

**ГЕНЕТИКА ВА ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ
ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.29.08.2017.В.53.01
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

УБАЙДУЛЛАЕВА ХУРШИДА АБДУЛЛАЕВНА

**ВЎЗАНИНГ (*GOSSYPIMUM SSP*) ФИТОХРОМ А1 ГЕНИ РНК
ИНТЕРФЕРЕНЦИЯСИНИНГ ГЕНЕТИК-ХУЖАЙРАВИЙ АСОСЛАРИ
ВА ГЕН-НОКАУТ “ПОРЛОҚ” НАВЛАРИНИНГ ФИЗИОЛОГИК,
БИОКИМЎВИЙ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2019.

Фан доктори (DSc) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавления автореферата докторской (DSc) диссертации
Contents of the abstract of doctoral (DSc) dissertation

Убайдуллаева Хуршида Абдуллаевна

Ѓўзанинг (*Gossypium* ssp) фитохром A1 гени РНК интерференциясининг генетик-хужайравий асослари ва ген-нокаут «Порлок» навларининг физиологик, биокимёвий тадқиқ қилиш 3

Убайдуллаева Хуршида Абдуллаевна

Исследование генно-клеточных особенностей РНК интерференции гена фитохрома A1 хлопчатника (*Gossypium* ssp), а также физиолого-биохимических параметров ген-нокаутных сортов «Порлок»..... 29

Ubaydullaeva Khurshida Abdullaevna

Investigation of genetic and cellular peculiarities of RNA interference of phytochrome A1 gene of cotton (*Gossypium* ssp) as well as physiological, biochemical parameters of RNAi varieties “Porloq” 55

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works..... 59

**ГЕНЕТИКА ВА ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ
ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.29.08.2017.В.53.01
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

УБАЙДУЛЛАЕВА ХУРШИДА АБДУЛЛАЕВНА

**ВЎЗАНИНГ (*GOSSYPIUM SSP*) ФИТОХРОМ А1 ГЕНИ РНК
ИНТЕРФЕРЕНЦИЯСИНИНГ ГЕНЕТИК-ХУЖАЙРАВИЙ АСОСЛАРИ
ВА ГЕН-НОКАУТ “ПОРЛОҚ” НАВЛАРИНИНГ ФИЗИОЛОГИК,
БИОКИМЁВИЙ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2019

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2019.2.DSc/B82 рақами билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Геномика ва биоинформатика марказида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгашнинг веб-саҳифасида (www.genetika.uz) ва «Ziyonet» Ахборот-таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: **Абдурахмонов Иброхим Юлчиевич**
биология фанлари доктори, академик

Расмий оппонентлар: **Ризаева Сафия Мамедовна**
биология фанлари доктори, профессор

Кадырова Дильбар Абдуллаевна
биология фанлари доктори, профессор

Мухамедов Рустам Султанович
биология фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот: **Биоорганик кимё институти**

Диссертация ҳимояси Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.29.08.2017.B.53.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2019 йил «___» _____ соат ____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 111226, Тошкент вилояти, Қибрай тумани, Юқори юз п/б, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти маэлислар зали. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30, e-mail: igebr@academy.uz, genetics@uzsci.net, gen@inst.gov.uz).

Докторлик диссертацияси билан Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (___ рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 111226, Тошкент вилояти, Қибрай тумани, п/о Юқори юз, Генетика ва экспериментал биология институти. Тел.: (99871) 264-23-90.

Диссертация автореферати 2019 йил «___» _____ куни тарқатилди.
(2019 йил йил «___» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

А.А. Нариманов

Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш раиси, к/х.ф.д.

С.К. Бабоев

Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш котиби, б.ф.д.

З.Т. Буриев

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

КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунё тўқимачилик саноатида олдинги йилларга нисбатан пахта толасидан (*Gossypium* spp.) кўпроқ фойдаланилмоқда, бу эса ғўзанинг қишлоқ хўжалиги экинлари орасида иктисодий жиҳатдан аҳамияти янада ортишига олиб келмоқда. Ғўза бутун дунё бўйлаб 80 дан ортиқ мамлакатда 32-34 млн гектар майдонга экилиб, йилига 25-65 млн метрик тонна ҳосил олинмоқда. Бугунги кунда бутун дунёда ғўзанинг иккита асосий аллотетраплоид тури *Gossypium hirsutum* (апланд-ғўза ёки ўрта толали ғўза) ва *Gossypium barbadense* (ингичка толали (ELS) ғўза ёки Пима/Си-айленд навли ғўза) етиштирилади. Жаҳон ғўза экин майдонларининг 90% дан кўпроғида етиштирилаётган ўрта толали ғўза навларининг, эрта пишарлиги ва бошқа ижобий агрономик хусусиятларини мужассамлаштиришда навларнинг физиологик ва биокимёвий хусусиятларини молекуляр даражада тадқиқ қилиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Дунёда ингичка толали (ELS) ғўза навларининг тола сифат белгиларини ўрта толали (апланд) ғўзага ўтказиш, апланд генотипларидаги эртапишарлик ва ҳосилдорликнинг барқарорлигини сақлаб қолишга катта эътибор қаратилмоқда. Ингичка толали (ELS) ғўза тури гарчи сифатли толага эга бўлса-да, кам ҳосиллиги, вегетация даврининг узунлиги, турли касалликларга мойиллиги ва сувни кўп миқдорда талаб этиши каби салбий хусусиятларга эга. Бу каби салбий белгиларни бартараф этишда анъанавий селекция ютуқлари чекланган бўлиб, бу Апланд ва Пима ғўза навларини турлараро дурагайлашдаги дурагайларда учрайдиган деформацияланган сегрегация ва белгилар стабиллигининг чекланганлиги билан изоҳланади. Апланд-ғўзада (*G. hirsutum*) анъанавий селекция усуллари орқали тола сифати, эрта гуллаши, эрта пишиши ва ҳосилдорлик каби ижобий белгиларни яхшилашда RNAi ген-нокаут ўсимликлардан фойдаланишни тақозо этади.

Ўзбекистонда юқори ҳосилдорликка эга, касалликларга ва зараркунандаларга нисбатан чидамли, маҳаллий тупроқ-иқлим ва экологик шароитларга мослашган қишлоқ хўжалиги экинларининг янги селекцион навларини яратиш ва ишлаб чиқаришга жорий этиш бўйича муайян натижаларга эришилмоқда. Бунда ғўзанинг фитохром A1 (*PHYA1*) гени учун РНК-интерференциясининг (RNAi) энг замонавий концепциясини қўллаб, юқори тола сифатига эга бўлган ва абиотик стрессларга чидамли навларини яратиш бўйича илмий-тадқиқот ишлари олиб борилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида¹ «... қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқариш соҳасига интенсив усулларни жорий этиш ҳамда маҳаллий ер-иқлим ва экологик шароитларга мослашган янги селекция навларни яратиш» вазифалари белгилаб берилган. Ушбу вазифаларни амалга оширишда тола сифати ва ҳосилдорлиги юқори бўлган, атроф муҳитнинг ноқулай шароитларига ва патогенларга чидамли бўлган ғўзанинг янги

1 Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги Фармони.

навларини яратишда ген-нокаут технологиясидан фойдаланиш муҳим аҳамиятга эга.

