

UOT 582. 001. 4

AZƏRBAYCANIN BƏZİ PALID (*QUERCUS* SPP.) NÖVLƏRİNİN GENETİK MÜXTƏLİFLİYİNİN MOLEKULAR ANALİZİ

G.N. Əliyeva, C.M. Ocaqi, Z.Ə. Məmmədova, S.M. Rüstəмова
(AMEA-nın akademiki İ.M. Hüseynova tərəfindən təqdim edilmişdir)

Azərbaycanda ilk dəfə olaraq palıd növlərinin biomüxtəlifliyi molekular səviyyədə analiz edilmişdir. Tədqiqat işində müxtəlif bölgələrdən toplanmış 5 növə (*Q. castaneifolia* C.A. Mey., *Q. pedunculiflora* C.Koch., *Q. iberica* Stev., *Q. macranthera* Fisch. & C.A.Mey. ex Hohen) aid 7 palıd genotipində 10 RAPD praymer cütü vasitəsilə genetik polimorfizm qiymətləndirilmişdir. RAPD-PZR analiz zamanı 91-i polimorf olmaqla ümumilikdə 113 bənd sintez olunmuşdur. Ən yüksək polimorfizm (92.31%) OPD-05 praymeri ilə, ən zəif polimorfizm (57.14%) isə OPB-05 praymeri ilə qeydə alınmışdır. Nümunələrdə polimorfizmin yüksək olması genetik müxtəlifliyin yüksək olduğunu göstərir. Alınan nəticələr RAPD markerlərin palıdlarda genetik tədqiqatlar aparmaq üçün yararlı olduğunu deməyə əsas verir.

Açar sözlər: *Quercus*, genetik polimorfizm, RAPD-PZR analiz, PIC, EMR, MI

Palıdlar Fıstıqçiçəklilər fəsiləsindən ən geniş yayılmış (600-ə yaxın növ), həmişəyaşıl və yarpağını tökən, uzunömürlü, küləklə tozlanan, ekoloji və iqtisadi əhəmiyyətə malik, bir çox ölkələr üçün böyük simvolik dəyərə sahib olan ağaclardır [8, 14]. Azərbaycan gerbində palıd yarpaqlarının əks olunması onun ölkənin təbiəti və iqtisadiyyatı üçün xüsusi əhəmiyyət kəsb etdiyini vurğulayır. Hələ Darwinin dövründən palıdlar təkamül təlimini və növəmələgəlmə prosesini öyrənmək üçün model növ kimi istifadə edilib. Palıdlar üçün yüksək fenotipik plastiklik, eləcə də yeni ekotiplərin, yarımnövlərin və növlərin yaranmasına təminat verən növlərarası gen mübadiləsi, genetik variasiya xarakterikdir [17]. Bunlar palıdların müəyyən bioloji üstünlüklər əldə etməsinə səbəb olsa da, onların təsnifləşdirilməsində, növlərarası genetik müxtəlifliyi və populyasiyaların genetik quruluşunu qiymətləndirməkdə çətinliklər yaradır.

Palıd meşələri respublikamızın ümumi meşə ərazisinin təxminən dördə birini təşkil edir. Bu meşələrin 40 %-i Böyük Qafqazda, 35 %-dən çoxu Kiçik Qafqazda, 25 %-ə qədəri isə Talış zonasında yayılmışdır. Palıd meşələrinin torpağın aşınmadan qorunmasında və dağların su rejiminin tənzim olunmasında rolu böyükdür [13,15]

