

UDK: 937:635.64+632

ДНКНИ АЖРАТИБ ОЛИШ БОСҚИЧЛАРИ ВА УСУЛЛАРИ

Тошкент давлат аграр университети

Хасанов Анвар Муроталиевич

Бодом арисы (мевахўри) (*Eurytoma samsonovi*) ва бодомнинг бошқа турдаги зараркунандаларини молекуляр идентификация қилиш ДНКсини аниқлаш учун бир неча босқичдаги амалий ва услубий ишлари амалга ошириш керак бўлади.

Тадқиқот давомида микроскопларнинг МБС-2; МБИ-3, электрон микроскоп Телса-БС-613 (чех.). Ҳашаротларни ривожлантириш инкубатор термостатнинг МЕММЕРТ E05273 русумли ва бошқа лаборатория ускуналардан фойдаланилди.

Фарғона водийси бодом биоценозидан йиғиб олинган бодом арисы (мевахўри) (*Eurytoma samsonovi*) зараркунандасини ДНКсини ажратиш ва полежаза таҳлилини ўтказиш қуйидаги босқичларда амалга оширилди.

Eurytoma samsonovi турларидан олинган материалларни 20 мг олиб суюқ азотда гомоген ҳолатга келгунга қадар майдаланди. Материал 1,5 мл эпидорфга солинди ва устига 180 мкл ДиГЕСТИОН Солутион эритмаси қуйилди, вортекс билан аралаштирилди.

Протеиназа К 20 мкл эритмасини қўшиб вортекс ёки пипетка билан яхшилаб аралаштирилди. Намуна 56°C ҳароратда тўқима тўлиқ бўлингунча ва заррачалар қолмагунча сақланди. 20 мкл РНасе А Солутион эритмасини қўшиб, вортекс билан аралаштирилади ва 10 минут хона ҳароратида сақланади. 200 мкл Лйсис Солутион эритмасини қўшиб, вортекс билан аралаштирилди ва 10 минут хона ҳароратида сақланади. 400 мкл 50 % этанол қўшиб вортексда аралаштирилади.

Тайёрланган эритмани ГенеЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунига олиб ўтилади ва 6000 х г да 1 дақиқа давомида центрифуга қилинади. ГенеЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунини янги 2 мл колбага жойлаштирилади. Тозалаш найчасига 500 мкл Буффер И қўшилади ва 1 дақиқа давомида центрифуга қилинади. Бу жараён центрифуга 1 дақиқада 8 минг тезликда амалга оширилади. ГенеЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунини янги 2 мл колбага жойлаштирилади.

Тозалаш найчасига 500 мкл Буффер II қўшилади ва 3 минут давомида максимал тезликда (≥ 12000 х г) центрифуга қилинади.

Гене ЖЕТ Геномик ДНКни тозалаш устунини тоза 1,5 мл эпидорфга ўтказилади. Тозалаш устун колбаси марказига 200 мкл Елутион буфери қуйилади. Эпидорфни хона ҳароратида 2 дақиқа давомида сақлаб, 1 дақиқада 8 минг тезликда амалга оширилади. Тозалаш устунини ташлаб юбориб ва олинган ДНКни - 20°C даражасида сақланади.

15-Fevral, 2026-yil

ПЗР-амплификацияси усули. Амплификация учун ажратиб олинган ҳашаротларни геном ДНКсини хромасомадаги СОИ соҳасининг уклеотидлар кетма-кетлигини ўрганиш учун «Силекс» фирмаси тўплами реактивлари стерилланган сув, 10x ПЗР буффер, дНТП эритмаси, Тақ-полимераза ва молекуляр таксономиясида қўлланилаётган куйидаги праймерлардан фойдаланилиб амплификация қўйилди (1-жадвалга қаранг).

Полимераза занжир реакциясини (ПЗР) дастурлаштирилувчи автоматик амплификатор (Тоучгене Градиент, УК) ёрдамида амалга оширилди.

