

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

КАДИРОВА ЗУХРА АБРАРОВНА

**МИКРОКЛОНЛАШ УСУЛИ ЁРДАМИДА ВИРУССИЗ ДОРИВОР
PHYSALIS ALKEKENGI ЎСИМЛИГИНИ ЯРАТИШ ВА БИОЛОГИК
ФАОЛ МОДДАЛАР ОЛИШ**

03.00.12 – Биотехнология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

ТОШКЕНТ – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Кадилова Зухра Аббаровна

Микроклонлаш усули ёрдамида вируссиз доривор *Physalis alkekengi*
ўсимлигини яратиш ва биологик фаол моддалар олиш 4

Кадилова Зухра Аббаровна

Создание безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi*
методом микроклонирования и получение биологически активных
веществ 22

Kadirova Zuxra Abrarovna

Creating a virus-free medicinal plant *Physalis alkekengi* by microcloning
and obtaining biologically active substances 41

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works 42

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

КАДИРОВА ЗУХРА АБРАРОВНА

**МИКРОКЛОНЛАШ УСУЛИ ЁРДАМИДА ВИРУССИЗ ДОРИВОР
PHYSALIS ALKEKENGI ЎСИМЛИГИНИ ЯРАТИШ ВА БИОЛОГИК
ФАОЛ МОДДАЛАР ОЛИШ**

03.00.12 – Биотехнология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

ТОШКЕНТ – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2019.2.PhD/В347 рақам билан рўйхатга олинган

Диссертация Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме) Илмий кенгаш веб-саҳифаси microbio@academy.uz ва «ZiyoNet» ахборот таълим тармоғида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар: **Ташмухамедова Шохиста Сабировна**
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: **Турдикулова Шахлохон Уткуровна**
биология фанлари доктори, профессор

Рамазанов Нурмурод Шералиевич
кимё фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот: Геномика ва биоинформатика маркази

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.В.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «9» июль кuni соат 10⁰⁰ даги мажлисида бўлади. Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси 7⁶-уй, Микробиология институти мажлислар зали, 3-қават Тел.:(+99871) 241-92-28, факс:(+99871) 241-92-71; e-mail: microbio@academy.uz.

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№__ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтохур тумани, А.Қодирий кўчаси 7⁶-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-қават. Библиотека. Тел.:(+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс:(+99871) 241-92-71.

Диссертация автореферати 2020 йил «_____» кuni тарқатилди.
(2020 йил «_____» _____ рақамли реестр баённомаси).

Арипов Тахир Фатихович
Илмий даража берувчи Илмий кенгаш раиси
б.ф.д., профессор, академик

Жураева Роҳила Назаровна
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Гулямова Ташхан Гафуровна
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш қошидаги
Илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда аҳоли сонининг ортиши доривор моддаларга бўлган эҳтиёжни янада оширмоқда. Маълумки, биологик фаол моддалар тиббий жиҳатдан аҳамиятли бўлган ноёб доривор ўсимликлардан олинади. Бугунги кунда экологиянинг кескин ўзгариши ушбу ноёб ўсимликларнинг фитопатогенлар яъни ўсимлик вируслари билан касалланишига олиб келади. Вирусли патогенлар ўсимликларнинг ўсиши, ривожланишига, шу билан бирга уларнинг дориворлик хусусиятларига ҳамда сифатига салбий таъсир кўрсатади. Таъкидлаш жоизки, вирусларга қарши пестицидларни, заҳарли кимёвий моддаларни ишлатилиши ҳар доим ҳам ижобий самара бермайди, балки ушбу моддалар биосферага жиддий зарар етказиши мумкин. Шу сабабли, доривор ўсимликларни, жумладан *Physalis alkekengi* ўсимлигини микроклонал усулда кўпайтириб, соғлом вируссиз ўсимлик яратиш ва ундан биологик фаол моддаларни олиш илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Жаҳонда турли доривор ўсимликларни фитопатогенлардан, айниқса итузумдошлар оиласи вакилларига жиддий зарар етказадиган тобамовируслардан химоя қилиш борасида илмий ишлар олиб борилмоқда. Жумладан, ўсимликларни микроклонал кўпайтириш усули самарадорлигини аниқлаш, ўсимлик эксплантларини ўстириш ва кўпайтириш учун оптимал озиқа муҳитларини танлаш, ўсимлик протопластларини ажратиш асосида соматик дурагайларни олиш, ўсимлик хужайраларини ажратиш ва уларни генетик трансформациялаш, гаплоид ўсимликлар ва улар асосида дигаплоидларни олиш усулларини такомиллаштириш, *Physalis alkekengi* L. экстрактларининг тиббий хусусиятларини аниқлаш, таркибида антибактериал фаолликга эга ва иммуностимуляторлик хусусияти мавжуд бўлган фаол бирикмаларни яъни физалинлар ва флавоноидларни ажратиб олишда замонавий биотехнологик ёндашувларни қўллаган ҳолда ўсимликларни микроклонал кўпайтириб, вируссиз, соғлом доривор ўсимликларни яратиш биотехнологиясини ишлаб чиқишни тақозо этмоқда.

Республикамизда фармацевтика, тиббиёт ва озиқ-овқат саноатини соғлом доривор ўсимликлар асосида олинadиган фаол моддалар билан таъминлаш чора-тадбирларини ишлаб чиқиш, доривор ўсимликлар ҳосилдорлигини ошириш ва сифатини яхшилаш, шунингдек, фитопатогенларга чидамли ўсимлик плантацияларини яратиш борасида муайян натижаларга эришишга алоҳида эътибор қаратилмоқда.

Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «...фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларини арзон, сифатли дори воситалари билан таъминлаш»¹ вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларни амалга оширишда, жумладан, вируссиз ўсимлик олиш учун *Solanaceae* оиласи вакили *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигини *in vitro* шароитда микроклонал кўпайтириш технологиясини ишлаб чиқиш муҳим

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сонли «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» Фармони.

аҳамият касб этади. Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғи жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора тадбирлар тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон «Дори воситалари ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида»ги қарорида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Доривор ўсимликлар, жумладан, итузумдошлар оиласига мансуб физалис турларининг (*Physalis alkekengi* L.) профилактик ва терапевтик хусусиятларини ўрганиш йўналишида дунёдаги кўплаб илмий текшириш марказларида бир қатор олимлар томонидан тадқиқотлар олиб борилган. Физалиснинг турлари бўйича илмий тадқиқот ишлари АҚШ, Франция, Хитой, Япония, Ҳиндистон, Покистон, Эрон олимлари Ai-LingLi (2018), Cheng Y.K., (2008), Laczkó-Zöld E. (2009), Helvacı S., (2010), Zang L.H., Feng Y.S., (2013), Zunpeng Shu, Na Xing, (2016), Osho (2010) томонидан олиб борилмоқда. Шунингдек, *Physalis alkekengi* L. спиртли экстрактларининг яллиғланишга қарши хусусиятлари Kang H., (2011), Ji L., Yuan Y. (2012), Hong J.M., Kwon O.K., (2015), Shu Z., Xing N., (2016), Moniruzzaman M., Bose S., (2016), Montaserti A., Pourheydar M., (2007), Ji L. ва Yuan Y., Luo L. (2012) олимлар томонидан ўрганилган. *Physalis alkekengi* L. мевали экстрактининг анемияни даволашдаги самарали таъсири Shahnaz Shekar-Foroosh ва бошқалар (2014) томонидан аниқланган. Ёшга боғлиқ кўриш қобилиятининг бузилишини олдини олишда *Physalis alkekengi* L. ўсимлигининг фойдали хусусиятларини Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. (2008) олимлар ўрганганлар.

МДХ мамлакатлари олимлари И.А. Гостищев ва унинг шогирдлари томонидан *Physalis alkekengi* L. таркибидаги каротиноидларни (2018), Т.Ю. Гумеров ва бошқ. физалиснинг биокимёвий таркибини (2017), И.Дж. Кароматов, З.Р.Гоипова (2017) *Physalis alkekengi* L.нинг шифобахшлик хусусиятларини аниқлаш борасидаги маълумотлар келтирилган. ЎЗР ФА Ботаника институтида физалиснинг ботаник хусусиятлари борасида С. Саҳобиддинов (1978), Зоҳидовлар (1991) томонидан илмий ишлар олиб борилган.

Таъкидлаш жоизки, соғлом, патогенсиз доривор *Physalis alkekengi* ўсимлигининг экув материални олиш учун учун *in vitro* шароитда микроклонал кўпайтириш усули амалий жиҳатдан энг қулай ва самарали ҳисобланади. Итузумдошлар оиласидан *Physalis minima* L., *Physalis angulata*

L. ўсимликларини микроклонал кўпайтириш бўйича G. Jahirhussain, S. Parvathi (2016), Owk Aniel Kumar (2016) олимлар томонидан тадқиқотлар олиб борилган ва доривор ўсимликларни кенг миқёсда тарқалишини ривожлантиришга қаратилган технология ишлаб чиқилган.

Адабиётлар таҳлили шуни кўрсатадики, *Physalis alkekengi L.* доривор ўсимлигини *in vitro* шароитда микроклонал кўпайтириш ва вируссиз соғлом ўсимликларни яратиш тўғрисида маълумотлар етарли эмас. Шу сабабли, микроклонал кўпайтириш усулида вируссиз *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигини яратиш ва биологик фаол моддалар олиш илмий-амалий аҳамият касб этади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университетининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг ДИТД А-6-9 «Маҳаллий хом-ашёдан иммуномодуляторлар ажратиш, улар асосида қўйи молекулали моддаларга специфик антитаналар олиш ва ушбу компонентлар асосида тест-система ишлаб чиқиш» (2015-2017), 2.3 «Вируслар, микроорганизмлар ва биологик фаол моддаларни ўрганишнинг назарий ва амалий жиҳатлари» мавзусидаги (2015-2020 йй) мавзусидаги амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади тамаки мозаикаси вирусини ажратиш, тозалаш ва идентификация қилиш ҳамда микроклонлаш усулида вируссиз *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигини яратиш ва биологик фаол моддаларни олишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари қуйидагилардан иборат:

Physalis alkekengi доривор ўсимлиги вирусининг вирус-специфик хусусиятларини аниқлаш ва dot-ИФА усули ёрдамида идентификация қилиш;

in vitro микроклонал кўпайтириш учун ўсимлик эксплантларини тайёрлаш ва уларни стерилизация қилиш;

ўсимликни микроклонал кўпайтириш учун оптимал озика муҳитини танлаш;

микроклонланган ўсимлик таркибидаги *TMV-Ph* вирусини полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усулида таҳлил қилиш;

микроклонланган *Physalis alkekengi L.* ўсимлигини тупроқда ўстириш шароитларини оптималлаштириш;

Physalis alkekengi L. ўсимлигидан флавоноидларни экстракциялашнинг оптимал шароитларини танлаш;

флавоноидлар экстрактининг микробларга қарши ва иммуностимулятор хусусиятларини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигининг вегетатив қисмлари, тамаки мозаикаси вируси *Ph-ВТМ* штамми, индикатор ўсимликлар, флавоноидлар йиғиндиси экстракти, *Proteus mirabilis 9*, *Escherichia coli NC 101*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa 003841/114*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis ВКМ*, *Candida albicans* шартли патоген ва патоген микроорганизмлари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети сифатида *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигини касаллантирувчи тамаки мозаикаси вируси хусусиятларини

аниқлаш, ПЭГ да чўктириш усули ёрдамида *Physalis alkekengi* ўсимлигидан тамаки мозаикаси вирусини (*TMV-Ph*) ажратиш ва тозалаш, *Physalis alkekengi* ўсимлигини микроклонал кўпайтириш усуллари ўрганиш, *Physalis alkekengi* ўсимлиги флавоноидлари экстрактини олиш ва унинг антимиқроб ва иммуностимулятор хусусиятларини ўрганиш учун тадқиқотлар ўтказишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотларни бажариш жараёнида ўсимликларнинг вирус касалликларини аниқлаш учун “индикатор ўсимликлар” усули, қаттиқ фазали нуқта усули dot-ИФА, флавоноидларни экстракция қилиш, стериллаш, Мурасиге-Скуга озиқа муҳитини тайёрлаш, ўсимликларни микроклонал кўпайтириш, полимераза занжир реакцияси (ПЗР) ва бошқа микробиологик ва биотехнологик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор *Physalis alkekengi* L. доривор ўсимлигидан *Virgaviridae* оиласига мансуб “тобамовируслар” гуруҳи вакили бўлган тамаки мозаикаси вирусининг *TMV-Ph* штамми ажратилган ва унга паспорт олинган;

ажратиб олинган тамаки мозаикаси вирусининг *TMV-Ph* штаммини дала шароитида идентификация қилиш учун сезгир иммунофермент таҳлил (dot-ИФА) усули қўлланилиши билан асосланган;

илк бор *Physalis alkekengi* ўсимлиги эксплантларини ўстириш учун оптимал озиқа муҳитлари танланган ва унинг асосида *Physalis alkekengi* L. ўсимлиги микроклонал кўпайтирилиб, вируссиз ўсимлик яратилган, шунингдек, ўсимлик ривожланишининг ювенил фазасидан репродуктив фазасига ўтиши ва тупроқда ўстириш шароитлари асосланган;

микрочлонлаш усулида кўпайтирилган *Physalis alkekengi* ўсимлигида *TMV-Ph* вирусини аниқлаш учун праймерлар дизайни тузилган ва полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули ёрдамида ўсимликда вирус мавжуд эмаслиги исботланган;

Physalis alkekengi ўсимлиги флавоноидлари экстрактининг *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* ва *Bacillus subtilis* каби шартли патоген ва патоген бактерияларга нисбатан фаоллиги, шунингдек, *in vivo* усулида иммуностимуляторлик фаоллиги аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Physalis alkekengi доривор ўсимлигини касаллантирувчи тамаки мозаикаси вируси - *TMV-Ph* штамми аниқланган ва ушбу штамм дала шароитида сезгир иммуноэнзим таҳлили (dot-ИФА) усулида идентификация қилинган;

