DOI 10.66073/ReFocus-Conf/3010039

BACILLUS THURINGIENSIS Bt1Fo SHTAMMINING TANLANGAN *cry1Ia* GENI UCHUN MUTAGEN PRAYMERLARNI LOYIHALASH VA PCR TAHLILI

Reyimberdiyeva Marjon Zafar qizi[1], **Karimov Nurbek Rayimovich**[2], **Rahimova Sh.Sh.**[1], **Kobilov Fazliddin Bozorovich**[3]
[1] *Toshkent kimyo-texnologiya instituti*
[2] *Mirzo Ulug‘bek nomidagi O‘zbekiston Milliy universiteti*
[3] *O‘zR FA Mikrobiologiya instituti*
marjonreyimberdiyeva@gmail.com

Annotatsiya: *Bacillus thuringiensis* bakteriyalari tomonidan ishlab chiqariladigan Cry oilasiga mansub insektitsid oqsillar qishloq xo‘jaligi zararkunandalariga qarshi biologik kurashda muhim ahamiyatga ega. Avvalgi tadqiqotlarda *Cry1Ia* oqsilining ayrim variantlari shakarqamishning yirik poya zararkunandasi *Telchin licus*ga qarshi faollik ko‘rsatgan. Mazkur ishda Bt1Fo shtammining GenBank bazasida PP897829 kirish raqami bilan saqlangan *cry1Ia* geni asosida adabiyotlarda tavsiflangan aminokislota almashinuvlariga mos praymerlarni loyihalash va PCR natijalarini dastlabki baholash maqsad qilindi. Tadqiqot doirasida D233N, I116T, L266F va E639G mutatsiyalariga mos praymerlar tanlandi hamda PCR amplifikatsiyasi amalga oshirildi. Gel elektroforezi tasvirida to‘rtta namunaning har birida asosiy DNK tasmalari kuzatildi. Olingan natijalar PCR mahsulotlari mavjudligini dastlabki baholash imkonini berdi.
Kalit so‘zlar: Bacillus thuringiensis, Cry1Ia, Bt1Fo, praymer dizayni, PCR, mutagenez.

Аннотация: Инсектицидные белки семейства Cry, продуцируемые бактерией *Bacillus thuringiensis*, играют важную роль в биологическом контроле сельскохозяйственных вредителей. В предыдущих исследованиях была продемонстрирована активность отдельных вариантов белка *Cry1Ia* в отношении крупного стеблевого вредителя сахарного тростника *Telchin licus*. Целью настоящего исследования являлись разработка праймеров, соответствующих описанным в литературе аминокислотным заменам, на основе гена *cry1Ia* штамма *B. thuringiensis* Bt1Fo (номер доступа GenBank: PP897829), а также предварительная оценка результатов ПЦР-амплификации. Были отобраны праймеры, соответствующие заменам D233N, I116T, L266F и E639G, и проведена ПЦР-амплификация. При анализе методом гель-электрофореза во всех четырёх образцах наблюдались выраженные полосы ДНК. Полученные результаты свидетельствуют о предварительном обнаружении продуктов ПЦР.
Ключевые слова: Bacillus thuringiensis; Cry1Ia; Bt1Fo; дизайн праймеров; ПЦР; мутагенез

Abstract: Insecticidal proteins of the Cry family, produced by *Bacillus thuringiensis*, play an important role in the biological control of agricultural pests. Previous studies have demonstrated the activity of certain *Cry1Ia* protein variants against the sugarcane giant borer, *Telchin licus*. This study aimed to design primers targeting amino acid substitutions previously described in the literature, based on the *cry1Ia* gene from *B. thuringiensis* strain Bt1Fo (GenBank accession number: PP897829), and to perform a preliminary assessment of PCR amplification results. Primers corresponding to the D233N, I116T, L266F, and E639G substitutions were selected, and PCR amplification was

IQTIBOS UCHUN
Reyimberdiyeva M.Z., Karimov N.R., Rahimova Sh.Sh., Kobilov F.B. Bacillus thuringiensis Bt1Fo shtammining tanlangan cry1Ia geni uchun mutagen praymerlarni loyihalash va PCR tahlili // Fundamental va amaliy mikrobiologiyaning bugungi holati va rivojlanish istiqbollari: yosh olimlar nigohi: Respublika ilmiy-amaliy anjumani materiallari. – Toshkent, 2026. – B. 155–159.
DOI: https://doi.org/10.66073/ReFocus-Conf/3010039

performed. Gel electrophoresis revealed prominent DNA bands in all four samples. These findings provide preliminary evidence of PCR product generation.