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 21 сентябрдаги ПФ-5544-сон “2019-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини инновацион ривожлантириш стратегиясини тасдиқлаш тўғрисида”ги Фармони, Ўзбекистон республикаси президентининг 2019 йил 17 июн ПФ-5742-сон « Қишлоқ хўжалигида ер ва сув ресурсларидан самарали фойдаланиш чора-тадбирлари тўғрисидаги» фармони ҳамда бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқот ишларидан олинган натижалари муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологияларини ривожлантиришнинг устувор йўналишлари билан мувофиқлиги. Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологияларини ривожланишининг V. “Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф муҳит муҳофазаси” устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи²

Икки занжирли РНК (dsRNA), ёрдамида ген сайленсинг таъсирини амалга оширишнинг молекуляр-генетик механизмларини аниқлашга қаратилган илмий тадқиқотлар дунёнинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида олиб борилган, шу жумладан Mississippi State University (АҚШ), Institute for Genomics, Biocomputing and Biotechnology (АҚШ), Texas A&M University (АҚШ), Biodiversity Institute of Ontario (Канада), Huazhong Agricultural University (Хитой), Shanghai Institutes for Biological Sciences (Хитой).

Ғўза генларининг нокаут таъсирининг молекуляр механизмларини аниқлаш бўйича дунёда олиб борилган тадқиқотлар натижасида бир қатор, жумладан қуйидаги илмий натижалар олинган: ғўзада тола ва уруғларни ривожланишида транскрипция омили (*GhHOX3*) *MiB* ва *HD-ZIP* генларининг роли аниқланган (CSIRO Plant Industry, Австралия); вакуолаларга хос инвертазани (*GhVIN1*) тартибга солиш функцияси толанинг хужайра элонгацияси ва дифференциациясида аниқланган (University of Newcastle, Австралия; Shanghai Institutes for Biological Sciences, Хитой); толанинг ривожланишида фасцилинга ўхшаш арабиногалактан (*FLAs*) генининг муҳим роли аниқланган (Huazhong Agricultural University, Хитой); толанинг ривожланишида сахарат синтаза генларининг роли аниқланган (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Plant Industry, Австралия).

Жаҳонда ген-нокаут технологиясини қишлоқ хўжалик экинларининг хосилдорлик ва сифат белгиларини яхшилашда қуйидаги устивор

² Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи <https://www.msstate.edu>, <https://www.mafes.msstate.edu>, <https://www.tamu.edu>, <https://biodiversity.uoguelph.ca>, www.hzau.edu.cn, <https://www.natureindex.com>

йўналишлар бўйича тадқиқотлар олиб борилмоқда: RNAi механизмларини аниқлаш, генларнинг сайленсингини амалга оширишда иштирок этадиган молекуляр компонентларни аниқлаш, ғўзада RNAiни молекуляр-генетик механизмларининг хусусиятлари, уни генлар экспрессиясини антиманноли сустлаштиришидан фарқлари, ғўзанинг функционал геномикаси учун RNAi технологиясини, шу жумладан тола сифати ва унумдорлиги учун маъсул бўлган RNAi генларини қўллаш, шунингдек, тола, уруғ ва мой сифатини яхшилаш, турли биотик ва абиотик стрессларга чидамлилиги учун маъсул бўлган RNAi генларини аниқлаш.

Муаммони ўрганилганлик даражаси. РНК интерференциясини амалга оширишга маъсул бўлган молекуляр хужайра механизмларини аниқлаш бўйича кўплаб тадқиқотлар етакчи хорижий илмий марказларда ўтказилган. Масалан, RNAi *GhMYB25* генига ўхшаш ген таъсирини аниқлашда ғўза толаси ва уруғларини ривожланишида *MiB* ва *HD-ZIP* транскрипцион омил (*GhHOX3*) генларининг муҳим функционал роли аниқланган (Machado et al.; Walford et al., CSIRO Plant Industry, Австралия).

Шу билан бирга, тола хужайралари элонгациясини таъминлайдиган тахминий механизм бу гибберелин кислотаси сигналини гомеодомен оксил билан трансдукциясидир (Shan et al., Shanghai Institutes for Biological Sciences, Хитой). Худди шундай, хужайраларнинг узайиши ва ўсишининг яна бир омили - вакуолаларга хос инвертаза (*GhVIN1*) толалар ривожланишининг дастлабки даврида уруғ тўқималаридан тола хужайраларини пайдо бўлиши ва шаклланишини белгилайдиган генларни бошқариш учун муҳим бўлган гексоз сигналига воситачилик қилади. Шунингдек, пахта толасини *GhAGP4* RNAi трансген ўсимликлардан фойдаланган ҳолда ривожланишида фасциклин - ўхшаш арабиногалактан (*FLAs*) генининг муҳим роли ўрганилган. *GhAGP4* RNAi трансген ўсимликлардан фойдаланиш, пахта толасини ривожланишида фасциклинга ўхшаш арабиногалактан генининг муҳим ролини топиш имконини берган (Li et al., Huazhong Agricultural University, Хитой). Бундан ташқари, *GbPDF1* RNAi ўсимликларининг батафсил тавсифи водород пероксиди ва этилен билан пектинни синтез қилиш ёки толаларни ривожланишида қанд моддаларини ташиш билан боғлиқ ферментларнинг таъсир механизмлари аниқланган (Deng et al., Huazhong Agricultural University, Хитой). Ғўза *PHYA1* RNAi транскриптом таҳлили 28 та метаболитик йўли бўйича KEGG ёрдамида хариталанган 142 та генлар дифференциал-экспрессиясини (ГДЭ) топиш имконини берган (Miao et al., Mississippi State University, АҚШ).

Ўзбекистонда RNAi таъсирни амалга ошириш бўйича молекуляр тадқиқотлар, ғўза фитохром A1 генининг сайленсинг таъсирини амалга оширишининг батафсил механизмларини аниқлаш назарий аҳамият касб этади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий тадқиқот муассасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Геномика ва бионформатика маркази илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф-5-Т030 “Инновацион биотехнологияларни

ривожлантириш учун устивор қишлоқ хўжалиги экинларининг геномларини тадқиқ қилиш” (2012-2016), И-2015-6-15 “Порлоқ - ғўза навларини ген-нокаут уруғларини қайта ишлаш махсулотларининг кўрсаткичларини кимёвий, биокимёвий ва фармако-токсикологик баҳолаш” (2015-2017), мавзусидаги фундаментал ва инновацион лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади ғўза (*Gossypium ssp*) фитохром А1 гени РНК интерференциясининг ген-хужайравий хусусиятларини, ҳамда “Порлоқ” ген-нокаутли навларининг физиологик-биокимёвий хусусиятларини, яъни кислороднинг фаол шакллариининг миқдорини, асосий антиоксидант ферментларининг фаоллигини, ёғ кислоталар ва углеводлар таркибини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

Порлоқ ген-нокаут ғўза навлари ва линиялари (Т₁₋₇ ва Т₃₁₋₁₀), ҳамда назорат сифатида олинган Кокер-312, АН-Боёвут-2 ва С-6524 ғўза навлари ва линияларида фитохром А1 ва В генларининг қиёсий экспрессиясини аниқлаш;

PHYA1 генининг RNAi технологиясидан фойдаланган ҳолда олинган ген-нокаут линиялари ва “Порлоқ” ғўза навларининг дифференциал экспрессияланувчи генларини қиёслаш;

азот алмашинуви ферментлари, хусусан, нитратредуктазининг ген-нокаут ва назорат ғўза линиялари ва навларида сутка давомида ривожланиш босқичига, шунингдек, геномда вектор конструкциясининг мавжудлигига қараб фаоллигини аниқлаш;

ғўзанинг “Порлоқ” ген-нокаут линиялари ва навлари ҳамда оналик шакллари сифатида олинган маҳаллий навларда фотосинтез параметрларини аниқлаш (фотофосфорилловчи фаоллик, квант чиқиши, фотосинтетик пигментларнинг таркиби – а ва в хлорофиллар, антоцианлар ва каротиноидлар, Кальвин-рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (RuBPC) ва фосфоенолпируват карбоксилаза (PEPC) цикли ферментларининг фаоллиги);

ғўзанинг RNAi ва назорат линия ва навларида антиоксидант тизим параметрларини (кислороднинг фаол шакллари, липид пероксидазининг якуний махсулотлари, асосий антиоксидант ферментларининг фаоллиги - (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (POD), аскорбатпероксидаза (APX) ва глутатионредуктаза (GR))ни қиёслаш;

геномдаги вектор конструкциянинг мавжудлигига қараб, турли ғўза генотипларида биокимёвий хусусиятларни (ёғ кислотаси таркиби, пролин миқдори, эрувчан қанд ва крахмал) аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида ғўзанинг *G. hirsutum* турига мансуб ген-нокаут ва маҳаллий навлари ва линияларидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг предмети ғўзанинг турли генотипларида молекуляр-генетик тадқиқотлар – полимераза занжир реакцияси (ПЗР) ёрдамида реал-тайм генлар экспрессияси, азот алмашинуви ферментларининг фаоллигини аниқлаш, фотосинтетик фаоллик параметрларини топиш, антиоксидант ферментларнинг фаоллигини ва биокимёвий параметрларини тахлил қилиш ҳисобланади.

