



**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)-17/15/3-M-10

Layihənin adı: **Azərbaycanda “Candidatus Phytoplasma solani” fitoplazmasının genetik müxtəlifliyi və onun həşərat vektorlarının tədqiqi**

Müqavilənin imzalanma tarixi: **02 oktyabr 2017-ci il**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Balakişiyeva Gülnarə Şamməd qızı**

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

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

Qrantın məbləği: **8000 manat**

1.	Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmənin) həyata keçirildiyi ölkə və şəhər	Fransa, Bordo
2.	Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmənin) həyata keçirildiyi təşkilatın və ya onun struktur bölməsinin tam rəsmi adı	Fransa Milli Kənd Təsərrüfatı Elmi-Tədqiqat İnstitutunun (INRA) Bordo Mərkəzinin Meyvələrin Biologiyası və Patologiyası şöbəsi
3.	Layihənin (elmi tədbirin və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmənin) icra müddəti (dəqiq gediş-gəliş vaxtı dəqiq göstərilməli)	22 Oktyabr- 26 Noyabr 2017-ci il
4.	Elmi tədbirdə edilmiş məruzənin adı və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmənin mövzusunun adı	Azərbaycanda “ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ” fitoplazmasının genetik müxtəlifliyi və onun həşərat vektorlarının tədqiqi
5.	Ezamiyyət üzrə ətraflı hesabat	Azərbaycanda aşkar olunmuş “ <i>Candidatus</i>

Phytoplasma solani” fitoplazma izolyatlarının DNT ekstraktları və xəstə bitkilərin üzərindən toplanaraq 96%-li spirtde saxlanılmış həşərat vektorları Fransanın Bordo şəhərinə aparılmış və ordada müasir molekulyar metodlarla tədqiq edilmişdir.

1. “*Candidatus* Phytoplasma solani” fitoplazmasının genetik müxtəlifliyini Multilokus sekvens analiz (MLSA) vasitəsilə tədqiq etmək üçün yeni qeyri ribosomal genin nukleotid ardıcılığı əldə olunaraq xarakterizə edilmişdir. Bu məqsədlə ‘*Ca. P. solani*’ (StolP) fitoplazmasının SSH vasitəsilə əldə edilmiş SDR00C09 gen fraqmenti seçilmişdir. Seçilmiş genin ‘*Ca. P. asteris*’ fitoplazmasının 2-Hydroxycarboxylate transporterini kodlaşdıran *mleP1* geninin nukleotid ardıcılığı ilə zəif homolojiya göstərdiyi təyin edilmişdir. Belə ki, Blast N proqramı ilə axtarış zamanı, SDR00C09 gen fraqmenti ‘*Ca. P. asteris*’ fitoplazmasının 2-Hydroxycarboxylate transporterini kodlaşdıran *mleP1* geni ilə yalnız 44% identiklik göstərmişdir. Genin nukleotid ardıcılığını tamamlamaq üçün SDR00C09 fraqmentinin sonluqlarından qonşu DNT fraqmentlərinə istiqamətlənmiş dörd praymer (GWMleP1D, GWMleP1DN, GWMleP1G and GWMleP1GN) dizayn edilmişdir. Dizayn edilmiş praymerlərlə Genome-Walker universal kit (BD Biosciences Clontech) vasitəsilə “xromosom üzərində gəzinti” metodu ilə amplifikasiya həyata keçirilmişdir. “Sağa doğru addımlama” GWMleP1D və AP1 praymerləri ilə ilkin, GWMleP1DN və AP2 praymerləri ilə Nested PZR, “sola doğru addımlama” isə GWMleP1G və AP1 praymerləri ilə ilkin, GWMleP1GN və AP2 praymerləri ilə Nested PZR vasitəsilə həyata keçirilmişdir. PZR reaksiyalar stolbur fitoplazmasının PO izolyatı ilə yoluxdurulmuş bənövşədən ayrılmış və müxtəlif restriksiya fermentləri ilə hidroliz olunduqdan sonra adaptorlara tikilmiş doqquz GenomeWalker DNT bankı üzərində aparılmışdır. GWMleP1GN və AP2 praymerləri ilə Nested PZR nəticəsində 0,5 m.n.c. və 1 m.n.c. ölçülərində iki PZR məhsul, GWMleP1DN və AP2 praymerləri ilə Nested PZR nəticəsində də iki (0,5m.n.c. və 1 m.n.c.) PZR məhsul əldə edilmişdir. Əldə edilmiş PZR məhsullar müvafiq praymerlərlə birlikdə sekvens olunmuşdur. PZR məhsulların nukleotid ardıcılıqları SDR00C09 fraqmentinin nukleotid ardıcılığı ilə birləşdirilərək 1,890 m.n.c. uzunluğunda fraqment əldə edilmişdir. Yeni əldə olunmuş bu fraqment (1,890 kb) əsasında dörd yeni praymer (MleP1-F1, MleP1-R1, MleP1-F2, MleP1-R2) dizayn edilmiş və bu praymerlərlə aparılan PZR reaksiyalar nəticəsində iki yeni PZR məhsul əldə olunaraq sekvens edilmişdir. Yekun sekvens Phred, Phrap, və Consed software proqramları vasitəsilə kombine və redaktə edilərək

