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

**ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ТОШКЕНТ ВИЛОЯТИ ЧИРЧИҚ ДАВЛАТ ПЕДАГОГИКА ИНСТИТУТИ**

**ФАЙЗИЕВ ВОХИД БАХРАМОВИЧ**

**КАРТОШКА Х ВИРУСИНИНГ ЎЗБЕКИСТОНДА ТАРҚАЛГАН ИЗОЛЯТИНИ АЖРАТИШ, ХУСУСИЯТЛАРИНИ ЎРГАНИШ ВА УНИНГ ДИАГНОСТИКАСИ**

**03.00.04– Микробиология ва вирусология**

### БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)

**ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2020**

**УДК:** 578.74: 578.85: 578.083: 577.15

**Фан доктори (DSc) диссертацияси автореферати мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)**

**Contents of dissertation abstract of doctor of science (DSc)**

|  |  |
| --- | --- |
| Файзиев Вохид Бахрамович  Картошка Х вирусининг Ўзбекистонда тарқалган изолятини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш ва унинг диагностикаси..……...…..................... | 3 |
|  |  |
| Файзиев Вахид Бахрамович  Выделение изолятa Х вируса картофеля распространенного в Узбекистане, изучение свойств и его диагноcтика.……………................. | 29 |
|  |  |
| Fayziev Vokhid Bakhramovich  Isolation of isolate Potato virus X spreading in Uzbekistan, the study of its properties and diagnostics…………………………..……………………...… | 55 |
|  |  |
| Эълон қилинган ишлар рўйхати  Список опубликованных работ  List of published works……………………………………………………..... | 59 |

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

**ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ТОШКЕНТ ВИЛОЯТИ ЧИРЧИҚ ДАВЛАТ ПЕДАГОГИКА ИНСТИТУТИ**

**ФАЙЗИЕВ ВОХИД БАХРАМОВИЧ**

**КАРТОШКА Х ВИРУСИНИНГ ЎЗБЕКИСТОНДА ТАРҚАЛГАН ИЗОЛЯТИНИ АЖРАТИШ, ХУСУСИЯТЛАРИНИ ЎРГАНИШ ВА УНИНГ ДИАГНОСТИКАСИ**

**03.00.04– Микробиология ва вирусология**

### БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)

**ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2020**

**Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2019.2.DSc/B95 рақам билан рўйхатга олинган.**

Докторлик диссертацияси Тошкент вилояти Чирчиқ давлат педагогика институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (microbio@academy.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот таълим портали ([www.ziyonet.uz](http://www.ziyonet.uz)) манзилларига жойлаштирилган.

|  |  |
| --- | --- |
| **Илмий маслаҳатчи:** | **Ваҳобов Абдурасул Ҳакимович**  биология фанлари доктори, профессор |
| **Расмий оппонентлар:** | **Хасанов Ботир Ачилович**  биология фанлари доктори, профессор  **Кодирова Гульчехра Хакимовна**  биология фанлари доктори  **Маматқулов Иброхим Хомидович**  тиббиёт фанлари доктори, профессор |
| **Етакчи ташкилот:** | **Генетика ва ўсимликлар экспериметал биологияси институти** |

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.В.38.01рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «\_\_» декабрь куни соат 1000 даги онлайн мажлисида бўлади. Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7б-уй, Микробиология институти мажлислар зали, 2-қават Тел.:(+99871) 241-92-28, факс:(+99871) 241-92-71; e-mail: [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz).

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№\_\_ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7б-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 «\_\_» декабрь куни тарқатилди.

(2020 йил «\_\_» декабрдаги «\_\_» рақамли реестр баённомаси).

**Т.Ф. Арипов**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш

раиси, б.ф.д., профессор, академик.

**Р.Н. Жўраева**

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

**Т.Г. Гулямова**

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

**КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)**

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Бугунги кундадунёда қишлоқ хўжалиги ўсимликларини касаллантирадиган қатор фитопатоген вируслар аниқланган бўлиб, улар етиширилаётган маҳсулотларнинг миқдори ва сифатига салбий таъсир этиб, катта иқтисодий зарар етказмоқда ва бу зарар дунё бўйича йилига 60 млрд АҚШ долларини ташкил этади. Шунингдек, картошка ўсимлигини ҳам 50 га яқин фитопатоген вируслар касаллантиради ва вирус турига боғлиқ ҳолда ҳосилдорликни 10-87% гача камайишига олиб келмоқда[[1]](#footnote-1). Шунинг учун картошка ўсимлигини касаллантирувчи бундай фитопатоген вируслар устида тадқиқотлар олиб бориш ва қарши кураш чораларини ишлаб чиқиш муҳим аҳамият касб этади.

Жаҳонда қишлоқ хўжалиги ўсимликларидан картошка ўсимлигида учрайдиган - L (PLRV), -Y (PVY), - X (PVX), - S (PVS), - M (PVM), - A (PVA) каби вирусларни ажратиш, уларнинг келтириб чиқарадиган зарарини камайтириш ҳамда қарши кураш чораларини ишлаб чиқиш бўйича кенг кўламли илмий изланишлар олиб борилмоқда. Жумладан, уларнинг молекуляр-генетик хусусиятларини тадқиқ этиш, филогенетик таҳлил қилиш, тозаланган препаратини олиш, вирус диагностикаси учун зардоб тайёрлаш, зардобдан иммуноглобулинларни ажратиш, тозалаш усулларини такомиллаштириш, ўсимликларнинг баъзи физиологик хусусиятларига вируснинг таъсири ва инфекцияга чидамлилик генлари экспрессияси механизмларини аниқлаш ҳамда вирусга қарши кураш чораларини ишлаб чиқишни такомиллаштиришни тақозо этмоқда.

Республикамизда қишлоқ хўжалиги ўсимликларини турли касалликлар ва зараркунандалардан ҳимоя қилиш борасидаги самарали чора-тадбирларни ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилиш, фитопатоген вирусларни аниқлаш, хусусиятларини тадқиқ этиш бўйича қатор илмий-тадқиқотлар олиб борилиб, муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини ривожлантиришнинг 2017-2021 йилларга мўлжалланган Ҳаракатлар стратегиясида«….қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқаришини изчил ривожлантириш, мамлакат озиқ-овқат хавфсизлигини янада мустаҳкамлаш, аҳолини сифатли озиқ-овқат маҳсулотлари билан таъминлаш, мева-сабзавот, картошка ва узум ишлаб чиқариш ҳажмларини ошириш, ички бозорда уларга бўлган нархларнинг кескин ошишини олдини олиш, аграр секторнинг экспорт салоҳиятини ошириш; касаллик ва зараркунандаларга чидамли, маҳаллий экологик шароитларга мослашган қишлоқ хўжалиги экинларининг янги навларини ишлаб чиқаришга жорий этиш»[[2]](#footnote-2) бўйича муҳим вазифалар белгилаб берилган. Шунинг учун муҳим қишлоқ хўжалиги экинлари ҳосилдорлигига жиддий зарар етказадиган фитопатоген вируслар устида илмий-тадқиқотлар олиб бориш муҳим 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 2018 йил 29 октябрдаги ПФ-5394-сон “Қишлоқ хўжалиги соҳасини ислоҳ қилишнинг қўшимча ташкилий чора-тадбирлари тўғрисида”ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2017 йил 30 августдаги ПҚ-3249-сон “Ўсимликлар карантини давлат инспекцияси фаолиятини ташкил этиш тўғрисида"ги қарори 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 устувор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи[[3]](#footnote-3).** Ўсимлик вирусларининг тузилиши, хусусиятлари, таснифи ва уларга қарши кураш чораларини ишлаб чиқишга йўналтирилган илмий тадқиқотлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, , Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada (Канада), Department of Plant Pathology, Cornell University (AҚШ), Department of Plant and Wildlife Sciences, Brigham Young University (AҚШ), University of Minnesota (AҚШ), Seul national university (Koрея), Biomedical Research Center, Institute of Virology (Словакия), Engelhardt Institute of Molecular Biology (Россия), Centre of Excellence in Molekulyar Biology (Cловения), Россия Фанлар академиясининг Биология-тупроқшунослик институти (Россия), Москва давлат университетининг вирусология кафедрасида (Россия) ва Ўзбекистон Миллий университетида ҳамда Тошкент вилояти Чирчиқ давлат педагогика институтида (Ўзбекистон) олиб борилмоқда.

Картошка вирусларини аниқлаш, уларнинг хўжайин организми билан муносабати ҳамда уларга қарши самарали кураш чораларини ишлаб чиқиш, идентификациялаш ва диагностика қилиш бўйича қатор, жумладан қуйидаги устивор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: картошка Х вирусининг геном тузилишини аниқлаш усуллари такомиллаштирилган (Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (МГУ*)*, Россия), картошка навларининг вирус инфекциясига генетик чидамлилик механизми аниқланган (James Hutton Institute, Шотландия), картошка вирусларини молекуляр диагностикаси яратилган (Department of Plant and Wildlife Sciences, Brigham Young University, АҚШ), табиий резерватор ўсимликларида ҳам картошка вируслари ривожланиши кузатилган (Ўзбекистон Миллий университети, Ўзбекистон), картошка вирусларини аниқлаш учун иммунодиагностикуми тайёрланган (Биолого*-*почвенный институт ДВО РАН, Россия), картошка Х вирусининг филогенетик шажараси аниқланган ва штаммлари ажратиб олинган (Centre of Excellence in Molekulyar Biology, Словения), КХВнинг оқсил қобиғи асосида диагностика қилинган (Institute of Biochemistry and Biotexnology, Покистон).

Дунё миқёсида фитопатоген вирусларининг тарқалишини олдини олиш ва уларга қарши кураш чораларини такомиллаштириш ҳамда вирусларга чидамли навларни яратиш бўйича қуйидаги устувор йўналишларда илмий-тадқиқотлар олиб борилмоқда: жумладан, ўсимликларнинг вирусларга чидамлилик генларини аниқлаш ва карталаш, генлар трансформацияси учун вектор конструкция яратиш; чидамлилик генлари транформацияси асосида навлар яратиш; чидамлиликнинг физиологик асоссларини аниқлаш; вируслар диагностикасининг сезгир, тезкор ва замонавий усулларни яратиш ҳамда амалиётга жорий этиш орқали картошка ҳосилдорлиги пасайишининг олдини олишга қаратилган илмий ечимлар ишлаб чиқиш.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Картошка вирусларини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш ва идентификация қилиш бўйича қатор хорижлик олимлар: Huisman M.J. (1988), Kagiwada S.Y. (2002), Yokota T. (2003), Вostan H. (2004), Rashid F. (1989), Tamura K. (2007), Abbas G. (2012), Ahmad N. (2011), Cox B.A. (2010), Cuevas J.M. (2012), Mandal B. (2012) каби олимлар томонидан олиб борилган.

МДҲ давлатлари олимлари МДУда академик Атабеков И.Г. раҳбарлигида Морозов С.Ю. (2001), Карпова О. (2006), Гнутова Р.В. (2011) ва бошқа қатор олимлар томонидан КХВ тузилиши, хусусиятлари, экологияси, штаммлари, иммунодиагностикаси ва молекуляр-генетик хусусиятларига доир тадқиқотлар олиб борилган; Малиновский В.И. (2010) вирусларнинг ўсимликлар физиологиясига таъсири ва инфекциядан ҳимояланиш механизмини аниқлаш; Шарипова М.Р. (2013) томонидан ўсимликларнинг инфекцияга чидамлиликни таъминловчи оқсиллари аниқланган.

Шу каби тадқиқотлар мамлакатимиз олимларидан Власов Ю.И. томонидан (1960) Ўзбекистонда ўсимлик вирусларини ўрганиш бўйича тадқиқотлари олиб борилган, Вахобов А.Ҳ. (1964) Ўзбекистон иқлим шароитида тарқалган турли фитопатоген вирусларни аниқлаш ва диагностика қилиш, Вахобов А.Ҳ. раҳбарлигида Давронов Қ.С. (1984) жўхори паканалиги вирусини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш ва диагностика қилиш, Қодирова З.Н. (2019) карамдошлар оиласига мансуб бўлган ўсимликларни касаллантирувчи вирусларни аниқлаш, Хусанов Т.С. (2019) вирус инфекциясининг ўсимликнинг баъзи бир физиологик хусусиятларига таъсири бўйича тадқиқотлар олиб боришган. Картошка вирусларини ўрганиш бўйича мамлакатимизда Мирзаахмедов В. (1964) дастлаб Х ва S-вируслар тарқалган фонда вируссиз картошка етиштириш, Эргашев И.Т. (2007) томонидан эса L-вируснинг айрим хусусиятлари ва картошка навлари селекцияси устида илмий изланишлар олиб борган. Шуни таъкидлаш лозимки, картошка вирусларининг молекуляр-генетик хусусиятларини аниқлаш ва диагностика усулларни ишлаб чиқиш ҳамда вирусга чидамли навларни аниқлаш бўйича мамлакатда етарлича илмий-тадқиқотлар олиб борилмаган. Шу сабабли, ушбу йўналишда олиб борилаётган тадқиқотлар муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

**Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университети ва CIP (Centre Internatilonal Potato) илмий-тадқиқот ишлари режаларининг (CACILM SLM-R-11-4) «Жанубий-ғарбий ва Mарказий Осиёда картошка навларини клонлаш орқали абиотик ва биотик омилларга чидамлилигини ошириш орқали унинг маҳсулдорлиги ҳамда сифатини яхшилаш» (2011-2013) мавзусидаги халқаро илмий лойиҳа доирасида бажарилган.

**Тадқиқот мақсади** картошка Х вирусининг мамлакатимизда тарқалган изолятини ажратиш, унинг хусусиятларини ҳамда ўсимлик айрим физиологик жараёнларига таъсирини аниқлаш ва молекуляр-генетик усулда идентификация қилишдан иборат.

**Тадқиқот вазифалари:**

КХВн изолятини ажратиш, биологик хусусиятларини аниқлаш ва идентификация қилиш ҳамда ўсимликларнинг айрим морфо-физиологик хусусиятларига таъсирини таҳлил қилиш;

Вирус изолятини аралаш инфекциядан биологик тозалаш ва гомоген тоза препаратини тайёрлаш усулларини ишлаб чиқиш;

Вирусга поликлонал зардоб тайёрлаш ва унинг иммунокимёвий хусусиятларини аниқлаш ҳамда вирус диагностикасида қўллаш;

Иммунологик усуллар ёрдамида вируснинг баъзи хусусиятларини аниқлаш;

КХВ изолятларини ҚТ-ПЗР усули ёрдамида турли табиий намуналардан диагностика қилиш;

Ўзбекистон иқлим шароитидан ажратилган КХВн изолятини *ORFs5* гени асосида молекуляр-генетик идентификацияси ва филогенетик таҳлил қилиш;

КХВн изоляти оқсил қобиғи аминокислота таркибини қиёсий таҳлил қилиш орқали бошқа изолятлар билан ўхшашлик ва фарқларини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти Ўзбекистон иқлим шароитида тарқалган картошка ва бошқа қишлоқ хўжалик ўсимликларини касаллантирувчи картошканинг Х вируси ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети - вирус изолятларининг хусусиятлари, ўсимликнинг физиологик жараёнларига таъсири, пероксидаза ферментининг инфекцион жараёндаги динамикаси, ўсимлик баргидаги пигменти миқдорига таъсири; вирус тоза препаратини олиш усуллари, зардоб ва специфик антитаналар, вируснинг молекуляр-генетик идентификацияси, оқсил қобиғи *ОRFs5* гени ва унинг секвенси, филогенетик шажараси ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Фитовирусология ва биотехнологиянингиммунофермент анализи (ИФТ), ҚT-ПЗР, фитовирусларни ажратиш ва тозалаш, индикатор ўсимликлар усули, иккиёқлама иммунодиффузия, электрон микроскопия, спектрофотометрия каби бир қатор усулларидан фойдаланилган.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

илк бор КХВнинг Ўзбекистонда тарқалган «некротик» (КХВн) изоляти ажратилди ва унинг *ORFs5* гени аниқланган, филогенетик анализ қилинган ва ушбу ген асосида синтезланадиган оқсилнинг аминокислота таркиби бошқа изолятлар билан солиштирилган ҳамда вирус эволюцияси молекуляр-генетик усуллар ёрдамида аниқланган;

илк бор КХВн изолятининг касалланиш даражасига боғлиқ равишда ўсимлик баргидаги хлорофилл “а” миқдорини назоратга нисбатан 4,4, хлорофилл “b” миқдорини 2,3, каротиноид миқдорини эса 5,3 баравар камайтириши асосланган;

НЦМда иммуноблотинг усули ёрдамида дастлабки текширишларда ноаниқ бўлган қатор ўсимликлар қайта текшириб чиқилган ва вируснинг олабута (*Atriplex micrantha* C.A.Mey), итузум (*Solanum nigrum*), думбил шўра (*Ch. murale),* оддий шўра *(Ch. quonea*), ёввойи гултожихўроз *(Amaranthus retrofflexus),* бургон шувоғи *(Artemisia annua),* эрмон шувоғи *(Artemisia vulgaris),* дала рангўти (*Sinapis arvensis* L.), хaртол карами (*Brassica juncea* (L) Czern) каби ИФА сезгирлигидан четда қолган вируснинг янги табиий резерватор ўсимликлари аниқланган;

вируснинг туганак таркибида ва маданий ўсимликлар аъзоларида сақланишини аниқлаш асосида табиий-ўчоқлар билан алоқадорликнинг иккинчи гуруҳига яъни «Маданий ўсимликлар ичида турғун айланиш циркуляциясига эга бўлган табиий ўчоқли касалликлар» типига мансублиги исботланган;

КХВнинг Республикамиз ҳудудида тарқалган Хн изоляти илк бор ажратилган ҳамда баъзи биологик ва физик-кимёвий хусусиятлари аниқланган, TSK гел ёрдамида гельфильтрация қилиш орқали вируснинг тоза препарати олиниб, вирусга специфик зардоб тайёрлаш усули такомиллаштирилган;

ўсимлик пероксидаза ферментининг инфекцион жараёндаги динамикаси соғлом ва вирус билан касалланган ўсимликлардан ажратилган ҳужайра шираси таҳлили орқали асосланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қуйидагилардан иборат:

картошка вирусларини иммунологик усулда диагностика қилиш бўйича тавсиянома ишлаб чиқилган;

вируснинг Ўзбекистон иқлим шароитидаги табиий ўчоқ тури ва циркуляцияси аниқланган;

ҚТ-ПЗР усули ёрдамида вирус идентификацияси амалга оширилган ва унинг баъзи молекуляр-генетик хусусиятлари аниқланган;

вирус диагностикаси учун поликлонал антитана тутувчи специфик зардоб тайёрланган;

табиий шароитда вирус сақланиши ва тарқалишига сабаб бўлувчи бир қатор табиий резерватор ўсимликлари аниқланган;

картошка вируслари тарқалишини олдини олиш, зарарини пасайтириш ва самарали қарши кураш чораларини ишлаб чиқишга қаратилган ҳамда илмий асосланган амалий тавсиялар ишлаб чиқилган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** тадқиқотда қўлланилган фитовирусология ва биотехнология усуллари ёрдамида олинган тажриба натижаларинининг назарий маълумотларгамос келиши, олинган тажриба натижаларининг замонавий дастурлар асосида (Biostat, 2007; Statistica 5,5; Microsoft Office Excel, 2003; Microsoft, USA, Origon Pro B 9,4, 2014, MEGA6, BALASTn) таҳлил қилинганлиги, диссертация амалий натижаларининг етакчи хорижий журналларда чоп этилганлиги ҳамда ишлаб чиқилган тавсияларнинг амалиётга жорий этилганлиги билан изоҳланади.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти КХВ ни ажратиш, тозалаш ва антизардоб тайёрлашнинг йўллари ишлаб чиқилди ҳамда шу асосда вирусга специфик зардоби тайёрланди. Тайёрланган специфик зардоб ИФА, НЦМ ва ИИД усулларида қўлланилди ва бу усуллар ёрдамида вирусга чидамли навлар ҳамда вируснинг мамлакатимиз иқлим шароитида тарқалган табиий-резерватор ўсимликларида аниқлаш ва Тошкент вилояти туманларида картошка X, Y-вирусларининг тарқалиш даражаси аниқланиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларини амалий аҳамияти вируснинг табиатда айланиш циркуляцияси ҳамда «табиий ўчоқ» типи аниқланди. Бу ўз навбатида вирусга қарши кураш чораларини ишлаб чиқишда муҳим ҳисобланади. Шу билан бир қаторда вирус билан касалланган ва соғлом ўсимликдаги пероксидаза ферменти динамикаси аниқланган бу эса ўсимликларнинг вирусга чидамлилигини оширишнинг физиологик асоси бўлиб хизмат қилиши мумкин. Бундан ташқари вируснинг Ўзбекистонда тарқалган «некротик» изоляти ажратилди ва уни *ORFs5* гени асосида молекуляр-генетик идентификацияси амалга оширилди ва филогенетик таҳлил қилинди, олинган геном нуклеотидлар кетма-кетлиги NCBI базасига жойлаштирилди ҳамда дунё бўйича худди шу йўналишда олиб борилаётган илмий-тадқиқотларда солиштириш учун қўлланилиши билан асосланади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Kартошка Х-вирусининг Ўзбекистонда тарқалган изолятини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш ва диагностика қилиш бўйича олиб борилган илмий-тадқиқот натижалари асосида:

