



O'ZBEKISTON FLORASIDA TARQALGAN ENDEM SCORPIRIS OST TURKUMI TURLARINING JOYLASH VA POLIMORF HUDUDLARNI ANIQLASH

Ortikov Elyor Abdumajidovich

Turan International University, Gumanitar fanlar va pedagogika kafedrası, PhD.

E-mail: sabirli.87.1@gmail.com, Tel: +99894 307-06-87

Mustafina Feruza Usmanovna

O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Botanika instituti huzuridagi akademik

F.N.Rusanov nomli Botanika bog'i biotexnologiya laboratoriyasi mudiri, b.f.n.

E-mail: mustafinaferuza@yahoo.com, Tel: +99890 023-17-76

^{1,2}**G'ulomov Rustamjon Komiljon o'g'li**

¹University of business and science, Umumkasbiy fanlar kafedrası, PhD.

²Namangan davlat universiteti, Biologiya kafedrası katta o'qituvchisi, PhD

E-mail: gulomovr92@mail.ru, Tel: +99893 409-45-00

Odiljonova Feruza Akramjon qizi

Namangan davlat universiteti, Biologiya ta'lim yo'nalishi, 3-bosqich talabasi

Tel: +99897 200-17-24

Annotatsiya: Ushbu maqolada, O'zbekiston florasida tarqalgan, endem, *Scorpiris* ost turkumi vakillari, *Iris orchioides*, *Iris hippolyti*, *Iris magnifica* va *Iris svetlanae* turlarining, *rbcL* markeriga asoslangan holda, o'zgaruvchan polimorf hududlarini aniqlanish haqida ma'lumotlar keltirildi.

Kalit so'zlar: *Bold sistema, polimorf, praymer, Gen bank, CTAB, DNK.*

Аннотация: В данной статье представлена информация по выявлению переменных полиморфных районов видов *Iris orchioides*, *Iris hippolyti*, *Iris magnifica* и *Iris svetlanae*, эндемичных для флоры Узбекистана, на основе маркера *rbcL*.

Ключевые слова: *Bold System, полиморф, праймер, банк генов, CTAB, ДНК.*

Annotation: This article provides information on the identification of variable polymorphic regions of the species *Iris orchioides*, *Iris hippolyti*, *Iris magnifica* and *Iris svetlanae* endemic to the flora of Uzbekistan, based on the *rbcL* marker.

Key words: *Bold System, polymorph, primer, Gene Bank, CTAB, DNA.*

KIRISH.

Taksonomistlarga 1,7 million turni tavsiflash uchun ikki asrdan ko'proq vaqt kerak bo'ldi, biroq bu raqamlar bilan Yerdagi haqiqiy biologik xilma-xillik to'liq baholagan deb aytib bo'lmaydi [1].

Avvalgi qo‘llanilib kelinayotgan usullarda bir qator kamchiliklar mavjud bo‘lib, birinchidan, turlarni tanib olish uchun ishlatiladigan belgilardagi fenotipik va genetik o‘zgaruvchanlik noto‘g‘ri identifikatsiyaga olib kelishi mumkin, ikkinchidan, morfologik kalitlar ko‘pincha hayotning faqat ma‘lum bir bosqichi uchungina samarali bo‘lganligi sababli, ko‘plab turlarni aniqlab bo‘lmaydi [2]. Bu o‘z navbatida morfologiyaga asoslangan identifikatsiya tizimlarida o‘ziga xos bo‘lgan yangi yondashuv zarurligidan dalolat beradi.

So‘nggi bir necha o‘n yilliklarda biologik materiallarni taksonomik identifikatsiyalash uchun muntazam ravishda qo‘llaniladigan eski ana‘naviy usullarda o‘zgarishi yuz berdi [3].

