

**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI  
BOTANİKA İNSTİTUTU**

*Əlyazması hüququnda*

**GÜLNARƏ ŞAMMƏD QIZI BALAKİŞİYEVƏ**

**AZƏRBAYCANDA MEYVƏ AĞAÇLARINDA VƏ TƏRƏVƏZ  
BİTKİLƏRİNDƏ FİTOPLAZMA XƏSTƏLİKLƏRİNİN  
YAYILMASI VƏ MÜXTƏLİFLİYİNİN  
MOLEKULYAR TƏDQIQI**

**2415.01– Molekulyar biologiya**

Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi  
dərəcəsi almaq üçün təqdim edilən dissertasiyanın

**AVTOREFERATI**

**Bakı – 2013**

Dissertasiya işi AMEA Botanika İnstitutunun Bioloji məhsuldarlığın fundamental problemləri şöbəsinin Bioadaptasiya laboratoriyasında, Fransa Milli Kənd Təsərrüfatı Elmi-Tədqiqat İnstitutunun Bordeaux Mərkəzində (INRA Center Bordeaux) və Victor Segelan adına Bordeaux II Universitetində yerinə yetirilmişdir.

**Elmi rəhbərlər:**

**Akademik Cəlal ƏLİYEV  
Prof., Dr. Xavier FOISSAC**

**Rəsmi opponentlər:**

**biologiya elmləri doktoru  
K.Q.QASIMOV**

**biologiya elmləri doktoru,  
professor X.Q. QƏNBƏROV**

**Aparıcı təşkilat:**

**AMEA Mikrobiologiya İnstitutu,  
Mikologiya şöbəsi**

Dissertasiyanın müdafiəsi «\_28\_» «\_06\_» 2013-cü il tarixdə saat \_\_ da Azərbaycan MEA Botanika İnstitutunun D.01.061. Dissertasiya Şurasının yığıncağında aşağıda göstərilən ünvanda keçiriləcəkdir.

**Ünvan:** Bakı şəhəri, AZ1073, Mətbuat prospekti, 2a

Dissertasiya ilə Azərbaycan MEA Botanika İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq olar.

Dissertasiyanın avtoreferatı «\_\_\_\_» «\_\_\_\_\_» 2013-cü il tarixində göndərilmişdir.

**Dissertasiya Şurasının elmi katibi,  
biologiya elmləri doktoru.,  
professor**

**S.C.İBADULLAYEVA**

## İŞİN ÜMUMİ XARAKTERİSTİKASI

**Mövzunun aktuallığı.** Bütün canlı orqanizmlər kimi, bitkilər də xarici mühitin əlverişsiz biotik və abiotik amillərinin təsirinə məruz qalırlar ki, bu da onların həyat fəaliyyətinə və yaşamaq qabiliyyətlərinə mənfi təsir göstərir. Bitkilərə mənfi təsir göstərən biotik stres amillərindən biri də fitopatogenlərdir. Bitkilərin patogenlərdən müdafiəsi iqtisadi cəhətdən əhəmiyyətli problemdir və müasir elmi tədqiqatların əsas istiqamətlərindən biridir. Son illərdə dünyada bitkiləri yoluxduran patogenlərin miqdarı və onların yayılma arealları sürətlə artmış, xüsusilə də, kənd təsərrüfatı bitkilərini yoluxduran fitoplazma xəstəliklərinin artması, iqtisadi cəhətdən böyük problemlərə səbəb olmuşdur. Dünyada həm mədəni bitkilər, həm də alaq otları arasında onları tamamilə məhv edən güclü fitoplazma epidemiyalarına rast gəlinmişdir (Bertaccini et al., 2007).

Kənd təsərrüfatının inkişafı, xaricdən bitki materiallarının mübadiləsi ölkəmizdə də fitoplazma xəstəliklərinin meyvə ağacları və tərəvəz bitkiləri üçün əsl təhlükəyə çevrilməsinə səbəb olmuşdur. Ölkəmizdə, əsasən, vegetativ yolla çoxalan ərzaq, yem, texniki və dekorativ bitki kulturalarının çoxu, demək olar ki, xroniki olaraq fitopatogenlərlə yoluxaraq yüksək miqdarda məhsul itkisinə səbəb olur. Bundan əlavə, kənd təsərrüfatı sisteminin qloballaşması və əkin materiallarının beynəlxalq mübadiləsi fitoplazma infeksiyalarının yeni regionlara introduksiyasına şərait yaradır. Bunun qarşısını almaq üçün sağlam bitkilərin seçilməsi, onlara nəzarət, əkin materialının sertifikatlaşdırılması, fitoplazma infeksiyalarını aşkarlamaq məqsədi daşıyan dövrü monitoriqlərin aparılması mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Hal-hazırda fitoplazmalar tərəfindən törədilən xəstəliklər müalicə oluna bilmirlər və xəstəliyin yayılmasının qarşısının alınması yoluxmuş bitkilərin kənarlaşdırılması və pestisidlərin istifadə olunması kimi profilaktik tədbirlərin həyata keçirilməsindən ibarətdir. Fitoplazmalar tərəfindən törədilən xəstəliklərə nəzarət bu patogenlərin ilkin diaqnostikasını, taksonomik səciyyələndirilməsini, bitki sahibinin spektrinin və həşərat vektorlarının identifikasiyasını tələb edir. İndiyədək Azərbaycanda fitoplazma xəstəlikləri tədqiq edilməmişdir. Bu səbəbdən də respublikamızda kənd təsərrüfatı bitkilərini yoluxduran fitoplazmalar haqqında məlumat bazası mövcud deyildir. Məlumdur ki, ərzaq təhlükəsizliyi nöqtəyi-nəzərindən, əhalinin keyfiyyətli kənd təsərrüfatı məhsulları ilə təmin olunması üçün patogenlərə davamlı bitkilərin yaradılması çox vacibdir. Biotexnologiya, seleksiya, gen-mühəndisliyi, genetik və molekulyar biologiyanın müxtəlif metodlarından istifadə etməklə biotik stres faktorlarına qarşı davamlı olan sortların alınması bu

gün qarşıda duran ən aktual məsələlərdən biridir. Bu istiqamətdə işlərin aparılması üçün Azərbaycanda bitkiləri yoluxduran əsas patogenlərin müasir molekulyar metodlarla dəqiq diaqnostikası, aşkar olunmuş fitoplazmaların identifikasiya edilərək məlumat bazası olan GENBANK-a daxil olunması və bununla yanaşı, ümumi məlumat bazasının da zənginləşdirilməsi də olduqca böyük əhəmiyyət kəsb edir.

**Tədqiqatın məqsədi və vəzifələri.** Təqdim olunan dissertasiya işində əsas məqsəd Azərbaycanın müxtəlif bölgələrində meyvə ağaclarında və tərəvəz bitkilərində fitoplazmaların aşkar olunması və onların müxtəlifliyinin molekulyar tədqiqi olmuşdur.

Bu məqsədlə aşağıdakı vəzifələr qarşıya qoyulmuşdur:

- Azərbaycanın müxtəlif bölgələrində fitoplazma xəstəliklərini aşkar etmək üçün monitorinqlərin aparılması və xarakterik simptomlara malik xəstə bitkilərin toplanması;
- Patogenlərin fitoplazmalar üçün universal praymerlərlə 16Sr Nested PZR metodu ilə ilkin diaqnostikasının həyata keçirilməsi;
- Aşkar olunmuş fitoplazmaların RFLP və sekvens vasitəsilə növ səviyyəsində identifikasiya edilməsi;
- Fitoplazmaların qeyri-ribosomal genlərinin xarakterizə edilməsi və bu genlər əsasında müxtəlif qrup fitoplazmalar üçün qrup spesifik Nested PZR test metodlarının hazırlanması;
- İdentifikasiya edilmiş müxtəlif qrup fitoplazma izolyatlarının genetik müxtəlifliyinin qeyri-ribosomal genlərin amplifikasiyasına əsaslanan MLSA metodunun köməyi ilə tədqiq edilməsi.

