

CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI
HUZURIDAGI ILMIY DARAJALAR BERUVCHI
PhD.03/27.09.2024.B.82.03 RAQAMLI ILMIY KENGASH

CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI

YUSUBAXMEDOV ABDURAUUF ABDURAXIM O‘G‘LI

**KARTOSHKA M – VIRUSINING MOLEKULAR DIAGNOSTIKASI VA
FILOGENETIK ANALIZI**

03.00.04 – Mikrobiologiya va virusologiya

**BIOLOGIYA FANLARI BO‘YICHA FALSAFA DOKTORI (PhD)
DISSERTATSIYASI AVTOREFERATI**

Chirchiq – 2025

Falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi avtoreferati mundarijasi

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Yusubaxmedov Abdurauf Abduraxim o‘g‘li

Kartoshka M – virusining molekulyar diagnostikasi va filogenetik analizi.....3

Юсубахмедов Абдурауф Абдурахим угли

Молекулярная диагностика и филогенетический анализ М-вируса

картофеля21

Yusubakhmedov Abdurauf Abdurakhim ugli

Molecular diagnostics and phylogenetic analysis of potato virus M.....41

E‘lon qilingan ishlar ro‘yxati

Список опубликованных работ

List of published works45

**CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI
HUZURIDAGI ILMIY DARAJALAR BERUVCHI
PhD.03/27.09.2024.B.82.03 RAQAMLI ILMIY KENGASH**

CHIRCHIQ DAVLAT PEDAGOGIKA UNIVERSITETI

YUSUBAXMEDOV ABDURAUUF ABDURAXIM O'G'LI

**KARTOSHKHA M – VIRUSINING MOLEKULYAR DIAGNOSTIKASI VA
FILOGENETIK ANALIZI**

03.00.04 – Mikrobiologiya va virusologiya

**BIOLOGIYA FANLARI BO'YICHA FALSAFA DOKTORI (PhD)
DISSERTATSIYASI AVTOREFERATI**

Chirchiq – 2025

Falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi mavzusi O'zbekiston Respublikasi Oliy ta'lim, fan va innovatsiya vazirligi huzuridagi Oliy attestatsiya komissiyasida B2022.4.PhD/B805 raqam bilan ro'yxatga olingan.

Dissertatsiya ishi Chirchiq davlat pedagogika universitetida bajarilgan.

Dissertatsiya avtoreferati uch tilda (o'zbek, rus, ingliz (rezyume)) Ilmiy kengash veb-sahifasida (www.chdpu.uz.ilmiy-kengash) va "ZiyoNet" Axborot ta'lim portalida (www.ziynet.uz) joylashtirilgan.

Ilmiy rahbar:

Fayziyev Voxid Baxramovich
biologiya fanlari doktori, professor

Rasmiy opponentlar:

Sherimbetov Anvar Gulmirzayevich
biologiya fanlari doktori, katta ilmiy xodim

Xusanov Toxir Sunnatovich
biologiya fanlari falsafa doktori, katta ilmiy xodim

Yetakchi tashkilot:

Guliston davlat universiteti

Dissertatsiya himoyasi Chirchiq davlat pedagogika universiteti huzuridagi PhD.03/27.09.2024.B.82.03 raqamli Ilmiy kengashning 2025 yil «4» 04 soat 14⁰⁰ dagi majlisida bo'lib o'tadi. (Manzil: 111720, Toshkent viloyati, Chirchiq shahar, Amir Temur ko'chasi, 104-uy. Tel: (99870) 712-27-55; faks: (99870) 712-45-41; e-mail: chdpukengash@umail.uz)

Dissertatsiya bilan Chirchiq davlat pedagogika universitetining Axborot-resurs markazida tanishish mumkin. 364 raqam bilan ro'yxatga olingan). Manzil: 111720, Toshkent viloyati, Chirchiq shahri, Amir Temur ko'chasi, 104-uy. Tel: (99870) 712-27-55; faks: (99870) 712-45-41.)

Dissertatsiya avtoreferati 2025 yil «19» 03 da tarqatildi.
(2025 yil «19» 03 dagi 5 - raqamli reyestr bayonnomasi).

**S.T. Jo'rayev**
Ilmiy daraja beruvchi Ilmiy kengash raisi o'rinbosari, b.f.d., professor

A.Q. Bo'ronov
Ilmiy daraja beruvchi Ilmiy kengash ilmiy kotibi, b.f.f.d., dotsent

H.A. Mo'minov
Ilmiy daraja beruvchi Ilmiy kengash huzuridagi Ilmiy seminar raisi, b.f.d., dotsent

KIRISH (falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi annotatsiyasi)

Dissertatsiya mavzusining dolzarbligi va zarurati. Dunyoda kartoshka o‘simligi oziq-ovqat sifatida eng ko‘p ekiladigan madaniy o‘simliklardan biri hisoblanadi. Shu o‘rinda, kartoshkaning yuqori hosildor va fitopatogen kasalliklarga chidamli navlarini yaratishda zamonaviy ilmiy usullardan foydalanishga alohida e‘tibor qaratish jahon hamjamiyati oldida turgan eng muhim vazifalardan biridir. Hozirgi vaqtda kartoshka eksportini oshishi urug‘lik tugunaklaridagi yashirin viruslarni boshqa hududlarga tarqalib, areali kengayishiga olib kelmoqda. Bu esa molekular-genetik identifikatsiya qilish, bioinformatik tahlillar natijasida esa yangi izolyatlarni ro‘yxatdan o‘tkazish va geneologiyasini aniqlash hamda virusning saqlanishi va sirkulyatsiyasi uchun muhim sanalgan yangi tabiiy rezervator o‘simliklarni aniqlash hamda virusga chidamli kartoshka navlarini yaratishda muhim ilmiy-amaliy ahamiyatga ega.

Jahonda kartoshka o‘simligini kasallantiruvchi fitopatogen viruslarni aniqlash, molekular-genetik identifikatsiya qilish ular keltiradigan zararini kamaytirish, qarshi kurash chora-tadbirlarini ishlab chiqish bo‘yicha keng ko‘lamli izlanishlar olib borilmoqda. Bu borada kartoshka M virusining biologiyasi, ekologiyasi va tarqalish yo‘llarini o‘rganish, tabiiy saqlovchilari va rezervatorlarini aniqlash, immunoxromotografik, immunoferment va PZR tahlillari yordamida viruslarni identifikatsiya qilish hamda filogenetik tahlil qilish, fitopatogen virusga qarshi kurashning ilmiy asoslangan choralari ishlab chiqish, kasallikka chidamlilik genlarini topish hamda ushbu genlar asosida navlarning chidamliligini oshirish, chidamli navlar yaratishga katta e‘tibor berilmoqda.

Mamlakatimizda ko‘plab sohalar qatori qishloq xo‘jaligini rivojlantirish, zamonaviy ilm-fan yutuqlaridan foydalanish, kartoshka yetishtirish, hosildorligi va kasallik qo‘zg‘atuvchi patogen mikroorganizmlarni aniqlash va ularni tarqalishini oldini olishga qaratilgan diagnostika usullarini ishlab chiqish va amaliyotga joriy etish borasida muhim natijalarga erishildi. Yangi O‘zbekistonning taraqqiyot strategiyasida “mahalliy tuproq-iqlim va ekologik sharoitlariga moslashgan, kasalliklarga chidamli qishloq xo‘jalik ekinlarining yangi seleksion navlarini yaratish va joriy etish¹” kabi muhim vazifalar belgilab berilgan. Ushbu vazifalardan kelib chiqqan holda kartoshka M virusi oqsil qobig‘i geni fragmenti asosida molekular-genetik identifikatsiya qilish, bioinformatik tahlillar natijasida esa yangi izolyatlarni ro‘yxatdan o‘tkazish va filogenetik shajarasi tuzish hamda virusning saqlanishi va sirkulyatsiyasi uchun muhim sanalgan yangi tabiiy rezervator o‘simliklarni aniqlash muhim ahamiyat kasb etadi.

O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2019 yil 23 oktabrdagi PF-5853-son “O‘zbekiston Respublikasi qishloq xo‘jaligini rivojlantirishning 2020-2030-yillarga mo‘ljallangan strategiyasini tasdiqlash” to‘g‘risidagi, O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2021-yil 15-iyuldagi PF-6262-son “Respublikada o‘simliklar karantini va himoyasi tizimini tubdan takomillashtirish chora-tadbirlari to‘g‘risida”gi Farmonlari, O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2020 yil 6 maydagi PQ-4704-

¹ O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2022 yil 28 yanvardagi PF-60-son “2022-2026 yillarga mo‘ljallangan Yangi O‘zbekistonning taraqqiyot strategiyasi to‘g‘risida”gi Farmoni.

son “Respublikada kartoshka yetishtirishni kengaytirish va urug‘chiligini yanada rivojlantirish chora-tadbirlari to‘g‘risida”gi, Vazirlar Mahkamasining 2022 yil 5 iyuldagi 361-son “Qishloq xo‘jaligi vazirligi huzuridagi Qishloq xo‘jaligida bilim va innovatsiyalar milliy markazining Sabzavot, poliz ekinlari va kartoshkachilik ilmiy-tadqiqot instituti faoliyatini yanada rivojlantirish to‘g‘risidagi” qarori hamda mazkur faoliyatga tegishli boshqa me‘yoriy-huquqiy hujjatlarda belgilangan vazifalarni amalga oshirishga ushbu dissertatsiya tadqiqoti muayyan darajada xizmat qiladi.

Tadqiqotning respublika fan va texnologiyalari rivojlanishining ustuvor yo‘nalishlariga mosligi. Mazkur tadqiqot respublika fan va texnologiyalar rivojlanishining V. «Qishloq xo‘jaligi, biotexnologiya, ekologiya va atrof-muhit muhofazasi» ustuvor yo‘nalishiga muvofiq bajarilgan.

Muammoning o‘rganilganlik darajasi. Kartoshka M virusining biologik xususiyatlari va diagnostikasi, virusning elektron mikroskopik tahlili, M virusining kasallik alomatlari, tarqalishi, genetik xilma-xilligi, molekulyar diagnostikasi bo‘yicha dunyo miqyosida ilmiy tadqiqotlarni xorijiy olimlar D.E. Schultz va D.M.Folsom (1923), M.B. McKay va T.P. Dykstra (1932), R.H. Bagnall (1956), B.Kassanis (1960), K. Xiruki (1973), R.S. Khurana (1980), I.D. Garg (1994), H.Plchova (2015), S.M. Khurana (2003), A.Kumar (2023) va boshqalar tomonidan olib borilgan.

MDH davlatlarida KMVga oid tadqiqotlar MDU akedemigi I.G. Atabekov rahbarligida S.K. Zavriev (1989), S.Yu. Morozov (2001), O. Karpova (2006), R.V.Gnutova (2011) va boshqa olimlar tomonidan olib borilgan bo‘lib, ular virusning tuzilishini, xususiyatlarini o‘rganish bilan birga, yangi shtammlarini aniqlash bo‘yicha bir qator tadqiqotlarni amalga oshirgan. Jumladan, MDH hududida R.V.Gnutova kartoshkani kasallantiruvchi S, Y, M, A, L kabi viruslarni toza holda ajratib olib, ularga spesifik antizardob tayyorlagan va immunologik usulda o‘rgangan.

Mamlakatimizda o‘simlik viruslarini aniqlash, xususiyatlarini o‘rganish, virusning o‘simlik ayrim morfofiziologik xususiyatlariga ta’siri, immunodiagnostikasi, genetik xilma-xilligi, molekulyar diagnostikasi ustida qator olimlar, jumladan prof. A.H. Vohobov rahbarligida Q.S.Davronov (1984), Z.N.Qodirova (1990), U.M. Jo‘rayeva (1993) va V.B.Fayziyevlar (2011) tomonidan; so‘ngi besh yillikda esa T.S. Xusanov (2019), V.B. Fayziyev (2020), B.J. Axmadaliyev (2023), T.X.Maxmudov (2023), Z.Sh.Sobirova (2024) va D.T.Jovliyeva (2024) kabi olimlar tomonidan olib borilgan. V.B. Fayziyev (2010) o‘zining tadqiqotlari natijasida kartoshkaning A va M-viruslari ham mamlakatimizda tarqalganligi hamda ularning tabiiy-rezervator o‘simliklari va tarqalish darajasini IFA va boshqa immunologik usullar yordamida birinchi marta aniqladi.

Ammo, mamlakatimizda KMVni biologik, ekologik xususiyatlari va molekulyar-genetik xarakteristikasi o‘rganilmagan bo‘lib, ushbu yo‘nalishda olib borilayotgan ilmiy izlanishlar viruslarga qarshi kurash choralarini ishlab chiqishda muhim ilmiy-amaliy ahamiyat kasb etadi.

Tadqiqotning dissertatsiya bajarilgan oliy ta’lim yoki ilmiy tadqiqot muassasasining ilmiy tadqiqot ishlari rejalari bilan bog‘liqligi. Mazkur tadqiqot Chirchiq davlat pedagogika universitetining «O‘zbekiston iqlim sharoitida tarqalgan

fitopatogen viruslarni ajratish, xususiyatlarini o'rganish va diagnostika qilishi» mavzusidagi ilmiy tadqiqot ishlarining rejaları bilan bog'liq holda bajarilgan.

Tadqiqotning maqsadi Toshkent viloyati ekologik sharoitidan KMVni ajratish, biologik xususiyatlarini aniqlash va molekulyar-genetik identifikatsiyalash hamda filogenetik shajarasini yaratishdan iborat.

Tadqiqotning vazifalari:

KMVni real vaqtdagi-PZR usuli yordamida molekulyar diagnostika qilish va Toshkent viloyatining ayrim hududlarida tarqalish darajasini monitoring qilish;

KMVni ajratish va test-indikator o'simliklardagi alomatlarini o'rganish orqali biologik identifikatsiyalash;

virusni oqsil qobig'i geni asosida molekulyar-genetik identifikatsiyalash va filogenetik analiz qilish;

virus molekulyar diagnostikasi uchun praymer dizayn qilish (*TaqMan*) va real vaqtdagi-PZR usulida qo'llash hamda xorijiy analoglar bilan qiyosiy tahlil qilish;

KMVning tabiiy infeksiya manbaalarini hamda kartoshka nav va namunalarining virusga chidamlilik darajasini real vaqtdagi-PZR usuli yordamida aniqlash;

apikal meristema texnologiyasi asosida KVMdan xoli kartoshka ekuv materiallarini olish jarayonini real vaqtdagi-PZR usuli yordamida nazorat qilish va samaradorligini aniqlash.

Tadqiqotning obyekti sifatida laboratoriya sharoitida toza holda ajratib olingan, ba'zi biologik va fizik-kimyoviy xususiyatlari o'rganilgan kartoshka M – virusidan foydalanildi.

Tadqiqotning predmeti KMVni xo'jayin o'simlikdan ajratib olish, virusning o'simlik ayrim morfofiziologik jarayonlariga ta'siri, peroksidaza fermentining infeksiyon jarayondagi dinamikasi, rezervator o'simliklarni aniqlash, molekulyar genetik usulda identifikatsiyalash va filogenetik shajarasini tuzish kabilar hisoblanadi.

Tadqiqotning usullari. Ilmiy ishda real vaqtdagi va TT-PZR, sekvenslash, gel elektorforez, gelxromatografiya, fitoviruslarni ajratish va tozalash, indikator o'simliklarga yuqtirish usuli, spektrofotometriya kabi bir qator biotexnologik hamda virusologik usullardan foydalanildi.