Physalis alkekengi доривор ўсимлиги микрочлонлаш усулида кўпайтирилган ва вируссиз ўсимлик олинган, шунингдек, ушбу ўсимликда *TMV-Ph* вируси мавжуд эмаслигини полимераза занжир реакцияси (ПЗР) ёрдамида асосланган ва ундан биологик фаол моддалар - флавоноидлар экстракция қилинган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги – ҳар бир тадқиқот тажрибаси камида 3 маротабадан ўтказилгани ва бу ишончли ва барқарор натижаларнинг ўртача қийматини ҳисоблаб чиқиш имконини бергани билан асосланган. Экспериментал

маълумотларга статистик хато, ўртача, ишончлилик интерваллари, стандарт оғишларни ҳисоблаш Statistica 6.0.компьютер дастури ва стандарт методлар ёрдамида олиб борилган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *Physalis alkekengi* L. доривор ўсимлигидан *Virgaviridae* оиласига мансуб “тобамовируслар” гуруҳи вакили бўлган тамаки мозаикаси вируси *TMV-Ph* штаммининг ажратиб олиниши ва *Physalis alkekengi* L. ўсимлигини микроклонлаш усулида кўпайтириш ёрдамида вируссиз, соғлом ўсимликлар яратилиши каби илмий тадқиқотларнинг ривожига катта ҳисса қўшиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти Республикамизда вируссиз, соғлом *Physalis alkekengi* L. доривор ўсимлиги плантацияларини яратиш имконини бериб, улардан ажратиб олинган биологик фаол моддалар эса тиббиёт ва фармацевтикада фойдаланиш учун асос бўлиб хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигини микроклонал кўпайтириш усули ёрдамида вируссиз ўсимлик яратиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

тамаки мозаикаси вируси *Tobacco mosaic virus-TMV-Ph* штамми Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг “Фитопатоген ва бошқа микроорганизмлар” ноёб объекти коллекцияси генофондига топширилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 25 июлдаги 4/1255-2050-сон маълумотномаси). Натижада фитопатоген микроорганизмлар штамлари коллекция генофондини бойитиш, вирус турлар хилма-хилликлари электрон базаси ахборот-таҳлил тизимини шакллантириш имконини берган;

Physalis alkekengi доривор ўсимлигидан ажратиб олинган тамаки мозаикаси вируси *TMV-Ph* штамми Жаҳон микроорганизмлар маълумотлар марказининг Патоген микроорганизмлар миллий коллекциясининг (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) маълумотлар базасига WDCM 862-рақами орқали рўйхатдан ўтказилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 25 июлдаги 4/1255-2050-сон маълумотномаси). Натижада дунёнинг турли минтақаларида тарқалган тобамовируслар гуруҳига оид турларни тадқиқ қилишда глобал доирада фойдаланиш имконини берган;

Physalis alkekengi доривор ўсимлигини микроклонлаш усулида кўпайтирилиши И-2016-5/13 рақамли «Микроклонланган ноёб ўсимлик навларини яратиш технологиясини ишлаб чиқиш ва амалиётга тадбиқ этиш» амалий лойиҳасида ўсимлик ривожланишининг ювенил фазасидан репродуктив фазасига ўтиши ва тупроқда ўстириш шароитларини аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Инновацион ривожланиш вазирлигининг 2020 йилнинг 11 мартдаги 4/135-сон маълумотномаси). Натижада вируссиз соғлом, доривор *Physalis alkekengi* ўсимлиги яратиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 11 та, жумладан 4 та халқаро ва 6 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 18 та илмий иш, шулардан 8 таси Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан 6 таси республика ва 2 таси хорижий илмий журналларда нашр қилинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 107 бетни ташкил этган.

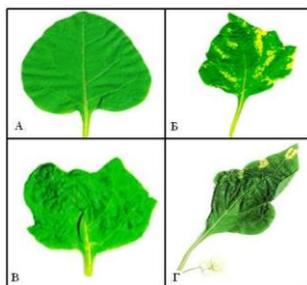
ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурияти асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **“*Physalis alkekengi* L.доривор ўсимлиги турлари, тобамовируслар тавсифи ва соғлом ўсимликлар яратишнинг замонавий усуллари”**деб номланган биринчи бобида келтирилган адабиётлар таҳлилида биологик фаол моддаларга бой *Physalis alkekengi* L. ўсимлигининг шифобахш хусусиятлари, итузумдошлар ўсимликлар оиласи вакиллари касаллантирувчи тобамовируслар ва штаммлари тавсифи ҳамда ўсимликларни микроклонал кўпайтиришнинг замонавий усуллари ҳақида маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **“Индикатор ўсимликлар ёрдамида тамаки мозаикаси вирусини аниқлаш, Мурасиге-Скуга озика муҳитини тайёрлаш ва ушбу муҳитда *Physalis alkekengi* L.доривор ўсимлиги эксплантларини микроклонал кўпайтириш учун ўстириш”** деб номланган иккинчи бобида тамаки мозаикаси вирусини (*TMV-Ph* – физалис штамми) «индикатор ўсимликлар усули» ёрдамида аниқлаш усуллари келтирилган, тамаки мозаикаси вирусини ажратиш ва тозалаш, *TMV-Ph* вируси штаммига юқори специфик антитана олиш ва дот-ИФА таҳлил усули билан вирусни аниқлаш, ўсимликни микроклонал кўпайтириш учун Мурасиге-Скуга озика муҳитини тайёрлаш ва унда ўсимлик эксплантларини кўпайтириш, тупроқни стериллаш ва микроўсимликни тупроққа ўтказиш, ПЗР усули билан тамаки мозаикаси вирусини аниқлаш, ўсимлик таркибидаги флавоноидлар йиғиндисини спектрофотометрда таҳлил қилиш ва ҳайвонлар лимфоид органларида иммунокомпетент ҳужайраларининг ошишини иммунологик тадқиқотлар ёрдамида аниқлаш усуллари тавсифланган.

Диссертациянинг “*Physalis alkekengi L.* доривор ўсимлигининг баъзи вирус хусусиятларини ўрганиш” деб номланган учинчи бобида тобамовируслар касаллик симптомларини аниқлаш, яъни тамаки мозаикаси вируси - физалис *TMV-Ph* штамми бўйича натижалар келтирилган. *Physalis alkekengi L.* ўсимлигининг вирусли касалликларини кузатиш асосида мозаика кўринишидаги (барглар рангининг ўзгариши, оч-яшил рангларни тўқ-яшил ранглар билан чипорланиши) вирус-специфик симптомлар билан касалланган барглар аниқланди (1-расм, В) ва кейинги тадқиқотларда ишлатилди.



1- расм. *Ph. alkekengi* ўсимлиги баргларидаги симптомлар:
 (А)- назорат (*Ph. alkekengi* соғлом барги)
 (Б) – барглар юзасида сариқ доғлар
 (В) – барглардаги тўқ-яшил мозаика
 (Г) – барглардаги деформацияланиш

Вирус-специфик симптомлар *N. glutinosa*, *N. tabacum* «Samsun» нави индикатор ўсимликларида ва *Physalis alkekengi L.* ўсимлигининг ўзида ўрганилди ва тўқ-яшил мозаика белгилари вирус мавжудлигини кўрсатди, бироқ, барглар юзасида сариқ доғлар, баргларнинг деформацияси симптомлари (1-расм, Б, Г) вирусга хос симптомларни намоён қилмади (1-жадвал).

1-жадвал

***Physalis alkekengi* ўсимлигида вирус-специфик симптомларни аниқлаш**

<i>Ph. alkekengi</i> ўсимлиги вирус касалликлари	Индикатор ўсимликлардаги симптомлар		
	<i>N. glutinosa</i>	<i>N. tabacum</i> «Samsun»нави	<i>Ph. alkekengi</i>
Назорат (соғлом барг)	-	-	-
Тўқ-яшил мозаика	Н	М	М
Барглар юзасидаги сариқ доғлар	-	-	-
Барглар деформацияланиши	-	-	-

Изоҳ: М-мозаика, Н-некроз, (-) - некроз намоён бўлмади

Physalis alkekengi L. ўсимлиги тамаки мозаикаси вируси симптомларини бошқа ТМВ штаммлари билан хўжайин ўсимликлар доирасида қиёсий таҳлил қилиш асосида физалис штамми-*TMV-Ph* бошқа ТМВ штаммларига ТМВ-В «Востряково» VII ТМВ-К (IV), ТМВ-Л (VI), ТМВ «Ленинград»VIII, ТМВ «Крымский» XII, Томат «Lenington», Томат «Ontario» III “Ленинград томатный зеленый IX”, Огуречный штамм «зеленый», *Ph. alkekengi (Ph-ВТМ)* ўхшаш белгиларни намоён қилди. Бироқ белгиларни намоён бўлиш вақти турлича бўлиб, баъзи штаммларда 6-, 10-, 12-, 15 ва х.к. кунларни ташкил этди 2-жадвал.

2-жадвал

***Ph. alkekengi* ўсимлиги ТМВ бошқа ТМВ штаммлари билан қиёсий тавсифи**

№	Штаммларнинг номи	N.tabacum «Samsun»	N.tabacum «Sylvestris»	N. tabacum «Debnev»	N. tabacum conf Barley	N. glutinosa	L. esculentum	Ch. quinoa	Ch. amaranticolor	D. stramonium	P. hybrida	Ph. alkekengi	Подорожник (P. lanceolata)	G. globosa	Бодиринг (Cucumis sativus)
1	О-ТМВ	6М	М	Н	Н	Н	12М	Н	Н	Н	М	М	М	М	Н
2	В-ТМВ «Востряково» VII	6М Д	М	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	Мс	-	М	М	Н
3	К-ТМВ (IV)	10М	10Н	Н	Н	Н	25М	Н	Н	Н	М	Н	-	М	Н
4	Л-ТМВ (VI)	6Мд	М	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	М	-	М	М	Мд
5	ТМВ «Ленинград» VIII	7Мд	10Мд	Н	Н	Н	14Мд	Н	Н	Н	М	-	М	М	-
6	ТМВ «Крымский» XII	10М	М	Н	Н	Н	Мс	Н	Н	Н	М	Н	-	М	-
7	Томат «Lenungton»	6Мд	6Н	Н	Н	Н	14М	Н	Н	Н	М	М	-	М	-
8	Томат «Ontario» III	10М	М	Н	Н	Н	М	Н	Н	Н	15Мд	-	-	М	-
9	Ленинград томатный зеленый IX	6М	М	Н	Н	Н	М	Н	Н	Н	М	Л	-	М	-
10	Огуречный штамм «зеленый»	6Мс	М	Н	Н	Н	Мс	Н	Н	Н	М	-	-	М	-
11	<i>Ph. alkekengi</i> (Ph-ТМВ)	10М	3Н	5Н	3Н	2Н	17СМ	10Н	10Н	6Н	17М	15М	25М	21М	3Н

Изох: М-мозаика, СМ – системали мозаика, Мс – кучсиз мозаика, Н-некротлар, Л-локал доғлар, Д- барглар деформацияси, (-) – симптомлар намоён бўлмади, сонлар касаллик белгилари намоён бўлган кунни кўрсатади. (P≤0,05).

Олинган натижалардан маълум бўлдики, *Ph. alkekengi* ўсимлиги вируси тобамовируслар гуруҳига хос симптомларни намоён қилди ва тамаки мозаикаси вирусининг “физалис штамми – TMV-Ph” деб номланди.

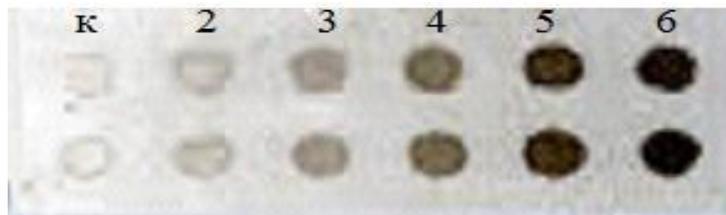
Тамаки мозаикаси вируси физалис штаммининг-TMV-Ph биологик, морфологик ва физик хусусиятларини ўрганиш асосида ушбу штаммининг Gibbs A., Harrison B. (1978) ва В.М. Жданова (1990) систематикаси бўйича *Virgaviridae* оиласининг «тобамовируслар» гуруҳига мансублиги аниқланди. Криптограммаси R/1: 2/5: E/E: S/0: дан иборат, яъни «қаттиқ» вирионлар узунлиги 300 нм, диаметри 18-20 нм; иссиқлик таъсирида инактивация нуқтаси (ИТИН) – 95-98°C; спирал симметрия асосида тузилган (спирал қадами 2,3 нм); бир занжирли РНК (5% РНК, 95% оксил) молекуляр массаси 2x10⁶ D дан иборат; Тадқиқотдаги TMV-Ph штаммининг вирусли ширадаги ИТИН -98°C; суюлиш даражаси – 10⁻⁷; изоэлектрик нуқтаси – 3,5 яъни ТМВ нинг томат штаммига яқин. Тамаки мозаикаси вирусининг физалис штаммига (TMV-Ph) паспорт олинди. Ажратиб олинган TMV-Ph вирус штамми Жаҳон микроорганизмлар маълумотлар марказининг Патоген Микроорганизмлар Миллий коллекциясининг (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) маълумотлар базасига WDCM №862 рақами билан рўйхатдан ўтказилган (http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/862).

TMV-Ph вирусини тозалаш ва антитаналар олиш. Вирусни полиэтиленгликоль (ПЭГ) ёрдамида “чўктириш” усули билан вирусни тозалаш бўйича маълумотлар келтирилган. Бунда *Physalis alkekengi* L. ўсимлик

хужайрасидан вирусли препаратни олиш учун механик майдалаш ва гомогенизация қилиш усули қўлланган. Бунинг учун 300 г *Physalis alkekengi* L. ўсимлиги барглари 0,05М фосфат буфери (рН 7,5) иштирокида гомогенизация қилинган. Кейин филтрдан ўтказиб, 6000 айл/тез. да центрифуга қилинган ва 4% м.м.6000 ПЭГ да 4°С ҳароратда 1 соат давомида инкубация қилиниб чўктирилган. Сўнг 6000 айл/тез. да вирус центрифуга қилиниб, 33-35 мг/мл миқдорда қисман тозаланган вирус ажратиб олинган.