1,925 m.n.c. uzunluğunda fraqmentin əldə olunması ilə nəticələnmişdir. Bu yekun fraqmentin nukleotid ardıcılıqları üzərində zülal kodlaşdıran nukleotid ardıcılıqlarının (CDS-coding sequence) proqnozlaşdırılması həyata keçirilmişdir.

FrameD oxunma çərçivəsi ilə proqnozlaşdırılmış CDS (491 amin turşu) BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oxşarlıq axtarış proqramının vasitəsilə analiz edilmişdir.

2. MleP1 geninin nukleotid ardıcılıqları üzərində zülal kodlaşdıran və "Ca. P. australiense" növünün güman olunan malat/sitrat simporterini kodlaşdıran geni ilə müqayisədə daha dəyişkən hissəsindən altı praymer (MleP1-F3, MleP1-F4, MleP1-F5, MleP1-R3, MleP1-R4, MleP1-R5) dizayn edilmişdir:

Dizayn edilmiş praymerlər İNRA-Bordo Mərkəzinin fitoplazma kolleksiyasında saxlanılan beş referens stolbur izolyatları (PO; GGY; 19-25; P7 və T292) üçün sınaqdan keçirilmişdir. Üç Nested PZR (MleP1-F3/MleP1-R3, MleP1-F4/MleP1-R4, MleP1-R5/MleP1-F5) reaksiyası həyata keçirilmiş və nəticələr elektroforez vasitəsilə 1%-li aqaroza gelində analiz edilmişdir. Nəticədə MleP1-F3/MleP1-R3 cütü ilə sınaqdan keçirilmiş beş stolbur izolyatlarının hər biri üçün PZR məhsul amplifikasiya edilmişdir. MleP1-F4/MleP1-R4 praymerləri ilə həyata keçirilmiş PZR test beş stolbur izolyatından üçü (PO; GGY və 19-25) üçün ampikon vermişdir. MleP1-R5/MleP1-F5 ilə isə beş fitoplazma izolyatından yalnız biri (GGY) üçün PZR məhsul amplifikasiya olunmuşdur. MleP1-F3/MleP1-R3 praymerləri ilə əldə edilən PZR məhsullarla ayrı-ayrılıqda həm MleP1-F4/MleP1-R5, həm də MleP1-F5/MleP1-R4 praymer cütlükləri üçün Nested PZR reaksiya qoyulmuşdur.

Beləliklə, yekun olaraq Stolbur qrupu fitoplazmaları üçün *mleP1* geninin nukleotid ardıcılığının amplifikasiyasına əsaslanan qrup-spesifik Nested PZR test üçün MleP1-F3/MleP1-R3 (birinci PZR üçün) və MleP1-F5/MleP1-R4 praymer cütlükləri seçilmiş və yeni Nested PZR test metodunun şəraiti müəyyən edilmişdir.

3. Azərbaycanda aşkar edilmiş "Candidatus Phytoplazma solani" izolyatlarının genetik müxtəlifliyi birlikdə dörd qeyri-ribosomal genin (*mleP1*, *Stamp*, *secY*, və *tuf*) nukleotid ardıcılıqlarının müəyyən edilməsi əsasında Multilokus Sekvens Analiz vasitəsilə tədqiq edilmişdir. Bu məqsədlə "Candidatus Phytoplazma solani" izolyatlarının qeyri-ribosomal genləri spesifik Nested PZR metodlarla amplifikasiya edilmişdir. Əldə olunmuş Nested PZR məhsullar sekvens olunmuşdur. Sekvenslərin ilkin xromatoqramları yığılaraq Chromas, preGAP və GAP4 (Staden package) məntiqi proqramları