Molekulyar usullar tez va qulayroq ekanligini hisobga olib, dunyo miqyosida olimlar tomonidan tur darajasida identifikatsiya qilish uchun, genomning o‘zgaruvchan uchastkalari markerlariga asoslangan DNK shtrix kodi texnologiyasidan foydalanilmoqda. DNK shtrix-kodi, taksonomik identifikatsiyaga bevosita yordam berib, u turlarda universal mavjud bo‘lgan ketma-ketlik o‘zgarishiga ega bo‘lgan standart qisqa genom mintaqalaridan foydalanadi [4].

DNK shtrix kodlashning asosiy g‘oyasi standart genom mintaqalarining DNK ketma-ketligiga asoslangan DNKning qisqa bo‘laklarini topish mumkinligiga asoslanadi, ular turlar ichida juda kichik darajada farqlanadi.

ADABIYOTLAR TAHLILI. Evolyutsion munosabatlarni o‘rganish uchun bitta gendagi nukleotidlar ketma-ketligi farqlaridan foydalanishni birinchi marta Karl Vouz tomonidan keng qo‘llanildi [4]. Hayvonlar uchun DNK shtrix kodi mitoxondrial geni *Cox1* aniqlangan bo‘lib, u turlarni aniqlash hamda buzilgan materiallardan turlarni aniqlashga yordam berishda (masalan, tahdid ostidagilar savdosini nazorat qilish) qo‘llaniladi, biroq bu marker o‘simliklar olamida turlarni to‘liq ajratish uchun yetarli emas [6,8].

O‘simlik yadrosida joylashgan genlar ko‘pincha bir nechta nusxada uchraydi va juda o‘zgaruvchan xususiyatga ega bo‘lib, bu o‘simliklarni shtrix-kodlashda o‘ziga xos genlarni tanlash praymerlar dizaynini yaratishni qiyinlashtiradi [8]. O‘simlik DNK shtrix kodini izlash davomida shtrix-kod markerlari sifatida foydalanish uchun xloroplast genomining genlariga asoslanib bir nechta kodlash genlari *accD*, *atpF-atpH*, *matK*, *nhdJ*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, va bir nechta spaserlar *trnH-psbA*, *atpF-atpH* va *psbK-psbI* turlari o‘simlik oilalari orasida olib borilgan tadqiqotlarga asoslanib tanlangan [7,9,10]. Hayotni shtrix kodlash konsorsiumining (CBOL) o‘simliklar bilan ishlovchi ishchi guruhi (PWG) ikkita plastid genlari, *rbcL* va *matK* mintaqalarini standart o‘simlik DNK shtrix kodlari sifatida qabul qilishni tavsiya qildi [9,11].

Keltirilgan shtrix-kod genlari orasida *rbcL* o‘simlik shtrix-kodi uchun eng istiqbolli nomzodlardan biri hisoblanadi. Ushbu genning afzalliklari shundaki, u ko‘pchilik quruqlikdagi o‘simliklarda osongina ko‘paytiriladi va u filogenetik tadqiqotlarda o‘simlik oilalari ichida joylashgan taksonni ishonchli o‘rnini ko‘rsatish uchun xizmat qiladigan markaziy lokus sifatida qaraladi [12]. Biroq, bu hududlar o‘simliklardagi mutatsiyalar darajasining hayvonlarga nisbatan pastroq ekanligini inobatga olib, o‘simlik turlarini maksimal darajada aniqlash uchun shtrix kodni talab qilishi mumkin [13,14].

Joriy tadqiqotning maqsadi *I. orchioides*, *I. hippolyti*, *I. magnifica* va *I. svetlanae* turlari misolida DNK shtrix kodlash texnologiyasini *rbcL* markeriga asoslangan holda BOLD sistemasi ko‘rsatkichlaridan foydalanib tahlillarni amalga oshirishdan iborat.

Tadqiqotlar DNK shtrix-kod texnologiyasidan foydalangan holda O‘zbekistonning noyob va yo‘qolib borayotgan o‘simlik turlarini genetik inventarizatsiya qilish loyihasi asosida tayyorlangan.