TMV-Ph вирусига специфик антитаналарни «Шиншилла» зотли қуёнга *TMV-Ph* иммуногенини Фрейнда адъюванти аралашмасида юбориш орқали иммунизация қилиб олинган. Бунда *TMV-Ph* концентрацияси 0,5 мг/мл дан 1,5 мг/мл гача миқдорни ташкил этган. Охирги инъекциядан 10 кун ўтиб, қуён қони олина бошланган ва *TMV-Ph* га специфик антитаналар ажратиб олинган. Ушбу специфик антитаналар *TMV-Ph* вирусини аниқлаш учун dot-ИФА таҳлилини амалга оширишда ишлатилган.

dot-ИФА усулида *TMV-Ph* вирусини идентификация қилиш. dot-ИФА иммунофермент таҳлили (dot-Elisa- нуктали қаттиқ фазада иммунофермент таҳлили) усули ёрдамида *Physalis alkekengi* L. ўсимлиги *TMV-Ph* штаммини дала шароитида аниқлаш учун натижалар келтирилган. Диагностик тадқиқотлар натижалари нитроцеллюлоза мембрана филтрларида ўтказилиб, ҳисоблаш ишлари субстрат рангининг ўзгариши билан визуал аниқланган. 2-расм.



2-расм. Нитроцеллюлоза мембранасида *TMV-Ph* вирусининг dot-ИФА таҳлили
Изоҳ: 1- назорат, 2, 3, 4, 5, 6 – турли концентрациядаги вирус намуналари

2-расмдан кўриниб турибдики, вирус концентрациясининг ошиши билан тўқ жигар рангли доғлар намоён бўлди. Ушбу маълумот вирус, яъни аниқланаётган антигеннинг юқори концентрацияда мавжудлигидан далолат беради. Қўлланилган dot-ИФА таҳлилининг бошқа усулларга нисбатан оддийлиги, самаралилиги бир вақтнинг ўзида кўплаб танланган намуналарни вирус билан касалланганлигини аниқлаш ва мураккаб қимматбаҳо асбоблардан фойдаланмасдан тегишли натижаларни олиш имконини беради.

Ўсимлик эксплантларини микроклонал кўпайтириш учун тайёрлаш ва стериллаш. *Physalis alkekengi* L. ўсимлигини стериллаш ва ўсимлик эксплантининг ўлчамини танлашнинг оптимал шароитлари келтирилган. Изоляцияланган тўқималар культураси билан ишлаш давомида стерилликка қаттиқ риоя қилиш зарур. Шунинг учун ўсимлик эксплантларини этанол, хлороформ, дистилланган сув ва ҳ.к.ларда стериллашнинг босқичма-босқич усуллари амалга оширилди. Тайёр бўлган стерил эксплантларни озиқа муҳитига жойлаштирилди ва эксплантларини озиқа муҳитига мослашиши учун 22°С ҳароратда 5 кун давомида совуқ инкубаторга қўйилди, кейинчалик

ёруғлик хонасида 24-25°C ҳароратда кундузи ва кечаси, 5-6 кЛх ёруғликда кузатилди.

Тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, эксплантларни ўстиришнинг 4-5 кунда 6 та Петри идишидан 2-таси замбуруғ (33%) билан зарарлангани аниқланди. 4 чашкада замбуруғ ўсиши кузатилмади (66%). Ўсимлик поялари ва илдиз эксплантлари озуқа муҳитига экилганидан 10 кун ўтиб ривожлана бошлади ва 18-20 кун ичида тўлиқ шаклланди. 100% стериллаш самарадорлигига эришиш учун биз ўсимлик эксплантларини гипохлориднинг турли хил концентрацияларида стериллашга қарор қилдик. Натижалар 3-жадвалда келтирилган. Натижаларга кўра, ўсимлик эксплантларини 20% гипохлорид эритмасида стерилланганда 10 та эксплантдан 9 таси, 15% гипохлоридда 10 та эксплантдан 7 таси замбуруғ ва бактериялар билан зарарланмади. 5% ва 10% гипохлорид эритмасида зарарланган эксплантлар сонининг ошиши кузатилди, яъни 10 та эксплантдан 6-8 таси зарарланди. Ўсимлик поя ва илдизлари 18-20 кундан сўнг шаклланди.

3-жадвал

Physalis alkekengi ўсимлиги эксплантларини ўстириш учун оптимал озиқа муҳитини танлаш

№	Стерил эксплантлар сони	Гипохлорид концентрация си, %	Стериллаш вақти (секунд)	Зарарланмаган эксплантлар сони	Зарарланган эксплантлар сони
1	10	20	20	9±1	1
2	10	15	20	7±2	3
3	10	10	20	4±1	6
4	10	5	20	2±1	8

Изоҳ: зарарланган ва зарарланмаган эксплантлар микдори (M±m; n=5), P≤0,05

Шундай қилиб, олинган натижалардан маълум бўлдики, ўсимлик эксплантларини 20% гипохлорид эритмасида стериллаш, *Physalis alkekengi* ўсимлигини микроклонал кўпайтиришда эксплантларнинг ўсиши ва шаклланишига ижобий таъсир кўрсатади.

Ўсимликни микроклонал кўпайтириш учун оптимал озиқа муҳити ва эксплант ҳажмини танлаш. *Physalis alkekengi* ўсимлиги эксплантларини *in vitro* микроклонал кўпайтириш бўйича тадқиқот натижалари келтирилган. Бунда эксплант ҳажми (поя ва илдиз эксплантлари узунликлари 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 см), озиқа муҳитининг таркиби ва замбуруғларга қарши нистатин препаратининг (500 000 ед/л дан 1500 000 ед/л гача) ўсимликнинг ўсиши ва ривожланишига таъсири ўрганилган.

Натижалардан маълум бўлдики, 0,2 см ўлчамли илдизларнинг эксплантида ўсиш кузатилмади. Илдиз эксплантининг регенерацияси 0,6-1,0 см ўлчамли 8-9 кунда кузатилди. Поя узунликлари 0,8,-1,0 см бўлган эксплантларда ўсиш ва ривожланиш тезроқ бошланди, яъни 8-кундан. Энг яхши натижалар ўлчамлари 0,8-1,0 см дан иборат поя эксплантларида кузатилди (4-жадвал, озиқа муҳити №2 ва №3). Бундан ташқари, замбуруғларга қарши нистатин препарати оптимал концентрациясининг *Physalis alkekengi* ўсимлиги эксплантининг ўсиши ва ривожланишига таъсири аниқланган. Олинган маълумотларга кўра, 8 кундан сўнг, нистатин

концентрацияси 500 000 ед/л бўлганида пояларнинг ўсиши 3,0-6,0 см ни ташкил этди, барглар ўлчамлари 0,5 см дан 2,5 см гача узунликни ташкил этди (3-расм, А, В, С, D).

4-жадвал

**Микроклонал кўпайтириш учун *Physalis alkekengi* ўсимлиги
эксплантининг ўлчамини танлаш ($M \pm m$; $n=5$) $P \leq 0,05$**

Гормонсиз озиқа муҳитлари							
Илдиз эксплант узунлиги (см)	Илдиз ўсимталари		Поя эксплант узунлиги (см)	Поя ўсимталари узунлиги		Барглар узунлиги	
	кунлар	узунлиги (см)		кунлар	узунлиги (см)	кунлар	узунлиги (см)
Озиқа муҳити №1 назорат (нистатинсиз)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	-	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	-	8-9	-
0,6	6-7	-	0,6	8-9	0,3±0,04	8-9	0,5±0,06
0,8	7-8	-	0,8	8-9	0,5±0,06	8-9	1,0±0,08
1,0	7-8	-	1,0	8-9	0,5±0,06	8-9	1,0±0,08
Озиқа муҳити №2 (500 000 ед/л нистатинли)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	*	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	3,0±0,08	8-9	0,5±0,06
0,6	6-7	-	0,6	8-9	3,5±0,12	8-9	2,0±0,14
0,8	7-8	-	0,8	8-9	3,5±0,12	8-9	2,5±0,32
1,0	7-8	-	1,0	8-9	6,0±0,16	8-9	2,5±0,32
Озиқа муҳити №3 (нистатинли 1 000 000 ед/л)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	*	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	4,0±0,08	8-9	1,5±0,16
0,6	6-7	-	0,6	8-9	6,5±0,32	8-9	2,8±0,18
0,8	7-8	-	0,8	8-9	6,5±0,32	8-9	2,8±0,18
1,0	7-8	-	1,0	8-9	8,0±0,34	8-9	3,5±0,36
Озиқа муҳити №4 (нистатинли 1 500 000 ед/л)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	*	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	*	8-9	-
0,6	6-7	-	0,6	8-9	0,2±0,02	8-9	0,5±0,06
0,8	7-8	-	0,8	8-9	0,4±0,03	8-9	0,8±0,06
1,0	7-8	-	1,0	8-9	0,4±0,03	8-9	0,8±0,06

Изох: (-) ўсимталар кузатилмади, (*) – поянинг бўртиши



3-расм. *Physalis alkekengi* ўсимлиги ўсиши ва ривожланишига нистатиннинг таъсири (А-назорат, В-озиқа муҳити №2 (500 000 ед./л нистатинли), С- озиқа муҳити №3 (1 000 000 ед/л нистатинли), D- озиқа муҳити №4 (1 500 000 ед/л нистатинли), E – *Physalis alkekengi* ўсимлигининг стерил тупроқда ўсиб ривожланиши

Нистатин концентрацияси 1 000 000 ед/л бўлган №3 озиқа муҳити ўсимлик эксплантларининг ўсиши ва ривожланишига ижобий таъсир кўрсатди. 10 кундан сўнг поянинг узунлиги 8,0 см ни барглар узунлиги эса 3,5 см ни ташкил этди. Олинган натижаларни назоратдаги эксплантлар ўсиши ва ривожланиши билан солиштирилганида (назоратда илдизлар узунлиги 0,3-0,5 см, баргларни эса 0,5-1,0 см ни ташкил этди) №3 озиқа муҳитида ушбу кўрсаткичлар бир неча марта ошганлиги маълум бўлди. Шу сабабли ўсимлик эксплантларини нистатин концентрацияси 1 500 000 ед/л бўлган озиқа муҳитига №4 экилди. Олинган натижаларга кўра нистатин концентрациясининг ошиши поя ва баргларнинг ўсиб ривожланишига салбий таъсир кўрсатди. Нистатин концентрацияси 1 500 000 ед/л бўлган озиқа муҳити ўсимликнинг ўсиши ва ривожланишига ингибирловчи таъсир кўрсатди.

Бундан ташқари, *Physalis alkekengi* ўсимлигини микроклонал кўпайтиришда концентрацияси турли бўлган гормонларнинг (ВАР, КИН, НАА ва ИВА) эксплантларни ўсиши ва ривожланишига таъсири ўрганилди. 5-жадвалдан кўриниб турибдики, концентрацияси 2 μM дан 10 μM ВАР ва КИН бўлган озиқа муҳитида пояларнинг барглар чиқариб ўсиши 12-15 кундан бошланди. Пояларнинг максимал ўсиб ривожланиши 20-25 кунда 8 μM ВАР ва КИН да кузатилди, янги ўсиб чиққан поя ўсимталарининг сони 6 тадан 13 та гача, узунлиги эса 0,4 см дан 5,18 см гача кўрсаткични ташкил этди.

5-жадвал

Physalis alkekengi ўсимлиги пояси эксплантлари индукциясига турли концентрациядаги цитокининларнинг таъсири ($M \pm m$; $n=5$) $P \leq 0,05$

ВАР	КИН	Униб чиқиши, %	Поялар сони	Поялар узунлиг см
2 μM	--	80	7,6 \pm 0,54	4,44 \pm 0,47
4 μM	--	90	6,8 \pm 1,48	4,68 \pm 0,25
6 μM	--	95	7,8 \pm 1,30	4,8 \pm 0,45
8 μM	--	100	13,4\pm1,14	5,18\pm0,14
10 μM	--	85	10,8 \pm 1,30	4,74 \pm 0,18
--	2 μM	95	6,8 \pm 1,48	4,36 \pm 0,16
--	4 μM	90	7,4 \pm 1,14	4,56 \pm 0,24
--	6 μM	95	8,8 \pm 0,83	4,84 \pm 0,38
--	8 μM	100	11,8 \pm 0,83	5,06 \pm 0,20
--	10 μM	90	8,2 \pm 1,48	4,66 \pm 0,15

Шунингдек, турли концентрациядаги (2 μM дан 10 μM гача) ауксинларни *Physalis alkekengi* ўсимлиги илдизларининг ўсиб ривожланишига таъсири ўрганилди (6-жадвал). Олинган натижалардан маълум бўлдики, концентрацияси 6 μM бўлган НАА ва ИВА *Physalis alkekengi* ўсимлиги илдизларининг ўсишига ижобий таъсир кўрсатди, илдизларнинг сони 7-12 тагача, узунлиги эса 3,16 - 4,54 см кўрсаткични ташкил этди.

Physalis alkekengi ўсимлиги илдиз эксплантлари индукциясига турли хил концентрацидаги ауксинларнинг таъсири ($M \pm m$; $n=5$) $P \leq 0,05$

НАА	ИВА	Униб чиқиши, %	Илдизлар сони	Илдизлар узунлиги, см
2 μ M	--	80	8,8 \pm 0,83	3,44 \pm 0,23
4 μ M	--	90	8,6 \pm 1,14	3,58 \pm 0,16
6 μM	--	100	10,8\pm1,48	4,54\pm0,27
8 μ M	--	95	8,6 \pm 1,14	3,66 \pm 0,30
10 μ M	--	85	8,4 \pm 1,14	4,04 \pm 0,19
--	2 μ M	95	7,6 \pm 1,14	3,16 \pm 0,23
--	4 μ M	90	7,4 \pm 0,89	3,38 \pm 0,21
--	6 μM	100	12,4\pm1,14	4,06\pm0,20
--	8 μ M	95	7,2 \pm 0,83	3,66 \pm 0,29
--	10 μ M	90	7,8 \pm 0,44	3,68 \pm 0,34

Шундай қилиб, *Physalis alkekengi* ўсимлигини микроклонал кўпайтиришда таркибида 1 000 000 ед/л миқдорда нистатин, 8 μ M ВАР ва КИН, 6 μ M НАА ва ИВА гормонлари мавжуд бўлган озика мухитлари поя, барг ва илдизларнинг ўсиши ва ривожланиши учун оптимал озика мухитлари ҳисобланади.