		<p>vasitəsilə assamble və redaktə edilmişdir. Redaktə edilmiş xromotoqramlardan nukleotid ardıcılıqları eksport olunmuş və nukleotid ardıcılıqlarının verilənlər bazasında homoloqlarının axtarılması Genbank məlumat bankında (http://gib.genes.nig.ac.jp) BLASTN və BLASTX axtarış proqramlarının köməkliliyi ilə həyata keçirilmişdir. BLASTN və BLASTX proqramları Biotexnoloji İnformasiya Milli Mərkəzinin (National Center for Biotechnology (NCBI)) serverindən (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) əldə edilmişdir.</p> <p>4. Azərbaycanda aşkar edilmiş “Candidatus Phytoplazma solani” izolyatlarının Avropa və Aralıq Dənizi hövzəsində aşkarlanmış izolyatlarla qohumluq əlaqələrinin müəyyən edilməsi üçün Filogenetik Analizdən istifadə edilmişdir. Filogenetik Analiz Mega 6 proqramı ilə həyata keçirilmiş, tədqiq edilən hər bir gen üçün filogenetik ağac Maximum Parsimony aləti ilə qurulmuşdur. Vmp1 geninin polifilogeniyanı araşdırmaq üçün “Candidatus Phytoplazma solani” izolyatlarının vmp1 geni amplifikasiya edilmişdir. Amplifikasiya məhsulları RsaI, AluI, TaqI, HpaI restriksiya fermentləri ilə RFLP analizinə məruz qoyulmuşdur. Nəticələr Qiagen robotu vasitəsilə Qiaxcel kapilyar elektroforetik analiz edilmişdir.</p> <p>5. Spirtə saxlanılan həşərat vektorları elektron mikroskopiya və barkodlaşdırma vasitəsilə molekulyar identifikasiya edilmişdir. Elektron mikroskopiya ilə identifikasiya erkək həşərat fərdlərinin cinsi orqanlarının quruluşuna əsasən həyata keçirilmişdir. Molekulyar identifikasiya üçün isə həşərat vektorlarından DNT ekstraksiya edilmişdir. DNT ekstraktları mtCOI mitoxondri markeri vasitəsilə barkodlaşdırılma vasitəsilə identifikasiya olunmuşdur.</p>
6.	<p>Layihənin yerinə yetirilməsindən (elmi tədbirdə və ya qısamüddətli elmi təcrübəkeçmədə iştirakdan) əldə edilən nəticələr, onların yenilik dərəcəsi, elmi və praktiki əhəmiyyəti</p>	<p>“Candidatus Phytoplazma solani” fitoplazmasının yeni qeyri-ribosomal geninin nukleotid ardıcılığı əldə olunaraq xarakterizə edilmişdir. Nukleotid ardıcılığı əldə olunaraq xarakterizə edilən yeni genin 2-Hydroxycarboxylate transporterini kodlaşdıran <i>mleP1</i> geni olduğunu müəyyən edilmişdir.</p> <p>“Candidatus Phytoplazma solani” fitoplazmasının qeyri-ribosomal <i>mleP1</i> genini amplifikasiya etməyə imkan verən yeni Nested PZR test metodu hazırlanmışdır.</p> <p>“Candidatus Phytoplazma solani” fitoplazmasının <i>tuf</i> geninin sekvensinin filogenetik analizi nəticəsində Azərbaycanda üzüm bitkisinde BN izolyatları arasında 3 tuf genotipi aşkar edilmişdir:</p>

- Abşeron yarımadasından toplanmış 'Qara yay üzümü' sortunda aşkarlanmış 'Ca. P. solani' izolyatları tuf-b1 adlandırılan, Qərbi Avropada çöl sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*) ilə əlaqəli olduğu bilinən, ümumi tuf-type 'b' genotipinə uyğun olmuşdur.

- 'Qara shani' və 'Mahmudu' sortlarında müəyyən olunmuş digər 'Ca. P. solani' izolyatları tuf 'a' tipi və tuf 'b' tipi arasında aralıq mövqə təşil edən tuf-b2 genotipinə aid olduğu və onun *Urtica dioica* yabanı bitki rezervuarları ilə əlaqəli olduğu müəyyən edilmişdir.