Keywords: Bacillus thuringiensis; Cry1Ia; Bt1Fo; primer design; PCR; mutagenesis.

Kirish

Bacillus thuringiensis qishloq xo‘jaligi zararkunandalariga qarshi biologik kurashda keng qo‘llaniladigan, insektitsid xususiyatga ega oqsillar ishlab chiqaruvchi Gram-musbat bakteriyadir [1]. Ushbu bakteriya hosil qiladigan Cry oqsillari sezgir hasharotlarning ichak epiteliysi bilan o‘zaro ta’sirlashib, hujayra membranasi faoliyatini buzishi va hujayralarning nobud bo‘lishiga olib kelishi mumkin [2,3]. Cry oqsillarini kodlovchi genlardan biologik insektitsid preparatlari hamda zararkunandalarga chidamli genetik modifikatsiyalangan ekinlarni yaratishda foydalaniladi [4]. Biroq Cry toksinlarining biologik samaradorligi hasharot turlari orasida farq qiladi. Ularning faolligi oqsilning molekulyar tuzilishi, proteolitik faollashuvi, nishon organizm ichak hujayralari bilan o‘zaro ta’siri va hasharotning fiziologik xususiyatlariga bog‘liq [5]. Shu sababli Cry oqsillarining aminokislota ketma-ketligi va biologik funksiyasi o‘rtasidagi bog‘liqlikni o‘rganish ularning ta’sir mexanizmlarini tushunish va yangi variantlarini tadqiq etish uchun muhim ilmiy yo‘nalish hisoblanadi.

Cry oqsillari oilasida Cry1I guruhi o‘zining molekulyar xususiyatlari va turli hasharot taksonlariga qarshi qayd etilgan biologik faolligi bilan ajralib turadi. Ruiz de Escudero va hammualliflari *Cry1Ia* 7 oqsilini molekulyar va insektitsid xususiyatlari jihatidan tavsiflab, uning Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae oilalari hamda Chrysomelidae oilasining ayrim vakillariga qarshi faolligini ko‘rsatgan [6]. Cry1I oqsillarining nishon organizmlar bilan o‘zaro ta’sirini o‘rganish ularning tabiiy insektitsid xususiyatlarini tavsiflash bilan bir qatorda, oqsil ketma-ketligidagi o‘zgarishlarning biologik faollikka ehtimoliy ta’sirini baholash uchun ham asos yaratadi. *Cry1Ia* 12 oqsilini ifodalovchi transgen g‘o‘za o‘simliklari bilan bog‘liq tadqiqotlar ham ushbu oqsil guruhining qishloq xo‘jaligi zararkunandalariga qarshi qo‘llash imkoniyatlarini o‘rganish muhimligini ko‘rsatadi [7].

Cry1Ia oqsilining xususiyatlarini o‘zgartirish imkoniyatlarini namoyish etgan muhim tadqiqotlardan biri Craveiro va hammualliflari tomonidan amalga oshirilgan. Mualliflar o‘simliklarda ekspressiya qilishga moslashtirilgan, C-terminal qismi qisqartirilgan sintetik *Cry1Ia* 12 oqsili — *Cry1Ia* 12synth variantlarini DNA shuffling va phage display yondashuvlarini birlashtirish orqali o‘rgangan. Olingan variantlar shakarqamishning yirik poya zararkunandasi Telchin licus licusga qarshi tekshirilgan va to‘rtta variantda insektitsid faollik aniqlangan [8]. Tadqiqotda faol variantlar tarkibidagi aminokislota almashinuvlari tahlil qilinib, ularning oqsilning ehtimoliy strukturaviy va funksional xususiyatlari bilan bog‘liqligi muhokama qilingan [8]. Ushbu natijalar *Cry1Ia* oqsilining ketma-ketligini maqsadli o‘rganish uchun ilmiy asos yaratadi. Biroq muayyan aminokislota almashinuvining funksional ahamiyatini faqat ketma-ketlik yoki strukturaviy taxmin asosida aniqlab bo‘lmaydi; buning uchun molekulyar tahlil va tegishli biologik sinovlar talab etiladi [5].