Тадқиқот усуллари. Диссертацияда молекуляр биологиянинг асосий усуллари, жумладан, ДНК ажратиш, реал-тайм ПЗР таҳлили, газ хроматографияси усуллари, ферментлар фаоллигини аниқлашнинг биокимёвий усуллари, спектрофотометрик ва флуорометрик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотларнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор ғўзанинг Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 навларида фитохром А1 генини экспрессияси пасайган вақтда фитохром В генининг оверэкспрессияси белгиланган;

ғўзанинг Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 навларида тола сифати ва абиотик стрессларга чидамлилигини белгилаб берувчи генларнинг дифференциал экспрессияси аниқланган;

“Порлоқ” ген-нокаут навларида бошланғич шаклларига нисбатан нитратредуктазали фаоллигининг юқори даражаси ўрнатилган;

илк бор фотосистемалар орасидаги оқимларни алмаштиришнинг кўпроқ беқарорлиги ва фотосистема II нинг юқори ҳароратга нисбатан барқарорлиги “Порлоқ” ген-нокаут навларида аниқланган;

ғўзанинг RNAi навларида назорат ўсимликларга нисбатан квант чиқишининг параметрини статистик жиҳатдан анча юқори қийматлари ва шунга мос равишда фотосинтез аппарати ишининг юқори самарадорлиги кузатилган;

ғўзанинг “Порлоқ” ген-нокаут навларида бошланғич ва оналик шаклларига нисбатан Кальвин циклининг ферментларини (RuBPC ва PEPC) сезиларли даражадаги фаоллиги аниқланган;

ғўзанинг ген-нокаут навлари барг тўқималарида бошланғич ва оналик навларига нисбатан кислороднинг фаол турларидан бири - H_2O_2 ва липидларнинг пероксидациясининг якуний маҳсулоти – малон диальдегидининг қуйи даражалари аниқланган;

барча антиоксидант ферментларнинг (SOD, CAT, POD, APX ва GR) фаоллиги турли генотиплар орасида сезиларли даражада фарқ қилганлиги ва генотипда вектор тузилиши мавжудлиги билан боғлиқлиги кўрсатилган;

ген-нокаут навларининг ёғ кислотаси таркибида назорат Кокер-312 генотипига нисбатан тўйинмаган ЁКнинг (UFA) улуши катталиги ва тўйинган ЁКнинг (SFA) улуши кам эканлиги аниқланган;

ген-нокаут ва назорат ғўза навларида эркин пролин тўпланишини таҳлил қилиш, ушбу параметрнинг вектор конструкцияси мавжудлигига ва навларнинг абиотик стрессларга чидамлилиги билан корреляция мавжудлигига боғлиқлигини кўрсатилган;

илк бор Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 ген-нокаут навларида эрувчан қандлар ва сахароза юқори миқдорда эканлиги аниқланди, тегишли равишда сахароза/крахмал нисбатининг қиймати Кокер-312 назорат линиясига нисбатан юқори эканлиги аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

RNYA1 гени сайленсинги вақтида фитохром В генини оверэкспрессияси “Порлоқ” сериясидаги ғўза навларининг ҳосилдорлигини ва толасининг

сифат кўрсаткичларини, *PHYA1* генининг RNAi таъсирини амалга ошириш фитогормонал регуляция тизими орқали амалга оширилиши мумкинлиги, ғўза RNAi генотипларининг курғоқчилик ва шўрланиш стрессларига чидамлилигини ошириши аниқланган.

ген-муҳандислиги усулларида яратилган генетик ўзгартирилган навларнинг хавфсизлиги баҳоланган, генетик ўзгартирилган махсулотлар (ГЎМ)ни яратишнинг оптимал ва хавфсиз стратегиясини ишлаб чиқилган ҳамда генетик-муҳандислик усулида олинган махсулотлардан фойдаланишда хавфсизлиги таъминланган.

Тадқиқот натижаларини ишончлилиги. Тадқиқотнинг ишончлилиги геномиканинг замонавий усул ва ёндашувлари, биокимёвий, спектрофотометрик усуллари ёрдамида тасдиқланган. Маълумотларнинг вариациялар таҳлили (ANOVA), молекуляр вариациялар таҳлили (AMOVA), корреляцион таҳлил, Пирсон тамойиллари ва бошқа статистик усуллардан фойдаланиб, таҳлил қилинган ва тасдиқланган. Олинган натижаларни назарий маълумотларга мос келиши, натижаларнинг етакчи илмий нашрларда чоп этилганлиги, олинган натижаларнинг амалиётга жорий этилганлиги билан изоҳланади.

Олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *PHYA1* гени РНК интерференцияси натижасида нафақат ғўза толасининг ривожланиши, балки ўрганилаётган ғўза генотипларининг курғоқчилик ва шўрланиш стрессларига чидамлилигини оширишга хизмат қилиши, фитогормонал регуляция тизими орқали амалга оширилиши мумкинлигини исботланди; ғўза геномида генетик вектор конструкциянинг мавжудлиги, ген-нокаут навларининг ҳосилдорлиги ва баргларидаги фотосинтетик тизими ҳамда азот алмашинуви ферментларининг фаоллиги ўртасидаги бевосита боғлиқлик кўрсатилган; ғўзанинг RNAi навларини абиотик стрессларга чидамлилигининг асосий механизмлари фитогормонларнинг метаболизмини тартибга солувчи генларнинг дифференциал экспрессияси, шунингдек, антиоксидант ферментларнинг фаоллиги ошишини аниқланганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ғўзанинг биотик ва абиотик стрессларга чидамлилиги ва барқарорлигини ошириш механизмларини аниқловчи ва тола сифати яхшиланган ғўзанинг янги серҳосил навларини яратишда номзод генларни танлаб олишда ишлатилганлиги, *PHYA1* гени РНК интерференцияси фитогормонал регуляция тизими орқали амалга оширилиши мумкинлиги, бу нафақат ғўза толасини ривожлантиришга, балки ўрганилаётган ғўза генотипларининг абиотик стрессларга чидамлилигини оширишга ёрдам бериши асослаб берилганлиги билан белгиланади.

