

АРПАНИНГ САРИҚ ПАКАНАЛИК ВИРУСИ ШТАММЛАРИ ИДЕНТИФИКАЦИЯСИ ВА МОЛЕКУЛЯР ДИАГНОСТИКАСИ

Махмудов Т.Х

Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ЎзРФА
Адилов Б.Ш.

Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ЎзРФА
Қодирова З.Н.

Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ЎзРФА
<https://doi.org/10.5281/zenodo.6960800>

Аннотация. Ушбу тадқиқот иши Тошкент вилояти Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти тажриба майдонида экилган буғдойнинг бир нечта навларида арпанинг сариқ паканалик вируси штамmlарининг тарқалиши ва уларни полимераза занжир реакцияси усулида аниқлашдан иборат

Калит сўзлар: арпанинг сариқ паканалик вируси, полимераза занжир реакцияси, штамм

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ШТАММОВ ВИРУСА ЖЁЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯМЕНИЯ

Аннотация. В данной научно-исследовательской работе приведены сведения о распространённости штаммов вируса желтой карликовости ячменя на нескольких сортах пшеницы, посеянной на экспериментальном участке института Генетики и экспериментальной биологии растений Ташкентской области, их идентификация методом полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: вирус жёлтой карликовости ячменя, полимеразная цепная реакция, штамм

IDENTIFICATION AND MOLECULAR DIAGNOSTICS OF BARLEY YELLOW DWARF VIRUS

Abstract. This research work provides information on the prevalence of the strains of barley yellow dwarf virus on several wheat varieties planted on the experimental field of the Institute of Genetics and Experimental Plant Biology in the Tashkent region, their identification by the polymerase chain reaction method.

Keywords: barley yellow dwarf virus, strain, polymerase chain reaction

КИРИШ

Ер юзида ғалла ўсимлигини касаллантирувчи вируслар сони 100 дан ошган бўлиб, Европа мамлакатларида уларнинг 40 га яқини идентификация қилинган. Шулардан Ўзбекистонда Арпанинг сариқ паканалик лютеовируси, буғдойнинг йўл-йўл мозаика потивируси ва арпанинг сариқ йўл-йўл мозаика рабдовируслари аниқланган [Горбунова 1966], [Қадирова 2002].

Ўзбекистон Республикаси вилоятлар кесимида ғалла ўсимлигида учрайдиган вирусларининг тарқалиш даражаси ўрганилган. [Қодирова.З.Н.,Махмудов.Т.Х, 2020]. Ғалла ўсимлигида учрайдиган Арпанинг сариқ паканалик вируси (АСПВ). лютеовируслар гуруҳига кириб, деярли барча ғалла етиштирувчи мамлакатларда тарқалган. АСПВ сферик шаклга эга бўлиб, диаметри 25 нм га тенг. АСПВ нинг тозаланган препаратидидаги седиментация коэффициентлари 115-118 S , вириони 28% нуклеин кислота ва 72% оксил,

геноми бир ҳалқали РНК дан иборат. Иссиклик тасирида инактивация нуқтаси 60°-75°С ни ташкил этади. Вирионлар ўсимликлар флорасида тўпланади. Унинг асосан 5 та штамми аниқланган бўлиб, улар PAV, MAV, SGH, RMV ва RPVлардир., АСПВ-PAV штамми деярли барча ҳудудларда тарқалганлиги аниқланган [Z.Kadirova, H.Makkouk, 2004, T.Махмудов 2021]. Ўзбекистон ҳудудида АСПВнинг штаммлари нитроцеллюлоза мембранасида иммуноблотинг усулида аниқланган бўлиб, ҳозирги кунда полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усулида фитопатоген вирусларни диагностика қилиш замонавий аниқ ташхис қўйиш усулларида бири ҳисобланади. Бугунги кунда Ўзбекистонда бир қатор вируслар, жумладан картошканинг Х вируси, олхўри чечаги вируси, беда мозаика вируси каби вирусларни ПЗР усули ёрдамида молекуляр диагностика, вирус штаммларининг молекуляр идентификацияси амалга оширилган ҳамда вируснинг ўсимлик айрим физиологик хусусиятларига таъсири ўрганилган [Fayziyev, 2020, Husanov, 2020].