Kobilov va hammualliflari O‘zbekistonda ajratib olingan Bt1Fo shtammining insektitsid oqsillari bilan bog‘liq genetik xususiyatlarini o‘rganib, tegishli molekulyar ma’lumotlarni taqdim etgan [9]. Mazkur tadqiqotda Bt1Fo shtammining cry1Ia geni uchun GenBank bazasida PP897829 kirish raqami bilan saqlangan nukleotid ketma-ketligi referens sifatida tanlandi. Ushbu ketma-ketlik asosida maqsadli hududlar aniqlandi, praymerlar loyihalashtirildi va keyingi eksperimental tekshiruvlar rejalashtirildi. 1-jadvalda keltirilgan praymerlar Bt1Fo shtammining *cry1Ia* geni referens nukleotid ketma-ketligi asosida D233N, I116T, L266F va E639G aminokislota almashinuvlariga mos keluvchi hududlarni nishonga olish uchun loyihalashtirildi. Shuningdek, ushbu praymerlar yordamida olingan PCR mahsulotlarini dastlabki baholash va maqsadli hududlarning sekvenslash uchun yaroqliligini aniqlash ko‘zda tutildi.

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010039

1-jadval. *cry1Ia* genining tanlangan hududlarini amplifikatsiya qilish va sekvenslash uchun mo‘ljallangan praymerlar

Nishon hudud	Praymer	Nukleotid ketma-ketligi (5′–3′)	Havola
I116T	I116T-For	CAAAAAACTTCAACTTATGCAAGAAATAAAG	[10]
I116T	I116T-Rev	GAAGTTTTTGATTAATAATCTCTTCTACATG	
D233N	D233N-For	TTATTCCAACCATTTGTGAAAATGGTATAG	
D233N	D233N-Rev	ATGGTTGGAATAATCTCCTGCTCGTTCGAC	
L266F	L266F-For	GACTTTCATGGTACTAGATTTAGTGG	
L266F	L266F-Rev	CATCAAAGTCATGTCTCTACGGAATTG	
E639G	E639G-For	GAATTGGCTTTGTTCGGTAGAAG	
E639G	E639G-Rev	AAGCCAATTCTATCTATATAAACTTC	

Materiallar va usullar

Referens ketma-ketlik va nishon aminokislota almashinuvlarini tanlash

B. thuringiensis Bt1Fo shtammining cry1Ia geni uchun GenBank ma’lumotlar bazasida PP897829 kirish raqami bilan saqlangan nukleotid ketma-ketligi praymerlarni loyihalashda referens ketma-ketlik sifatida tanlandi [9]. Nishon aminokislota almashinuvlari — D233N, I116T, L266F va E639G — Craveiro va hammualliflari tomonidan tavsiflangan Cry1Ia 12synth variantiga oid ma’lumotlar asosida belgilandi [8]. Mazkur aminokislota almashinuvlarining Bt1Fo shtammining Cry1Ia oqsilidagi mosligini baholash uchun tegishli aminokislota ketma-ketliklari SnapGene dasturida o‘zaro taqqoslandi. Taqqoslash natijalari asosida nishon pozitsiyalariga mos keluvchi hududlar aniqlandi va ushbu hududlarni qamrab oluvchi praymerlarni loyihalash uchun nukleotid ketma-ketliklari tanlandi. Loyihalangan praymerlar keyingi PCR amplifikatsiyasi va sekvenslash orqali nishon hududlarini eksperimental tekshirish uchun mo‘ljallandi.

Praymerlarni loyihalash

To‘rtta nishon aminokislota almashinuviga mos keluvchi nukleotid hududlarini amplifikatsiya qilish uchun praymer juftlari loyihalandi. Keyingi sekvenslash bosqichida foydalanish maqsadida Seq F, Seq R va Seq F mid deb belgilangan qo‘shimcha sekvenslash praymerlari ham tanlandi. Tadqiqotda foydalanilgan barcha praymerlarning nomlari va nukleotid ketma-ketliklari 1-jadvalda keltirilgan. Nukleotid ketma-ketliklari 5′ dan 3′ yo‘nalishda taqdim etildi.

