



**AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASININ PREZİDENTİ YANINDA
ELMİN İNKİŞAFI FONDU**

**Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında
Elmin İnkişafı Fondunun 2017-ci ildə elan edilmiş
8-ci “Mobillik qrantı” müsabiqəsinin
(EIF-Mob-8-2017-4(30))
qalibi olmuş layihə üzrə**

EZAMİYYƏ HESABATI

Layihənin nömrəsi: **EIF-Mob-8-2017-4(30)-17/14/3-M-11**

Layihənin adı: **Azərbaycan mənşəli ərik genotiplərinin şarka xəstəliyinə davamlılığının molekulyar-genetik tədqiqi**

Müqavilənin imzalanma tarixi: **11 oktyabr 2017-ci il**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Rəkidə Əminə Mərfət qızı**

Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmənin) keçirilmə müddəti: **1 ay**

Layihənin başlama və bitmə tarixi: **23 oktyabr 2017-ci il-21 noyabr 2017-ci il**

Qrantın məbləği: **5000 manat**

1 • Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçməni) həyata keçirildiyi ölkə və şəhər	Türkiyə, Kayseri
2 • Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçməni) həyata keçirildiyi təşkilatın və ya onun struktur bölməsinin tam rəsmi adı	Erciyes Universiteti, Genom və Kök Hüceyrə Tədqiqat Mərkəzi, Aqrar Biotexnologiya Şöbəsi

3	Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçməni) icra müddəti (dəqiq gediş-gəliş vaxtı dəqiq göstərməli)	Gediş - 22 oktyabr, 2017-ci il Gəliş - 21 noyabr, 2017-ci il
4	Elmi tədbirdə edilmiş məruzənin adı və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçməni mövzusunun adı	Azərbaycan mənşəli ərik genotiplərinin şarka xəstəliyinə davamlılığının molekulyar genetik tədqiqi
5	Ezamiyyət üzrə ətraflı hesabat	<p>Layihə çərçivəsində Türkiyənin Erciyes universitetində Azərbaycanın müxtəlif bölgələrindən toplanmış ərik bitkisi nümunələrinin genetik müxtəlifliyi və şarka xəstəliyinə davamlılığının öyrənilməsi istiqamətində yeni metodikalar öyrənilmiş və tədqiqat materialı kimi götürülmüş ərik genotiplərinin şarka xəstəliyinə davamlılığı süni fonda qiymətləndirilmiş, mikrosatellit markeri ilə genotipləşdirilməsi həyata keçirilmiş və şarka xəstəliyi ilə ilişikli markerlərlə skriningi aparılmışdır. İlk öncə, aşağıdakı işlər həyata keçirilməsi üçün elmi rəhbər- Dr. Kahraman Gurcanla müzakirələr aparılmışdır.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tədqiqat materialı kimi götürülmüş qələmlərin istixana şəraitində əkilməsi 2. Süni fonda nümunələrin qiymətləndirilməsi 3. Nümunələrdən DNT-nin ekstraksiyası və aqaroz gelində keyfiyyəti yoxlanılması 4. DNT-nin miqdarı Nanodrop vasitəsilə yoxlanılması və durulaşdırılması 5. Seçilmiş SSR praymerləri ilə PZR reaksiyası qoyulması və PZRMəhsulu akrilamid gelində elektroforezi 6. SSR markerinin nəticələrinin analizi və nümunələr genetikmüxtəlifliyinin təyini 7. Şarka xəstəliyiniidarə edən genlərin praymerlərinin seçilməsi və skriningi 8. Nəticələrin müqayisəli analizinin kəmiyyət və keyfiyyətinin analizi ilə başladı və qısa müddətdə DNT-lər təcrübi işlər üçün hazır vəziyyətə gətirildi.

Təcrübi hissə

İlk öncə tədqiqat məqsədilə apardığım 88 yumşaq buğda (*T.aestivum L*) nümunələrinin hərəsindən 10 toxum seçilərək petri qablarında 1 həftə ərzində cücərdilmiş və DNT-nin ekstraksiyasına başlanılmışdır..