Ушбу илмий тадқиқот ишининг мақсади, Тошкент вилояти иқлим шароитида тарқалган арпанинг сариқ паканалик вируси штаммларининг идентификацияси ва молекуляр диагностикасини полимераза занжир реакцияси усулида амалга ошириш ҳисобланади.

ТАДҚИҚОТ МАТЕРИАЛЛАРИ ВА МЕТОДОЛОГИЯСИ

Тадқиқот объекти сифатида Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг тажриба далаларида ўстирилаётган буғдой нав ва тизмаларида илмий тадқиқот ишлари олиб борилди.

Буғдойнинг маҳаллий ва хорижий навлари ғалла ширалари ёрдамида АСПВ билан касаллантирилди ва изоляторларда ўстирилди. АСПВ билан касаланган буғдой ўсимликларидан касаллик аломатларига қараб намуналар йиғилди. Ўсимлик намуналари табиий ҳолатини сақлаб туриш учун -20°С хароратда музлатгичда сақланди.

Ўсимлик намуналаридан АСПВ РНК “Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit Thermo Fisher USA” реактивлар тўплами ёрдамида ажратиб олинди. Тескари транскрипция реакцияси учун “ОТ-1” реактивлар тўплами (Синтол, Россия), ПЗР утказиш учун “PLATINUM HS PCR 2X MM 200 RXNS PCR” реактивлар тўплами, ҳамда АСПВ ва унинг штаммлари учун (Синтол, Россия) праймерлардан фойдаланилди.

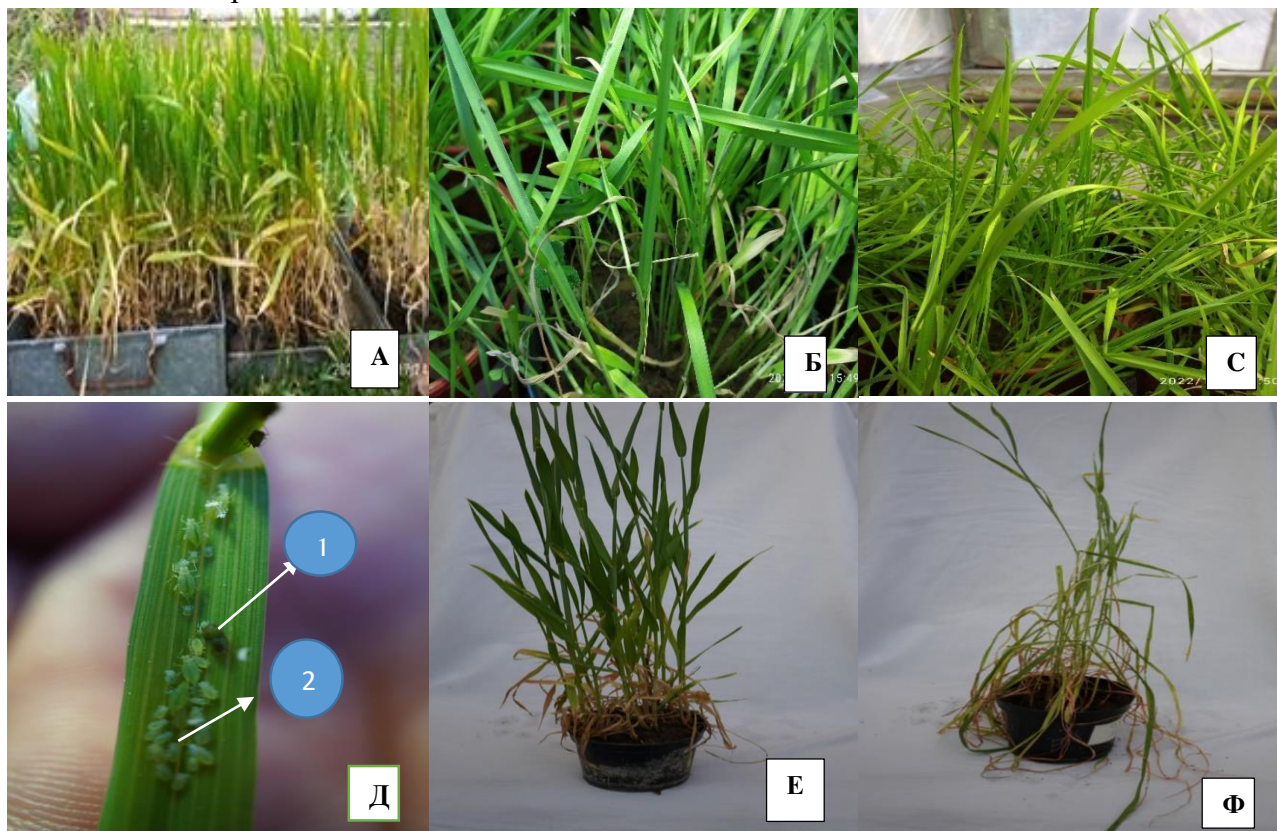
Тадқиқотларда касалланган буғдой ўсимлигидан АСПВ РНК ажратиш, Тескари транскрипция ва ПЗР жараёнлари реактивлар тўпламлари ишлаб чиқарувчининг тавсияси асосида олиб борилди.

