



**AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASININ PREZİDENTİ YANINDA
ELMİN İNKİŞAFI FONDU**

**Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı Fondunun
elmi-tədqiqat proqramlarının, layihələrinin və digər elmi tədbirlərin maliyyələşdirilməsi
məqsədi ilə qrantların verilməsi üzrə**

2014-cü ildə keçirilmiş 5-ci “Möbillik qrantı” - müsabiqəsinin

(EIF-Mob-5-2014-2(17)) qalibi olmuş

layihənin yerinə yetirilməsi üzrə

ELMİ-TEXNİKİ HESABAT

Layihənin nömrəsi: **EIF-Mob-5-2014-2(17)-14/08/3**

Layihənin adı: Payızlıq buğda genotiplərində keyfiyyət əlamətlərinin asosiativ xəritələnməsi
və keyfiyyətə nəzarət edən genlərin skriningi

Müqavilənin imzalanma tarixi: **13 oktyabr 2014 cu il**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Rüstəmovə Vəfa Nuşrəvan qızı**

Qrant layihəsinin yerinə yetirilmə müddəti: **30 gün**

Layihənin icra müddəti (başlama və bitmə tarixi): **06 noyabr – 05 dekabr 2014-ci il**

Qrantın məbləği: 5300 man

Bakı-2014

Mündəricat

| | |
|-----------------------|------|
| 1. Giriş----- | 3-4 |
| 2. İcmal----- | 4-5 |
| 3. Təcrübi hissə----- | 5-15 |

Giriş

Layihənin məqsədi və qarşıya qoyulan məsələləri:

Layihənin əsas məqsədi Milli genbankda saxlanılan yumşaq buğda nümunələrinin keyfiyyət göstəricilərinə görə qiymətləndirmək, onların genetik müxtəlifliyini molekulyar markerlərlə qiymətləndirmək və keyfiyyətə nəzarət edən məlum genlərin skriningini aparmaqdan ibarət olmuşdur. Tədqiqat işinin yerinə yetirilməsi üçün aşağıdakı mərhələlər üzrə plan hazırlanmışdır.

1. Tədqiqat materialı kimi götürülmüş nümunələrin cüçərdilməsi və eyni zamanda nümunələrin əsas keyfiyyət göstəricilərinin qiymətləndirilməsi
2. Tədqiqat materialından DNT-nin ekstraksiyası və aqaroz gelində keyfiyyətinin yoxlanılması
3. DNT-nin miqdarının Nanodrop vasitəsilə yoxlanılması və PZR reaksiyasına uyğun durulaşdırılması
4. Molekulyar markerlər ilə PZR reaksiyasının qoyulması və PZR məhsulunun akrilamid gelində elektroforezi
5. Molekulyar markerin nəticələrinin analizi və nümunələrin genetik müxtəlifliyinə görə qruplaşdırılması
6. Molekulyar markerlərin və keyfiyyət göstəricilərinin nəticələrinin müqayisəli analizi
7. Keyfiyyət əlamətlərini idarə edən genlərin müəyyənləşdirilməsi və seçilmiş genlərə görə nümunələrin skriningi

Təcrübəkeçmənin baş tutduğu təşkilat: Çukurova Universiteti ,
Kənd təsərrüfatı fakultəsi, Tarla bitkiləri kafedrası, Molekulyar
biologiya laboratoriyası.

Təcrübəkeçmənin baş tutduğu təşkilatda təcrübəkeçməyə məsul şəxs:

Professor **Hakan ÖZKAN**

İcmal

Layihənin yerinə yetirilməsi ilə əlaqədar olaraq noyabr ayının 6-da Türkiyənin Adana şəhərinə gəldim və noyabr ayının 7-də təcrübəkeçmənin baş tutacağı təşkilata-Türkiyənin Adana şəhərində yerləşən Çukurova Universitetinin Kənd Təsərrüfatı fakültəsinin Tarla bitkiləri kafedrasının Molekulyar biologiya laboratoriyasında oldum. Prof Hakan ÖZKAN laboratoriyanın bütün işçilərinin iştirakı ilə iclas keçirildi və məni kollektivə təqdim etdi və bizim planlaşdırdığımız işlər haqqında məlumat verdi. Tədqiqatın planı geniş müzakirə olundu və Azərbaycanlıdan apardığım yumşaq buğda nümunələrinin mənşəyi-, toplandığı yer və müxtəlif əlamətləri haqqında geniş informasiya verdim-. İlk olaraq nümunələrdən DNT-nin ekstraksiya olunması üçün- cüçərdilməsi və bu müddət ərzində digər bitki nümunələri üzərində bir sıra analizləri öyrənməyim məqsədə uyğun hesab olundu. DNT-nin ekstraksiyası-, keyfiyyət və kəmiyyətinin yoxlanılması metodikasını öyrəndim-. Müəyyən təcrübə topladıqdan sonra öz materiallarım üzərində planlaşdırılan mərhələlər üzrə təcrübələrin qoyulmasına başladım. DNT ekstraksiyası-, PZR amplifikasiya, İSSR analizlərinin görülməsi nəzərdə tutuldu və bütün bu işlər laboratoriyada hazırlanmış metodikalar əsasında həyata keçirildi. Prof Hakan ÖZKAN şəxsən özü bütün analizlərin yerinə yetirilməsində nəzarət edirdi və öz dəyərli fikirlərini bölüşürdü.