**İşin elmi yeniliyi.** Dissertasiya Azərbaycanda fitoplazmaların öyrənilməsinə həsr edilmiş ilk tədqiqat işidir. İlk dəfə olaraq, Abşeron yarımadasında, Quba və Şəki rayonlarında meyvə ağaclarından albalı, şaftalı, armud, ərik, alça, gavalı və əzgildə, tərəvəz bitkilərindən isə pomidor, bibər və badımcanda R16mF2 - R16mR1 və R16F2n - R16R2 universal praymerlərilə 16Sr Nested PZR nəticəsində fitoplazmalar aşkar olunmuş və onların növ səviyyəsində identifikasiyası həyata keçirilmişdir.

İlk dəfə olaraq, Azərbaycanda Avropa və Aralıq dənizi üçün endem hesab edilən '*Ca. P. solani*' fitoplazma növünün müxtəlif izolyatları aşkar edilmişdir. "Xromosom üzərində addımlama" metodu vasitəsilə Stolbur fitoplazmasının malat/sitrat simporter zülalını kodlaşdıran *citS* geninin nukleotid ardıcılığı tamamlanmış və onun üzərində Stolbur qrupu fitoplazmaları üçün yeni qrup-spesifik Nested PZR test metodu hazırlanmışdır.

Dünyada ilk dəfə olaraq fitoplazmalar üçün növlərarası rekombinasiyanın baş verməsi aşkar edilmişdir. Belə ki, *imp*, *aceF*, *secY* və *pnp* genetik lokusları əsasında MLSA nəticəsində Abşeron

yarımadasında yarpaqların qızarması simptomuna malik xəstə armud ağacında aşkarlanmış POI45.AZ izolyatının ‘*Ca. P. prunorum*’ və ‘*Ca. P. pyri*’ fitoplazma növləri arasında rekombinant olduğu müəyyən edilmişdir. ‘*Ca. P. brasiliense*’ növü Azərbaycanın Quba bölgəsində şaftalı ağacında aşkar edilmişdir ki, bu da indiyədək yalnız Braziliyada *Hibiscus*-da tapılmış bu fitoplazma növünün Braziliyadan kənarında və ağac bitkisinə aşkar olunması haqqında ilk məlumatdır. Dissertasiya işində ‘*Ca. P. brasiliense*’ fitoplazmasına görə spesifik olan və müqayisəli RAPD ilə klonlaşdırılmış qeyri-ribosomal *dnaK* geninin amplifikasiyasına əsaslanan yeni Nested PZR test metodu hazırlanmışdır.

**Praktiki əhəmiyyəti.** Dissertasiya işində ilk dəfə olaraq Azərbaycanda meyvə ağaclarında və tərəvəz bitkilərində fitoplazma xəstəliklərinin monitorinqi həyata keçirilmiş, onların ilkin diaqnostika və molekulyar identifikasiya metodları təkmilləşdirilmişdir.

Azərbaycanda aşkarlanmış fitoplazmalar taksonomik səciyyələndirilmiş və identifikasiya edilmiş fitoplazma növlərinin genetik müxtəlifliyinin tədqiqi üçün yeni spesifik Nested PZR test metodları hazırlanmışdır.

Azərbaycanda yayılmış, əksər meyvə və tərəvəz bitkilərini yoluxdurən fitoplazma xəstəliklərinin əlamətlərini, yayılma yollarını və onlara qarşı mübarizə tədbirlərini əhatə edən tövsiyyə xarakterli buklet nəşr edilərək fermerlər, aqronomlar və kənd təsərrüfatı universitetlərinin tələbələri və geniş oxucu kütləsinə təqdim edilmişdir.

**İşin aprobasiyası.** Dissertasiya işinin nəticələri “First International Transcaucasus Conference of Plant Pathology” (Tbilisi, 2008), “18th International Organization for Mycoplasmatology Congress” (Chianciano Terme, 2010), “2nd European Bois noir Workshop” (Castelbrando, 2011), “2nd International Phytoplasmatologist Working Group Meeting” (Neustadt an der Weinstrasse, 2011), “22<sup>nd</sup> International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops” (Rome, 2012) beynəlxalq elmi konfranslarında, “Phytoplasma Genome Sequencing Initiative” (Norwich, 2012) və “Methodologies to improve phytoplasma DNA extraction from plants and insects” (Ankara, 2012) mövzusunda beynəlxalq treyning-seminarlarda, həmçinin, AMEA Botanika İnstitutunun laboratoriya və elmi seminarlarında təqdim edilərək müzakirə olunmuşdur.

**İşin nəşri.** Dissertasiya materialları üzrə yerli və xarici nəşrlərdə 13 elmi əsər və 1 buklet çap olunmuşdur.

**Dissertasiyanın quruluşu və həcmi.** Dissertasiya işi girişdən, 7 fəsildən, ümumi yekundan, nəticələrdən və 304 adda ədəbiyyat siyahısından ibarətdir. Dissertasiya işi 50 şəkil və 20 cədvəl daxil olmaqla 194 səhifədə cəmlənmişdir.

## İŞİN MƏZMUNU

**Ədəbiyyat icmalı** fitoplazmalar haqqında müasir məlumatları əhatə edir. Bu fəsildə fitoplazmaların müasir təsnifatı təqdim edilmiş, təhlükəli fitoplazma xəstəlikləri, onların sahib bitkiləri və daşıyıcı həşərat vektorları nəzərdən keçirilmişdir. Fitoplazmaların törətdikləri xəstəliklərin əlamətləri ətraflı təsvir edilmişdir. Eyni zamanda, fitoplazmalara qarşı mübarizə üsullarına da xüsusi yer ayrılmışdır.

**Tədqiqatın obyektı və metodları.** Tədqiqat obyektı kimi, 2007-2009-cu illərdə Yanvar, Avqust və Sentyabr aylarında Azərbaycanın müxtəlif bölgələrindən toplanmış xəstə bitki nümunələrindən, eləcə də, neqativ kontrol kimi toplanmış sağlam bitki nümunələrindən istifadə olunmuşdur. Toplanmış bitki yarpaqlarının mərkəzi damarlarından DNT CTAB metoduna əsasən ekstraksiya edilmişdir (Maixner *et al.*, 1995). DNT-nin təmizlik dərəcəsi və qatılığı spektrofotometrik metodla öyrənilmişdir. DNT ekstraktlarında fitoplazmaların aşkar olunması R16mF2 - R16mR1 və R16F2n - R16R2 universal praymerlərlə 16Sr Nested PZR (Gundersen and Lee 1996) metoduyla həyata keçirilmişdir. 16Sr Nested PZR-in nəticələri 1%-li aqaroza gelində elektroforetik analiz olunmuşdur. Aşkarlanmış fitoplazmalar RFLP və sekvens analizlərlə növ səviyyəsində identifikasiya edilmişdir. RFLP-nin nəticələri 8%-li poliakrilamid gelində analiz edilmişdir. Sekvenslərin ilkin xromatoqramları Phred, Phrap və Consed (Ewing & Green, 1998) məntiqi proqramları vasitəsilə assamblə və redaktə edilmişdir. Nukleotid ardıcılıqlarının verilənlər bazasında homoloqların axtarılması Genbank məlumat bankı əsasında (<http://gib.genes.nig.ac.jp> saytında) BLASTN və BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) axtarış proqramlarının köməkliliyi ilə həyata keçirilmişdir. Nukleotid ardıcılıqları MEGA 4.0 proqram versiyası (Tamura, 2007) ilə filogenetik analiz edilmişdir.

XII-A (Stolbur) qrupu fitoplazmalarının genetik müxtəlifliyini daha dərindən tədqiq etmək üçün Stolbur fitoplazmasının SSH vasitəsilə əldə edilmiş SDR00C09 gen fraqmentinin nukleotid ardıcılığı əsasında malat/sitrat simporter zülalını kodlaşdıran *citS* geninin nukleotid ardıcılığı "xromosom üzərində addımlama" metodu ilə tamamlanmışdır. Qeyri-ribosomal *citS* geninin nukleotid ardıcılığı üzərində Stolbur qrupu fitoplazmaları üçün yeni qrup-spesifik praymerlər Consed proqramının "primer picking" funksiyası (Gordon *et al.*, 1998) vasitəsilə dizayn edilərək, Nested PZR test metodu hazırlanmışdır. Stolbur qrupu fitoplazmalarının genotipləşdirilməsi 4 qeyri-ribosomal genin amplifikasiyasına əsaslanan molekulyar tipləşdirmə metodu ilə həyata keçirilmişdir.