картошка (*Solanum tuberosum* L.) ўсимлигининг “КХВ-Ўз” изоляти Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг “Фитопатоген ва бошқа микроорганизмлар” ноёб объекти коллекцияси генофондига топширилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси 2019 йил 13 ноябрдаги 4/1255-3019-сон маълумотномаси). Натижада фитопатоген микроорганизмлар штаммлари коллекция генофондини бойитиш, вирус турлари хилма-хилликлари электрон базаси ахборот таҳлил тизимини шакиллантириш имконини берган;

вирус билан касалланган картошка (*Solanum tuberosum* L.) ўсимлигидан ажратиб олинган КХВ-Ўз изоляти (*Potato virus* X) Жаҳон микроорганизмлар маълумотлар марказининг Патоген Микроорганизмлар Миллий коллекциясининг (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) маълумотлар базасига WDCM 915-рақами орқали рўйхатдан ўтказилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси 2019 йил 13 ноябрдаги 4/1255-3019-сон маълумотномаси). Натижада дунёнинг турли минтақаларида тарқалган “Картошка Х вируси”ни тадқиқ қилишда глобал доирада фойдаланиш имконини берган;

вирусга тайёрланган специфик зардоби Тошкент вилояти Қибрай туманидаги “Флора”, Паркент туманидаги “Хисорак-Чотқол”, Тошкент туманидаги “Мурод агро-плюс” фермер хўжаликларидаги 78,6 гектар картошка майдонларида жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2020 йил 7 декабрдаги 02/025-4226-сон маълумотномаси). Натижада экиш олдидан уруғлик картошкани саралаш, вегетация жараёнида касалланиш даражасини мониторинг қилишда самарали фойдаланилган ҳамда картошка ҳосилдорлигини ошиши имконини берган;

иммуноблотинг усули Тошкент вилоятининг Қибрай, Паркент туманлари картошка экин майдонлари ва уларнинг атрофида ўсувчи ўсимликлар вирусологик назоратини олиб боришда жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2020 йил 7 декабрдаги 02/025-4226-сон маълумотномаси). Натижада, ушбу ҳудудларда ўсувчи вирус сақловчи ўсимликларни эрта аниқлаш ҳамда фитосанитар чораларини олиб бориш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Мазкур тадқиқот натижалари 10 та халқаро ва 22 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган**.**

**Тадқиқот натижаларнинг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 32 та илмий иш чоп этилган, шундан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларида 12 та мақола, жумладан, 9 таси республика ва 3 таси хорижий илмий журналларда нашр этилган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми**. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ҳамда иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 194 бетни ташкил этган.

**ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ**

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

Диссертациянинг **“Картошка ўсимлиги вируслари ва уларга таъсир этувчи экологик омиллар ҳамда инфекциядан ҳимояланиш йўллари”** деб номланган биринчи бобида картошка ўсимлигини касаллантирувчи вирусларнинг умумий хусусиятлари, уларнинг систематик ўрни ва *Potexvirus*авлодига мансуб фитопатоген вирусларнинг тавсифи, вирус эпифитотийси ва уларга таъсир этувчи экологик омиллар, вирусларнинг сақланишига таъсир кўрсатувчи ташқи муҳит омиллари, картошка вирусларининг резерваторлари ҳамда вирус эпифитотийсини олдини олиш чоралари ва ўсимликларнинг инфекциядан ҳимояланиш йўллари ҳақида маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Картошка вирусларини ажратиш, тоза препаратини олиш, специфик зардоб тайёрлаш ва диагностика услубларига тавсиф»** деб номланган иккинчи бобида тоза вирус препаратини олиш усуллари ва уларнинг характеристикаси, вирусларни аралаш инфекциядан биологик тозалаш ва унинг аҳамияти, тозалашнинг физик-кимёвий усуллари, картошка Х вирусининг тоза препаратини олиш усуллари, тоза вирус препаратига қўйилган талаблар, фотовируслар диагностикасида қўлланиладиган иммунологик усуллар ва уларнинг сезгирлик даражаси, иммунофермент анализ усули, унинг классификацияси, қўлланилиши ҳамда фиотвирусологияда самарали қўлланилиб келинаётган молекуляр-генетик усуллар ва уларнинг вируслар диагностикасида қўлланилиш даражалари тавсифланган.

Диссертациянинг **“Тадқиқотлар учун фойдаланилган материаллар ва услублар”** деб номланган учинчи бобида диссертация ишини бажаришда фойдаланилган материаллар, реактивлар ва услублар тавсифланган. Бундай услублар ўсимликларни механик усулда касаллантириш, касалланиш даражасини ва вирус зарарини аниқлаш, картошка Х вирусини биологик тозалаш, тоза препарат олишнинг физик-кимёвий усуллар, вирусга специфик антизардоб тайёрлаш ва унинг иммунокимёвий хусусиятларини ўрганиш, иммунологик усулларнинг қиёсий таҳлили, тоза вирус препаратини спектрофотометрик анализи, электрон микроскопия усулида вирионининг микрофотографиясини олиш усули, ИФТ усули ёрдамида картошка вирусларини диагностика қилиш, ўсимлик пероксидазасини ажратиш ва хусусиятларини ўрганиш, картошка вирусларига экологик омилларнинг таъсирини аниқлаш, ПЗР усули ёрдамида КХВни ўрганиш ва таҳлил қилиш усуллари ҳақидаги маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **“Картошка Х вирусини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш, тоза препаратини олиш ва специфик антизардоб тайёрлаш”** деб номланган тўртинчи бобида вирус изолятларининг биологик хусусиятларини ўрганиш ва унинг ўсимликлар баъзи физиологик хусусиятларига таъсири, вирус изолятларининг идентификацияси, табиий циркуляцияси ва «табиий ўчоқ» турини аниқлаш, вирусни ажратиш ва тоза препратини олиш, специфик антизардоб тайёрлаш, унинг иммунокимёвий хусусиятларини ўрганиш ва антизардобнинг ишлатилиши бўйича олинган тадқиқот натижалари ва уларнинг таҳлили келтирилган.

**КХВ «некротик» изолятининг тест-индиктор ўсимликлардаги касаллик аломатларини ўрганиш.** КХВни ўрганиш устида олиб борилган тадқиқотлар давомида вируснинг Умид навида қорамтир системали мозаика аломатларини келтириб чиқарувчи “некротик” (КХВн) изоляти ажратилди ва дастлабки олиб борилган тадқиқотлар натижасида Диёра навида хол-хол мозаика касаллик аломатларини келтириб чиқарадиган “оддий” изоляти билан солиштирилди (Файзиев, 2011) ва ўрганишлар натижасида хўжайин ўсимликларда бир-биридан фарқ қилувчи аломатларини келтириб чиқарганлиги, уларнинг бир-биридан фарқланувчи изолятлар эканлигидан далолат беради. Бунинг учун лаборатория шароити ва тажриба майдонида ўстирилган бешта оила, 16 турга мансуб, дастлабки тадқиқотларда фойдаланилган тест-индикатор ўсимликлар механик инокуляция қилиниб, уларда касаллик аломатлари пайдо бўлиш ҳамда аломатлардаги ўхшашлик ва тафовутлар ўрганилди (1-жадвал).

**1-жадвал**

**КХВ изолятларининг тест-индикатор ўсимликлардаги касаллик аломатларини**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Индикатор ўсимликлар оиласи ва тур номи** | **КХВ штаммлари** | | | |
| **\*КХВо** | | **\*\*КХВн** | |
| Касаллик аломати | Пайдо бўлиш муддати | Касаллик аломати | Пайдо бўлиш муддати |
| **Шўрадошлар *(Chenopodiaceae)***  Шўра (*Chenopodium quinoa*)  Шўра (*Ch. amaranticolor*)  Думбил шўра (*Ch. murale* L*.*)  Оқ шўра (*Ch. album* L*.*)  **Итузумдошлар** **(*Solanaceae*)**  Дўрмон *(Datura stramonium)*  Мингдевона *(D. metel* L*.)*  Физалис *(Phisalis floridana* L*.)*  Тамакининг  *N. barley* нави  *N. rustica* нави  Петуния *(Рetunia hybrida)*  Помидор *( L. esculentum* Mill*.)*  Бақлажон *(S. melon-gena* L*.)*  Булғор қалампири **(***C. annum***)**  **Дуккакдошлар *(Leguminosae)***  Қоракўз вигна *(Vigna sinensis)*  **Лабгулдошлар *(Labiatae)***  Райҳон *(Ocimum basilicum* L*.)*  **Мочиндошлар (*Amaranthus*)**  Қулупнайгул *(G. globosa)* | ХД  ХД  ХД  -  ХХМ  ЯМ  -  СМ  -  -  ЯМ  -  М  -  -  ҚҲН | 13-14  10-12  6-7  -  10-12  18-20  -  20-22  -  -  10-15  -  10-12  -  -  5-6 | ХД  ХД  СН  -  Н  -  -  ЯМ  Н  -  ББ, ЯМ  -  ХХМ  -  -  ЙН | 10-12  8-10  5-6  -  8-10  -  -  18-20  14-16  -  6-8  -  8-10  -  -  5-6 |

**Изоҳ:** жадвалнинг касаллик аломатлари устунидаги: ХД – хлоритик доғ, ХХМ – хол-хол мозаика, ЯМ – яшил мозаика, СМ - системали мозаика, М – мозаика, ҚҲН – қизил ҳалқали некроз, СН – сариқ некроз, Н – некроз, ЙН – йирик некрозни; “\*” – белги вируснинг Диёра навидан ажратилган “оддий”, “\*\*” – эса Умид навидан ажратилган “некротик” изолятини англатади.

Вируснинг Диёра навидан ажаратилган изоляти *Chenopodiaceae* оиласига мансуб қатор турлари, яъни *Chеnopodium quinoa, Ch. amaranticolor* ва *Ch. murale* каби турларида ўлчами жиҳатдан бир-биридан фарқланувчи сариқ хлоритик доғларни келтириб чиқарса, *Solanaceae* оиласига мансуб *Datura stramonium* ўсимлигида хол-хол мозаика, *D. metel* ва *Lycopersicum esculentum* Millўсимликларида эса яшил мозаика аломатларини келтириб чиқарган бўлса, *Amaranthus* оиласига мансуб *Gоmphrena globosa* ўсимлигида эса қизил ҳалқали некрозларни келтириб чиқариши аниқланди (Файзиев, 2011). Вируснинг КХВн изоляти КХВо изолятдан фарқли ўлароқ *Ch. murale* ўсимлигида сариқ некротик доғларни, *D. stramonium* ўсимлигида эса барг эти некрозлари ва ўсимлик ўсишининг секинлашиши каби аломатларни келтириб чиқариши маълум бўлди, қолган ўсимликлардаги касаллик аломатлари жадвалда келтирилган (1-жадвал).

Вируснинг КХВн изоляти КХВо изолятидан фарқли равишдатамакининг *N. barley* навида яшил мозаика,  *N. rustica* навида некротик доғларни, *Cарsicum annum* ўсимлигида эса хол-хол мозаика аломатларини келтириб чиқариши аниқланди.

Ҳар иккала изолят ҳам *Chenopodiaceae* оиласига мансуб *Ch. аlbum* ўсимлигида, *Solanaceae* оиласига мансуб *Phisalis floridana*, *Рetunia hybrida*, *Sоlanum melon-gena*, *Capsicum annum*каби вакилларида, *Leguminosae* оиласига мансуб *Vigna sinensis*, *Labiatae* оиласи вакилларидан *O. basilicum* каби ўсимликларида касаллик аломатларини келтириб чиқармаслиги аниқланди (1-жадвал).

Демак, олиб борилган тадқиқотлар натижасида мамлакатимиз иқлим шароитида тарқалган, картошка ўсимлигининг Умид навида системали қорамтир мозаика аломатларини келтириб чиқарувчи, *Dаtura stramonium, Ch. murale, Gоmphrena globosa* каби ўсимликларда йирик некрозларни тез пайдо бўлишига олиб келувчи “некротик” КХВнизоляти ажратилди ва Диёра навида хол-хол мозаика, *Dаtura stramonium* ўсимлигида эса оддий системали мозаика аломатларини келтириб чиқарувчи вируснинг “оддий” КХВо изоляти билан солиштириб, тест-индикатор ўсимликлари ёрдамида идентификация қилинди ва касаллик аломатлари ўрганиб чиқилди.

**Вируснинг ўсимлик фотосинтетик аппаратига таъсирини аниқлаш.** Фитовируслар ҳам бошқа патоген организмлар сингари хўжайин организмига киргандан сўнг ундаги маълум бир физиологик жараёнларга таъсир кўрсатиб бу жараёнларни ўзгартиради ва ўсимлик ҳужайрасини ўзи учун зарур қисмларини синтезлашга йўналтиради. Шунинг учун вируснинг ўсимликда кечадиган баъзи физиологик хусусиятларига, яъни фотосинтетик жараёнларни таъминловчи хлорофилл ва каротиноид пигментларига таъсирини ўрганиш мақсад қилиб олинди. Бунинг учун КХВн изолятининг *Dаtura stramonium*ўсимлиги баргидаги хлорофилл “а” ва “b” ҳамда каротиноид миқдорига таъсир даражаси аниқланди (2-жадвал).

Жадвалдан кўриниб турибдики, вирус билан кучсиз ва ўртача даражада касалланган *D. stramonium*ўсимлигибаргидаги хлорофилл «а» миқдори назоратга нисбатан тўрт баравар пасайиб кетганлиги, яъни 2,80 - 2,88 mg/l ни ташкил этган бўлса, кучли даражада касалланган ўсимлик баргида эса пигмент миқдорининг назоратга нисбатан тўққиз баравар камайтирганлиги, яъни 1,03 mg/l ни ташкил этганлиги аниқланди. Хлорофилл «b» пигментининг миқдори эса назортага нисбатан икки барвар пасайганлиги, яъни назоратда 5,16 mg/l ни ташкил қилган бўлса, тажрибаларда турли даражада касалланган ўсимлик баргида деярли бир хил даражада, яъни 2,18-2,25 mg/l ни ташкил этганлиги аниқланди.

**2-жадвал**

**Вирус билан турли даражада касалланган *D. stramonium* ўсимлиги баргидаги пигмент миқдорининг ўзгариши**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Вариантлар** | **Тўлқин узунлиги** | | | **Ca, mg/l** | **Cb, mg/l** | **Ckar, mg/l** |
| **D664, nm** | **D649, nm** | **D470, nm** |
| Назорат\* | 0,925 | 0,462 | 0,993 | 9,96 ±0,06 | 5,16±0,04 | 2,24±0,06 |
| Кучсиз касалланган | 0,280 | 0,165 | 0,319 | 2,88±0,04 | 2,25±0,07 | 0,44±0,03 |
| Ўртача касалланган | 0,272 | 0,160 | 0,303 | 2,80±0,07 | 2,18±0,03 | 0,40±0,01 |
| Кучли касалланган | 0,268 | 0,490 | 0,306 | 1,03±0,10 | 2,21±0,09 | 0,42±0,02 |

**Изоҳ:** р≤0,05 – назоратга нисбатан ишончли, \*-назорат соғлом ўсимлик ҳисоланади.

Каротиноид миқдори ҳам назортага нисбатан тўрт баравардан ортиқ камайганлиги яъни соғлом ўсимликда 2,24 mg/l ни ташкил этган бўлса, қолган касалланиш даражаларида эса деярли бир хил миқдорда 0,40-0,44 mg/l ни ташкил этганлиги маълум бўлди (2-жадвал).

Бундан ташқари ўсимлик қуруқ массасидаги хорофилл «а», «b» ҳамда коротиноид миқдори ҳам ўрганиб чиқилди (3-жадвал).

**3-жадвал**

**Ўсимлик барги қуруқ массасидаги хлорофилл ва коротиноид миқдорининг ўзгариши**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Вариантлар | Ўсимлик барги қуруқ вазнидаги пигмент миқдори, mg/g | | | Хлорофилл “а” нинг хлорофилл “b” га нисбати |
| Хлорофилл “а” | Хлорофилл “b” | Каротиноид |
| Назорат\* | 5,00±0,08 | 2,65±0,10 | 1,15±0,03 | 1:1,93 |
| Кучсиз касалланган | 1,41±0,05 | 1,16±0,09 | 0,24±0,02 | 1:1,28 |
| Ўртача касалланган | 1,44±0,03 | 1,14±0,04 | 0,23±0,01 | 1:1,28 |
| Кучли касалланган | 0,53±0,07 | 1,09±0,06 | 0,20±0,01 | 1:2,14 |

**Изоҳ:** р≤0,05 – назоратга нисбатан ишончли, \*-назорат соғлом ўсимлик ҳисоланади.

Ўрганишлар натижасида ўсимлик барги қуруқ массасидаги хлорофилл «а» пигментининг миқдори назоратда 5,0 mg/g ни ташкил қилган бўлса, вирус билан кучсиз ва ўртача даражада касалланган ўсимлик баргида 1,41 mg/g, кучли даражада касалланган ўсимлик баргида эса бу пигмент миқдори 0,53 mg/g эканлиги ўрганишлар натижасида аниқланди. Хлорофилл “b” пигментининг миқдори эса назоратда 2,65 mg/g ни ташкил қилган бўлса, қолган касалланиш даражаларида назоратга нисбатан икки баравар камайганлиги, яъни 1,09-1,14 mg/g эканлиги аниқланди (3-жадвал). Коротиноид миқдори ҳам назоратда 1,15 mg/g ни ташкил этган бўлса, қолган турли касалланиш даражаларида эса деярли бир хил 0,20-0,24 mg/g ни ташкил этганлиги ўрганишлар натижасида аниқланди (3-жадвал).

Олинган натижалар асосида хлорофилл “а” нинг хлорофилл “b” га нисбати ҳисоблаб топилди, натижада соғлом ўсимликда бу кўрсаткич 1:1,93 ни ташкил қилган бўлса, вирус билан кучсиз ва ўртача даражада касалланган ўсимлик баргида 1:1,28 ни, кучли даражада касалланган ўсимлик баргида эса бу нисбат 1:2,14 ни ташкил этди (3-жадвал).

Демак, КХВн изоляти *D. stramonium*ўсимлигининг фотосинтетик системасига таъсир этиб, касалланиш даражасига боғлиқ равишда, хлорофил “а”ни назоратга (9.96 mg/l) нисбатан ўртача 4,4 баравар (2,23 mg/l) ва “b”ни назоратга (5.16 mg/l) нисбатан 2,3 баравар (2,2 mg/l), каротиноидни эса назоратга (2,24 mg/l) нисбатан (0,42 mg/l) 5,3 баравар камайтириб юбориши аниқланди.

**КХВн изоляти билан касалланган ва соғлом ўсимликлардаги пероксидаза ферменти миқдорининг ўзгариш динамикасини ўрганиш.** Ўсимлик пероксидазасини ўрганган Газарян И.Г. (2006), Витякина В.О. (2012) каби қатор муаллифларнинг фикрича ўсимлик ҳужайрасида пероксидазанинг ҳужайра девори билан кучсиз боғланган ва эрувчан формаларининг учраши, Малиновский В.И. (2010), Шарипова М.Р. (2013) каби муаллифлар маълумотига кўра пероксидаза ҳам *PR*-оқсилларнинг (*Pathogenesis-Related protein*) *PR*-9-оқсиллар гуруҳига мансублиги ҳамда уларнинг миқдори турли стрес шароитларда ўзгариши келтириб ўтилган. Шунинг учун кейинги тадқиқотларда вирус билан турли даражада касалланган ўсимликларда пероксидаза турлари миқдорининг ўзгариши ўрганилди. Бунинг учун механик инокуляция қилиш орқали КХВ билан турли даражада касаллантирилган *D. stramonium* ўсимлигида пероксидаза динамикаси ўрганилди (1-расм).