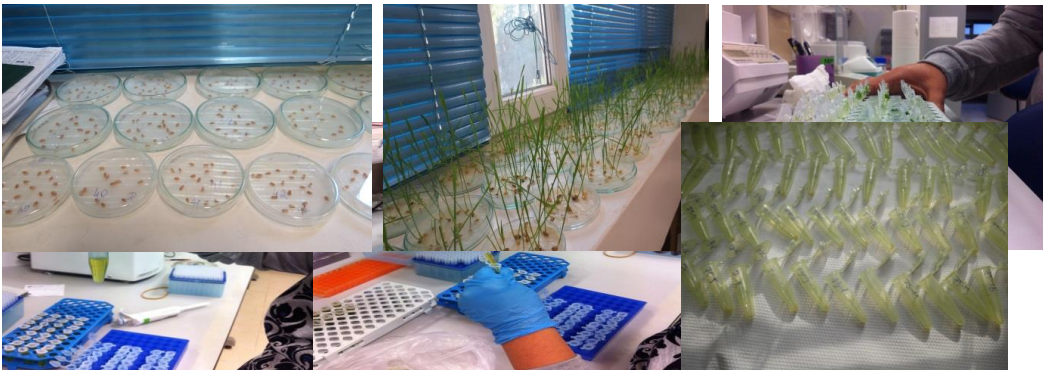
Qeyd etmək istəyirəm ki, qısa müddət ərzində molekulyar biologiya və genetik sahəsində bir çox müasir metodikaları mükəmməl mənimsəyə bildim. Hesab edirəm ki, bu işlər gələcəkdə mənim elmi işimin aparılmasında çox faydalı olacaq. Öyrənilən metodikalar və alınan nəticələr haqqında hesabatda geniş məlumat verilmişdir.

Bu təcrübənin qazanılmasında mənə göstərdiyi dəstəyə görə AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI PREZİDENTİ YANINDA ELMİN İNKİŞAF FONDUNA dərin minnətdarlığımı bildirirəm.

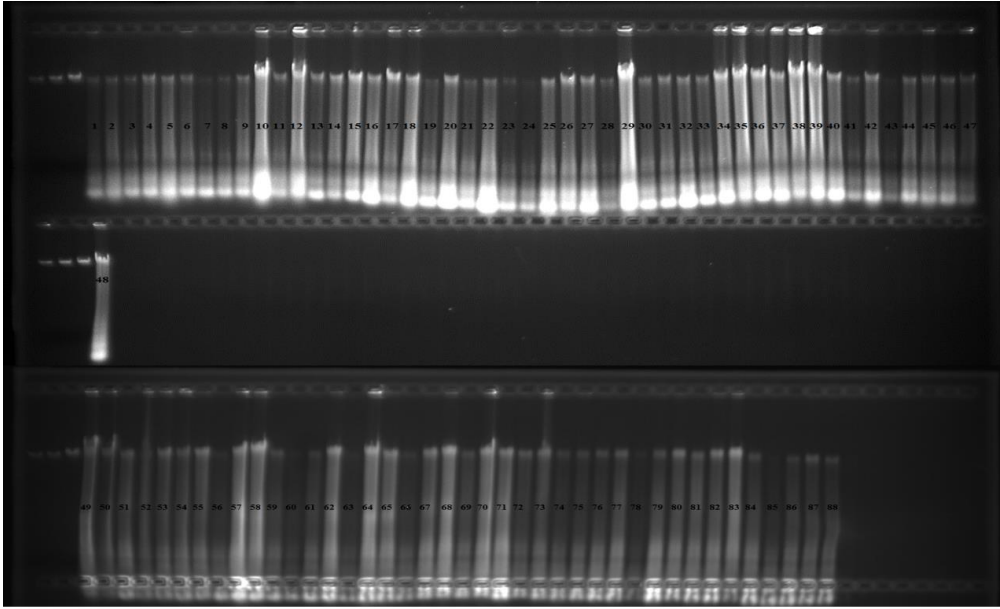
Təcrübi hissə

İlk öncə tədqiqat məqsədiylə apardığım 88 yumşaq buğda (*T.aestivum L*) nümunələrinin hərəsindən 10 toxum seçilərək petri qablarında 1 həftə ərzində cücərdilmişdir.