Тадқиқот натижаларини жорий қилиниши. Ғўзанинг фитохром A1 гени (*Gossypium* spp) РНК интерференцияси ген-хужайра хусусиятларининг илмий натижалари, шунингдек, “Порлоқ” ген-нокаут навларининг физиологик-биокимёвий параметрлари асосида:

Ўрта толали ғўзанинг Порлоқ-1 навиغا Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг (№ NAP 00146) рақамли селекция

ютуғига патенти олинган. Натижада Порлоқ-1 ғўза навидан юқори сифатли пахта толаси олиш имконини берган;

Ўрта толали ғўзанинг Порлоқ-2 навига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг (№ NAP 00147) рақамли селекция ютуғига патенти олинган. Натижада Порлоқ-2 ғўза навининг юқори ҳосилдорлиги, касаллик ва зараркунандаларга чидамлилиги ҳисобига юқори сифатли пахта ҳосили олиш имконини берган;

Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 ғўза навлари Республика вилоятларида фермер хўжалиқларига жумладан, Порлоқ-1 нави 2013-2019 йиллар мобайнида 133 минг 491.3 гектар, Порлоқ-2 нави эса 2013-2019 йилларда 54 минг 477.8 гектар майдонда жорий қилинган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ хўжалиги вазирлигининг 2019 йил 31 октябрдаги Т-9/02-1087-сон маълумотномаси). Натижада, янги навлардан гектаридан ўртача 40 центнер ҳосилдорликка эришилган ва микронейри 4,2, тола пишиқлиги (Str) 37,9 гкуч/текс, тола узунлиги (УНМ) 1,27 дюйм бўлган юқори сифатли тола олиш имконини берган;

Ўзанинг функционал геномикаси учун РНК интерференцияси бўйича олинган натижаларидан 4 та хорижий импакт фактори юқори журналларда – ғўзанинг тола узунлиги белгисини назорат қилувчи генларни аниқлашда, фитохром генлари ўртасидаги ўзаро муносабатларни ўрганишда фойдаланилган (PLoS ONE, oct 2017/ <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186240> Research Gate IF-2,76; Genet.mol.Res. 2016, Dec. Research Gate IF -0,75; AJPS Jan 2017, IF -5,46; BMC Genetics, oct 2016, IF 3,73). Натижада янги ген-нокаут технологиясини қўллаш услубларини мукаммалаштириш ва янги узун толали ғўза навларини яратиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг муҳокамаси. Ушбу тадқиқот натижалари 13 та, жумладан, 3 та ҳалқаро конференция ва 10 та республика илмий-амалий анжуманларда муҳокама қилинган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 29 та илмий ишлар чоп этилган. Шундан 16 таси илмий мақола, шу жумладан, 10 таси республика ва 6 таси хорижий Ўзбекистон Республикаси олий аттестация комиссияси томонидан докторлик диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган журналларда; ғўзанинг Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 навлари учун 2 та республика муаллифлик гувоҳномаси олинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация структураси кириш, етита боб, хулоса ва адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертация ҳажми 197 бетдан иборат.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида тадқиқотнинг долзарблиги ва талабгорлиги, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объекти ва предмети тавсифлаб берилган, тадқиқотнинг республика фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган,

тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий этиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши ҳақидаги маълумотлар очиқ берилган.

«РНК-интерференция: компонентлар, механизмлар ва функциялар» деб номланган диссертациянинг биринчи бобида RNAi механизмларини аниқлаш, генларнинг сайленсингини амалга оширишда иштирок этадиган молекуляр компонентларни, шунингдек, турли организмларда ушбу жараённинг хусусиятлари ва функцияларини, унинг эволюциясини, хавфсизликни баҳолашнинг мумкин бўлган дастурини ва қисқача шарҳини аниқлашга бағишланган молекуляр-генетик тадқиқотлар келтирилган;

«Ёўзанинг агрономик хусусиятларини яхшилаш учун РНК интерференциясини қўллаш» мавзусидаги диссертациянинг иккинчи бобида ёўзада RNAi молекуляр-генетик механизмларининг хусусиятлари, уни генлар экспрессиясини антимаъноли сустлаштиришдан фарқлари, RNAi ёўзани функционал геномикасида қўллаш, хусусан тола сифати ва фертилликга жавоб берувчи генларни, ҳамда тола, уруғ ва ёғ сифатини ошиши ва биотик ва абиотик стрессларга чидамлик учун жавоб берувчи генларни РНК-интерференцияси кўриб чиқилган. Бундан ташқари ушбу бобда RNAi технологияси ёрдамида олинган дала синовлари ва навларни тижоратлаштириш бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Материаллар ва тадқиқот усуллари»** деб номланган диссертациянинг учинчи боби диссертация ишини бажаришда фойдаланилган усулларга бағишланган.

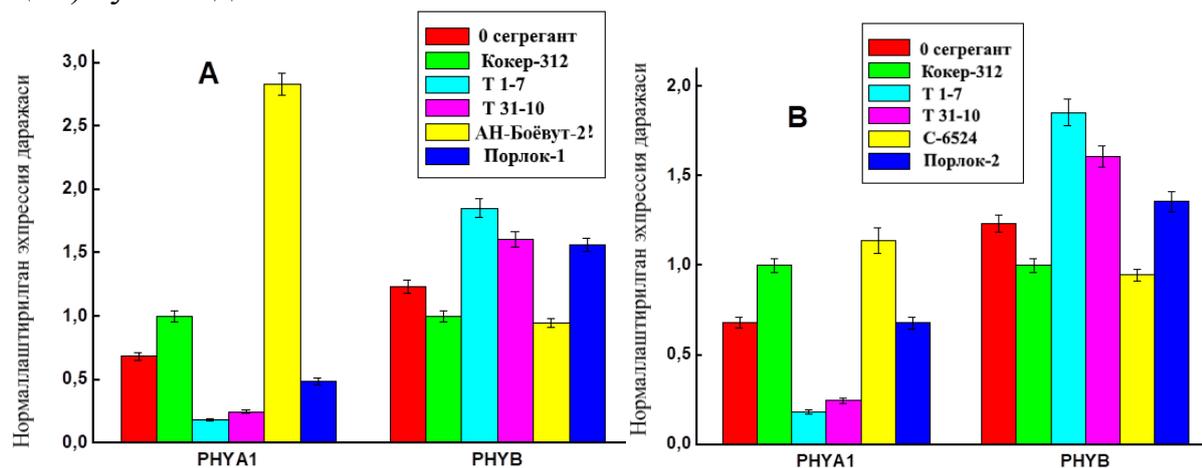
Бу ерда ўсимлик материалининг батафсил тавсифи ва ишлатилган реагентлар, молекуляр биология усуллари, шу жумладан ДНКни ажратиб олиш, ПЗР ўтказиш ва реал вақтда (Real time) ПЗР, газ хроматографияси усуллари, ферментларнинг фаоллигини аниқлашнинг биокимёвий усуллари, фотосинтез аппарати фаоллигини аниқлашнинг спектрофотометрик ва флуорометрик усуллари келтирилган.

“Ёўза ген-нокаут навларининг ген экспрессиясини аниқлаш” мавзусидаги диссертациянинг тўртинчи бобида *PHYA* генининг RNAi технологиясидан фойдаланган ҳолда олинган Порлоқ ёўза навлари ва дастлабки ген-нокаут линияларининг генларини қиёсий дифференциал экспрессияси, шунингдек A1 ва B фитохром генлари экспрессиясини ўрганиш натижалари келтирилган.

Шу билан бирга, ёўзанинг T₁-7 ва T-31-10 ген-нокаут линиялари, Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 навларида фитохром генларини экспрессиясининг молекуляр-генетик таҳлилини ўтказиш натижасида, Кокер-312 линияси ва вектор конструкциясини киритиш мақсадида чаптиштириш учун олинган оналик шаклларига нисбатан *PHYA1* генини экспрессия даражаси АН-Боёвут-2 (Порлоқ-1 нави учун), С-6524 (Порлоқ-2 нави учун) ва референс линия Кокер-312 га нисбатан 2,8 ва 1,3 мартага ортгани кузатилди (1-расм).

С-6524 навида РНУВ генининг экспрессия даражаси Кокер-312 га нисбатан 65%га камайган, АН-Боёвут-2 навида ҳам бироз камайгани (5%га

яқин) кузатилди.



