

***Erwinia amylovora* VA UNGA QARINDOSH TURLARNING
DIAGNOSTIKASI UCHUN YANGI MAHALLIY TEST TIZIMLARINI
ISHLAB CHIQISH MAQSADIDAGI GENOM TADQIQOTLARI**

Radjapov Farxod Sunnatullaevich kich.i.x., Kamburova Venera Seytumerovna
Dsc, Xurshut Ernest Enverovich PhD, Tojiboyeva Dinara Ilxamovna kich.i.x.,
Usmonov Dilshod Erkinbaevich PhD, Abdukarimov Sharofiddin Sayfidinovich

kich.i.x., prof. Buriyev Zabardast Tojiboyevich,

Salaxutdinov Ilxom Baxtiyarovich PhD

O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi

Genomika va bioinformatika markazi

E-mail: farhod.radjapov@yandex.ru

Annotasiya: Kun sayin tobora rivojlanib borayotgan bozor iqtisodiyoti va xalqaro savdo-sotiqning ta'siri natijasida mamlakatimizga olib kirilayotgan qishloq ho'jaligi mahsulotlari (meva, ko'chat, urug') ning foydali tomonlari bilan qatorda zararli (karantin) kasallik qo'zgatuvchilarining ham kirib kelish havfi oshib bormoqda. Ushbu maqolada meva ekinlarida bakterial kuyish kasalligini keltirib chiqaruvchi *Erwinia amylovora* ni molekulyar aniqlash uchun ishlab chiqilgan mahalliy test tizimi haqidagi ilmiy izlanishlar tavsifi keltirilgan.

Kalit so'zlar: *Erwinia amylovora*, meva ekinlarining bakterial kuyishi, karantin fitopatogenlari, genetik tahlil, praymerlar dizayni, PZR, molekulyar diagnostika.

**GENOMIC STUDIES OF *Erwinia amylovora* AND RELATED SPECIES
FOR THE SUBSEQUENT DEVELOPMENT OF NEW LOCAL TEST
SYSTEMS FOR DIAGNOSTICS**

Radjapov Farkhod Sunnatullaevich jr. researcher, Kamburova Venera
Seitumerovna DSc., Khurshut Ernest Enverovich Ph.D., Tojiboeva Dinara
Ilkhamovna jr. researcher, Usmanov Dilshod Erkinbaevich Ph.D., Abdukarimov
Sharofiddin Sayfidinovich jr. researcher, prof. Buriev Zabardast Tojiboevich,
Salakhutdinov Ilkhom Bakhtiyarovich Ph.D.

Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Center of genomics and bioinformatics

E-mail: farhod.radjapov@yandex.ru

Abstract: as a result of the constantly growing market economy and the influence of international trade, along with the beneficial aspects of agricultural products imported into our country (fruits, seedlings, seeds), the risk of importing harmful (quarantine) pathogens increases. The article describes studies of a local test system developed for the molecular detection of *Erwinia amylovora*, which cause bacterial blight of fruit crops.

Key words: *Erwinia amylovora*, fire blight of fruit crops, quarantine phytopathogens, genetic analysis, primer design, PCR, molecular diagnostics.

ГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *Erwinia amylovora* И РОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛОКАЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Раджапов Фарход Суннатуллаевич м.н.с., Камбурова Венера Сейтумеровна д.б.н., Хуршут Эрнест Энверович к.б.н., Тожибоева Динара Ильхамовна м.н.с., Усмонов Дилшод Эркинбаевич к.б.н., Абдукаримов Шарофиддин Сайфидинович м.н.с., проф. Буриев Забардаст Тожибоевич, Салахутдинов Ильхом Бахтиярович к.б.н.

Академия Наук Республики Узбекистан

Центр геномики и биоинформатики

E-mail: farhod.radjapov@yandex.ru

Аннотация: в результате постоянно растущей рыночной экономики и влияния международной торговли, наряду с полезными сторонами импортируемой в нашу страну сельскохозяйственной продукции (плодов, саженцев, семян), возрастает риск ввоза вредных (карантинных) возбудителей болезней. В статье описаны исследования локальной тест-системы, разработанной для молекулярного выявления *Erwinia amylovora* – возбудителя бактериального ожога плодовых культур.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, бактериальный ожог плодовых культур, карантинные фитопатогены, генетический анализ, дизайн праймеров, ПЦР, молекулярная диагностика.