Tadqiqotning ilmiy yangiligi quyidagilardan iborat:

ilk bor Toshkent viloyati sharoitida KMV real vaqtdagi PZR usuli yordamida molekulyar diagnostika qilish asosida tarqalish darajasi aniqlangan;

KMVning oqsil qobig'i (CP) sinteziga javobgar bo'lgan genom uchastkasi nukleotidlar izchilligi asosida bir-biridan molekulyar-genetik jihatdan farqlanuvchi "PVM-UZ-AY1" va "PVM-UZ-AY2" izolyatlar sifatida aniqlangan hamda filogenetik tahlili natijasida NW-Prada1 (Russia), NW-Lomonosov11 (Rossiya) va NW-Laperla1 izolyatlari bilan 97-98% gomologiyaga ega ekanligi isbotlangan;

ajratilgan izolyatlarning oqsil qobig'i aminokislotalar tarkibini qiyosiy tahlil qilish natijasida PVM-Uz-AY1 izolyatda *serine* (S) aminokislotasi *isoleucine* (I) bilan va *arginine* (R) aminokislotasi esa *glycine* (G) bilan almashganligi, PVM-Uz-AY2 izolyatida esa *asparagin* (N) aminokislotasi *aspartic acid* (D) bilan, *tyrosine*

(Y) aminokislota *asparagin* (N) bilan va *arginine* (R) aminokislota ham *asparagin* (N) bilan almashgani isbotlangan;

virusning qora ituzum (*Solanum nigrum*), fizalis (*Physalis*), oq sho'ra (*Chenopodium album*) hamda oddiy jag'-jag' (*Capsella bursa-pastoris* L.), burchoq (*Lathyrus pratensis*) kabi mamlakatimiz iqlim sharoiti uchun yangi bo'lgan tabiiy rezervator o'simliklari aniqlangan.

Tadqiqotning amaliy natijalari quyidagilardan iborat:

KMV molekulyar diagnostikasi uchun praymerlar dizayn qilindi va virus molekulyar diagnostikasi uchun "real vaqtdagi-PZR" test sistemasi ishlab chiqildi, uning Sintol (Rossiya) kompaniyasidan olingan xorijiy analoglar bilan qiyosiy tahlili esa sezgirlik jihatdan qolishmasligini va 2,2 baravar arzon ekanligi baholangan;

real vaqtdagi-PZR test to'plami kartoshka tugunagidagi yashirin virus infeksiyasini va *Mastak*, *Suravink*, *Zarochka*, *Palast*, *Liliya*, *Gorantiya*, *Universal* kabi immun navlarni aniqlashda qo'llanilgan hamda yuqori sezgirlikka ega ekanligi isbotlangan;

in vitro usuli yordamida KMVDan xoli bo'lgan virussiz ekuv materiali olish bosqichlarida qo'llanilgan real vaqtdagi-PZR test sistemasi virussiz tunganak olish uchun asos bo'lib xizmat qilgan va tunganaklarning ikkilamchi infeksiya bilan zararlanishining oldini olishda samarali ekanligini isbotlangan.

Tadqiqot natijalarining ishonchliligi. Tadqiqot natijalarining ishonchliligi tahlillar zamonaviy virusologik, biotexnologik, molekulyar genetik usullardan foydalangan holda o'tkazilganligi, ilmiy natijalar "Statistica 6.0" dasturidan foydalangan holda zamonaviy statistik tahlillar yordamida tahlil qilingani, shuningdek, SnapGene, MEGA11 dasturlari yordamida bioinformatik tahlil, GenBank NCBI ma'lumotlar bazasiga o'rganilgan virus izolyatining nukleotidlar ketma-ketligini joylashtirilganligi, natijalarni respublika va xalqaro konferensiyalarda muhokama qilinganligi va tadqiqot natijalarini O'zbekiston Respublikasi Oliy ta'lim, fan va innovatsiyalar vazirligi huzuridagi Oliy attestatsiya komissiyasi tomonidan tavsiya etilgan ilmiy jurnallarda nashr etilganligi bilan izohlanadi.

Tadqiqot natijalarining ilmiy va amaliy ahamiyati. Tadqiqot natijalarining ilmiy ahamiyati O'zbekistonda tarqalgan KMV oqsil qobig'i genining fragmenti asosida molekular-genetik identifikatsiya qilinganligi, bioinformatik tahlillar natijasida esa yangi izolyatlarning ro'yxatdan o'tkazilganligi va filogenetik shajarasi tuzilganligi hamda Toshkent viloyati iqlim sharoitida virusning saqlanishi va sirkulyatsiyasi uchun muhim sanalgan yangi tabiiy rezervator o'simliklarining aniqlanganligi bilan izohlanadi.

Tadqiqot natijalarining amaliy ahamiyati KMVni diagnostikasi uchun ishlab chiqilgan real vaqtdagi-PZR test to'plami yordamida kartoshkaning 35 dan ortiq nav va klonlaridan KMV ga immun, chidamli va chidamsizlarini baholashda hamda virusning respublikamiz iqlim sharoitida tarqalgan tabiiy infeksiya manbalarini aniqlashda qo'llanilganligi bilan izohlanadi.

Tadqiqot natijalarining joriy qilinishi. Kartoshka (*Solanum tuberosum* L.) o'simligini kasallantiruvchi KMVning molekulyar diagnostikasi va filogenetik analizi bo'yicha olingan ilmiy natijalar asosida:

M - virusining respublikamizda tarqalgan izolyati “Fitopatogen va boshqa mikroorganizmlar noyob ilmiy obyekti kolleksiyasi” genofondiga topshirilgan (O‘zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi 2024-yil 15-mart 4/1255-314-son ma’lumotnomasi). Natijada, fitopatogen mikroorganizmlar shtammlari kolleksiya genofondini boyitish, virus turlari xilma-xilliklari elektron bazasi axborot tahlil tizimini shakillantirish imkonini bergan;

Toshkent viloyati kartoshka ekin dalalaridan kuzatilgan bir qator kartoshka kasallik alomatlaridan KMV PZR usuli yordamida tahlil o‘tkazilib, virusning “PVM-UZ-AY1” va “PVM-UZ-AY2” izolyati aniqlangan hamda ushbu izolyatlar xalqaro GeneBank - NCBI bazasiga PP235793.1 va PQ243305 ID raqam bilan joylashtirilgan (O‘zbekiston Respublikasi Qishloq xo‘jaligi vazirligining 2024-yil 12-avgustdagi 05/06/-02-651-sonli ma’lumotnomasi). Natijada, ushbu yo‘nalishdagi ilmiy-tadqiqot ishlarida foydalanish va filogenetik shajarasini yaratish jarayonida foydalanish imkonini bergan;

“Kartoshka M-virusi molekulyar diagnostikasi uchun mualliflik praymeri dizayn qilingan va real vaqtdagi-PZR test sistemasi ishlab chiqilgan va ushbu test toplami “Sabzavot, poliz ekinlari va kartoshkachilik ilmiy tadqiqot institutida” kartoshka kolleksiyasi urug‘lik materiallarini saralash amaliyotiga joriy qilingan (O‘zbekiston Respublikasi Qishloq xo‘jaligi vazirligining 2024-yil 12-avgustdagi 05/06/-02-651-sonli ma’lumotnomasi). Natijada, kartoshka tuganaklari va ekin maydonlarida virus diagnostikasini amalga oshirish, virussiz kartoshka tuganaklari olishda hamda tuganak tarkibida yashirin holda saqlanayotgan KMVni erta diagnostika qilish imkonini bergan.

Tadqiqot natijalarining aprobatsiyasi. Mazkur tadqiqot natijalari 8 ta xalqaro va 7 ta respublika ilmiy-amaliy anjumanlarida muhokamadan o‘tkazilgan.

Tadqiqot natijalarining e‘lon qilinganligi. Dissertatsiya mavzusi bo‘yicha jami 21 ta ilmiy ish, shulardan 6 tasi O‘zbekiston Respublikasi Oliy ta‘lim, fan va innovatsiya vaziligi huzuridagi Oliy attestatsiya komissiyasining doktorlik dissertatsiyalar asosiy ilmiy natijalarini chop etish uchun tavsiya etilgan ilmiy nashrlarda, jumladan 5 tasi respublika va 1 tasi xorijiy ilmiy jurnallarda nashr qilingan.

Dissertatsiyaning tuzilishi va hajmi. Dissertatsiya ishi kirish, 3 ta bob, xulosalar va adabiyotlar ro‘yxatidan iborat bo‘lib, jami 111 sahifani tashkil qiladi.

DISSERTATSIYANING ASOSIY MAZMUNI

Kirish qismida dissertatsiya mavzusining dolzarbligi va zarurati, maqsad va vazifalari asoslangan hamda tadqiqotning obyekti va predmetlari tavsiflab berilgan, tadqiqotning respublika fan va texnologiyalari rivojlanishining ustuvor yo‘nalishlariga mosligi keltirilgan, ilmiy yangiligi va amaliy natijalari bayon etilgan, olingan natijalarning nazariy va amaliy ahamiyati ochib berilgan, tadqiqot natijalarini amaliyotga joriy qilinganligi, natijalarning nashr etilganligi va dissertatsiya tuzilishi haqida ma’lumotlar keltirilgan.

Dissertatsiyaning “**Kartoshka M-virusining biologiyasi, ekologiyasi va diagnostikasiga oid adabiyotlar sharhi**” deb nomlangan birinchi bobida *Betaflexiviridae* oilasiga mansub viruslar tavsifi, kartoshka M - virusining

biologiyasi, ekologiyasi va molekulyar-genetik xarakteristikasi, virusning o‘simlikdagi fiziologik va biokimyoviy xususiyatlariga ta’siri va KMVga qarshi kurashish usullari haqidagi xorijiy hamda mahalliy ilmiy adabiyotlardan olingan ma’lumotlar bayon etilgan.

Dissertatsiyaning **“Tadqiqotlar uchun foydalanilgan materiallar va uslublar”** deb nomlangan ikkinchi bobida tadqiqotni bajarish uchun foydalanilgan materiallar hamda real vaqtdagi TT-PZR yordamida KMVni aniqlash, ajratish va biologik tozalash va toza preparatini olish, molekulyar-genetik identifikatsiya qilish, virusning o‘simlik ayrim morfofiziologik xususiyatlariga ta’sirini o‘rganish kabi usullarining tavsifi keltirilgan.

Dissertatsiyaning **“KMVning molekulyar diagnostikasi va filogenetik tahlili bo‘yicha olingan natijalar va ularning tahlili”** deb nomlangan uchinchi bobida KMVni real vaqtdagi TT-PZR usuli yordamida aniqlash, Toshkent viloyatining ayrim hududlarida tarqalish darajasini monitoring qilish, indikator o‘simliklarga yuqtirish va kasallik alomatlarni o‘rganish, ba’zi morfofiziologik xususiyatlari va mahsuldorligiga ta’sirini aniqlash kabi olib borilgan tadqiqot natijalar keltirilgan.

Virusologik tadqiqotlarda vizual monitoring ishlari muhim hisoblanganligi bois, bobning birinchi bo‘limida kartoshka dalalarida tarqalgan virusli kasallik belgilari ichidan KMVga xos bo‘lgan alomatlarni aniqlash, molekulyar-genetik usul yordamida diagnostika qilish hamda tarqalish darajasi monitoring qilindi. Ushbu yo‘nalishda olib borilgan kuzatishlar natijasida, kartoshka ekin maydonlarida virusli kasalliklarga xos bo‘lgan barg plastinkasining to‘lqinsimon jingalaklanishi, bujmayishi yoki burishishi, xol-xol mozaikasi, tomirlararo xloroz, mozaikali dog‘lar va o‘simlik o‘sishining sekinlashishi kabi alomatlar mavjud barg namunalari olindi (1-rasm) va real vaqtdagi-PZR usuli yordamida molekulyar identifikatsiya qilindi.

Tahlillar natijasiga ko‘ra tomirlararo xloroz, barg plastinkasining yuqoriga qayiqsimon buralishi yoki burishish, to‘lqinsimon jingalaklanish, mozaikali dog‘ alomatlari aynan KMVga xos ekanligi real vaqtdagi TT-PZR usuli yordamida aniqlandi.

Ushbu yo‘nalishda olib boriladigan keyingi tadqiqot virusning tabiiy sharoitda tarqalish darajasini aniqlash bo‘lib, bunda Toshkent viloyatining kartoshka keng



1-rasm. Kartoshka o‘simligida uchraydigan virusga xos bo‘lgan kasallik alomatlari. Rasmdagi: 1 - barglarning buralishi va mozaika; 2-xol-xol mjaika; 3-barglarning qisman buralishi; 4-barglarning burishishi; 5,6-KMV va KLV birgalikdagi simptomlar.

ekiladigan hududlari hisoblangan va avvalgi ushbu yo‘nalishda o‘tkazilgan tadqiqotlar (Fayziyev, 2011) bilan solishtirish uchun Bo‘stonliq, Toshkent, Qibray va Zangiota tumanlarida monitoring ishlari olib borildi va olingan natijalar jadvalda keltirildi (1-jadval).

1-jadval

Toshkent viloyati ayrim tumanlarida virus tarqalishini PZR usuli yordamida aniqlash

№	Namuna olingan F/X nomi	Tuman	Kartoshka navlari	Yer maydoni, ga	kasallanish darajasi, %
1.	Taraqqiyot	Qibray	Golland	2,0	91,7±0,29
2.	Yuksalish	Qibray	Pikasso	1,0	78,4±0,16
3.	Yusubaxmedov Jomiy Fayz	Qibray	Gala	1,0	88,4±0,13
4.	Mirmuxsin	Qibray	Umid	2,0	94,1±0,21
5.	Baurjan	Bo‘stonliq	Gala (Rossiya)	1,5	78,14±0,16
6.	Tuxtasin Baraka	Bo‘stonliq	Arena	2,0	89,97±0,19
7.	Keles Agro	Toshkent	Razara	0,5	84,3±0,11
8.	Farida aya	Zangiota	Arizona	0,5	88,3±0,18
9.	Shodmonov Toxir	Zangiota	Zarzara	1,0	79,5±0,17

Izoh: P<0,05 – nazoratga nisbatan ishonchli; n=3.

Monitoring olib borilgan kartoshka ekilgan dala maydonlarda PZR tahlillar natijasiga ko‘ra KMVning tarqalish darajasi aniqlandi. Tadqiqot natijasida tekshirilgan ekin maydonlarining barchasida KMV keng tarqalganligi ma’lum bo‘ldi. Kompleks viruslar bilan kasallanish “Mirmuxsin” F/X 94%, “Taraqqiyot” F/X 92%, “Tuxtasin Baraka” F/X 90%, “Yusubaxmedov Jomiy Fayz” F/X va “Keles Agro” F/X 88%, “Shodmonov Toxir” F/X 79%, “Yuksalish” F/X va “Baurjan” F/X 78% ekanligi aniqlandi (1-jadval).

Ushbu yo‘nalishda tadqiqot olib borgan mualliflarning (Fayziyev va boshq., 2010) IFA usuli yordamida Toshkent viloyatida KMVni tarqalish darajasini aniqlash natijasida Qibray tumanida 48%, Toshkent tumanida 5%, Zangiota tumanida 35% va Parkent tumanida 34% virus bilan zararlanish aniqlangan. So‘ngi yillarda (Yusubaxmedov, 2023) ushbu yo‘nalishda olib borilgan PZR tekshirishlari natijasida Toshkent viloyatining tumanlarida, xususan, Qibray tumanida 88%, qolgan Zangiota, Bo‘stonliq va Toshkent tumanlarida 84% KMV bilan zararlanish holati aniqlandi. Qiyosiy tahlillar virus tarqalishining yillar davomida Qibray tumanida 40%, Zangiota tumanida 49%, Toshkent tumanida 79% ga oshganligi aniqlandi.