DNT Ekstraksiyası-cücərdilən toxumlardan 5-6 yarpaq seçilərək Doyle (1987) tərtib etdiyi DNT ekstraksiyası protokoluna uyğun olaraq ekstraksiya edilmişdir. Yarpaqlar 2 ml-lik eppendorf tubiklərə yığılaraq maye azot köməyi ilə Tissue laser aparatında üyüdülmüş və üzərinə 1 ml CTAB (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, b-merkaptolanol, %0.1 Na₂S₂O₅) DNT ekstraksiya buferi əlavə edilmişdir. Daha sonra tubiklər 65 C° 1.5 saat su hamamına qoyulmuşdur. Tubiklər su hamamında ikən hər 15 dəqiqədən bir yavaşca qarışdırılmışdır. Su hamamından çıxarılan tubiklər otaq temperaturunda soyumağa qoyulmuşdur (15-20 dəqiqə). Daha sonra tubiklərə 0.5 ml xloroform-izoamil qarışığı (24:1) əlavə edilmiş və yenə əl ilə yavaşca qarışdırılmışdır. Daha sonra tubiklər 15 dəqiqə 13000 rpm-də sentrifuqa edilmişdir. Sentrifuqa edilən tubiklərin üst hissəsi alınaraq 1.5 ml-lik tübiklərə köçürülmüşdür. Bu tübiklərin üzərinə 300 ml izopropanol (-20 C° saxlanılmış) əlavə edilmişdir. Daha sonra tubiklər əllə yavaşca çalxalanaraq DNT-nin çökdürülməsinə nail olunmuşdur. DNT-lərin yaxşı çökməsini əldə etmək üçün nümunələr 1 saat -70 C° və ya 1 gecə -20 C° temperaturda gözlədilmişdir. Daha sonra tubiklər 1500 rpm-də 2 dəqiqə sentrifuqa edilərək DNT tubikin dibinə çökdürülmüşdür. Daha sonra tubik içərisində olan izopropanol boşaldılmışdır və DNT-lərin üzərinə içərisində 10 mM ammonium asetat olan, 3 ml 76 %-li etanol yəni yuyucu bufer əlavə edilmişdir və 1-2 saat çalxalanmışdır. Yuyulan DNT-lər 1500 rpm-də 2 dəqiqə müddətində sentrifuqa edilərək dibə çökdürülmüşdür və yuyucu bufer boşaldılaraq tubikin dibindəki DNT -nin quruması üçün 1 gün boyunca gözlədilmişdir. Sonra qurudulan DNT-lərin üzərinə 50-60 ml ddH₂O əlavə edilmişdir. Bu yolla əldə edilən ehtiyat DNT konsentrasiyasının müəyyən edilməsinə qədər -20 C° temperaturda saxlanılmışdır.