'*Ca. P. prunorum*', '*Ca. P. mali*' və '*Ca. P. pyri*' fitoplazma növlərinin

genetik müxtəlifliyi dörd müxtəlif *imp*, *aceF*, *secY* və *pnp* lokusları əsasında MLSA metoduyla tədqiq edilmişdir.

‘*Ca. P. brasiliense*’ növü üçün qeyri-ribosomal gen əldə etmək məqsədilə müqayisəli RAPD metodundan istifadə olunmuşdur (Foissac *et al.*, 2000). Müqayisəli RAPD vasitəsilə yalnız infeksiyalı bitkidən amplifikasiya edilmiş SVG28 fraqmenti plazmid vasitəsilə *E. coli* bakteriyasına transformasiya edilərək klonlaşdırılmış və əldə edilən klonlar sekvens edilmişdir. *E. coli* hüceyrələrinin hazırlanması və onların yüksək gərginlikdə elektroporasiya vasitəsilə transformasiyası Hanahan metoduna əsasən həyata keçirilmişdir (Hanahan *et al.*, 1991). Rekombinant *E. coli* bakteriyalarından plazmidlərin ayrılması Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kiti ilə qoyulmuş protokola əsasən yerinə yetirilmişdir.

## NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

### 1. Fitoplazmaların aşkar olunması və identifikasiyası

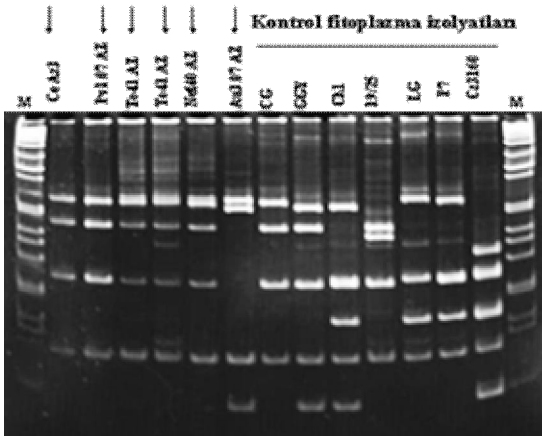
16S Nested PZR nəticəsində Quba rayonundan toplanmış bibər və badımcandan, eləcə də, gilə, armud, ərik, gavalı və şaftalı ağaclarından, Abşeron yarımadasından toplanmış armud, göyəm və pomidordan, Şəki rayonundan toplanmış əzgil və pomidordan ayrılmış DNT ekstraktlarından R16mF2 / R16mR1 və R16F2n / R16R2 praymerlərilə 1250 bp ölçülü 16S PZR məhsullar amplifikasiya edilmişdir. Neqatif kontrol qismində istifadə etdiyimiz sağlam bitki nümunələrindən PZR məhsul əldə edilməmişdir.

Amplifikasiya edilmiş 16S Nested PZR məhsullar sekvens edilmiş və nəticələr göstərmişdir ki, bibər (Pv1.07.AZ), badımcan (Au3.AZ), albalı (AZ3-Ce), pomidor (To41.08AZ, To42.08.AZ) və əzgil (Nef40.08.AZ) ‘*Ca. P. solani*’ (16SrXII-A, qeydiyyat nömrəsi EU552453), armud ağacları (PD36.AZ, PD43.AZ, Poi11.07.AZ, Poi45.08.AZ) “*Ca. P. pyri*’ (16SrX-C, qeydiyyat nömrəsi AJ542543), ərik (Azer4), alça (Prm01.08.AZ) və gavalı (Azer10) ağacları ‘*Ca. P. prunorum*’ (filogenetik qrup 16SrX-B, qeydiyyat nömrəsi AM933142), şaftalı ağacı (Peach19) isə ‘*Ca. P. brasiliense*’ (16SrXV, qeydiyyat nömrəsi AF147708) fitoplazması ilə yoluxmuşdur.

### 2. Azərbaycanda aşkarlanmış stolbur izolyatlarının genetik müxtəlifliyi

Azərbaycanda aşkar olunmuş stolbur izolyatlarının genetik müxtəlifliyi Avropadan olan stolbur izolyaları ilə birlikdə dörd qeyri-ribosomal genin (*citS*, *Stamp*, *secY*, and *vmp1*) amplifikasiyası vasitəsilə tədqiq edilmişdir.

*Vmp1* geni StolH10F1/StolH10R1 (I PZR) və TYPH10F/TYPH10R (Nested PZR) praymer cütükləri (Cimmerman et al., 2009) ilə Nested PZR vasitəsilə amplifikasiya olunmuşdur. Amplifikasiya edilmiş PZR məhsullar (1.4 kb) *RsaI* fermenti vasitəsilə restriksiyaya uğradılmışdır (Şəkil 1). RFLP-nin nəticəsindən görüldüyü kimi, Azərbaycandan olan stolbur izolyatları arasında iki müxtəlif genotip identifikasiya edilmişdir. Aşkar edilmiş stolbur genotiplərindən biri V1 genotipidir. V1 genotipi Quba rayonundan toplanmış saralmış bibər və soluxmuş albalı ağacı, Abşeron yarmadasından toplanmış pomidor və Şəki rayonundan toplanmış xəstə pomidor və əzgil ağacı nümunələrində aşkar edilmişdir. Azərbaycanda aşkar edilmiş digər stolbur genotipi indiyədək təsvir edilmiş *vmp* genotiplərindən fərqlənən yeni genotipdir. Quba rayonundan toplanmış badımcan nümunəsində aşkar edilmiş bu genotip V14 adlandırılmışdır.

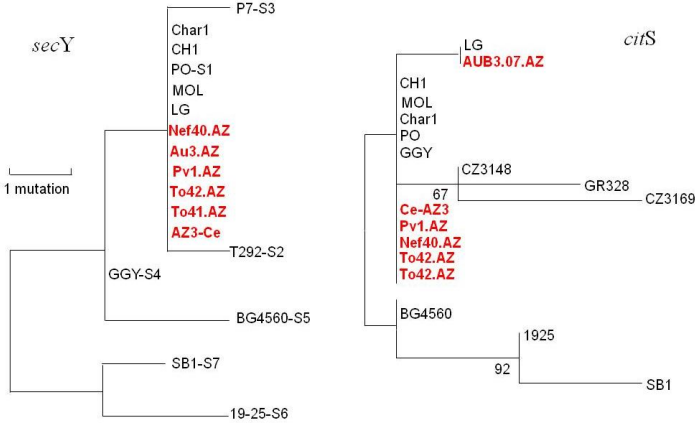


**Şəkil 1.** TYPH10F/TYPH10R Nested PZR məhsulların RFLP-*RsaI* analizi. Azərbaycanda aşkar olunmuş stolbur izolyatları oxla göstərilmişdir

*SecY* geni PosecF1/ PosecR1 və PosecF3/PosecR3 praymerləriylə Nested PZR vasitəsilə amplifikasiya edilmişdir. Nested PZR məhsullar sekvens olunmuşdur (Şəkil2). Nəticələr göstərmişdir ki, Azərbaycanın müxtəlif regionlarında aşkarlanmış bütün stolbur izolyatları Avropada geniş yayılmış və VKII qrupuna daxil olan S1 *secY* genotipinə malik olmuşdur. *CitS* geninin 991bp uzunluğunda fraqmenti tərəfimizdən dizayn edilmiş CitS-F3/CitS-R3 və CitS-F5/CitS-R4 (Nested PZR) praymer cütükləri ilə Stolbur qrupu fitoplazmaları üçün qrup-spesifik Nested PZR test metodu vasitəsilə amplifikasiya edilərək sekvens olunmuşdur (Şəkil 2).