**1-расм. КХВн изоляти билан касалланган *D. stramonium* ўсимлигидаги пероксидаза ферменти фаоллиги**

Расмдан кўриниб турибдики, назоратга нисбатан кучсиз касалланган ўсимликда пероксидазанинг эрувчан формаси соғлом ўсимликга нисбатан ошганлиги, яъни 21,0 ммоль/мл ни, ўртача даражада касалланган ўсимликда фермент активлиги 12,5 ммоль/мл ни, кучли даражада касалланган ўсимликда эса унинг активлиги икки баравар ортганлиги, яъни 24 ммоль/мл эканлиги аниқланди. Ҳужайра девори билан кучсиз боғланган фермент формасининг активлиги соғлом ўсимликда 9,75 ммоль/мл ни ташкил этган бўлса, кучсиз даражада касалланган ўсимликда 14,0 ммоль/мл ни, ўртача касалланган ўсимликда 8,0 ммоль/мл ни, кучли даражада касалланган ўсимликда эса 7,4 ммоль/мл ни ташкил этганлигини маълум бўлди (1-расм).

Олинган натижалар асосида қуйидагича хулоса қилиш мумкин, демак, пероксидаза ферменти эрувчан формасининг концентрацияси соғлом ва вирус билан касалланишнинг дастлабки вақтларидан бошлаб юқори бўлиб, касалланишнинг кейинги босқичларида ҳам унинг активлиги юқори даражада сақланиши, ҳужайра девори билан боғланган формасининг концетрацияси дастлаб ортиб кейин эса пасайиб бориши вирус билан касалланиш ўсимликнинг вегетатив органларида кечадиган физиологик жараёнларини издан чиқишига олиб келишидан далолат беради.

**КХВн изоляти физ-кимёвий хусусиятларини қиёсий ўрганиш орқали штаммга хос белгиларини аниқлаш.** Вируснинг мамлакатимиз иқлим шароитида тарқалган изолятларининг штаммга хос хусусиятларини ўрганиш муҳим масалалардан бири бўлиб, кейинги тадқиқотларда унинг юқумлилиги, охирги суюлиш даражаси (ОСД) ва ҳарорат таъсирида фаоллигини йўқотиш даражаси (ҲТФЙД) каби хусусиятлари ўрганилди (4-жадвал).

**4-жадвал**

**КХВ штаммларининг асосий хусусиятлари**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Штаммлар** | **ҲТФЙД, °С** | **ОСД** | **Юқумлилиги** |
| Хп  Хс  Хх  Хр  Хо\* | 69  70  71  75  70 | 10-5  10-6  10-6  10-7  10-5 | кучли юқумли  ўртача юқумли  ўртача юқумли  кучсиз юқумли  кучли юқумли |
| Хн\* | 72 | 10-5 | кучли юқумли |

**Изоҳ: "**\***"**- белгиланган изолятлар диссертант томонидан Ўзбекистонда ажратилган.

Бугунги кунгача вируснинг «Х-суровий» (Хс)- картошканинг Дарунок Батькивщина навидан Қозоғистонда, «Х-киевский» (Хк) – картошканинг Ранная роза навидан Киев вилоятида, «Х-польский» (Хп) - картошканинг Прикульский ранний навидан Польшада, «Х-херсонский» (Хх) - Херсон областида, «Х-размятий» (Хр) - картошканинг Берлихенген навидан Московец, Шелудко, Козар ҳамкорлигида ажратилган. Бу штаммлар ичида энг юқумлилари Хсва Хп ҳисобланиб, улар бангидевона ўсимлигида жуда тез системали касаллик аломатларини юзага келтиради. Вируснинг Ўзбекистон иқлим шароитида тарқалган Хн ваХо изолятларнинг ОСД ва ҲТФЙД ларини ўрганилди ва жадвалда келтирилди (4-жадвал). Жадвалдан кўриниб турибдики, вирус Хн изолятида 72°С ни ташкил қилган бўлса, Хо изолятида эса ҲТФЙД 70°С ни, ҳар иккала изолятда ҳам ОСД 10-5 ни ташкил этиши маълум бўлди.

Ваyne E.H. (2005), Гнутова Р.В. (2014) каби қатор муаллифлар вируснинг Хх, Хт ва Хр-штаммлари қуритилган баргда 3 ой, ўсимликдан ажратилган ширада хона ҳароратида 2 ой гача, совутгичда (+4°С) бир йилга яқин, Хп-штамми эса хона шароитида қуритилган баргда 1,5 ой, ўсимликдан ажратилган ширада 2 ой гача, +4°С эса 6 ойгача сақланишини таъкидлаб ўтишган.

Бу маълумотларга асосланган ҳолда дастлабки тадқиқотларимизда вирус Хо изолятининг ва кейинги олиб борилган тадқиқотларда эса Хн изолятининг ўсимлик баргида ва ундан ажратилган ширада сақланиш муддати аниқланди. Натижалар вирус юқумлилик даражасининг сақланишига боғлиқ ҳолди, *G.globosa* ўсимлигида пайдо бўлган некрозлар сонига қараб аниқланди ва қуйида келтирилди. Дастлабки ўтказилган тажрибалар асосида бу вирус бангидевона ўсимлиги қуритилган баргида хона ҳароратида 10-12 кун, +4°С да 96 кунгача, музлатилганда эса бир йилгача сақланиши, ўсимликдан ажратилган юқумли ширада эса худди қуритилган баргдаги сингари хона шароитида 10-12 кун, +4°С да 96 кун, музлатилганда эса 192 кунгача сақланиши аниқланди ва вирус қанчалик узоқ муддат сақланса, унинг юқумлилик хусусияти шунчалик пасайиб бориши аниқланган (Файзиев, 2011).

Вирус Хн изолятининг ҳам шундай икки ҳолатда сақланиш даражаси ўрганилганда, унинг ўсимлик баргидагидан ажратилган ширада сақланиш муддати КХВо  изоляти билан бир хил, фақат ўсимлик қуритилган баргида сақланиш муддати хона шароитида 4 ойгача, совутгич шароитида 6 ойгача, музлатилганда эса 2 йилгача сақланиши ўтказилган тажрибалар асосида аниқланди. Мамлакатимизда ажратилган КХВо ва Хн изолятларини юқорида аниқланган биологик хусусиятларига асосланиб Польшада «Прикульский ранний» навидан ажратилган кучли юқумлиликка эга бўлган Хп-штаммига солиштирадиган бўлсак, бу штаммнинг ҲТФЙ даражаси 69°С, КХВо изолятининг эса ҲТФЙ даражаси 70°С, Хн изолятиники эса 72°С эканлиги ва хона ҳароратида КХВо 10-12 кун, Хн изоляти эса қуритилган ўсимлик баргида 4 ойгача сақланиши аниқланган бўлса, Хп-штамми эса хона ҳароратида қуритилган ўсимлик баргида 1,5 ой гача сақланиши адабиётларда келтирилган. Ҳар иккала ажратилган изолятларининг ОСД эса бир хил, яъни 10-5 ни ташкил этди.

Олинган натижалар асосида қуйидагича хулоса қилиш мумкин, демак, КХВнинг мамлакатимизда ажратилган изолятлари кучли юқумлилик, ОСД каби хусусиятлари билан Хп-штаммига ўхшаш, аммо ҲТФЙД, хона ҳароратида сақланиши билан фарқланиши аниқланди. Улардаги хусусиятларнинг Европада тарқалган штаммларга ўхшашлиги, уларнинг келиб чиқиши ва тарқалиши шу минтақалардан эканлигидан далолат беради. Буни сўнгги йилларда мамлакатимизга картошка уруғлик туганакларининг Европа мамлакатларидан олиб келиниши билан изоҳлаш мумкин.

**КХВнинг циркуляцияси ва “табиий ўчоқ” турини аниқлаш.** Вирусга қарши кураш чоралари ишлаб чиқиш учун унинг табиий циркуляцияси ва “таббиий ўчоқ” типи, вирус сақланиш манбалари каби биологик хусусиятларини аниқлаш муҳим ҳисобланади. Бунинг учун картошка экин майдонлари атрофи ва ичида тарқалган бир қатор ёввойи ва маданий ўсимликлар ИФТ ва НЦМ ёрдамида текширилиб, уларнинг ичидан касаллик аломатларини намоён қилмасдан яширин ҳолда вирус сақловчи табиий-резерватор ўсимликлари аниқланди. Шу билан бир қаторда тажриба майдонида экилган вирус билан механик инокуляция қилиш ёрдамида касаллантирилган картошка ўсимликларининг тугунакларини уч йил давомида қайта-қайта экиш ҳамда ушбу туганаклардан юқумли шира тайёрланиб, тест-индикатор ўсимликларга юқтириш, ИФТ ва ИИД усуллари ёрдамида диагностика қилиш орқали вируснинг туганакда сақланиши ва асосий инфекция манбаи сифатида вирус табиий циркуляциясини таъминланишига ёрдам бериши ҳақида хулоса қилиш имконини берди.

Умуман, олиб борилган кузатишлар ва ўтказилган тажрибалар асосида вируснинг табиий циркуляциясини қуйидаги расмда, схематик равишда тасвирлаш мумкин (2-расм).

Расмдан кўриниб турибдики, вируснинг табиатда айланиши иккита, яъни катта ва кичик айланиш доиралари мавжуд бўлиб, бу айланиш доиралари орқали вирус табиатда ўз циркуляциясини таъминлайди ва узоқ йиллар давомида сақланиб боради. Вирус айланишининг катта доирасида ёввойи ўсимлик ташувчи ёрдамида вирус билан касаллангандан сўнг уни ўз органларида сақлайди ва табиий циркуляциясини таъминлайди. Резерватор ўсимлик вирусни баҳор, ёз ва куз фаслларида ер устки органларида сақлайди, қишда эса унинг илдизида сақланади. Маданий ўсимлик, жумладан картошка ўсимлигининг вегетатив органларида вирус кўпайиб, туганагига ўтади ва сақланади, кейинги йилда ушбу вирус тутувчи туганакни экиш яна вирусни табиатга қайтишига сабаб бўлади, бу вирус айланишининг кичик доираси бўлиб, маданий ўсимлик билан чамбарчас боғлиқдир (2-расм).

Ю.Власовнинг фитовирусларнинг “табиий ўчоқ”лар билан алоқадорлиги назариясига асосланган ҳолда КХВнинг табиий айланиш доирасини таъминлаш учун бир вақтнинг ўзида маданий ва ёввойи ўсимликлардан фойдаланиши унинг турғун айланиш церкуляциясини таъминлаб беради.

Вируснинг табиатда айланиши эса иккита яъни катта ва кичик айланиш доиралари асосида амалга ошади. Катта айланиш доирасини қуйидагича тасвирлашимиз мумкин: ёввойи резерватор ўсимлик – ташувчи – маданий ўсимлик – ташувчи – ёввойи резерватор ўсимлик; кичик айланиш доираси эса: туганак – маданий ўсимлик – ташувчи – маданий ўсимлик тартибида тасвирлаш мумкин.

Шундан келиб чиққан ҳолда, КХВни “табиий ўчоқ”лар билан алоқадорлигига қараб иккинчи гуруҳга, яъни «Маданий ўсимликлар ичида турғун айланиш циркуляциясига эга бўлган табиий ўчоқли касалликлар» типига мансублигини туганак таркибида сақланиши ва маданий ўсимликлар аъзоларида сақланиши кўрсатди. Вируснинг табиатда бир қатор резерватор ўсимликлари мавжуд бўлсада, туганак орқали ҳам авлоддан – авлодга узатилади ва қўзғатувчи (вирус) билан маданий ўсимлик (картошка) орасида мустаҳкам алоқа сақланиб қолган.

**КХВн изолятини ажратиш, тоза препаратини олиш ва специфик зардоб тайёрлаш.** Биологик хусусиялари ўрганилган КХВн изолятига специфик антизардоб тайёрлаш уни хўжайин ўсимликдан ажратиш, аралаш келган бошқа вируслардан биологик тозалаш, кўпайтириш ва тозаланган препарат олишни талаб этади.Шуларни эътиборга олган ҳолдаКХВн изолятини ажратиш ва биологик тозалаш схемаси ишлаб чиқилди ва у қуйида келтирилган (3-расм).

|  |
| --- |
| намуна=> гомогенизацация => *D. stramonium => G. glabosa* *=>*  *D. stramonium*  0,02 M ФБ, pH 7-8 (дифференциатор) (мононекроз) (тўпловчи) |
| ***1-пассаж*** |
| => гомогенизaция => *D. stramonium =>G. glabosa* *=>*  *D. stramonium*  0,02 M ФБ, pH 7-8 (системали мозаика) (мононекроз) (системали мозаика) |
| ***2-пассаж*** |
| => гомогенизaция => *D. stramonium => 72°C да 10 дақ.* *=>*  *N. tabacum*  0,02 M ФБ, pH 7-8 (системали мозаика) (сув ҳаммомида) (системали мозаика) |
| ***3-пассаж*** |

**3-расм. КХВн изолятини ажратиш ва биологик тозалаш схемаси**

КХВн изолятиниажратишда асосий табиий манба сифатида картошканинг Умид навидан, дифференциатор ўсимлик сифатида *Datura stramonium* ўсимлигидан фойдаланилди. *D. stramonium* ўсимлигида касаллик аломати дастлаб некроз, кейинчалик системали мозаика сифатида пайдо бўлгандан сўнг, ундан инокулюм олиниб *G. globosa* ўсимлигига юқтирилди, пайдо бўлган некрозлардан яна қайта инокулюм тайёрланилиб, қайта инокуляция қилиш орқали вирус мононекроз ҳолида ўтказилиб биологик тозаланиб олинди. Шу билан бир қаторда вирусни аралаш инфекциядан тозалаш мақсадида, вирусли шира 72°C да 10 дақиқа давомида ушлаб турилди ва Nicotiana tabacumнинг *N.barley* навига юқтириб кўпайтириб олинди (3-расм).Унда кўпайтирилган вирусли намуна полиэтилен қопчаларга 250 г дан солиниб тоза препарат олиш учун музлатилган ҳолатда сақлаб қўйилди.

КХВн изолятининг тозаланган препарати вирусли намунани 0,02М ли ФБ (рН 7.5) солиниб гомогенизация қилиш, органик эрутувчилар билан ҳужайра компонентларини денатурациялаш, паст айланишда центрифуга қилиш ва 25% ли аммоний сульфат ёрдамида чўктириш орқали қисман тозаланган вирус препаратини олиш ва ундан TSK гелни қўллаб гельфильтрация қилиш орқали олинди (4-расм).

Гомогенизация

(барг)

Центрифугалаш

(20 мин, 5000 aйл./дақ.)

Ҳужайра таркибий қисмларини денатурлаш (хлороформ (8:1 нис) б.н.)

Чўкма

Чўкма усти суюқлиги

Чўкма

Чўкма 0,02М ф.б. билан эртилиб, центрифугаланади (10 мин 6000 aйл./дақ.)

Гельфильтрация

(TSK-75)

Центрифугалаш (5000 aйл./дақ.)

KXВнинг тозаланган препарати (150 мг)

ЧУСга 25%-ли аммоний сульфат тузи солиб

эритиш ва +4°С да 1 соат сақлаш

Центрифугалаш

(20 мин, 5000 aйл./дақ.)

Чўкма усти суюқлиги

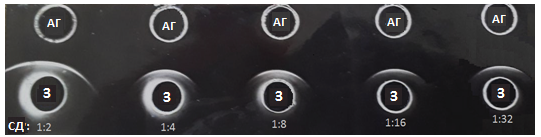
**4-расм. КХВн изолятининг тоза препаратини олиш схемаси**

Олинган вирус препарати спектрофотометр ёрдамида 220-320 нм тўлқин узунлигида ўлчанганда, препаратнинг УБ-нурини минимал ютиш кўрсаткичи 245 нм, максимал кўрсаткичи эса 260 нм ни, 260/280 га нисбати 1,2 ни, яъни спирал симметрия асосида тузилган вирусларга хос бўлган кўрсаткични намоён қилди.

Ажратиб олинган вирус миқдори Е2600,1%≈2,8 га асосланиб ҳисоблаб топилди. Модификацияланган усул ёрдамида 1 кг вирусли материалдан дастлабки тадқиқотларимизда 3% ли агар-агар ва сефадекс (G-200) дан иборат бўлган комплекс колонка ёрдамида 135,5 мг ни ташкил этган бўлса (Файзиев, 2011), кейинги тадқиқотлар натижасида гельфильтрация жараёнида ТSK-75 гелини қўллаб эльюция тезлигини соатига 35 мл дан 50 мл га ҳамда тоза вирус препаратини эса 150 мг гача оширишга эришилди.

**КХВн изолятига поликлонал зардоб тайёрлаш ва иммунокимёвий хусусиятларни аниқлаш.** КХВн изолятига поликлонал антизардоб тайёрлаш ҳам КХВо изолятига зардоб тайёрлаш каби амалга оширилди (Файзиев, 2016). Бунинг учун гельфильтрация усули билан тозаланган гомоген вирус препарати 4 мг/мл дан қуённинг сон мускулларига ва курак териси остига кунора, жами 5 марта 1 мл вирус препарати ва 1 мл дан тўлиқ Фрейнд адъюванти қўшилиб юборилди. Охирги иммунизациядан 14 кун ўтгандан сўнг қуён қулоқ венасидан биринчи марта 10 мл, уч кундан сўнг эса яна 10 мл қон олинди. Олинган қон 1 сутка давомида хона ҳароратида қолдирилгандан сўнг, секин қон зардоби қуйиб олинди ва қолган қоннинг шаклли элементларидан тозалаш учун 2000 айл./дақ.да 5 дақиқа давомида центрифуга қилиниб, чўкма усти қуйиб олинди ва унинг иммунокимёвий хусусиятлари ўрганилди. Дастлабки тадқиқотларда вируснинг Хо изолятига тайёрланган зардобнинг титри 1:16 ташкил этган бўлса (Файзиев, 2011), вируснинг Хн изолятига тайёрланган поликлонал зардобнинг титри эса 1:32 ни ташкил этди (5-расм).

Титри аниқланган зардоб алоҳида флаконларга, 0,6 мл зардоб ва 1-2 томчи хлороформ солиб яхшилаб беркитилгандан сўнг -4°С да сақлаб қўйилди. Ажратилган зардоб миқдори жами 20 мл олинган қондан 12,5 мл ни ташкил этди. Агар ИФТ усулида битта намунани текшириш учун 10 мкл суюлтрилмаган зардоб сарфланса, 100 мкл 10 та намунага, 1 мл эса 100 та намунани текширишга, 12,5 мл суюлтирилмаган ҳолатдаги зардоб 1250 та намунани текширишга етади.

****

**Изоҳ:** расмдаги АГ – КХВн изоляти билан касалланган *Nicotiana barley* ўсимлиги вирусли шираси яъни АГ; З – тоза вирус препаратини қуёнга юбориш орқали олинган поликлонал антитана тутувчи зардоб; СД - эса суюлтириш даражасини ангалатади.

**5-расм. Хн изолятига тайёрланган зардобнинг ИИД усули ёрдамида аниқланган титри**

Шундай қилиб, Хн изолятига юқори титрли специфик зардоб тайёрланди. Хн изолятига тайёрланган зардобнинг титри эса 1:32 ни ташкил қилди ва уни титрга мувофиқ равишда суюлтирилса, миқдори 62,5 мл ни ташкил этади, бу 6255 та намуналардан вирусни аниқлаш имконини беради. Тайёрланган зардоб вируснинг табиий циркуляцияси ва резерватор ўсимликларни аниқлаш ҳамда вирусга чидамли нав ва намуналарни аниқлашда ишлатилди.