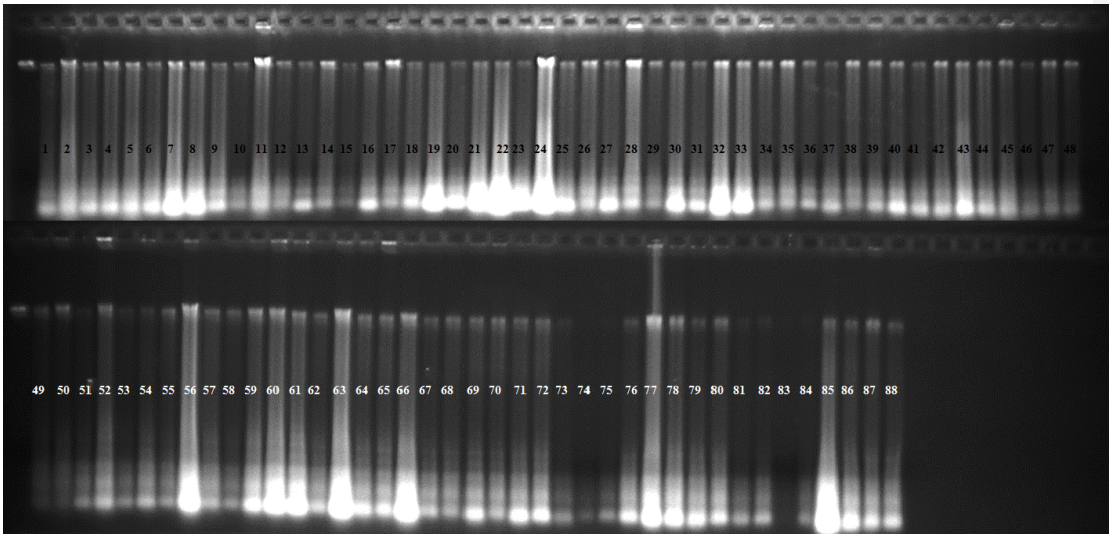


DNT konsentrasiyasının müəyyən edilməsi - PZR əsaslı DNT molekulyar markerləri ilə işləyərkən istifadə edilən DNT-nin konsentrasiyası çox vacibdir. Bu səbəblə hər bir numunədə PZR reaksiyasında istifadə ediləcək DNT miqdarının çox yaxşı müəyyən etmək lazımdır. Bu tədqiqatda yumşaq buğda nümunələrinin ehtiyat DNT-ləri 0.8 %-lik aqaroz gəldə standart λ DNT-lər ilə qarşılaşdırılaraq konsentrasiyası müəyyən edilmişdir. DNT ekstraksiyası bitdikdən sonra əldə edilən ehtiyat DNT-lərin konsentrasiyasını müəyyən etmək üçün, hər bir nümunə üçün ümumi həcmi 20 μ l olan qarışıqlar hazırlanmışdır. Bunun üçün hər bir bitkiyə aid olan ehtiyat DNT miqdarının müəyyən edilməsi bu şəkildə yerinə yetirilmişdir; 50-60 ml saf su içində həll edilən ehtiyat DNT-lər 2000 rpm-də 2 dəqiqə sentrifuga edilmişdir. Hər bir bitkinin DNT-si üçün 0.5 ml-lik PZR tubikləri hazırlanaraq qapaqlarına nümunələrin nömrələri yazılmışdır. Hər bir bitkiyə aid olan ehtiyat DNT-lərdən 2 μ l PZR tubiklərinə əlavə edilmişdir. Sonra hər bir bitki üçün 4 μ l mavi boya (blue dye) və 14 μ l saf su əlavə edilərək homogen qarışıq əldə edilmişdir. Konsentrasiyası əvvəlcədən müəyyən olan standart λ DNT-lər (25ng-50ng-100ng-200ng) üçün 2 μ l λ DNT, 4 μ l mavi boya (blue dye) və 14 μ l saf su qarışıq hazırlanmışdır. Ümumi həcmi 20 μ l olan bu qarışıq 2000 rpm-də 2 dəqiqə sentrifuga edildikdən sonra 10 μ l'si %0,8'lik aqaroz gel üzərindəki quyucuqlara yüklənmişdir. Gel üzərindəki ilk quyucuqlara 10 μ l λ DNT qarışımı və digər quyucuqlara 10 μ l bitkilərə aid nümunələrin DNT-lər yüklənmişdir. Sonra yüklü gellər elektroforez tankındakı 0.5 x TBE buferi içərisinə yerləşdirilir və 120 voltda 1 saat elektrik mühitində DNT fraqmentlərinin ayrılmasına nail olunmuşdur. Elektroforez müddəti bitdikdən sonra suyu süzülərək təmiz su içərisində 15 dəqiqə yuyulur. Daha sonra yuyulan gellər UV transilluminator cihazında şəkli çəkilir. UV transilluminator vasitəsi ilə əldə edilən görüntülərdəki DNT fraqmentlərinin böyüklüyü, konsentrasiyası məlum λ DNT-lər (25ng-50ng-100ng-200ng) ilə müqayisə edilərək DNT-nin miqdarı müəyyən olunmuşdur .



PZR üçün 10 ng / μ l DNT konsentrasiyasının müəyyən edilməsi .

Ehtiyat DNT konsentrasiyaları əsas götürülərək, ISSR üsülünə aid PZR analizləri üçün hər bir DNT nümunəsinin konsentrasiyası 10 ng / μ l müəyyən olunmuşdur. DNT-nin 10 ng / μ l müəyyən olduğunu yoxlamaq üçün ümumi həcmi 20 μ l olan DNT və 4 μ l yükləmə boyası olan (blue dye) hər bir bitkiyə məxsus qarışıq hazırlanmışdır. Daha sonra hazırlanan qarışım homogenizə edildikdən sonra aqaroz gəldəki yuvalara yüklənmişdir. İlk yuvacığa standart kimi 10 ng / μ l λ DNT yüklənmişdir. Daha sonra yüklü gəllər elektroforez tankındakı 0.5 x TBE içərisinə yerləşdirilmiş və 90 volda 45 dəqiqə müddət ilə elektroforez edilmişdir. Elektroforez müddəti bitdikdən sonra yuxarıdakı açıqlandığı kimi gel boyanmış və gel görüntüsü alınmışdır.



Bitki genetik ehtiyatlarının xarakterizə olunmasında morfoloji markerlər, biokimyəvi markerlər və DNT markerlərindən sıx istifadə olunur. Xüsusən, morfoloji markerlər ətraf mühit təsiri altında qala bildiklərindən xarakterizə olunma işlərində istifadəsi məhduddur. Eyni zamanda biokimyəvi markerlərdə də, polimorfizm səviyyəsinin aşağı olması bu markerlərin istifadəsində məhdudiyyətlər yaradır. Bir çox bitki növləri arasında genetik variasiyanı ortaya çıxarmaqda hansı molekulyar DNT texnikasının ən uyğun olduğunu müəyyən etmək məqsədilə RFLP, AFLP, RAPD, SSR, İSSR, DNT marker üsulları müqayisə edilmiş polimorfizm baxımından SSR və AFLP üsulları, mailiyə baxımından RAPD və İSSR, təkrarlanma qabiliyyətinə görə isə RFLP, SSR, İSSR və AFLP DNT üsullarının məqsədə uyğun olunduğu müəyyən edilmişdir.

İSSR analizləri - ISSR analizləri Zietkiewicz və əməkdaşlarının (1994) tərtib etdiyi protokola uyğun aparılmışdır. Bu üsula görə işlədilən kimyəvi maddələr Cədvəl 1 və PZR protokolu Cədvəl 2 də göstərilmişdir.