DNT-nin ekstraksiyası: Toplanmış yarpaqlardan nüvə DNT-sinin ayrılması Murray & Thomson (1980) və Doyle & Doyle –nin (1987) metodikası əsasında aparılmışdır. İlk öncə əriyin yarpaqları tubikə yığılır və maye azotdan istifadə olunaraq toz halına salınır. Tubikdə olan 0.3q bitki tozu üzərinə 600 µl, əvvəlcədən 65⁰ C-dək qızdırılaraq 2xCTAB (2% CTAB, 0.1 M Tris HCl (pH=8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA) məhlulu və 1% β-merkaptoetanol (pH=8.0) əlavə olunur və vorteksdə qarışdırılır. Alınmış suspenziya hər 10-15 dəqiqədən bir silkələməklə 45 dəqiqə müddətinə su hamamına (65⁰ C) yerləşdirilir. Suspenziya üzərinə 700 µl xloroform: izoamil spirti (24:1) (XİS) əlavə olunub ehtiyatla qarışdırılır. Qarışıq 15 dəqiqə müddətində otaq temperaturunda 13000 rpm tezlikdə sentrifuqa olunur və supernatant təzə 2 ml-lik tubikə keçirilir.Yenidən XİS əlavə olunaraq mərhələ təkrar olunur. 500 µl soyuq izopropanol əlavə olunduqdan sonra, tubik ehtiyatla qarışdırılır, sonra 15 dəqiqə müddətində 13000 rpm tezlikdə sentrifuqa olunur. Supernatnat yeni tubikə keçirildikdən sonra 2 dəfə üzərinə soyuq yuyucu məhlul (76% etanol və 10mM ammonium asetat) əlavə olunmaqla yuyulur. Qurutmaq üçün 20 dəqiqə otaq temperaturunda saxlanılır və üzərinə 100 µl su və yaxud TE məhlulu əlavə edilərək həll edilir. DNT qatılığı və təmizliyi nanodrop vasitəsilə müəyyən edilir (Thermo, NANO DROP, 2000).

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 ərik nümunələrinin ehtiyat DNT-ləri 2 %-lik aqaroz gəldə müəyyən olunmuş primerlər ilə qarşılaşdırılaraq konsentrasiyası müəyyən edilmişdir. DNT ekstraksiyasının nəticəsində əldə edilən DNT-lərin konsentrasiyasını müəyyən etmək üçün, hər bir nümunə üçün ümumi həcmi 20 µl olan qarışıqlar hazırlanmışdır. Bunun üçün hər bir bitkiyə aid olan ehtiyat DNT miqdarının müəyyən edilməsi bu şəkildə yerinə yetirilmişdir; 100 µl saf su içində həll edilən ehtiyat DNT-lər 2000 rpm-də 2 dəqiqə sentrifuqa edilmişdir. Hər bir bitkinin DNT-si üçün 2 µl-lik PZR tubikləri hazırlanaraq

qapaqlarına nümunələrin nömrələri yazılmışdır. Hər bir bitkiyə aid olan ehtiyat DNT-lərdən 3 µl PZR tubiklərinə əlavə edilmişdir. Sonra hər bir bitki üçün 0,20 µl boya və 12,15 µl saf su əlavə edilərək homogen qarışıq əldə edilmişdir. Konsentrasiyası əvvəlcədən müəyyən olunan primerlər (25ng-50ng-100ng-200ng) üçün 0,35 µl primer, 0,20 µl boya və 12,15 µl saf su qarışıq hazırlanmışdır. Ümumi həcmi 20 µl olan bu qarışıq 2000 rpm-də 2 dəqiqə sentrifuga edildikdən sonra 10 µl'si 2%'lik aqaroz gel üzərindəki quyucuqlara yüklənmişdir. Gel üzərindəki ilk quyucuqlara 8 µl lambda DNT qarışımı və digər quyucuqlara 10 µl bitkilərə aid nümunələrin DNT-lər yüklənmişdir. Sonra yüklü gellər elektroforez tankındakı 1 x TBE buferi içərisinə yerləşdirilir və 90 voltda 3 saat elektrik mühitində DNT fraqmentlərinin ayrılmasına nail olunmuşdur. Daha sonra yuyulan gellər Bio-Rad Gel Documentation cihazında şəkli çəkilir. Bio-Rad Gel Documentation vasitəsi ilə əldə edilən görüntülərdəki DNT fraqmentlərinin böyüklüyü, konsentrasiyası məlum lambda DNT-lər (25ng-50ng-100ng-200ng) ilə müqayisə edilərək DNT-nin miqdarı müəyyən olunmuşdur .