ТАДҚИҚОТ НАТИЖАЛАРИ

Институт тажриба далаларида етиштирилаётган ғалла ўсимликларидан АСПВни ажратиш ва ўрганиш мақсадида буғдойнинг Қайроқтош, Оқ марварид, Паҳлавон, Бардош, Илғор, Морокко, Гром навлари уруғлари гултувакларга экилди ва касаллик аломатлари ривожланган АСПВ га табиий инфекцион бўлган, АСПВга хос касаллик аломатлари мавжуд кўчатзорларга апрель ойида жойлаштирилди ва майсаларнинг ўсиши, касаллик аломатлари ривожланиши ҳамда уларда ўсимлик битлари (ширалари) миграцияси ва кўпайиши кузатиб борилди.

Буғдойнинг барча навларида ўсимлик битлари (ширалар) (1-расм, D) ва шу билан бирга АСПВга хос касаллик аломатларининг ривожланиши кузатилди, яъни ўсимликнинг барг учидан сарғайиши, сўнг ўсимлик сарғайиши, ўсишдан ортда қолиб паканилиги ва қуриб қолиш ҳолатлари кузатилди (1-расм, А, С, Ф). Тажриба ўсимликларимизда катта ғалла

шираси -*Sitobion avenae* F., черемуха шираси- *Rhopalosiphum padi*, оддий ғалла шираси - *Schizaphis graminum* ривожланди. Шира тури ЎзРФА Зоология институти кичик илмий ходими Ш. Назаров томонидан аниқланди.



**1-расм АСПВ нинг буғдой ўсимликларидаги касаллик аломатлари
А, С, Ф -АСПВ билан касалланган буғдой ўсимликлари, В, Е- соғлом ўсимликлар,
Д-ғалла ширалари 1-*Rhopalosiphum padi* 2- *Schizaphis graminum***

Шираларнинг вирофорблигини аниқлаш мақсадида изоляция хоналарида буғдойнинг Қайроқтош ва Бардош навларини гултувакларда ўстирилиб, 5-6 смли майсаларнинг ҳар бирига 5тадан ширалар ўтказилди. Уларда ҳам АСПВга хос белгилар кузатилди (2-расм).



2-расм. Ғалла ширалари ёрдамида АСПВ юктирилган буғдой майсалари
Касаллик аломатлари аниқ кўринган буғдой ўсимлик баргларида АСПВини изолятларини аниқлаш мақсадида полимерза занжир реакцияси олиб борилди.