- Qəbələ rayonundan götürülmüş 'Qara kişmiş'i' üzüm sortunda aşkarlanmış bütün 'Ca. P. solani' izolyatları, son vaxtlar Ruminiyada toplanmış xəstə kartof bitkilərində aşkarlanmış tuf-b3 genotipi ilə eyni genotipə malik olmuşdur.

"Candidatus Phytoplasma solani" fitoplazmasının secY geninin filogenetik analizi nəticəsində Azərbaycanda ikisi indiyədək rast gəlinməyən yeni genotip olmaqla, dörd fərqli secY genotipinin mövcudluğu aşkar edilmişdir:

-Qəbələ rayonundan toplanan "Qara kişmiş'i"-də aşkarlanan 'Ca.P.solani' izolyatlarının hamısı indiyədək məlum olan bütün referans 'Ca.P.solani' izolyatlarından fərqli olan yeni bir sec Y genotipinə malik olmuşdur. Bu yeni secY genotipi Avropada rast gəlinən referans S4 genotipindən iki tək nukleotid polimorfizmi (SNP) ilə fərqlənmişdir.

- Abşeron yarımadasından toplanmış 'Qara şanı', 'Ağ şanı' və 'Qara yay üzümü' sortlarında, eləcə də Quba rayonundan toplanmış badımcın və bibər bitkilərində aşkar olunmuş 'Ca.P.solani' izolyatları Aralıq dənizi ərazisində yayılmış S1 secY genotipinə uyğun gəlmişdir.

-Abşeronda "Mahmudu" üzüm sortunda aşkar edilən 'Ca.P.solani' izolyatı eyni üzüm sahəsindən toplanmış bütün digər izolyatlarından fərqli, yalnız Fransada lavanda bitkisinde aşkarlanmış S14 secY genotipi ilə identik olmuşdur.

-Quba rayonunda *Prunus myrobalan* ağaclarında və eyni gavalı bağında olan sarmaşıqların üzərindən toplanmış 6 yoluxmuş *H. obsoletus* həşərat vektorlarında aşkar olunmuş dördüncü secY genotipi indiyədək dünyada məlum olan bütün secY genotiplərindən fərqlənmişdir.

'Ca. P. solani' izolyatlarının Stamp genlərinin filogenetik analizi ilə səkkiz Azərbaycan üzüm BN izolyatlarında dörd müxtəlif Stamp genotipi differensiasiya edilmişdir:

-Qəbələ rayonundan olan 'Qara kişmiş'i' sortundan olan üzüm bitkilərində yeni stamp genotipinə uyğun

olan 2 BN izolyatı aşkarlanmışdır.

-Azərbaycandan olan digər üzüm BN izolyatları 3 müxtəlif stamp genotipi göstərmişdir. AZ GR22-14, AZ GR06-15 və AZ GR15-15-nin BN izolyatlarında Stamp geninin amplifikasiyası indiyədək məlum olmayan mürəkkəb ardıcılıqlar müəyyən edilmişdir. Stamp geninin sekvens ardıcılığının maximum parsimony filogenetik analizi əvvəlki analizlərdən artıq məlum olan 4 genetik qrup ilə birlikdə, əlavə olaraq yalnız Azərbaycan izolyatlarında aşkarlanmış 2 yeni filogenetik qrupun da olduğunu aşkara çıxartmışdır. Abşeron yarımadasından olan üzüm bitkilərində aşkarlanan 3 stamp genotipi Azərbaycanın digər rayonlarından toplanmış badımcan, bibər, tomat, əzgil və giləsdə aşkarlanmış 4 digər stamp genotipi ilə birlikdə III filogenetik qrupda toplanmışdır və onların Livanda aşkarlanmış 'Ca. P. solani' izolyatları ilə qohumluq əlaqələrinə malik olduğu müəyyən edilmişdir.

Layihədə yeni hazırlanmış Nested PZR vasitəsilə amplifikasiya edilmiş *mleP1* geninin sekvens analizi 5 müxtəlif *mleP1* genotipinin aşkarlanması ilə Azərbaycanda üzüm bitkilərində *Ca. P. solani* izolyatlarının daha yüksək müxtəlifliyini aşkara çıxartmışdır:

-Abşeron yarımadasından toplanmış üzüm bitkilərində aşkarlanmış 'Ca. P. solani' izolyatları bir-birindən fərqlənən dörd müxtəlif *mleP1* genotipləri göstərmiş, Qəbələdən toplanmış üzümlərdəki izolyatlar isə eyni *mleP1* genotipinə malik olmuşdur.