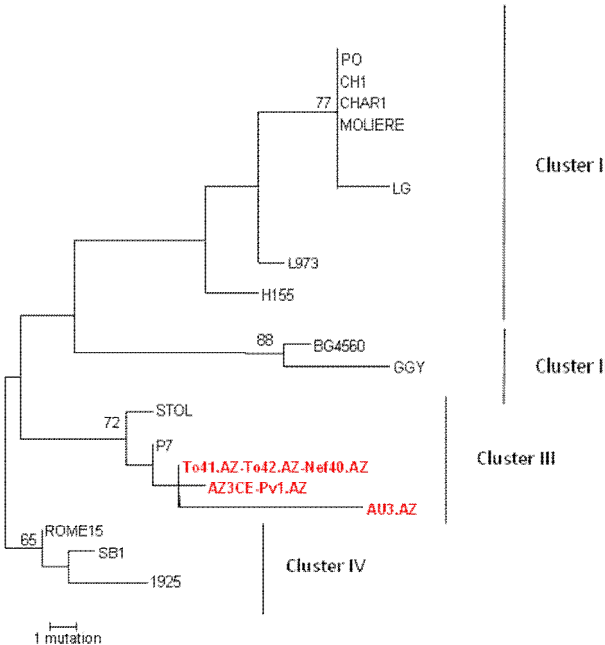
*Stamp* geninin amplifikasiyası StampF/STampR0 və STampF1/STampR1 praymer cütükləri ilə Nested PZR vasitəsilə həyata keçirilmişdir. Əldə edilmiş 578bp ölçülü fraqmentlər sekvens olunmuşdur (Şəkil 3).





**Şəkil 2.** Stolbur izolyatları üçün *SecY* və *citS* genlərinin nukleotid ardıcılıqları əsasında qurulmuş filogenetik ağaclar. Filogenetik ağaclar Mega4 proqramının Maximum Parsimony aləti vasitəsilə qurulmuşdur.

Nəticələr göstərir ki, *citS* geninin amplifikasiyası Azərbaycanda aşkarlanmış stolbur izolyatları arasında iki genotipi fərqləndirməyə imkan verir.



**Şəkil 3.** Stolbur izolyatları üçün *Stamp* geninin nukleotid ardıcılıqlarının əsasında Maximum Parsimony vasitəsilə qurulmuş filogenetik ağac. Buradaqların yanında verilmiş rəqəmlər bootstrap kəmiyyətini göstərir (500 təkrar). Azərbaycandan olan izolyatlar qırmızı ilə verilmişdir.

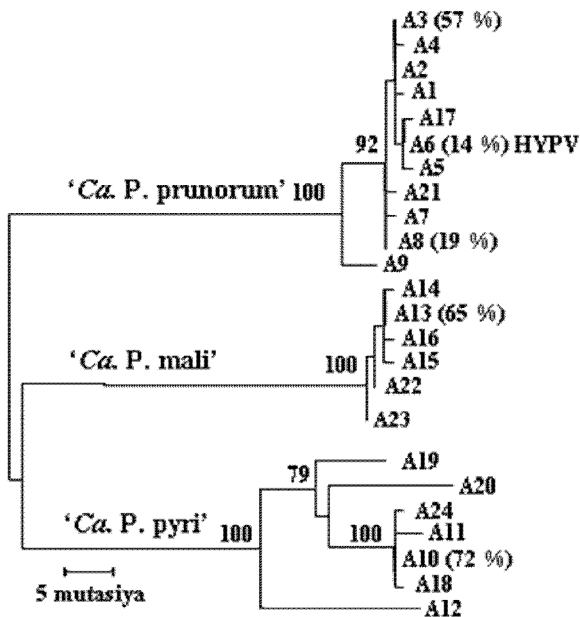
Stamp geninin amplifikasiyasına əsaslanan genotipləşdirmə zamanı Azərbaycanda aşkar olunmuş stolbur izolyatları arasında üç genotip fərqlənmiş və hər üçü eyni budaqda (*tuf-b* tip, klaster III) cəmlənmişdir.

### 3. Meyvə ağaclarında tapılmış fitoplazmaların MLSA tədqiqi

16SrX fitoplazma qrupunun multilokus ardıcılıqlı analizini (MLSA) həyata keçirtmək üçün 4 gen seçilmişdir: bunlardan ikisi karbon və nukleotidlərin metabolizmində iştirak edir, digər iki gen isə protein sintez edən aparatın komponentləri olan İMP və SecY immunodominant səth zülallarını kodlaşdırır.

*AceF*, *pnp*, *secY* və *imp* nested PZR testləri Fransa, Almaniya, İtaliya, İspaniya, Xorvatiya, İsveçrə, Böyük Britaniya, Macarıstan, Türkiyə, Yunanıstan, Azərbaycan və Livandan alınmış 197 fitoplazma izolyatından ibarət kolleksiyaya tətbiq edilmişdir. Nümunələrin çoxu (197-dən 157-si), 32 yoluxmuş *Cacopsylla Pruni* ('*Ca. P. prunorum*'-un həşərat vektoru) də daxil olmaqla Nested PZR testin dördünə də müsbət cavab vermişdir. Ardıcılıqların sıralanmaları göstərmişdir ki, '*Ca. P. prunorum*'-la müqayisədə '*Ca. P. pyri*'-nin *aceF* geninin nukleotid ardıcılığında dörd delesiya (cəmi 15 bp) və bir insersiya (3 bp) baş verir, '*Ca. P. mali*'-nin *aceF* geninin nukleotid ardıcılığı isə 48 bp-dən ibarət beş delesiya ilə fərqlənir. *Pnp* geninin nukleotid ardıcılığında heç bir delesiya və insersiya baş verməmişdir. *secY* genində "Ca.P.pyri" üçün 3 bp-dən ibarət bir delesiya müşahidə olunmuşdur. Bu dörd gen arasında ən dəyişkəni *imp* geninin olduğu aşkar edilmişdir. Hər biri 3 bp-dən ibarət iki delesiya '*Ca. P. prunorum*'-un *imp* genində yer almış; 9 bp-dən ibarət bir delesiya və hər biri 3 bp-dən ibarət iki insersiya '*Ca. P. mali*'-nin *imp* genini xarakterizə etdiyi halda, 3 bp-dən ibarət bir insersiya isə '*Ca. P. pyri*'-nin *imp* genində müşahidə olunmuşdur.

*AceF* markerin nukleotid ardıcılığı üç *Candidatus* növünün 197 izolyatı üçün sekvens edilmişdir (Şəkil 4). Nəticədə "Ca.P.prunorum" üçün on bir fərqli genotip (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A17, A21) müəyyən edilmişdir ki, bu genotiplərin əksəriyyəti bir-birindən bir və ya iki tək nukleotid polimorfizminə (SNPs- single nucleotide polymorphisms) görə fərqlənmişdir. Yalnız A9 genotipi (Azərbaycandan olan alça və ərək izolyatları) digər '*Ca. P. prunorum*' genotiplərilə müqayisədə 10-12 SNPs göstərmişdir. Tədqiq edilən izolyatların 57%-i A3 genotipinə aid olmuşdur. Bu genotip Fransa, Almaniya, İspaniya və İtaliyadan olan izolyatlarda aşkar edilmişdir.



**Şəkil 4.** 16SrX qrupuna daxil olan izolyatlarının *aceF* genetik lokusunun təkamül əlaqələri. Təkamül tarixi Maximum Parsimony üsulu ilə həyata keçirilmişdir. Replikat ağaclarının (500 replikat) faizi budaqların yanında göstərilib. A: filogenetik ağac faizlə göstərilib. HYPV isə hipervirulenliyi göstərir.

Digər iki genotip - A6 və A8 - müvafiq olaraq izolyatların 14% və 19%-ni təşkil etmişdir. Bu genotiplər Fransada, Xorvatiyada, Almaniyada, İtaliyada, Türkiyədə, İspaniyada və Azərbaycanda müəyyən edilmişdir. Yeddi *aceF* genotipi isə yalnız tək-tək ölkələrdə tapılmışdır, məsələn: A7, A9 və A17 müvafiq olaraq Xorvatiyada, Azərbaycanda və Türkiyədə müəyyən edilmişdir. "Ca. pruni" həşərat vektorunda "Ca. P. prunorum"-un beş *aceF* genotipi (A3, A5, A6, A8 və A21 genotipləri) müəyyən edilmişdir. "Ca. P. mali" üçün bir-birindən 1 SNP-dən 3 SNPs-ə qədər fərqlənən 6 genotip (A13, A14, A15, A16, A22, A23) arasında A13 genotipi üstünlük təşkil edərək (65%), Fransa, İtaliya və Almaniyadan olan nümunələrdə rast gəlinmişdir. "Ca. P. pyri" üçün bir-birindən 1 SNP-dən 24 SNPs-ə qədər fərqlənən yeddi genotip (A10, A11, A12, A18, A19, A20, A24) 'Ca. P. prunorum' genotiplərindən daha yüksək genetik müxtəliflik göstərmişdir. A10 genotipi tədqiq edilən izolyatların 72%-ni təmsil edərək müşahidə aparılmış doqquz ölkədən səkkizində müəyyən edilmişdir. Digər 6 genotipin hər biri yalnız bir ölkədə tapılmışdır.