**КХВн изолятига тайёрланган поликлонал зардобни вирус диагностикасида қўллаш.** Бунинг учун “Сабзавот, полиз экинлари ва картошкачилик” институти тажриба даласида экилган 30 дан ортиқ навларни лаборатория шароитида ИФТ ва ИИД ёрдамида текширилиб, чидамлилиги аниқланди (5-жадвал).

Олиб борилган тадқиқотлар ва ушбу йўналишдаги дастлабки иммунологик текширишлар натижасида, аввалги шу йўналишда олиб борилган тадқиқотлардаги сингари ушбу вирусга иммун бўлган картошка навлари аниқланмади (Файзиев, 2011), фақатгина Кондор ва Курадо навлари амалий чидамли эканлиги, Вирго, Невский, Пикассо ва Сарнов каби навлар КХВ билан кучсиз касалланувчи гуруҳга мансублиги, ўртача касалланадиган навларга Дитта, Романо, Арнова, Мирям, Марфона, Писком, Диоманд, Гуливер, Розара-Агате, Кординал каби қатор навлар мансублиги аниқланган бўлса, чидамсиз навларга эса Ред-скарлет, K-10 (Қизғалдоқ), Умид, Радуга, Aльвара кабилар мансублиги аниқланди (5-жадвал).

5-жадвал

**Картошка навлари ва клонларининг КХВ билан касалланиш даражасини аниқлаш**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Картошка навлари ва яратилган давлат номи** | | **касалланиш даражаси, % ҳисобида** | **Картошка навлари ва яратилган давлат номи** | | **касалланиш даражаси, % ҳисобида** |
| Пикассо | Голландия | 23,0 | Дитте | Голландия | 35,2 |
| Ред-скарлет | Голландия | 68,4 | Дезирия | Голландия | 45 |
| Диоманд | Голландия | 45 | Сантэ | Голландия | 56,3 |
| Қизғалдоқ | Ўзбекистон | 72,2 | Курадо | Голландия | 10,0 |
| Фреско | Голландия | 66,7 | Романо | Голландия | 30,0 |
| Линия | Ўзбекистон | 52,9 | Арнова | Голландия | 30,0 |
| Гуливер | Голландия | 38,7 | Мирям | Германия | 30,4 |
| Умид | Ўзбекистон | 63,2 | Вирго | Германия | 20,2 |
| Розара-Агате | Германия | 48,7 | Марфона | Германия | 40,5 |
| Тўйимли | Ўзбекистон | 30,5 | Невский | Россия | 15,3 |
| Кординал | Голландия | 47,8 | Кондор | Голландия | 5,0 |
| Aрмада | Россия | 40 | Писком | Ўзбекистон | 40,6 |
| Радуга | Россия | 54,2 | Серҳосил | Ўзбекистон | 62,7 |
| Aльвара | Германия | 66,7 | Сарнов | Ўзбекистон | 24,7 |
| Ақраб | Ўзбекистон | 32,9 | Диёра | Ўзбекистон | 61,2 |

Олинган натижалар асосида қуйидагича хулоса қилиш мумкин, демак, тайёрланган специфик зардоб вирус диагностикасида, жумладан чидамли навларни аниқлашда қўлланилди. Ўтказилган текширишлар натижасида нав ва намуналар ичида КХВга иммун навлар аниқланмади, аммо Курадо, Кондор каби амалий чидамли; Вирго, Невский, Пикассо ва Сарнов каби навлар эса кучсиз касалланувчи навлар эканлиги аниқланди. Бу навлардан келажакда селекционерлар вирусга чидамли навлар яратишда фойдаланилса, самарали натижаларга эришилади.

Диссертациянинг **“КХВнинг иммунологик ва молекуляр-генетик усулда диагностика қилиш ҳамда филогенетик анализи”** дебномланганбешинчи бобида вируснинг иммунологик ва ПЗР усули ёрдамида ўрганилган хусусиятлари устида олиб борилган тадқиқот натижалари ҳақидаги маълумотлари келтирилган. Бунинг учун дастлаб бир қатор иммунологик усуллар сезгирлиги КХВ антигени асосида ўрганилди ва уларнинг ичидан ИФТ “сэндвич” вариантининг сезгирлиги 10-9 эканлиги (Файзиев, 2011), кейинги тадқиқотларда эса нитроцелюлоза мембранасида иммуноблотинг усулининг сезгирлигини ҳам солиштирилди ва унинг сезгирлиги 10-10 тенг эканлиги аниқланди. Шунинг учун кейинги тадқиқотларда НЦМ вариантлари қўлланилиб олинган баъзи ноаниқ бўлган натижалар ушбу усул ёрдамида қайта кўриб чиқилди.

**КХВнинг табиий-резерватор ўсимликларини НЦМ иммуноблотинг усули ёрдамида аниқлаш.** Вируснинг табиий-резерватор ўсимликларини ўрганиш бўйича олиб борилган дастлабки тадқиқотларда ИФТнинг «сендвич» варианти ёрдамида 16 оилага мансуб 37 тур ёввойи ва маданий ўсимликлар текширилган бўлиб, уларнинг ичидан вирус бор йўқлиги номаълум бўлган ўсимликлар аниқланган эди (Файзиев, 2009).Кейинги тадқиқотларда эса НЦМда иммуноблотинг усули ёрдамида ушбу ўсимликлар қайта текшириб чиқилди ва вируснинг олабута (*Atriplex micrantha* C.A.Mey), итузум (*Solanum nigrum*), думбил шўра (*Ch. murale),* оддий шўра *(Ch. quonea*), ёввойи гултожихўроз *(Amaranthus retrofflexus),* бургон шувоғи *(Artemisia annua),* эрмон шувоғи *(Artemisia vulgaris),* дала рангўти (*Sinapis arvensis* L.), хaртол карами (*Brassica juncea* (L) Czern) каби ИФТ сезгирлигидан четда қолган янги табиий резерватор ўсимликлари аниқланди. Бу вируснинг мамлакатимиз иқлим шароитида табиий циркуляциясини ҳамда “табиий ўчоқ” типини аниқлаш ҳамда қарши кураш чораларини ишлаб чиқиш учун асос бўлиб хизмат қилади.

КХВ изолятларини турли табиий намуналардан ҚТ-ПЗР усули ёрдамида диагностика қилиш. Сўнги йилларда фитовируслар диагностикасида молекуляр-генетик усуллар кенг қўлланиёлган бўлиб, мамлакатимизда эса бугунги кунгача ИФТ анализи усули қўлланилган бўлиб, унинг сезгирлиги вариантларга боғлиқ равишда ~10-3 - 10-5 ед/мл ва ПЗР усулининг сезгирлиги эса ~10-1 -10-2 ед/мл патогенга тенглиги келтирилган (Шляхов, 2017). Шунинг учун ушбу ишда турли касаллик аломатлари мавжуд бўлган ўсимликлардан (8-расм) олинган намуналардан ҚT-ПЗР усули ёрдамида КХВни диагностика қилинди.

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\Windows 10\Desktop\20190615_090457-1.jpg      А. | **Б.** |
| В. |  |
| 8-расм. ҚT-ПЗР усулида КХВга текширилган ўсимликлар: А - системали хол-хол мозаика аломатлари мавжуд дўрмон ўсимлиги (*D. stramonium*); Б - хол-хол мозика аломатлари бўлган картошка ўсимлиги барги (*S. tuberosum*), Диёра нави; В - мозика аломатлари мавжуд помидор ўсимлиги (*L. esculentum* Mill) (МДУ тажриба майдонидан олинган); Г- хол-хол мозика аломатлари бўлган картошка ўсимлиги барги, Умид нави. | |

Ўсимликлардан олинган намуналар лиофил қуритилган ҳолатда МДУнинг Вирусология кафедраси “Ўсимлик вируслари биохимияси” илмий лабораториясида б.ф.д., проф. Чирков С.Н. билан биргаликда, ҚT-ПЗР усули ёрдамида аниқланди ва ушбу берилган методик ва амалий ёрдам учун б.ф.д., проф. С.Н.Чирковга ўз миннатдорчилигимизни билдирамиз. ҚT-ПЗР натижалари электрофорез қурилмасида 2% агароза гелида визуализациялаштирилди ва элетрофореграммада келтирилган (9-расм).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | F:\190822_PVX_Tom.jpgM1 1 2 3 4 M2 | Электрофорез 2%-ли агароза гелида амалга оширилган. М1 - O'GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas); М2 - 100 bp DNA ladder Plus. 1 – дўрмон (*Datura stramonium*) ўсимлигидан олинган намунадан ажратилган КХВ (11-расм, А); 2 – картошканинг Умид навидан олинган намунадан ажратилган КХВ (11-расм, Б); 3 - мозика аломатлари мавжуд помидор ўсимлигидан (*Lycopersicum esculentum* Mill) (МДУ) олинган намунадан ажратилган КХВ (11-расм, В); 4 - картошканинг Диёра навидан олинган намунадан ажратилган КХВ (11-расм, Г). Праймерлар PVXIF/PVXIR. ПЦР шароити Ahmed et al. да (2013) келтирилгани сингари амалга оширилди. |
|  |
| 1000 bp **-** |

**9-расм.** **КХВни ҚT-ПЗР усули ёрдамида ўсимликларда**

**диагностика қилиш**

Расмдан кўриниб турибдики, ҚT-ПЗР усули ёрдамида ўтказилган текшириш натижасида намуна олинган ҳар тўрттала ўсимликларнинг барчаси КХВ билан касалланганлиги электрофореграмма линиялари асосида маълум бўлди.

Демак, ўтказилган текширишлар натижасида касаллик аломатлари мавжуд ўсимликлардан КХВ ҚT-ПЗР усули ёрдамида диагностика қилинди ва бу кейинги тадқиқотлар олиб бориш, яъни вирусни молекуляр-генетик хусусиятларни ўрганиш учун асос бўлиб хизмат қилади.

**Ўзбекистон иқлим шароитидан ажратилган КХВн изолятини *ORFs5* гени асосида ўрганиш ва филогенетик анализ қилиш.**Бунинг учун лиофилизация қилинган вирусли намунадан ва қуритилган дўрмон баргидан вируснинг суммар (тоталь) ва геном РНКси икки усулда ажратилди. Биринчи усул вирусга тайёрланган поликлонал антитанага вирус заррасини иммуносорбция қилиш йўли билан вирус геном РНКси ажратилган бўлса (10-расм, 1,3), иккинчи усулда эса вируснинг суммар РНКси махсус тўплам (RNeasy Plant Mini Kit) таркибига кирувчи селикагелли колонка ёрдамида ажратилди (10-расм, 2,4).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 1 2 3 4 M | Электрофорез 1,5%-ли агароза гелида амалга оширилди. М - 100 bp DNA ladder Plus. 1, 2 – лиофилизация қилинган дўрмон (*D. stramonium*) ўсимлигидан ажратилган КХВ; 3,4 – қуритилган дўрмон баргидан ажратилган КХВ. 1, 3 – вирусга тайёрланган поликлонал антитанага вирус заррасини иммуносорбция қилиш йўли билан ажратилган КХВнинг геном РНКси (Agdia, АҚШ); 2, 4 - RNeasy Plant Mini Kit набори ёрдамида ажратилган КХВнинг умумий РНКси (Qiagen, АҚШ). Қайталама транскрипция эса белгиланган тўплам асосида амалга оширилди (random hexamers). |
| 714 bp- |  |
| **10-расм. КХВн изоляти *ORFs5* генига тайёрланган специфик праймерлар ёрдамида олинган ПЗР маҳсулоти электрофореграммаси** | | |

ПЗР маҳсулоти гелдан скальпел ёрдамида кесиб олиниб тозаланди ва секвенс қилиш учун топширилди (Евроген, Россия). Секвенс натижаларига кўра КХВнинг Ўзбекистон иқлим шароитида ажратилган изоляти *ORFs5* генининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланди ҳамда у Халқаро ген банк – NCBIга PVXUZ номи билан MN702769 рақами остида жойлаштирилди, изолятнинг ўрганилган нуклеотид кетма-кетлиги кейинги биоинформатик таҳлил ўтказиш учун фойдаланилди. Ўтказилган таҳлиллар натижасида мамлакатимизда тарқалган (MN702769) КХВн изоляти D00344.1 изоляти (Нидерландия) билан 97,48%, GU384732.1 (Австралиядан), [AY297843.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297843.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=XFNWE2E9014), [AY297842.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297842.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=XFNWE2E9014) ва [M95516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M95516.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=5&RID=XFNWE2E9014) изолятлари (Буюк Биритания) билан эса 97.06% гомологияга эга эканлиги аниқланди ва унинг филогенетик шажараси яратилди (11-расм). Филогенетик шажарадан кўриниб турибдики, ушбу изолят келиб чиқиши жиҳатдан Нидерландиядан ажратилган изолят D00344.1 билан жуда яқин келиб чиқишга эгалиги, GU384732.1 изоляти билан эса филогенетик шажарада узоқ шохда жойлашганлиги, уларнинг битта яқин аждоддан тарқалганли ва кейинчалик уларнинг географик бўлиниш натижасида фарқларнинг пайдо бўлиши натижасида келиб чиққанлигидан далолат беради (11-расм).

|  |
| --- |
| **11-расм. Ўзбекистонда ажратилган КХВн изолятининг филогенетик шажараси** |

Умуман олганда, ушбу олинган натижалар асосида қуйидагича хулоса қилиш мумкин, демак мамлакатимизда аниқланган MN702769 изоляти *ORFs5* гени нуклеотид кетма-кетлиги билан D00344.1 97.48%, [AY297843.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297843.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=XFNWE2E9014), [AY297842.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297842.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=XFNWE2E9014), [M95516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M95516.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=5&RID=XFNWE2E9014) каби Европа изолятлари билан 97.06% яқинлиги бу изолятнинг ушбу Европа изолятидан келиб чиққанлиги ва мамлакатимиз иқлим шароитига тушгандан сўнг маълум ўзгаришга учраган янги изолят сифатида қайд этиш мумкин.

**КХВн изоляти оқсил қобиғи аминокислота таркибининг қиёсий таҳлили.** Бунинг учун изолятнинг оқсил қобиғи аминокислота таркиби дунёнинг бошқа минтақаларда тарқалган D00344.1 (Netherlands (X3)), M95516.1 ва X88788.1 (UK), KR605395.1 (India), KJ620846.1 (China), AF260641.1 (South Korea), GU384732.1 (Australia) изолятлари билан солиштирилиб, улар орасида аминокислота сони ва таркиби жиҳитдан фарқлар мавжудлиги аниқланди. Жумладан, мамлакатимиздан ажратилган изоляти оқсил қобиғининг умумий 236 аминокислотадан иборатлиги ва D00344.1 изолятидан Ser, Thr, Asp, Iso, Val – каби аминокислоталар сони жиҳатдан тафовут қилиши аниқланди.

**ХУЛОСАЛАР:**

“Kартошка Х вирусининг Ўзбекистонда тарқалган изолятини ажратиш, хусусиятларини ўрганиш ва унинг диагностикаси” мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар асосида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Диссертация мавзуси бўйича олиб борилган тадқиқотлар асосида КХВнинг бир-биридан фарқ қилувчи хўжайин ўсимликда оддий мозаика аломатини келтириб чиқарувчи “оддий” Хо ва *Datura stramonium* ўсимлигида барг эти некрози аломатини келтириб чиқарувчи “некротик” Хн изолятлари ажратилди, тест-индикатор ўсимликлардаги касаллик аломатлари аниқланди, биологик ва физик-кимёвий хусусиялари асосида идентификация қилинди ҳамда вируснинг хлорофил “а” пигменти миқдорини назоратга (9.96 mg/l) нисбатан 4,4 баравар (2,23 mg/l) ва хлорофилл “b” миқдорини назоратга (5.16 mg/l) нисбатан 2,3 баравар (2,2 mg/l), каротиноид миқдорини эса назоратга (2,24 mg/l) нисбатан (0,42 mg/l) 5,3 баравар камайтириши қайд этилади.
2. КХВн изоляти билан касалланган ва соғлом ўсимликда эрувчан ва ҳужайра девори билан кучсиз боғланган пероксидаза ферменти динамикаси аниқланди, ўтказилган тажрибалар асосида ҳужайра девори билан кучсиз боғланган пероксидаза миқдори соғлом ўсимликдаги 9,75 ммоль/мл ни ташкил этса, вирус билан касалланиш даражасига қараб 7,4-14,0 ммоль/мл гача, эрувчан фермент миқдори эса соғлом ўсимликда 10,85 ммоль/мл ни, касалланган ўсимликда эса 12,5-24,3 ммоль/мл гача ошишини маълум бўлди.
3. Вирус дифференциатор *D. stramonium*  ўсимлиги ёрдамида хўжайин ўсимликдан ажратилиб, *G. globosa* ўсимлиги ёрдамида мононекроздан ўтказиш орқали биологик тозаланди ва тўпловчи *Nicotiana barley* ўсимлигида максимал кўпайтириб олинди ҳамда гельфильтрация қилиш орқали тозаланган препарати олинди, препарат нур ютишининг максимал даражаси 260 нм ни, минимали эса 245 нм ни, 260/280 нисбати эса 1,2 ни, яъни спиралл симметрия асосида тузилган вирусларга хос эканлигини намоён қилади.
4. Гомоген вирус препарати асосида КХВн изолятига специфик поликлонал АТ тутувчи зардоб тайёрланди, тайёрланган зардобнинг титри 1:32 ни ташкил этди ҳамда олинган зардоб ИИД, ИФТ каби усулларда ишлатилиб, вирус билан кучсиз касалланувчи Курадо, Кондор каби амалий чидамли; Вирго, Невский, Пикассо ва Сарнов каби кучсиз касалланувчи навлар аниқланди ва селекционерларга вирусга чидамли навлар яратиш учун тавсия этилди.
5. НЦМда иммуноблотинг усули ёрдамида 16 оилага мансуб 32 тур ўсимликлар текширилиб, вируснинг олабута (*Atriplex micrantha* C.A.Mey), итузум (*Solanum nigrum*), думбил шўра (*Ch. murale),* оддий шўра *(Ch. quonea*), ёввойи гултожихўроз *(Amaranthus retrofflexus),* бургон шувоғи *(Artemisia annua),* эрмон шувоғи *(Artemisia vulgaris),* дала рангўти (*Sinapis arvensis* L.), хaртол карами (*Brassica juncea* (L) Czern) каби ИФТ сезгирлигидан четда қолган вируснинг янги табиий резерватор ўсимликлари қайд этилади.
6. КХВнинг оқсил қобиғи синтезига жавобгар гени асосида помидор, картошка ва дўрмон ўсимликларидан олинган табиий намуналардан ҚT-ПЗР усули ёрдамида вирус изолятларининг диагностикаси амалга оширилди.
7. Ўзбекистон иқлим шароитида ажратилган КХВн изоляти *ORFs5* гени нуклеотид кетма-кетлиги билан D00344.1 97.48%, [AY297843.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297843.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=XFNWE2E9014), [AY297842.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297842.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=XFNWE2E9014), [M95516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M95516.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=5&RID=XFNWE2E9014) каби Европа изолятлари ҳамда Австралиядан ажратилган GU384732.1 изоляти билан 97.06% гомологлиги аниқланган бўлса, филогенетик таҳлиллар асосида эса D00344.1 изоляти билан яқин ва битта шажара шохида жойлашганлиги унинг Европа изолятидан келиб чиққанлиги ҳамда мамлакатимиз иқлим шароитига тушгандан сўнг маълум ўзгаришга учраганлиги қайд этилди ва ушбу изолят MN702769 рақам билан PVXUZ изоляти сифатида NCBI базасига жойлаштирилиши билан изоҳланади.
8. КХВн изолятининг оқсил қобиғи аминокислота таркиби бўйича 97,48% гомологияга эга бўлган ва филогенетик шажара дарахтида битта шохда жойлашган аждоди(X3) D00344.1 изолятидан Ser, Thr, Asp, Iso, Val – каби аминокислоталар сони жиҳатидан тафовут қилиши қайд этилади.