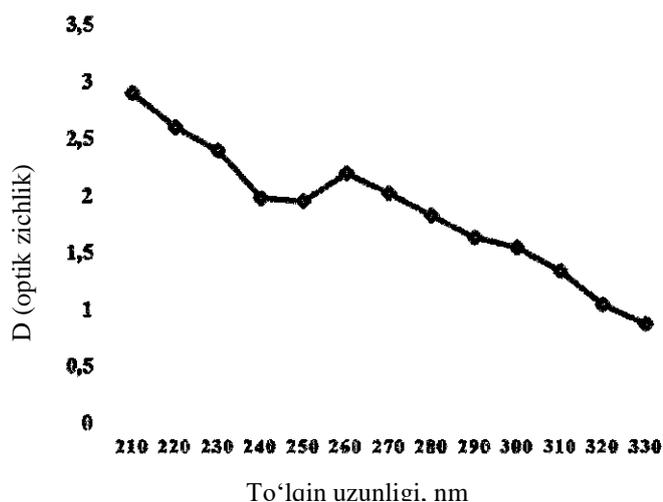
KMVni ajratish va indikator o‘simliklardagi kasallik alomatlarini o‘rganish orqali biologik identifikatsiyalash. KMVning toza preparatini olishning sharti, mazkur virusni indikator o‘simliklar yordamida boshqa viruslar, bakteriyalar va zamburug‘lar kabi mikroskopik organizmlardan ajratib olishdan boshlanadi.

Bunda *Fabaceae* oilasi vakili bo‘lgan *Vigna sinensis* differentsiator, *Solanaceae* oilasiga vakili *Datura stramonium* KMV ni to‘plovchi o‘simlik sifatida ishlatish mumkinligi aniqlandi va virusning toza preparatini olish uchun foydalanildi.

Virusni dastlab biologik tozalash, keyin fizik-kimyoviy usul bilan tozalash davom ettirildi. Bunda virusning qisman tozalangan preparati olindi. Gomogen virus preparatini olish uchun esa gelfiltratsiya usulidan foydalanildi. Sefadeks-G200 geli

solingan gelxromotografik kolonkadagi bufer orasiga konsentrlangan KMVning qisman tozalangan preparatidan solinib, namuna alohida fraksiyalarga ajratildi.

Olingan fraksiyalarning UB-nurini yutishiga qarab tozalik darajasi va tozalangan virus miqdori «UV-1700» markali spektrofotometrda aniqlandi (2-rasm). Spektrofotometrik tahlillar shuni ko'rsatdiki, virusning dastlabki filtrlanishi 6 fraksiyadan boshlanib, 8 - fraksiyada eng maksimal darajaga, 11 - fraksiyada minimal darajaga yetdi va 12 - fraksiyadan boshlab hujayra komponentlari chiqa boshlashi *Vigna sinensis* indikator o'simligida paydo bo'lgan alomatlari asosida aniqlandi. Preparatni real vaqtdagi-PZR tekshiruvini ham virusning gelxromotografik kolonkadan 6-10 fraksiyalarda ajralib chiqqanligini, 8 - fraksiyada esa eng maksimal darajada ajralganligi tasdiqlandi (2-jadval).



2-rasm. KMV toza virus preparatining UB nurini yutishi ko'rsatkichi

2- jadval

KMV preparatining gelfiltratsiya usulida ajralgan fraksiyasiylarining real vaqtdagi-PZR tahlili

Katakcha nomi	Namuna nomi	Namuna turi	Fluoresent kanal	Gen	Ct*	PZR xulosasi
A1	2-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
A2	3-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
A3	4-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
A4	6-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	30,02	Musbat
A5	8-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	26,37	Musbat
A6	10-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	37,22	Musbat
A7	14-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
A8	16-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
B1	19-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
B2	22-fraksiya	Fraksiya suyuqligi	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy
B3	Musbat nazorat.	K+	FAM	CP-gen	27,02	Musbat
B4	Manfiy nazorat.	K-	FAM	CP-gen	Ct yuq	Manfiy

Izoh: *Ct (cycle threshold) - kDNKning nusxalarini yaratish tsikllari soni. Tsikl ko'rsatgan ko'rsatgichdan boshlab sinov namunasi ijobiy hisoblanadi.

Ushbu tadqiqot natijasida quyidagicha xulosa qilish mumkin, fraksiyalarning yuqumliligi *Datura stramonium*, *Vigna sinensis*, *Phisalis* kabi test-indikator o'simliklariga mexanik inokulyatsiya qilish orqali aniqlandi va 6-10 fraksiyalar yuqori yuqumlilikka ega ekanligi ma'lum bo'ldi va ushbu fraksiyalarning real

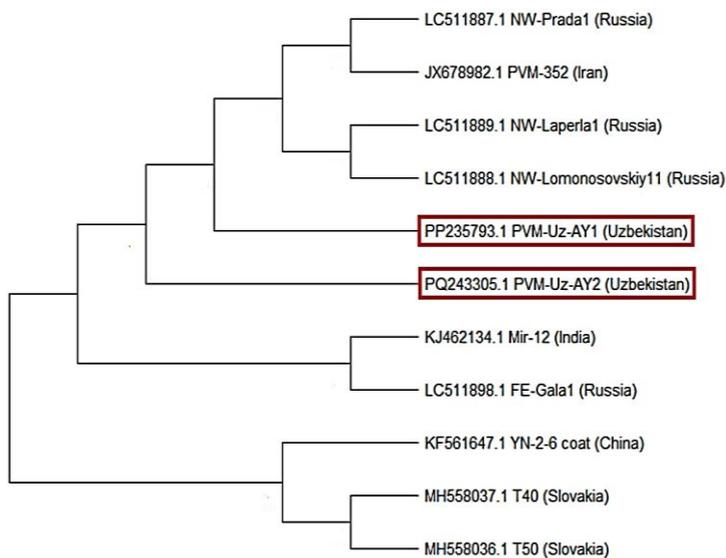
vaqtdagi-PZR tahlili hamda test-indikatorlarga mexanik inokulyatsiya qilish orqali biologik identifikatsiya qilish ushbu preparatning KMVga xos ekanligini tasdiqladi.

KMVni oqsil qobig‘i geni asosida molekulyar identifikatsiyalash va filogenetik analiz qilish.

KMVning mamlakatimizda tarqalgan izolyatini oqsil qobig‘iga (CP) javobgar bo‘lgan geni asosida molekulyar identifikatsiya va filogenetik analiz qilish uchun, Xu va boshq. (2010) tomonidan ishlab chiqilgan maxsus praymerlarni (PVM-R-CTTCATTTGTTATTCGACTT va PVM-F-ATGGGAGATTCAACRAAGAA)

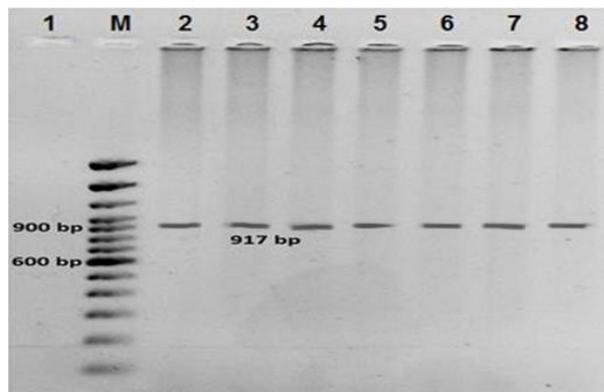
“Integrated DNA Technologies” (Belgiya) kompaniyasi tomonidan sintez qilindi va kartoshka ekin dalalarida KMVning kasallik belgilari bo‘lgan kartoshkaning Umid, Gala, Pikas kabi navlardan namunalarni olib, TT-PZR usuli yordamida molekulyar identifikatsiya qilindi Virusni molekulyar genetik identifikatsiyasi maxsus praymerlar ishtirokida TT-RZR usuli yordamida agarozda gelida o‘tkazildi (3-rasm).

Sekvens reaksiyasi mahsulotlarini nukleotidlar ketma-ketligini o‘qitish “Applied Biosystems 3500” DNK-sekvenatorida amalga oshirildi.



4-rasm. KMV ning filogenetik shajarasi

bazasiga “Potato virus M, isolate PVM-Uz-AY1” nomi va PP235793.1 ID raqam bilan ro‘yxatdan o‘tkazildi. Kartoshkadan ajratib olingan ikkinchi izolyat esa CP geni nukleotidlar ketma-ketligi (807 j.n.) ham Xalqaro gen bank – NCBI ma‘lumotlar bazasiga “Potato virus M, isolate PVM-Uz-AY2” nomi va PQ243305 ID raqam bilan joylashtirildi.



3-rasm. Toshkent viloyati kartoshka barglari namunalaridan aniqlangan KMV oqsil qobig‘i (CP) geni yordamidagi TT-PZR tahlili.

Elektroforez 2%-li agarozda gelida amalga oshirilgan. Rasmdagi: 1-kontrol (virussiz kartoshka), TT-PZR analiz uchun namunalar Umid (2,3), Gala (4,5), Pikas (6-8) navlaridan olingan. M - O‘GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas). Praymerlar PVM1/PVM2 TT-PZR sharoiti Xu va boshq.da (2010) keltirilgandek amalga oshirildi.

CP geni nukleotidlar ketma-ketligining bir qismi aniqlandi va BLAST online dasturi yordamida Xalqaro GenBank-NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ma‘lumotlar bazasiga kiritilgan KMV izolyatlari nukleotidlar ketma-ketliklari bilan taqqoslandi. Tajribalar davomida kartoshka o‘simligidan ajratilgan KMVning ikkita izolyatlari aniqlandi.

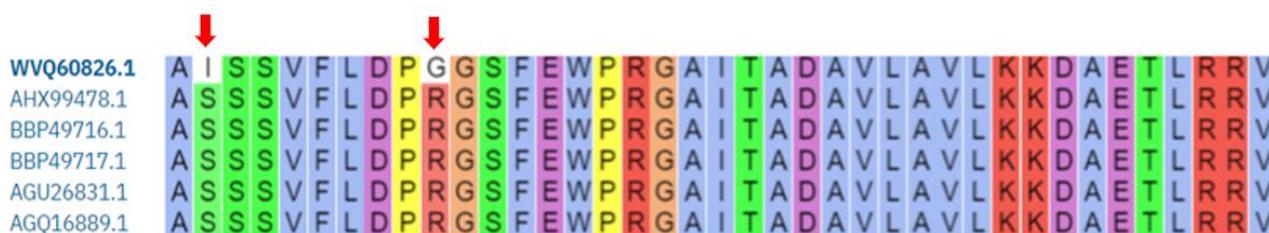
Virusning aniqlangan ilk izolyati CP geni nukleotidlar ketma-ketligi (286 j.n.) Xalqaro gen bank – NCBI ma‘lumotlar

Ushbu aniqlangan mahalliy izolyatlar – virusning filogenetik shajarasini ishlab chiqish uchun asos bo‘lib xizmat qildi. Aniqlangan izolyat nukleotid ketma-ketligi asosida NCBI bazasida mavjud boshqa izolyatlar bilan solishtirilib, bioinformatik tahlil qilindi va MEGA11 dasturi yordamida uning filogenetik shajarasi yaratildi (4-rasm).

Virusni bioinformatik tahlil qilish hamda filogenetik shajarasini yaratish bo‘yicha o‘tkazilgan tadqiqotlar natijasida gomologiyaga ega bo‘lgan izolyatlar to‘rtta alohida-alohida filogenetik klaster hosil qilib joylashgaligi, PVM-Uz-AY1 va PVM-Uz-AY2 izolyati esa uchinchi klasterga mansubligi va unda alohida filogenetik shoxda joylashganligi aniqlandi.

Filogenetik shajaradan ko‘rinib turibdiki, mamlakatimiz iqlim sharoitida aniqlangan KMVning izolyatlari NW - Prada1 (Rossia), NW-Lomonosov11 va NW-Laperla1 izolyatlari bilan 97-98% gomolog ekanligi ularning ushbu izolyatlardan kelib chiqqan degan xulosa qilishga, qolgan T40 (Slovakia) va T50 (Slovakia) izolyatlari bilan (CP geni) 95%, Mir-12 (India) va FE-Gala1 (Rossia) kabi izolyatlar bilan 94-97%, YN-2-6 coat (China) izolyati bilan 95% ga gomologiyaga ega ekanligi mamlakatimizda aniqlangan izolyatlarning ushbu izolyatlar bilan uzoq kelib chiqishda bitta ajdod virusdan kelib chiqqanligini ko‘rsatadi (3-jadval).

Tadqiqotlarning keyingi bosqichida mamlakatimizdan ajratilgan “PVM-Uz-AY1” izolyati oqsil qobig‘ining (CP) aminokislota tarkibi o‘rganildi (5-rasm).



5-rasm. KMVning PVM-Uz-AY1 izolyati aminokislota tarkibining qiyosiy tahlili

PVM-Uz-AY1 izolyatining aminokislotalar ketma-ketligi <https://www.ebi.ac.uk> saytda boshqa NCBI ma’lumotlar bazasidagi Mir-12 India (AHX99478.1), NW-Prada1 Rossia (BBP49716.1), NW-Lomonosovskiy11 Rossia (BBP49717.1) kabi izolyatlar bilan taqqoslandi. Solishtirma jadvaldan ko‘rinib turibdiki PVM-Uz-AY1 izolyatda *serine* (S) aminokislota *isoleucine* (I) bilan almashgani va *arginine* (R) aminokislota esa *glycine* (G) bilan almashganligi ma’lum bo‘ldi.

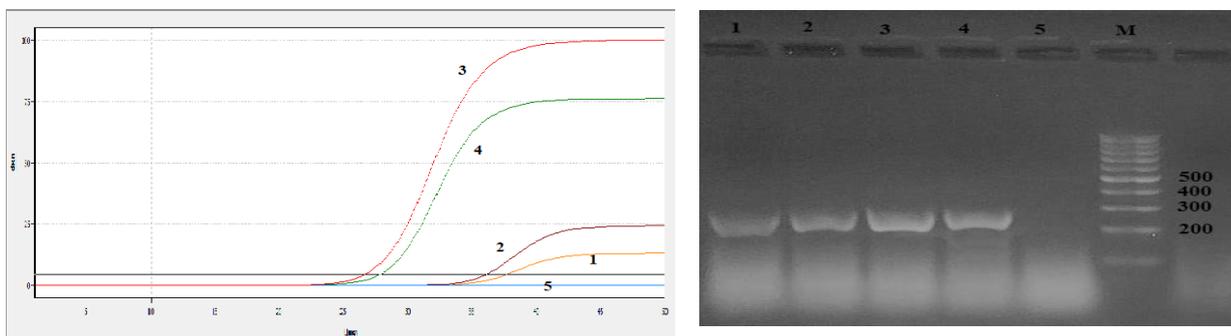
KMVni mintaqamizda tarqalgan PVM-Uz-AY2 izolyatining ham oqsil qobig‘i aminokislota tarkibi qiyosiy tahlil qilinganda esa PVM-Uz-AY2 izolyatida *asparagin* (N) aminokislota *aspartic acid* (D) bilan, *tyrosine* (Y) aminokislota *asparagin* (N) bilan va *arginine* (R) aminokislota ham *asparagin* (N) bilan almashgani aniqlandi (6-rasm).



6-rasm. KMVning PVM-Uz-AY2 izolyati aminokislota tarkibining qiyosiy tahlili

Ushbu tadqiqot natijasiga ko‘ra quyidagicha xulosa qilish mumkin, mamlakatimizda ajratilgan izolyat oqsil qobig‘i aminokislota tarkibi jihatdan ko‘pgina izolyatlar bilan yaqin, ammo bir xil emasligi, turli abiotik va biotik omillar ta’siri natijasida KMV ning o‘zgaruvchanlikka uchraganligidan dalolat beradi.

KMV molekulyar diagnostikasi uchun praymer dizayin qilish (*TaqMan*) va real vaqtdagi-PZR usulida qo‘llash hamda xorijiy analoglar bilan qiyosiy tahlil qilish. Praymer NCBI ma’lumotlar bazasiga kiritilgan KMV genomlari ketma-ketligi asosida real vaqtdagi-PZR usulida qo‘llash uchun ishlab chiqildi. Bu praymerlarning KMVning gen bankdagi mavjud izolyatlarini aniqlay olish imkoniyati NCBI ma’lumotlar ba’zasi tomonidan taqdim etilgan Basic Local Alignment Search Tool dasturi yordamida tekshirildi. Ishlab chiqilgan praymerlar: *Forward*: PVM_F5`-CTGAGCACGTGCARCAGGT-3` *Reverse*: PVM_R5`-TTCTCAACGTAATCAAAGCAGTC-3` flyurosentli zond bilan belgilangan *probe* praymeri Cy5-GCAAGCAGCTCCGTA TTCCTGGATC-BHQ-2 KMV ning CP geni nukleotidlar ketma-ketligiga mos qilib tanlangan. Replikaza sinteziga javobgar genning bir qismini ifodalovchi PZR mahsuloti 298 juft nukleotid (j.n.) ketma-ketligiga teng. O‘tkazilgan tajribada standart (an’anaviy) va real vaqtdagi TT-PZR usullardan bir xil natijalar olindi (7-rasm).