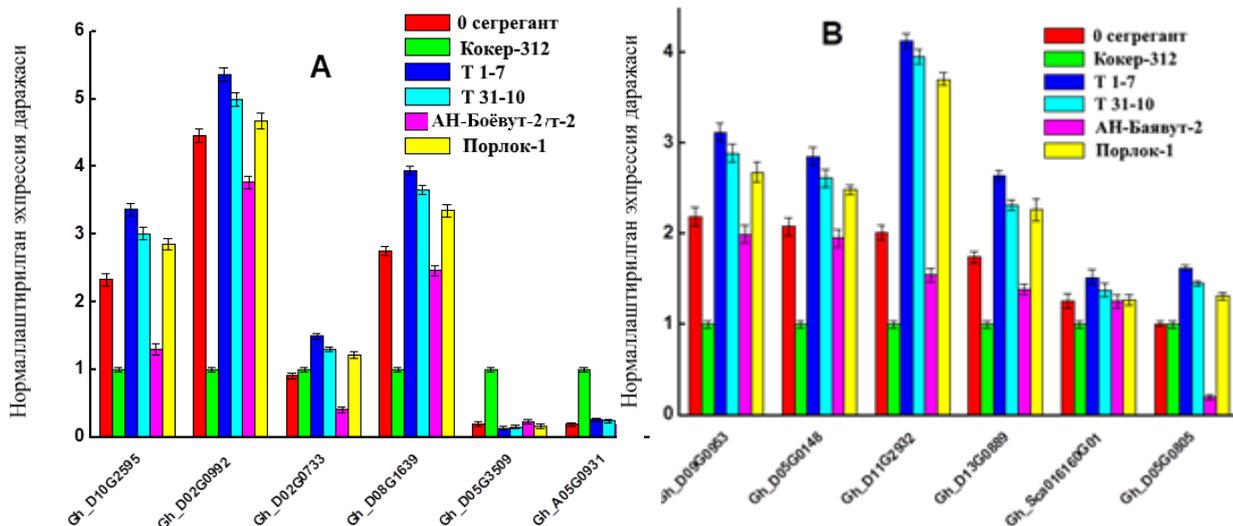
1-расм. Ғўзанинг модификацияланмаган ва ген-нокаут навларида генларнинг қиёсий экспрессияси. Генларнинг экспрессия даражалари эталон сифатида олинган убиквитин генидан GhUBQ7 фойдаланиб, меъёрлаштирилди. Қиймати $P \leq 0,05$.

Шу билан бирга, Порлок ген-нокаут навларида *PHYA1* гени экспрессия даражасини таҳлил қилиш шуни кўрсатдики, Порлок-1 навида *PHYA1* транскриптлар, трансформация учун олинган бошланғич Кокер-312 линиясига нисбатан 50% га пасайган ва вектор конструкцияни киритиш учун фойдаланилган АН-Боёвут-2 навида нисбатан 80%га камайган. Бир вақтнинг ўзида Порлок-2 навида *PHYA1* экспрессияси Кокер-312 линиясига нисбатан 33%га камайган ва оналик шакли бўлган С-6524 навида нисбатан 40%га камайган.

Бундан ташқари, ғўзанинг назорат ва ген-нокаут навларида *PHYB* генини қиёсий экспрессиясини ўрганиш вақтида, ғўзанинг ген-нокаут Порлок-1 навида *PHYB* генининг экспрессияси бошланғич Кокер-312 линияси ва оналик нави бўлган АН-Боёвут-2 навида нисбатан 1,5 ва 1,6 мартага ортгани кузатилди (1-расм, А). Порлок-2 навида *PHYB* транскриптарининг даражаси бошланғич линия Кокер-312 ва оналик нави бўлган С-6524 га нисбатан 1,3 ва 1,4 мартага ортгани кузатилди (1-расм, В).

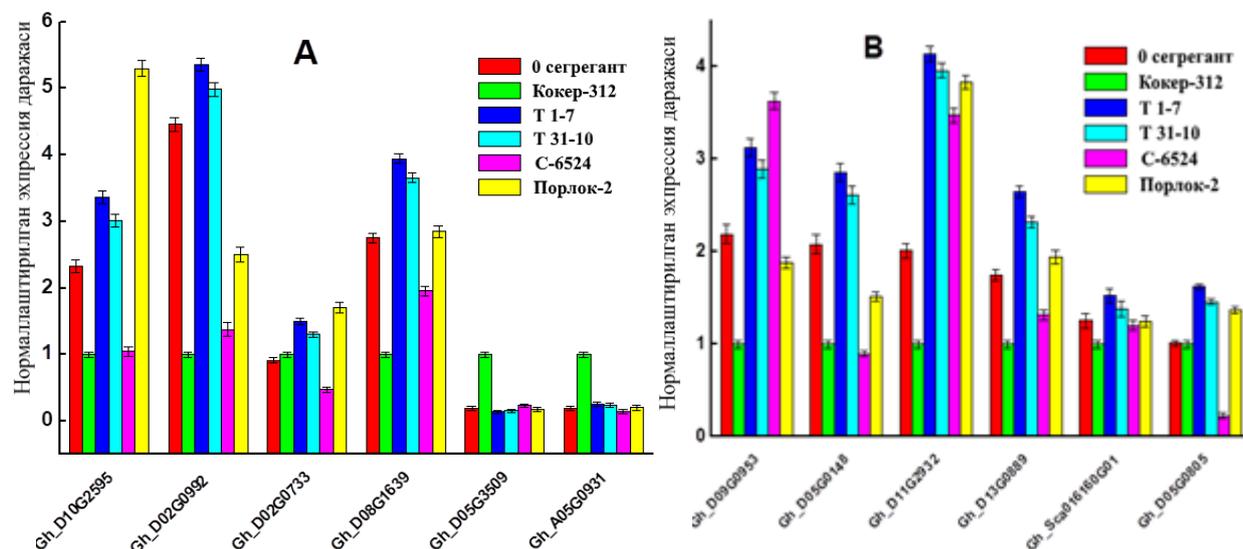
Шу билан бирга, мазкур бобда ғўзанинг ген-нокаут ва оналик сифатида олинган маҳаллий навларида генларнинг дифференциал экспрессиясини (ГДЭ) ўрганишга бағишланган маълумотлар келтирилган.

Тадқиқот натижаларидан, ген-нокаут навларида кўпгина генларнинг транскрипция даражаси бирмунча ўзгаргани маълум бўлди. Мисол учун, абсиз кислотасини (АВА) оксидловчи деградациясини биринчи босқичини катализлайдиган цитохром Р-450 монооксигеназа турини АВА 8'-гидроксилазани (*Gh_D08G1639*) кодлайдиган ген экспрессияси ортган (2-расм, А, В; 3-расм, А, В).



2-расм. Ғўзанинг модифицирланмаган ва ген-нокаут линиялар ва Порлоқ-1 навида ГДЭ қиёсий экспрессияси. Генларнинг экспрессияси даражаси эталон сифатида олинган убиквитин GhUBQ7 гени ёрдамида меъёрлаштирилди.

Бундан ташқари, РНУА1 гени сайленсинги биогенез жараёнида ва хужайра деворини ҳосил бўлишида иштирок этган баъзи оқсиллар ҳамда ферментларга таъсир кўрсатиши аниқланди. Мисол учун ксилоглюкан эндотрансглюкозилаза гидролаза (*Gh_D02G0992*) оқсиллар оиласини кодлайдиган ген экспрессияси Порлоқ навларида бошланғич линия Кокер-312 га ва оналик навлари АН-Боёвут-2 ва С-6524 га нисбатан ортгани кузатилди (2-расм, А, В; 3-расм, А, В).



3-расм. Ғўзанинг модифицирланмаган ва ген-нокаут линиялар ҳамда Порлоқ-2 навида ГДЭ қиёсий экспрессияси. Генларнинг экспрессияси даражаси эталон сифатида олинган убиквитин GhUBQ7 гени ёрдамида меъёрлаштирилди.