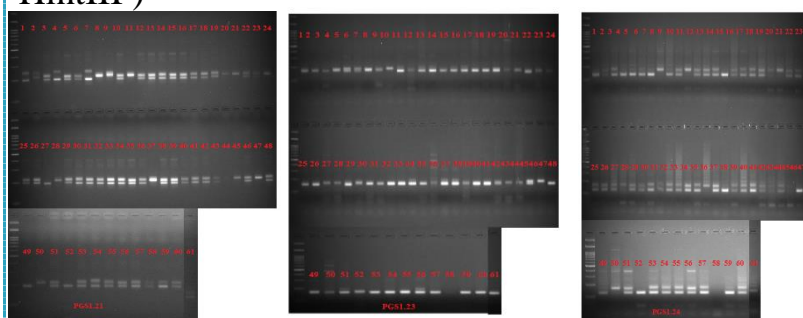
Ehtiyat DNT konsentrasiyaları əsas götürülərək, SSR üsülünə aid PZR analizləri üçün hər bir DNT nümunəsinin konsentrasiyası 10 ng /µl müəyyən olunmuşdur. DNT-nin 10 ng /µl müəyyən olduğunu yoxlamaq üçün ümumi həcmi 20 µl olan DNT və 0,20 µl yükləmə boyası olan hər bir bitkiyə məxsus qarışıq hazırlanmışdır. Daha sonra hazırlanan qarışım homogenizə edildikdən sonra aqaroz gəldəki yuvalara yüklənmişdir. İlk yuvacığa standart kimi 10 ng /µl λDNT yüklənmişdir. Daha sonra yüklü gellər elektroforez tankındakı 1 x TBE içərisinə yerləşdirilmiş və 90 voltda 3 saat 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 məhdudiyətlər 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, mailiyyə baxımından RAPD və İSSR, təkrarlanma qabiliyyətinə görə isə RFLP, SSR, İSSR və AFLP DNT üsullarının məqsədə uyğun olduğu müəyyən edilmişdir.

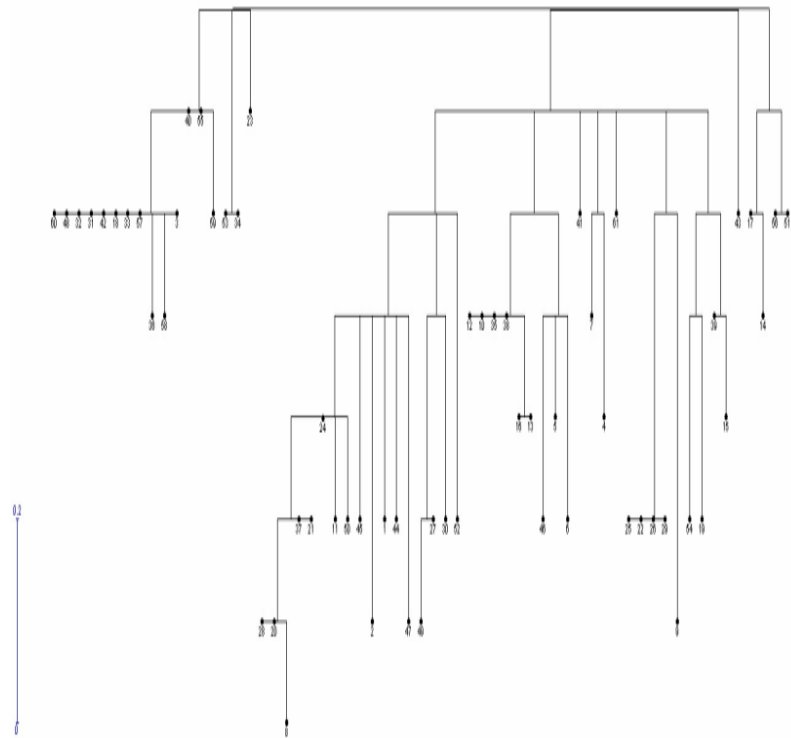
Cədvəl 1. Ərik genotiplərində istifadə olunan SSR-PZR protokolu.

Proqram No	PZR mərhələləri	Temperatur (C°)	Müddət (dəqiqə)	Tsikllərin sayı
1.1	İlkin denaturasiya	94	4	1
2.1	Denaturasiya	94	1	42
2.2	Praymerin DNT-yə bağlanma fazası	50-60	1	
2.3				
3	Son elonqasiya fazası	72	10	1

Ərik genotiplərində DNT analizlərində SSR praymerlərindən istifadə olunmuşdur. Bu praymerlərin nukleotid ardıcılıqları fərqli olduğu kimi bağlanma (annealing) temperaturları da fərqlidir. 61 ərik genotiplərində şarka xəstəliyinə davamlılığı və genotiplərin xarakteristikasını yoxlamaq üçün 17 praymerdən istifadə edilmişdir. Bunlardan 3 praymerdə şarka xəstəliyinə davamlılıq allelləri aşkar edilmişdir. Bunlar PGS1.21, PGS1.23, PGS1.24 praymerləridir. 61 ərik genotipində PGS1.21, PGS1.23, PGS1.24 praymerlərinin amplifikasiyası nəticəsində alınmış amplikonların 2 %-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.