Palıdlar ekoloji və iqtisadi əhəmiyyətə sahib olsalar da, iqlim dəyişkənliyi, qlobal istiləş-

mə, oduna olan tələbatın ödənilməsi üçün meşələrin qeyri-qanunu kəsilməsi, təbii bərpanın otarılma vasitəsilə sıradan çıxarılması, meşə yanğınları, meşə zolaqlarının məhv edilərək yerində meyvə ağaclarının, bostan bitkilərinin əkilməsi, müxtəlif obyektlərin tikilməsi kimi səbəblər təbii palıd populyasiyalarının sürətlə azalmasına səbəb olur [22]. Meşələrin yüksək genetik resurslarının qorunması və saxlanması üçün populyasiyadaxili və populyasiyalararası genetik müxtəliflik haqqında informasiyalar tələb olunur [1]. Bu məqsədlə genetik müxtəlifliyin və polimorfizmin yeni mənbələrini, populyasiyaların müxtəlif genezisləri arasında qohumluq əlaqələrini müəyyən edilməsi üçün tətbiq olunan güclü və etibarlı vasitə - molekular markerlərdən istifadə etmək olar [4]. DNT markerlərdən istifadə edərək bitkilərin identifikasiya edilməsi genetik materiala əsaslandığı üçün morfoloji göstəricilərlə təyinatdan daha etibarlıdır. Digər tərəfdən morfoloji əlamətlər müxtəlif xarici mühit amillərinin təsirindən dəyişikliyə məruz qalır [22]. Bu məqsədlə çoxsaylı molekular markerlər içərisində polimeraz zəncir reaksiyasına əsaslanan (PZR) RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) markerlər daha çox istifadə edilir [4]. Tədqiqat işinin məqsədi müxtəlif populyasiyalardan olan 5 növə aid 7 palıd genotipində PZR analizi metodu ilə gene-

tik müxtəlifliyi müəyyən etmək, palıd bitkisinin RAPD markerlərin istifadə edilmə imkanlarını qiymətləndirməkdir. Tədqiqat işinin yerinə yetirilməsi üçün xarici ədəbiyyat materialları analiz olunaraq palıd bitkisi üçün universal praymerlər seçilmişdir [1, 5, 11]

Material və metodlar

Azərbaycanın müxtəlif regionlarından palıd cinsinə aid 5 növdən 7 genotip (*Q. pedunculiflora* (Bakı), *Q. pedunculiflora* (Abşeron), *Q. macrhantera* (Göyqol), *Q. iberica* (İsmayılı), *Q. castaneifolia* (Abşeron), *Q. castaneifolia* (Lənkəran) *Q. ilex* (Abşeron) təsadüfi seçilmişdir. Növlər yarpaqların və qozaların morfoloji göstəricilərinə əsasən təyinedicilərin köməyi ilə dəqiq müəyyən edilmişdir. Nüvə DNT-nin ekstraksiyası üçün hər ağacdən 3-5 yarpaq toplanılmış, dərhal maye azotda dondurularaq -80°C verən soyuducuda yerləşdirilmişdir.

Tədqiqatlar AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun Bioadaptasiya laboratoriyasında aparılmışdır. Yarpaqlardan CTAB [16] metodu ilə DNT ekstraksiya edilmiş, ULTROSPEC 3300 PRO

(“AMERSHAM”, USA) spektrofotometri vasitəsi ilə qatılığı və keyfiyyəti təyin olunduqdan sonra PZR reaksiyasının aparılması üçün 50 nq/μl qatılığa qədər durulaşdırılmışdır. PZR reaksiyası 10x PZR buferi, 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 10 μM praymer, 0.2 vahid Taq-polimerazadan ibarət 20μl məlul və 5 μl 20 nq/μl DNT-dən ibarət olmaqla, ümumilikdə 25 μl həcmdə aparılmışdır. Reaksiya «Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler» (Singapore) maşınında aşağıdakı şəraitdə həyata keçirilmişdir: denaturasiya - 3 dəq 94°C-də; 35 tsikl: 30 san 94 °C-də, 40 san 40°C-də, 1.3 dəq 72°C-də; son elonqasiya mərhələsi 15-dəq 72°C-də [1]. İstifadə edilmiş praymerlər haqqında ətraflı məlumat Cədvəl 1-də öz əksini tapmışdır. Amplifikasiya məhsulları 1.5%-li aqaroza gelində 2 saat müddətində elektroforetik analiz edilmişdir (HR-2025-High Resolution («IBI SCIENTIFIC», USA). Gellərin sənədləşdirilməsi «Gel Documentation System UVITEK» vasitəsilə həyata keçirilmişdir. Amplifikasiya etmiş fraqmentlərin ölçüsünü müəyyən etmək üçün 100-3000 bp DNT ladderindən istifadə edilmişdir.

