – Molekulyar biologiya

*Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi
dərəcəsi almaq üçün təqdim edilən dissertasiyanın*

AVTOREFERATI

Bakı – 2014