Ўсимлик намуналари ҳовончага солиниб, суяқ азот ёрдамида гомогенизация қилинди. Гомоген массадан 200 мг 1,5 мл ҳажмдаги эппендорф пробиркасига солинди, 1

мл лизис буфер ва меркаптаэтанол солиниб вортексланди. Хона хароратида 3 дақиқа инкубация қилнди. 2600 айл./дақ тезликда 5 дақиқа центрифугаланди. Центрифугаланган пробирканинг супернатанти бошқа пробиркаларга солинди. Пробиркаларга 1:1,5 нисбатда 96% ли этанол солиниб вортексланди. 700 µl эритма спин-колонкага солинди (эппендорф пробирка билан) солинди ва 12000 айл./дақ тезликда 15 секунд центрифугаланди.

700 µl юувчи буфер №1 спин-колонкага солинди. Центрифугада 12000 айл./дақ тезликда 15 сек центрифугаланди, сўнг спин-колонкалар янги пробиркага олинди. Кейин 500 µl юувчи буфер №2 спин-колонкага солинди ва 12000 айл./дақ тезликда 15 секунд центрифугаланди. Пробиркани 12000 айл./дақ тезликда 15 секунд центрифуга қилинди. спин-колонкалар янги пробиркага солинди ва сорбент мембрана устига марказий қисмига 100 µl Rnase-Free water солиниб, хона хароратида 2 дақиқа инкубация қилиниб, 12000 айл./дақ тезликда 2 дақиқа центрифугаланди ва элюция қилинган РНК эппендорф пробиркага олинди ва - 20°C харорат музлатгичда сақланди.

1-жадвал АСПВ штаммларининг праймерлари

Shu-F	TACGGTAAGTGCCCAACTCC
Yan-R	TGTTGAGGAGTCTACCTATTTG
S2a-F	TCACCTTCGGGCGTCTCTATCAG
S2b-F	TCACCTTCGGGCGTCTCTTTCTG

Ажратиб олинган АСПВ РНК тескари транскрипция, қДНК синтезида универсал Yan-R праймери фойдаланилди ва ПЗР MiniAmpTM Plus Thermal Cycler (Applied BioSystems, USA) амплификаторида амалга оширилди. [Carolyn M. Malmstrom, Ruijie Shu, 2004]

АСПВ нинг ORF-3 генининг тескари транскрипцияни амалга ошириш учун қуйидаги таркибий қисмлар ишлатилди: тескари транскрипция қДНК олиш учун “OT-1” реактивлар тўплами кўрсатмаси асосида аралашма (master mix) тайёрланиб олинди бу икки босқичда амалга оширилди.

1-босқич: RNK-5 µl, ddH₂O-2 µl, Yan-R праймер - 2 µl микропробиркага солиб, 70 °C 2 дақ. амплификаторга қўйилди. Кейин амплификатордан намуналар олиниб муз устига қўйилди.

2-босқич: 2x ПЗР буффер -8 µl, dNTP-2 µl, MMLV-RT-1 µl, аралашма (master mix) тайёрланди, ва 1 босқич аралашмага қушилди

Тескари транскрипция термоциклик дастури: 37°C - 60 дақиқа, 70°C - 10 дақиқада 1 циклда давом этади.

Синтез қилинган қДНКни ПЗР қуйиш учун қуйидаги таркибий аралашма (master mix) тайёрланди: PLATINUM HS PCR 2X Master Mix (Invitrogen, USA) тўпламидан Platinum Master Mix-12,5µl, ddH₂O- 4,5µl, Yan-R- µl, S^hu-F- µl, S2a-F- µl, S2b-F- µl, cDNK-4µl. ПЗР термоциклик дастури: бошланғич денатурация - 94°C 10 дақиқа 1 цикл; денатурация 94°C 10 секунд, отжиг - 55°C 30 секунд ва элонгация 72°C 1 дақиқа 35 циклда такрорланди; якуний элонгация - 72°C 10 дақиқа давом этди.