Cədvəl 1

Tədqiqat işində istifadə edilmiş praymerlərin nukleotid ardıcılığı

Primer	Nukleotid ardıcılığı	C+G (%)
OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	60
OPB-02	5'-TGATCCCTGG-3'	60
OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'	70
OPB-04	5'-GGACTGGAGT-3'	60
OPB-05	5'-TGCGCCCTTC-3'	70
OPD-05	5'-TGAGCGGACA-3'	60
OPD-08	5'-GTGTGCCCCA-3'	70
OPD-11	5'-AGCGCCATTG-3'	60
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	60
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	60

RAPD praymerlərin palıd nümunələrinin genetik analizi üçün effektivliyini müəyyən etmək məqsədilə polimorf informasiya tutumu PIC (polymorphism information content) [25], effektiv multipleks əmsalı EMR (effective multiplex ratio), marker əmsalı MI (marker indeksi)

[19], görüntüləmə qabiliyyəti RP (resolving power) [20] kimi statistik parametrlər təyin edilmişdir. Praymerin i-ci lokusunun PIC-ni ifadə edən PIC_i $PIC = 1 - \sum p_i^2$ formul əsasında hesablanmışdır. Marker əmsalı müxtəlif genotiplər arasında polimorfik loksları müəyyən etmək

üçün praymer imkanındır və EMR x PIC kimi hesablanır, burada EMR polimorf bəndlərin ümumi bəndlərin sayına nisbətini ifadə edir.

Nəticələr və onların müzakirəsi

Genetik materialların molekulyar markerlərlə qiymətləndirilməsi florada mövcud olan müxtəliflik haqqında informasiya verməklə yanaşı, morfoloji baxımdan oxşar olan nümunələri bir-birindən fərqləndirməyə və genotiplər arasında genetik yaxınlıq dərəcəsini qiymətləndirməyə imkan verir. İndiyə qədər Azərbaycan florasında olan *Quercus* cinsinə aid növlərin genetik müxtəlifliyi molekulyar markerlər vasitəsilə müqayisəli şəkildə tədqiq edilməmişdir. Ancaq dünya miqyasında genom səviyyəsində palıdlar üzərində geniş tədqiqat işləri aparılır [6, 2, 24; 10, 12, 18]. Palıd növlərində populyasiyadaxili və populyasiyalararası müxtəlifliyi qiymətləndirmək üçün RAPD-PZR metodunun ən yaxşı vasitə olduğu göstərilir [6,9, 7, 23;26.]

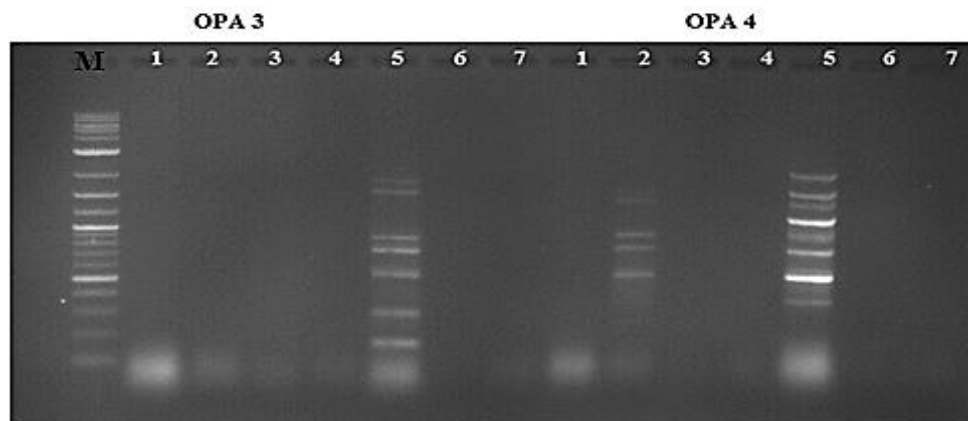
Biz tədqiqat işində Azərbaycan florasında mövcud olan palıd cinsinə aid 5 palıd növündən