Layihənin yerinə yetirilməsindən (elmi tədbirdə və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmədə iştirakdan) əldə

6

Tədqiqat işi nəticəsində aşağıdakı mühüm nəticələr əldə edilmişdir.

1. İlk dəfə olaraq, Azərbaycan mənşəli ərik genotiplərinin biomüxtəlifliyi 17 SSR markerinə görə həyata keçirilmiş, genetik cəhətdən oxşar və fərqli genotiplər müəyyənləşdirilmiş və populyasiya daxilində yüksək polimorfizmin olması müəyyən edilmişdir.
2. İlk dəfə olaraq, ərik nümunələrinin SSR profillərinə

	<p>edilən nəticələr, onların yenilik dərəcəsi, elmi və praktiki əhəmiyyəti</p>	<p>görə genetik identifikasiyası aparılmış, öyrənilən nümunələrin genetik strukturu müəyyənləşdirilmiş və pasportlaşdırılmışdır.</p> <p>3. İlk dəfə olaraq, ərik nümunələrinin şarka xəstəliyinə davamlılıq genləri əsasında skrininqi həyata keçirilmiş, nümunələrin şarka xəstəliyinə reaksiyası müəyyənləşdirilmiş və fərqi genotiplərdən ibarət əlamət kolleksiyası yaradılmışdır.</p> <p>4. İlk dəfə olaraq, Azərbaycan mənşəli ərik genotipləri ilə Türkiyə mənşəli nümunələrinin genetik müxtəlifliyi və şarka xəstəliyinə davamlılığı müqayisəli analiz edilmiş və hər iki ölkədə mövcud olan ərik kolleksiyalarının yüksək genetik müxtəlifliyə sahib olduğu sübut edilmişdir.</p>
<p>7</p>	<p>Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı istifadə olunmuş üsul və yanaşmalar</p>	<p>Layihə çərçivəsində bitkilərin genetik müxtəlifliyinin öyrənilməsində ən mükəmməl texnologiya olan-molekulyar marker texnologiyası öyrənilmiş və bitkilərin genetik müxtəlifliyinin qiymətləndirilməsi zamanı tələb olunan biostatistik üsullar mənimsənilmişdir. İlk dəfə olaraq, ərik bitkisinin şarka xəstəliyinə davamlılığında rol oynayan praymerlərin dizaynı və həmin praymerlərlə skrininqin aparılması öyrənilmişdir.</p>
<p>8</p>	<p>Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı əldə olunmuş nəticələrin gözlənilən tətbiq sahələri (konkret olaraq qeyd etməli)</p>	<p><u>Əldə olunan nəticələrdən, ilk öncə məqalənin yazılmasında istifadə olunacaqdır. Hazırlanacaq məqalə vasitəsilə dünya elmi ictimaiyyətinə Azərbaycanda ərik genofondu və onun müxtəlifliyi haqqında genetik analizlərlə sübut olunmuş informasiyalar çətdiriləcəkdir. Bundan başqa, əldə olunmuş nəticələrdən istifadə etməklə ərik genofondunun əlamət və özək kolleksiyası yaradılacaqdır ki, bunlardan da gələcəkdə yeni sortların alınmasında istifadə olunacaqdır. Şarka xəstəliyi üzrə əldə olunmuş nəticələr həm Azərbaycan və həm də digər ölkələr üçün olduqca böyük elmi və praktik əhəmiyyətə malikdir. Belə ki, davamlılıq genləri aşkar edilmiş nümunələrdən gələcəkdə davamlılıq istiqamətində seleksiya işlərində istifadə ediləcək, o cümlədən onlardan genetik donor kimi digər ölkələrdə də davamlı sortların yaradılmasında istifadə olunacaqdır.</u></p>

Layihə rəhbərinin imzası _____

Tarix _____

Elmin İnkişafı Fondunun əməkdaşının imzası _____

Tarix _____