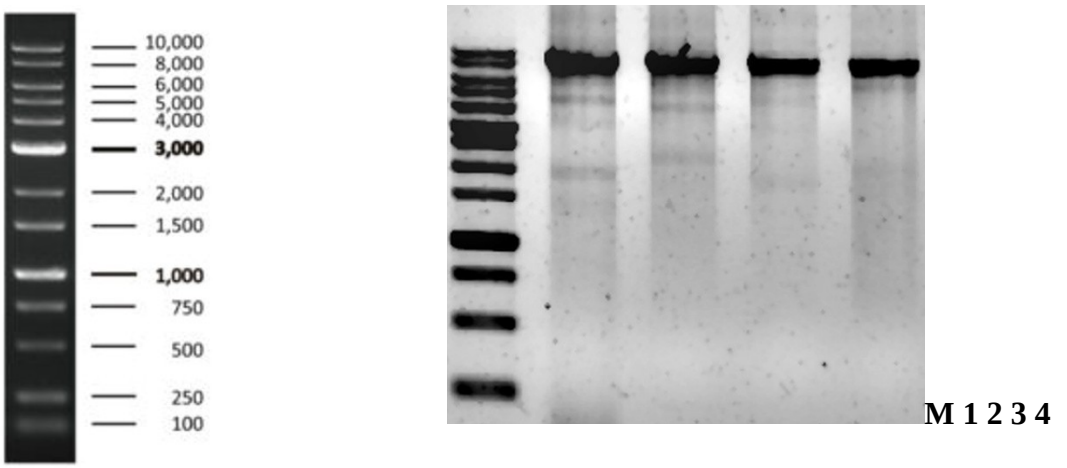
Natijalar

PCR mahsulotlarini agarozali gel elektroforezi yordamida tahlil qilish

PCR amplifikatsiyasi natijasida olingan mahsulotlar agarozali gel elektroforezi yordamida tahlil qilindi. DNK fragmentlarining taxminiy uzunligini aniqlash uchun 1 kb DNK molekulyar markeri ishlatildi. Elektroforez 1% li agarozali gelda o‘tkazildi. DNK fragmentlarini vizualizatsiya qilish uchun etidiy bromid, namunalarning gel bo‘ylab harakatini kuzatish uchun esa bromfenol ko‘ki ishlatildi.

Elektroforez natijalari gel tasvirlari asosida baholandi. Hosil bo‘lgan DNK fragmentlarining elektroforetik harakatchanligi va taxminiy uzunligi tahlil qilinib, PCR amplifikatsiyasining dastlabki natijalari baholandi. Ushbu tahlil maqsadli hududlarning amplifikatsiyalanganligini dastlabki baholash imkonini berdi.

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010039



1-rasm. *cry1Ia* genining nishon hududlariga mos PCR mahsulotlarini agarozali gel elektroforezi yordamida tahlil qilish (1% agarozali gel. M — 1 kb DNK molekulyar markeri; 1 — D233N; 2 — I116T; 3 — L266F; 4 — E639G aminokislota almashinuvlariga mos keluvchi nishon hududlaridan olingan PCR mahsulotlari)

Bt1Fo shtammining *cry1Ia* geni uchun tanlangan D233N, I116T, L266F va E639G nishon hududlarini amplifikatsiya qilish maqsadida PCR reaksiyalari amalga oshirildi. Agarozali gel elektroforezi natijasida to‘rtta namunaning har birida yaqqol DNK fragmentlari kuzatildi (1-rasm). Ushbu natijalar barcha to‘rtta PCR reaksiyasida amplifikatsiya mahsulotlari hosil bo‘lganini dastlabki baholash imkonini berdi.

Muhokama

Mazkur tadqiqot Bt1Fo shtammining *cry1Ia* geni referens ketma-ketligi asosida Cry1Ia oqsilidagi tanlangan aminokislota almashinuvlariga mos hududlarni amplifikatsiya qilish uchun praymerlarni loyihalash va PCR tahlilining dastlabki bosqichini tavsiflaydi. Tadqiqotning dolzarbligi Cry oqsillarining tuzilishi va biologik xususiyatlarini maqsadli o‘zgartirish imkoniyatlarini o‘rganish bilan bog‘liq. Avvalgi tadqiqotlar insektitsid oqsillarga kiritilgan aminokislota almashinuvlari ularning funksional xususiyatlariga ta’sir qilishi mumkinligini ko‘rsatgan. Biroq bunday ta’sirning yo‘nalishi va darajasi oqsil turi, kiritilgan o‘zgarishlarning xususiyati hamda tekshirilayotgan hasharot turiga bog‘liq.

Ushbu ishda Bt1Fo shtammining *cry1Ia* geni uchun GenBank ma’lumotlar bazasida PP897829 kirish raqami bilan saqlangan nukleotid ketma-ketligi referens sifatida tanlandi. Nishon aminokislota almashinuvlari — D233N, I116T, L266F va E639G — Craveiro va hammualliflari tomonidan tavsiflangan Cry1Ia 12synth variantiga oid ma’lumotlar asosida belgilandi. Tegishli hududlarni amplifikatsiya qilish uchun praymerlar loyihalandi va PCR mahsulotlari agarozali gel elektroforezi yordamida dastlabki baholandi. To‘rtta namunada ham DNK fragmentlarining kuzatilishi tanlangan hududlarni keyingi molekulyar tahlil qilish uchun dastlabki asos yaratdi.