*Pnp* və *secY* markerlərinin nukleotid ardıcılıqları üç fitoplazma növünün uyğun olaraq 172 və 157 izolyatı üçün təyin olunmuşdur (Şəkil 5). *Pnp* üçün 15, *secY* üçün isə 12 genotip fərqlənmişdir. 'Ca. P. prunorum' üçün 2 *pnp* və 3 *secY*, 'Ca. P. mali' üçün 5 *pnp* və 4 *secY* genotipi, 'Ca. P. pyri' üçün isə 8 *pnp* və 5 *secY* genotipi fərqlənmişdir.

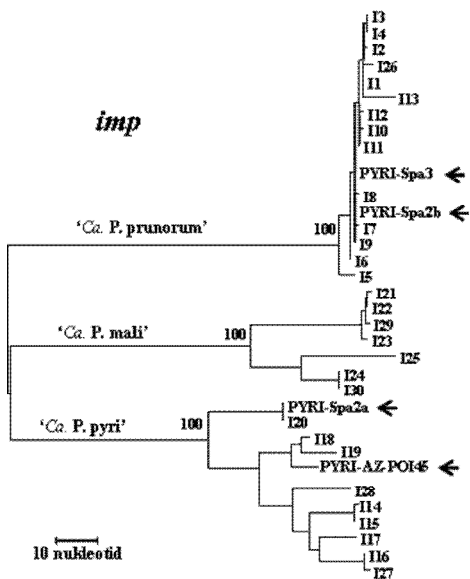
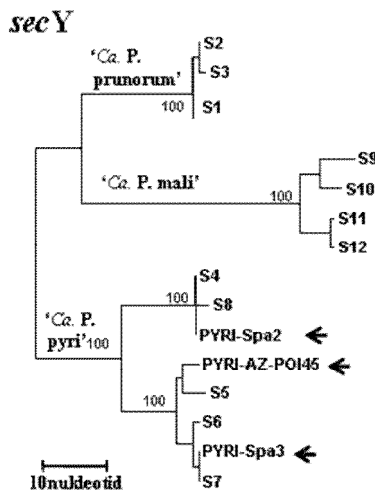
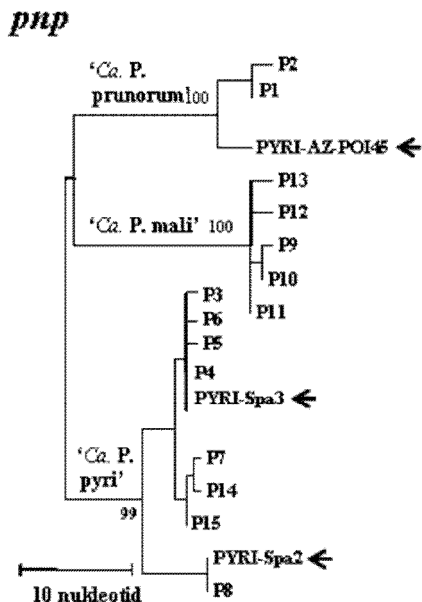
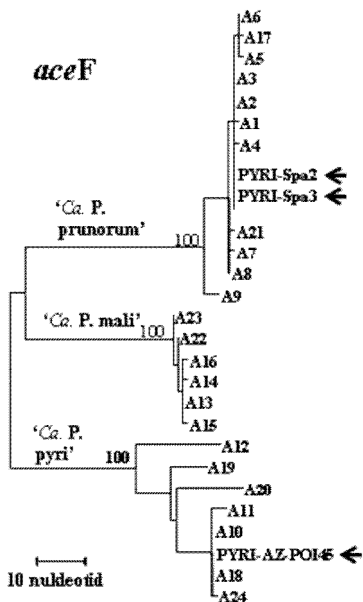


‘*Ca. P. mali*’, ‘*Ca. P. pyri*’ və ‘*Ca. P. prunorum*’ üçün uyğun olaraq 7, 9 və 14 genotip fərqlənmişdir. ‘*Ca. P. prunorum*’ üçün üstünlük təşkil edən genotip II olmuşdur ki, bu genotip 6 ölkədən olan 56 bitki və həşərat nümunələrində təyin olunmuşdur. Altı genotip 2-4 ölkədə və 8 genotip yalnız 1 ölkədə tapılmışdır. Yalnız 1 ölkədə tapılmış genotiplərdən Azərbaycanda tapılmış 15 genotipini və Türkiyədə tapılmış 126 genotipini göstərmək olar.

#### 4. ‘*Ca. P. pyri*’ və ‘*Ca. P. prunorum*’ növləri arasında rekombinasiya

Azərbaycan və İspaniyadan toplanmış xəstə bitki nümunələrindən ayrılmış ‘*Ca. P. pyri*’ izolyatlarının genotipləşdirilməsi göstərdi ki, onlardan bəziləri ‘*Ca. P. prunorum*’ ilə ümumi allellərə malikdirlər. Belə ki, MLSA nəticəsində Azərbaycandan AZ-POI45 və İspaniyadan Spa2 və Spa 3 adlı ‘*Ca. P. pyri*’ izolyatlarının hər iki genotipin, həm ‘*Ca. P. pyri*’, həm də ‘*Ca. P. prunorum*’ genotipinin genlərinə malik olduğu müəyyən edilmişdir ki, bu da adı çəkilən iki növ arasında növlərarası rekombinasiyanın mövcud olduğunu göstərir (Şəkil 7).

MLSA-nın nəticələri göstərmişdir ki, Azərbaycanda aşkar olunmuş AZ-POI45 izolyatının üç geni (*aceF*, *secY* və *imp*) ‘*Ca. P. pyri*’, *pnp* geni isə ‘*Ca. P. prunorum*’ genotipinə uyğundur. Spa3 izolyatı ‘*Ca. P. prunorum*’-un *aceF* və *imp* genlərinə malikdir, onun *pnp* və *secY* genləri isə ‘*Ca. P. pyri*’ genotipinə uyğundur. Spa2 izolyatı da həmçinin ‘*Ca. P. prunorum*’ genotipinə uyğun olan iki genə malikdir və digər iki geni isə ‘*Ca. P. pyri*’ genotipinə uyğundur. Bütün bu nəticələr ‘*Ca. P. pyri*’ izolyatlarının növlərarası rekombinant olduğunu göstərir. Spa2 izolyatı üçün iki müxtəlif *imp* ardıcılığının aşkar edilməsi çox maraqlıdır. Bu ardıcılıqlardan biri ‘*Ca. P. prunorum*’-a uyğundur, digəri isə ‘*Ca. P. pyri*’-nin *imp* ardıcılıqları ilə qruplaşmışdır. ‘*Ca. P. pyri*’-nin yalnız bir 16S rDNT ardıcılığı aşkar edildiyi üçün bunu qarışıq infeksiya ilə əlaqələndirmək olmaz. Ədəbiyyat məlumatlarına görə, bizim tədqiqata qədər fitoplazmalar arasında növlərarası rekombinasiyaya rast gəlinməmişdir. İlk dəfə olaraq biz ‘*Ca. P. pyri*’ və ‘*Ca. P. prunorum*’-un rekombinasiyaya məruz qaldığını müəyyən etmişik. PZR reaksiya zamanı çarpaz çirklənmənin mümkünlüyünü ehtimal etdiyimizçün təcrübə tərəfimizdən dəfələrlə təkrarlanmış, lakin hər dəfə eyni nəticələr alınmış və neqativ PZR kontrollar neqativ olaraq qalmışdır. AZ-POI45 ilə alınan nəticələri ətraflı nəzərdən keçirərək biz nəhayət PZR çirklənmənin mümkünlüyünü istisna etdik. Bu izolyat *pnp* geninin rekombinantıdır və o bütün digər məlum *pnp* genotiplərindən (P1 və P2) fərqlənir.



Səkil 7. 16SrX qrupuna daxil olan 'Ca. P. pyri' rekombinantları üçün *aceF*, *pnp*, *secY* və *imp* genetik lokuslarının təkamül əlaqələri.