7-rasm. KMVni real vaqtdagi PZR va standart TT-PZR usuli yordamida diagnostika taqqoslama xulosalari. Rasmdagi: 1-“Agave” navi; 2 - “Gala” navi; 3 - “Zarzara” navi; 4 - “Pikas” navi; 5 - sog‘lom kartoshka namunasi; M-1000 bp DNA ladder Plus.

Real vaqtdagi PZRning avzallik tarafi: juda ko‘p namunalarni qisqa vaqtda tekshirish imkoni mavjud, nukleyin kislotani bo‘yash uchun foydalaniladigan etidium bromid kabi inson salomatligiga xavfli kanserogen moddalardan foydalanilmasligi,

laboratoriyani nukleyin kislotalar (amplikonlar) bilan ifloslantirish (kontaminatsiya) xavfi darajasi juda kam va eng muhimi sezgirlik darajasi yuqori, bunda tajriba natijasini olishda inson faktori ishtirok etmaydi.

Ishlab chiqilgan PZR tashxis test to'plamini boshqa tadqiqotlarda qo'llanilayotgan muqobil PZR to'plam bilan taqqoslama tajriba o'tkazildi (4-jadval).

4-jadval

KMV diagnostikasi uchun ishlab chiqilgan PZR tashxis test to'plamining muqobil varianti bilan sezgirligini aniqlash bo'yicha qiyosiy tahlili

No	Nav nomi	“Molekulyar biologiya va bioinformatika” ilmiy-tadqiqotlari laboratoriyasida ishlab chiqilgan “KMV real vaqtdagi-PZR” tashxis test to'plami	SINTOL kompaniyasining “Kartoshka M virusini real vaqtdagi-PZR” tashxis test to'plami
		PZR natijasi (Ct)*	PZR natijasi (Ct)
1	Karona	32,95	28,64
2	Bog'izag'on	31,42	34,22
3	Pskom	15,56	24,81
4	Quvonch	26,73	31,84
5	Toshkent ertagi	14,03	25,31
6	O'zbekiston qizili	24,71	28,67
7	Aqrob	16,69	22,74
8	Umid	29,49	24,63
9	Mastak	-	-
10	Yuliya	33,94	27,84
11	Karlan	33,48	28,64
12	Manifes	21,26	25,44
13	Uladar	27,66	25,28
14	Suravink	-	-
15	Zarochka	-	-
16	Palast	-	-
17	Liliya	-	-
18	Gorantiya	-	-
19	Universal	-	-
20	Golden	-	-
21	Ariran	-	-
22	Pitek	35,08	29,54
23	Kavkaz	34,88	33,34
24	Naxitta	35,18	29,59
25	Zirve	35,16	31,45

Izoh: *Ct (cycle threshold) - kDNKning nusxalarini yaratish tsikllari soni. Tsikl ko'rsatgan ko'rsatgichdan boshlab sinov namunasi ijobiy hisoblanadi.

Jadvalda keltirilgan natijaga ko'ra KMV diagnostikasi uchun ishlab chiqilgan va ushbu diagnostikumga muqobili bo'lgan SINTOL (Rossiya) kompaniyasining “Kartoshka M virusini real vaqtdagi-PZR tashxis test to'plami” bilan solishtirish natijasida ikkala testda ham PZR natijasi (Ct) bir-biriga juda yaqin chiqqanligi, O'zbekistonda ishlab chiqilgan PZR test to'plamining KMV diagnostikasi uchun

qo'llash, virusni erta aniqlagan holda virus epifitotiysini oldini olishda muhim amaliy ahamiyatga egaligini e'tirof etish lozim.

Ushbu yo'nalishda aniqlashtirilishi zarur bo'lgan ishlardan biri bu - ishlab chiqilgan mahalliy PZR test to'plamining iqtisodiy samaradorligini aniqlash bo'lib, bu test to'plamni ishlab chiqish uchun sarflangan barcha mehnat haqi hamda boshqa sarflanadigan reagentlar jamlanmasi bilan aniqlanadi.

Ishlab chiqilgan real vaqtdagi-PZR test to'plami tarkibi bir necha reagentlar majmuasidan iborat bo'lib, 100 ta namunani (shu jumladan musbat va manfiy nazorat namular ham hisobga olingan) tekshirish uchun sarflanadigan miqdori va ularning tannarxi quyida keltirildi (5-jadval). Test to'plamining komponentlar jamlanmasi va narxi SINTOL ilmiy ishlab chiqarish kompaniyasi mahsulotlari va xizmatlari asosida tuzildi.

5-jadval

Real vaqtdagi-PZR test to'plami tarkibi

№	Real vaqtdagi PZR tashxis test to'plamini tayyorlash uchun sarflangan ashyolar va mehnat	Komponent nomlanishi	Miqdori	Narxi, so'm hisobida
1.	PZR reagentlar va fermentlar	PZR amalga oshirish uchun reagentlar to'plami	100 ta tahlil uchun	250 000.00
		TT-PZR transkriptaza fermenti.		475 000.00
	Praymerlar	To'g'ri va teskari prymerlar		20 000.00
		Belgilangan (меченый) praymer (TaqMan)		212 000.00
2.	Rezbali probirka 2 ml		6 ta dona	12 000.00
	Qadoqlash qutisi va testdan foydalanish yo'riqnomasi			5000.00
3	Peaymer dizayni uchun xaq to'lash		3 soat	796 500.00
4	Elektr toki		2 kVt/soat	1 800.00
Umumiy narxi				1751300.00

SINTOL kompaniyasi tomonidan ishlab chiqarilgan "real vaqtdagi TT-PZR usuli orqali «Kartoshka M virusini differensial diagnostikalovchi va virus RNKsini aniqlovchi» test to'plami QQS bilan hisoblanganda 3 920 000 ming so'mga "GENOMED" MCHJ tomonidan yetkazib berish taklifini bergan.

Hisob natijalariga ko'ra bitta to'plamning tannarxi 1 751 300.00 so'm ekanligi hisoblab topildi, bu esa PZR test to'plamning tannarxini xorijiy analoglardan 2,2 baravar arzon ekanligidan dalolat beradi.

KMVning tabiiy infeksiya manbalari hamda kartoshka nav va namunalarining virusga chidamlilik darajasini real vaqtdagi-PZR usuli yordamida aniqlash. KMVning tabiatda aylanishini o'rganishda uning tashuvchi hasharotlari va rezervator o'simliklarini aniqlash bugungi kunda muhim amaliy ahamiyat kasb etadi. Shuning uchun ushbu o'tkazilgan tadqiqotlarda O'zbekiston iqlim sharoitida yovvoyi va madaniy holda o'sadigan o'simliklardan KMVning rezervatorlarini molekulyar-genetik usul yordamida aniqlash asosiy maqsad qilib olindi. Tadqiqotlar uchun namunalar Toshkent viloyati kartoshka dalalari va uning atroflarida o'sgan kasallik alomatlari mavjud yoki hech qanday kasallik alomatlari

bo'lmagan 20 turga mansub madaniy va yovvoyi o'simliklar real vaqtdagi - PZR yordamida tekshirildi.

Natijada, adabiyotlarda ko'rsatilgan qora ituzum (*Solanum nigrum*), fizalis (*Physalis*), oq sho'ra (*Chenopodium album*) o'simligining tanasida yuqori titrda virus mavjudligi aniqlangan bo'lsa, shuningdek hali adabiyotlarga kiritilmagan oddiy jag'-jag' (*Capsella bursa-pastoris* L.), burchoq (*Lathyrus pratensis*) o'simligi tanasida virus saqlashi va bu o'simlik virusning tabiiy rezervatori ekanligi PZR usuli yordamida o'rganildi.

Jag'-jag' o'simligi kuzda o'sib, barglari qor tagida qishlab, bahorda o'sishda davom etishini inobatga olinsa, KVMni rezervator o'simliklarda saqlanishi virusning davriy aylanishi va kengroq hududga tarqalishiga sabab bo'ladi.

Kartoshka kolleksiyasi turli nav va namunalarining KVMga chidamlilik darajasining monitoringi. Ushbu yo'nalishdagi tadqiqot obektlari sifatida "Sabzavotchilik, poliz ekinlari va kartoshkachilik ilmiy tekshirish instituti" kolleksiyasi tajriba dala maydonida mavjud kartoshka nav va namunalardan KVM bilan tabiiy kasallanish darajasi aniqlandi va shu asosida chidamlilik guruhlariga ajratildi (6-jadval).

6-jadval

Kartoshka nav va namunalarining KVM ga chidamlilik guruhlari

Chidamlilik guruhlari				
Immun	Amaliy chidamli	Kuchsiz kasallanuvchi	O'rtacha kasallanuvchi	Chidamsiz
Guruhlariga ajratish chegaralari, kasallanish darajasi bo'yicha				
0%	10%	25%	50%	50% dan yuqori
Mastak, Suravink, Zarochka, Palast, Liliya, Gorantiya, Universal, Golden, Ariran, Kaya, Anaran, Yaproq, Bahor, K-1, K-2, K-5, K-73.	-	Yuliya, Naxitta.	Karona, Pitek, Zirve, K-12.	Bog'izag'on, Pskom, Quvonch, Toshkent ertagi, O'zbekiston qizili, Aqrob, Umid, Karlan, Manifes, Uladar, Kavkaz, K-9.

Olingan natijalar asosida shu holat ma'lum bo'ldiki, tekshirilgan 35 ta nav va klonlardan *Mastak, Suravink, Zarochka, Palast, Liliya, Gorantiya, Universal, Golden, Ariran, Kaya, Anaran, Yaproq, Bahor* nav va *K-1, K-2, K-5, K-73* klonlarda KVM aniqlanmadi. *Yuliya* va *Naxitta* navlarida kuchsiz kasallanish, *Bog'izag'on, Pskom, Quvonch, Toshkent ertagi, O'zbekiston qizili, Aqrob, Umid, Karlan, Manifes, Uladar, K-9, Kavkaz* nav va klonlarda esa yuqori darajada kasallanish aniqlandi.

Foiz hisobida tartibga solinganda, birinchi (immun) guruhga mansub nav va namunalar asosan xorijdan keltirilgan namunalar bo'lib, 49% ni, ikkinchi guruhga (amaliy chidamli) mansub nav va namunalar aniqlanmadi, uchinchi (kuchsiz kasallanuvchi) guruhga 5,6% nav mansubligi aniqlandi. To'rtinchi, ya'ni o'rtacha kasallanuvchi guruhga 11,4% nav mansubligi, beshinchi (chidamsiz) guruhga esa 34% nav to'g'ri keldi. Tekshirishlar natijasida shu narsa aniqlandiki, chidamlilik guruhlarining immun navlar ichida mahalliy navlar uchramadi, o'rtacha

kasallanuvchi navlarning 25% mahalliy navlar tashkil qilgan bo'lsa, kasallikka chidamsiz navlarning 58% mahalliy navlar ekanligi aniqlandi.

Bundan kelib chiqib shuni aytish mumkinki, chidamlilik guruhlari aniqlangan asosan, immun va kuchsiz kasallanuvchi navlardan kelgusida virusga chidamli navlar yaratishda foydalanilsa maqsadga muvofiq bo'lar edi.

Apikal meristema texnologiyasi asosida KVMdan xoli o'simlik ekuv materiallarini olish jarayonini real vaqtdagi TT-PZR usuli yordamida nazorat qilish hamda samaradorligini aniqlash. Buning uchun Sabzavot, poliz ekinlari va kartoshkachilik instituti biotexnologiya laboratoriyasidan 6 xil (Pikas, Umid, Arizona, O'zbekiston qizili, Karona va Karlan) real vaqtdagi-PZR test natijalariga ko'ra KMV bilan zararlangan tuganaklar tanlab olindi va ularning o'sgan yosh navdalarning uchki qismi olinib, kimyoviy ishlov berildi va *in vitro* usulida oziqa muhitda ko'paytirildi. Hosil bo'lgan *in vitro* va shu bilan bir qatorda issiqxona sharoitida ekilgan o'simliklar navdalardan olinib, real vaqtdagi TT-PZR usulda tekshirib borildi (7-jadval).

7-jadval

Kartoshka urug'lik tuganaklaridan *in vivo* va *in vitro* usulda yetishtirilganda KMV aniqlash bo'yicha TT-PZR xulosalari

Kartoshka navi	<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i>		
	Tekshirish muddati, kun hisobida					
	30	40	60	30	40	60
Pikas	+	++	++	-	-	-
Umid	+	++	+++	-	-	-
Arizona	+	++	++	+	+	Ø
O'zbekiston qizili	++	+++	++++	-	-	-
Karona	+	+	+	+	+	Ø
Karlan	+	+	+	-	-	-

Izoh: "+" - kasallanish darajasi, "-" - virus bilan zararlanmagan, "Ø" - tajribadan namunalari olib tashlangan.

O'tkazilgan tadqiqotdan ma'lum bo'ldiki, *in vitro* usulida kartoshka o'simligi yetishtirilganda apikal meristema to'qimasidan foydalangan holda, o'simlikni turli fitopatogenlardan himoyalash uchun kimyoterapiya va molekulyar-genetik tashxislash usulining kompleks qo'llash orqali virussiz ekuv materialini olishga erishish mumkinligi tasdiqlandi. Shuningdek ushbu usulni qo'llash orqali virus va boshqa bakteriologik va zamburug'li kasallik qo'zg'atuvchilardan himoyalab, hosil yetishtirishda iqtisodiy samaradorlik oshishi isbotlandi.

XULOSALAR

"Kartoshka M – virusining molekulyar diagnostikasi va filogenetik analizi" mavzusidagi biologiya fanlari falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi bo'yicha olib borilgan tadqiqotlar asosida quyidagi xulosalar taqdim etildi:

1. Kartoshka o'simligida uchraydigan bargning qayiqsimon buralishi va mozika alomatlari KMV xos ekanligi real vaqtdagi-PZR usuli yordamida tasdiqlandi va Toshkent viloyatining Zangiota, Qibray, Bo'stonliq va Toshkent tumanlarida

tarqalish darajasi monitoring qilindi va ushbu tumanlarda virus tarqalishining 78% dan 94% gacha ortganligi aniqlandi.

2. KMV xo‘jayin o‘simlikdan differentsiator o‘simlik yordamida ajratib olindi va test-indikator o‘simliklarga inokulyatsiya qilish va ulardagi alomatlar asosida biologik identifikatsiya qilindi, natijada kuzatishlar *Vigna sinensis* o‘simligida sariq xloritik dog‘, *Datura stramonium* o‘simligidagi sariq mozaika, *Physalis* o‘simligidagi tomirlar aro sariq mozaika alomatlari ushbu virusga xos ekanligi tasdiqlandi.

3. O‘zbekiston iqlim sharoitida tarqalgan KMV izolyati CP geni asosida molekulyar identifikatsiya qilindi va ushbu virusning ilk marotaba ajratilgan “PVM-Uz-AY1” (ID: PP235793.1) va “PVM-UZ-AY2” (PQ243305) izolyatlari NCBI bazasiga joylandi, ushbu gen asosida virusning filogenetik shajarasi yaratildi.

4. KMV molekulyar diagnostikasi uchun praymerlar dizayn qilindi va virus molekulyar diagnostikasi uchun “real vaqtdagi-PZR” test to‘plami ishlab chiqildi, uning Sintol (Rossiya) kompaniyasidan olingan xorijiy analoglar bilan qiyosiy tahlili sezgirlik jihatdan qolishmasligini ko‘rsatdi va 2,2 baravar arzon ekanligi baholandi.