TADQIQOT METODOLOGIYASI. *I. orchioides* Angren shahri yaqinidagi Yangiobod qishlog‘i atrofidan (41.1584539722°E, 70.1405199722°N), *I. hippolyti* Konimex tumani Navoiy viloyati hududida joylashgan Ko‘kchatog‘ tog‘idan (40.534099°E, 65.032523°N), *I. magnifica* turi Samarqand viloyati Urgut tumani va Qashqadaryo viloyatining Kitob tumanlari o‘rtasi Taxtaqoracha dovonidan (39.301799°E, 66.937888°N), *I. svetlanae* Surxondaryo viloyati Boysun tumani Rabot qishlog‘idan (38.171522°E, 67.237472°N) mazkur turlar namunalari terildi. Turlar aniqlagichlarga asoslangan holda aniqlandi. Ushbu turlardan gerbariy namunalari terish bilan bir qatorda barglaridan DNK ajratish uchun namunalar olindi. Namunalar silikagel yordamida quritildi va CTAB usuli yordamida har bir turdan DNK ajratib olindi [15]. Ajratib olingan DNK ning sifati ikki usul bilan baholandi:

A. agaroz gel va elektroforez orqali.

B. yutilish darajasini spektrofotometrik baholash.

Gel elektroforezi usuli TBE buferi yordamida 1,2% agaroz gelida amalga oshirildi. Agaroz gel elektroforezi izolyatsiya qilingan nuklein kislotaning miqdori va sifatini vizual baholash uchun ishlatiladi. Bromfenol ko‘k interkalatsiya qiluvchi vosita sifatida ishlatildi. Spektrofotometrik o‘lchashda nuklein kislotalarning tozaligi va sifatini baholash uchun namunaning tozaligi 230, 260 va 280 nm to‘lqin uzunliklarida optik zichliklarining nisbati asosida aniqlandi. Nuklein kislotalar 260 nm to‘lqin uzunligida maksimal yutilishga ega, aksariyat oqsillar 280 nm, organik birikmalar va tuzlar 230 nm uzunlikdagi to‘lqin uzunligida yutiladi. Sof nuklein kislotalar uchun 260/280 nisbati 1,8-2,2 oralig‘ida bo‘lishi kerak va optimal ravishda DNK va RNK uchun mos ravishda ~1,8 va ~2,0 ni tashkil qiladi. 260/280 indikatorining pastroq qiymatlari bo‘lsa, preparat tarkibida 280 nm da sezilarli singdiruvchanlikka ega bo‘lgan oqsil, fenol yoki boshqa ifloslantiruvchi moddalarning katta miqdordagi aralashmalari mavjud. DNK yoki RNK preparatining tozaligining yana bir ko‘rsatkichi 260/230 absorbans nisbati hisoblanadi. Sof reaktiv vositasida bu nisbat odatda 1,8 - 2,2 ni tashkil qiladi. 260/230 koeffitsientining pastroq qiymatlari preparatning DNK yoki RNK ekstraksiyasidan keyin qolgan komponentlar bilan ifloslanganligini ko‘rsatadi.

Ekstraksiya qilingan DNKning miqdori va sifati gel elektroforezi va NanoPhotometr N60 Spektrofotometri (Implen, GMBH Germaniya) yordamida aniqlandi.

PCR jarayoni. PCR kuchaytirilishi quyidagi dastur yordamida amalga oshirildi: 94°C da dastlabki DNK erishi - 3 min, 1 tsikl; 94°C da keyingi 35 tsikl – 30 sek; 54°C — 45 s; 72°C – 45 sek va 72°C da 10 min 1 tsikl, 15°C da cheksiz uzaytirish olib borildi.