Cədvəl 1. Yumşaq buğda bitkisinde İSSR-PZR reaksiyasında istifadə edilən kimyəvi maddələr və onların konsentrasiyası.

| PZR-də istifadə olunan kimyəvi maddələr | konsentrasiyaları |
|---|--------------------------|
| Tris-HCl pH=8.8 | 75 mM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 mM |
| Tween 20 | 0.1 % |
| MgCl ₂ | 2 mM |
| dATP | 100 mM |
| dCTP | 100 mM |
| dGTP | 100 mM |
| dTTP | 100 mM |
| Praymer | 0.2 mM |
| Taq DNA Polimeraz | 1.0 unite |
| DNT | 10-20 ng |

Cədvəl 2. Yumşaq buğda genotiplərində istifadə olunan İSSR-PZR protokolu.

| Program No | PZR mərhələləri | Temperatur (C°) | Müddət (dəqiqə) | Tsikllərin sayı |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1.1 | İlkin denaturasiya | 94 | 2 | 1 |
| 2.1 | Denaturasiya | 94 | 1 | 35 |
| 2.2 | Praymerin DNT-yə bağlanma fazası | 44-56 | 1 | |
| 2.3 | Elonqasiya fazası | Praymerə görə dəyişir | 2 | |
| 3 | Son elonqasiya fazası | 72 | 7 | 1 |

Yumşaq buğda genotiplərində DNT analizləri məqsədi ilə “University of British Columbia (UBC)” istehsal olunmuş İSSR praymerlərindən istifadə olunmuşdur. Bu praymerlərin nukleotid ardıcılıqları fərqli olduğu kimi bağlanma (annealing) temperaturları da fərqlidir. İlkin olaraq 88 genotipdə istifadəsi nəzərdə tutulan 23 praymer 8 genotipdə yoxlanmışdır və onlardan ən çox polimorfluq göstərən 2 praymer seçilərək 88 genotipdə yoxlanmışdır.

Cədvəl 3. İSSR-PZR reaksiyasında istifadə olunan praymerlər, nukleotid ardıcılıqları və bağlanma temperaturları.

| Sıra № | Praymer | Nukleotid ardıcılığı | Bağlanma temperaturu |
|---------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | UBC 842 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | 54 |
| 2 | UBC 844 | CTC TCT CTC TCT CTC TRC | 54 |
| 3 | UBC 857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYG | 54 |
| 4 | UBC 859 | TGT GTG TGT GTG TGT GRC | 54 |

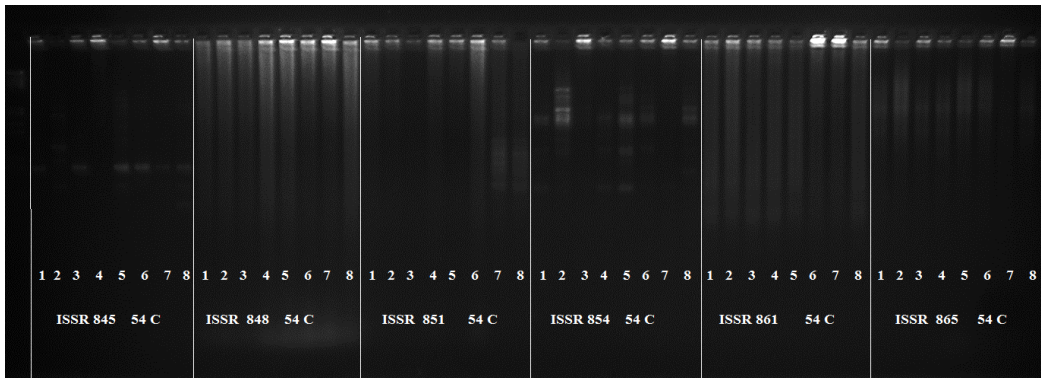
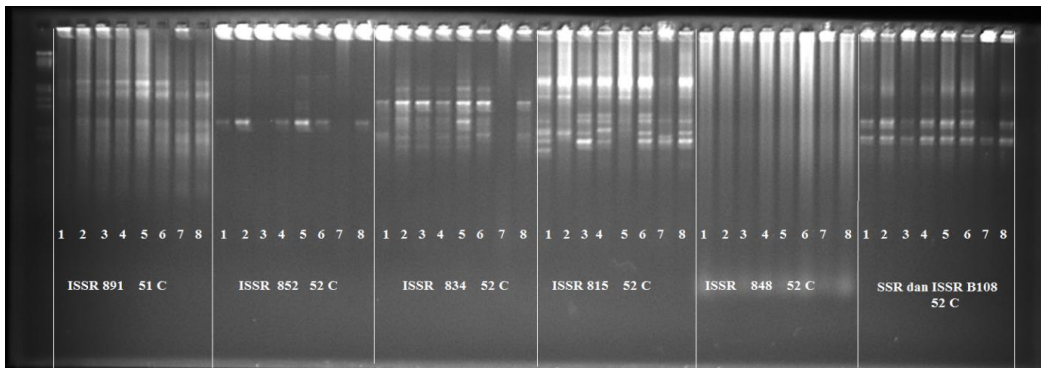
İlkin olaraq 8 genotipdə 23 praymer yoxlandı və 81 ampikon sintez olunmuşdur və onlardan 51 polimorf ampikon müəyyən edilmişdir. Ən çox ampikon sayı UBC 834 və UBC 815 praymeri ilə sintez edilmişdir.