(7 genotip) istifadə etmişik. Nəticələr cədvəl 2-də öz əksini tapmışdır. Belə ki, RAPD-PZR analiz zamanı 10 praymer üzrə 91-i polimorf olmaqla ümumilikdə 113 bənd sintez olunmuşdur. Fraqmentlərin əsas paylanma sahəsi 250-3500 bp aralığında olmuşdur (Şək.). Ən çox polimorfik bənd OPB-02, ən az polimorfik bənd sayı isə OPB-05 praymeri ilə müşahidə edilmişdir. Orta hesabla polimorfik bənd sayı 9.1 olub. Ən yüksək polimorfizm (92.31%) OPD-05 praymeri ilə, ən zəif polimorfizm isə OPB-05 (57.14%) praymeri ilə qeydə alınmışdır. Ən mühüm statistik parametr hesab olunan polimorf informasiya tutumu PIC-in ən yüksək qiymətləri OPD-05 (0.96), OPB-03 (0.95) və OPB-01(0.94) praymerləri ilə müşahidə edilmişdir. PIC-in ən zəif qiymətləri isə OPB-05 (0.48) ilə müşahidə edilmişdir, hər praymerə görə orta qiymət isə 0.75 olmuşdur.

Cədvəl 2

RAPD praymerlər ilə palıd genotiplərində təyin olunmuş polimorfizm və genetik müxtəliflik göstəriciləri

Praymer	Sintez olunmuş bənd sayı	Polimorf bənd sayı	Polimorfizm, %	PIC	EMR	MI
OPA-03	8	5	62.50	0.62	5.9	3.66
OPA-04	7	6	85.71	0.76	8.7	6.61
OPB-01	10	9	90.00	0.948	11.4	10.81
OPB-02	15	13	86.67	0.79	9.8	7.74
OPB-03	11	10	90.90	0.952	10.8	10.28
OPB-04	12	9	75.00	0.69	6.8	4.69
OPB-05	7	4	57.14	0.48	4.8	2.30
OPD-05	13	12	92.31	0.96	11.8	11.32
OPD-08	14	11	78.57	0.68	7.8	5.31
OPD-11	16	12	75.00	0.64	6.1	3.90
Ümumi	113	91	-	-	-	-
Orta	11.3	9.1	79.38	0.752	8.39	6.66



Şəkil. OPA3 və OPA4 RAPD praymerləri ilə palıd genotiplərində sintez olunmuş ampikonlar: 1-Q. *pedunculiflora* (Bakı), 2-Q. *pedunculiflora* (Abşeron), 3-Q. *macrhantera* (Göygöl), 4-Q. *iberica* (İsmayılı), 5-Q. *ilex* (Abşeron), 6-Q. *castaneifolia* (Abşeron), 7-Q. *castaneifolia* (Hirkan) və M-DNT marker

Nümunələrdə polimorfizmin yüksək olması genetik müxtəlifliyin yüksək olmasının göstəricisidir. Bu isə onu deməyə əsas verir ki, yerli növlərdə yeni növün əmələ gəlməsi üçün potensial imkan yüksəkdir və bu növlərdən seleksiya işlərində müvəffəqiyyətlə istifadə etmək olar. Polimorf lokus fraksiyasına əsaslanan effektiv multikompleks əmsalının (EMR) və marker əmsalının (MI) ən yüksək qiyməti OPD-05, OPB-01 və OPB-03, eləcə də ən zəif qiymətləri OPB-05 praymeri ilə qeydə alınmışdır. Praymerlər üzrə EMR-in orta qiyməti 8.39, markerlər indeksinin orta qiyməti isə 6.66 vahid olmuşdur. Bu tədqiqatda əldə edilən yüksək EMR və MI qiymətləri, istifadə olunan RAPD markerlərinin genetik dəyişikliyin qiymətləndirilməsi və palıd populyasiyaları arasında filogenetik analizi üçün faydalı olduğunu göstərir.

AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunda elmi-tədqiqat işinin yerinə yetirilməsinə şərait yaratdığı üçün akademik İ.M.Hüseynovaya dərin minnətdarlığımızı bildiririk.

ƏDƏBİYYAT

1. Ardi M., Rahmani F., Siami A. (2012) Genetic variation among Iranian oaks (*Quercus* spp.) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(45): 10291-10296
2. Ashley M.V., Backs J.R., Kindsvater L., Abraham S.T. 2018. Genetic Variation and Structure in an Endemic Island Oak, *Quercus tomentella*, and Mainland Canyon Oak, *Quercus chrysolepis*. *International Journal of Plant*

Sciences. 179 (2): 151-161. [https://doi.org/ 10.1086/696023](https://doi.org/10.1086/696023).

3. Aykut Y, Emel U, Tekin BM (2013). Molecular diversity among Turkish oaks (*QUERCUS*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *African Journal of Biotechnology* 12(45): 6358-6365.
4. Baig NMR, Grewal S, Dhillon S (2008). Molecular characterization and genetic diversity analysis of citrus cultivars by RAPD markers. *Turk. Agric.*, 33: 375-384.
5. Bardakci F (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk. J. Biol.*, 25: 185-196.
6. Degen B., Yanbaev R., Yanbaev Y. 2019. Genetic differentiation of *Quercus robur* in the South-Ural. *Silvae Genetica*. 68 (1): 111-115. DOI: <https://doi.org/10.2478/sg-2019-0019>.
7. Fernandes JP, Costa A, Rocha CSJ, Santos C (2011). Genetic stability evaluation of *Quercus suber* L. somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Pakistan Journal of Botany* 43:2727-31
8. Govaerts R., Frodin D.G. 1998. World checklist and bibliography of Fagales (Betulaceae, Corylaceae, Fagaceae, and Ticodendraceae). The Royal Botanic Gardens, Kew. 456p.
9. Jurkšienė G, Baranov OY, Kagan DI, Kovalevič-Razumova OA, Baliuckas V. 2019. Genetic diversity and differentiation of pedunculate (*Quercus robur*) and sessile (*Q. petraea*) oaks. *Journal of Forestry Research*. DOI: 10.1007/s11676-019-01043-3.
10. Khadivi-Khub A., Shabani N., Rahmani M.S. 2015. Genotypic analysis and population structure of Lebanon oak (*Quercus libani* G. Olivier) with molecular markers. *Tree Genetics & Genomes*. 11, 102. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0935-1>.
11. Liu ZJ, Cordes JF (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
12. Lopez-Aljorna A., Bueno M.A., Aguinalgalde I., Martin J.P. 2007. Fingerprinting and genetic variability in cork oak (*Quercus suber* L.) elite trees using ISSR and SSR markers. *Annals of Forest Science*. 64 (7): 773-779.