5. Ishlab chiqilgan real vaqtdagi-PZR test sistemasi KMVning tabiiy rezervator o‘simliklarini aniqlashda qo‘llanildi, natijada qora ituzum (*Solanum nigrum*), fizalis (*Physalis*), oq sho‘ra (*Chenopodium album*) kabi o‘simliklarning tanasida yuqori titrda saqlanishi aniqlangan bo‘lsa, oddiy jag‘-jag‘ (*Capsella bursa-pastoris* L.), burchoq (*Lathyrus pratensis*) kabi mamlakatimiz iqlim sharoiti uchun yangi bo‘lgan tabiiy rezervator o‘simliklari aniqlandi.

6. Real vaqtdagi-PZR test to‘plami kartoshka tuganagidagi virus infeksiyasini erta tashxislashga va *Mastak*, *Suravink*, *Zarochka*, *Palast*, *Liliya*, *Gorantiya*, *Universal* kabi immun navlar aniqlashga asos bo‘lib xizmat qildi. Ushbu navlarni esa seleksionerlarga virusga chidamli navlarni yaratish hamda chidamlilikni oshirish bo‘yicha olib boriladigan tadqiqotlarda foydalanish uchun tavsiya qilindi.

7. *in vitro* usuli yordamida KMVdan xoli bo‘lgan virussiz ekuv materiali olish bosqichlarida qo‘llanilgan real vaqtdagi-PZR test sistemasi virussiz tuganak olish uchun asos bo‘lib xizmat qildi va tugunaklarning ikkilamchi infeksiya bilan zaralanishini oldini olishda nazorat qilish samarali ekanligini ko‘rsatdi.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ PhD.03/27.09.2024.В.82.03 ПО
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ЧИРЧИКСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**ЧИРЧИКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

ЮСУБАХМЕДОВ АБДУРАУФ АБДУРАХИМ УГЛИ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ М-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ**

03.00.04 – Микробиология и вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Чирчик-2025

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Министерстве высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан под номером B2022.4.PhD/B805.

Диссертационная работа выполнена в Чирчикском государственном педагогическом университете.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском и английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.chdpu.uz.ilmiy-kengash) и на информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный руководитель: Файзиев Вохид Бахрамович
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Шеримбетов Анвар Гулмирзаевич
доктор биологических наук, с.н.с.
Хусанов Тохир Суннатович
доктор философии по биологии, с.н.с.

Ведущая организация: Гулистанский государственный университет

Защита диссертации состоится на заседании Ученого совета под номером PhD.03/27.09.2024.B.82.03 в Чирчикском государственном педагогическом университете в 14⁰⁰ часов «4» 04 2025 года. (Адрес: 111720, г. Чирчик, ул. Амира Темура, 111720. Тел.: (99870) 712-27-55; факс: (99870) 712-45-41; e-mail: chdpukengash@umail.uz)

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-ресурсном центре Чирчикского государственного педагогического университета (зарегистрирован под номером 384). Адрес: 111720, Ташкентская область, город Чирчик, улица Амира Темура, 104. Телефон: (99870) 712-27-55; факс: (99870) 712-45-41.)

Автореферат диссертации разослан «19» 03 2025 года.
((реестр протокола рассылки № 3 от «19» 03 2025 года).

**С.Т.Жураев**
Заместитель председателя Научного совета по присуждению ученых степеней, док. биол. наук., профессор

А.К. Буронов
Ученый секретарь Научного совета по присуждению ученых степеней, д.ф.б.н., доцент

Х. А. Муминов
Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., доцент

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора (PhD) философии)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Картофель является одной из наиболее широко выращиваемых продовольственных культур в мире. В связи с этим одной из важнейших задач, стоящих перед мировым сообществом, является выделение особого внимания использованию современных научных методов при создании высокоурожайных сортов картофеля, устойчивых к фитопатогенным болезням. В настоящее время рост экспорта картофеля приводит к распространению латентных вирусов в семенных клубнях в другие регионы, что расширяет их ареал. Поэтому важное научное и практическое значение имеют молекулярно-генетическая идентификация, биоинформатический анализ, регистрация и филогения новых изолятов, выявления новых растений-природных резерваторов, важных для сохранения и циркуляции вируса, а также создания вирусоустойчивых сортов картофеля.

Во всем мире проводятся обширные исследования с целью выявления фитопатогенных вирусов, поражающих растения картофеля, проведения их молекулярно-генетической идентификации, снижения наносимого ими ущерба и разработки мер противодействия. В связи с этим большое внимание уделяется изучению биологии, экологии и распространения М-вируса картофеля, выявлению природных резерваторов, идентификации вирусов с помощью иммунохроматографического, иммуноферментного и ПЦР-анализов, проведению филогенетического анализа, разработке научно обоснованных мер борьбы с фитопатогенными вирусами, а также к поиску генов устойчивости к инфекционным болезням, повышения устойчивости сортов и созданию устойчивых сортов на основе этих генов.

В нашей стране достигнуты значительные результаты во многих областях, в том числе в развитии сельского хозяйства, использовании современных научных достижений, возделывание картофеля, повышении его урожайности, разработка и внедрение методов диагностики, направленных на выявление и предотвращение распространения патогенных микроорганизмов. В стратегии развития Нового Узбекистана определены такие важные задачи, как «создание и внедрение новых селекционных сортов сельскохозяйственных культур, адаптированных к местным почвенно-климатическим и экологическим условиям, устойчивых к болезням»¹. Исходя из этих задач, большое значение приобретает молекулярно-генетическая идентификация на основе фрагмента гена белка оболочки М вируса картофеля, а также регистрация и построение филогенетического дерева новых изолятов на основе биоинформатического анализа, а также выявление новых растений-естественных резервуаров, которые считаются важными для сохранения и циркуляции вируса. Данная диссертационная работа в определенной степени служит выполнению задач,

¹Указ Президента Республики Узбекистан, от 28.01.2022 г. № УП-60 “О Стратегии развития Нового Узбекистана на 2022 — 2026 годы”

предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан от 23 октября 2019 года № УП-5853 «Об утверждении стратегии развития сельского хозяйства Республики Узбекистан на 2020-2030 годы», в Указе Президента Республики Узбекистан от 15 июля 2021 года № УП-6262 «О мерах по кардинальному совершенствованию системы карантина и защиты растений в республике», в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 6 мая 2020 года № ПП-4704 «О мерах по расширению производства картофеля и дальнейшему развитию картофельного семеноводства в Республике» и в Постановлении Кабинета Министров Республики Узбекистан от 5 июля 2022 г №361 «О дальнейшем развитии деятельности научно-исследовательского института овощных, бахчевых культур и картофелеводства Национального центра сельскохозяйственных знаний и инноваций при Министерстве сельского хозяйства», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследований приоритетам развития науки и технологий республики. Данные исследования проводились в соответствии с приоритетным направлением развития республиканской науки и техники V. «Сельское хозяйство, биотехнологии, экология и охрана окружающей среды».

Степень изученности проблемы. Биологические особенности и диагностика М-вируса картофеля (МВК), электромикроскопический анализ вируса, мировые научные исследования по симптомам заболевания, распространенности, генетическому разнообразию, молекулярной диагностике вируса разработан и исследован зарубежными учеными D.E. Schultz и D.M.Folsom (1923), M.B. McKay и T.P. Dykstra (1932), R.H.Bagnall (1956), V.Kassanis (1960), K. Xiruki (1973), R.S. Khurana (1980), I.D. Garg (1994), H. Plchova (2015), S.M. Khurana (2003), A.Kumar (2023) и др.

В странах СНГ под руководством академика И.Г. Атабекова С.К.Завриева (1989), С.Ю.Морозова (2001), О.Карповой (2006), Р.В.Гнутовой (2011) и других ученых они изучили структуру и свойства вируса, открыли новые штаммы, провели ряд исследований по идентификации. Р.В.Гнутова выделила вирусы картофеля типа S, Y, M, A, L, поражающие картофель на территории СНГ, приготовила к ним специфическую антисыворотку и иммунологически изучила их.

В нашей стране имеются ряд ученых, занимающихся идентификацией вирусов растений, изучением свойств фитопатогенных вирусов, изучением биоэкологических свойств, влиянием вирусов на определенные морфофизиологические свойства растений. А также, иммунодиагностикой, генетическим разнообразием, молекулярной диагностикой. В том числе под руководством проф. А.Н. Вахобов, К.С. Давронов (1984), З.Н. Кадырова (1990), У.М.Жураева (1993) и В.Б.Файзиевых (2011); а за последние пять лет Т.С. Хусанов (2019), В.Б.Файзиев (2020); Б.Ж. Ахмадалиев (2023), Т.Х. Махмудов (2023), З.Ш. Собирова (2024), Д.Т. Жовлиева (2024) проводили исследование. В.Б.Файзиев (2010) в своих исследованиях впервые определили распространенность как А (АВК) и М-вирусов картофеля (МВК) в нашей

стране, а также их природно-резерваторные растения и степень заражённости и идентификации с помощью ИФА и других иммунологических методов.

Однако биологические, экологические и молекулярно-генетические характеристики МВК в нашей стране не изучены, а научные исследования, проводимые в этом направлении, имеют большое научное и практическое значение при разработке мер борьбы с вирусами.

Связь исследования с планами научных исследований высшего учебного заведения или научно-исследовательского учреждения. Оно проводилось в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры биологии Чирчикского государственного педагогического университета по теме «Выделение, изучение и диагностика фитопатогенных вирусов, распространенных в климатических условиях Узбекистана».

Цель исследования является выделение МВК из экологических условий Ташкентской области, определение его биологических особенностей, проведение молекулярно-генетической идентификации и создание филогенетического дерева.

Задачи исследования:

молекулярная диагностика МВК методом ПЦР в реальном времени и мониторинг распространенности в некоторых районах Ташкентской области;

биологическая идентификация путем выделения МВК и изучение симптомов на тест - индикаторных растениях;

молекулярно - генетическая идентификация и филогенетический анализ вируса на основе гена белковой оболочки;

разработка праймеров для молекулярной диагностики вирусов (*TaqMan*) и использование их по методу ПЦР в реальном времени и сравнительном анализе с зарубежными аналогами;

определены природные источники МВК и установлена степень вирусоустойчивости сортов и образцов картофеля с методом ПЦР в реальном времени;

контроль и определение эффективности процесса получения посадочного материала картофеля очищенного от МВК методом ПЦР в реальном времени на основе технологии апикальной меристемы.

Объект исследования является М - вируса картофеля (МВК), выделенного в чистом виде в лабораторных условиях и изучены некоторые биологические и физико-химические свойства.

Предметом исследования является выделение МВК из растения-хозяина, изучение его влияние на некоторые морфофизиологические процессы растения, определение динамики активности фермента пероксидазы в инфекционном процессе, идентификация молекулярно-генетическим методом и анализ филогенетического дерева.

Методы исследования. В научной работе использован ряд биотехнологических и вирусологических методов, таких как ПЦР в реальном времени и ОТ-ПЦР, секвенирование, гельэлектрофорез, гельхроматография,

выделение и очистка фитовирусов, метод заражения индикаторных растений, спектрофотометрия.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые была определена степень распространенности М-вирус картофеля в условиях Ташкентской области на основе молекулярной диагностики методом ПЦР в реальном времени;

идентифицированы изоляты МВК “PVM-Uz-AY1” и “PVM-Uz-AY2” на основе гена, ответственный за синтез белковой оболочки (СР), которые молекулярно-генетически отличаются друг от друга на основе последовательности нуклеотидов, а филогенетический анализ показал, что узбекские изоляты на 97-98% имеют гомологичность с изолятами NW-Prada1 (Россия), NW-Lomonosov11 (Россия) и NW-Laperla1;

результаты сравнительного анализа аминокислотного состава белковой оболочки изолятов показал, что в изоляте PVM-Uz-AY1 аминокислота **серин (S)** заменена **изолейцином (I)**, а аминокислота **аргинин (R)** заменена на **глицин (G)** а в изоляте PVM-Uz-AY2 аминокислота **аспарагин (N)** замещается **аспарагиновой кислотой (D)**, аминокислота **тирозин (Y)** замещается **аспарагином (N)**, а аминокислота **аргинин (R)** также замещается **аспарагином (N)**;

выявлены новые природно-резерваторные растения, распространённые в климатических условиях нашей страны, как паслен черный (*Solanum nigrum*), физалис (*Physalis*), марь белая (*Chenopodium album*), пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris* L.) и чина луговая (*Lathyrus pratensis*);

Практические результаты исследования заключаются в следующем: Результаты, полученные путем секвенирования нуклеотидной последовательности фрагмента гена СР изолята МВК, распространенного в нашей стране, были зарегистрированы в базе данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации США) с идентификационными номерами “PVM-Uz-AY1” и “PVM-Uz-AY2”.

Разработаны специфические праймеры на основе нуклеотидной последовательности изолята МВК, и появилась возможность раннего обнаружения вируса методом ПЦР в реальном времени, разработки мер борьбы с ним, определение степени распространения вируса.

Внедрена практика сортировки безвирусного семенного материала картофельного сбора в диагностике МВК с использованием разработанного метода ПЦР в реальном времени, а также в Научно-исследовательском институте овощеводства, бахчевых культур и картофелеводства.

Достоверность результатов исследования. Достоверность результатов исследований заключается в том, что анализы проводились с использованием современных вирусологических, биотехнологических, молекулярно-генетических методов, научные результаты анализировались с помощью современных статистических анализов с использованием программы «Statistica 6.0», а также биоинформатического анализа с использованием программ SnapGene, MEGA11, данные GenBank NCBI. При этом нуклеотидная

последовательность исследуемого изолята вируса была размещена в базе данных, результаты обсуждались на республиканских и международных конференциях, а итоги исследований публиковались в научных журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан.

Научно-практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования объясняется тем, что на основе фрагмента гена белковой оболочки МВК, распространенного в Узбекистане, была проведена молекулярно-генетическая идентификация, а в результате биоинформатического анализа были зарегистрированы новые изоляты и составлено филогенетическое генеалогическое древо, а также выявлены новые растения-природные резерваторы, которые считаются важными для сохранения и циркуляции вируса в климатических условиях Ташкентской области.

Практическая значимость результатов исследования объясняется применением разработанного для диагностики МВК набора тестов ПЦР в реальном времени для оценки иммунных, устойчивых и непереносимых к МВК из более чем 35 сортов и клонов картофеля, а также для выявления естественных источников заражения вирусом, распространяющимся в климатических условиях нашей республики.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований, проведенных по выделению МВК, инфицирующего картофель (*Solanum tuberosum* L.), изучение его особенностей и их диагностика имели практическое применение.

Изолят МВК, распространенного в нашей республике, передан в генфонд «Коллекция уникального научного объекта фитопатогенных и других микроорганизмов» (Справка Академии наук Республики Узбекистан от 15 марта 2024 года № 4/1255-314). В результате удалось пополнить коллекцию генофонда штаммов фитопатогенных микроорганизмов, сформировать информационную систему анализа электронной базы данных видового разнообразия вирусов;

С помощью метода ПЦР проанализирован ряд симптомов болезней картофеля, наблюдавшихся на картофельных полях Ташкентской области, и идентифицированы изоляты МВК “PVM-Uz-AY1” и “PVM-Uz-AY2”, которые внесены в международный список GeneBank - база данных NCBI PP235793.1 и PQ243305 размещается с идентификационным номером (справка Министерства сельского хозяйства Республики Узбекистан от 12 августа 2024 года № 05/06/-02-651). В результате это позволило использовать его в научно-исследовательских работах в этом направлении и в процессе создания филогенетического древа.

Для молекулярной диагностики М-вируса картофеля был разработан авторский праймер и разработана ПЦР-тест-система в реальном времени, а данный тест-набор внедрен в практику сортировки семенного материала коллекции Научно-исследовательского института овощей, полевых культур и

картофеля (Министерство сельского хозяйства Республики Узбекистан 2024-от 12 августа года 05/06/-02-651- числовой справочник). В результате удалось провести вирусную диагностику в клубнях картофеля и посевных полях, получить безвирусные клубни картофеля, провести раннюю диагностику скрытого в клубнях МВК.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований обсуждались на 8 международных и 7 национальных научно-практических конференциях.