KIRISH

Erwinia amylovora meva ekinlarining bakterial kuyish kasalligining qo'zg'atuvchisi bo'lib, Ra'noguldoshlar oilasining (*Rosaceae*) olmadoshlar (*Maloideae*) va olxo'ridoshlar (*Spiraeoideae*) oilachalarining bir qator turlariga zararli ta'sir etadi. Ushbu patogen ko'plab mamlakatlarda *Pyrus communis* (oddiy nok) va *Malus domestica* (olma) navlariga zararli ta'sir qiluvchi eng og'ir kasalliklardan biri hisoblanadi [1]. Epifitotiyalar sporadik bo'lib, bir qator omillarga, jumladan, atrof-muhitning qulay sharoitlariga, o'simlikda bakterial massaning etarli darajada mavjudligiga va ho'jayin o'simlikning sezgirligiga bog'liq. Kasallik qushlar, hasharotlar, yomg'ir yoki shamol orqali osongina tarqaladi [2]. Kasallik rivojlanishi bahorda daraxt tanasidagi yaralarda qishlagan bakteriyalar tomonidan birlamchi infeksiya qo'zg'atuvchi agentlarni ishlab chiqish orqali boshlanib [2], gullarning zararlanishiga olib keladi, yozda esa novdalar va mevalarning zararlanishi bilan davom etadi so'ngra ho'jayin o'simlikning qishki tinim davrida yaralarning shakllanishi bilan tugaydi [2, 3].

ADABIYOTLAR TAXLILI

E. amylovora bakteriyasi Shimoliy Amerikaning mahalliy turi hisoblanib, ushbu hududdan tashqarida ilk bor 1920 yilda Yangi Zelandiyada aniqlangan. Hozirgi vaqtda *E. amylovora* 40 dan ortiq mamlakatlarda uchraydi. Kasallik Shimoliy Amerika, Yevropa va Yaqin Sharq mamlakatlari, jumladan Eron va Turkiyada keng tarqalgan. Patogen Janubiy Amerikada, Afrika va Osiyoning aksariyat mamlakatlarida hozirga qadar qayd etilmagan [4]. Avstraliyada yagona qayd etilgan holatdan keyin kasallikka havfi bartaraf etilgan [5]. Biroq, global jahon bozorining rivojlanishi (mahsulot va ko'chat materiallari importi) Markaziy Osiyodagi mevali daraxtlar ho'jaligi uchun potensial xavf tug'diradi. Shu sababli

mamlakatimizda ushbu kasallik qo'zg'atuvchisi O'zbekiston Respublikasi uchun karantin ahamiyatiga ega bo'lgan zararli organizmlar toifasiga kiritilgan [6].

1-jadval

Taksonomik ma'lumotlar

Nomlanishi:	Erwinia amylovora (Burrill, 1883) Winslow et al., 1920
Sinonimlari:	Micrococcus amylovorus Burrill, 1883, Bacillus amylovorus (Burrill, 1883) Trevisan, 1889, "Bacterium amylovorus" [sic] (Burrill, 1883) Chester, 1897, Erwinia amylovora f.sp. rubi (Starr et al., 1951)
Taksonomik birliklari:	Bo'lim: Proteobacteria Ajdod: Gammaproteobacteria Qabila: Enterobacteriales Oila: Erwiniaceae
Oddiy nomlanishi:	meva ekinlarining bakterial kuyish kasalligining qo'zg'atuvchisi (EPPO, 2013)