CƏDVƏL 4 . 8 Yumşaq buğda genotipində 23 İSSR praymeri ilə əldə edilmiş amplikon və polimorf amplikonların sayı

| Sıra № | Praymer | Nukleotid ardıcılığı | Amplikonların sayı ədəd | Polimorf amplikonların sayı | Polimorfiz % |
|--------|---------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1 | UBC 891 | HVH TGT GTG TGT GTG TG | 4 | 1 | 25 |
| 2 | UBC 874 | CCC TCC CTC CCT CCCT | 0 | 0 | 0 |
| 3 | UBC 884 | HBH AGA GAG AGA GAG AG | 2 | 0 | 0 |
| 4 | UBC 885 | BHB GAG AGA GAG AGA GA | 4 | 3 | 75 |
| 5 | UBC 887 | DVD TCT CTC TCT CTC TC | 2 | 1 | 50 |
| 6 | UBC 888 | BDB CAC ACA CAC ACA CA | 4 | 3 | 75 |
| 7 | UBC 890 | VHV GTG TGT GTG TGT GT | 4 | 3 | 75 |
| 8 | UBC 852 | TCT CTC TCT CTC TCT CRA | 2 | 1 | 50 |
| 9 | UBC 834 | AGA GAG AGA GAG AGA GYT | 7 | 5 | 71 |
| 10 | UBC 815 | CTC TCT CTC TCT CTC TG | 7 | 5 | 71 |
| 11 | UBC 848 | CAC ACA CAC ACA CAC ARG | 0 | 0 | 0 |
| 12 | UBC 845 | CTC TCT CTC TCT CTC TRG | 4 | 3 | 75 |
| 13 | UBC 848 | CAC ACA CAC ACA CAC ARG | 5 | 2 | 40 |
| 14 | UBC 851 | GTG TGT GTG TGT GTG TYG | 0 | 0 | 0 |
| 15 | UBC 854 | TCT CTC TCT CTC TCT CRG | 6 | 5 | 83 |
| 16 | UBC 861 | ACC ACC ACC ACC ACC ACC | 0 | 0 | 0 |
| 17 | UBC 865 | CCG CCG CCG CCG CCG CCG | 0 | 0 | 0 |
| 18 | UBC 835 | AGA GAG AGA GAG AGA | 6 | 5 | 83 |

| | | GYC | | | |
|----|---------|----------------------------|---|---|----|
| 19 | UBC 841 | GAG AGA GAG AGA GAG AYC | 4 | 3 | 75 |
| 20 | UBC 842 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | 4 | 3 | 75 |
| 21 | UBC 844 | CTC TCT CTC TCT CTC TRC | 4 | 3 | 75 |
| 22 | UBC 857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYG | 5 | 3 | 60 |
| 23 | UBC 859 | TGT GTG TGT GTG TGT GRC | 7 | 5 | 71 |

8 yumşaq buğda genotipində bəzi praymerlərin amplifikasiyası nəticəsində alınmış ampikonların 1.8%-li aqaroz məhlulunda elektroforez analizi. (marker-EcoI-HintIII)



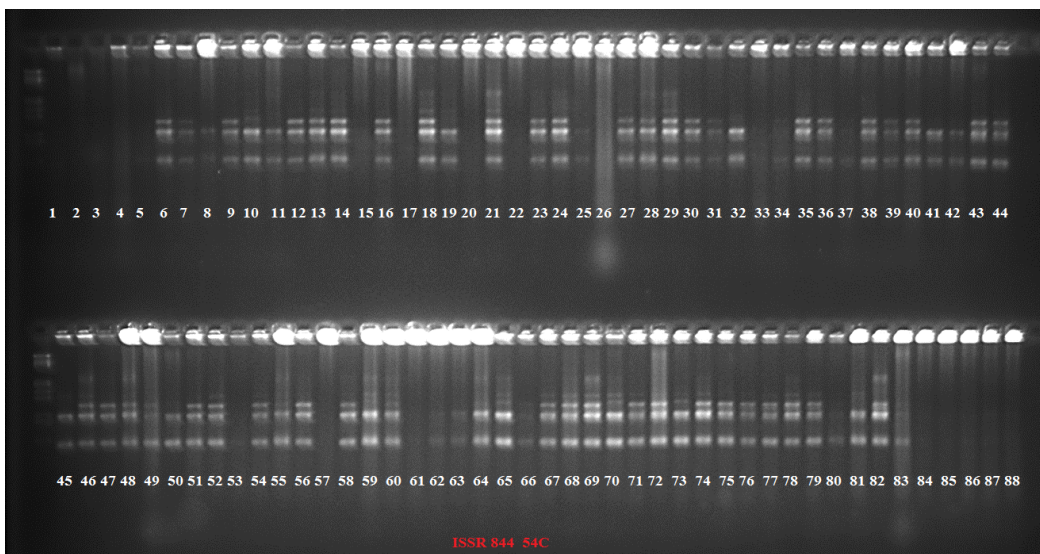
23 praymerdən ən polimorf olan 2 UBC844 və UBC857 praymerləri seçilərək 88 nümunədə amplifikasiya edilmişdir və Genetik müxtəliflik indeksi hesablanmışdır. PZR metodu ilə sintez olunmuş lokusların uzunluğu və hər bir