Публикация результатов исследования. Всего по теме диссертации опубликовано 21 научных работ, из них 6 в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, в том числе 5 в республиканских и 1 в зарубежных научных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и списка использованной литературы, общим объемом 111 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В части **Введение** обосновываются актуальность и необходимость темы диссертации, цели и задачи, а также описываются объект и предметы исследования, соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и техники республики. Представлена научная новизна и практические результаты, раскрыта теоретическая и практическая значимость полученных результатов, представлена информация о внедрении результатов исследования, публикации результатов и структура диссертации.

В первой главе диссертации, озаглавленной **“Обзор литературы по биологии, экологии и диагностике М-вируса картофеля”**, содержится описание вирусов семейства *Betaflexiviridae*, биология, экология и молекулярно-генетическая характеристика М – вируса картофеля, влияние вируса на физиологические и биохимические свойства у растения, получение очищенного препарата, методы диагностики вируса, применяемые современные молекулярно-генетические методы против МВК изложены сведения о методах борьбы как из зарубежной, так и из отечественной научной литературы.

Во второй главе диссертации, который называется **“Материалы и методы, использованные для исследований”**, приведено описание материалов, использованных для выполнения исследования, а также методов, таких как выявление МВК с использованием тест-системы в реальном времени, выделение и биологическая очистка вируса, получение чистого препарата, молекулярно-генетическая идентификация и изучение влияния вируса на определенные морфофизиологические характеристики растений.

В третьей главе диссертации под названием **“Результаты, полученные по молекулярной диагностике и филогенетическому анализу МВК и их анализ”**, выявлен МВК методом ОТ-ПЦР в реальном времени, проведен

мониторинг уровня его распространения в некоторых районах Ташкентской области. Установлена инфицированность МВК, описано изучение растений-индикаторов и симптомов болезни, представлены влияние вируса на некоторые морфофизиологические процессы и на продуктивность картофеля.

В связи с тем, что работа по визуальному мониторингу важна в вирусологических исследованиях, в первом разделе этой главы основной целью было выявление характерных для МВК симптомов из числа вирусных заболеваний, распространенных на картофельных полях, диагностика с помощью молекулярно-генетического метода и мониторинг уровня распространенности в отдельных районах Ташкентской области.

В результате наблюдений в этом направлении на полях возделывания картофеля

наблюдаются такие симптомы, характерные для вирусных заболеваний, как волнообразное скручивание, деформация листовых пластинок, хлоритические пятна по жилкам, мозаичные пятна и замедление роста и развития растений. Заражённые образцы были взяты и исследованы методом ПЦР в реальном времени (рис. 1).

Полученное ПЦР-исследование показало, что сорта *Голландия*, *Умид*, *Арена*, *Аризона*, *Гала*, *Разара*, *Зарзара*, *Пикассо*, *Азара*, *Узбекистан красный* были инфицированы вирусом, результат ПЦР-исследования был подтвержден, а сорта *Агава*, *Санта*, *Киргизская Новкат*, *Красный глаз*, *Наташа* не были инфицированы вирусом на основании отрицательного результата ПЦР. В целом были выявлены сортоспецифические аспекты симптомов вирусного заболевания, которые послужили основой для мониторинга степени распространения вируса (Таб.1).

Сравнение с предыдущими исследованиями в этом направлении (Файзиев и др., 2010) в Ташкентском, Кибрайском и Зангиатинском районах проведен мониторинг и получены результаты, приведенные в таблице 1.

По результатам ПЦР-анализа определен уровень распространения МВК на контролируемых полях картофеля. Исследование показало, что МВК широко



Рисунок 1. Симптомы заболевания, характерные для вируса, обнаруженного на растении картофеля. На рисунке: 1-скручивание листьев и мазаика; 2-точичный мазаика; 3-частичное скручивание листьев; 4-скручивание листьев; 5-6-ЛВК с МВК сопутствующие симптомы.

распространен на всех исследуемых пахотных землях. Заболеваемость комплексными вирусами “Мирмухсин” Ф/Х 94%, “Юксалиш” Ф/Х 92%, “Тухтасин Барака” Ф/Х 90%, “Юсубахмедов Джами Файз” Ф/Х и “Келес Агро” Ф/Х 88%, “Шодмонов Тохир” Ф/Х 79%, “Бауржан” Ф/Х составляют 78% (табл. 1).

Таблица 1

Распространение МВК в некоторых районах Ташкентской области

№	Название Ф/Х	Район	Сорта картофеля	земельного участка, га	уровень заражения, %
1.	Тараққиёт	Кибрайский	Голландия	2.0	91,7 ± 0,29
2.	Юксалиш	Кибрайский	Пикассо	1.0	78,4 ± 0,16
3.	Юсубахмедов Жомий Файз	Кибрайский	Гала	1.0	88,4 ± 0,13
4.	Мирмухсин	Кибрайский	Умид	2.0	94,1 ± 0,21
5.	Бауржан	Бостанлыкский	Гала (Россия)	1,5	78,14 ± 0,16
6.	Тухтасин Барака	Бостанлыкский	Арена	2.0	89,97 ± 0,19
7.	Келес Агро	Ташкентский	Разара	0,5	84,3 ± 0,11
8.	Фарида ая	Зангиатынский	Аризона	0,5	88,3 ± 0,18
9.	Шодмонов Тохир	Зангиатынский	Зарзара	1.0	79,5 ± 0,17

$P < 0,05$ – достоверно по сравнению с контролем; $n=3$.

В результате определения уровня распространения МВК в Ташкентской области авторами, проводившими исследования в этом направлении (Файзиев и др., 2010) методом ИФА, в Кибрайском районе 48%, в Ташкентском районе 5%, 35% в Зангиатынском районе и 34% в Паркентском районе были заражены вирусом. За последние годы (Юсубахмедов, 2023) в результате ПЦР-тест, проведенных в этом направлении, 88% районов Ташкентской области, в частности, в Кибрайском районе и 84% в остальных Зангиатынском, Бостанлыкском и Ташкентском районах были обнаружены растения зараженные МВК. Сравнительный анализ показал, что распространение вируса увеличилось на 40% в Кибрайском районе, на 49% в Зангиатынском районе и на 79% в Ташкентском районе.

Выделение МВК и биологическая идентификация путем изучения симптомов заболевания у растений-индикаторов. Условие получения чистого препарата МВК начинается с выделения этого вируса из других микроскопических организмов, таких как, бактерии и грибы, с использованием растений индикаторов.

При этом было обнаружено, что *Vigna sinensis*, представитель семейства *Fabaceae*, дифференцирующее растение, *Datura stramonium*, представитель семейства *Solanaceae*, может быть использован в качестве собирательного растения для МВК и использован для получения чистого препарата вируса. Сначала вирус был биологически очищен от других вирусов, затем получен препарат, очищенный физико-химическим методом. Получен частично очищенный препарат вируса.

Для получения гомогенного препарата вируса использовали метод гель-фильтрации. Образец из частично очищенного препарата МВК, концентрированного между буфером в колонке гель-хроматографии с гелем Сефадекс-G200, разделяли на отдельные фракции. Степень чистоты и количество очищенного вируса определяли по поглощению полученных фракций УФ-светом на спектрофотометре УФ-1700 (рис. 2).

Спектрофотометрические анализы показали, что первоначальная фильтрация вируса начиналась с 6 фракций, достигая максимального уровня в 8 фракциях и минимального уровня в 11 фракциях. С 12 фракции началось выделение клеточных компонентов, что было установлено на основе проявившихся симптомов на индикаторном растении *Vigna sinensis*. Проверка препарата с помощью ПЦР в режиме реального времени также подтвердила, что вирус выделялся из гельхроматографической колонки в 6-10 фракциях, причем в 8 фракциях было достигнуто максимальное выделение (табл. 2.).

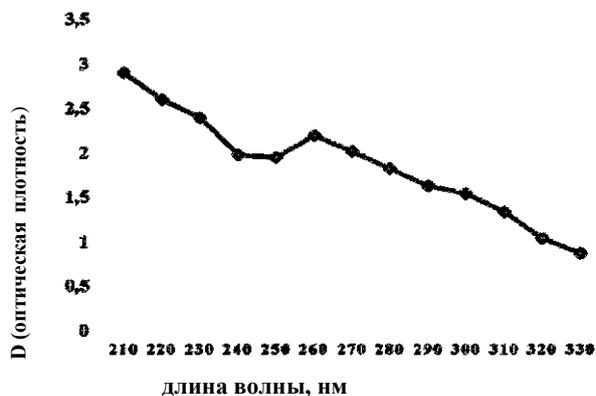


Рисунок 2. График поглощения ультрафиолетового (УФ) излучения чистого вирусного препарата МВК

Таблица 2

Результаты ПЦР в реальном времени фракций, разделенных методом гель-фильтрации препарата МВК

Имя ячейки	Образец имени	Образец тип	Флуоресцентный канал	Ген	Ст*	Результат ПЦР
A1	2-фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
A2	3-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
A3	4-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
A4	6-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	30,02	Положительный
A5	8-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	26,37	Положительный
A6	10-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	37,22	Положительный
A7	14-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
A8	16-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
B1	19-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
B2	22-я фракция	Фрак. жидкость	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный
B3	Пол. контроль.	К+	ФАМ	ген CP	27,02	Положительный
B4	Отр. контроль.	К-	ФАМ	ген CP	Нет Ст	Отрицательный

Примечание: *St* (cycle threshold) — это количество циклов создания дополнительных копий ДНК, начиная с которого результат конкретного теста считается положительным.

Результаты данного исследования позволяют сделать следующие выводы: инфекционность фракций была установлена путем механической инокуляции тест-индикаторных растений, таких как *Datura stramonium*, *Vigna sinensis* и

Phisalis. Установлено, что фракция 6-10 обладает высокой инфекционностью. Кроме того, молекулярная диагностика с использованием ПЦР в реальном времени и биологическая идентификация посредством механической инокуляции тест-индикаторов подтвердили, что данный препарат специфичен для МВК.

Молекулярная идентификация и филогенетический анализ МВК на основе гена белковой оболочки. Молекулярная идентификация и филогенетический анализ изолятов МВК, распространенных в нашей стране, на основе гена, отвечающего за белковую оболочку (CP) (Xu и др., 2010) праймеры (PVM-R - CTT CAT TTG TTA TTC GAC TT и PVM-F-ATG GGA GAT TCA ACR AAG AA) были синтезированы компанией «Integrated DNA Technologies» (Бельгия) и на картофельных полях Кибрайского района Ташкентской области отобраны и молекулярно идентифицированы методом ОТ-ПЦР образцы сортов картофеля Умид, Гала, Пикас с симптомами заболевания МВК (рис. 3)

Нуклеотидное секвенирование продуктов реакции секвенирования проводили на секвенаторе ДНК «Applied Biosystems 3500».

Для определения гена CP использовали базу данных онлайн-программу BLAST International GenBank-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и изолятов

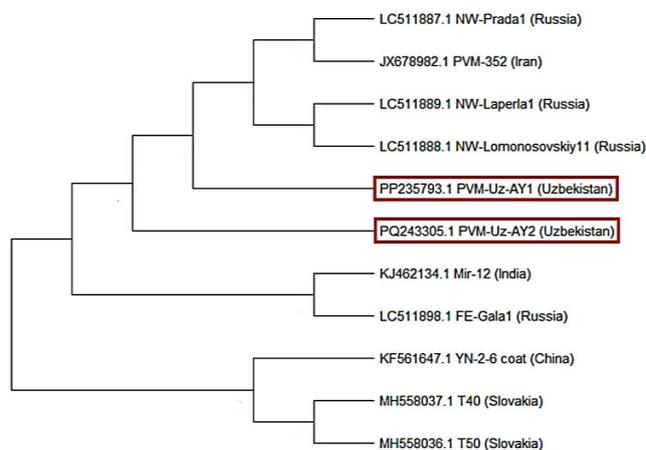


Рисунок 4. Филогенетическое генеалогическое древо МВК

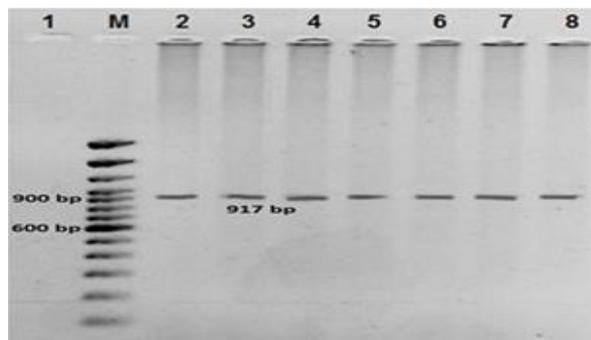


Рис. 3. ОТ-ПЦР анализ с использованием гена белка оболочки (CP) МВК, обнаруженного в образцах листьев картофеля Ташкентской области. Электрофореграмма ОТ-ПЦР гена белка оболочки (CP) МВК, выполнена с универсальными праймерами из образцов листьев картофеля Ташкентской области, электрофорез проведен в 2% агарозном геле. На фото: контроль 1 (безвирусный картофель), образцы для ОТ-ПЦР анализа взяты от сортов Умид (2,3), Гала (4,5), Пикас (6-8). М - ДНК-лестница O'GeneRuler 1 п.н. (Fermentas). Праймеры PVM1/PVM2 и условия ОТ-ПЦР были описаны Xu et al. (2010) было выполнено в представленном виде.

МВК сравнивали с нуклеотидными последовательностями. В итоге вирус, выделенных из заражённых образцов картофеля в ходе экспериментов были идентифицированы два разных узбекских изолятов МВК (Рис.4).

Идентифицированная нуклеотидная последовательность гена CP изолята 1 (286 пн) была помещена в базу данных Международного банка генов – NCBI под названием PVM-Uz-

AY1 (PP235793.1), а второй изолят под названием PVM-Uz-AY2 (PQ243305) выделенного из картофеля (807 пн). Идентифицированные изоляты сравнивали с другими изолятами, имеющимися в базе данных NCBI, на основании их нуклеотидных последовательностей проводили биоинформатический анализ и создавали филогенетическое древо с помощью программы MEGA11 (рис. 4).

В результате биоинформационного анализа изолятов было установлено, что изоляты с гомологией образовывали четыре отдельных кластера, а изоляты PVM-Uz-AY1 и PVM-Uz-AY2 относились к третьему кластеру оказалось, что они находятся в отдельной

филогенетической ветви. Ниже представлена степень сходства обоих изолятов с изолятами других филогенетических ветвей (табл. 3).

Как видно из филогенетического древа, изоляты MBK, идентифицированные в климатических условиях нашей страны, на 98-97% гомологичны изолятам

Таблица 3
Гомология изолятов MBK с изолятами, доступными в базе данных NCBI.

Названия изолятов MBK	PVM-Uz-AY1 (Узбекистан) PP235793.1	PVM-Uz-AY2 (Узбекистан) PQ243305.1
NW-Prada1 (Russia)	98.25%	97.65%
FE-Gala1 (Russia)	96.04%	94.55%
NW-Lomonosovskiy11 (Russia)	98.25%	97.03%
NW-Laperla1 (Russia)	98.25%	97.27%
Mir-12 (India)	97.90%	95.66%
T40 (Slovakia)	95.70%	95.42%
T50 (Slovakia)	95.34%	95.42%
PVM-352 (Iran)	97.54%	96.78%
YN-2-6 coat (China)	95.42%	94.66%

NW-Prada1 (Россия), NW-Lomonosov11 (Россия) и NW-Laperla1 позволяет сделать вывод, что они произошли от этих изолятов, остальные изоляты T40 (Словакия) и T50 (Словакия) 95%, Мир-12 (Индия) и Fe-Gala1 (Россия) 97-94%, YN-2-6 coat (Китай) 95% указывают на то, что изоляты, идентифицированные в нашей стране, произошли от вируса одного предка в отдаленном происхождении с этими изолятами.