ПЗР маҳсулотлари анализи электрофорез ёрдамида 10x трис-борат-ЕДТА буфериди (TBE, Thermo Scientific) тайёрланган 2% агароза гелида, этидиумбромид билан аниқланди. 10 мкл намунага 3 мкл бўёқ (6x DNA loading dye, Fermentas) ва агароза чуқурчасига намуна билан биргаликда солинди. Маркерлар сифатида ДНКнинг маълум

Ўлчамдаги 100bp DNA Lader (Invitrogen, USA) молекулалари аралашмасидан фойдаланилди. Электрофорез 100В да 60 дақиқа давомида горизонтал электрофорез CE-2(Хеликон, Россия) ёрдамида амалга оширилди.



3-расм. АСПВ штамларининг ПЗР таҳлили.

Гел трансиллюминатор Квант-С (Хеликон, Россия) да олинган электрофореграмма натижасига кўра буғдойнинг Қайроқтош навида *АСПВ-PAV* штамга хос 600 bp ампликон ва ундан ташқари ушбу навнида АСПВ-RPV штамга хос 372 bp ампликон борлиги аниқланди. Иккинчи ва учинчи намуналарда АСПВ аниқланмади. Тўртинчи намуна Морокко навида ва олтинчи намуна Бардош навида *АСПВ-RPV* штамга хос 372 bp ампликон борлиги аниқланди.

ХУЛОСА: Шундай қилиб, Тошкент вилояти Қибрай тумани Дўрмон Институт тажриба даласига экилган буғдойнинг табиий инфекцион фонида *АСПВ* ва унинг ташувчилари-ўсимлик битлари буғдой майсаларига ўтказилди ва уларда кўпайтирилди. Касаллик аломатлари ўрганилди ва намуналар йиғилди. Йиғилган намуналардан *АСПВ* РНК си ажратилди. Ажратиб олинган *АСПВ* РНК си ОТ-ПЗР усулида ўрганилди. Тадқиқод натижасида буғдой навлари *АСПВ-PAV* ва *АСПВ-RPV* штамлари билан зарарланганлиги аниқланган. Буғдойнинг Қайроқтош нави *АСПВ*нинг PAV ва RPV штамлари билан ва Морокко, Бардош навлари эса *АСПВ*нинг RPV штамми билан касаланганлиги аниқланди.

МУҲОКАМА:

Тадқиқотимиз натижалари олдинги кўплаб тадқиқотларда кўрсатилган арпанинг сарик паканалик *АСПВ-PAV* ва *АСПВ-RPV* штамлари буғдойнинг касаллиптирувчи преобладаконт штамлар эканлигига мос келади. *АСПВ-PAV* Эроннинг барча минтақаларида етиштирилаётган дон экинларида BYDV вирусларнинг асосий серотипи эканлиги аниқланди (**Rastgou va бошқ., 2004b**). Бундан ташқари 2013 йилдан 2015 йилгача Миннесота ва Жанубий Дакота тўпланган 463 та намуналардан, тахминан 50%-да (n = 222) *АСПВ* вирус мавжудлиги аниқланди. Вирус билан зарарланган намуналарнинг

аксариятида ($n = 146$) арпанинг сариқ паканалик PAV штамми аниқланган (Anil Adhikari ва бошқ., 2020).

Ушбу тадқиқотда қўлланилган ОТ-ПЗР таҳлили Ўзбекистонда бугдойда АСПВ инфекциясини молекуляр диагностика қилишда фойдали эканлигини исботлади. Вирус хилма-хиллигини тушуниш бизга тегишли бугдой вируслари карши кураш чоралари ишлаб чиқишга ёрдам беради, шу жумладан препаратларни ишлаб чиқиш ва вирусларга чидамлилиқ бугдой генотипларни селекция қилиш ва қишлоқ хужалигига тадбиқ қилиш муҳим ҳисобланади.