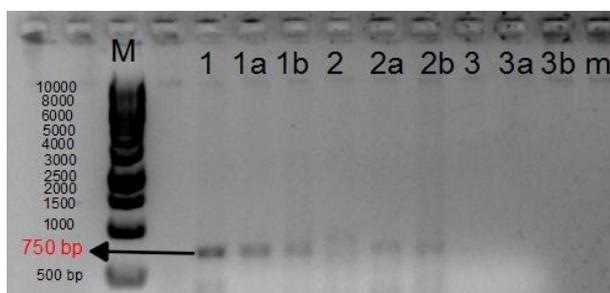
Микроклонал кўпайтирилган *Physalis alkekengi* ўсимлигида ТМВ-Ph вирусини ПЗР усулида аниқлаш. Бунинг учун дастлаб *Physalis alkekengi* ўсимлиги ТМВ-Ph вирусининг праймерлар дизайни тузилди (7-жадвал) ва шу асосда ТМВ-Ph вирусини аниқлаш учун ПЗР таҳлили ўтказилди.

7-жадвал

ТМВ-Ph вирусининг специфик праймерлар дизайни
(Virus-specific primers for multiplex PCR)

Target virus	Primer	Sequence 5 –3	Tm (°C)	GC (%)	Amplicon size (bp)	NCBI accession
TMV	TMV F	TAGACCCGCTAGTCACAG	48.1	55.6	237	JN711115
	TMV R	CAGAGGTCCAAACCAAAC	49.9	50.0		

ТМВ-Ph вирусини ПЗР усулида аниқлаш юзасидан олинган натижалар шуни кўрсатдики, 3-пассаждан сўнг *Physalis alkekengi* ўсимлигида ТМВ-Ph вируси аниқланмади. Маълумотлар 4-расмда келтирилган.



4-расм. Микроклонланган *Physalis alkekengi* ўсимлиги таркибида ТМВ-Ph вирусини ПЗР усулида аниқлаш (1, 1a, 1b – биринчи пассаж вариантлари, 2, 2a, 2b - иккинчи пассаж вариантлари, 3, 3a, 3b – учинчи пассаж вариантлари)

Шундай қилиб, микроклонланган *Physalis alkekengi* ўсимлигида ТМВ-Ph вирусини ПЗР усулида аниқлаш юзасидан олинган натижалардан маълум бўлдики, 3-пассаждан кейин *Physalis alkekengi* ўсимлигида ТМВ-Ph вируси аниқланмади.

Микроклонланган Physalis alkekengi ўсимлигини тупроқда ўстиришининг оптимал шароитларини танлаш. Микроклонланган ўсимликни тупроқга трансплантация қилиш оптимал шарт-шароитларни талаб қилади. Микроклонал кўпайтирилган ўсимликнинг яшаб кетиши ва ҳосилдорлиги намлик, ҳарорат, тупроқ таркиби ва уларнинг стериллиги каби кўплаб омилларга боғлиқ. Ўсимликни тупроқга трансплантация қилишдан аввал 1:5 нисбатда биогумус:стерил тупроқ тайёрланди ва 1,5 атм.босим остида буғланиш таъсири билан 30-40 дақиқа аралашмани стерилланди. Бунда 25-30 см қатламли массани 90-100°C ҳароратга етгунга қадар қиздирилди. Эксплантларни тупроқга кўчириб ўтказиш 20-22°C ҳароратда, нисбий намлиги 70-80%, 3-4 кЛх ёруғликда дастлабки 10 кун давомида, ва 5-7 кЛх кейинги кунларда 14-16 с. фотопериод вақти билан махсус хонада амалга оширилди (5-расм). Расмдан кўриниб турибдики, микроклонланган *Physalis alkekengi* ўсимлиги стерил тупроқда жадал ривожлана бошлади, илдизлари тупроқга мослашди, дастлаб пайдо бўлган барглари ва пояси катталашди, янги барглар ва поялар ўсиб ривожланди.



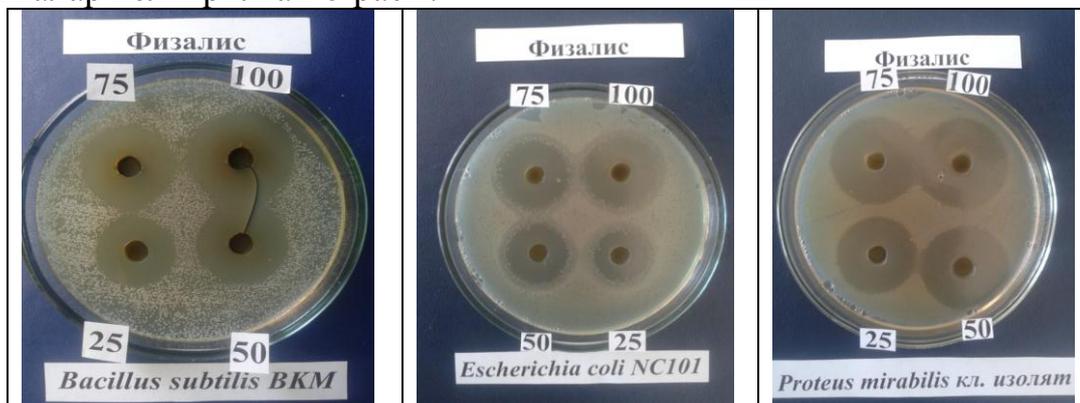
5-расм. Микроклонланган вируссиз *Physalis alkekengi* ўсимлигини стерил тупроқда ўстириш

Шундай қилиб, микроклонланган *Physalis alkekengi* ўсимлигини тупроқда ўстиришининг оптимал шароитлари аниқланди.

Physalis alkekengi ўсимлигидан флавоноидлар йиғиндисини экстракциясининг оптимал шароитларини аниқлаш. Вируссиз доривор *Physalis alkekengi* ўсимлигидан флавоноидлар биологик фаол моддалари экстракция қилинди. Бунда *Physalis alkekengi* ўсимлигидан флавоноидлар йиғиндисини экстракция қилишнинг оптимал шароитлари ўрганилди. Экстракцияни 20% дан 96% гача бўлган этанолда амалга оширилди 20%, 30% ва 40% бўлган этанол концентрацияларида флавоноидлар чиқиши 0,25 дан 0,55 мг гача миқдорни ташкил этди. Флавоноидлар концентрацияси 80% бўлган этанолда тўлиқ экстракция бўлди ва 1,92 мг миқдорни ташкил этди. Экстрагент концентрациясининг ошиши экстракция самарадорлигига таъсир кўрсатмади. Шунингдек, флавоноидлар экстракцияси самарадорлигига 30-135

дақиқа давомида вақтни таъсири ўрганилди ва 90 дан 105 дақиқагача бўлган вақт давомида флавоноидлар ўсимлик хом ашёсидан тўлиқ экстракцияланиши аниқланди. Шунингдек, ўсимлик хом ашёсининг майдаланиш даражаси, экстрагент ва хом ашё нисбатининг экстракцияга таъсири ҳам ўрганилди. Бунда хом ашёни 2,0 мм гача майдаланганда (флавоноидлар 1,93 мг миқдорни ташкил этди), хом ашё ва экстрагент нисбати эса 1:100 бўлганда (флавоноидлар 1,95 мг миқдорни ташкил этди) *Physalis alkekengi* ўсимлигидан флавоноидлар йиғиндисининг максимал экстракцияланиши аниқланди. Шундай қилиб, *Physalis alkekengi* ўсимлигидан флавоноидлар йиғиндисини экстракция қилишнинг оптимал шароитлари ўрганилди.

Physalis alkekengi ўсимлиги флавоноидлари экстрактининг бактерияларга қарши ва иммуностимулятор хусусиятларини ўрганиш. *Physalis alkekengi* ўсимлиги экстрактининг *Escherichia coli* 002673/477, *Pseudomonas aeruginosa* 003841/114, *Proteus mirabilis* 9, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ВКМ, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* шартли патоген ва патоген микроорганизмларга қарши фаоллигини ўрганиш бўйича олинган натижалар келтирилган 6-расм.



6-расм. Флавоноидлар экстрактининг шартли патоген микроорганизмларга нисбатан фаоллиги

7-расмдан кўриниб турибдики, флавоноидлар экстракти *Bacillus subtilis* ВКМ (ўсишнинг тўхташ зонаси диаметри 32 мм ташкил этди) ва *Listeria monocytogenes* (18 мм), *Staphylococcus aureus* (13 мм), *Pseudomonas aeruginosa* 003841/114 (12 мм) каби тест-микроорганизмларни нобуд қилувчи таъсир кўрсатди. *Proteus mirabilis* 9 ва *Escherichia coli* NC 101 микроорганизмлари флавоноидлар экстракти таъсирига ўта сезгир бўлиб, ўсишнинг тўхташ зонаси диаметри 32 мм ва 27 мм ташкил этди (8-жадвал).

8-жадвал

***Physalis alkekengi* ўсимлиги флавоноидлар экстрактининг шартли патоген микроорганизмларга қарши, диаметри, мм ($P \leq 0,05$)**

№	Флавоноид	<i>Escherichia coli</i> NC 101	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 003841/114	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ВКМ	<i>Candida albicans</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
1	Флавоноид	27	12	32	13	32	0	18

Флавоноидлар экстрактининг нисбати 1:1, 1:2, 1:3 ва 1:4 бўлганида *Listeria monocytogenes* да ўсиш зонасининг тўхташи 18, 16, 14 ва 12 мм ташкил этди. *Bacillus subtilis* ВКМ да флавоноидлар экстракти концентрациясининг

пасайиши билан ўсиш зонасининг камайиши кузатилди ва 32, 29, 27, 24 мм ташкил этди. Флавоноидлар экстрактининг микробларга қарши фаоллиги *Proteus mirabilis* 9 ва *Escherichia coli* NC 101 бактерияларида экстракт дозасига боғлиқ бўлиб, ўсиш зонасининг тўхташи 32, 30, 28, 26 мм ва 26, 24, 22, 19 мм ташкил этди.

Шундай қилиб, флавоноидлар йиғиндиси экстракти ўрганилган шартли патоген микроорганизмларга қарши кенг антимиқроб таъсирга эгаллиги маълум бўлди. Экстракт *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* ва *Bacillus subtilis* BKM каби микроорганизмларни ўсишини самарали тўхтатди ва антимиқроб таъсири экстракт дозасига боғлиқ бўлди.

Шунингдек, *Physalis alkekengi* ўсимлиги флавоноидлар экстрактининг сичқонлар лимфоид органларидаги иммунокомпетент хужайралари сонини ошишига таъсири ҳам ўрганилди. Олинган натижалар 9-жадвалда келтирилган.

9-жадвал

Флавоноидлар экстрактининг сичқонлар лимфоид органларидаги иммунокомпетент хужайралари сонини ошишига таъсири ($M \pm m$, $n=6$) ($P \leq 0,05$)

№	Гурухи	Экстракт дозаси	Тимус хужайралари $\times 10^6$	НИ	Суяк кўмиги хужайралари $\times 10^6$	НИ	Лимфа хужайралари $\times 10^6$	НИ
1.	Назорат	-	36,8 \pm 2,0	-	11,0 \pm 0,5	-	20,5 \pm 0,8	-
2.	Экстракт <i>Physalis alkekengi</i>	1,0 мг/л	65,2 \pm 2,1*	+1,77	20,8 \pm 0,5*	+1,89	29,2 \pm 1,1*	+1,42

Изох: НИ – назоратга нисбатан индекс, * - назоратга тўғри

Олинган натижалардан маълум бўлдики, тимусда назорат гурухида 36,8 \pm 2,0 $\times 10^6$ хужайралар аниқланган. *Physalis alkekengi* ўсимлиги флавоноидлар экстракти иммунизация қилинган сичқонларда тимусдаги хужайралар сонини 1,77 марта, суяк кўмиги хужайралари сонини 1,89 марта ва лимфа хужайралари сонини 1,42 марта ошириши маълум бўлди.

ХУЛОСА

«Микроклонлаш усули ёрдамида вируссиз доривор *Physalis alkekengi* ўсимлигини яратиш ва биологик фаол моддалар олиш» мавзуси бўйича ўтказилган тадқиқотлар асосида қуйидаги хулосаларни келтириш мумкин:

1. Илк бор *Physalis alkekengi* L. доривор ўсимлигидан тамаки мозаикаси вирусининг TMV-Ph штамми ажратиб олинди ва унинг биологик, морфологик ва физик хусусиятлари ўрганилди. TMV-Ph штамми тобамовируслар гурухининг *Virgaviridae* оиласига мансублиги аниқланди. Вируснинг ушбу штамми учун паспорт олинган. TMV-Ph вирус штамми Жаҳон микроорганизмлар маълумотлар марказининг Патоген Микроорганизмлар Миллий коллекциясининг (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) маълумотлар базасига WDCM №862 рақами билан рўйхатга киритилган (http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/862).