На следующем этапе исследований была изучена аминокислотный состав белковой оболочки (CP) изолята "PVM-Uz-AY1", выделенного в нашей стране (рисунок 5).

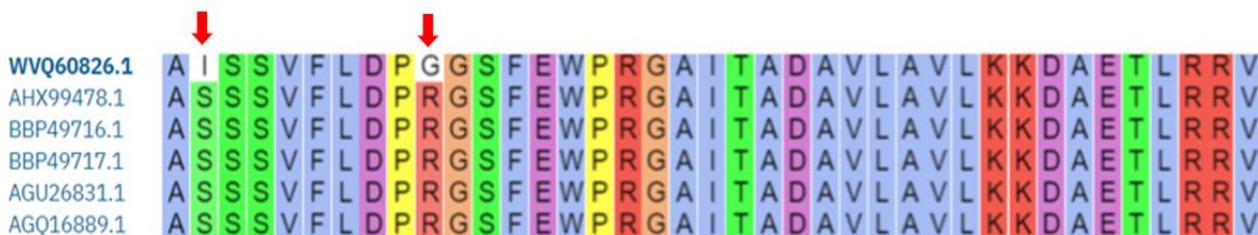


Рисунок 5. Сравнительный анализ аминокислотного состава изолята PVM-Uz-AY1

Сравнивали аминокислотную последовательность изолята PVM-Uz-AY2 <https://www.ebi.ac.uk> с изолятами: Мир-12 Индия (АНХ99478.1), NW-Prada1 Россия (BBP49716.1), NW-Ломоносовский11 Россия (BBP49717.1), 760 Иран (AGQ16889.1), YN-2-6 Китай в другой базе данных NCBI на сайте (AGU26831.1). Как видно из сравнительной таблицы, PVM-Uz-AY1

(Узбекистан) отличался тем, что в изоляте аминокислота **серин (S)** заменялась **изолейцином (I)**, а аминокислота **аргинин (R)** заменялась на **глицин (G)**.

В результате было установлено, что в изоляте PVM-Uz-AY2 (Узбекистан) аминокислота **аспарагин (N)** замещается **аспарагиновой кислотой (D)**, аминокислота **тирозин (Y)** замещается **аспарагином (N)**, а аминокислота **аргинин (R)** также замещается **аспарагином (N)** (рис.6).



Рисунок 6. Сравнительный анализ аминокислотного состава изолята PVM-Uz-AY2

По результатам исследования был сделан вывод, что белковая оболочка близка по аминокислотному составу к большинству изолятов, но не идентична им, что свидетельствует об изменчивости МВК в результате различных абиотических и биотических факторов.

Разработка праймеров для молекулярной диагностики МВК (*TaqMan*) и использование в режиме реального времени метода ОТ-ПЦР и сравнительного анализа с зарубежными аналогами. Метод ПЦР важен в молекулярной диагностике вирусных инфекций, идентификации фитопатогенных типов и штаммов. Поэтому были разработаны специальные праймеры для ОТ-ПЦР в реальном времени. Они также включены в базу данных NCBI. Праймер для МВК был разработан на основе последовательности геномов МВК. Способность праймеров идентифицировать изоляты вируса МВК, имеющиеся в банке генов, проверяли с помощью инструмента поиска базового локального выравнивания, предоставленного базой данных NCBI. Разработанные праймеры: *форвард* праймер: PVM_F5`-CTGAGCACGTGCA-RCAGGT-3`, *реверс* праймер: PVM_R5`-TTCTCAACGTAATCAAAGCAGTC-3`, праймер меченный флуоресцентным зондом Cy5-GCAAGCAGTCCGTA TTCCTGGATC-BHQ-2 были выбраны по нуклеотидной последовательности гена CP МВК. Продукт ПЦР, представляющий собой часть гена, отвечающего за синтез репликазы, имеет последовательность из 298 пар нуклеотидов (пн). В проведенном эксперименте были получены одинаковые результаты как стандартных (обычных), так и методов ОТ-ПЦР в реальном времени (Рис.7).

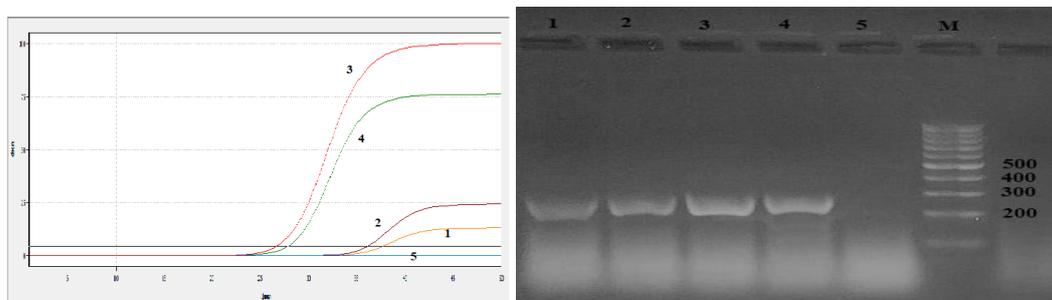


Рисунок 7. Выводы сравнения диагностики МВК с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени и стандартного метода ОТ-ПЦР. На фото: 1 – сорт «Агаве»; 2 – сорт «Гала»; 3 – сорт «Зарзара»; 4 – сорт «Пикас»; 5 – образец здорового картофеля; ДНК-лестница М-1000 п.н. плюс.

Преимущество ПЦР в реальном времени: есть возможность кратковременного исследования большого количества образцов, отсутствие использования опасных для здоровья человека канцерогенов, таких как этидий бромид, используемых для окрашивания нуклеиновых кислот, очень низкий уровень риска загрязнения лаборатории нуклеиновыми кислотами (ампликонами) и, что наиболее важно, высокий уровень чувствительности, при котором человеческий фактор не участвует в получении результата эксперимента (Рис. 7).

Проведен сравнительный эксперимент между разработанным ПЦР-диагностическим набором и альтернативным ПЦР-набором, использованным в других исследованиях (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительный анализ чувствительности разработанного ПЦР-диагностического набора для диагностики МКВ с альтернативным вариантом

Нет	Название сорта	Тест-система «МКВ -ПЦР в реальном времени», разработанная в лаборатории научных исследований «Молекулярная биология и биоинформатика»	Диагностический набор «М вирус картофеля в реальном времени-ПЦР» компании СИНТОЛ
		Результат ПЦР (Ct)*	Результат ПЦР (Ct)
1	Карона	32,95	28,64
2	Боғизағон	31,42	34,22
3	Пском	15,56	24,81
4	Кувонч	26,73	31,84
5	Ташкент эртаги	14,03	25,31
6	Узбекистон кизили	24,71	28,67
7	Ақроб	16,69	22,74
8	Умид	29,49	24,63
9	Мастак	-	-
10	Юлия	33,94	27,84
11	Карлан	33,48	28,64
12	Манифес	21,26	25,44
13	Уладар	27,66	25,28
14	Суравинк	-	-
15	Зарочка	-	-
16	Паласт	-	-
17	Лилия	-	-
18	Горангия	-	-
19	Универсал	-	-
20	Голден	-	-
21	Ариран	-	-
22	Питек	35,08	29,54
23	Кавказ	34,88	33,34
24	Нахитга	35,18	29,59
25	Зирве	35,16	31,45

Примечание: Ct (cycle threshold) — это количество циклов создания дополнительных копий ДНК, начиная с которого результат конкретного теста считается положительным.

По результатам, представленным в таблице, сравнение «Набора для диагностики ПЦР в реальном времени на М вирус картофеля» фирмы СИНТОЛ (Россия), который выпускается для диагностики МВК и является альтернативой данной диагностике. По результатам ПЦР (Ст) в обоих тестах один и тот же – очень близок к единице, следует признать, что применение разработанного в Узбекистане ПЦР- теста для диагностики МВК имеет большое практическое значение в профилактике вирусного эпифита на ранних стадиях заражения вирусом (табл. 5).

Данное исследование является доказательством экономической эффективности разработанного местного ПЦР-тест-набора, которое определяется суммой всех трудозатрат и других расходных реагентов, затраченных на разработку тест-набора.

Разработанный набор ПЦР в реальном времени состоит из нескольких наборов реагентов для тестирования 100 образцов (включая образцы положительного и отрицательного контроля). Сумма расходов и их стоимость приведены ниже (табл. 5). Совокупность компонентов и цена тест-набора составлены с учетом продукции и услуг научно-производственной компании «СИНТОЛ».

Тест-набор «Дифференциальная диагностика вируса картофеля МВК и выявление вируса ЛВК методом ОТ-ПЦР в реальном времени» производства компании «СИНТОЛ» был предложен ООО «ГЕНОМЕД» за 3 920 000 сум, включая НДС.

Таблица 5

Состав тестового набора для ПЦР в реальном времени

№	Материалы и трудозатраты, необходимые для создания диагностического тест набора ПЦР в реальном времени	Компоненты	Стоимость 100 анализов	Цена, (в сумах)
1.	ПЦР-реагенты и ферменты	Набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени	за 100 образцов	250 000.00
		Фермент транскриптаза для проведения ОТ-ПЦР		475 000.00
	Праймеры	Прямые и обратные праймеры		20 000.00
		Меченый праймеры (TaqMan)		212 000.00
2.	Резьбовой пробирка 2 мл		6 шт	12 000.00
	Бумага для инструкция и упаковки тестовых наборов			5000.00
3	Стоимость труда, затраченного на разработка праймеров.		3 ч	796 500.00
4	Стоимость использованной электроэнергии		2 кВт/час	1 800.00
Общие расходы				1751300.00

По результатам расчета на один набор потрачено 1 751 300.00 сум, что снижает стоимость набора ПЦР-теста в 2.2 раза.

Природные источники заражения МВК и степени вирусоустойчивости сортов и образцов картофеля методом ПЦР в реальном времени. В изучении циркуляции МВК в природе большое практическое значение сегодня имеет выявление его насекомых-переносчиков и растений-резерватров. Поэтому в данных исследованиях основной целью было определение резерваторов МВК у дикорастущих и культурных растений в климатических условиях Узбекистана молекулярно-генетическим методом. Образцы для исследования были получены методом ПЦР в реальном времени из 20 видов культурных и дикорастущих растений с симптомами болезни или без симптомов болезни, произрастающих на картофельных полях Ташкентской области и ее окрестностях.

По данным ПЦР установили что, в растений, которых указанных в литературе: у физалиса (*Physalis*), паслён чёрного (*Solanum nigrum*) а также пастушья сумка обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* L.), чина луговой (*Lathyrus pratensis*) содержится высокий титр МВК.

Пастушья сумка обыкновенная разрастается осенью, её листья зимуют под снегом и продолжают расти весной и сохранение МВК в резерваторных растениях вызывает периодическую циркуляцию вируса и его распространение на более широкую территорию.

Мониторинг уровня устойчивости к МВК различных сортов и образцов коллекции картофеля. В качестве объектов исследований в этом направлении в коллекцию Института научных исследований овощеводство, полевых культур и картофелеводство включены сорта и образцы картофеля, имеющиеся на опытном поле. Был определен уровень естественной заболеваемости МВК и на его основе резистентность разделена на группы (табл. 6).

Таблица 6

Группы устойчивости картофельных сортов и образцов к МВК

Группы выносливости				
Иммунитет	Практически устойчивый	Слабая заболеваемость	Средний заболеваемость	Не устойчивый
Границы классификации на группы по уровню заболеваемости				
0%	10%	25%	50%	выше 50%
Мастак, Суравинк, Зарочка, Паласт, Лилия, Горантия, Универсал, Голден, Ариран, Кая, Анаран, Япрок, Бахор, К-1, К-2, К-5, К-73.	-	Юлия, Нахитта.	Карона, Питек, Саммит, К-12.	Богизаган, Пском, Кувонч, Ташкент эртаги, Узбекистан красный, Акроб, Умид, Карлан, Манифест, Уладар, Кавказ, К-9.

По результатам установлено, что из 35 испытанных сортов и клонов *Мастак, Суравинк, Зарочка, Паласт, Лилия, Горантия, Универсал, Голден, Ариран, Кая, Анаран, Япрок, Бахор* и *К-1, К-2, К-5, К-73* МВК не выявлен. Слабая заболеваемость выявлена у сортов *Юлия* и *Нахитта*, а высокая - у

сортов *Богизаган, Пском, Кувонч, Ташкент эртаги, Узбекистан красный, Акроб, Умид, Карлан, Манифест, Уладар, Кавказ, К-9* сорта и клоны.

В процентном отношении 49% сортов и образцов, относящихся к первой группе (иммунные), были в основном завезены из-за границы, тогда как сорта и образцы, относящиеся ко второй группе (практически устойчивые), не выявлены. Кроме того, установлено, что 5,6% относились к третьей группе (слабые пациенты). К четвертой, то есть умеренно восприимчивой группе, относились 11,4% сортов, к пятой группе (устойчивые) - 34%. В результате испытаний установлено, что среди иммунных сортов устойчивых групп местные сорта отсутствуют, в среднем 25% восприимчивых сортов составляют местные сорта, 58% устойчивых к болезням сортов - местные сорта.

Исходя из этого, можно сказать, что было бы целесообразно, если бы выявленные группы устойчивости представляли собой преимущественно иммунные и слабая заболевающие сорта, используемые для создания в дальнейшем вирусостойчивых сортов.

Контроль и определение эффективности процесса получения посадочного материала растений без МВК методом ОТ-ПЦР в реальном времени на основе технологии апикальной меристемы. Для этого по результатам ПЦР-теста в режиме реального времени в биотехнологической лаборатории Института научных исследований овощеводство, полевых культур и картофелеводство подобрано 6 сортов (Пикас, Умид, Аризона, Узбекский красный, Карона и Карлан), зараженных МВК и в этапе вегетации третью часть сортов подобрали, химически обработали и далее выращивали на питательной среде методом *in vitro*. После выращенные *in vitro* образцы посадили в теплицу и исследовали методом ОТ-ПЦР в реальном времени (табл. 7).

Таблица 7

Результаты ПЦР в режиме реального времени по выявлению МВК при выращивании семенных клубней картофеля *in vivo* и *in vitro*

Нет	Сорт картофеля	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
		Срок проверки, дней					
		30	40	60	30	40	60
1	Пикас	+	++	++	-	-	-
2	надеясь	+	++	+++	-	-	-
3	Аризона	+	++	++	+	+	Ø
4	Узбекистан красный	++	+++	++++	-	-	-
5	Карона	+	+	+	+	+	Ø
6	Карлан	+	+	+	-	-	-

Примечание: «+» — уровень заражения, «-» — не заражен вирусом, « Ø » — образцы исключены из эксперимента.

Из проведенного исследования выяснилось, что при выращивании картофеля методом *in vitro* с использованием ткани апикальной меристемы было достигнуто получение безвирусного посадочного материала путем комбинированного применения химиотерапии для защиты растения от различных фитопатогенов. Также доказано, что при использовании этого

метода повышается экономическая эффективность при выращивании урожая, защита его от вирусов и других бактериологических и грибковых патогенов.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных научно-исследовательских работ на тему «Молекулярная диагностика и филогенетический анализ М-вируса картофеля» были сделаны следующие выводы:

1. В Ташкентском, Кибрайском, Бостонликском и Зангиатинском районах проведен мониторинг, обнаружены вирусные симптомы у картофеля как: волнообразное скручивание, деформация листовых пластинок, хлоротические пятна по жилкам, мозаичные пятна и замедление роста и развития. Заражённые образцы были проверены методом ПЦР и получены положительные результаты, тем и доказано МВК, а также определена распространённость вируса, она составляла с 78% до 94%.

2. МВК выделен из растения-хозяина с помощью растения-дифференциатора и был биологически идентифицирован на основе инокуляции к растениям-индикаторам и симптомов у них, в результате наблюдений было подтверждено, что симптомы желтого хлористого пятна у растения *Vigna sinensis*, желтой мозаики у растения *Datura stramonium*, желтой мозаики между жилки листа у растения *Physalis* специфичны для этого вируса.