Olma va nokdan tashqari, *E. amylovora* Rosaceae oilasining turli vakillarini, jumladan, Olxo'ridoshlar oilachasining bir qator turlari (olxo'ri, o'rik, olcha, gilos) ni ham kasallik bilan zararlashi mumkin. Shu bilan bir qatorda olma va nok daraxtlarining nafaqat *E. amylovora*, balki *E. piriflorinigrans* bilan ham zararlanish holatlari kuzatilgan. Shu kabi kuzatishlar va avvalroq olib borilgan genetik tadqiqotlar *E. amylovora* ni uchta asosiy ho'jayin – shtamm guruhlariga ajratish imkonini berdi. Ular *Spiraeoideae*, *Rosoideae* (*Rubus* spp.) va Osiyo nokidan (*E. pyrifoliae* yangi tur bo'lib, faqatgina Yaponiya va Janibiy Koreyada ro'yhatga olingan) ajratib olingan. *E. piriflorinigrans* turi Ispaniyada qayd etilgan bo'lib, nok gullarining nekrozini keltirib chiqaradi. *Erwinia* ning boshqa qarindosh turlari safiga Avstraliya va Buyuk Britaniyada o'suvchi olma daraxtining gullaridan ajratib olingan, *E. tasmaniensis* va *E. billingiae* larni kiritish mumkin [4, 7].

Olingan ma'lumotlar ushbu kasallik menejmenti oldiga yangi vazifalarni yuklaydi. Xalqaro savdo-sotiqning tobora rivojlanib borishini hisobga olgan holda, *Erwinia* va unga qarindosh turlarni aniqlash uchun so'nggi ma'lumot va

yondashuvlar asosida yangi diagnostika tizimlarini ishlab chiqarishni talab etadi [8].

TADQIQOT METODOLOGIYASI

Erwinia avlodi turlarining to'liq genom ketma-ketliklarining paydo bo'lishi, patogenlarni genom darajasida qiyosiy tahlil qilish imkonini yaratib berdi. Shu tariqa, biz turli mamlakatlar (AQSh, Kanada, Germaniya, Fransiya, Italiya, Shveysariya, Xitoy, Yaponiya, Janubiy Koreya va Malayziya) da aniqlangan 17 xil *Erwinia* turlarining 39 ta shtammlarining to'liq genomlarini qiyosiy tahlil qildik, ulardan 12 tasi bevosita *E. amylovora* tur namunalari edi. Natijada, biz 344 blokdan iborat bo'lgan turli xil genom strukturalarini oldik. Tahlillar Mauve algoritmidan foydalangan holda o'zgartirish yo'li bilan konservativ genom ketma-ketliklarni ko'p marotaba to'g'irlash orqali amalga oshirildi [9].

Nisbatan ko'proq konservativ DNK hududlarini o'z ichiga olgan bloklarni aniqlash uchun biz "bash skript" tilidan foydalangan holda dastur yozdik, bu esa bizga eng kichik genetik masofalarga ega (eng konservativ ketma-ketliklarni o'z ichiga olgan) bloklarni saralab olish imkonini yaratib berdi.

Masofaviy matritsalar ma'lumotlarini tahlil qilish natijasida har bir alohida blok uchun biz 480 genni o'z ichiga olgan 77 ta blokni tanlab oldik. Keyinchalik, eng informatsion ketma-ketlikka ega genlarni aniqlash uchun (konservativ va polimorf hududlar o'rtasidagi muvozanat), har bir genni to'g'irlash maqsadida o'rtacha entropiya qiymatini hisoblash uchun R dasturiy tilida skript (kichik dastur) yozildi. *Erwinia* 17 ta turlari genomlarini unifikasiyalangan annotatsiyasi uchun "Prokka" dasturidan foydalanildi [10]. Bunday filtrlash natijasida biz 20 ta genni aniqlashga erishdik, bu esa keyinchalik *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. tasmaniensis* va *E. billingiae* kabi boshqa turlarni informatsion tahlil qilish imkonini beradi.