13. Mammadov T.S. (2016) Azərbaycan dendroflorası, III cild, Bakı, Elm, 2016, 400.
14. Menitsky YL. Oaks of Asia. Enfield: Science Publishers. USA 2005.
15. Məmmədov Q., Mahmudov X. (2002) Azərbaycanın meşələri, Bakı-Elm-2002, 472 səh
16. Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.
17. Neophytou C, Aravanopoulos FA, Fink S, Dounavi A (2010). Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. For. Ecol. Manag., 259: 2026-2035.
18. Neophytou, C., Gärtner, S.M., Vargas-Gaete, R. et al. 2015. Genetic variation of Central European oaks: shaped by evolutionary factors and human intervention? Tree Genetics & Genomes. 11, 79. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0905-7>
19. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalsky A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed., 2: 225-238.
20. Prevost A., Wilkinson M.J. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet., 98: 107-112.
21. Ranjan Rout G, Aparajita S (2010). Phylogenetic study of twelve species of *Phyllanthus* originated from India through molecular for conservation. Am. J. Plant Sci., 1: 32-37.
22. Saenz-Romero C, Tapia-Olivares BL (2003). *Pinus oocarpa* isoenzymatic variation along an altitudinal gradient in Michoacan, Mexico. Silvae Genet., 52: 237-240.
23. Schiller G, Korol L (2004). Genetic diversity assessment by random amplified polymorphic DNA of oaks in Israel. 2. *Quercus boissieri* Reut. Israel Journal of Plant Sciences. 52 (4): 315-322.
24. Shi X., Wen Q., Cao M., Guo X., Xu L. 2017. Genetic diversity and structure of natural *Quercus variabilis* population in China as revealed by microsatellites markers. Forests. 8, 495. doi:10.3390/f8120495.
25. Smith J.S.C., Chin E.C., Shu H., Smith O.S., Wall S.J., Senior M.L., Mitchell S.E., Kresovich S., Ziegler J (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparisons with data from RFLPs and pedigree. Theor. Appl. Genet 95:163-173.
26. Yakovlev IA, Kleinschmidt J. 2002. Genetic Differentiation of Pedunculate Oak *Quercus robur* L. in the European Part of Russia Based on RAPD Markers. Russian Journal of Genetics 38: 148-155.

AMEA-nın Dendrologiya İnstitutu
bio890@mail.ru,

MOLECULAR ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF SOME OAK (QUERCUS SPP.) SPECIES OF AZERBAIJAN

G.N. Aliyeva, J.M. Ojaghi, Z.A. Mammadova, S.M. Rustamova

The biodiversity of oak species was analyzed at the molecular level for the first time in Azerbaijan. In the study, genetic polymorphism was assessed using 10 RAPD primers in 7 oak genotypes of 5 species (*Q. castaneifolia* C.A. Mey., *Q. pedunculiflora* C. Koch., *Q. iberica* Stev., *Q. macranthera* Fisch. & C.A.Mey. ex Hohen) collected from different regions. A total of 113 elements were synthesized during the RAPD-PCR analysis, 91 of them were polymorphic. The highest polymorphism (92.31%) was recorded with the OPD-05 primer, and the lowest polymorphism (57.14%) was recorded with the OPB-05 primer. The high polymorphism of the samples indicates a high genetic diversity. The results suggest that RAPD markers are suitable for genetic research in oaks.

Keywords: *Quercus*, genetic polymorphism, RAPD-PCR analysis, PIC, EMR, MI

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДУБА (QUERCUS SPP.) В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Г.Н. Алиева, Дж.М.Оджаги, З.А.Мамедова, С.М.Рустамова

Впервые в Азербайджане, биоразнообразие видов дуба проанализировано на молекулярном уровне. В ходе исследования был оценен генетический полиморфизм с применением 10 RAPD праймеров в 7 генотипах 5 видов дуба (*Q. castaneifolia* C.A. Mey., *Q. pedunculiflora* C.Koch., *Q. iberica* Stev., *Q. macranthera* Fisch. & C.A.Mey. ex Hohen), собранных из разных регионов. Всего в ходе RAPD-ПЦР-анализа было синтезировано 113 элементов, из которых 91 являлись полиморфными. Самый высокий полиморфизм (92,31%) был зарегистрирован с праймером OPD-05, а самый низкий полиморфизм (57,14%) - с праймером OPB-05. Высокий полиморфизм образцов свидетельствует о высоком генетическом разнообразии. Результаты показывают, что маркеры RAPD подходят для генетических исследований растений дуба.

Ключевые слова: *Quercus*, генетический полиморфизм, RAPD- ПЦР анализ, PIC, EMR, MI