1-жадвал

Параймер номи (Тўғри праймер)	Параймер номи (Тўғри праймер)
ФWD_СЕК:ТТСААССААТСАТ АААГАТАТТГГ	РЕВ_СЕК:АААСТТСТГГАТГТ ССААААААТСА
ФWD_СЕК:ТГТААААСГАСГГ ССАГТААТСАТААРГАТАТЙГ	РЕВ_СЕК:ТАААСТТСТГГАТГ ТССААААААТСА

Фирма қайдномаси асосида куйидаги реактивлардан Мастер-мих тайёрланди. ПЗР куйидаги схема бўйича амалга оширилди: 1-босқич – 3 дақиқа давомида ДНКнинг 95°C шароитда денатурасияланиши, 2-босқич – ДНКнинг 93°C шароитда 20 сония давомида денатурасияланиши, 3-босқич ДНКда 55°C шароитда 30 сония давомида праймерларнинг ёпишиши, 4-босқич 72°C шароитда 2 дақиқа давомида элонгасияланиш, 5-босқич 72°C шароитда 10 дақиқа давомида занжирнинг элонгасияланиши.

Мастер-мих учун реактивлар рўйхати

2-жадвал

Сув (стер.)	13.8 мкл
10x ПЗР буфери	2 мкл
дНТП	0.6 мкл
Ҳар бир праймердан	1.5+1.5 мкл
Тақ-полимераза	0.6 мкл
Жами:	20 мкл

Иккинчидан тўртинчи босқичгача жараён цикл кўринишида 35 мартагача такрорланган (2-жадвал).

Агароза гелида электрофорез усули. Полимераза занжир реакцияси тугаганидан сўнг гелэлектрофорез усулидан фойдаланилди. Бу усул - аналитик метод бўлиб, ажратиш, тенглаштириш ва ДНК қисмларини тозалаш учун фойдаланилади. ДНК электрофорези горизонтал йўналишда амалга оширилади. Гелнинг таркибига куйидагилар киради: 1X ТАЕ (рН 8,1), агароза, бромли этидий.

Агароза гелини тайёрлаш ва ПЗР маҳсулотларида электрофорез ўтказиш учун куйидаги кетма - кетликда амалга оширилди.

15-Fevral, 2026-yil

Тароқчаларнинг пастки тишчалари умумий ҳажми 50 мл бўлган гелнинг асосидан 2 мм оралиғида жойлаштирилди (умумий ҳажми 150 мл бўлган гелнинг асосидан 1мм оралиғида жойлаштирилган).

50 мл 2%ли агароза гелини тайёрлаш учун 50 мл 1X ТАЕ ва 1г агароза кўшилди. 1X ТАЕ бошланғич концентрацияси 50X ТАЕ эритмасидан тайёрланади (Трис, 0,5М ЭДТА pH8,0, музлатилган сирка кислотаси).

Колбага солинган агарозали ТАЕ аралашмасини гомоген ҳолатига келгунча киздирилади (эритмада агарозанинг эримаган зарраларини бўлмаслиги лозим).

Бу жараёндан сўнг 50°C даражасида совутилди ва 0,5 мкл бромли этидий кўшилди. Ҳамма гел ҳажми электрофорез ванначасига қуйилди. Гел совугандан сўнг (30-45 дақиқа хона ҳароратида), секинлик билан тароқчаларни олиб ташланди ва электрофорез ванначасига 1X ТАЕ буферини гел тўлиқ қоплаганича қуйилди. 10-15 дақиқадан сўнг чуқурчаларнинг (лунка) бирига 2,5 мкл ли ДНК-маркерини ДНА Ладдер 100пб (Промега) кўшилди.

ДНК ажратиши учун кучланиш 1 сантиметр гелда 5 вольтдан ошмаслиги зарур. 40-45 дақиқадан сўнг гелни ультрабинафша ва трансиллюминатор нурларида кўрилди ва расмга олинди, натижалар қайд қилинди.

ДНКни тозалаш. Электрофорез натижасидан ҳосил бўлган керакли фрагментларни скалпел ёрдамида гелдан кесиб олинди ва 1,5 мл ли эпипиндорф пробиркага жойлаштирилди. ДНКни гелдан ажратиб олишда ишлаб чиқарувчи кўрсатмаларига амал қилган ҳолда, «Силекс М» (Россия, Москва) томонидан ишлаб чиқарилган реактивлар тўпламидан фойдаланилди.

Секвенирлаш – ДНКнинг нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш - Гелдан тозаланган ПЗР маҳсулотларини сиквенирлашга беришда, гелдан тозаланган ДНК консетрациялари ўлчанди ҳамда ПЗР га қўйилган праймерлар ёрдамида секвенсга берилди.