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

**ЧИРЧИКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ТАШКЕНТСКОЙ ОБЛАСТИ**

**ФАЙЗИЕВ ВОХИД БАХРАМОВИЧ**

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗОЛЯТА Х ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ, РАСПРОСТРАНЁННОГО В УЗБЕКИСТАНЕ, ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И ЕГО ДИАГНОСТИКА**

**03.00.04 – Микробиология и вирусология**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА НАУК (DSc)**

**ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

**Ташкент – 2020**

**Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2019.2.DSc/B95.**

Диссертация выполнена в Чирчикском педагогическом институте Ташкентской области

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета ([microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz)) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» ([www.ziyonet.uz](http://www.ziyonet.uz)).

|  |  |
| --- | --- |
| **Научный консультант:** | **Вахабов Абдурасул Хакимович**  доктор биологических наук, професс |
| **Официальные оппоненты:** | **Хасанов Ботир Ачилович**  доктор биологических наук, профессор  **Кодирова Гульчехра Хакимовна**  доктор биологических наук  **Маматқулов Иброхим Хомидович**  доктор медицинских наук, профессор |
| **Ведущая организация:** | **Институт генетики и экпериментальная биология растериий** |

Защита диссертации состоится «...» декабрь 2020 года в «1000» часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.12.2019.В.38.01при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 7б, конференц-зал Института микробиологии, 3 этаж Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, 246-02-24, e-mail: [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz).

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

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2020 года.

(реестр протокола рассылки № \_\_\_\_ от « \_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2020 года)

|  |
| --- |
| **Т.Ф. Арипов** |
| Председатель Научного совета по присуждению  ученых степеней, д.б.н., академик |
| **Р.Н. Жўраева** |
| Ученый секретарь Научного совета по присуждению  ученых степеней, к.б.н., старший научный сотрудник |
| **Т.Г. Гулямова** |
| Председатель Научного семинара при Научном совете  по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор |

**ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора наук (DSc))**

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** В настоящее время изучен ряд фитопатогенных вирусов, поражающих сельскохозяйственные растения, которые влияют на количество и качество выращенной продукции и приносят большой экономический ущерб. Во всем мире этот показатель составляет 60 млрд. долларов США. Как известно наиболее проблемный комплекс фитопатогенов, представляют вирусные болезни картофеля при выращивании семенного картофеля всех категорий. Картофель относится к культурам, сильно поражаемым вирусными болезнями. Растения картофеля подвергаются поражению более чем 50 видами фитопатогенных вирусов и в зависимости от вида вируса их урожайность снижается от 10 до 87%[[4]](#footnote-4). В связи с этим, проведение исследований по изучению и разработке мер борьбы против вирусов, поражающих растения картофеля имеет большое значение.

В последние десятилетие мировыми учеными ведутся широкомасштабные исследования по изучению таких вирусов картофеля как L (PLRV), -Y (PVY), - X (PVX), - S (PVS), - M (PVM), - A (PVA) и уменьшению наносимого ущерба и разработке мер борьбы против них. В рамках этих исследований проводится изучение молекулярно-генетических свойств вирусов, филогенетический анализ, получение очищенного препарата, приготовление сыворотки для диагностики вируса, выделение иммуноглобулинов из сыворотки, оптимизация методов очистки, влияние вируса на некоторые физиологические свойства растений, определение механизмов экспрессии генов устойчивости к инфекциям, а также усовершенствование мер борьбы против вируса.

В настоящее время в нашей Республике проводится ряд исследований по разработке эффективных мер по защите сельскохозяйственных растений от различных заболеваний и вредителей, выявлению и определению фитопатогенных вирусов, изучению их свойств. В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан определены задачи направленные на «….интенсивное развитие производительности сельского хозяйства, укрепление продовольственной безопасности республики, обеспечение населения качественными продуктами питания, увеличение объема производства фруктов-овощей, картофеля и винограда, предотврашение увеличения их стоимости на внутреннем рынке, увеличение экспорта аграрного сектора; внедрение новых сортов сельскохозяйственных культур устойчивых к заболеваниям и вредителям, адаптированным к местным экологическим условиям»[[5]](#footnote-5). Исходя из этих задач проведение исследований по изучению фитопатогенных вирусов, наносящих большой ущерб урожайности важных сельскохозяйственных культур является актуальной.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит решению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан № УП-4947 от 7 февраля 2017 года “О Стратегия действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан”, в Указе Президента Республики Узбекистан № УП-5394 от 29 октября 2018 года “Дополнительные меры усовершенствования сферы сельского хозяйства”, в Решении Совета министров Республики Узбекистан (УП-3249), принятое 30-августа 2017 года “О создании структуры государственной инспекции карантина растений”, а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

**Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики.** Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий Республики V. “Сельское хозяйство, биотехнология, экология и защита окружающей среды”.

**Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации[[6]](#footnote-6).**

Научные исследования, направленные на поиск новых растительных вирусов, их свойств, характеристик и мер борьбы против них осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, в Potato Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada (Канада), Department of Plant Pathology, Cornell University (США), Department of Plant and Wildlife Sciences, Brigham Young University (США), University of Minnesota (США), Seul national university (Koрея), Biomedical Research Center, Institute of Virology (Словакия), Engelhardt Institute of Molecular Biology (Россия), Московском государственном университете (Россия), Дальневосточном биолого-почвенном институте ДВО РАН (Россия), в Национальном университете Узбекистана, а также Чирчикском педагогическом институте Ташкентской области (Узбекистан).

В результате исследований, проведенных мировыми исследователями по выявлению вирусов картофеля, изучению взаимоотношения вирусов с организмом хозяина, разработке мер борьбы, идентификации и диагностики получен ряд научных результатов, в частности: определены механизмы генетической устойчивости сортов картофеля к вирусным инфекциям (James Hutton Institute, Scotland); выявлена молекулярная диагностика вирусов картофеля (Department of Plant and Wildlife Sciences, Brigham Young University, США); изучено филогенетическое дерево ХВК и его штаммов (Centre of Excellence in Molekulyar Biology, Slovenija); определена диагностика ХВК на основе белковой оболочки (Institute of Biochemistry and Biotexnology, Pakistan); изучен геном ХВК (Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, МГУ, Россия); определена иммунодиагностика вирусов картофеля (Дальневосточный биолого-почвенный институт ДВО РАН, Россия); изучены естественные растения-резерваторы вирусов картофеля (Национальный университете Узбекистана, Узбекистан);.

В мировом масштабе проводятся научные исследования в следующих направлениях по предотврашению распространения фитопатогенных вирусов и усовершенствованию мер борьбы против них таких как: определение гена устойчивости растений к вирусам и картирование; создание векторной конструкции для трансформации генов; создание сортов на основе трансформации генов устойчивости; определение физиологических основ устойчивости; разработка чувствительных, высокоскоростных и современных методов диагностики вирусов, внедрение которых решит проблему снижения урожайности картофеля.

**Степень изученности проблемы**. До сегодняшнего дня, ведутся фундаментальные исследования по изучению различных свойств и идентификации вирусов картофеля зарубежными учеными, такими как M.J.Huisman (1988), S.Y. Kagiwada (2002), T.Yokota (2003), H.Вostan (2004), F.Rashid (1989), B.A. Cox (2010), N.Ahmad (2011), K. Tamura (2007), G.Abbas (2012), J.M. Cuevas (2012), B Mandal (2012) и многие другие.

Ученые стран СНГ в МГУ под руководством академика И.Г. Атабекова С.Ю. Морозова (2001), О.Карпова (2006), Р.В. Гнутова (2011) Т.С. Фоминых(2017) и другие проводили исследования по изучению строения ХВК, свойств, экологии, штаммов, иммунодиагностике и молекулярно-генетическим свойствам; В.И. Малиновский (2010) изучил влияния вируса на физиологию растений и механизма защиты от инфекций; М.Р. Шариповой (2013) определены белки обеспечивающие устойчивость растений к инфекциям.

В нашей стране исследования по изучению вируса растений Узбекистана проводились Ю.И. Власовым (1960); изучение различных фитопатогенных вирусов, распространённых в климатических условиях Узбекистана изучал А.Х. Вахабов (1964); получение безвирусного картофеля в инфекционном фоне с X и S-вирусами картофеля - В. Мирзахмедовым (1964); выделение вируса карликовости кукурузы, изучение свойств и диагностику - К.С. Даврановым (1984); изучение некоторые особенности L-вируса и селекция сортов картофеля - И.Т. Эргашевым (2007); изучение вирусов поражающих растения семейства капустных - Кадировым З.Н. (2019), изучение влияния вирусной инфекции на некоторые физиологические свойства растений - Хусановым Т.С. (2019). Однако мало исследований по определению молекулярно-генетических свойств вирусов картофеля, разработке методов диагностики и определению устойчивых сортов к вирусу.

**Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена работа.** Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ Национального университета Узбекистана Международного научного проекта CIP (Centre Internatilonal Potato) «Увеличение продуктивности и качества продукта, а также прибыли путем повышения устойчивости к абиотическим и биотическим факторам путем клонирования сортов картофеля Южно-восточной и Центральной Азии» (2011-2013).

**Целью исследования** является выделение изолята Х-вируса картофеля, распространённого в нашей Республике, влияние на некоторые физиологические свойства растений и идентификация молекулярно-генетическим методом.

**Задачи исследований:**

выделение ХВКн, определение биологических свойств, идентификация, а также изучение влияния вируса на некоторые физиологические свойства растений;

биологическая очистка ХВК от смешанных инфекций, разработка методов приготовления гомогенного чистого препарата;

приготовление поликлональной сыворотки к вирусу и изучение его иммунохимических свойств, а также применение в диагностике вирусов;

определение некоторых свойств вируса с помощью иммунологических методов;

диагностика изолятов ХВК с методом RT-PCR из различных естественных образцах;

молекулярно-генетическая идентификация на основе *ORFs5* гена изолята ХВКн,выделенного в климатических условиях Узбекистана и проведение филогенетического анализа;

определение сходства и различий ХВКн с другими раннее выделенными изолятами путём сравнительного анализа аминокислотного состава.

**Объектом исследования** являлись Х вирус картофеля, поражающий растение картофель и другие сельскохозяйственные растения в климатических условиях Узбекистана.

**Предметом исследования являются**: свойства изолятов вируса; влияния на физиологические свойства растений; динамика фермента пероксидазы в инфекционном процессе; влияние на количество пигмента хлорофилла в листьях растений; разработка способов получения чистого препарата вируса; сыворотка и специфичные антитела, молекулярно-генетическая идентификация вируса; *ОRFs*5 гена и его секвенс, определяется филогенетическое дерево.

Методы исследования. В экспериментах использовались современные методы фитовирусологии и биотехнологии (ИФА), RT-PCR, выделения и очистки фитовирусов, метод растений-индикаторов, двойной диффузии, электронного микроскопирования, спектрофотометрии и другие.

**Научная новизна исследования** заключается в следующем:

впервые выделен некротический изолят ХВКн, распространённый в Узбекистане, определен его *ORFs5* ген, проведен филогенетический анализ и сравнён аминокислотный состав белка, который синтезируется на основе этого гена с другими изолятами, проведён сравнительный анализ и молекулярно-генетическим методом определена эволюция вируса;

обосновано по отношению к контролю уменьшение количество хлорофилла «а» в 4,4 раза, хлорофилла «b» в 2,3 раза, каротиноида в 5,3 раза в зависимости от степени поражаемости изолятом ХВКн;

методом иммуноблотинга на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ) перепроверен ряд растений, среди них определены новые естественные растения-резерваторы, которые в первичных исследованиях не дали определенных результатов ИФА. К таким растениям относятся лебеда (*Atriplex micrantha* C.A.Mey), паслён чёрный (*Solanum nigrum*), марь постенная (*Ch. murale),* марь *(Ch. quonea*), амарант запрокинутый *(Amaranthus retrofflexus),* полынь однолетняя *(Artemisia annua),* полынь обыкновенная *(Artemisia vulgaris),* горчица полевая (*Sinapis arvensis* L.), горчица сарептская (*Brassica juncea* (L) Czern);

на основе изучения сохранения вируса в составе клубней и органах культурных растений по связи c естественными очагами установлено, что вирус относится ко второй группе, то есть «к естественно очаговым заболеваниям, имеющим стойкую циркуляцию среди культурных растений»;

впервые выделен Хн изолят ХВК, распространённый в республике, определены биологические и физико-химические свойства, получен чистый вирусный препарат методом гельфильтрации в TSK геле и усовершенствован метод приготовления специфической сыворотка к вирусу;

путём сравнительного исследование клеточних сок здоровых и инфицированных растений с вирусом, определена динамика активности фермента пероксидазы растений в инфекционном процессе.

**Практические результаты исследований** заключаются в следующем:

разработана рекомендация по диагностике вирусов картофеля иммунологическими методами;

установлен вид естественного очага и циркуляция вируса в климатических условиях Узбекистана;

проведена идентификация вируса с помощью RT-PCR и определены его некоторые молекулярно-генетические свойства;

приготовлена специфическая сыворотка, содержащая поликлональные антитела для диагностики вируса;

установлены ряд естественных растений-резерваторов, которые участвуют в сохранении и распространении вируса в природе;

разработаны научно-обоснованные практические рекомендации для предупреждения распространения вирусов картофеля, уменьшения вредоносности и эффективные меры борьбы.

**Достоверность результатов исследования** подтверждается тем, что они получены с применением современных фитовирусологических и биотехнологических методов исследований. Интервал средних значений, полученных в контроле и опытах, вычислялся с помощью t-теста Стьюдента, статистическая достоверность интервала значений выражалась на уровне *Р<0,05*, анализ результатов и начертание графиков проводили с помощью компьютерных программ (Biostat, 2007; Statistica 5,5; Microsoft Office Excel, 2003; Microsoft, USA Origon Pro B 9,4, 2014, MEGA6, BALASTn). Достоверность полученных результатов подтверждается их обсуждением на республиканских и международных конференциях и публикацией результатов в научных рецензируемых изданиях.

**Научная и практическая значимость результатов исследований**. Научная значимость результатов исследования заключается в разработке путей выделения, очистки и получения специфической сыворотки. Полученная сыворотка применена в методах иммуноболотинга на НЦМ, ИФА и РДД, и с помощью этих методов установлены вирусоустойчивые сорта и естественные растения-резерваторы, распространённые в климатических условиях нашей республики, установлена степень распространённости Х и У вирусов картофеля в районах Ташкентской области.

Определена естественная циркуляция, а также тип «естественного очага» вируса в природе. Это в свою очередь является очень важным при разработке мер борьбы против вируса. Изучена динамика фермента пероксидазы в здоровых и поражённых вирусом растениях, это может послужить физиологической основой повышения устойчивости растений к вирусу. Выделен «некротический» изолят вируса, распространённого в Узбекистане, проведена молекулярно-генетическая идентификация и филогенетический анализ на основе *ОRFs5* гена, нуклеотидная последовательность полученного генома размещена на NCBI базе, что может послужить для сравнения научных исследований, проводимых в этом направлении.

**Внедрение результатов исследования.** На основе проведенных научных исследований и полученных результатов по изучению свойств и проведении диагностики изолята ХВК, распространённого в Узбекистане:

Изолят «ХВК-Уз» передан генофонду коллекции редких объектов «Фитопатогенные и другие микроорганизмы» Института Генетики экспериментальной биологии растений (Справка № 4/1255-3019 Академии наук Республики Узбекистан от 13 ноября 2019 года). В результате это дало возможность обогатить генофонд коллекции штаммов фитопатогенных микроорганизмов, формировать информационно-аналитическую систему электронной базы разнообразий вирусных видов;

выделеный изолят ХВК-уз (*Potato virus* X) из пораженного растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) прошёл регистрацию в национальной коллекции патогенных микроорганизмов в центре сведений мировых микроорганизмов (World Data Center for Microorganism (WDCM) National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM)) под номером-915 WDCM (уведомление №4/1255-3019 от 13 ноября 2019 года академии наук Республики Узбекистан). В результате это дало возможность глобально использовать в исследованиях «Х вирус картофеля», распространенного в различных регионах мира;

специальная сыворотка, приготовленная для вируса, внедрена на 78,6 га картофельных полей на фермерских хозяйствах «Флора» Кибрайского района, «Хисорак-Чаткал» Паркентского района, «Мурод агро-плюс» Ташкентского района Ташкентской области (Справка № 02/025-4226 Министерства Сельского хозяйства Республики Узбекистан от 7 декабря 2020 года). В результате предпосевная сортировка семенного картофеля была эффективно использована для мониторинга заболеваемости в течение вегетационного периода и позволила повысить урожайность картофеля;

внедрение метода иммуноблоттинга для вирусологического контроля картофельных полей и окружающих растений в Кибрайском и Паркентском районах Ташкентской области (Справка 02/025-4226 от 7 декабря 2020 года Министерство сельского хозяйства Республики Узбекистан). В результате, раннее обнаружение растений-переносчиков вируса, произрастающих на этих территориях, позволило принять фитосанитарные меры.

**Апробация результатов исследования.** Результаты данного исследования были обсуждены на 10 международных и 22 республиканских научно-практических конференциях.

**Опубликованность результатов исследования.**  По теме диссертации опубликовано 32 научные работы, из них 12 научных статей, в том числе 9 в республиканских и 3 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

**Структура и объем диссертации.** Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, выводов, заключения и списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 194 страниц.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Во введении** обоснована актуальность и востребованность проведения исследования, цель и задачи исследования диссертационной работы, дана характеристика объекта и предмета, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики, описана научная новизна и практическая ценность работы, раскрыта научная и практическая значимость полученных результатов, приведены сведения о практическом внедрении результатов исследования, сведения об опубликованных работах и струкруре диссертации.

В первой главе диссертации **«Вирусы растений и экологические факторы, влияющие на них»** приведен анализ современного состояния исследований по вирусам, поражающих растения картофеля, их систематическое место, характеристика фитопатогенных вирусов, относящиеся к семейству *Potexvirus,* эпифитотиях вируса и факторы, влияющие на них, внешние факторы среды, оказывающие действие на сохранение вируса, резерваторы вирусов картофеля, а также сведения о мероприятиях предотвращения вирусных эпифитотий и путях защиты растений от инфекций.

В последние годы по сведениям авторов, проводящих исследования по вирусам, поражающих растения картофеля, на сегодняшний день их насчитывается около 50-ти видов. Однако их количество может быть еще больше, что требует глубокого и всестороннего изучения различных свойств вирусов. А полученные результаты послужат основой для разработки мер борьбы против вирусных заболеваний.

В второй главе диссертации **“Выделение вирусов картофеля, получение чистого вирусного препарата, приготовление специфической антисыворотки и разработка методов диагностики”** приведены данные о получении чистого вирусного препарата и его характеристика, биологическая очистка при смешанной инфекции и его значение, физико-химические методы очистки, получение чистого вирусного препарата ХВК, требования, предявляемые к чистым вирусным препаратам, иммунологические методы, используемые в диагностике фитовирусов и степени их чувствительности, метод иммуноферментного анализа, его классификация, применение, а также молекулярно-генетические методы, широко и успешно применяемые в фитовирусологии, степень применения в диагностике вирусов.

В третьей главе “**Материалы и методы, использованные в исследованиях”** охарактеризованы материалы, реактивы и методы применённые в ходе выполнения диссертации. Описаны: метод механического заражения растений, определение распространённости и степени вредоносности вируса, биологическая очистка Х вируса картофеля, физико-химические методы получения чистого препарата, приготовление специфической антисыворотки к вирусу и изучение его иммунохимических свойств, сравнительный анализ иммунохимических методов, спектрофотометрический анализ чистого вирусного препарата, получение микрофотографии вириона электронномикроскопическим методом, диагностика вируса методом ИФА, выделение и изучение свойств пероксидазы растений, определение влияния экологических факторов на вирусы картофеля, изучение ХВК с помощью ПЦР и методы его анализа.

В четвертой главе **«Выделение Х вируса картофеля, изучение свойств, получение чистого препарата и приготовление специфической сыворотки»** приведены результаты по изучению биологических свойств вируса, воздействие его на некоторые физиологические свойства растений, идентификация изолятов вируса, определение естественной циркуляции и «естественного очага», выделение и получение чистого препарата вируса, приготовление специфической сыворотки, изучение его иммунохимических свойств и применение полученной сыворотки.

**Изучение симптомов поражения «некротического» изолята ХВК на тест индикаторных растениях**. В исследованиях, проводимых по изучению ХВК из растений картофеля сорта Умид, который проявляет чёрную системную мозаику, выделен «некротический» изолят (ХВКн) и изучены его свойства в сравнительном аспекте с «обычным» изолятом, выделенным в первичных исследованиях из сорта Диёра, проявляющий симптомы крапчатой мозаики на картофеле. В результате исследований установлено, что они являются отдельными изолятами, которые отличаются друг от друга по проявлению симптомов на растениях-хозяевах. Для выяснения этого механически заражены тест-индикаторные растения, использованные в первичных исследованиях, относящиеся к 16 видам, 5 семействам, выращенные в лабораторных условиях и полевых опытных полях. Изучены сходство и различия в сроках проявления симптомов, а также проявленные характерные признаки.