Бир вақтнинг ўзида ген-нокаут навларда ГДЭ транскриптлари даражасини қиёсий ўрганиш шуни кўрсатдики, ген-нокаут навларини ГДЭ транскрипт даражасини қиёсий ўрганиш оқсил оиласига мансуб ole E1 чанг аллургени ва экстенсин (*Gh_D05G0805*), цитозол сульфотрансфераза 12 га ўхшаш оқсил (*Gh_D13G0889*), 11 *scr4*-ассоциирланган омилнинг эхтимолдаги

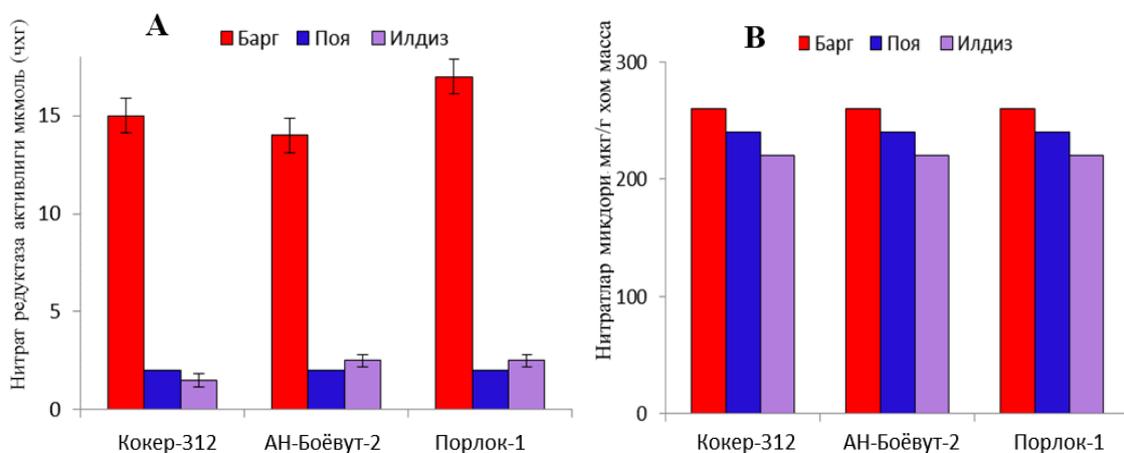
гомологи (*Gh_D09G0953*), *ein3*-боғловчи f-бокс ўхшаш оксил (*Gh_D05G0148*), дегидрогеназа алкоголи (*Gh_D02G0733*), липоксигеназа-3 (*Gh_D10G2595*), пектинэстераза (*Gh_D11G2932*) ингибиторига ўхшаш оксил, ва гипотетик оксил M569_00222 (*Gh_Sca016160G01*) лари ҳар иккала ген-нокаут Порлоқ навларида назорат Кокер-312 линиясига нисбатан ортгани кузатилди. Бошқа генларнинг экспрессияси, шу жумладан *Gh_D05G3509* (*scarecrow*-ўхшаш оксил 21) ва *Gh_A05G0931* (фосфотаза эхтимолидаги оксили 2с 25) генлари, RNAi навларида Кокер-312 линиясига нисбатан камайгани кузатилди (2-расм, А, В; 3-расм, А, В).

Шундай қилиб, ген-нокаут навларининг баргларидаги ГДЭ, *PHYA* ва *PHYB* генларининг қиёсий экспрессияси бўйича маълумотларни умумлаштириб, шундай хулосага келиш мумкинки, *PHYA1* генининг RNAi таъсирини амалга ошириш фитогормонал регуляция тизими орқали амалга оширилади, бу эса нафақат ғўза толасини ривожланишига, балки ўрганилаётган ғўза генотипларининг сув ва туз стрессига чидамлилигини оширишга ёрдам беради.

«Ќўза ген-нокаут навларида азот алмашинуви ферментларининг фаоллигини ўзгартириш» мавзусидаги диссертациянинг бешинчи бобида азот алмашинуви ферментлари, хусусан, ген-нокаут ва ген-нокаут бўлмаган ғўза навларида нитратредуктаза фаоллигининг ўзгариши ҳақидаги маълумотлар келтирилган.

Ќўзанинг турли вегетатив органларида нитратларнинг парчаланиш тезлигини ўрганиш давомида барча ўрганилган ғўза навларида нитратларни қайта тикланишининг энг юқори даражаси баргларга тегишли эканлиги аниқланди (4-расм, А).

Ќўзанинг турли вегетатив органларида нитратлар таркибини ўрганишда шу нарса маълум бўлдики, ўрганилаётган ўсимликлар органларида нитратлар микдори бўйича нитратредуктаза фаоллигига мос келадиган қонуният йўқ (4-расм, В).



4-расм. Тадқиқотда ўрганилган ғўза навлари органларида нитратредуктазанинг потенциал фаоллиги ва нитратлар таркиби. А - NR фаолияти, В - NO₃ таркиби. Эслатмалар: абсцисса ўқи бўйлаб – ўрганиладиган навлар; ордината ўқи бўйлаб – нитратредуктаза фаоллиги, мкмол/с г хом вазнда

Барча ўсимликларнинг илдизларидаги нитратларнинг миқдори, барглардаги нитратлар миқдори билан бир хил ёки ундан пастроқ бўлди. Бу эса, сўрилган нитратларнинг илдизларда тўпланмаганлигини, балки илдизда қайта тикланганлигини ёки ер усти органларига ўзгармаган ҳолда етказиб берилганини айтиш имконини беради.

Шу билан бирга, тадқиқотларда ўсимликларнинг ривожланиш босқичларида ғўза вегетатив органларининг нитратларни қайта тикланиш жараёнидаги аҳамияти ўрганилди. Ғўза баргларида нитратларнинг қайта тикланиш тезлиги юқори эканлиги ва вегетациянинг охириги босқичларидагина пасайгани кузатилди.

Ўсимликлар поясида нитрат редуктаза фаоллиги кўсаклашиш фазасигача ортиб борди, сўнг органлар тўқималарини эскириши билан камайиб борди.

Ғўза ер устки қисми органлари, бутун вегетация даври мобайнида тупроққа ютилувчи комплекснинг нитратларини фаол равишда ўзлаштиради, бироқ ўсимликлар гуллашидан то мева ҳосил бўлгунига қадар оксил миқдори икки баробар камаяди.

Эҳтимол буни нитратредуктазанинг фаоллиги ер усти қисмининг хом вазн грамига ҳисоблаганда кескин камайиб кетиши билан тушунтириш мумкин.

Нитратредуктазанинг солиштирма фаоллиги – вақт бирлиги ичида оксилнинг бир бирлигига ҳисобланган тикланган нитратларнинг миқдори, нитратларни қайта тиклаш аппаратини ишлаш интенсивлигини тўлиқ кўрсатмайди. Шунинг учун ферментнинг фаоллигини органнинг бутун вазнини ҳисобга олган ҳолда ҳисоблаш тўғри бўлади.

Кузатишлар даврида нитратларнинг қайта тикланиш жараёни баргларда юқори кўрсаткичга эга бўлди. Бироқ, вегетация даврида ўсимликлар томонидан нитратларни умумий ўзлаштирилиши 94% дан 87% гача камайди, бунда поя ва илдизларнинг бу жараёндаги роли деярли ўзгармади.

Нитратларни тикланиш жараёнида ғўза ўсимлигининг барча органлари: барглари, поялари, мевалари ва илдизлари иштирок этади. Илдизларда нитратларнинг сезиларли камайиши кузатилмади. Ерусти органлари нитратларни бир хил миқдорда ўзлаштирмайди. Кузатув даврида нитратредуктазанинг энг юқори фаоллигига эга бўлган ўсимликларнинг баргларида, ёшга қараб, қабул қилинган нитратларнинг 87-94% ўзлаштирилиши мумкин.