Cry1Ia oqsilining faollashuvi, proteolitik qayta ishlanishi, oligomerlanishi va turli hasharotlarga nisbatan biologik faolligi bilan bog‘liq mexanizmlarni o‘rganish Cry oqsillarining funksional xususiyatlarini tushunishda muhim ahamiyatga ega. Shu nuqtayi nazardan, tanlangan aminokislota almashinuvlariga mos hududlarni molekulyar tahlil qilish keyingi tadqiqotlar uchun dastlabki bosqich hisoblanadi. Biroq hozirgi natijalar faqat PCR mahsulotlari hosil bo‘lganini ko‘rsatadi; ular nishon ketma-ketliklarning to‘g‘riligini yoki aminokislota almashinuvlarining mavjudligini o‘z-o‘zidan tasdiqlamaydi.

Keyingi bosqichda PCR mahsulotlarini sekvenslash va olingan ketma-ketliklarni referens *cry1Ia* geni bilan taqqoslash rejalashtiriladi. Bu nishon hududlarning identifikatsiyasini tekshirish va tegishli nukleotid o‘zgarishlarini aniqlash imkonini beradi. Shundan so‘nggina ushbu o‘zgarishlarning Cry1Ia oqsilining xususiyatlariga ehtimoliy ta’siri haqida asoslangan xulosalar chiqarish mumkin.

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010039

Foydalanilgan adabiyotlar

1. E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, D.H. Dean, *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol Mol Biol Rev 62 (1998) 775–806. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998.
2. V. Vachon, R. Laprade, J.-L. Schwartz, Current models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review, Journal of Invertebrate Pathology 111 (2012) 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001.
3. A. Bravo, S.S. Gill, M. Soberón, Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, Toxicon 49 (2007) 423–435. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
4. James C, Global status of commercialized biotech/GM crops, (2016).
5. L. Pardo-López, M. Soberón, A. Bravo, *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection, FEMS Microbiol Rev 37 (2013) 3–22. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x.
6. I. Ruiz De Escudero, A. Estela, M. Porcar, C. Martínez, J.A. Oguiza, B. Escriche, J. Ferré, P. Caballero, Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry1I Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae, Appl Environ Microbiol 72 (2006) 4796–4804. https://doi.org/10.1128/AEM.02861-05.
7. R.S. De Oliveira, O.B. Oliveira-Neto, H.F.N. Moura, L.L.P. De Macedo, F.B.M. Arraes, W.A. Lucena, I.T. Lourenço-Tessutti, A.A. De Deus Barbosa, M.C.M. Da Silva, M.F. Grossi-de-Sa, Transgenic Cotton Plants Expressing *Cry1Ia* 12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (Spodoptera frugiperda) and Cotton Boll Weevil (Anthonomus grandis), Front. Plant Sci. 7 (2016). https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00165.
8. K.I.C. Craveiro, J.E.G. Júnior, M.C.M. Silva, L.L.P. Macedo, W.A. Lucena, M.S. Silva, J.D.A.D.S. Júnior, G.R. Oliveira, M.T.Q.D. Magalhães, A.D. Santiago, M.F. Grossi-de-Sa, Variant *Cry1Ia* toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer, Journal of Biotechnology 145 (2010) 215–221. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.11.011.
9. F.B. Kobilov, P. Li, M.-L.M. Nazirov, M. Chen, S. Miralimova, I. Yakubov, A.M. Asrorov, K. Sohibnazarova, N. Azimova, I. Khalilov, U. Yusupov, Y. Chen, Y. Tang, Z. Mirakbarova, Discovery and expression of insecticidal proteins via genome mining of novel Bacillus thuringiensis strain Bt1Fo, Front. Microbiol. 16 (2025) 1679336. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1679336.
10. W. Lucena, P. Pelegrini, D. Martins-de-Sa, F. Fonseca, J. Gomes, L. De Macedo, M. Da Silva, R. Oliveira, M. Grossi-de-Sa, Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of Bacillus thuringiensis Cry Toxins, Toxins 6 (2014) 2393–2423. https://doi.org/10.3390/toxins6082393.

DOI: 10.66073/ReFocus-Conf/3010039