2. *TMV-Ph* штамми нитроцеллюлозали мембранага адсорбцион-иммобилланган антитаналар асосида сезгир қаттиқ фазали иммунофермент усули ёрдамида идентификация қилиниб, ушбу усул дала шароитида кўп сонли намуналарни бир вақтнинг ўзида таҳлил қилиш имконини берган.
3. Илк бор микроклонал кўпайтириш ёрдамида вируссиз доривор *Physalis alkekengi* ўсимлигини яратиш усули ишлаб чиқилди. Бунда 1 000 000 ед/л нистатин, концентрацияси 8 μ M ВАР ва КИН, 6 μ M NAA ва ИВА бўлган гормонлар ўсимликларни микроклонал кўпайтиришда поя, барг ва илдизларини ўсиб ривожланиши учун оптимал озика муҳити эканлиги аниқланди. Ўсимликни ювенил фазасидан репродуктив фазасига ўтишини тезлаштириш ва ўсимликни тупроқда етиштириш учун махсус шароитлар: 20-22°C ҳарорат, 70-80% нисбий намлик, 14-16 соатли фотодавр давомида 3-4 кЛх ёруғлик дастлабки 10 кун мобайнида ва кейинги кунларда 5-7 кЛх ёруғлик бўлиши қайд этилди.
4. Илк бор *Physalis alkekengi* доривор ўсимлигида *TMV-Ph* вирусини полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули ёрдамида аниқлаш учун праймерлар дизайни тузилди. Бунда 3-пассаждан сўнг микроклонланган *Physalis alkekengi* ўсимлиги эксплантларида *TMV-Ph* вируси мавжуд эмаслиги аниқланди.
5. Доривор *Physalis alkekengi* ўсимлигидан флавоноидлар йиғиндисини экстракция қилишнинг оптимал шароитлари танланди. Бунда 80% этил спиртида хом ашё ўлчами 2,0 мм бўлган, хом ашё/экстрагент 1:100 нисбати флавоноидлар йиғиндисини экстракцияси учун оптимал кўрсаткич эканлиги қайд этилди.
6. Флавоноидлар экстракти йиғиндисининг *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* ва *Bacillus subtilis* каби шартли патоген ва патогенларга қарши антибактериал фаоллиги аниқланди. Флавоноидлар экстракти дозага боғлиқ равишда бактерияларнинг кўпайишини самарали тўхтатди. Бунда флавоноидлар концентрациясининг ошиши билан микроорганизмларни ўсиш зонасини кенгайтириши кузатилди.
7. Флавоноидлар экстрактининг *in vivo* иммуностимулятор таъсири аниқланиб, ҳайвонлар лимфоид органларининг иммунокомпетент ҳужайралари сонини: тимусда - 1,77 марта, суяк кўмигида - 1,89 марта ва лимфа тугунларида - 1,42 марта самарали ошириши билан изоҳланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЁНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ**

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА

КАДИРОВА ЗУХРА АБРАРОВНА

**СОЗДАНИЕ БЕЗВИРУСНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ
PHYSALIS ALKEKENGI МЕТОДОМ МИКРОКЛОНИРОВАНИЯ И
ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

03.00.12 – Биотехнология

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

ТАШКЕНТ – 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером **B2019.2.PhD/B347**

Диссертация выполнена в Национальном университете Узбекистана имени Мирзо Улугбека

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (microbio@academy.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный руководитель: **Ташмухамедова Шохиста Сабировна**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Турдикулова Шахлохон Уткуровна**
доктор биологических наук, профессор

Рамазанов Нурмурод Шералиевич
доктор химических наук, профессор

Ведущая организация: Центр геномики и биоинформатики

Защита диссертации состоится «9» июля 2020 года в «10» часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.B.38.01 при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадирий,7б, конференц-зал Института микробиологии, 5-этаж. Тел.: (+99871)241-92-28, (+99871)241-71-98, факс: (-99871) 241-92-71, 246-02-24, e-mail: microbio@academy.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована под №__). Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадирий,7б, Административное здание Института микробиологии, 5-этаж, библиотека.Тел.: (+99871)241-92-28

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2020г.
(реестр протокола рассылки № __ от «__» _____ 2020 г.

Арипов Тахир Фатихович
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

Жураева Рохила Назаровна
Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, к.б.н., старший научный сотрудник

Гулямова Ташхан Гафуровна
Председатель научного семинара при Научном
совете по присуждению учёных степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации.

Увеличение численности населения в мире повышает потребность в лекарственных веществах. Известно, что биологически активные вещества получают из редких лекарственных растений, имеющих медицинское значение. На сегодняшний день резкое изменение экологии приводит к тому, что эти редкие растения заражаются фитопатогенами, в том числе растительными вирусами. Вирусные патогены отрицательно влияют на рост и развитие лекарственных растений, а также на их лечебные свойства. Стоит отметить, что применение пестицидов, ядохимикатов против вирусов не всегда дает положительный эффект, и эти вещества могут нанести серьезный ущерб биосфере. Поэтому микрклональное размножение лекарственных растений, том числе *Physalis alkekengi*, и создание здорового безвирусного растения, а также получение из него биологически активных веществ имеет научное и практическое значение.

Во всем мире ведутся научные работы по защите различных лекарственных растений от фитопатогенов, особенно тобамовирусов, которые наносят серьезный ущерб представителям семейства пасленовых. В частности, определение эффективности метода микрклонального размножения растений, выбор оптимальных питательных сред для культивирования и размножения растительных экстрактов, получение соматических гибридов на основе разделения растительных протопластов, выделение растительных клеток и их генетическая трансформация, усовершенствование методов получения гаплоидных растений и дигаплоидов на их основе, определение лекарственных свойств экстрактов *Physalis alkekengi* L., выделение таких важных биологически-активных соединений, как флавоноиды и физалины, имеющих антибактериальную активность и иммуностимулирующее действие с использованием современных биотехнологических подходов требует разработки биотехнологии создания безвирусных, здоровых лекарственных растений с использованием методов микрклонального размножения растений.

В Республике особое внимание уделяется разработке и реализации мероприятий по обеспечению фармацевтической, медицинской и пищевой промышленности активными веществами на основе здоровых лекарственных растений, а также достижению определенных результатов в области повышения урожайности и качества лекарственных растений, создании плантаций растений, устойчивых к фитопатогенам. В стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан "...определены задачи дальнейшего развития фармацевтической промышленности, обеспечения населения и медицинских учреждений дешевыми, качественными лекарственными средствами"². В осуществлении этих задач, разработка технологии микрклонального размножения в условиях *in vitro* лекарственного растения *Physalis alkekengi* из семейства пасленовых имеет важное значение.

² Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сонли «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Харакатлар стратегияси тўғрисида» Фармони.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Постановлением Президента Республики Узбекистан ПП-3532 от 14 февраля 2018 года «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли», Постановлением Президента Республики Узбекистан ПП-3489 от 23 января 2018 года «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения», а также в другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы:

Во многих научно-исследовательских центрах мира рядом ученых проведены исследования в области изучения профилактических и лечебных свойств видов физалиса, относящегося к семейству пасленовых (*Physalis alkekengi* L.). Работы по видам физалиса интенсивно проводятся в США, Франции, Китае, Японии, Индии, Пакистане, Иране учеными (2018), Cheng Y.K. (2008), Laczko-Zöld E (2009), Helvacı S. (2010), Zang L.H., Feng Y.S. (2013), Zunpeng Shu, Na Xing (2016), Osho (2010). Изучены противовоспалительные свойства спиртовых экстрактов *Physalis alkekengi* L. учеными Kang H. И и др. (2011), Ji L., Yuan Y. (2012), Hong J.M., Kwon O.K. (2015), Shu Z., Xing N. (2016), Moniruzzaman M., Bose S. (2016), Montaserti A., Pourheydar M. (2007), Ji L., Yuan Y., Luo L. (2012), эффективные действия фруктового экстракта *P. alkekengi* L. при лечении анемии учеными Shahnaz Shekar-Foroosh и др. (2014). Применение *P. alkekengi* L. для предотвращения возрастного ухудшения зрения изучены российскими учеными Дейнека В.И. и Сорокопудов В.Н. (2008), получение каротиноидов Гостищевым И.А. (2018), биохимический состав физалиса - Гумеровым Т.Ю. и др. (2017). Также ведутся исследования в Институте химии растительных веществ в Таджикистане учеными И.Дж. Кароматов, З.Р. Гоипова (2017). Ботанические свойства физалиса изучали в Институте ботаники АН РУз С.Сахобиддинов (1978), Х.Зохидов (1991).

Следует отметить, что для получения здорового, безпатогенного посадочного материала лекарственного растения *Physalis alkekengi* наиболее оптимальным и эффективным, с практической точки зрения является метод клонального микроразмножения *in vitro*. Проводятся исследования по микроразмножению растения из семейства пасленовых *Physalis minima* L., *Physalis angulata* L. и разработана технология, направленная на развитие крупномасштабного распространения лекарственного растения учеными G. Jahirhussain, S. Parvathi 2016; Owk Aniel Kumar (2016).

Анализ литературных источников свидетельствует о том, что данных по микрклональному размножению лекарственного растения *Physalis*

alkekengi L. *in vitro* и по созданию безвирусных здоровых растений недостаточно. Поэтому создание безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi* способами микроклонального размножения и получение биологически активных веществ имеет научное и практическое значение.

Связь диссертационной работы с планами научно-исследовательских работ высшего образовательного или научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ прикладных проектов Национального университета Узбекистана ГКНТ: А-6-9 «Разработка тест-систем к низкомолекулярным антигенам с применением высокоспецифических антител, полученных с помощью иммуномодуляторов из местного сырья» (2015-2017), а также в рамках тематических планов по теме кафедры биологического факультета НУУз 2.3 «Теоретические, практические аспекты изучения вирусов, микроорганизмов и биологически активных веществ» (2015-2020 гг.).

Целью исследования являлось выделение, очистка и идентификация вируса табачной мозаики; создание безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi* методом микроклонирования и получение биологически активных веществ.

Задачи исследования:

определение вирус-специфических свойств лекарственного растения *Physalis alkekengi* и его идентификация методом dot-ИФА;

подготовка эксплантов растения и их стерилизация для клонального микроразмножения *in vitro*;

подбор оптимальных питательных сред для клонального микроразмножения растения;

определение наличия вируса Ph-ВТМ в микроклональном растении *Physalis alkekengi* методом ПЦР;

подбор оптимальных условий для выращивания растений в грунте;

подбор оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов из растения *Physalis alkekengi* L.;

определение антимикробных и иммуностимулирующих свойств экстракта флавоноидов.

Объектом исследования являются вегетативные части лекарственного растения *Physalis alkekengi*, вирус табачной мозаики Ph-ВТМ, индикаторные растения, экстракт флавоноидов, *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* 003841/114, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ВКМ, *Candida albicans*.

Предметом исследования является определение свойств вируса табачной мозаики, поражающего лекарственное растение *Physalis alkekengi*, выделение и очистка ВТМ (Ph-ВТМ) методом осаждения в ПЭГ, изучение способов микроклонального размножения растения *Physalis alkekengi*, получение экстракта суммы флавоноидов из растения *Physalis alkekengi* и проведение исследований по определению антимикробных и иммуностимулирующих свойств экстракта.

Методы исследования. В данной работе для определения вирусных заболеваний использовали метод «растений-индикаторов», твердофазный точечный метод dot-ИФА, спектрофотометрические методы, метод экстракции флавоноидов, стерилизация, приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга, микрклональное размножение, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и другие микробиологические и биотехнологические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые из лекарственного растения *Physalis alkekengi* L. выделен штамм вируса табачной мозаики Ph-ВТМ, относящегося к роду «тобамовирусов» семейства *Virgaviridae* и оформлен паспорт;

оптимизирован чувствительный метод иммуноферментного анализа (dot-ИФА) для определения вируса табачной мозаики Ph-ВТМ в полевых условиях;

впервые создано безвирусное лекарственное растение *Physalis alkekengi* L. методом клонального микроразмножения на основе подбора оптимальных соотношений основных компонентов питательных сред для выращивания эксплантов растения, а также подобраны условия ускорения перехода *Physalis alkekengi* от ювенильной к репродуктивной фазе развития и выращивания растения в грунте;

проведен дизайн праймеров для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения наличия Ph-ВТМ в микрклональном растении *Physalis alkekengi*;

установлена антибактериальная активность экстракта флавоноидов растения *Physalis alkekengi* по отношению к условно-патогенным и патогенным бактериям, в частности, *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* и *Bacillus subtilis*, а также *in vivo* показано иммуностимулирующее действие флавоноидов.

Практические результаты исследования заключаются в следующем: обнаружен вирус табачной мозаики Ph-ВТМ, который поражает лекарственное растение *Physalis alkekengi* и идентифицирован чувствительным иммуноферментным анализом dot-ИФА в полевых условиях;

размножено лекарственное растение *Physalis alkekengi* методом микрклонального размножения и получено безвирусное, здоровое растение, а также доказано отсутствие вируса Ph-ВТМ в растении *Physalis alkekengi* методом полимеразной цепной реакции и экстрагированы биологически активные вещества – флавоноиды.

Достоверность результатов исследования обосновывается тем, что эксперименты проведены не менее, чем в 3 повторностях, что позволило найти средний, наиболее достоверный и стабильный результат. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи критерия Стьюдента с вычислением граничных значений путем использования компьютерных программ STATISTICA 6.0.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в выделении штамма вируса табачной мозаики *Ph*-ВТМ, относящегося к роду «тобамовирусов» семейству *Virgaviridae* и в создании безвирусного лекарственного растения методом клонального микроразмножения.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том что исследования безвирусного, здорового растения *Physalis alkekengi* L. в Республике позволяет создать плантации растения и выделенные из них биологически активные вещества могут быть использованы в медицине и фармакологии.

Внедрение результатов исследования. На основании научных результатов, полученных по созданию безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi* методом клонального микроразмножения:

Штамм вируса табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus-TMV-Ph*) передан в коллекцию генофонда уникального научного объекта «Фитопатогены и другие микроорганизмы» Института Генетики и экспериментальной биологии (справка Академии наук Республики Узбекистан за №4/1255-2050, от 25 июля 2019 г). В результате позволил обогатить коллекцию генофонда фитопатогенных микроорганизмов и сформировать электронную базу чистых культур внутривидовых и специализированных штаммов вирусов.

Выделенный штамм вируса табачной мозаики - *TMV-Ph* из лекарственного растения *Physalis alkekengi* внесен в базу данных Национальной коллекции патогенных микроорганизмов Всемирного информационного центра микроорганизмов (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) под номером WDCM №862 (справка Академии наук Республики Узбекистан за №4/1255-2050, от 25 июля 2019 г.). В результате дал возможность использовать его в глобальном порядке при исследовании видов, относящихся к группе тобамовирусов, которые распространены в разных регионах мира;

Размножение лекарственного растения *Physalis alkekengi* методом микроразмножения использованы в рамках прикладного проекта И-2016-5/13 «Разработка технологии создания микроразмноженных уникальных сортов растений и внедрение» было использовано при определении перехода развития растения от ювенильной фазы в репродуктивную фазу и в определении условий для выращивания в грунте (Справка Министерства Инновационного развития Республики Узбекистан за № 4/135 от 11 марта 2020 г.). В результате дал возможность создать безвирусное, здоровое лекарственное растение *Physalis alkekengi*.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на 4 международных и 7 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них 8 статей, в том числе: 6 - в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей

аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций.