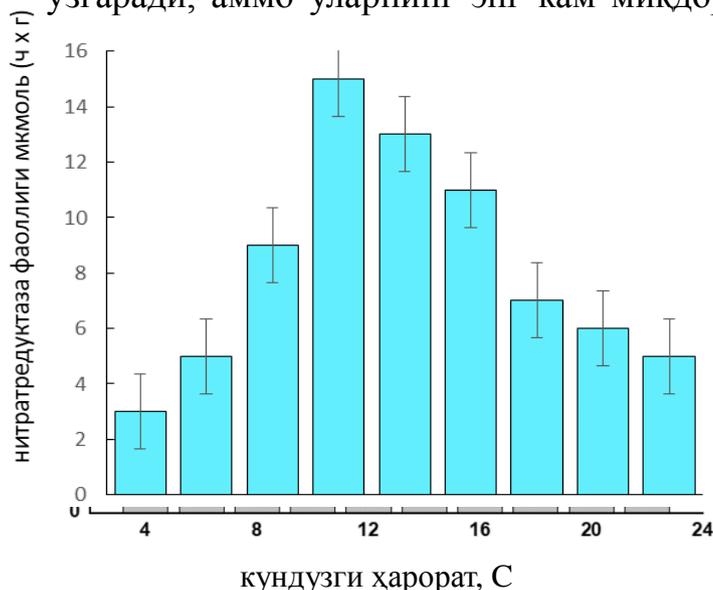
Вегетация жараёнида ерусти органлари массасининг нисбати ўзгаришига қараб, ўсимликларнинг метаболизмига нитрат азотини киритишда уларнинг роли ҳам ўзгаради.

Ушбу жараённинг юқори фаоллиги ўсимликнинг ерусти органларида нитратларнинг тўпланишига олиб келмайди.

Юксак ўсимликлардаги нитрат редуктаза фаоллиги циркад ритмга бўйсунганини ҳисобга олиб, нитратредуктаза фаоллигини кун вақтига боғлиқлиги ўрганилди. Шу билан бирга, ғўзанинг Кокер-312 линиясида нитратредуктаза фаоллигини ўрганиш шуни кўрсатдики, барглардаги

фермент фаоллиги куёш чикқанидан 5-6 соатдан кейин, яъни кун ярмига бориб максимал қийматга етди (5-расм).

Ўсимликлар ерустки қисмидаги нитратлар миқдори кун давомида ўзгаради, аммо уларнинг энг кам миқдори уларнинг тикланиш тезлигининг



энг юқори даражаси даврида қайд этилади, яъни нитрат редуктаза фаоллигига нисбатан акс эттирилади.

Расм-5. Сутка вақтига қараб Кокер-312 ғўза линияси баргларида нитратредуктаза фаоллиги. Изох: абсцисса ўқи бўйлаб – куннинг вақти, соат; ордината ўқи бўйлаб – нитратредуктаза фаоллиги, мкмоль/с×г хом вазни. $P \leq 0,05$

Шундай қилиб, ғўзада

нитратредуктазанинг фаоллиги кун давомида сезиларли даражада ўзгаради.

Ғўза нитратредуктаза фаоллигидаги кундалик ўзгаришлар органларнинг нитратларни тиклаш жараёнига қўшган хиссаси ўзгаришига олиб келмайди. Куннинг вақти ва муҳитдаги азот миқдоридан қатъий назар, барг нитратларни тиклаш жараёнида доминант орган бўлиб қолди (5-расм). Шу билан бирга, ғўзанинг назорат ва ген-нокаут навларида фермент фаоллигини қиёсий ўрганилди. 1-жадвалда келтирилган маълумотлардан кўришиб турибдики, синов даврида АН-Боёвут-2 навида нитратредуктаза фаоллиги ўртача 11,71 ммол (минимал қиймат) дан 17,82 ммол (максимал) гача ўзгариб, ўртача 14,30 ммолни ташкил қилди.

1-жадвал.

Ғўзанинг ген-нокаут навлари баргларининг бошланғич нав намуналарига нисбатан нитратредуктаза фаоллиги [ммол NO_2^- (г хом вазн, соат) $^{-1}$]

Генотиплар	Нитратредуктаза фаоллигини аниқлаш вақти*				Ўртача арифметик $M \pm m$
	I	II	III	IV	
0 сегрегант	13,42±0,20	14,56±0,22	18,75±0,25	14,47±0,23	15,30±0,22
Кокер-312	12,35±0,19	13,64±0,21	18,26±0,25	15,14±0,23	14,85±0,22
Т 1-7	15,21±0,22	16,48±0,23	19,86±0,24	20,87±0,25	18,11±0,23
Т 31-10	14,31±0,21	15,37±0,22	18,79±0,23	19,65±0,24	17,03±0,22
АН-Боёвут-2	11,71±0,18	12,91±0,20	17,82±0,24	14,74±0,22	14,30±0,21
Порлоқ-1	18,05±0,22	12,11±0,20	17,82±0,23	22,11±0,25	17,52±0,22
С-6524	14,45±0,20	19,14±0,23	20,39±0,26	16,34±0,22	17,58±0,23
Порлоқ-2	15,31±0,21	19,71±0,23	21,37±0,25	22,05±0,27	19,61±0,24

* I – 10 июл, II – 15 июл, III – 21 июл, IV – 25 июль. $P \leq 0,05$

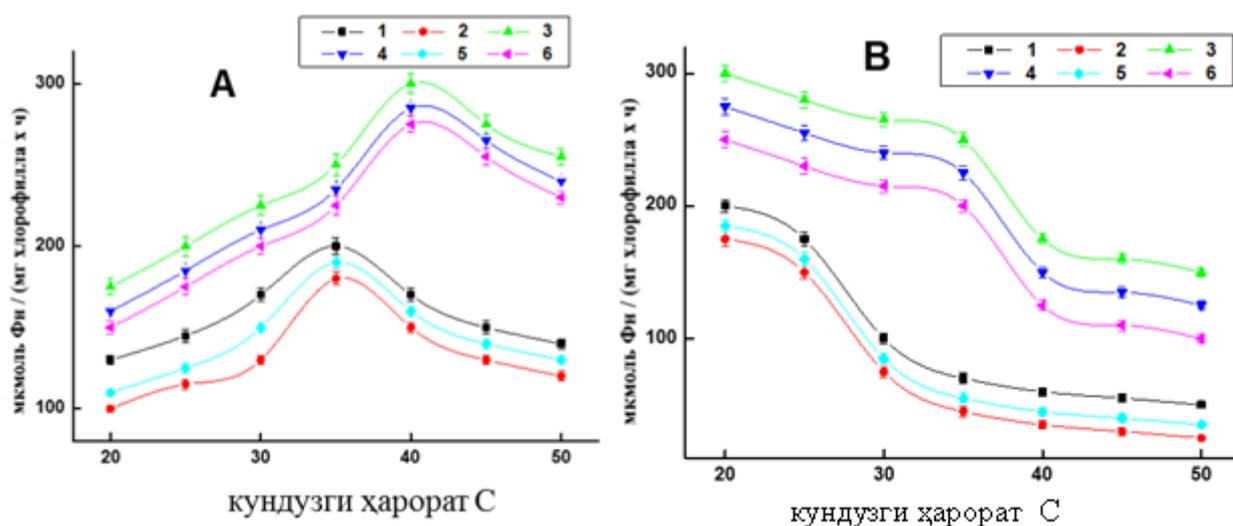
Ген-нокаут ғўза навларида “М” нитратредуктаза фаоллигининг ўртача арифметик қиймати Порлоқ-1 навида 17.52 ммол бўлиб, бу бошланғич оналик “АН-Боёвут-2” навиға нисбатан 22.94% юқори кўрсаткичға эға бўлди.