REFERENCES

1. Горбунова Н.И., Успенская Н.В., и Шевакова, М.Н. 1966. Полосатой мозаики пшеницы в Узбекистане . Вирусные болезни сельскохозяйственных растений и методы защиты. Киев.. 378-381 стр.
2. K.M. Makkouk, S. Kumari, Z. Kadirova, A. Zueva, First record of Barley yellow striate mosaic virus and Cereal yellow dwarf virus-RPV infecting wheat in Uzbekistan. Plant Disease /vol.85 No.10 October 2001
3. Z.N. Kadirova, A.A. Zueva, and A.A. Abdikarimov Identification of Cereal Viruses in Uzbekistan Barley Yellow Dwarf Disease: Recent Advances and Future Strategies Proceedings of an International Symposium Held at El Batán, Texcoco, Mexico 1-5 September 2002. pp 108-109.
4. Қодирова З.Н., Махмудов Т.Х., Ахмаджонов М., А.А. Абдукаримов Ўзбекистон Республикасининг айрим вилоятларида бугдойнинг вирус касалликларини тарқалишини ўрганиш. O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasining Maruzalari 4-2020. 83-88 bet
5. Махмудов Т.Х., Қодирова З.Н., А.А. Абдукаримов Арпанинг сариқ паканалик вирусининг иммуноблотинг диагностикаси. O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasining Maruzalari 5-2021. 75-79 bet.
6. Fayziev, V., Jovlieva, D., Juraeva, U., S'havkiev, J., Es'hboev, F. Yeffects of PVXN-UZ 915 necrotic isolate of Potato virus X on amount of pigments of *Datura stramonium* leaves//Journal of Critical Reviews, 2020, 7(9), str. 400–403
7. Khusanov Tokhir Sunnatovich., Kadirova Zarifa Nasirovna., Davronov Kodirjon Sotvoldievich., Akhmedova Zakhro Rakhmatovna, Analysis of Lysimetric Parameters of The Yeffect Of Chemical And Biological Drugs Against Alfalfa Mosaic Virus. The American Journal of Agriculture And Biomedical engineering JULY 2020 Page No.: 25-29 Volume-II Issue-VII PUBLIS'hED: 30 JULY 2020 www.usajournals'hub.com/index.php/tajabe.
8. Carolyn M. Malmstrom, Ruijie Shu. Multiplexed RT-PCR for streamlined detection and separation of barley and cereal yellow dwarf viruses. October 2004; *Journal of Virological Methods* 120(1):69-78
9. Jensen, Virology 38: 83, 1969. Orlob, Army & Medler, Phytopathology 51: 515, 1961. *Oswald & Houston, Pl. Dis. Repr* 35: 471, 1951.
10. Т.Б Касталева Выделение вируса желтой карликовости ячменя из естественно зараженных растений овса и ячменя // Доклады ВАСХНИЛ–Москва, 1994. – С. 23–25.

11. Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Вердеревская Т. Борьба с вирусными болезнями плодовых культур. -М. Агропромиздат. 1986.- с. 326-356.
12. Rastgou M, Khatabi B, Yasaei A, Afsharifar AR, Masoumi M and Izadpanah K (2004b) Distribution and new hosts of viruses causing yellow dwarf in cereals. Proc. 16th Iranian Plant Protection Congress. 61
13. Anil Adhikari, Benham E. Lockhart, Mala Ganiger, Emmanuel Byamukama, Connie Tande, Madeleine J. Smith, Ruth Dill-Macky, Barley yellow dwarf virus-PAV is the dominant species causing Barley yellow dwarf disease in South Dakota and Minnesota. Crop Protection, 2020, Volume 134, 2020,105171.
14. Мусахонова Қ. Л. УЗЛУКСИЗ ТАЪЛИМ ТИЗИМИДА БИОЛОГИЯ ФАНИДАН САМАРАДОРЛИККА ЭРИШИШДА ЭЛЕКТРОН ТАЪЛИМИЙ ВОСИТАЛАРДАН ФОЙДАЛАНИШНИНГ ИЛМИЙ-АМАЛИЙ АСОСЛАРИ //Science and innovation. – 2022. – Т. 1. – №. В3. – С. 577-585.
15. Dzhuraev R. K., Karakhanova L. M. Model of the organization of research activities of 10th grade students in teaching physics and biology //International journal of discourse on Innovation, integration and education. – 2021. – Т. 2. – №. 01. – С. 296-300.
16. ДЖУРАЕВ Р. Х., КАРАХАНОВА Л. М. Модель организации исследовательской деятельности учащихся 10 классов при преподавании физики и биологии //International journal of discourse on Innovation, integration and education. – 2021. – Т. 2. – №. 1. – С. 295-299.
17. Musokhonovna K. L. ICT-As a means of achieving new educational results in teaching natural disciplines in secondary schools //ACADEMICIA: An International Multidisciplinary Research Journal. – 2021. – Т. 11. – №. 10. – С. 315-321.
18. Kharaxonova L. M. SPECIFIC ASPECTS OF MEDIA EDUCATION AND ITS USE IN HIGH SCHOOLS //Academic research in educational sciences. – 2021. – Т. 2. – №. CSPI conference 3. – С. 278-284.
19. Караханова Л. М. DEVELOPMENT OF STUDENTS'KNOWLEDGE BASED ON THE USE OF 3D EDUCATIONAL TECHNOLOGIES IN THE BIOLOGY EDUCATION //Образование и инновационные исследования международный научно-методический журнал. – 2020. – №. 2. – С. 55-59.
20. Джураев Р. Х., Карахонова Л. М. Медиаобразование как фактор повышения качества обучения школьников //Образование через всю жизнь: непрерывное образование в интересах устойчивого развития. – 2013. – Т. 11. – №. 2. – С. 322-323.
21. Сафарова Р. Г. и др. Ўқувчи-ёшларни оммавий маданият хуружларидан химоя қилишнинг назарий-методологик асослари. – 2017.
22. Karakhanova L. M. USE OF MEDIERE RESOURCES IN THE EDUCATIONAL PROCESS OF BIOLOGY IN SCHOOLS //International Scientific Review of the problems of pedagogy and psychology. – 2018. – С. 68-70.
23. Karakhanova L. M. Using the electronic educational resources in biology lessons //INTERNATIONAL SCIENTIFIC REVIEW OF THE PROBLEMS OF PHILISOPHY, PSYCHOLOGY AND PEDAGOGY. – 2019. – С. 35-39.
24. Jurayev, R. K., & Karakhanova, L. M. (2020). Scientific And Methodical Bases Of The Use Of Electronic Educational Resources In Teaching Biology In General Educational Schools. International Journal of Advanced Science and Technology, 29(8), 3500-3505.

25. Musaxonovna, K. L. (2022). General secondary schools requirements for the introduction of informed educational resources for the development of natural sciences. *ACADEMICIA: An International Multidisciplinary Research Journal*, 12(5), 855-860.
- 26.1 Караханова Л. М. НОВЫЕ ИНТЕРАКТИВНЫЕ ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ В СОВРЕМЕННОМ ОТКРЫТОМ ОБРАЗОВАНИИ В ОБУЧЕНИИ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК // Academic research in educational sciences. – 2021. – Т. 2. – №. CSPI conference 1. – С. 1303-1305.
27. Джураев, Р. Х., & Караханова, Л. М. (2022). ПЕДАГОГИЧЕСКОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ОДАРЕННЫХ ДЕТЕЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫМИ УЧРЕЖДЕНИЯМИ. *INTEGRATION OF SCIENCE, EDUCATION AND PRACTICE. SCIENTIFIC-METHODICAL JOURNAL*, 3(4), 66-70.
28. ДЖУРАЕВ Р. Х., КАРАХАНОВА Л. М. Модель организации исследовательской деятельности учащихся 10 классов при преподавании физики и биологии // International journal of discourse on Innovation, integration and education. – 2021. – Т. 2. – №. 1. – С. 295-299.