lokusa görə allellərin sayı müəyyən edildikdən sonra binar nömrələmədən istifadə olunaraq, hər hansı bir allelin nümunədə olması "1", olmaması "0" kimi qeyd olunmuşdur. Hər lokusdakı allellərin sayı (i), allellərin rastgəlmə tezliyi (Pi) hesablanmışdır. Polimorfizm polimorf allellərin sayını umumi allellərin sayına bölməklə hesablanmışdır. Genetik müxtəliflik əmsalı (GM) Weyr düsturu əsasında hesablanmışdır

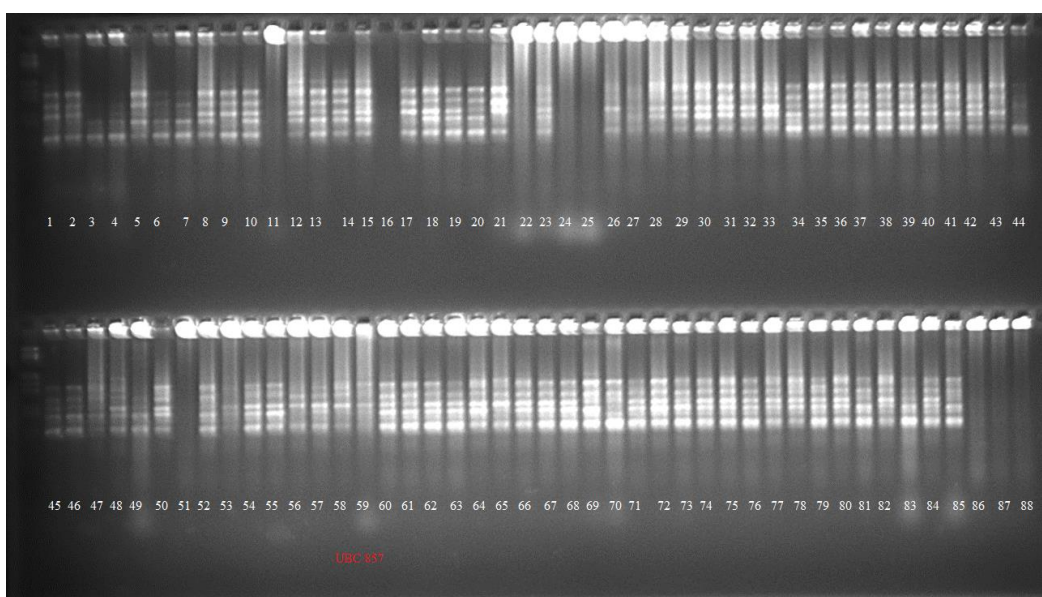
$$GM = 1 - \sum_i p_i^2$$

| Praymerin adı | Nukleotid ardıcılığı | Amplikonların sayı | Polimorf amplikonların sayı | Polimorfizm % | GMİ |
|---------------|--|--------------------|-----------------------------|---------------|------|
| UBC844 | CTC TCT CTC TCT CTC TRC | 4 | 3 | 75 | 0.67 |
| UBC857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYG | 5 | 3 | 60 | 0.56 |
| UBC874 | | | | | |

88 yumşaq buğda genotipində UBC 844 praymerində amplifikasiyası nəticəsində alınmış amplikonların 1.8%-li aqaroz məhlulunda elektroforez analizi. (marker-EcoI-HintIII)