Praymerlar namunalarni sekvinerlash jarayoniga tayyorlash. Primerlar O‘zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi O‘simlik moddalari kimyosi institutida 2020-yil sentabr oyida kelishuv asosida sintez qilingan. Namunalarni sekvinerlash jarayoniga tayyorlashda quyidagi reaktivlardan foydalanildi:

1. Thermo Scientific DreamTaq Hot start PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher, U.S.A.).

Sekvinerlash jarayoni. DNK mahsulotlari tarkibidagi qo‘shimchalar va tuzlardan tozalanganidan so‘ng ABI Prism 3500 genetik analizatorida ketma-ketlik (Applied Biosystems, AQSH), sekvinerlandi.

NATIJALAR VA MUHOKAMA. O‘simlik shtrix kodini tanlash bo‘yicha umumiy xulosaga kelishning eng katta qiyinchiliklaridan biri barcha alternativ belgilarini va keng diapazondagi taksonomik tanlamalarni qamrab oluvchi qiyosiy ma‘lumotlarning kamligi edi. Hayot shtrix-kodi konsorsiumi (CBOL) ishchi guruhi markerlar ustida olib borgan tajribalari va samaradorlikni sinovdan o‘tkazgandan so‘ng, asosiy shtrix-kod sifatida *rbcL* va *matK* va qo‘shimcha shtrix-kod sifatida *trnH-psbA* intergenik spayserdan foydalanishni taklif qildi [11].

O‘zbekiston florasida tarqalgan *Iris* L. turkumiga mansub bo‘lgan *I.svetlanae*, *I.magnifica*, *I.orchoides* va *I.hippolyti* turlaridan olingan 12 ta namunalarning nukleotidlar ketma ketligi *rbcL* markerlariga asoslangan holda ketma-ketlashtirildi. *rbcL* markerlariga asoslangan xloroplast genining 533 b.p dan 542 b.p gacha bo‘lgan ketma-ketlik mintaqasi o‘qildi.



1-Rasm. *Iris* turkumiga mansub 8 turlarining kontiglar to‘plami

Konsensus ketma-ketligi to‘g‘ridan-to‘g‘ri va teskari ketma-ketliklarning identifikatsiya indeksi 100% bo‘lgan nukleotidlar ketma ketligi yaratildi. *I.svetlanae*, *I.magnifica*, *I.orchoides* va *I.hippolyti* turlarining 12 ta namunasi, shuningdek, *I.collettii* (KP089558), *I.scariosa* (KP089582), *I.germanica* (KX518304) va *I.japonica* (KX518309) ning to‘rtta mos nukleotidlari (KX518309) CLUSTAL W dasturi yordamida tekislandi va xatolar tahlil qilindi. Fasta formatidagi *I.svetlanae*, *I.magnifica*, *I.orchoides* va *I.hippolyti* turlarining yaratilgan nukleotidlar ketma-ketligi, shuningdek, .ab1 formatidagi fayllar (Trace fayllari) BOLD tizimiga yuklandi (1-rasm).

Polimorf hududlarning olingan nukleotidlar ketma-ketligi tarkibida mavjudligi tekshirildi. *I.svetlanae*, *I.magnifica*, *I.orchioides* va *I.hippolyti* turlari uchun 10 ta yagona polimorfik mintaqalar (SNP) topildi. (1-jadval).