Изолят вируса, выделенного из сорта картофеля Диёра, проявляет различные симптомы: на растениях семейства *Chenopodiaceae* - *Chеnopodium quinoa, Ch. amaranticolor* и *Ch. murale,* отличающиеся друг от друга желтые хлоротические пятна*,* на *Datura stramonium* семейства *Solanaceae* крапчатую мозаику, *D. metel и Lycopersicum esculentum* Millзелёную мозаику, на *Gоmphrena globosa* семейства *Amaranthus* красный кольцевой некроз. Изолят ХВКн, в отличие от изолята ХВКо, на растении *Ch. murale* проявлял жёлтые некротические пятна, на растении *D. stramonium -* некротизацию листовой пластинки и замедление роста растения. Симптомы поражения на других тест- индикаторных растениях приведены в таблице 1.

**Таблица 1**

**Симптомы вирусного поражения на тест-индикаторных растениях**

**изолятов ХВК**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название семейства и вида индикаторных растений | Изоляты ХВК | | | |
| \*ХВКо | | \*\*ХВКн | |
| Симптомы заболевания | Сроки появления | Симптомы заболевания | Сроки появления |
| Марьевые *(Chenopodiaceae)*  Марь (*Chenopodium quinoa*)  Марь (*Ch. amaranticolor*)  Марь (*Ch. murale* L*.*)  Мар белый (*Ch. album* L*.*)  Паслёновые (*Solanaceae*)  Дурман *(Datura stramonium)*  Белена *(D. metel* L*.)*  Физалис *(Phisalis floridana* L*.)*  Табак, сорт *N. barley*  Табак сорт *N. rustica*  Петуния *(Рetunia hybrida)*  Помидор *( L. esculentum* Mill*.)*  Баклажон *(S. melon-gena* L*.)*  Балгарский перец (*C. annum*)  Бобовые *(Leguminosae)*  Вигна чёрноглаз *(Vigna sinensis)*  Яснотковые *(Labiatae)*  Базилик *(Ocimum basilicum* L*.)*  Амарантовые (*Amaranthus*)  *Gоmphrena globosa* | ХП  ХП  ХП  -  КМ  ЗМ  -  СМ  -  -  ЗМ  -  М  -  -  ККН | 13-14  10-12  6-7  -  10-12  18-20  -  20-22  -  -  10-15  -  10-12  -  -  5-6 | ХП  ХП  ЖН  -  Н  -  -  ЗМ  Н  -  ББ, ЗМ  -  КМ  -  -  КН | 10-12  8-10  5-6  -  8-10  -  -  18-20  14-16  -  6-8  -  8-10  -  -  5-6 |

**Примечание:** симптомы заболевания означают: ХП – хлоротические пятна, КМ – крапчатая мозаика, ЗМ – зелёная мозаика, СМ - системная мозаика, М – мозаика, ККН – красный кольцевидный некроз, ЖН – желтый некроз, Н – некроз, КН – крупный некроз; “\*” – означает “обычный” штамм вируса выделенного из сорта Диёра, “\*\*” – означает “некротический” штамм, выделенный из сорта Умид.

Установлено, что изолят ХВКн вируса, в отличие от изолята ХВКо, на табаке сорта *N. barley* проявляет зелёную мозаику, на сорте *N.rustica -* некротические пятна, на растении *Cарsicum annum -* крапчатую мозаику. У обоих изолятов на растениях *Ch. аlbum* семейства *Chenopodiaceae*, на *Phisalis floridana*, *Рetunia hybrida*, *Sоlanum melon-gena*, *Capsicum annum* семейства *Solanaceae*, на *Vigna sinensis* семейства *Leguminosae* и на *O. basilicum* семейства *Labiatae* не были онаружены симптомы вирусного поражения (табл.1).

Таким образом, в результате проведенных исследований идентифицированы с помощью тест-индикаторных растений и изучены распространённые в климатических условиях нашей Республики “некротический” изолят ХВКн, который на картофеле сорта Умид проявляет системную черную мозаику, на растениях *Dаtura stramonium, Ch. murale, Gоmphrena globosa* крупные некротические поражения и “обычный” изолят ХВКо, который на картофеле сорта Диёра проявляет симптомы крапчатой мозаики, на *Dаtura stramonium* обычную системную мозаику.

**Определение влияния вируса на фотосинтетический аппарат растения.** Фитопатогенные вирусы также, как и другие патогенные организмы, после проникновения в организм хозяина влияют на некоторые физиологические процессы, изменяют эти процессы и вынуждают клетку растения синтезировать необходимые части для самого вируса. Поэтому, цель исследований заключалась в изучении влияния вируса на некоторые физиологические свойства растения, то есть, влияние на пигменты хлорофилла и каротиноида, обеспечивающие фотосинтетические процессы. Для этого изучено влияние ХВКн изолята на количество “а” и “b**”** хлорофиллов и каротиноидов листьев растений *Dаtura stramonium* (табл. 2).

Таблица 2

**Изменение количества пигмента на листьях растения *D. stramonium* при различных процентах поражения вирусом**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Варианты** | **Длина волны** | | | **Ca, mg/l** | **Cb, mg/l** | **Ckar, mg/l** |
| **D664, nm** | **D649, nm** | **D470, nm** |
| Контроль\* | 0,925 | 0,462 | 0,993 | 9,96 ±0,06 | 5,16±0,04 | 2,24±0,06 |
| Слабо пораженный | 0,280 | 0,165 | 0,319 | 2,88±0,04 | 2,25±0,07 | 0,44±0,03 |
| Средне пораженный | 0,272 | 0,160 | 0,303 | 2,80±0,07 | 2,18±0,03 | 0,40±0,01 |
| Сильно  пораженный | 0,268 | 0,490 | 0,306 | 1,03±0,10 | 2,21±0,09 | 0,42±0,02 |

**Примечение:** р≤0,05 – достоверно по отношение к контролю, \*-контролем считается здоровое растение.

Из данных таблицы видно, что на листьях растения *Dаtura stramonium*, слабо и средне пораженного вирусом, количество хлорофилла «а» по отношению к контролю уменьшалось в 4 раза и составляло 2,80-2,88 мг/л, на листьях сильно пораженных растений количество уменьшалось в 9 раз и составило 1,03 мг/л. Количество хлорофилла “b**”** по отношению к контролю уменьшалось в 2 раза (в контроле оно составляет 5,16 мг/л), в опытных вариантах, пораженных в различной степени вирусом количество хлорофилла “b**”** близко и составляет 2,18-2,25 мг/л (табл.2). Количество каротиноидов в здоровых растениях составляет 2,24 мг/л, тогда как в растениях с различной степенью поражения вирусом уровень каротиноидов снижается более чем в 4 раза - 0,40-0,44 мг/л (табл.2).

Также определено количество хлорофиллов “а”, “b”и каротиноидов в сухой массе растения, данные представлены в таблице 3. В ходе исследований установлено, что количество хлофилла “а” в сухой массе здорового растения составляет 4,98-5,00 мг/л, в слабо и средне пораженных вирусом растениях составляло 1,41-1,44 мг/л, в сильно поражённых растениях – 0,53 мг/л. Количество хлорофилла “b”в контроле составляет 2,65 мг/л, в различной степени поражённых вирусом растениях по отношению к контролю оно уменьшалось в 2 раза и составляло 1,09-1,16 мг/л. Количество каротиноида в контроле составляет 1,15 мг/л, в растениях, поражённых в различной степени вирусом, его количество почти одинаково -0,20-0,24 мг/л.

На основании полученных данных определено соотношение хлорофилла “а” по отношению хлорофилла “b”.Этот показательв листьях здоровых растений составил 1:1,93, в листьях слабо и средне поражённых растений 1:1,28, а в листьях сильно поражённых растений 1:2,14 (табл.3).

Таблица 3

**Изменение количества хлорофилла и каротиноида**

**в сухом весе листьев растений**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Варианты | Количество пигмента в сухой массе листьев растений, mg/g | | | Соотношение хлорофилла “а”  к хлорофиллу  “b” |
| Хлорофилл “а” | Хлорофилл “b” | Каротиноид |
| Контроль\* | 5,00±0,08 | 2,65±0,10 | 1,15±0,03 | 1:1,93 |
| Слабо пораженный | 1,41±0,05 | 1,16±0,09 | 0,24±0,02 | 1:1,28 |
| Средне пораженный | 1,44±0,03 | 1,14±0,04 | 0,23±0,01 | 1:1,28 |
| Сильно  пораженный | 0,53±0,07 | 1,09±0,06 | 0,20±0,01 | 1:2,14 |

**Примечение:** р≤0,05 – достоверно по отношение к контролю, \*- в качестве контроля брали пробы из листьев здоровых растений.

На основании анализа полученных данных установлено, что изолят ХВКн, влияя на фотосинтетическую систему растения *Dаtura stramonium*, в зависимости от степени поражения, уменьшает количество хлорофилла “а” по отношению к контролю (9,96 мг/л) в среднем в 4,4 раза (2,23мг/л), хлорофилл “b” по отношению к контролю (5,16 мг/л) в среднем в 2,3 раза (2,2мг/л), а количество каротиноида по отношению к контролю (2,24 мг/л) в 5,3 раза (0,42 мг/л).

**Изучение динамики изменения концетрации фермента пероксидазы в здоровых и заражённых ХВК растениях**. В последние годы появляются работы, в которых авторы предлагают использовать различные ферменты, в том числе пероксидазы, как диагностический признак для оценки степени устойчивости растений к действию стрессовых факторов.По мнению Газарян И.Г. (2006), Витякина В.О. (2012) и многих других авторов, изучавших пероксидазу растений, в клетках растений пероксидаза слабо связана с клеточной стенкой и встречаются ее растворимые формы. Малиновский В.И. (2010), Шарипов М.Р. (2013) и другие учёные считают, что *PR-*белки (*Pathogenesis- Related protein*) пероксидазы относятся к группе *PR*-9-белков и в различных стрессовых условиях их количество может меняться. Поэтому в дальнейших исследованиях были изучены изменения количества пероксидазы в растениях, в различной степени поражённых вирусом. Для этого изучали динамику развития пероксидазы в растении *D. stramonium,*которое после механического заражения ХВК проявляло различную степень поражения.

Из рисунка видно, что по сравнению с контролем в слабо поражённом растении количество растворимой пероксидазы увеличивается и составляет 21,0 ммоль/мл, в средне поражённом растении составляет 12,5 ммоль/мл, а в сильно поражённом растении 24,0 ммоль/мл. Установлено, что активность фермента, слабо связанного с клеточной стенкой в здоровом растении составила 9,75 ммоль/мл, слабо поражённом 14,0 ммоль/мл, средне поражённом 8,0 ммоль/мл, а в сильно поражённом растении количество фермента уменьшалось в 2 раза и составляет 7,4 ммоль/мл. (рис.1).

**Рис.1. Активность фермента пероксидазы растения *D. stramonium***, **пораженного ХВКн**

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что концентрация растворимой формы пероксидазы в здоровых растениях и на начальных стадиях поражения вирусом высокая, а в последующих стадиях его концентрация снижается, тогда как концентрация связанной с клеточной стенкой формы увеличивается. Это приводит к нарушению физиологических процессов в вегетативных органах растения, пораженного вирусом.

**Определение штаммовых свойств изолята ХКВн**. Одним из важных задач является изучение штаммовых свойств изолята, распространенного в климатических условиях республики. В связи с этим изучены биологические свойства как симптомы штаммов вирусов, проявляющиеся на тест индикаторных растениях. В последующих исследованиях изучены инфекционность, конечная концентрация и конечная точка тепловой инактивации выделенного изолята (табл.4).

В настоящее время исследователями выделены многие штаммы вируса: «Х-суровий» (Хс)– выделен в Казахстане из сорта картофеля Дарунок Батькивщина, «Х-киевский» (Хк) – выделен в Киевской области из сорта Раннаяя роза, «Х-польский» (Хп) – выделен в Польше из Прикульский, «Х-херсонский» (Хх) – выделен в Херсонской области, «Х-размятий» (Хр) – из сорта Берлихенген совместно Московец, Шелудко и Козаром. Среди этих штаммов самыми инфекционными считаются Хси Хп штаммы, они на *Dаtura stramonium,* которыебыстро проявляют системное поражение. Нами изучены ПР и *ТТИ* ХоиХн изолятов, распространённых в климатических условиях Узбекистана (табл.4). Из таблицы видно, что ТТИ Хо изолята составляет 70°С, Хн-72°С, ПР обоих изолятов составляет 10-5.

Таблица 4

**Основные свойства изолятов ХВК**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Изоляты** | **ТТИ, °С** | **ПР** | **инфекционность** |
| Хп  Хс  Хх  Хр  Хо\* | 69  70  71  75  70 | 10-5  10-6  10-6  10-7  10-5 | Сильно инфекционный  Средне инфекционный  Средне инфекционный  Слабо инфекционный  Сильно инфекционный |
| Хн\* | 72 | 10-5 | Сильно инфекционный |

**Примечание:"**\***"**- изолят, отмеченный таким знаком, выделен диссертантом в Узбекистане.

По данным Ваyne E.H. (2005), Гнутова Р.В. (2014) и других исследователей штаммы вируса Хх, Хт и Хр в высушенных листьях сохраняются в течение 3 месяцев, в соке растения при комнатной температуре - 2 месяца, в холодильнике (+4°С) до 1 года, а Хп-штамм в высушенных листьях сохраняется в течение 1,5 месяца, в соке, выделенном из растения при комнатной температуре, - до 2 месяцев, в холодильнике (+4°С) до 6 месяцев.

На основании этих данных нами исследованы сроки хранения штаммов вируса на листьях и выделенном соке из растений изолятов Хо и Хн. В результате проведенных наблюдений показано, что сохранение инфекционности вируса определяется на основе проявленных симптомов – некрозов на растении *G. globosa*. Проведенных первичные исследования установили, что вирус, полученный из высушенных листьев растения *Dаtura stramonium,* в комнатной температуре хранится 10-12 дней, при +4°С до 96 дней, при замораживании до 1 года, в инфекционном соке, выделенном из растения, отмечены аналогичные показатели, за исключением хранения в течение 192 дней в замороженном состоянии. Также установлено, что чем дольше хранится вирус, тем меньше его инфекционность.

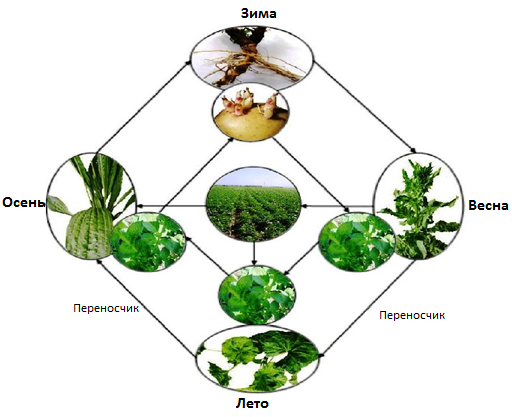
Такие же показатели были получены и у изолята Хн вируса. Результаты проведенных исследований показали, что сроки сохранения инфекционности в соке, выделенном из листьев больного растения, одинаковы с изолятом ХВКо. При хранении в высушенных листьях он сохраняет инфекционность до 4 месяцев, в холодильнике до 6 месяцев, в морозильнике до 2 лет. На основании полученных данных можно считать, что по биологическим свойствам выделенные в республике изоляты ХВКо и ХВКн сравнительно изучены по инфекционности с высоко инфекционным штаммом ХВКп, выделенном из сорта «Прикульский ранний» в Польше. ТТИ этого штамма равна + 69°С, ХВКо - 70°С, ХВКн -72°С, при комнатной температуре ХВКо сохраняет инфекционность в течение 10-12 дней, а ХВКн в высушенном листе хранится до 4 месяцев. В литературе приведены данные о том, что сохранение Хп-штамма в листьях, высушенных при комнатной температуре, составляет 1,5 месяца. У обоих выделенных изолятов ПР было одинокаво и составлял 10-5.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: оба изолята, выделенные в республике имеют высокую инфекционность, по показателям ПР, сходны с ХВКп –штаммом, однако отличаются по ТТИ и сохранении инфекционности при комнатной температуре. Сходство свойств, выделенных изолятов с Европейскими штаммами, свидетельствуют об их происхождении и распространении из одного континента. Это можно объяснить тем, что в последние годы семена клубней картофеля экспортируются из стран Европы.

**Определение циркуляции и типа «естественного очага» ХВК**. Для разработки мер борьбы важным являются сведения о биологических свойствах как естественная циркуляция, типа «естественного очага», источнике сохранения вируса. Для этого методомы ИФА и НЦМ проанализирован ряд дикорастущих и культурных растений вокруг и внутри картофельных полей. Среди них обнаружены естественные резерваторы, которые, не проявляя симптомов вирусного поражения, в скрытом состоянии сохраняют вирус. Полученные данные приведены в рис.2.

Из рисунка видно, что существует 2 цикла круговорота вируса в природе: большой и малый и с помощью этого круговорота вирус обеспечивает свою циркуляцию в природе в течение многих лет. Большой цикл круговорота обеспечивается с помощью естественных растений-резерваторов вируса. В этом случае дикорастущие растения, поражаясь вирусом с помощью переносчиков, сохраняют его в своих органах. В культурных растениях, в том числе в картофеле, вирус, размножаясь в вегетативных органах, переходит в клубни и хранится в них. На следующий год посадка заражённых клубней обеспечивает возвращение вируса в природу. Это малый путь цикла круговорота вируса в природе и он тесно связан с естественными растениями (рис.2).

|  |
| --- |
| **Рис. 2. Схематическое изображение естественной циркуляции ХВК** |

Основываясь теории Ю. Власова о взаимосвязи фитовирусов с “естественными очагами”, стойкий круговорот ХВК в природе обеспечивается в одновременном использовании культурных и дикорастущих растений: в природе существует два типа круговорота вируса - большой и малый. Большой это: дикорастущие растения – резерватор – переносчик - культурное растение - переносчик – дикорастущие растения - резерватор; малый – клубень - культурное растение – переносчик - культурное растение.

Исходя из вышесказанного, по “естественной очаговости” ХВК относится ко вторым “естественно-очаговым заболеваниям, имеющим стойкую циркуляцию среди культурных растений”. В природе присутствует ряд растений-резерваторов, несмотря на это вирус передается от поколения в поколение через клубни и существует тесная связь возбудителя (вируса) с культурными растениями.

**Выделение чистого препарата ХВК и специфической антисыворотки**. Получение специфической АС к изученному изоляту ХВКн требует выделение вируса из растения-хозяина, биологическую очистку при смешанных инфекциях, размножение и получение чистого препарата вируса. Принимая во внимание вышесказанное, разработан метод выделения изолята ХВКн и схема биологической очистки, которая приводится ниже (рис.3).

|  |
| --- |
| Гомогенизация => *D. stramonium => G. glabosa* *=>*  *D. stramonium*  0,02 M ФБ, pH 7-8 (дифференциатор) (мононекроз) (накопитель) |
| ***1-пассаж*** |
| => гомогенизaция => *D. stramonium =>G. glabosa* *=>*  *D. stramonium*  0,02 M ФБ, pH 7-8 (сис. мозаика) (мононекроз) (сис. мозаика) |
| ***2-пассаж*** |
| => гомогенизaция => *D. stramonium => 72°C да 10 дақ.* *=>*  *N. tabacum*  0,02 M ФБ, pH 7-8 (сис. мозаика) (водяная баня) (сис. мозаика) |
| ***3-пассаж*** |

**Рис.3. Схема выделения и биологической очистки ХВК**

В качестве основного естественного источника ХВКн использовали сорт картофеля Умид, первоначальным растением-дифференциатором растения *Dаtura stramonium.* На растении *Dаtura stramonium* вирусное поражение сначала проявлялось в виде некроза, затем перешло в системную мозаику и после этого из неё брали инокулюм и перезаразили растение *G.globosa*. Из проявленных на растении некрозов заново готовили инокулюм и перезаразили растение, перевели вирус в мононекроз и биологически очистили. Кроме этого, для очистки от других вирусов картофеля, инфекционный сок выдерживали 10 минут при +70-72°С и размножили путем перезаражения *Nicotiana tabacum* сорт *barley* (рис.3). Вирусный материал, размноженный в этом растении, собрали в полиэтиленовые пакетики по 250 гр и хранили в морозильнике для выделения чистого вирусного препарата.