Структура и объем работы. Структура диссертации состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 107 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, изложены цель, задачи исследования, характеризуются объект и предмет исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, отмечено научное практическое значение работы, представлены данные о практическом внедрении результатов исследования, сведения о структуре диссертации.

В первой главе диссертации – обзоре литературы «**Виды лекарственного растения *Physalis alkekengi* L., характеристика тобамовирусов и современные методы создания здоровых растений**» приведен анализ лекарственного растения *Physalis alkekengi* L. обладающего медико-биологическими свойствами, богатого состава биологически активных веществ, приведена характеристика тобамовирусов и их штаммов, поражающих растения из семейства пасленовых, и современных методов клонального микроразмножения растений.

Во второй главе диссертации «**Определение вируса табачной мозаики с помощью индикаторных растений, приготовление питательных сред Мурасиге-Скуга и культивирование эксплантов растения *Physalis alkekengi* L. на среде для микрклонального размножения**» описаны методы определения вируса табачной мозаики (физалисного штамма- *Ph-ВТМ*) с помощью индикаторных растений, выделение и очистка вируса табачной мозаики, синтез конъюгата пероксидазы с антителами полученные к *Ph-ВТМ*, определение вируса методом dot-иммуноферментного анализа, приготовление питательных сред Мурасиге-Скуга и культивирование эксплантов растений на среде, стерилизация почвы и пересадка микрорастений в почву, определение вируса табачной мозаики методом ПЦР, спектрофотометрический анализ количественного определения флавоноидов, а также иммунологические методы по определению общего количества клеток в лимфоидных органах животных.

В третьей главе диссертации «**Изучение некоторых свойств вирусных болезней лекарственного растения *Physalis alkekengi* L. и подбор оптимальных условий выращивания растения *Physalis alkekengi* в грунте**» приведены основные результаты исследования. В частности, в разделе 3.1. «**Изучение некоторых свойств вирусных болезней лекарственного растения *Physalis alkekengi* L.**» описаны результаты по изучению симптомных болезней тобамовирусов, в частности, физалисного штамма вируса табачной мозаики - *Ph-ВТМ*. На основе наблюдений симптомов вирусных болезней растения *Ph. alkekengi* были определены зараженные листья с вирус-специфичными симптомами в виде мозаики (с изменениями

окраски листьев, чередование темно-зеленых участков со светло-зелеными) (Рис.1, В) и использованы в дальнейших исследованиях.

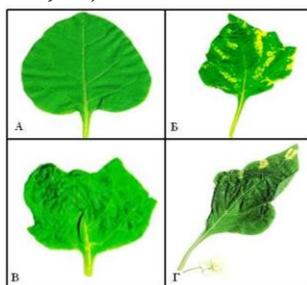


Рис. 1. Симптомы на листьях растения *Ph. alkekengi*:

(А)- контроль (здоровый лист *Ph. alkekengi*)

(Б) – желтые пятна на листьях

(В) – темно-зеленая мозаика листьев

(Г) – деформация листьев

Были изучены вирус-специфичные симптомы на индикаторных растениях *N. glutinosa*, *N. tabacum* сорта «Samsun» и на самом растении *Ph. alkekengi* и было установлено, что симптомы темно-зеленой мозаики подтвердили наличие вирусов, но симптомы желтые пятна на листьях и деформация листьев (Рис. 1, Б, Г) - отсутствие вирусов в растении *Ph. alkekengi* (Табл. 1).

Таблица №1.

Определение вирус-специфичных симптомов растения *Physalis alkekengi*

Симптомы вирусных болезней <i>Ph. alkekengi</i>	Симптомы на индикаторных растениях		
	<i>N. glutinosa</i>	<i>N. tabacum</i> сорт «Samsun»	<i>Ph. alkekengi</i>
Контроль (здоровый лист)	-	-	-
Темно-зеленая мозаика	Н	М	М
Желтые пятна на листьях	-	-	-
Деформация листьев	-	-	-

Примечание: М-мозаика, Н-некрозы, (-) - некроз не выявлен

На основе сравнительного анализа вируса табачной мозаики растения *Ph. alkekengi* с другими штаммами ВТМ на растениях-хозяевах наблюдали сходные симптомы физалисного штамма с другими: В-ВТМ «Востряково» VII К-ВТМ (IV), Л-ВТМ (VI), ВТМ «Ленинград» VIII, ВТМ «Крымский» XII, Томат «Lenington», Томат «Ontario» III, Ленинград томатный зеленый IX, Огуречный штамм «зеленый», *Ph. alkekengi* (*Ph*-ВТМ). Однако время проявления симптомов ВТМ были разные, у некоторых штаммов на 6-день, 10-, 12-, 15-дни и тд. Табл. №2.

Таблица №2

Сравнительный анализ ВТМ растения *Ph. alkekengi* с другими штаммами ВТМ

№	Название штаммов	<i>N. tabacum</i> «Samsun»	<i>N. tabacum</i> «Sylvestris»	<i>N. tabacum</i> «Debnev»	<i>N. tabacum</i> сорт Barley	<i>N. glutinosa</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>Ch. quinoa</i>	<i>Ch. amaranticolor</i>	<i>D. stramonium</i>	<i>P. hybrida</i>	<i>Ph. alkekengi</i>	Подорожник (<i>P. lanceolata</i>)	<i>G. globosa</i>	Огурец (<i>Cucumis sativus</i>)
1	О-ВТМ	6М	М	Н	Н	Н	12М	Н	Н	Н	М	М	М	М	Н
2	В-ВТМ «Востряков» VII	6МД	М	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	Мс	-	М	М	Н
3	К-ВТМ (IV)	10М	10Н	Н	Н	Н	25М	Н	Н	Н	М	Н	-	М	Н
4	Л-ВТМ (VI)	6Мд	М	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	М	-	М	М	Мд
5	ВТМ «Ленинград» VIII	7Мд	10Мд	Н	Н	Н	14Мд	Н	Н	Н	М	-	М	М	-

6	ВТМ «Крымский»ХП	10М	М	Н	Н	Н	Мс	Н	Н	Н	М	Н	-	М	-
7	Томат «Lenungton»	6Мд	6Н	Н	Н	Н	14М	Н	Н	Н	М	М	-	М	-
8	Томат «Ontario» Ш	10М	М	Н	Н	Н	М	Н	Н	Н	15Мл	-	-	М	-
9	Ленинград томатный зеленый IX	6М	М	Н	Н	Н	М	Н	Н	Н	М	Л	-	М	-
10	Огуречный «зеленый» штам	6Мс	М	Н	Н	Н	Мс	Н	Н	Н	М	-	-	М	-
11	<i>Ph. alkekengi</i> (<i>Ph</i> -ВТМ)	10М	3Н	5Н	3Н	2Н	17СМ	10Н	10Н	6Н	17М	15М	25М	21М	3Н

Примечание: М-мозаика, СМ - системная мозаика, Мс – слабая мозаика, Н-некрозы, Л- локальные поражения, Д- деформация листьев, (-) – симптомы не выявлены, числа указывают дни поражения ($P \leq 0,05$)

Из полученных результатов было установлено, что вирус растения *Ph. alkekengi* проявлял симптомы сходные к группе тобамовирусов и был назван физалисным штаммом вируса табачной мозаики – *Ph*-ВТМ.

Изучение биологических, морфологических и физических свойств физалисного штамма вируса табачной мозаики показало, что по систематике А. Gibbs, В. Harrison (1978) и В.М. Жданова (1990) *Ph*-ВТМ относится к роду «тобамовирусов» семейства *Virgaviridae*, криптограмма состоит из R/1: 2/5: E/E: S/0: это «твердые» вирионы с длиной 300 нм, шириной 18-20 нм; ТТИ - 98°C; основан на принципе спиральной симметрии (шаг спирали 2,3 нм); частицы включают одноцепочечную РНК (5% РНК, 95% белка) с молекулярной массой 2×10^6 D; Температура инактивации исследованного штамма *Ph*-ВТМ в соке составляло +98°; предельное разведение в инфекционном соке составлял – 10^{-7} ; изоэлектрическая точка – 3,5; т.е. близкая к томатному штамму ВТМ. На физалисный штамм (*Ph*-ВТМ) вируса табачной мозаики получен паспорт. Выделенный вирус *Ph*-ВТМ внесен в базу данных Национальной коллекции патогенных микроорганизмов Всемирного информационного центра микроорганизмов (World Data Center for Microorganism (WDCM), National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) под номером WDCM №862 (http://new.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/862).

В разделе 3.2. «Очистка вируса *Ph*-ВТМ и получение антител» были приведены данные по очистке вируса с помощью «осаждения» - полиэтиленгликолем (ПЭГ). При этом для получения вирусного препарата из растительной клетки *Physalis alkekengi* использовали метод гомогенизации. Для этого 300 г листа растения *Physalis alkekengi* гомогенизировали в присутствии 0,05М фосфатного буфера рН 7,5. Затем фильтровали и центрифугировали при 6000 об/мин и концентрировали вирус при 4% ПЭГ 6000 м.м. (инкубация 1 часа при температуре 4°C). Центрифугировали вирус при 6000 об/ мин. в течение 20 мин. и получили частично очищенный вирус. При этом выход вируса составил 33-35 мг/мл.

Специфические антитела к вирусу *Ph*-ВТМ были получены с помощью иммунизации введением кроликам породы «Шиншилла» иммуногена *Ph*-ВТМ в смеси с полным адьювантом Фрейнда. При этом концентрация *Ph*-ВТМ

составила от 0,5 мг/мл до 1,5 мг/мл. Через 10 дней, считая от последней инъекции была получена кровь и были выделены специфические антитела к *Ph*-ВТМ. Антитела использовали при разработке dot-ИФА для определения *Ph*-ВТМ.

В разделе 3.3. «Идентификации вируса *Ph*-ВТМ методом dot-ИФА» представлены результаты об иммуноферментном анализе dot-ИФА (dot-Elisa-точечный твёрдофазный иммуноферментный анализ) для определения растительного вируса *Ph*-ВТМ в полевых условиях. Учёт результатов диагностических исследований на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах проводили визуально - по изменению цвета окраски субстрата. Рис. 2.

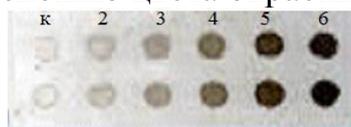


Рис. 2. dot-ИФА на нитроцеллюлозных мембранных *Ph*-ВТМ

Примечание: 1- контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – образцы с разными концентрациями вируса

Из рис. 2. видно, что с повышением концентрации вируса появляется более темные пятна. Это свидетельствует о повышенной концентрации определяемого антигена, в частности вируса. Сравнительная простота использованного иммуноферментного анализа dot-ИФА, даёт возможность одновременной регистрации большого числа отобранных проб и получение соответствующих результатов без применения сложных дорогостоящих приборов.

В разделе 3.4. «Приготовление экспланта растения и стерилизация для клонального микроразмножения» приведено оптимальное условие стерилизации эксплантов растения *Physalis alkekengi*. При этом необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности. Поэтому проводили поэтапные методы стерилизации эксплантов растений в этаноле, хлороформе, дистиллированной воде и т.д. Готовые стерильные экспланты помещали в питательную среду и инкубировали при температуре 22°C в охлажденном инкубаторе 5 дней для приспособления эксплантов к питательной среде, далее экспланты культивировали в световой комнате при температуре 24-25°C днем и ночью, при освещенности 5-6 кЛх.

Результаты исследования показали, что на 4-5 дни после культивирования эксплантов, в 2 чашках Петри из 6 были заражены грибами (33%). В 4 чашках рост грибов не наблюдался (66%). Стебли и корни начали развиваться на 10 день после посадки на питательную среду, а полностью растения сформировались через 18-20 дней. Чтобы достичь 100% эффективности стерилизации и культивирования, далее мы решили стерилизовать экспланты растения экспланты растения в разных концентрациях гипохлорида. Результаты приведены в таблице №3.

Как показывают результаты, стерилизованные экспланты растения в 20% растворе гипохлорида, 9 эксплантов из 10, при 15% растворе гипохлорида, 7 эксплантов из 10 не были поврежденными. При 5% и 10% растворе гипохлорида наблюдали повышение количества поврежденных эксплантов, 8-

6 эксплантов из 10 были поврежденными. Стебли и корни начали развиваться на 10 день после посадки на питательную среду, а полностью растения сформировались через 18-20 дней (Рис. 3, В).

Таблица №3

Подбор оптимальной среды для культивирования эксплантов растения

Physalis alkekengi

№	Количество стерильных эксплантов	Концентрация гипохлорида, в %	Время стерилизации (секунд)	Количество не поврежденных эксплантов	Количество поврежденных эксплантов
1	10	20	20	9±1	1
2	10	15	20	7±2	3
3	10	10	20	4±1	6
4	10	5	20	2±1	8

Примечание: количество поврежденных и не поврежденных эксплантов ($M \pm m$; $n=5$), $P \leq 0,05$

Таким образом, из результатов установлено, что стерилизация эксплантов растения в 20% растворе гипохлорида положительно влияет на рост и формирование эксплантов для клонального микроразмножения *Physalis alkekengi*.

В разделе 3.5. «Подбор оптимальных питательных сред и размеров эксплантов для клонального микроразмножения растения» приведены результаты по клональному микроразмножению *in vitro* растения *Physalis alkekengi*, осуществленного при контроле размера экспланта (экспланты стебля и корня длиной 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 см), состав питательных сред и влияние антимикотического препарата нистатина (от 500 000 ед/л до 1500 000 ед/л) на рост и развитие растения.

Результаты показывали, что на эксплантах корней размерами 0,2 см, проростков не наблюдалось. Регенерация эксплантов корней наблюдалась на отрезках стебля размером 0,6-1,0 см на 8-9 дни. Регенерация растений, где были использованы отрезки стебля длиной 0,8, 1,0 см, происходила быстрее (на 8-день). Наилучшие результаты наблюдались на эксплантах стебля размерами 0,8-1,0 см (Таблица №4, среды №2 и №3). Кроме того, была подобрана концентрация антимикотического препарата нистатина, положительно влияющего на развитие экспланта растения *Physalis alkekengi*. Полученные данные показывали, что через 8 дней проростки растения, где концентрация нистатина составляла 500 000 ед/л, проростки стебля составляли 3,0-6,0 см, размеры листьев достигли от 0,5 до 2,5 см (Рис. 3, А, В, С, D).