TAXLIL NATIJALARI VA HULOSA

Natijada, biz ikki xil turdagi test tizimlari uchun praymer va zondlar ishlab chiqdik - AS-PZR - allel spesifik PZR [11] va FLASH-PZR - "so'nggi nuqta" deteksiyasi PZR [12]. So'ngra, O'zbekiston Respublikasi Qishloq Xo'jaligi

Vazirligi huzuridagi O'simliklar karantini va himoyasi agentligi tomonidan taqdim etilgan *E. amylovora* ning 8 ta shtammlari ustida ishlab chiqilgan yangi tizim prototiplarini laboratoriya sinovlaridan o'tkazdik. Manfiy nazorat sifatida biz *E. coli*, *A. tumefaciens*, *P. syringae* kabi boshqa bakteriya shtammlaridan, shuningdek, behidan ajratilgan *Erwinia* shtammidan foydalandik. Olingan ma'lumotlar va tadqiqot natijalari negizida, biz *E. amylovora* ni aniqlash tizimi uchun yuqori spesifiklik darajasini namoyon etgan genlar asosida ishlab chiqilgan praymer hamda zondlarni tanlab oldik. Ayni paytda biz tomondan ishlab chiqilgan har ikki turdagi test tizimlari uchun ixtiro patentini olish maqsadida Intelektual mulk agentligiga hujjatlar tayyorlanmoqda. Ishlab chiqilgan tizimning yakuniy ko'rinishlarini sinovdan o'tkazish uchun O'zbekiston Respublikasi Qishloq Xo'jaligi Vazirligi huzuridagi O'simliklar karantini va himoyasi agentligiga taqdim etish uchun hozirlanmoqda. Ushbu mahalliy tizim nafaqat chet davlatlardan import qilinayotgan analoglariga nisbatan arzon, balki ular bilan bimalol raqobatlasha oladigan, yuqori sezuvchanlikka ega ekanligi bilan ham ajralib turadi.

ADABIYOTLAR

1. FAO. (2017). Диагностический протокол *Erwinia amylovora*.
2. Thomson, S.V. 2000. Epidemiology of fire blight. In J. Vanneste, ed. Fire blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, pp. 9–36. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.
3. Van der Zwet, T. & Beer, S. 1995. Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. USDA Agricultural Information Bulletin, No. 631.
4. Zhao Y. & Qi M. (2011). Comparative genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species-what do we learn? *Genes*, 2(3), 627–639. <https://doi.org/10.3390/genes2030627>
5. Moltmann, E., Fried, A., Seibold, A. and Lange, E. (2006). MORE RESULTS OF TESTING CONTROL AGENTS FOR FIRE BLIGHT IN THE FIELD

WITH A NEW EXPERIMENTAL DESIGN. Acta Hortic. 704, 253-258
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.35>

6. “O’SIMLIKLAR KARANTINI TO’G’RISIDA”GI O’ZBEKISTON RESPUBLIKASI QONUNIGA O’ZGARTISH VA QO’SHIMCHALAR KIRITISH HAQIDA 09.07.2018 yildagi O’RQ-484-son.
7. Kube M, Migdoll AM, Gehring I et al. (2010). Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. BMC Genomics 11:1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-393>
8. Barbé S, Bertolini E, Roselló M, Llop P & López MM. (2014). Conventional and real-time PCRs for detection of *Erwinia piriflorinigrans* allow its distinction from the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. Applied and Environmental Microbiology, 80(8), 2390–2398.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03626-13>
9. Darling AE, Mau B, Perna NT (2010) progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. PLoS One 5:e11147
10. Хуршут Э., Базаров Р., Базаров Д., Салахутдинов И. (2023). Аннотирование геномов прокариот на примере бактерий рода *Erwinia*. Ta’lim, fan va innovatsiya ISSN 2181-8274, 5, 36-41.
<https://scienceweb.uz/publication/4523>
11. Egamberdiev SS, Salahutdinov IB, Abdullaev AA. (2014) Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 3 by single-base extension method and allele-specific polymerase chain reaction. Can J Plant Pathol 36:216–223.
<https://doi.org/10.1080/07060661.2014.905496>
12. Pirc M, Ravnikar M, Tomlinson J, Dreo T. (2009). Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. Plant Pathol 58:872–881.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02083.x>