Чистый препарат изолята ХВКн получили следующим путём - вирусную пробу гомогенизировали 0,02М ФБ (рН 7,5), клеточные компоненты денатурировали органическими растворителями. Частично очищенный препарат вируса получали низкоскоростным центрифугированием, осаждением 25% сульфатом аммония, затем его очистили гельфильтрацией с применением TSK геля и получили чистый препарат вируса (рис.4).

Гомогенизация

(листья)

Центрифугирование

(20 мин, 5000 об./мин.)

денатурация клеточных компонентов с хлороформом (8:1)

Осадок

Супернатант

Осадок

Осадок растворили в 0,02 М ф.б., центрифугировали (10 мин 6000 об/мин.)

Гельфильтрация

(TSK-75)

Центрифугирование

(5000 об/мин)

Очищенный препарат XВK (150 мг)

В супернатант добавили 25%-ный сульфат аммония,

растворили и хранили при +4°С в течение 1часа

Центрифугирование

(20 мин, 5000 об/мин.)

Супернатант

**Рис.4. Схема получения чистого препарата ХВКн**

Полученный вирусный препарат исследовали на спектрофотометре при 220-320 нм длинах волн. Препарат облучали УФ-лучи min при 245 нм, max при 260 нм, соотношение 260/280 составило 1,2, то есть, показатель, который соответствует вирусам, построенным на основе спиральной симметрии.

Количество выделенного вируса определяли на основе Е2600,1%≈2,8. В первичных исследованиях с помощью модифицированного метода с применением комплексной колонки, состоящей из 3% агара-агара и сефадекса (G-200) из 1 кг вирусного материала получено 135,5 мг чистого вирусного препарата. В последующих исследованиях с применением ТSK-75 геля и увеличением скорости элюции от 35 мл до 50 мл было достигнуто увеличение количества получаемого вирусного препарата до 150 мг.

**Приготовление поликлональной сыворотки вируса и определение иммунохимических свойств**. Приготовление поликлональной сыворотки изолята ХВКн проведены так же как при получении сыворотки к изоляту ХВКо. Для этого очищенный методом гельфильтрации гомогенный вирусный препарат вводили лабораторным кроликам по 4,0 мг/мл внутримышечно в мускулы ног и под лопатку через день 5 раз. Каждый раз в 1,0 мл вирусного препарата добавляли по 1,0 мл адъюванта Фрейнда и осторожно, медленно вводили кроликам. Спустя 14 дней после последней инъекции из ушной вены кролика в первый раз брали 10 мл, через 3 дня снова 10 мл крови, выдерживали в течение 1 суток при комнатной температуре, сыворотку осторожно выливали в центрифужные пробики и для избавления от клеточных компонентов центрифугировали 5 минут при 2000 об/мин, супернатант собирали в пробирку и изучали его иммунохимические свойства. Титр полученной сыворотки к изоляту ХВКo определяли методом РДД, он равен 1:16. В последующих исследованиях была получена сыворотка к изоляту ХКВн , ее титр был равен 1:32 (рис.5).

****

**Примечание:** АГ – сок растениий *Nicotiana barley,* инфицированного с некротического изолята ХВКн, антиген (АГ); С – сыворотка приготовленного для определения некротического изолята ХВК; ПР – предел разведенние.

**Рис. 5. Определение титра сыворотки некротического изолята ХВК с помощью РДД**

Из сыворотки с определенным титром налили по 0,6 мл во флаконы, добавили 1-2 капли хлороформа и хранили в холодильнике при -4°С. Количество полученной сыворотки в первой порции составило 5 мл, во второй 7,5 мл, всего из 20 мл крови получено 12,5 мл сыворотки. Если при ИФА для 1 пробы используется 10 мкл неразбавленной сыворотки, то 100 мкл хватит на 10 проб. 1 мл для исследования 100 проб, 12,5 мл неразбавленной сыворотка хватит для исследования 1250 проб.

В результате исследований приготовлена специфическая АС с высоким титром к изоляту ХВКн. Титр полученной АС составил 1:32, если его развести соответственно титру, его количество составит 62,5 мл, а это даст возможность исследовать 6255 проб на содержание вируса. Далее полученная АС была использована при выявлении циркуляции и естественных растений-резерваторов, а также устойчивых сортов и линий картофеля к вирусу.

**Выявление с помощью иммунологических методов степени устойчивости различных сортов и линий к ХВК.** Собранные пробы 30 сортов картофеля из опытных полей института «Овощеводства, бахчевых культур и картофелеводства» исследованы в лабораторных условиях методом РРД и ИФА, определена степень их устойчивости. Полученные результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

**Определение степени поражаемости клонов картофеля ХВК**

**с помощью иммунологического метода**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Сорта картофеля | | Степень поражаемости, % | Сорта картофеля | | Степень поражаемости, % |
| Название сорта | Наименование государств | Название сорта | Наименование государств |
| Пикассо | Голландия | 23,0 | Дитте | Голландия | 35,2 |
| Ред-скарлет | Голландия | 68,4 | Дезирия | Голландия | 45 |
| Диоманд | Голландия | 45 | Сантэ | Голландия | 56,3 |
| Қизғалдоқ | Узбекистан | 72,2 | Курадо | Голландия | 10,0 |
| Фреско | Голландия | 66,7 | Романо | Голландия | 30,0 |
| Линия | Узбекистан | 52,9 | Арнова | Голландия | 30,0 |
| Гуливер | Голландия | 38,7 | Мирям | Германия | 30,4 |
| Умид | Узбекистан | 63,2 | Вирго | Германия | 20,2 |
| Розара-Агате | Германия | 48,7 | Марфона | Германия | 40,5 |
| Тўйимли | Узбекистан | 30,5 | Невский | Россия | 15,3 |
| Кординал | Голландия | 47,8 | Кондор | Голландия | 5,0 |
| Aрмада | Россия | 40 | Писком | Узбекистан | 40,6 |
| Радуга | Россия | 54,2 | Серҳосил | Узбекистан | 62,7 |
| Aльвара | Германия | 66,7 | Сарнов | Узбекистан | 24,7 |
| Ақраб | Узбекистан | 32,9 | Диёра | Узбекистан | 61,2 |

В ходе исследований обнаружены сорта и клоны, иммунные к ХВК: сорта Кондор и Курадо, которые отнесены к практически устойчивой группе (поражаемость до 10%), сорта Вирго, Невский, Пикассо и Сарнов - к слабо поражаемым (до25%): сорта Дитта, Романо, Арнова, Мирям, Марфона, Писком, Диоманд, Гуливер, Розара-Агате и Кординал - к средне поражаемым (до 50%), сорта Ред-скарлет, K-10 (Қизғалдоқ), Умид, Радуга и Aльвара - к сильно поражаемым (выше 50%).

На основе полученных результатов следуют следующие выводы: приготовленная сыворотка применена в диагностике ХВК. Иммунологическим методом установлено, что среди сортов картофеля нет иммунных сортов, а сорта Курадо и Кондор были практически устойчивыми, сорта Вирго, Невский, Пикассо и Сарнов слабо поражаемыми. Селекционеры в будущем могут использовать эти сорта и клоны для создания новых сортов и линий картофеля, устойчивых к вирусным заболеваниям.

**В пятой главе диссертации “Иммунологическая и молекулярно-генетическая диагностика и филогенетический анализ ХВК”** приведены сведения и анализ изученных свойств вируса с помощью иммунологического и ПЦР методов. Первоначально чувствительность ряда методов изучена на основе антигена ХВК. Выявлено, что среди них “сэндвич” вариант ИФА является самым высокочувствительным, то есть может определять вирус до 10-9 степени. В следующих исследованиях также сравнивали чувствительность метода иммуноблотинга на нитроцелюлозных мембранах, где установлено, что его чувствительность равна 10-10 и более. Поэтому в следующих исследованиях с помощью этого метода перепроверены неопределенные результаты, которые получены с помощью метода ИФА.

**Определение естественных резерваторов ХВК с помощью метода иммуноблотинга на НЦМ.** В первичных исследованиях по изучению естественных резерваторов вируса с помощью “сэндвич” варианта ИФА были обследованы дикорастущие и культурные растения, относящиеся к 37 видам, 16 семействам на присутствие вируса. Среди них были такие растения, в которых не было возможности точно определить присутствие или отсутствие вируса. В последующих исследованиях эти растения были перепроверены с помощью метода иммуноблотинга на НЦМ. Среди вторично исследованных растений обнаружены новые естественные растения резерваторы, которые не были зафиксированы при ИФА, к ним относятся следующие растения: лебеда (*Atriplex micrantha* C.A.Mey), паслён чёрный (*Solanum nigrum*), марь постенная (*Ch. murale),* марь *(Ch. quonea*), амарант запрокинутый *(Amaranthus retrofflexus),* полынь однолетняя *(Artemisia annua),* полынь обыкновенная *(Artemisia vulgaris),* горчица полевая (*Sinapis arvensis* L.) и горчица сарептская (*Brassica juncea* (L) Czern). Полученные данные послужат основой для определения естественной циркуляции и типа “естественного очага” вируса в наших климатических условиях, а также для разработки мер борьбы.

**Диагностика изолятов ХВКс методом ОТ-ПЦР из естественных образцов.** В нашей Республике до сегодняшнего дня в диагностике фитовирусов использовался метод ИФА, его чувствительность в зависимости от вариантов, составляет а ~10-3 - 10-5 ед./мл, а чувствительность ПЦР составляет ~10-1 -10-2 ед./мл (Шляхов, 2017).

В исследованиях проб, полученных из растений с наличием вирусных симптомов, ХВК диагностировали методом ОТ-ПЦР. Симптомы на растениях приведены в рисунке 8.

Пробы растений, хранившиеся в лиофильно высушенном состоянии, исследованы в научной лаборатории “биохимия вирусов растений” кафедры Вирусологии МГУ совместно с д.б.н., проф. Чирковым С.Н. методом ОТ-ПЦР. Выражаем благодарность д.б.н., проф. С.Н. Чиркову за оказанную методическую и практическую помощь.

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\Windows 10\Desktop\20190615_090457-1.jpg  А. | **Б.** |
| В. | Г. |
| Примечение: Б и В приведены фотографии здоровых (а) и больных листьев растений (б); А и Г растения, пораженные вирусом.  Рис. 8. Растения, исследованные на наличие ХВК методом ОT-ПЦР: А-*Datura stramonium,* в котором присуствовали симптомы системной крапчатой мозаики; Б - листья картофеля *(Sоlanum tuberosum*) - сорта Диёра, на котором присуствовали симптомы системной крапчатой мозаики;В – листья помидора (*Lycopersicum esculentum* Mill), на котором присутствовали симптомы мозаика (проба получена из опытных полей МГУ); Г- листья картофеля (*S. tuberosum*), сорта Умид, на которых присутствовали симптомы крапчатой мозаики. | |

Результаты, полученные на основе ОТ-ПЦР, визуализировали в 2% геле агарозы и приведены в электрофореграмме (рис. 9).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | F:\190822_PVX_Tom.jpgM1 1 2 3 4 M2 | Электрофорез проводили на 2%-агарозном геле. М1 - O'GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas); М2 - 100 bp DNA ladder Plus. 1 – ХВК, выделенный из пробы растения *Datura stramonium*) (рис.8, А); 2 – ХВК, выделенный из пробы растения картофеля сорта Умид (рис.8, Г); 3 – ХВК, выделенный из пробы растений помидора (*Lycopersicum esculentum* Mill) (МГУ), полученного из опытного участка (рис.8, В); 4 - ХВК выделенный из пробы растения картофеля сорта Диёра (рис.8, Б). Праймеры PVXIF/PVXIR. Условия ПЦР проводили, как указано у Ahmed et al. (2013). |
|  |
| 1000 bp **-** |

**Рис. 9.** **Диагностика ХВК с помощью метода ОТ-ПЦР на растениях**

На основании линий в электрофореграмме следует вывод, что все исследованные четыре пробы растений поражены ХВК.

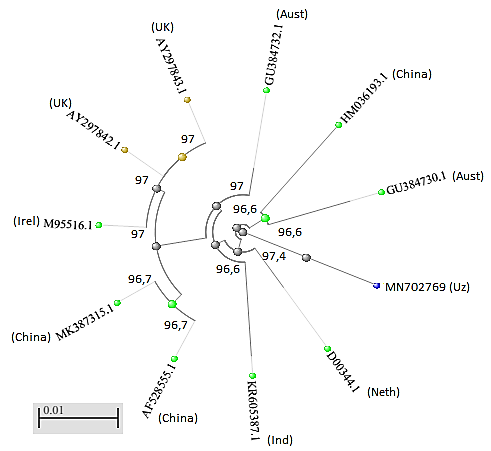
ХВК с помощью ОТ-ПЦР диагностирован на растениях с симптомами поражения и это послужило основой для проведения последующих исследований в изучении молекулярно-генетических свойств вируса.

**Изучение изолята ХВК, выделенного в климатических условиях Узбекистана, на основе *ORFs5* гена и его филогенетический анализ.** Выделение изолята ХВК проводили двумя путями: были выделены суммарный (тотальный) и геномный РНК из лиофизированно высушенной вирусной пробы и высущенных листьев *Datura stramonium*. В первом случае геномный РНК вируса выделен путём иммуносорбции вирусной частицы к поликлональной АТ (рис. 10.1, 3), во втором суммарная РНК вируса выделена в силиконовой колонке со специальным набором (RNeasy Plant Mini Kit), (рис. 10. 2,4).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 1 2 3 4 M | Электрофорез проводили в 1,5%-ном геле агарозы. М - 100 bp DNA ladder Plus. 1, 2 – ХВК, выделенный из лиофилизированого растения дурмана (*Datura stramonium*); 3 и 4 – ХВК, выделенные из высущенных листьев дурмана (*Datura stramonium*). 1, 3 – геномная РНК выделенного ХВК, полученная иммуносорбцией вирусной частицы к поликлональной АТ (Agdia, США); 2, 4 – общая РНК ХВК, выделенная с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США). Обратная транскрипция осуществлена на основании определенного набора (random hexamers). Праймеры PVXIF/PVXIR. Условия ПЦР проведены, как описано в публикации ученых Ahmed et al, 2013. |
| 714 bp - |  |

**Рис. 10. Электрофореграмма продукта ПЦР, полученная с помощью праймера, приготовленного к *ORFs5* гену ХВК**

Продукт ПЦР был отделен скальпелем от геля и передан для проведения секвенса (Евроген, Россия). На основе секвенса определена нуклеотидная последовательность*ORFs5* гена изолята, выделенного из механически зараженного растения *Datura stramonium,* которое выращено в климатических условиях Узбекистана. Этот ген сдан в Международный ген банк-NCBI под названием PVXUZ под номером MN702769. Нуклеотидная последовательность изолята использовалась в последующих биоинформатических анализах. Установленная нуклеотидная последовательность *ORFs5* гена вируса определена с помощью программы ВLASTn и сравнительна изучена на основе этого гена с другими изолятами, находившимися в Международном ген банке – NCBI, проведен биологический анализ и определена степень их родства**.** По результатам анализа, проведенного ВLASTn программой, изолят РVX-UZ под №MN702769, распространанённый в нашей Республике, имел разные соотношения сходств с другими, ранее выделенными изолятами.

Гомология с изолятом D00344.1 (Netherlands) составила 97,48%, гомология с Австралийским изолятом GU384732.1, изолятами [AY297843.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297843.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=XFNWE2E9014), [AY297842.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297842.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=XFNWE2E9014) и [M95516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M95516.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=5&RID=XFNWE2E9014) выделенными в Англии, составила - 97.06%. В последующих исследованиях проводили сравнительное изучение с более чем 250 изолятами, хранившимися в базе – NCBI и проведен биостатистический анализ и с помощью BLASTn программы составлено филогенетическое дерево ХВК (рис.11). По данным филогенетического дерева видно, что распространенный в республике изолят MN702769 по происхождению очень близок изоляту D00344.1, выделенного в Голландии, который по нуклеотидной последовательности имеет 97,06% сходства с изолятом GU384732.1, выделенного в Австралии. Однако расположение в филогенетическом дереве на дальней ветке свидетельствует об их происхождении когда-то из одного близкого поколения. Степень родства с другими изолятами приведены в рисунке 11.

|  |
| --- |
| **Рис. 11. Филогенетическое дерево изолята ХВКн, выделенного в Узбекистане** |

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: выделенный в республике изолят MN702769 по нуклеотидной последовательности *ORFs5* гена близко родственным на 97.48% с изоляту D00344.1, таким Европейским изолятам, как [AY297843.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297843.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=XFNWE2E9014), [AY297842.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297842.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=XFNWE2E9014), [M95516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M95516.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=5&RID=XFNWE2E9014) - на 97.06%. Этот изолят происходит от Европейского изолята, однако после попадания в климатические условия нашей республики был подвержен некоторым изменениям и его можно считать новым изолятом.

**Сравнительный анализ аминокислотного состава белковой оболочки ХВКн изолята**. Аминокислотный состав белковой оболочки изолятов, распространёнными в других странах, сравнительно изучен: это изоляты D00344.1 (Netherlandes (X3)), M95516.1, X88788.1 (UK), KR605395.1 (India), KJ620846.1 (China), AF260641.1 (South Korea), GU384732.1 (Australia). Установлено, что исследованные изоляты отличаются между собой по количеству и составу аминокислот. Белковая оболочка изолята, выделенного в нашей Республике, состоит из 236 аминокислот и от изолята D00344.1 отличается по количеству таких аминокислот как Ser, Thr, Asp, Iso, Val.