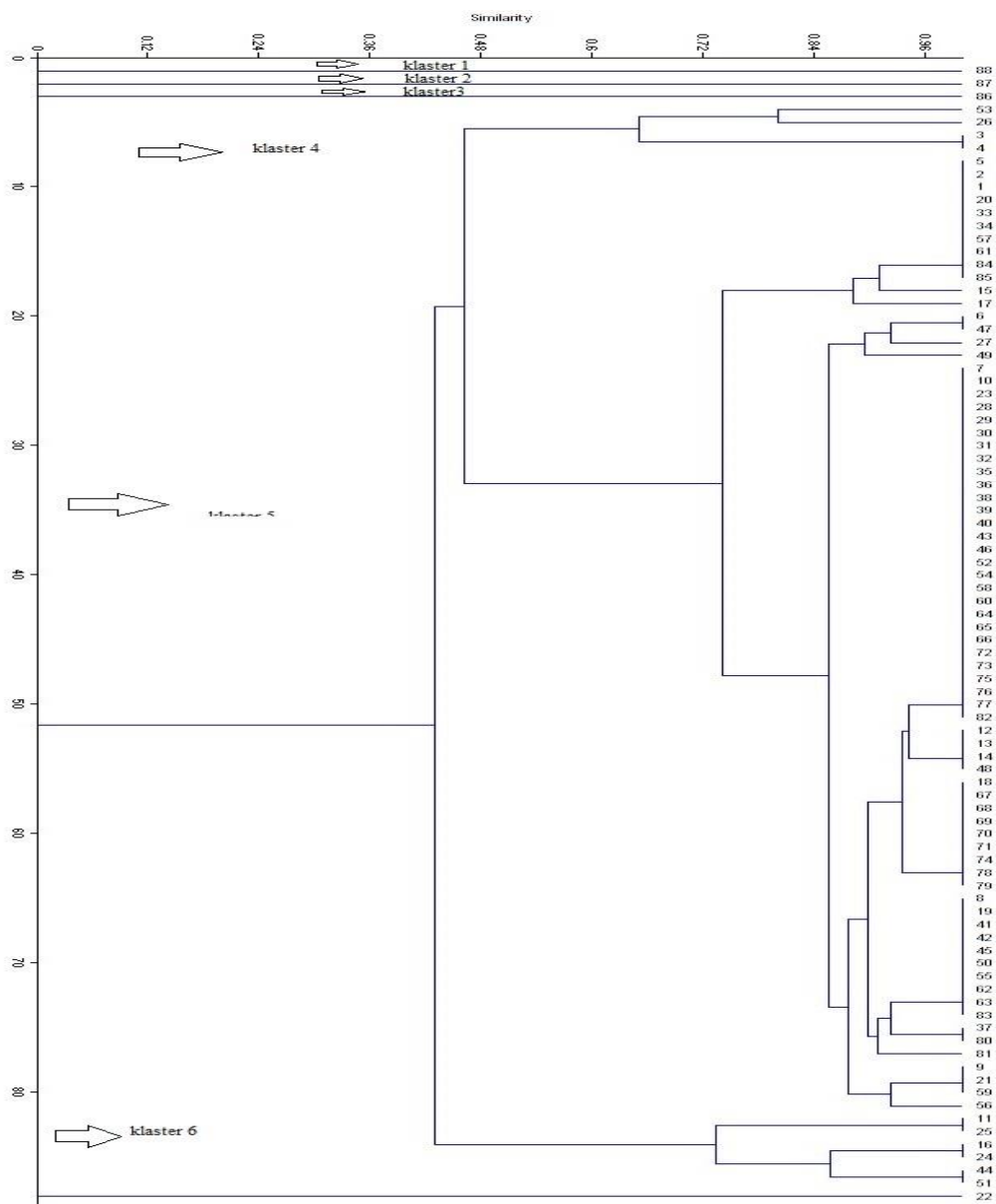


88 yumşaq buğda genotipində UBC 857 praymerində amplifikasiyası nəticəsində alınmış ampikonların 1.8%-li aqaroz məhlulunda elektroforez analizi. (marker-EcoI-HintIII)



İSSR praymerlərlə klaster analizi NTSYS kompüter proqramı vasitəsilə həyata keçirilmişdir. Klaster analizi çoxölçülü statistik metod kimi genotiplərin və ya cinslərin genetik oxşarlığının təyini və qruplaşdırılmasında tətbiq olunur. Bu metod əsasında genetik cəhətdən yaxın olan nümunələr bir qrup daxilində yerləşdirilmişdir. Klaster analizi eyni zamanda həqiqi qrupların tanınmasında və gözlənilməyən qrupların yaradılmasında əlverişli olub rəqəmlərin həcmnin azaldılmasına kömək edir. Qruplaşdırmanın nəticələri dendogram şəklində təsvir edilmişdir. Dendogramdan görüldüyü kimi nümunələr 6 klasterdə qruplaşmışdır. 1-ci ,2-ci və 3-cü klasterə hərəsində 1 genotip ,4 –cü klasterdə 32 genotip , 5- ci klasterdə 27 genotip , 6 –cı klasterdə isə 23 genotip qruplaşmışdır. Jaccard düsturu əsasında hesablanmış genetik oxşarlıq indeksi

0.67-056 arasında dəyişmişdir. Genetik cəhətdən yaxın olan kataloq nömrəsi YBRFS 013k-156 , YBRF 013k-120 ,YBRFS 013k-38 ,YBRFS 013 olan Abşeron Tədqiqat baza stansiyasından Azərbaycan mənşəli buğdalar eyni klasterde qruplaşmışdır. Naxçıvandan toplanan kataloq nömrəsi 7319 , Şəkidən toplanan kataloq nömrəsi 9530 olan Goranboydan toplanan kataloq nömrəsi 7255 olan yumşaq buğda genotipləri isə bir klasterdə toplanmışdır.



2 ISSR markeri əsasında yumşaq buğda genotiplərinin genetik qohumluğunu əks etdirən dendrogram.

-

Nəşr olunmuş əsərlər; Ümumilikdə 4 tezis nəşr olunmuşdur .1 xarici və 3 yerli məqalə nəşrə göndərilmişdir.

Formatted: Azeri (Latin)