Таблица №4

Подбор размера экспланта растения *Physalis alkekengi* для микроразмножения ($M \pm m$; $n=5$) $P \leq 0,05$

Питательные среды без гормонов							
Длина экспланта корня (см)	Проростки корня		Длина экспланта стебля (см)	Проростки стебля		Длина листьев	
	дни	длина (см)		дни	длина (см)	дни	длина (см)
Питательная среда №1 контроль (без нистатина)							

0,2	2-3	-	0,2	8-9	-	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	-	8-9	-
0,6	6-7	-	0,6	8-9	0,3±0,04	8-9	0,5±0,06
0,8	7-8	-	0,8	8-9	0,5±0,06	8-9	1,0±0,08
1,0	7-8	-	1,0	8-9	0,5±0,06	8-9	1,0±0,08
Питательная среда №2 контроль (с нистатином 500 000 ед/л)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	*	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	3,0±0,08	8-9	0,5±0,06
0,6	6-7	-	0,6	8-9	3,5±0,12	8-9	2,0±0,14
0,8	7-8	-	0,8	8-9	3,5±0,12	8-9	2,5±0,32
1,0	7-8	-	1,0	8-9	6,0±0,16	8-9	2,5±0,32
Питательная среда №3 (с нистатином 1 000 000 ед/л)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	*	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	4,0±0,08	8-9	1,5±0,16
0,6	6-7	-	0,6	8-9	6,5±0,32	8-9	2,8±0,18
0,8	7-8	-	0,8	8-9	6,5±0,32	8-9	2,8±0,18
1,0	7-8	-	1,0	8-9	8,0±0,34	8-9	3,5±0,36
Питательная среда №4 (с нистатином 1 500 000 ед/л)							
0,2	2-3	-	0,2	8-9	*	8-9	-
0,4	4-5	-	0,4	8-9	*	8-9	-
0,6	6-7	-	0,6	8-9	0,2±0,02	8-9	0,5±0,06
0,8	7-8	-	0,8	8-9	0,4±0,03	8-9	0,8±0,06
1,0	7-8	-	1,0	8-9	0,4±0,03	8-9	0,8±0,06

Примечание: (-) всходов не было, (*) - уплотнение стебля



Рис. 3. Влияние нистатина на рост и развитие растения *Physalis alkekengi* (А-контроль, В-среда №2 (с нистатином 500 000 ед./л), С- среда №3 (с нистатином 1 000 000 ед/л), D- среда №4 (с нистатином 1 500 000 ед/л), Е – *Physalis alkekengi* в стерильной почве

Среда №3, где концентрация нистатина составляла 1 000 000 ед/л, положительно влияла на рост и развитие эксплантов растения. При этом через 10 дней рост стебля достиг до 8,0 см, размер длины листьев составлял 3,5 см. Если сравнивать полученные данные с данными контрольным эксплантом (в контроле длина стебля составляла 0,3-0,5 см, а листьев - 0,5-1,0 см), эффективность роста и развития растения в среде №3 повышалась в несколько раз. Поэтому была приготовлена среда №4, где концентрация нистатина составляла 1 500 000 ед/л. Полученные данные показывали, что повышение концентрации нистатина неблагоприятно влияло на рост и развитие стеблей и листьев. Питательная среда №4 с высокой

концентрацией нистатина оказывала ингибирующее действие на рост и развитие растения.

Также при микроклональном размножении растения *Physalis alkekengi* было изучено влияние различных концентраций гормонов (ВАР, КИН, НАА и ИВА) на рост и развитие эксплантов. Как видно из таблицы №5, в питательных средах с добавлением ВАР и КИН в различных концентрациях, (от 2 мкМ до 10 мкМ) стебли начали развиваться на 12-15 дни с появлением листьев. Максимальный рост стебля наблюдался на 20-25 дни, количество новых стеблей достигло от 6 до 13 штук, их длина достигла от 0,4 см до 5,18 см при концентрации 8 мкМ ВАР и КИН.

Таблица №5

Влияние различных концентраций цитокининов на индукцию эксплантов стеблей растения *Physalis alkekengi* ($M \pm m$; $n=5$) $P \leq 0,05$

ВАР	КИН	Выход, %	Количество побегов	Длина побегов, см
2 мкМ	--	80	7,6±0,54	4,44±0,47
4 мкМ	--	90	6,8±1,48	4,68±0,25
6 мкМ	--	95	7,8±1,30	4,8±0,45
8 мкМ	--	100	13,4±1,14	5,18±0,14
10 мкМ	--	85	10,8±1,30	4,74±0,18
--	2 мкМ	95	6,8±1,48	4,36±0,16
--	4 мкМ	90	7,4±1,14	4,56±0,24
--	6 мкМ	95	8,8±0,83	4,84±0,38
--	8 мкМ	100	11,8±0,83	5,06±0,20
--	10 мкМ	90	8,2±1,48	4,66±0,15

Кроме того, было изучено влияние различных концентраций ауксинов (от 2 мкМ до 10 мкМ) на индукцию корней растения *Physalis alkekengi* (Таблица №6). Из полученных результатов видно, что 6 мкМ концентрация НАА и ИВА положительно влияет на выход эксплантов корней *Physalis alkekengi*, а также на рост и развитие. Количество корней достигло 7-12 штук, длина корней достигла 3,16 - 4,54 см.

Таблица №6

Влияние различных концентраций ауксинов на индукцию эксплантов стеблей растения *Physalis alkekengi* ($M \pm m$; $n=5$) $P \leq 0,05$

НАА	ИВА	Выход, %	Количество корней	Длина корней, в см
2 мкМ	--	80	8,8±0,83	3,44±0,23
4 мкМ	--	90	8,6±1,14	3,58±0,16
6 мкМ	--	100	10,8±1,48	4,54±0,27
8 мкМ	--	95	8,6±1,14	3,66±0,30
10 мкМ	--	85	8,4±1,14	4,04±0,19
--	2 мкМ	95	7,6±1,14	3,16±0,23
--	4 мкМ	90	7,4±0,89	3,38±0,21
--	6 мкМ	100	12,4±1,14	4,06±0,20
--	8 мкМ	95	7,2±0,83	3,66±0,29
--	10 мкМ	90	7,8±0,44	3,68±0,34

Таким образом, установлено, что питательная среда с добавлением 1000000 ед/л нистатина, с содержанием 8 мкМ ВАР и КИН, 6 мкМ НАА и ИВА

гормонов является оптимальной для роста и развития стеблей, листьев и корней в микроклональном размножении растения.

В разделе 3.6. «**Определение наличия *Ph*-ВТМ в микроклональном растении *Physalis alkekengi* методом ПЦР**» приведены результаты по определению наличия вирусов в микроклональном растении *Physalis alkekengi* с помощью метода ПЦР. Для определения наличия *Ph*-ВТМ составлен дизайн праймеров для растительного вируса (таблица №7). Далее был проведен ПЦР анализ для идентификации *Ph*-ВТМ.

Таблица №7

Вирус-специфический праймер для ПЦР анализа

Вирус	Праймер	Последовательность 5-3	t (°C)	GC (%)	Размер ампликона (bp)	Номер в NCBI
TMV	TMV F	TAGACCCGCTAGTCAACAG	48.1	55.6	237	JN711115
	TMV R	CAGAGGTCCAAACCAAAC	49.9	50.0		

Результаты по определению наличие вируса методом ПЦР показали что, *Ph*-ВТМ растения *Physalis alkekengi* после 3-пассажа экспланта растения не были обнаружены. Данные приведены на рис. 4.

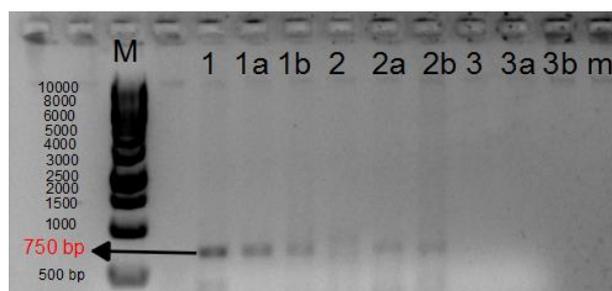


Рис. 4. ПЦР-анализ *Ph*-ВТМ растения *Physalis alkekengi* (1, 1a, 1b – варианты первого пассажа, 2, 2a, 2b - варианты второго пассажа, 3, 3a, 3b – варианты третьего пассажа)

Результаты по определению наличия вируса методом ПЦР показали что, в микроклонированных эксплантах после 3-пассажа растения *Physalis alkekengi* не был обнаружен вирус *Ph*-ВТМ.

В разделе 3.7. «**Подбор оптимальных условий выращивания растения *Physalis alkekengi* в грунте**» показано, что пересадка микроклонированного растения в почву требует подбора условий выращивания растения в грунте. Выживаемость и продуктивность растения, размноженного микроклональными методами, зависит от многих факторов, таких, как влага и температура, и по составу почвы и их стерильности. Перед пересадкой эксплантов в грунт приготовили стерильную почву с биогумусом в соотношении 1:5 и обеззараживали смесь паром под давлением 1,5 атм. с экспозицией пропаривания 30-40 мин. до момента достижения прогреваемой массы (слоем 25-30 см) температуры 90-100°C. Пересадку эксплантов в грунт осуществили в специальном помещении при температуре 20-22°C, и относительной влажностью 70-80%, освещенностью 3-4 кЛх в первые 10 дней,

и 5-7 кЛх в последующие дни при фотопериоде 14-16 ч. (Рис. 5). Как видно из рис.3, микроклонированное растение *Physalis alkekengi* начало интенсивно развиваться в стерильной почве, корни приспособились к почве, ранее появившиеся листья и стебли увеличились в размере, выросли новые листья и стебли.



Рис. 5. Выращивание микроклонированного растения *Physalis alkekengi* в стерильной почве

Таким образом, подобраны оптимальные условия выращивания микроклонированного растения *Physalis alkekengi* в грунте.

В разделе 3.8. «**Подбор оптимальных условий экстракций флавоноидов из растения *Physalis alkekengi* L.**» из безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi* были экстрагированы биологически активные вещества флавоноиды. При этом были изучены оптимальные условия экстракции флавоноидов из растения *Physalis alkekengi* L. Экстракцию проводили с помощью 20-96% этанола. При низких концентрациях (20%, 30% и 40%) выход флавоноидов составлял от 0,25 до 0,55 мг. Флавоноиды наиболее полно извлекались этанолом при концентрации 80%. При этом концентрация флавоноида составляла 1,92 мг. Дальнейшее повышение концентрации экстрагента не приводило к увеличению эффективности экстракции флавоноидов. Также было изучено влияние времени инкубации на эффективность экстракции флавоноидов в течение 30-135 минут. В течение 105 минут флавоноиды полностью извлекаются из растительного сырья. При изучении влияния степени измельчения сырья, соотношения сырья и экстрагента для выхода флавоноидов, было установлено, что максимальное извлечение флавоноидов из *Physalis alkekengi* достигается при измельчении сырья до размера частиц 2,0 мм (количество флавоноидов составляло 1,93 мг), при соотношении сырья и экстрагента -1:100 количество экстрагированных флавоноидов составляло 1,95 мг. Таким образом, был разработан метод выделения флавоноидов из сухого экстракта растения *Physalis alkekengi*.

В разделе 3.9. «**Изучение антибактериальных и иммуностимулирующих свойств экстракта флавоноидов из растения *Physalis alkekengi***» показаны результаты изучения антимикробной активности экстракта флавоноидов растения *Physalis alkekengi* против условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* 002673/477, *Pseudomonas*

aeruginosa 003841/114, *Proteus mirabilis* 9, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ВКМ, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*. Рис.6.

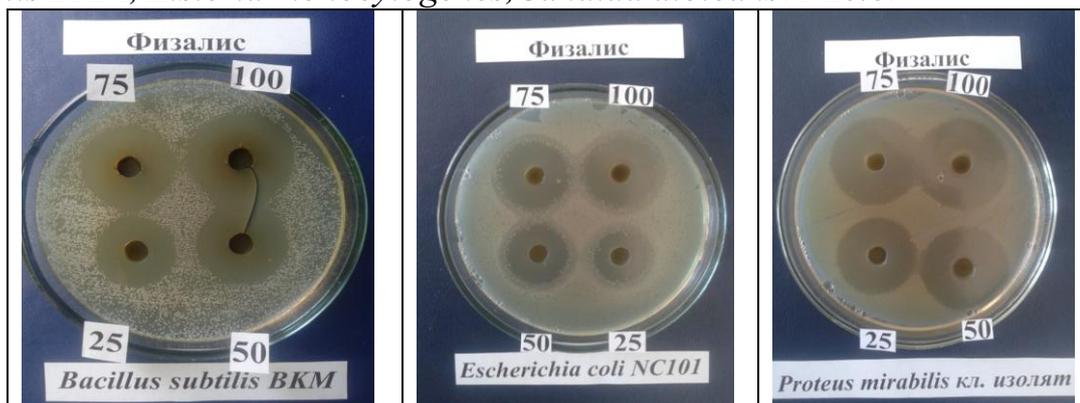


Рис.6. Антимикробная активность веществ против условно-патогенных микроорганизмов

Как видно из рис. 6, экстракт флавоноидов оказало губительное действие на рост тест-микроорганизмов: *Bacillus subtilis* ВКМ (диаметр зоны подавления роста составил 32 мм) и *Listeria monocytogenes* (диаметр зоны подавления роста составил 18 мм), *Staphylococcus aureus* (13 мм), *Pseudomonas aeruginosa* 003841/114(12 мм). *Proteus mirabilis* 9 и *Escherichia coli* NC 101 оказались наиболее чувствительными к действию экстракта флавоноидов, диаметр зоны подавления роста составил 32 мм и 27 мм, соответственно (Таблица №8).