**ВЫВОДЫ:**

В результате проведённых исследований по докторской диссертации на тему “Выделение изолята Х вируса картофеля, распространённого в Узбекистане, изучение свойств и его иммунодиагностика” сформулированы следующие выводы:

1. Выделены два отличающиеся друг от друга изолята: обычныйХо изолят, проявляющий обычную мозаику на растении-хозяине, и Хн - «некротический» изолят ХВК*,* проявляющий некротические поражения на листьях *Datura stramonium.* Определены симптомы поражения выделенных изолятов на тест-индикаторных растениях, идентификация проводилась на основе биологических и физико-химических свойств. Установлено уменьшение количества хлорофилла «а» в пораженных ХВК листьях растений по отношению к контролю (9,96 mg/l) в 4,4 раза (2,23 mg/l), “b” хлорофилла по отношению к контролю (5,16 mg/l) в 2,3 раза (2,2 mg/l), количество каротиноида в 5,3 раза (0,42 mg/l) по отношению к контролю (2,24 mg/l).
2. Установлена динамика растворимого и слабо связанного с клеточной стенкой фермента пероксидазы на растениях, поражённых изолятом ХВКн и здоровых растений, при этом показано, что количество слабо связанного с клеточной стенкой фермента пероксидазы на здоровых растениях составляет 9,75 ммоль/мл, а на пораженных - увеличивается до 14,0 ммоль/мл. При этом количество растворимого фермента в здоровых растениях составляет 10,85 ммоль/мл, а в пораженных увеличивается до 12,5-24,3 ммоль/мл.
3. Вирус, выделенный из растения дифференциатора *D. stramonium,* биологически очищен на основе проведенного мононекроза на растении *G.globosa* с максимальным накоплением на растении накопителе *Nicotiana barley.* Получен чистый препарат вируса с помощью гельфильтрации, максимальная степень поглощения цвета препарата составляет 260 нм, минимальная - 245 нм, соотношение 260/280 составляет 1,2, что соответствует вирусам, составленным на основе спиральной симметрии.
4. На основе гомогенного вирусного препарата изолята КХВн приготовлена специфическая поликлональная АС, титр которой составил 1:32. Полученная АС использована в диагностических методах РДД, ИФА, установлены слабо поражаемые, практически устойчивые сорта картофеля: Курадо и Кондор; слабо поражаемые сорта: Вирго, Невский, Пикассо и Сарнов, которые были рекомендованы селекционерам для создания устойчивых сортов к вирусу.
5. При проведении ряда иммунобиотехнологических методов на основе антигена ХВК, чувствительность «сэндвич» варианта ИФА составила до 10-9, а метод иммуноблотинга на НЦМ составил 10-10. С помощью этого метода были определены растения, относящиеся к 32 видам, 16 семействам, среди них установлены новые естественные растения-резерваторы вируса, которые оставались в стороне чувствительности ИФА. К ним относятся лебеда (*Atriplex micrantha* C.A.Mey), паслён чёрный (*Solanum nigrum*), марь постенная (*Ch. murale),* марь *(Ch. quonea*), амарант запрокинутый *(Amaranthus retrofflexus),* полынь однолетняя *(Artemisia annua),* полынь обыкновенная *(Artemisia vulgaris),* горчица полевая (*Sinapis arvensis* L.), горчица сатрапская (*Brassica juncea* (L) Czern).
6. На основе гена, ответственного за синтез белковой оболочки ХВК, с помощью ОТ-ПЦР на естественных пробах из растений томата, картофеля и дурмана произведена диагностика изолятов вируса.
7. Выявлено 97.48% гомология нуклеотидной последовательности *ORFs5* гена изолята ХВКн, выделенного в климатических условиях Узбекистана с D00344, 97.06% гомология с Европейскими изолятами [AY297843.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297843.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=XFNWE2E9014), [AY297842.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY297842.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=4&RID=XFNWE2E9014), [M95516.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M95516.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=5&RID=XFNWE2E9014) а также Австралийским изолятом GU384732.1. На основе филогенетического анализа показано, что выделенный нами изолят близок к изоляту D00344.1 и находится на одной ветке филогенетического дерева, поэтому его можно считать новым изолятом PVXUZ, зарегистрированным под номером MN702769, который в климатических условиях нашей Республики подвергся некоторым изменениям.
8. Установлена отличия аминокислотного состава белковой оболочки ХВКн по таким аминокислотам как Ser, Thr, Asp, Iso, Val по сравнению с изолятом (X3) D00344, с которым имеет 97.48% гомологию и расположен на одной ветке филогенетического дерева.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREES DSc.02/30.12.2019.В.38.01 AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

**CHIRCHIK STATE PEDAGOGIKAL INSTITUTE**

**TASHKENT REGION**

**FAYZIEV VOKHID BAKHRAMOVICH**

**ISOLATION OF ISOLATE POTATO VIRUS X SPRIADING IN UZBEKISTAN, THE STUDY OF ITS PROPERTIES AND DIAGNOSTICS**

**03.00.04 – Microbiology and virology**

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF SCIENCES (DSc)**

**OF BIOLOGICAL SCIENCES**

**Тashkent – 2020**

**Тhis dissertation of DSc has been registered with the number B2019.2.DSc/B95 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.**

The dissertation has been prepared at the Chirchik State Pedagogical Institute, Tashkent Region

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 on the website «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

**Scientific supervisor: Vakhabov Abdurasul Khakimovich**

Doctor of biological sciences, professor

|  |  |
| --- | --- |
| **Official opponents:** | **Khasanov Botir Achilovich**  Doctor of biological sciences, Professor |
|  | **Kadirova Gulchekhra Khakimovna**  Doctor of biological sciences |
|  | **Mamatkulov Ibrokhim Khomidovich**  Doctor of medical sciences, Professor |
| **Leading organization:** | **Institute of Genetic and Experimental Biology of Plants, Academy of Sciences of Uzbekistan** |

The defense of the dissertation will take place on « » December 2020 at 1000 the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.В.38.01of Institute of Microbiology at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. 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, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: microbio@academy.uz

**Aripov Takhir Fatikhovich**

Chairman of the scientific council awarding scientific

degrees, Dr.Sc.B., Professor, Academician

**Jurayeva Roxila Nazarovna**

Scientific secretary of the scientific council

awarding scientific degrees, PhD, Senior researcher

**Gulyamova Tashkhan Gafurovna**

Chairman of the academic seminar under the scientific

council awarding scientific degrees,

Dr.Sc.B., Professor

**INTRODUCTION (abstract of DSc thesis)**

**The aim of the research work** is the isolation of the potato X-virus isolate, which is widespread in our republic, the study of the properties, the effect of the virus on some morphological-physiological properties of plants, as well as the identification by the molecular genetic method.

**The object of the research work is** PVX, which in the climatic conditions of Uzbekistan affects potato plants and other agricultural plants.

**The scientific novelty of the research is:**

for the first time, the “necrotic” (PVXn) isolate of PVX spread in Uzbekistan was isolated and its ORFs5 gene was identified, phylogenetically analyzed, the amino acid composition of the protein synthesized on the basis of this gene was compared with other isolates, and viral evolution was determined by molecular genetic methods;

for the first time, depending on the degree of morbidity of KXVn isolate is based on the fact that the amount of chlorophyll "a" in the leaves of the plant decreased by 4.4 times compared to control, chlorophyll "b" - by 2.3 times, and carotenoids - by 5.3 times;

In NCM, a number of plants that were unidentified in the initial investigations using the immunoblotting method were re-examined and tested for the virus *Atriplex micrantha* CAMey, *Solanum nigrum*, *Ch. murale, Ch. quonea*, *Amaranthus,* new natural reservoir plants of the virus that have been excluded from ELISA susceptibility have been identified, such as *Artemisia annua,* *Artemisia vulgaris, Sinapis arvensis* L., *Brassica juncea* (L) Czern;

proved to belong to the second group of association with natural foci, ie "natural foci of diseases with a stable circulation in cultivated plants", based on the determination of the presence of the virus in the final composition and in the organs of cultivated plants;

Xn isolate of KXV distributed in the territory of the Republic was isolated for the first time and some biological and physicochemical properties were determined, the pure preparation of the virus was obtained by gel-filtration using TSK gel, on the basis of pure virus preparates the method of development of specific serum for the virus was improved;

the dynamics of the plant peroxidase enzyme in the infectious process was determined by a comparative study of healthy and virus-infected plants.

**The implementation of the research results.**

Based on the results of research on the isolation, study and diagnosis of potato X-virus isolate in Uzbekistan:

PVX-Uz isolate of potato (Solanum tuberosum L.) was submitted to the gene pool of the collection of the unique object “Phytopathogenic and other microorganisms” of the Institute of Genetics and Experimental Biology of Plants (reference of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated November 13, 2019 No 4 / 1255-3019). As a result, strains of phytopathogenic microorganisms allowed to enrich the gene pool of the collection, to form an electronic database information analysis system of viral species diversity;

PVX-Uz isolates (Potato virus X) isolated from infected potato (Solanum tuberosum L.) was registered to the National Collection of Phytopathogenic Microorganisms (NCAM) database of the World Data Center for Microorganisms (WDCM) Registered by WDCM number 915 (reference of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated November 13, 2019 No 4 / 1255-3019). As a result, the collection of strains of phytopathogenic microorganisms allowed to enrich the collection gene pool, the formation of an electronic database information analysis system of viral species diversity;

Prepared specific serum for the virus was introduced on 78.6 hectares of potato fields in the following Tashkent region districts: “Flora” farm of Kibray district, “Hisorak-Chatkol” farm of Parkent district, “Murod agro-plus” farm of Tashkent district (Ministry of Agriculture of the Republic of Uzbekistan on December 7, 2020 02 / Reference No. 025-4226). As a result, pre-sowing seed potato sorting was used effectively in monitoring the incidence of diseases during the growing season and allowed to increase potato yield;

The immunoblotting method was introduced in virological control of potato fields and surrounding plants in Kibray and Parkent districts of Tashkent region (Reference number 02 / 025-4226 of the Ministry of Agriculture of the Republic of Uzbekistan dated December 7, 2020). As a result, early detection of virus-carrying plants growing in these areas and phytosanitary measures were carried out.

**The structure and volume of the thesis.** The structure of the dissertation consists of introduction, six chapters, conclusion, list of used literature. The volume of the dissertation is 194 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**

**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х. КХВ-уз изолятини ажратиш ва индикатор ўсимликлардаги касаллик аломатларини ўрганиш // ЎзМУ хабарлари, Махсус сон: Биология туркуми, -Тошкент, 2013. -№4/2. 179-181-б. (03.00.00; №9).
2. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х. Картошка Х-вирусини ажратиш, тоза препаратини тайёрлаш ва баъзи хусусиятларини ўрганиш// Ўзб. биол. журн. – Тошкент, 2013. - № 5. 29-34-б. (03.00.00; №5).
3. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х. Картошка Х-вирусининг Ўзбекистонда тарқалган изолятини ажратиш ва идентификация қилиш // Ўзб. биол. журн. - Тошкент, 2015. - № 4. 18-21-б. (03.00.00; №5).
4. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х. Ўзбекистонда тарқалган картошка Х-вирусининг штаммга хос хусусиятларини аниқлаш // ЎзМУ хабарлари, Махсус сон: Биология туркуми, -Тошкент, 2015. -№3/2. 56-59-б. (03.00.00; №9).
5. Файзиев В.Б., Марасулов А.Ф. Технология распознование как диагноз-прогноз в решении задач иммунодиагностики вирусов картофеля // ЎзМУ хабарлари, -Тошкент, 2016. - № 3/2. 64-68-б. (03.00.00; №9).
6. Файзиев В.Б., Фатхуллаева Ф.Э., Ваҳобов А.Х. Картошка Х-вирусига поликлонал антизардоб тайёрлаш ва титрини аниклаш // Инфекция, иммунитет ва фармокология, - Тошкент, 2016. - № 4. 163-167-б (15.00.00; №6).
7. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х., Жураева У.М. Изучение некоторих биологическых свойств S-вируса картофеля с методом иммуноферментного анализа // Ўзб. биол. журн. – Тошкент, 2017. - № 2. 27-33-б. (03.00.00; №5).
8. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х. Картошка Х-вирусини тўпловчи хўжайин ўсимликларини аниқлаш // ЎзМУ хабарлари, - Тошкент, 2017. - № 4/2. 179-181-б. (03.00.00; №9).
9. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х., Жавлиева Д.Т., Жураева У.М. Выделение, очистка и изучение иммунохимических характеристик ХВК // Ўзбекистон биология журнали, 2019. № 2 сон, Тошкент, 27-33 бет. (03.00.00; №5)
10. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х., Жавлиева Д.Т., Жураева У.М. Изучение распространения и определение растений резерваторов Х и L вирусов методом иммуноферментного анализа// Научное обозрение: Биологические науки. №2, 2019. -с. 79-86. (03.00.00; №23).
11. Fayziev V.B., Javlieva D.T., Chirkov S.N., Jurayeva U.M. Study of some biological properties necrotic isolyat of Potato virus X and phylogenetic analysis//International Journal of Psychosocial Rehabilitation,Vol.24, Issue 09, 2020. PP. 455-462. ISSN:1475-7192 (№3, Scopus, Impact Factor -0,08).
12. Fayziev V.B., Javlieva D.T., Jurayeva U.M., Jaloliddin Sh., Eshboyev F.B. Effect of PVX-Uz 915 necrotic isolyate of Potato veris X on ammount of pigments of *Datura stramonium* leaves// Journal of Critical Reviews, Vol 7, Issue 9, 2020. PP. 400-403. DOI: <http://dx.doi.org/10.31838/jcr.07.09.82> (№3, Scopus, Impact Factor -0,6).

**II бўлим (II часть; II part)**

1. Fayziyev V.B., Vakhabov A.KH. The study of the biological properties of potato virus X in common environmental conditions of Uzbekistan// European Sciences review. № 1–2 2019 (January–Febrary). Volume 2, 46-50 p. (№5, Global Impact Factor – 1,44).
2. Файзиев В.Б., Қодирова З.Н., Ваҳобов А.Х., Эшбоев Ф., Жураева У.М Изучение распространения у естественных растений резерваторов УВК методом ИФА // Вестник Прикаспия, Астраханская обл., 2014. №2 (5), С. 6-10.
3. Файзиев В.Б., Кадирова З.Н., Ваҳобов А.Х., Жураева У.М. Выявление ХВК и изучение некоторых биологических свойст // Материалы II Международной научно-практической конференции молодых учёных «Теоретическое и практическое развитие науки в современных социально-экономических условиях», -Россия, Москва, 2013. С. 109-110.
4. Fayziyev V.B., Kadirova Z.N., Еshboyev F., Vakhabov A.KH. Spreading of PVL over Samarkand and Tashkent Regions // Regional Conference of Young Scientists on Recent Trends in Physical and Biological Sciences, March 7-8, 2014. Bangalore, P. 56.
5. Махкамов С.А., Файзиев В.Б., Ваҳобов А.Ҳ. Турли ёввойи ўсимликлардан ажратилган пероксидаза ферментининг термостабиллик хусусиятини аниқлаш // Биология ва экологиянинг долзарб муаммолари, Республика миқёсидаги илмий-амалий конференция, Тошкент, 2015. 400-401-бетлар.
6. Файзиев В.Б., Фатхуллаева Ф.Э., Ваҳобов А.Ҳ. Картошка Х-вирусига тайёрланган антизардобнинг титрини иккиёқлама иммунодиффузия усули ёрдамида аниқлаш // Биология ва экологиянинг долзарб муаммолари, Республика илмий-амалий конференция, Тошкент, 2015. 323-324 бетлар.
7. Файзиев В.Б., Вахобов А.Х. Картошка ўсимлиги барг тўқимасидаги Х ва L вирус миқдорини ИФА усули ёрдамида аниқлаш // Академик Тўрақулов Ёлқин Холматовичнинг 100 йиллик таваллудига бағишланган «Физик-кимёвий биология ва эндокринологиянинг долзарб муаммолари» мавзусидаги Республика миқёсидаги илмий-амалий конференция, Тошкент, 16 ноябрь, 2016. 7-8 бетлар.
8. Шохиддинова М.Н., Файзиев В.Б. Аrmarasia rustikana ўсимлиги турли аъзоларидаги фермент миқдорини аниқлаш // Академик Тўрақулов Ёлқин Холматовичнинг 100 йиллик таваллудига бағишланган «Физик-кимёвий биология ва эндокринологиянинг долзарб муаммолари» мавзусидаги Республика миқёсидаги илмий-амалий конференция, Тошкент, 16 ноябрь, 2016. 14-15 бетлар.
9. Махкамов С.А., Шохиддинова М.Н., Файзиев В.Б. Ўсимлик пероксидазасининг қисман тозаланган препаратини олиш // «XXI аср – интеллектуал авлод асри» мавзусидаги Ёш олимлар ва талабаларнинг Республика миқёсидаги илмий-амалий конференция, Тошкент, 18 май, 2017. 52-53 бетлар.
10. Махкамов С.А., Файзиев В.Б. Ўсимлик пероксидаза ферментининг активлигини темпратурага боғлиқ ҳолда ўрганиш // «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» Республика миқёсидаги илмий конференция, Тошкент, 12-13 май, 2017. 183-184 бетлар.
11. Махкамов С.А., Файзиев В.Б. Отқулоқ (А. rustikana) пероксидаза ферментининг ҳужайра девори билан кучсиз боғланган ва эрувчан формасини ўрганиш // «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» Республика миқёсидаги илмий конференция, Тошкент, 18-19 май, 2018. 110-112 бетлар.
12. Файзиев В.Б., Кадирова З.Н., Вахобов А.Х. Картошка клонларининг картошка Х-вирусига чидамлилигини баҳолаш // «Биологиянинг долзарб муаммолари» Республика миқёсидаги илмий-амалий конференция, Фарғона, 17 май, 2018. 265-266 бетлар.
13. Махкамов С.А., Файзиев В.Б. Отқулоқ (А. rustikana) пероксидаза ферментининг ҳужайра девори билан кучсиз боғланган ва эрувчан формасини ўрганиш // «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» Республика миқёсидаги илмий конференция, Тошкент, 18-19 май, 2018. 110-112 бетлар.
14. Аҳмадалиев Б.Ж., Файзиев В.Б. Тошкент вилоятига картошка М вирусининг тарқалишини ИФА усули ёрдамида аниқлаш // «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» Республика миқёсидаги илмий конференция, Тошкент, 18-19 май, 2018. 39-40 бетлар.
15. Файзиев В.Б., Вахобов А.Х. Картошка X вируси «табиий ўчоқ» типини аниқлашнинг назарий ва амалий аҳамияти // Меж. научной конферен. «Непрерывное оброзавание в устойчивом развитии: проблемы и решения», Чирчик, 2019. 2-том, -С. 300-302.
16. Файзиев В.Б., Жавлиева Д.Т. Картошка турли намуналаридан Х вирусни ажратиш ва юқумлилик даражасини аниқлаш // «Непрерывное оброзавание в устойчивом развитии: проблемы и решения», Чирчик, 2019. 2-том. С. 300-302.
17. Tўражонова Э.Э., Жавлиева Д.Т., Файзиев В.Б. Картошка Х вирусининг *Datura stramonium* ўсимлиги баргидаги хлорофилл миқдорига таъсирини аниқлаш // «Аграр соҳани истиқболли ривожлантиришда ресурс тежовчи инновацион технологиялардан самарали фойдаланиш» мавзусидаги Халқаро миқёсдаги илмий конференция,, Андижон, 20-21 сентябрь, 2019. 321-323 б.
18. Тоғаев С.А., Нуғмонова К.И., Файзиев В.Б., Ваҳобов А.Ҳ. // Картошка Х вирусининг умумий хусусиятлари // «Состояние и перспективы развития микробиологии и микробной биотехнологии в Узбекистане» Республиканская научно-практическая конференция, посвященная 80-летию выдающегося ученного биохимика и биотехнолога Узбекистана академика А.Г.Халмурадова, Ташкент, 24 октябрья, 2019.С. 51-52.
19. Файзиев В.Б., Жавлиева Д.Т. Выделение некротическое штамма Х вируса картофеля и изучение некоторых свойств // Меж. научной конферен. «V Образовские чтения: Вклад тюркской цивилизации в развитие науки и образование», Шымкент, 30 октябрь, 2019. 2-том. С. 421-423.
20. Файзиев В.Б., Бахтиёрова М.С., Ботирова Н.Т., Сулаймонов О.А., Вахобов А.Ҳ. Картошка вирусларини ИФА ёрдамида аниқлаш ва қарши кураш чоралари бўйича тавсиянома // Тошкент, Адабиёт учқунлари, 2019. 38 бет.

Автореферат «ЎзМУ хабарлари» журнали таҳририятида таҳрирдан ўтказилди.

Бичими 60х84 1/16 , «Times New Roman»

гарнитурада рақамли босма усулида босилди.

Шартли босма табоғи 3,875. Адади:100. Буюртма: № 24.

Ўзбекситон Республикаси Фанлар Академияси

Асосий кутубхонаси босмахонасида чоп этилди.

Тошкент шаҳри, Зиёлилар кўчаси, 13-уй.

1. <https://ru.qwe.wiki/wiki/Plant_virus>;

   <https://propozitsiya.com/virusnye-bolezni-kartofelya-i-borba-s-nimi> [↑](#footnote-ref-1)
2. Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сонли «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» Фармони. [↑](#footnote-ref-2)
3. Диссертация мавзуси бўйича илмий тадқиқотлар шарҳи [https://www.scopus.com](https://www.scopus.com/), [www.webofscience](http://www.webofscience), [www.dissecat.com](http://www.dissecat.com), http://www.works.doklad.ru, <http://www.km.ru>,

   [https://www.wemakescholars.com ва бошқа манбалар асосида ишлаб чиқилган.]( https://www.wemakescholars.com  ва бошқа манбалар асосида ишлаб чиқилган.) [↑](#footnote-ref-3)
4. <https://ru.qwe.wiki/wiki/Plant_virus>;

   <https://propozitsiya.com/virusnye-bolezni-kartofelya-i-borba-s-nimi> [↑](#footnote-ref-4)
5. Указ Президента Республики Узбекистана от 7 февраля 2017 года № УП-4947 “О Стратегия действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан”. [↑](#footnote-ref-5)
6. Обзор научных исследований по теме диссертации разработаны на основе данных [https://www.scopus.com](https://www.scopus.com/), [www.webofscience](http://www.webofscience), [www.dissecat.com](http://www.dissecat.com), http://www.works.doklad.ru, <http://www.km.ru>,  [https://www.wemakescholars.com и других источников.](file:///C:\Users\Personal\Downloads\Telegram%20Desktop\%20https:\www.wemakescholars.com%20%20и%20других%20источников) [↑](#footnote-ref-6)