3. Изолят МВК, распространенный в климатических условиях Узбекистана, был молекулярно идентифицирован на основе гена СР и впервые выделены изоляты этого вируса “PVM-UZ-AY1” (ID: PP235793.1) и “PVM-UZ-AY2” (PQ243305), которые внесены в базу данных NCBI, на основе этого гена было создано филогенетическое генеалогическое древо вируса.

4. Разработаны праймеры для молекулярной диагностики МВК, создан тестовый набор “ПЦР в реальном времени” для молекулярной диагностики вируса, сравнительный анализ которого с зарубежными аналогами от компании Sintol (Россия) показал, что они не отстают по чувствительности и по стоимости примерно в 2,2 раза дешевле.

5. Разработан ПЦР-тест системы в реальном времени и использовалась для определения естественных резерваторных растений МВК, в результате были обнаружены с высоким титром МВК в таких растений как: паслён чёрный (*Solanum nigrum*), физалис (*Physalis*), как марь белая (*Chenopodium album*). Выявлены новые природно-резерваторные растения МВК: пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris* L.), чина луговая (*L. athyrus pratensis*).

6. Набор для ПЦР в реальном времени послужил основой для ранней диагностики вирусной инфекции клубней картофеля и выявления иммунных сортов Мастак, Суравинк, Зарочка, Паласт, Лилия, Горантия, Универсал. Эти

сорта были рекомендованы селекционерам для использования в исследованиях по созданию вирусоустойчивых сортов и повышению устойчивости.

7. Тест-система ПЦР в реальном времени, использованная на этапах получения безвирусного посадочного материала, не содержащего МВК, с использованием метода *in vitro*, послужила основой для получения безвирусных клубеньков и показала, что контроль эффективен для предотвращения повреждения клубеньков вторичной инфекцией.

**SCIENTIFIC COUNCIL PhD.03/27.09.2024.B.82.03 ON AWARD OF
SCIENTIFIC DEGREES AT CHIRCHIK STATE PEDAGOGICAL
UNIVERSITY**

CHIRCHIK STATE PEDAGOGICAL UNIVERSITY

YUSUBAXMEDOV ABDURAUUF ABDURAXIM O'G'LI

**MOLECULAR DIAGNOSIS AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF
POTATO VIRUS M**

03.00.04-Microbiology and virology

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOKTOR OF PHILOSOPHY (PhD)
OF BIOLOGICAL SCIENCE**

Chirchik-2025

The dissertation of PhD has been registered with number B2022.4.PhD/B805 at the Supreme Attestation Commission at the Ministry of higher education, science and innovations of the Republic of Uzbekistan

The dissertation has been prepared at the Chirchik State Pedagogical University.

The abstract of the dissertation in three (Uzbek, Russian and English (Resume) languages has been placed on the website of the Scientific Council (www.chdpu.uz.ilmiv-kengash) and on the website of "Ziyonet" information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific supervisor:

Fayziev Vokhid Bakhramovich
Doctor of biological sciences, professor.

Official opponents:

Sherimbetov Anvar Gulmirzayevich
Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher

Khusanov Tokhir Sunnatovich
Doktor of philosophy in biological sciences

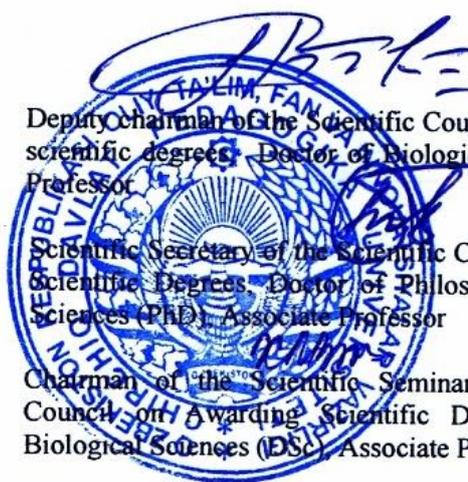
Leading organization:

Gulistan State University

The defense of the dissertation will take place at the meeting of the Scientific Council PhD.03/27.09.2024.B.82.03 at Chirchik State Pedagogical University on "4" 04 2025, at 14⁰⁰ o'clock. (Address: 111720, Tashkent region, Chirchik city, Amir Temur street, house 104. Phone: (+99870) 712-27-55; Fax: (+99870) 712-45-41; E-mail: chdpukengash@umail.uz)

The dissertation can be reviewed at the Information Resource Center of Chirchik State Pedagogical University. (Registered under number 364).
Address: 111720, Tashkent region, Chirchik city, Amir Temur street, house 104.
Phone: (+99870) 712-27-55; Fax: (+99870) 712-45-41.)

The dissertation abstract was distributed on "19" 03 2025.
(No. 3 of the registry dated dated "19" 03 2025).



S.T.Jurayev

Deputy chairman of the Scientific Council for awarding of scientific degrees. Doctor of Biological Sciences (DSc), Professor

A.Q. Buronov

Scientific Secretary of the Scientific Council on Award of Scientific Degrees. Doctor of Philosophy of Biological Sciences (PhD). Associate Professor

Kh.A. Muminov

Chairman of the Scientific Seminar of the Scientific Council on Awarding Scientific Degrees, Doctor of Biological Sciences (DSc), Associate Professor

INTRODUCTION (Abstract of PhD dissertation)

The aim of the research work. It consists in the study and phylogenetic analysis of the biological and molecular genetic characteristics of PVM, isolated from the ecological conditions of the Tashkent region.

The object of research the potato virus M was used, which was isolated cleanly in laboratory conditions, some biological and physico-chemical properties were studied.

The scientific novelty of the research is as follows:

for the first time in our Republic, the isolation of the PVM virus “PVM-UZ-AY1” and “PVM-UZ-AY2” was determined by sequencing the nucleotide sequence of the shell protein (CP) gene fragment, and the PVM isolates in other regions of the world were compared and a phylogenetic analysis was carried out using the NCBI international gene bank electronic platform;

a real-time PCR test system was developed to detect MVC. Based on the results of the sensitivity study, the developed PCR test kit showed results that were not inferior to foreign analogues;

real-time-PZR test system developed for virus Molecular Diagnostics has been applied to natural reservist plant detection, resulting in natural reservist plants new to our country's climate wine such as black ituzum (*Solanum nigrum*), Physalis (*Physalis*), White Dew (*Chenopodium album*), Common jaw-jaw (*Capsella bursa-pastoris* L), corner (*Lathyrus pratensis*), while high-titer plants have been found;

real-time-when the pZR test system was used to early diagnosis of virus infection in potato tubers, to determine the degree of virus resistance of potato variety samples present in the collection “Scientific Research Institute of vegetable, pulses and potato growing”, it was recommended for use in crop material sorting and for use in tadiqotlar, Mastak, Suravink, Zarochka, Palast, Lilia, Gorantia, Universal, etc.

Implementation of research results. Potato (*Solanum tuberosum* L.) on the basis of the results of the research carried out on the separation of PVM, the study of its properties and their diagnosis:

The isolation of potato virus M spread in our Republic was assigned to the genophone” collection of a unique scientific object of Phytopathogens and other microorganisms" (Reference book of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated March 15, 2024 No. 4/1255-314). As a result, strains of phytopathogenic microorganisms have made it possible to enrich the gene pool of the collection, to shape the electronic database information analysis system of virus species diversity;

From a number of potato disease symptoms observed from the potato crop fields of Tashkent region, an analysis was carried out using the PVM PZR method, which identified the virus isolate “PVM-UZ-AY1” and “PVM-UZ-AY2”, and this isolate was placed in the NCBI base of international Genebank with the number ID: PP235793.1 and ID PQ243305. The result was the use in research work in the direction and the use in the process of creating a phylogenetic genealogy (Ministry of Agriculture of the Republic of Uzbekistan as of August 12, 2024 05/06/-02-651-numerical reference).

“On the basis of the local isolate of the potato m-virus, an author's primer was designed and a real-time-pcr test system was developed, and this test kit was introduced into the practice of sorting seed materials of the potato collection” at the Scientific Research Institute of vegetable, pulses and potato growing”. The result was the implementation of virus diagnostics in potato tubers and cultivated areas, the development of measures to combat it, the acquisition of virus-free potato tubers and the early diagnosis of PVM, which is kept hidden in the contents of the tubers. This has been achieved to obtain virus-free planting material in its navabat and to prevent the spread of the virus's cultivated areas in a wide scale (Ministry of Agriculture of the Republic of Uzbekistan as of August 12, 2024 05/06/-02-651-numerical reference).

The structure and scope of the dissertation. The dissertation consists of an introduction, 3 chapters, conclusions and a list of references, totaling 111 pages.

E'LON QILINGAN ISHLAR RO'YXATI
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS
I bo'lim (I часть; part I)

1. Yusubaxmedov A., Fayziyev V. Kartoshkadan yuqori hosil olishda viruslarsiz urug'lik tugunaklarini ekishning samaradorligi//O'zbekiston qishloq va suv xo'jaligi jurnali, –Toshkent, 2023. (Maxsus son) №1. –B. 19-21. (06.00.00, №4).
2. Yusubaxmedov A.A., Fayziyev V.B. Molekulyar usul orqali kartoshka M-virusining rezervator o'simliklarini o'rganish// Инфекция, иммунитет и фармакология научно-практический журнал. Специальный выпуск. Часть – 2. Ташкент, 2023. – С. 180-185. (03.00.00, №1).
3. Yusubaxmedov A.A. Indikator o'simliklar yordamida kartoshka M-virusining toza kulturasini ajratib olish// O'zR FA Yosh olimlar axborotnomasi, –Toshkent, 2023. №4. –B. 67-70. (03.00.00. <https://oak.uz/pages/4802>)
4. Yusubakhmedov A.A., Fayziyev V.B. Molecular identification of PVM with real-time PCR and study its effects physiological proportions of potato plants// Modern Biology and Genetics, – Chirchik, 2024. №1. – P. 21-31. (03.00.00. <https://oak.uz/pages/4802>)
5. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B., Adilov B., Mahmudov T.H., Abduvaliev B.A., Kurganov S.K., Bekmatova E.E., Temirov A.A., Erdanaeva SH.P., Atabaeva D.T. Molecular identification of the potato virus M isolate PVM-UZ AY1 with coat protein (CP) gene and phylogenetic analysis// SABRAO Journal of Breeding and Genetics, Japan, 2024. № 56(5). –P. 1769-1777. (Scopus).
6. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B., Esanov I.O'. Kartoshka M-virusi oqsil qobig'i aminokislota tarkibining qiyosiy tahlili// «AGRO ILM» jurnali. –Toshkent, 2025. (Maxsus son) №1. (107) (06.00.00, №1).

II bo'lim (II часть; part II)

7. Юсубахмедов А.А., Файзиев В.Б. Определение некоторых биологических свойств и идентификация М вируса картофеля с помощью метода ПЦР// Современная биология и генетика, –Ташкент, 2022. №1-2. –С. 14-20.
8. Yusubaxmedov A.A., Fayziyev V.B. Kartoshkani zararlovchi kartoshka M virusi va uning biologik tasnifi// Academic research in educational sciences №3. – Chirchiq, 2022. – B. 424-430.
9. Yusubaxmedov A.A., Fayziyev V.B. Kartoshka tugunaklarida fitopotogenglarni aniqlashda polimeraza zanjir reaksiyasi usulini qo'llashning afzalliklari// «Qishloq xo'jalik ekinlari seleksiyasi, urug'chiligi va agrotexnologiyalarida dolzarb masalalar va yechimini kutayotgan muammolar» Respublika ilmiy-amaliy anjumani. –Toshkent, 2022. – B. 298-300.
10. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B. Kartoshka M - virusi sistematikasi va biologik xarakteristikasi// “O'zbekistonda milliy tadqiqotlar, Respublika 38-ko'p tarmoqli ilmiy masofaviy onlayn konferentsiya materiallari to'plami, – Toshkent, 2022. – B. 13-15.
11. Юсубахмедов А.А., Файзиев В.Б. Изменение количества хлорогеновой кислоты в растениях при заражении М-вирусом картофеля// материалы международной научной конференции «становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане». – Душанбе: Дониш, 2022. – С. 128-130.

12. Yusubaxmedov A.A., Fayziyev V.B. Kartoshka M - virusi bilan zararlangan o'simliklarda peroksidaza fermentining dinamikasi// Yosh olimlar axborotnomasi. – Toshkent, 2022. № 4. –B. 80-84.

13. Yusubaxmedov A.A., Fayziyev V.B. Kartoshkaning viruslarsiz urug'lik tugunaklarini saralashda molekulyar diagnostikaning avzalliklari// "O'zbekistonda ta'lim tizimidagi islohotlar: olimlar va yoshlar nigohida" mavzusidagi Respublika ilmiy-amaliy konferensiya to'plami. – Toshkent, 2022. – B. 601-604.

14. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B. Kartoshka M-virusi o'simlikning xlorofill pigmenti va karotenoidlariga ta'siri// Zamonaviy fan va ta'lim-tarbiya: muammo va yechimlaril mavzusidagi respublika ilmiy-amaliy anjuman materiallari 2-qism. – Qo'qon, 2022. – B. 448-451.

15. Yusubaxmedov A.A., Fayziyev V.B. Kartoshkaning viruslarsiz urug'lik tugunaklarini ekish orqali yuqori hosil olish// Материалы международной научно-практической конференции «инновационные основы сельскохозяйственных и биоэкологических исследований в регионе приаралья. Часть 2». – Нукус. 2023, – С. 367-368.

16. Yusubaxmedov A.A. Kartoshka M-virusining toza biologik preparatini ajratib olishda ishlab chiqilgan optimal usul// Ta'lim sifati yangi O'zbekiston taraqqiyotini yanada yuksaltirishning muhim omili. Yosh olim va talabalar ilmiy-amaliy konferensiyasi to'plami. – Qo'qon. 2023 – B. 21-23.

17. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B. Kartoshkaning virus kasalliklariga qarshi kurashish chora tadbirlar// International Scientific Journal. Science and innovation issue dedicated to the 80th anniversary of the academy of sciences of the republic of Uzbekistan. – Toshkent, 2023. – P. 279-283.

18. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B. Viruslarning kartoshka tugunagi tarkibidagi kraxmal miqdoriga ta'siri// "Zamonaviy biologiyaning dolzarb muammolari: yechimlari, istiqbollari va o'qitishda fan-ta'lim integratsiyasi" xalqaro ilmiy-amaliy konferentsiyasi. – Chirchiq, 2023. – B. 354-355.

19. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B. Kartoshka yetishtirishda virus kasalliklardan himoya qilish// Oziq-ovqat xavfsizligi: global va milliy muammolar V xalqaro miqyosidagi ilmiy-amaliy anjuman. – Samarqand, 2023l, – B. 399-401.

20. Yusubaxmedov A.A., Fayziev V.B. "Kartoshka M-virusining rezervator o'simliklari"// Biofizika va biokimyoy muammolari – ilmiy konferensiya materiallari. – Toshkent, 2024. – B. 62-63.

21. Yusubakhmedov A.A., Fayziev V.B. Comparative analysis of the amino acid composition of the protein coat of potato M-virus// XVI International Scientific and Practical Conference «The modern vector of the de-velopment of science», – USA, Philadelphia, 2024. – P. 9-10.

Avtoreferat «Zamonaviy biologiya va genetika» jurnali tahriryatida
tomonidan tahrirdan o‘tkazildi. (15.03.2025-yil)

Nashriyot litsenziyasi:



1390

Bosishga ruxsat etildi 15.03.2025 yil.
Buyurtma № 15/03. Adadi 100 nusxa.
Bichimi 60x84 1/16. Bosma tabogi 3,06.
“Times New Roman” garniturasini.
“Zebo prints” MCHJ bosmaxonasida chop etildi.
Toshkent sh., Yashnobod t. 22-harbiy shaxarcha.