Əgər bu nəticənin səbəbi PZR reaksiya zamanı çirklənmə olsaydı, *pnp* geninin nukleotid ardıcılığı P1 və P2-nin ardıcılıqlarına uyğun olardı. Biz *imp* geninin iki müxtəlif surətini müşahidə etdiyimiz Spa2 izolyatında 16S rDNT-nin sekvens olunmasından sonra ‘Ca. P. pyri’ və ‘Ca. P. prunorum’ arasında qarışıq infeksiyanı da istisna edə bildik. Lakin yalnız birinin rekombinant olduğu iki ‘Ca. P. pyri’ izolyatı arasında qarışıq infeksiyanın mümkünlüyünü istisna etmək olmaz. Digər ehtimal ondan ibarətdir ki, izolyat iki *imp* geni daşıyır ki, bunlardan birinin funksiyası normadan kənara çıxır. Lakin belə rekombinasiyaların mexanizmi hələ öyrənilməlidir.

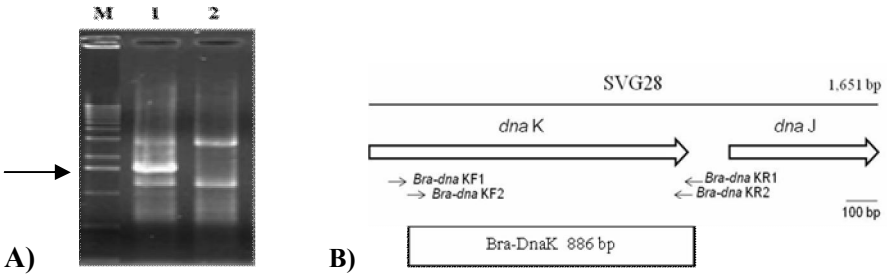
İki növ arasında rekombinasiyanın mümkün olması üçün onlar ümumi sahibə malik olmalıdırlar. ‘Ca. P. pyri’ şaftalı bitkisinə ötürülərək orada çoxalır və şaftalı yarpaqlarının saralıb burulması xəstəliyinə yol açır (Blomquist & Kirkpatrick, 2002). Şaftalı Avropanın Aralıq dənizi sahəsində ‘Ca. P. prunorum’ üçün çox yayılmış sahib bitkidir, buna görə də, şaftalıda növ-arası rekombinasiyanın baş verdiyini ehtimal etmək olar. Rekombinasiya həmçinin *Cacopsylla pyri* kimi ümumi həşərat vektorunda da baş verə bilər. Payızda daha çox həris olan *C. pyri* polifaq qidalandığı üçün hər iki fitoplazmanı uyğun sahib bitkidən ala bilər. Üç ‘Ca. P. pyri’ rekombinantının heç biri eyni MLSA genotipinə malik olmadığı üçün, rekombinasiyanın kifayət qədər tez-tez baş verdiyini ehtimal etmək olar.

## **5. Azərbaycanda aşkar olunmuş ‘Ca. P. brasiliense’ üçün növ-spesifik Nested PZR test metodunun hazırlanması**

“Ca. P. brasiliense” fitoplazma növünü aşkar etmək üçün spesifik diaqnoz metodları mövcud deyildir. Bunun əsas səbəbi bu fitoplazma üçün 16S rRNT genindən başqa heç bir geninin nukleotid ardıcılığının məlum olmamasıdır. Bu baxımdan da dissertasiya işində “Ca. P. brasiliense” növünün qeyri-ribosomal genetik lokusları xarakterizə edilməsi məqsədəuyğun hesab olunmuşdur. Bunun üçün hüceyrədən kənarda becərilməsi mümkün olmayan bakteriyaların genlərinin klonlaşdırılmasında tətbiq edilən strategiyadan, yəni müqayisəli RAPD metodundan istifadə olunmuşdur. Sağlam (PS) və *Suriname virescence* ( “Ca. P. brasiliense” növünün Surinamda tapılmış izolyatı SV) ilə yoluxdurulmuş bənövşə bitkilərindən ayrılmış 10nq DNT CATG1- CATG48 adlandırılmış və ATGCATGWSSWS (40% GC ) kimi dizayn edilmiş qırx səkkiz 15-li RAPD praymerləri vasitəsilə “təsadüfi PZR” metoduyla amplifikasiya edilmişdir. CATG28 15-li (ATGCATGACTCGAAC) praymeri sağlam bitkidən fərqli olaraq, SV ilə yoluxdurulmuş bənövşə bitkisinin 1.6 kbp DNT fraqmentinin amplifikasiyasına imkan vermişdir (Şəkil 8 A, zolaq 2).

SVG28 adlandırılan bu ampikon plazmid vasitəsilə *E. coli* bakteriyasına transformasiya edilərək klonlaşdırılmış və klonlar sekvens olunaraq EMBL məlumat bazasına (qeydiyyat nömrəsi FR717541) daxil edilmişdir.

Sekvensin nəticələrinin analizi göstərmişdir ki, SVG28 fraqmentinin nukleotid ardıcılığı 1651 bp uzunluqdadır və Yer fındığının *dnaK* və *dnaJ* istilik şoku zülallarını kodlaşdıran witches'-broom fitoplazma genləri ilə 84% uyğunluğa malikdir. SVG28 fraqmentinin nukleotid ardıcılığı əsasında qrup-spesifik BradnaKF1/R1 və Bra-dnaKF2/R2 praymer cütləri dizayn edilərək 16SrXV-A ("*Ca. P. brasiliense*") qrupuna daxil olan fitoplazmaları aşkar etmək üçün qeyri-ribosomal *dnaK* genini amplifikasiya edən qrup-spesifik PZR test metodu hazırlanmışdır (Şəkil 8 B). Hazırlanmış PZR testin spesifikliyini yoxlamaq üçün 16SrXV-A qrupunun 6 izolyatı ilə yanaşı 16SrXV qrupuna filogenetik cəhətdən yaxın olan 16SrII qrupunun fitoplazma izolyatları da testdən keçirilmişdir. Təcrübənin nəticələri göstərmişdir ki, tərəfimizdən hazırlanmış Bra-dnaK Nested PZR testi spesifikdir və 16SrXV qrupuna ən yaxın qrup hesab olunan 16SrII qrupunun uyğun fitoplazmalarını amplifikasiya etmir.

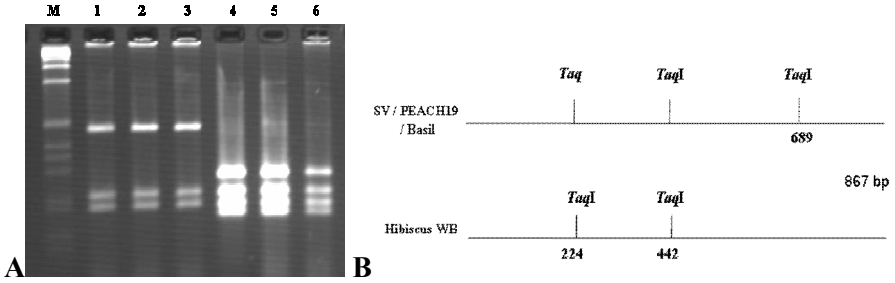


**Şəkil 8.** CATG28 15-li praymeri ilə RAPD (A). M-1Kb DNT marker (Invitrogen), 1-Suriname virescense ilə infeksiya edilmiş bənövşə, 2-sağlam bənövşə. SVG28 DNT fraqmenti saxlayan genin sxematik təşkili (B). Kiçik oxlar PZR-də istifadə edilən praymerlərin mövqeyini, ağ panel isə Nested PZR-in məhsulunu göstərir.

16SrXV-A qrupuna görə spesifik olan Bra-dnaKF2/R2 praymerlərilə alınmış PZR məhsulları *TaqI* fermentindən istifadə olunmaqla restriksiya edilmişdir (Şəkil 9 A). RFLP analizinin nəticələri göstərmişdir ki, *TaqI* vasitəsilə ampikonların restriksiyası müxtəlif "*Ca. P. brasiliense*" izolyatları arasında iki restriksiya profilini fərqləndirməyə imkan verir. HİB121, HİB 122, CB2 izolyatları eyni 0.5 kb uzunluğunda DNT zolağı ilə xarakterizə olunduqları halda PEACH19, SV və BASİL izolyatları 0.5 kb



uzunluğunda DNT zolağına deyil, 0,3 kbp DNT zolağına və 0.2 kbp uzunluğunda daha parlaq zolağa malikdirlər. Bu nəticələr genetik cəhətdən fərqlənən iki “*Ca. P. brasiliense*” qrupu izolyatlarının olduğunu göstərir. Spesifik PZR test ilə alınmış altı ampikonun sekvensinin nəticələri RFLP analizinin nəticələrini təsdiq edir. Belə ki, sekvensin nəticəsində də, iki fərqli ardıcılıq alınmışdır.