-Abşeron yarımadasından toplanmış "Ala shani" üzüm sortunda aşkar olunmuş 'Ca. P. solani' izolyatının *mleP1* genotipi Azərbaycanda tomat, bibər, gilə, əzgildə və Fransa, İtaliya, Almaniya və Livanda aşkarlanmış 'Ca. P. solani' reference izolyatları ilə eyni genotipə malik olmuşdur.

-"Qara yay uzumu" sortunda aşkar olunmuş 'Ca. P. solani' izolyatının *mleP1* genotipi isə Azərbaycanın Quba rayonundan toplanmış badımcanda, eləcə də, Fransada, *Cuscuta campestris* ilə tomatdan *Catharanthus roseus* bitkisinə keçirilən izolyatda da aşkarlanmışdır.

Azərbaycanda "Candidatus Phytoplasma solani" fitoplazmasını yayan həşərat vektorları identifikasiya edilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, Azərbaycanda "Candidatus Phytoplasma solani" fitoplazması *Hyalestes obsoletus* və *Reptalus noahi* həşərat növləri ilə yayılır. Alınan nəticə *Reptalus noahi* həşərat növünün "Candidatus Phytoplasma solani" fitoplazmasını yaymasını göstərən ilk məlumatdır.

Alınan nəticələr tam yenidir. Xüsusilə qeyd etmək

		<p>lazımdır ki, indiyədək bu sahədə tədqiqatlarda həşərat vektorları identifikasiya edilməmişdir. Reptalus noahi növünün 'Ca. P. solani' fitoplazmasının həşərat vektoru olduğu ilk dəfə olaraq Azərbaycanda aşkar edilmişdir. Eləcə də tədqiqatlar nəticəsində indiyədək elmə məlum olmayan yeni genotiplər alınmışdır. Alınmış nəticələr həm elmi, həm də praktiki əhəmiyyətə malikdir.</p>
7.	<p>Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı istifadə olunmuş üsul və yanaşmalar</p>	<p>Nested PZR metodu, aqaroza gəlində elektroforetik analiz, SSH metodu, "xromosom üzərində gəzinti", multilokus sekvens analiz, filogenetik analiz, RFLP analiz, Qiagen robotu vasitəsilə Qiaxcel kapilyar elektroforetik analiz, elektron mikroskopiya, barkodlaşdırma metodu</p>
8.	<p>Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı əldə olunmuş nəticələrin gözlənilən tətbiq sahələri (konkret olaraq qeyd etməli)</p>	<p>Layihədə hazırlanmış yeni Nested PZR test metodundan "Candidatus Phytoplasma solani" fitoplazmasının epidemiologiyasının tədqiqində genotipləşmə üçün istifadə oluna bilər.</p> <p>Aparılan tədqiqat işində Azərbaycanda aşkar olunmuş "Candidatus Phytoplasma solani" izolyatlarının digər ölkələrdən olan izolyatlarla birlikdə Multilokus Sekvens Analizinin nəticələri ölkəmizdə yayılmış izolyatların mənşəyini aydınlaşdırmağa imkan verir.</p> <p>Alınan nəticələrdən Azərbaycana idxal olunan əkin materialına nəzarət və onların sertifikatlaşdırılmasında istifadə etmək mümkündür. Layihədə əldə olunmuş nəticələrdən istifadə etməklə müxtəlif üzüm sortlarının fitoplazma xəstəliklərinə qarşı genetik potensialının qiymətləndirilməsi aparıla bilər.</p> <p>Alınan nəticələr patogenlərə davamlı olan bitki genotiplərinin müəyyən edilməsində, seleksiyada geniş istifadə oluna bilər.</p> <p>Layihədə "Candidatus Phytoplasma solani" fitoplazmasını Azərbaycanda yayan həşərat vektorları müəyyən edilmişdir ki, bu nəticələrdən istifadə etməklə Stolbur və Bois Noir kimi təhlükəli fitoplazma xəstəliklərinin qarşısının alınması üçün mübarizə tədbirləri hazırlamaq olar.</p>

Layihə rəhbərinin imzası



Balakışiyeva Gülnarə Şamməd qızı

Tarix 30 noyabr 2017

Elmin İnkişafı Fondunun əməkdaşının imzası _____

Tarix _____