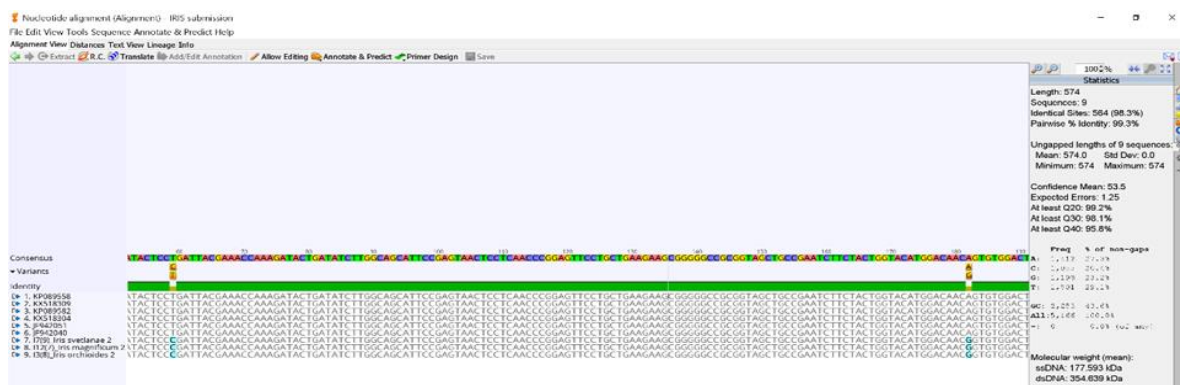
1-Jadval

Polimorf hududlar *Iris* (marker – *rbcL*)

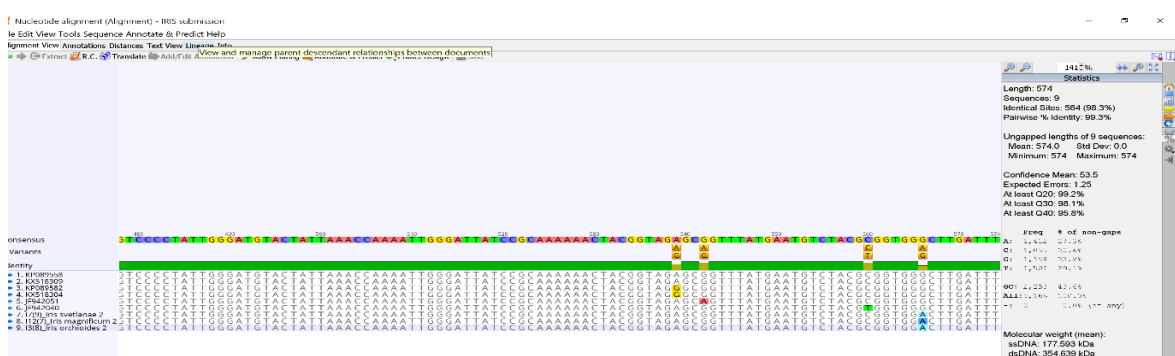
№	Polimorf. uchastka	Joylashuv	Uzunlik	Uchrash chastorasi	
1	C	59	1 n.j.	33,3%	3 rasm
2	T	59	1 n.j.	66,7%	
3	A	182	1 n.j.	66,7%	
4	G	182	1 n.j.	33,3%	
5	C	323	1 n.j.	77,8%	4 rasm
6	T	323	1 n.j.	22,2%	
7	C	390	1 n.j.	66,7	
8	T	390	1 n.j.	33,3	
9	A	566	1 n.j.	33,3	5 rasm
10	G	566	1 n.j.	66,7	

O‘rganilayotgan 4 ta turlar uchun *rbcL* hududi konservativ bo‘lib hisoblanadi. Keltirilgan 9 ta nukleotid uchun *rbcL* mintaqalarining identifikatsiyasi, shu jumladan GenBankdan yuklab olinganlar, 99,3% ni tashkil etadi. 10 ta polimorf maydon aniqlandi (3-5-rasmlar). Shuni ta’kidlash kerakki, aniqlangan yagona polimorf hududlar o‘rganilayotgan turlarni nukleotidlar ketma-ketligi GenBankdan yuklab olingan turlardan ajratib turadi: *I.collettii* (KP089558), *I.scariosa* (KP089582), *I.germanica* (KX518304) va *I.japonica*. (KX518309).