**Şəkil 9.** *TaqI* restriksiya fermenti vasitəsilə RFLP analiz (A). Restriksiya olunmuş DNT-lər 3% -li aqaroza gelində 1X TBE buferində elektroforez edilmişdir. M- 1Kb DNT ladder (Invitrogen), 1- Hib121, 2-Hib122, 3-Hib CB02, 4-SV, 5- Bas, Liviyadan reyhan, 6-Peach19.AZ, Azərbaycandan şaftalı ağacı. ‘*Ca. P. brasiliense*’ izolyatlarından amplifikasiya edilmiş *bradnaK* PZR məhsulların *TaqI* fermenti ilə restriksiya xəritəsi (B).

Birinci ardıcılıq (FR775800) HİB121, HİB122 və CB2 izolyatlarına uyğundur. PEACH19, BASİL və SV izolyatlarının nukleotid ardıcılığı isə tamamilə identik olmaqla ikinci ardıcılığı (FR717541) təşkil edir. Sekvensin nəticələri HİB121, HİB122 və CB2 izolyatlarının PEACH19, BASİL və SV izolyatları ilə müqayisədə 19 mutasiyaya malik olduğunu göstərir. *Hibiscus* izolyatlarının *Bra-dnaK* PZR məhsullarının 689-cu mövqeyində (Şəkil 9 B) olan G→T mutasiyası SV, BASİL və PEACH19 izolyatları ilə restriksiya profilləri arasındakı fərqə cavabdeh olan *TaqI* fermentinin restriksiya saytını yox edir.

## NƏTİCƏLƏR

1. R16mF2 - R16mR1 və R16F2n - R16R2 universal praymerlərilə 16Sr Nested PZR nəticəsində ilk dəfə olaraq Abşeron yarımadasında, Quba və Şəki rayonlarında meyvə ağaclarından albalı (*Cerasus avium* (L.) Moench.), şaftalı (*Persica vulgaris* Mill.), armud (*Pyrus communis* L.), ərik (*Armeniaca vulgaris* Lam.), alça (*Prunus divaricata* Ledeb.), gavalı (*Prunus domestica* L.) və əzgilin (*Mespilus germanica* L.), tərəvəz

bitkilərindən isə pomidor (*Lycopersicon esculentum* Mill.), bibər (*Capsicum annuum* L.) və badımcanın (*Solanum melanogena* L.) fitoplazmalarla yoluxması aşkar olunmuşdur.

2. PZR məhsulların RFLP analiz və sekvens olunması nəticəsində Azərbaycanda aşkar olunmuş fitoplazmaların növ səviyyəsində molekulyar identifikasiyası həyata keçirilmişdir. Nəticədə məlum olmuşdur ki, bibər, badımcan, albalı, pomidor və əzgil bitkiləri ‘*Ca. P. solani*’ (filogenetik qrup 16SrXII-A, qeydiyyat nömrəsi EU552453), armud ağacları ‘*Ca. P. pyri*’ (filogenetik qrup 16SrX-C, qeydiyyat nömrəsi AJ542543), ərik, alça və gavalı ağacları ‘*Ca. P. prunorum*’ (filogenetik qrup 16SrX-B, qeydiyyat nömrəsi AM933142), şaftalı ağacı isə ‘*Ca. P. brasiliense*’ (filogenetik qrup 16SrXV, qeydiyyat nömrəsi AF147708) fitoplazma növləri ilə yoluxmuşdur.
3. Avropa və Aralıq dənizi üçün endem hesab edilən ‘*Ca. P. solani*’ (16S XII Stolbur qrupu) fitoplazma növünün ilk dəfə olaraq Azərbaycanda müxtəlif izolyatları (Pv1.07.AZ, Au3.AZ, AZ3-Ce, To41.08AZ, To42.08.AZ, Nef40.08.AZ) aşkar edilmişdir.
4. ‘*Ca. P. solani*’ (16S XII Stolbur qrupu) fitoplazma növünün SSH vasitəsilə əldə edilmiş SDR00C09 gen fraqmentinin nukleotid ardıcılığı əsasında “xromosom üzərində addımlama” metodu vasitəsilə malat/sitrat simporter zülalını kodlaşdıran *citS* geninin nukleotid ardıcılığı tamamlanmış və onun üzərində Stolbur qrupu fitoplazmaları üçün yeni qrup-spesifik Nested PZR test metodu hazırlanmışdır.
5. Azərbaycanda aşkar olunmuş ‘*Ca. P. solani*’ fitoplazma növünün müxtəlif izolyatları ilə Avropa ölkələrindən olan stolbur izolyatları arasında qeyri-ribosomal *citS*, *Stamp*, *POsecY* və *vmp1* genləri əsasında qohumluq əlaqələri aşkar edilmişdir.
6. Dörd qeyri-ribosomal *imp*, *aceF*, *secY* və *pnp* genetik lokusları əsasında Multilokus Sekvens Analiz (MLSA) metodu ilə ‘*Ca. P. prunorum*’, ‘*Ca. P. mali*’ və ‘*Ca. P. pyri*’ fitoplazma növlərinin genetik müxtəlifliyi müəyyən edilmişdir.
7. Dünyada ilk dəfə olaraq fitoplazmalar üçün növlərarası rekombinasiyanın baş verməsi aşkar edilmişdir. Qeyri-ribosomal *imp*, *aceF*, *secY* və *pnp* genetik lokusları əsasında MLSA nəticəsində Abşeron yarımadasında yarpaqların qızarması simptomuna malik xəstə armud ağacında aşkarlanmış POI45.AZ izolyatının ‘*Ca. P. prunorum*’ və ‘*Ca. P. pyri*’ fitoplazma növləri arasında rekombinant olduğu müəyyən edilmişdir.
8. ‘*Ca. P. brasiliense*’ növü Azərbaycanın Quba bölgəsində şaftalı ağacında aşkar edilmişdir ki, bu da indiyədək yalnız Braziliyada

*Hibiscus*-da tapılmış bu fitoplazma növünün Braziliyadan kənarında və ağac bitkisinde aşkar olunması haqqında ilk məlumatdır.

9. Müqayisəli RAPD metodu ilə yalnız yoluxmuş bitkidən amplifikasiya edilmiş SVG28 fraqmentinin plazmid vasitəsilə *E. coli* bakteriyasına transformasiya edilərək klonlaşdırılması nəticəsində “*Ca. P. brasiliense*” fitoplazmasının qeyri-ribosomal *dnaK-dnaJ* genetik lokusu əldə edilmişdir.
10. “*Ca. P. brasiliense*” fitoplazmasını identifikasiya etməyə imkan verən, qeyri-ribosomal *dnaK* geninin amplifikasiyasına əsaslanan növ-spesifik Nested PZR test metodu hazırlanmışdır.

### **Dissertasiya mövzusu üzrə çap olunmuş əsas işlərin siyahısı**

1. Balakishiyeva G.Sh., Mammadov A.Ch. & Foissac X. (2008). Determination of phytoplasmas inducing fruit trees and legume diseases in Azerbaijan. Abstracts book of First International Transcaucasus Conference of Plant Pathology, Tbilisi, Georgia, September 25-27, p.23.
2. Balakishiyeva G.Sh., A. Ch. Mammadov, Sh. M. Bayramov & X. Foissac (2009). Determination and characterization of phytoplasmas inducing fruit trees and legume diseases in the districts of Azerbaijan. Transactions of the Institute of Botany of ANAS, XXIX, p. 609-614.
3. Fialova R., Valova P., Balakishiyeva G., Danet J. L., Şafarova D., Foissac X. & Navratil M. (2009). Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in south Moravia (Czech Republic). Journal of Plant Pathology, 91, p. 411-416.
4. Balakishiyeva G., Danet J.L., Qurbanov M., Mamedov A., Khey-Pour A. & Foissac X. (2010). First report of phytoplasma infections in several temperate fruit trees and vegetable crops in Azerbaijan. Journal of Plant Pathology, 92, (4, Supplement), p. 115.
5. Balakishiyeva G., Mammadov A., Danet J.-L., Salar P. & Foissac X. (2010). Detection and characterization of *Ca. P. brasiliense* from yellowing peach tree in Guba region of Azerbaijan. Proceedings of ANAS (Biological Sciences), 65(5-6), p. 158-163.
6. Balakishiyeva G., Qurbanov M., Mammadov A., Bayramov S., Aliyev J. & Foissac, X. (2011). Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma brasiliense*’ in a new geographic region and existence of two genetically distinct populations. European Journal of Plant Pathology, 130, p. 457-462.
7. Danet J.-L., Balakishiyeva G., Cimerman A., Sauvion N., Marie-

Jeanne V., Labonne G., Lavina A., Batlle A., Križanac I., Škorić D., Ermacora P., Ulubaş Serce C., Caglayan K., Jarausch W. & Foissac, X. (2011). Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and the existence of inter species recombination. *Microbiology*, 157, p. 438 - 450.