ДНКни секвенс қилишда АБИ ПРИСМ® БигДе™ Терминатор в. 3.1 реактивлар тўплами ёрдамида амалга оширилиб, реакция маҳсулотлари АБИ ПРИСМ 3100-Авант автоматик секвенаторида қайд қилинди (СКП «Геном» («Гентотех», Москва). Коллектив фойдаланиш марказидан (СКП) олинган секвенс маълумотлари “аб1” форматда олиниб, “Чромас версион 1.45” (McCarthy, 1996-1998) дастури ёрдамида таҳлил қилинди.

Секвенсдан олинган маълумотларнинг хатоликларини тўғрилаш мақсадида тўғри ва тескари праймерлар ёрдамида ўқитилган секвенес натижаларни ФАСТА-форматга айлантирилди. Кейин иккита хроматография натижаларини бирлаштириш учун «Слустал X версион 1.81» (Swofford D.L, 2000) дастури ёрдамида амалга оширилди. « Gendoc version 2. 5.000» (McCarthy, 1999) дастури ёрдамида кераксиз нуклеотидлар олиб ташланади. Нехус-форматга ўтказиш учун «ФорСон версион 1.0 фор Windows» (Раес, Ван де Пеер, 1996) дастурида амалга оширилди. Филогенетик анализлар ПАУП* 4.0б10 (Swofford D.L, 1998) дастурида амалга оширилди. Бу дастур фақат Нехус-файлида ишлашлигини алоҳида таъкидлаб ўтиш жоиз.

15-Fevral, 2026-yil

Фойдаланилган адабиётлар:

1. Хасанов А., Ш.Есанбоев. Ўрмонзорлардаги ёнғоқ зараркунандаси. Агрокимёхимоя ва ўсимликлар карантини. Журнал. 2019/6. Б. 65-66.
2. Хасанов А ва бош. Бинафшаранг қалқондори –*PARLATORIA OLEAE GOLV* феналогуяси. Агрокимёхимоя ва ўсимликлар карантини. Журнал. 2019/6. Б.14-15.
3. Хасанов А ва бош. Бодом зараркунандалари ва уларга қарши кураш чоралари. Агрокимёхимоя ва ўсимликлар карантини. Журнал. 2020/3. Б.39-40.
4. Хасанов А ва бош. *Almond pest in forest agrobiocenosis and measures against them*. E3S Web of Conferences 258, 04028 (2021) UESF-2021. P. 1-6.
5. Rasul Jumaev. *Methods of determining the optimal temperature and humidity in dryness and storage of in vitro propagated parasitic entomophages*. E3S Web of Conferences. 2024. – P. 553. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303003>.
6. Rasul Jumaev, Abdurakhim Kuchboev, Nozimakhon Jumaeva, Farukh Yakubov, Shamsi Esanbaev. *Molecular identification and polymerase chain reaction analysis of Xanthogaleruca Luteola (Chrysomelidae) species*. E3S Web of Conferences. 2024. –P. 563. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303001>.
7. Rasul Jumaev. *In vitro rearing of parasitoids*. E3S Web of Conferences 371, 01032 (2023). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202337101032>.
8. Rasul Jumaev. *Methods of determining the optimal temperature and humidity in dryness and storage of in vitro propagated parasitic entomophages*. E3S Web Conf. Volume 563, 2024. 1-6. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303003>.
9. Lebedeva N, Akhmedova Z, Kholmatov B, Jumaev R. *Revision of stoneflies insecta: plecoptera fauna in Uzbekistan*. E3S Web of Conferences 258, 08030 (2021). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125808030>.
10. Sulaymonov O, Jumaev R., Sobirov B, Gazibekov A. *Representatives of Lepidoptera groups occurred in forestry and agricultural crops and their effective entomophage types*. E3S Web of Conferences 244, 02020 (2021). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124402020>.
11. Kimsanboev K, Rustamov A, Usmonov M, R.Jumaev. *Euzophera Punicaella Mooze Lepidoptera bioecology and development of host entomophagic equilibrium in biocenosis*. E3S Web of Conferences 244, 01003 (2021). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124401003>.
12. Rasul Jumaev. *In vitro mass reproduction of parasitic entomophages Braconidae Trichogrammatidae*. E3S Web of Conferences 389, 03100 (2023). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202338903100>.
13. Esanbaev Sh, Jumaev R. *Study on stem pests of elm tree in Uzbekistan*. E3S Web of Conferences 563, 03004 (2024). 162-169. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202456303004>.
14. Kimsanbaev X, Jumaev R.A, Jumaeva N. *Bioecology harm of tobacco trips for the cotton plant and measure of counteraction*. European science review 3-4, 29-31 (2018).