Таблица №8

Антимикробная активность экстракта флавоноидов растения *Physalis alkekengi* против условно-патогенных микроорганизмов, мм в диаметре ($P \leq 0,05$)

№	Флавоноид	<i>Escherichia coli</i> NC 101	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 003841/114	<i>Proteus mirabilis</i> 9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ВКМ	<i>Candida albicans</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
1	Флавоноид	27	12	32	13	32	0	18

При соотношениях экстракта флавоноидов и стерильной воды 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, диаметр зоны подавления роста *Listeria monocytogenes* составил 18, 16, 14 и 12 мм, соответственно. Диаметр зоны подавления роста *Bacillus subtilis* ВКМ уменьшался по мере снижения концентрации экстракта флавоноидов и составила 32, 29, 27, 24 мм, соответственно. Антимикробная активность экстракта флавоноидов против *Proteus mirabilis* 9 и *Escherichia coli* NC 101 имела также дозозависимый характер и диаметры зоны подавления роста составили 32, 30, 28, 26 мм и 26, 24, 22, 19 мм, соответственно.

Таким образом, экстракт флавоноидов обладает антимикробным действием по отношению к изученным условно-патогенным микроорганизмам. Экстракт эффективно подавляет рост *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* и *Bacillus subtilis* ВКМ. Антимикробное действие имеет дозозависимый характер.

Также приведены результаты по изучению эффекта экстракта флавоноидов *Physalis alkekengi* на повышение количества

иммунокомпетентных клеток в лимфоидных органах животных. Полученные результаты представлены в таблице №9.

Таблица №9

Влияние экстракта флавоноидов на количество клеток в центральных и периферических органах иммунитета у мышей ($M \pm m$, $n=6$) ($P \leq 0,05$)

№	Группа	Доза вещества	Клетки тимуса $\times 10^6$	ИС	Клетки костного мозга $\times 10^6$	ИС	Клетки лимфатических узлов $\times 10^6$	ИС
1.	Контроль	-	36,8 \pm 2,0	-	11,0 \pm 0,5	-	20,5 \pm 0,8	-
2.	Препарат <i>Physalis alkekengi</i>	1,0 мг/л	65,2 \pm 2,1*	+1,77	20,8 \pm 0,5*	+1,89	29,2 \pm 1,1*	+1,42

Примечание: ИС - индекс соотношения к контролю, * - достоверно к контролю

Как видно из полученных данных, в контрольной группе в тимусе регистрируется $36,8 \pm 2,0 \times 10^6$ клеток. Растительный экстракт флавоноидов достоверно повышал общее число клеток в тимусе иммунизированных мышей - в 1,77 раза ($65,2 \pm 2,1 \times 10^6$).

ВЫВОДЫ

На основе проведенных исследований на тему «Создание безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi* методом микроклонирования и получение биологически активных веществ» представлены следующие выводы:

1. Впервые из лекарственного растения *Physalis alkekengi* L. выделен штамм вируса табачной мозаики Ph-BTM и изучены биологические, морфологические и физические свойства. При этом установлено, что Ph-BTM относится к роду «тобамовирусов» семейства *Virgaviridae*. К данному штамму вируса получен паспорт. Штамм Ph-BTM внесен в базу данных Национальной коллекции патогенных микроорганизмов Всемирного информационного центра микроорганизмов (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) под номером WDCM №862. (в какую из коллекций внесли в базу данных)
2. Штамм Ph-BTM идентифицирован чувствительным твердофазным методом иммуноферментного анализа (dot-ИФА) на нитроцеллюлозной мембране с адсорбционно - иммобилизованными антителами, который дает возможность одновременной регистрации большого числа отобранных проб в полевых условиях.
3. Впервые разработан метод создания безвирусного лекарственного растения *Physalis alkekengi* методом клонального микроразмножения. Было установлено, что питательная среда, содержащая 1000 000 ед/л нистатина, 8 μ M ВАР и КИН, 6 μ M NAA и ИВА гормонов, является оптимальной для роста и развития стеблей, листьев и корней в микроклональном размножении растения. Подобраны условия для ускорения перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития и выращивания растения в

грунте в специальных условиях при температуре 20-22° С, относительной влажностью 70-80%, освещенностью 3-4 кЛх в первые 10 дней и 5-7 кЛх - в последующие дни при фотопериоде 14-16 ч.

4. Впервые составлен дизайн праймеров для определения наличия *Ph*-ВТМ лекарственного растения *Physalis alkekengi* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом было установлено, что в микроклонированных эксплантах после 3-пассажа растения *Physalis alkekengi* не был обнаружен вирус *Ph*-ВТМ.

5. Подобраны оптимальные условия экстракции флавоноидов лекарственного растения *Physalis alkekengi*. В 80% этиловом спирте с частицами сырья размером 2,0 мм при соотношении сырьё/экстрагент – 1:100 являются оптимальными показателями для экстракции флавоноидов.

6. Установлена антибактериальная активность экстракта флавоноидов по отношению к условно-патогенным и патогенным бактериям, в частности, *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* и *Bacillus subtilis*. Экстракт флавоноидов эффективно подавлял рост и имел дозозависимый характер. С повышением концентрации флавоноидов увеличивались зоны подавления роста микроорганизмов.

7. *In vivo* доказано иммуностимулирующее действие экстракта флавоноидов, при этом установлено эффективное повышение количества иммунокомпетентных клеток в лимфоидных органах животных: в тимусе - в 1,77, в костном мозге - в 1,89 и в лимфатических узлах - в 1,42 раза.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSC.02/30.12.2019.B.38.01 AT THE INSTITUTE OF MICROBIOLOGY
THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

KADIROVA ZUXRA ABRAROVNA

**CREATING A VIRUS-FREE MEDICINAL PLANT *PHYSALIS
ALKEKENGI* BY MICROCLONING AND OBTAINING BIOLOGICALLY
ACTIVE SUBSTANCES**

03.00.12 –BIOTECHNOLOGY

**DISSERTATION'S ABSTRACT
of the Doctor of Philosophy (PhD) of biological sciences**

Tashkent – 2020

The subject of this dissertation for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) has been registered under no. B2019.2.PhD/B347 by the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The doctoral dissertation has been conducted at the Institute of Microbiology.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (abstract)) languages on the website of the Scientific Council (microbio@academy.uz) and the website «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific supervisor: **Tashmukhamedova Shokhista Sabirovna**

doctor of biological sciences, professor

Official opponents:

Turdikulova Shaxloxon Utkurovna

doctor of biological sciences, professor

Ramazanov Nurmurod Sheraliyevich

doctor of chemical sciences, professor

Leading organization:

Center for genomics and bioinformatics

The defense of the dissertation will take place on «9» July 2020 at 10⁰⁰ the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.38.01 of the Institute of Microbiology (Address: 100128, Tashkent, 7^B A.Kadyri str., conference hall of the Institute of Microbiology. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology under № ____ (Address: 100128, Tashkent, 7^B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: microbio@academy.uz).

The abstract of the dissertation is distributed on «__» _____ 2020.
(protocol at the register № _____ dated by «__» _____ 2020).

Aripov Takhir Fatikhovich

Chairman of the scientific council awarding scientific degrees, Dr.Sc.B., Professor, Academician

Juraeva Roxila Nazarovna

Scientific secretary of the scientific council awarding scientific degrees, PhD, Senior researcher

Gulyamova Tashkhan Gafurovna

Chairman of the scientific seminar under the scientific council awarding scientific degrees, Dr.Sc.B., Professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work was to isolate, purify, and identify the tobacco mosaic virus; create a virus-free medicinal plant *Physalis alkekengi* by *microcloning* and obtain biologically active substances.

The objects of the research work are vegetative parts of the medicinal plant *Physalis alkekengi*, tobacco mosaic virus *Ph-TMV*, indicator plants, flavonoid extract, *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* 003841/114, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* BKM, *Candida albicans*.

The scientific novelty of the research is as follows:

for the first time, a strain of tobacco mosaic virus *Ph-TMV*, belonging to the genus "tobamoviruses" of the family *Virgaviridae*, was isolated from the medicinal plant *Physalis alkekengi* L. and a passport was obtained;

a sensitive method of enzyme immunoassay (dot-ELISA) has been developed to determine the *Ph-TMV* tobacco mosaic virus in the field;

first created virus-free medicinal plant *Physalis alkekengi* L. by the method of micropropagation based on the selection of optimal proportions of the main components of nutrient mediums for cultivation of explants of the plant, as well as the conditions have been chosen to accelerate the transition *Physalis alkekengi* from juvenile to reproductive phase of development and plant growth in the soil;

the design of primers for polymerase chain reaction (PCR) to determine the presence of *Ph-TMV* in the microclonal plant *Physalis alkekengi*;

the antibacterial activity of the flavonoid extract of the plant *Physalis alkekengi* in relation to opportunistic and pathogenic bacteria, in particular, *Proteus mirabilis* 9, *Escherichia coli* NC 101, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*, as well as in vivo proved the immunostimulating effect of flavonoids.

Implementation of research results. The practical results of the study are as follows:

The tobacco mosaic virus strain (*Ph-TMV*) was transferred to the collection of the gene pool of the unique scientific collection "Phytopathogens and other microorganisms" of the Institute of Genetics and experimental biology (Reference of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan for No.4/1255-2050, dated July 25, 2019). As a result, it allowed enriching the collection of the gene pool of phytopathogenic microorganisms and forming an electronic database of pure cultures of intraspecific and specialized virus strains;

The isolated strain of tobacco mosaic virus - *Ph-TMV* from the medicinal plant *Physalis alkekengi* is included in the database of the National collection of pathogenic microorganisms of the world data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopatogenic Microorganisms (NCAM) under the number WDCM No.862 (Reference of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan for No.4/1255-2050, dated July 25, 2019). As a result, it made it possible to use it in a global order in the study of species belonging to the group of tobamoviruses that are distributed in different regions of the world;

Propagation of the medicinal plant *Physalis alkekengi* by the mean of microcloning was used as part of the application project I-2016-5/13

"Development of technology for creating microcloned unique plants and implementation in practice" to determine the transition of plant development from the juvenile phase to the reproductive phase and the conditions for growing in soil (certificate of the Ministry of innovative development of the Republic of Uzbekistan No. 4/135, dated 11 March 2020). As a result, it was possible to create a virus-free, healthy medicinal plant, *Physalis alkekengi*.

The structure and volume of the dissertation. The structure of the dissertation consists of an introduction, three chapters, a conclusion, a list of references, and appendices. The volume of the dissertation is 107 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙҲАТИ СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Кадилова З.А. Выделение и очистка физалисного штамма вируса табачной мозаики и получение специфической антисыворотки к нему // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2007. №4, С. 29-32 (03.00.00, № 5).
2. Кадилова З.А. Разработка оптимальных условий выделения Ф-ВТМ из листьев *Physalis alkekengi* // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2009. № 3, С. 18-22 (03.00.00, № 5).
3. Кадилова З.А., Ташмухамедова Ш.С. Диагностика лекарственного растения *Physalis alkekengi* // Фармацевтический журнал. – Ташкент, №2, С.21-25 (15.00.00, № 2).
4. Kadirova Z.A., Tashmukamedova Sh.S., Madjidova R.X. Receiving dry extract from the plant of *Physalis alkekengi* and determination of content of flavonoids // European Sciences review. - Vienna, № 11-12, 2018. P. 3-6. (03.00.00, № 6).
5. Kadirova Z.A., Tashmukamedova Sh.S., Madjidova R.X. Isolation of plant virus from *Physalis alkekengi* and obtaining pure preparation // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, №1, 2019. С.29-32 (03.00.00, № 5).
6. Кадилова З.А., Ташмухамедова Ш.С., Батырбеков А.А. Изучение иммуностимулирующих свойств растительного препарата *Physalis alkekengi* // Журнал Инфекция, Иммунология и Фармакология. – Ташкент, 2019. №1, С. 54-56 (15.00.00, № 6).

II часть; (II бўлим; II part)

7. Kadirova Z.A., Sh.S.Tashmukamedova, D.A.Dalimova, R.X.Madjidova. Microclonation of medicine plants *Physalis alkekengi* // National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology (Impact Factor 0,18 & ISSN 2231-3206) 2019, Volume: 9, Issue:8). P. 809-812
8. Кадилова З.А. Идентификация тобамовирусов из листьев *Physalis alkekengi* и некоторые методы их хранения и реактивации // Материалы XLI международной научной конференции “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений”. – Новосибирск, 2003. С.18-19.
9. Кадилова З.А. Приготовление антисыворотки к ВТМ с использованием иммуномодулина в качестве адъюванта // Материалы XLI международной научной студенческой конференции “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений”. – Новосибирск, 2003. С.19-20.

10. Кадилова З.А. Разработка условий хранения томатного штамма вируса табачной мозаики // Сборник тезисов международной научной студенческой конф. молодых ученых “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений”. – Харьков, 2003. С.253-254.
11. Кадилова З.А., Вахобов А.Х. Выделение вируса *Physalis alkekengi* и разработка некоторых методов хранения в коллекции // Материалы научно-практической конференции «Экологические проблемы в сельском хозяйстве». – Бухара, 2003. С.194-196.
12. Кадилова З.А., Вахобов А.Х. Выделение вируса растения *Physalis alkekengi*, получение очищенного препарата и изучение некоторых свойств // Тезисы докладов «V съезд микробиологов Узбекистана». – Ташкент, 2012. С.75-76.
13. Кадилова З.А. Очистка вируса растения *Physalis alkekengi* методом гельфильтрации. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии». – Ташкент, 2017.С. 140-141.
14. Kadirova Z.A., Tashmukhamedova Sh.S., Madjidova R.X. The isolation of plant virus from *Physalis alkekengi* by metod gelfiltration // Extremophiles: from biology to biotechnology. International Summer course. – Tashkent, 2018. P.19-25.
15. Кадилова З.А., Ташмухамедова Ш.С., Маджидова Р.Х., Бобоева С. Выделение вируса ТШ-ВТМ из растения *Physalis alkekengi* // Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии». – Ташкент, 2018. С.232-233.
16. Кадилова З.А., Ташмухамедова Ш.С., Маджидова Р.Х. Микрочлонирувание растения *Physalis alkekengi* // Труды - XXVII - научно-технической конференции молодых ученых, магистрантов и студентов бакалавриата «Умидли кимёгарлар-2018». – Ташкент, 2018. С.33-34.
17. Кадилова З.А., Маджидова Р.Х., Ташмухамедова Ш.С. Изучение условий микрочлониального размножения растения *Physalis alkekengi* // Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии». – Ташкент, 2018.С. 136-138.