Yagona nukleotid polimorfizmlari №1, №4, №7 и №9 yani *I.svetlanae*, *I.magnifica*, *I.orchioides* va *I.hippolyti* turlarda uchradi. Bu nukleotid polimorfizmi NCBI bazasidan olingan quyidagi turlarda uchramadi: *I.collettii* (KP089558), *I. scariosa* (KP089582), *I.germanica* (KX518304) va *I.japonica* (KX518309). Yagona nukleotid polimorfizmlari №2, №3, №8 и №10 *I. collettii* (KP089558), *I. scariosa* (KP089582), *I. germanica* (KX518304) va *I. japonica* (KX518309) turlarida uchraydi. O‘rta Osiyoda tarqalgan *I.svetlanae*, *I.magnifica*, *I.orchioides* va *I.hippolyti* turlarida uchramasligi qayd etildi. Qiziq tomoni shunda-ki, yagona polimorf hudud sifatida faqatgina *I. svetlanae* va *I. magnifica* turlarida № 6 sayt topilgan bo‘lsa, qolgan *I. collettii* (KP089558), *I. scariosa* (KP089582), *I.germanica* (KX518304) va *I.japonica* (KX518309), turlardan o‘ziga xos bo‘lgan № 5 sayt aniqlandi.



2-Rasm. Polimorfik hududlar. №1, №2, №3, №4 turlar uchun



3-Rasm. Polimorfik hududlar №5, №6, №7, №8, №9 va №10 turlar uchun

XULOSA. O‘zbekiston qizil kitobiga kiritilgan endem, kamyob va yo‘qolib ketish xavfi ostida turgan *Iris* L. turkumi turlarini DNK shtrixkodlash texnologiyasi asosida turlarda uchraydigan polimorf uchastkalarni aniqlandi. Kelgusida ushbu turlar uchun mos bo‘lgan praymerlar dizayni va sintezini amalga oshirish uchun qimmatli tavsiyalar beradi. Bu esa iqtisodiy va amaliy jihatdan ahamiyatga egadir.

O‘zbekiston qizil kitobiga kiritilgan Iridaceae oilasi vakillarining 4 turidan olingan 12 ta namuna uchun STAB usulidan foydalangan holda DNK ekstraksiyasi jarayoni sinovdan o‘tkazildi va optimallashtirildi.

Komponentlarning konsentratsiyasini optimallashtirish, tsentrifuga tezligini o‘zgartirishga ta’sir ko‘rsatadigan o‘zgartirishlar konsentratsiyasi ≥ 50 ng/ μ l, A 260/280 - $1,8 \pm 0,1$ va A 260/ konsentratsiyasi bilan DNKni ajratish imkonini berdi. Praymer sinovi, olingan sinov namunalari uchun *rbcL* primerlari yordamida yaxshi natijalarni ko‘rsatdi.

Praymer tanlashdan tashqari, optimal harorat sinovdan o‘tkazildi. *Iris* turlarida *rbcL* markerlari uchun maqbul optimal harorat 56°C ekanligi qayd etildi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935-1943.
2. Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
3. Meiklejohn, K. A., Damaso, N., & Robertson, J. M. (2019). Assessment of BOLD and GenBank—Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. *PloS one*, 14(6), e0217084.
4. Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811.
5. Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928.
6. Hebert, P. D., DeWaard, J. R., Zakharov, E. V., Prosser, S. W., Sones, J. E., McKeown, J. T., & La Salle, J. (2013). A DNA ‘Barcode Blitz’: Rapid digitization and sequencing of a natural history collection. *PloS one*, 8(7), e68535.
7. Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928.
8. Yu, J., XUE, J. H., & ZHOU, S. L. (2011). New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 176-181.
9. CBOL Plant Working Group 1, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
10. Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS one*, 2(6), e508.
11. Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*, 6(5), e19254.
12. Adams, E. R., Hamilton, P. B., Malele, I. I., & Gibson, W. C. (2008). The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(4), 439-444.

13. Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374.
14. Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 1-2.
15. Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer, Berlin, Heidelberg