8. Fabre A., Balakishiyeva G., Ember I., Acs Z., Kölber M., Danet J.-L. & Foissac X. (2011). Heterologous expression and genetic diversity of StAMP the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma. In: Second European Bois Noir Workshop. Angelini, Castelbrando - Cison di Valmarino (TV), Italy, Petria, p. 79.

9. Balakishiyeva G., Gurbanov M., Mammadov A., Bayramov S., Aliyev J. & Foissac X. (2011). Detection of ‘Candidatus Phytoplasma brasiliense’ in a new geographic region and existence of two genetically distinct dnaK genotypes. In: Second International conference of the International Phytoplasmatologists Working Group. Neustadt an der weinstrasse, Rheinland-Pfalz, Germany: Bulletin of Insectology, 64 (Supplement) p. 61-62

10. Fabre A., Balakishiyeva G., Ember I., Omar A.F., Acs Z., Kölber M., Kauzner L., Bartola M, Danet J.-L. & Foissac X. (2011) Stamp encoding the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma is useful for molecular epidemiology. In: Second International conference of the International Phytoplasmatologists Working Group. Neustadt an der weinstrasse, Rheinland-Pfalz, Germany: Bulletin of insectology, 64 (Supplement), p. 21-22.

11. Balakışiyeva G.Ş., Məmmədov Ə.Ç. & Hüseynova İ.M. (2012) Fitoplazmalar-bitki patogenləridir. AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), 67(1), p. 39-52.

12. Balakishiyeva G. Sh., Danet J.-L., Mammadov A.Ch., Huseynova I.M. & Foissac X. (2012). Genetic variability of stolbur phytoplasma in Azerbaijan. AMEA-nın məruzələri, LXVIII cild, N 2, p. 66-73.

13. Balakishiyeva G., Danet J.-L., Mammadov A., Batlle A., Laviña A., Huseynova I. & Foissac X. (2012). Evidence for “Ca. P. pyri” and “Ca. P. prunorum” inter-species recombination. Book of Abstracts of 22<sup>nd</sup> International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, June 3-8., COST FA 0807, p. 99.

14. Balakışiyeva G., Məmmədov Ə. & Hüseynova I. M (2012) Azərbaycanada fitoplazma xəstəlikləri. Bakı: Elm, 48 səh.

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРАСТРАНЕНИЯ И РАЗНООБРАЗИЯ ФИТОПЛАЗМЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПЛОДОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ И ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

### РЕЗЮМЕ

Диссертационная работа посвящена исследованию распространения и разнообразия фитоплазменных болезней плодовых деревьев и овощных культур в Азербайджане. Впервые в Апшеронском полуострове, в Губинском, Шекинском районах Азербайджана среди фруктовых деревьев у вишни, персика, груши, абрикоса, алчи, сливы и мушмулы германской, а среди овощных растений в томате, перце и в баклажане при помощи универсальных праймеров (R16mF2 / R16mR1 и R16F2n / R16R2) в результате 16S р Нестед ПЦР были обнаружены фитоплазмы. Идентификация обнаруженных фитоплазм на уровне вида осуществлялась посредством RFLP и секвенирования ПЦР продуктов.

С помощью метода “прогулки по геному” на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена SDR00C09 фитоплазмы столбур, полученного посредством SSH, была завершена нуклеотидная последовательность гена *citS*, кодирующего белок малат / цитрат симпортер и на этой основе был разработан новый групп-специфичный Нестед ПЦР тест метод для фитоплазм группы Столбур. На основе генов *citS*, *Stamp*, *POsecY* и *vmp1* было изучено генетическое разнообразие между изолятами Столбура обнаруженными в Азербайджане и в европейских странах.

Впервые в мире у фитоплазм было обнаружено наличие межвидовой рекомбинации. В результате Мультилокусного Секвенса Анализа на основе *imp*, *aceF*, *secY* и *pnp* генетических локусов было установлено, что POI45.AZ изолят, обнаруженный в больном грушевом дереве с симптомом покраснения листьев в Апшеронском полуострове, является рекомбинантом между видами фитоплазм ‘*Ca. P. prunorum*’ и ‘*Ca. P. rugii*’.

‘*Ca. P. brasiliense*’ был обнаружен в персиковом дереве в Губинском районе. Это первое обнаружение этого вида за пределами Бразилии в растении, отличном от *Hibiscus*. В диссертационной работе был разработан Нестед ПЦР тест метод специфичный для фитоплазмы ‘*Ca. P. brasiliense*’ основанный на амплификации нерибосомального *dnaK* гена, клонированного с помощью сравнительного RAPD метода.

**MOLECULAR STUDY OF THE DISTRIBUTION AND DIVERSITY  
OF PHYTOPLASMA DISEASES IN FRUIT TREES AND  
VEGETABLE CROPS IN AZERBAIJAN**

**SUMMARY**

The molecular study of the distribution and diversity of phytoplasma diseases in fruit trees and vegetable crops in Azerbaijan are presented in the thesis. In the first time in the Absheron peninsula, Guba and Shaki regions on cherry, peach, pear, apricot, cherry-plum and medlar tree samples and on vegetable crops: on aubergine, pepper and tomatoes phytoplasmas were detected by 16S-rDNA nested PCR with the universal primers for phytoplasmas R16mF2 / R16mR1 and R16F2n/R16R2. Taxonomic characterization of detected phytoplasmas were realized by RFLP analysis and the sequencing of the PCR products.

Partial gene sequence SR01H10, issued from a suppression subtractive hybridization (SSH) survey of the Stolbur genome subjected to Genome walking amplification, obtained completed sequence of *citS* gene and were developed a new marker based on this non-ribosomal gene encoding the malate/citrate symporter. Stolbur phytoplasma isolates detected in Azerbaijan were subjected to genotyping on four non-ribosomal genes: *citS*, *Stamp*, *secY*, and *vmp1*.

The genetic diversity of three temperate fruit tree phytoplasmas ‘*Ca. P. prunorum*’, ‘*Ca. P. mali*’ and ‘*Ca. P. pyri*’ has been established by multilocus sequence analysis. For the first time to our knowledge, evidenced the existence of inter-species recombination between ‘*Ca. P. pyri*’ and ‘*Ca. P. prunorum*’. Genotyping of Azerbaijanese and Spanish ‘*Ca. P. pyri*’ isolates showed that they shared some alleles with ‘*Ca. P. prunorum*’.

Detection of ‘*Ca. P. brasiliense*’ was performed for the first time in a plant other than hibiscus and from a location outside of Brazil. It was detected in a peach tree in the Guba region. A test for the detection of ‘*Ca. P. brasiliense*’ was developed and was based on the amplification of the non ribosomal *dnaK* gene which had been cloned upon comparative RAPD. This new detection assay should help surveying for ‘*Ca. P. brasiliense*’.

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА  
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

---

*На правах рукописи*

**ГЮЛЬНАРА ШАММЕД кызы БАЛАКИШИЕВА**

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРАСТРАНЕНИЯ И  
РАЗНООБРАЗИЯ ФИТОПЛАЗМЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПЛОДО-  
ВЫХ ДЕРЕВЬЕВ И ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР В АЗЕРБАЙДЖАНЕ**

2415.01 – Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

*диссертации на соискание ученой степени доктора  
философии по биологии*

**Баку – 2013**