С-6524 ғўза нави намунасида ўхшаш параметрлар 14.45 ва 20.39 рақамлар билан белгиланган, ўртача арифметик қиймати мос равишда «М» - 17,58 мкмоль билан ифодаланди, ген-нокаут Порлоқ-2 навида эса бу кўрсаткич 19.61 ммолға тўғри келди, бу эса Порлоқ-2 нави бошланғич она шакли С-6524 навиға нисбатан 11.55% юқорилигини билдирди.

Порлоқ-2 навининг ўртача арифметик “М” қиймати барча синовдан ўтган генотиплар орасида энг юқори кўрсаткичға эға бўлди (1-жадвал).

Шундай қилиб, ғўзанинг Порлоқ ген-нокаут навларида бошланғич навларига (АН-Боёвут-2 ва С-6524) нисбатан нитратредуктаза фаоллиги юқори даражаси, ғўза геномиға *PHYA1* – RNAi векторнинг киритилиши, ноорганик азот ўғитларини ташиш ва уларни парчаланишида иштирок этувчи тизимларни келтириб чиқаради, шу билан бирға ген-нокаут навларининг умумий ҳосилдорлигини оширади деб тахмин қилишға асос бўлади.

“Ғўза ген-нокаут навларида фотосинтетик фаоллик” мавзусидаги диссертациянинг олтинчи бобида ғўзанинг турли навларининг фотосинтетик фаоллигини, жумладан, Порлоқ навларини қиёсий ўрганиш натижалари келтирилган. Шу билан бирға, биринчи босқичда кундалик ҳароратнинг ўзгаришиға қараб, назорат ва ген-нокаут ғўза навлари хлоропластларининг фотофосфорилловчи фаоллигидаги циркадли ўзгаришлари ўрганилди (6-расм).



6-расм. Ғўзанинг циклик (А) ва циклик бўлмаган фосфорилланиш (В) фаоллигини кундалик ҳароратға боғлиқлиги. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31-10, 4 – Т 1-7, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1. $P \leq 0.05$

6-расмда $+23^{\circ} \text{C}$ дан $+45^{\circ} \text{C}$ гача бўлган ўзгарувчан кундалик ҳароратлар таъсирида (Порлоқ-1 нави бўйича маълумотлар берилган) ғўзанинг турли навлари хлоропластларининг фотофосфорилланиш фаоллиги тақдим этилган.

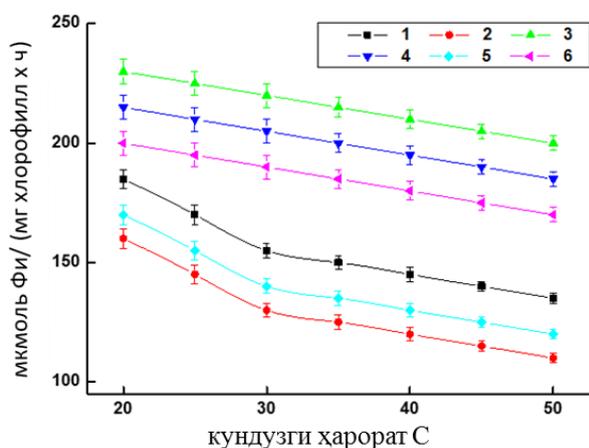
Олинган натижаларға кўра, ғўзанинг назорат ва ген-нокаут навларидан

циклик фосфорилланиш фаоллигининг маълум циркадли ритми кузатилган (6-расм, А). Шу билан бирга кунлик ҳароратнинг ортиши билан циклик фосфорилланиш (ЦФ) ва ациклик фосфорилланиш (НЦФ) тезлигининг ўзгаришлари (6-расм, В): кечки ҳарорат оралиғида НЦФ даражаси ЦФдан юқори бўлди, кундалик ҳароратнинг кунлик нормага кўтарилиши эса, электрон оқимларини циклик бўлмаган ҳолатидан цикликка ўтишига сабаб бўлди. ЦФ фаоллигининг энг юқари жаражаси 35°C га яқин ҳароратда кузатилди. Шу билан бирга, ген-нокаут бўлмаган ғўза навларининг хлоропластларида НЦФ жараёни анча термосезгир бўлиб чиқди: унинг тезлиги $+30^{\circ}\text{C}$ да 60% га пасайгани кузатилган, $+50^{\circ}\text{C}$ да унинг фаоллиги деярли нолга тенг бўлди (6-расм, В). Ген-нокаут Порлоқ навларида кундалик ҳароратнинг ортиши ЦФ фаоллигини ортишига сабаб бўлди (6-расм, А).

Бунда, ҳароратни $+30^{\circ}\text{C}$ гача кўтарилиши ЦФ фаоллигини 15% га ортишига олиб келди ва кундалик ҳароратнинг $+40^{\circ}\text{C}$ га кўтарилиши тунги вақт давомида таянч кўрсаткичларга нисбатан ЦФ тезлигини деярли 2 мартага оширди (6-расм, А). Кундалик ҳароратнинг $+50^{\circ}\text{C}$ гача кўтарилиши ЦФ интенсивлигини бироз камайишига олиб келди, бироқ унинг қиймати назорат намуналар даражасидан 55-70% га ортди. НЦФ га келсак, кундалик ҳароратини $+30^{\circ}\text{C}$ гача кўтарилиши натижасида унинг фаоллиги 10% га камайган (6-расм, В). Бироқ, кундалик ҳароратини 40°C гача кўтарилиши тезликни назоратга нисбатан 2 марта камайишига олиб келди. Ҳароратнинг кунлик максимумгача ортиши натижасида НЦФ камайишида давом этди ва назорат даражасининг 35% ни ташкил қилди (6-расм).

Шундай қилиб, олинган натижаларга кўра, Порлоқ навларида НЦФ фаоллиги бошланғич оналик навларга нисбатан оз миқдорда камайди, бу ғўзанинг ген-нокаут навларида юқори ҳарорат стрессига нисбатан ФСII юқори барқарорликни намоён қилганини кўрсатади.

Хилл реакциясининг тезлигини кунлик ҳароратнинг ўзгаришига боғлиқлиги ҳам ўрганилди. 7-расмдан кўриниб турибдики, назорат ғўза навларининг суткалик ҳарорати $+30^{\circ}\text{C}$ гача ошганда Хилл реакцияси тезлигини камайгани яъни, ўртача 25% га тушгани кузатилди. Кундалик ҳароратнинг янада ошиши билан унинг фаоллиги пасайиб борди, кундалик



максимал ҳароратда минимал қийматларга (назорат даражаси 40%) эга бўлди (7-расм).

7-расм. Ғўзанинг турли навларида кунлик ҳароратга Хилл реакция тезлигини боғлиқлиги. Изоҳ: абсцисса ўқи бўйлаб – кун давомида ҳарорат ўзгариши; ордината ўқи бўйлаб – Хиллнинг реакцияси тезлиги, мкмоль P_n /(мг хлорофилл × ч). 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1. $P \leq 0,05$

Бир вақтнинг ўзида Порлоқ навлари ўсимликлари кундалик температураларда иссиқликка чидамлилиги билан характерланади: Хилл реакцияси тезлигининг ишончли пасайиши фақат кунлик ҳароратнинг субмаксимал ва максимал қийматларида (тахминан 15%) қайд этилди.

Биргаликда олиб борилган тадқиқотлар натижалари шуни кўрсатдики, Порлоқ ген-нокаут навлари иссиқлик таъсири натижасида (ҳароратнинг суткалик ўсиши) бир вақтнинг ўзида НЦФ ва Хилл реакциясини ингибирланиши кузатилган.

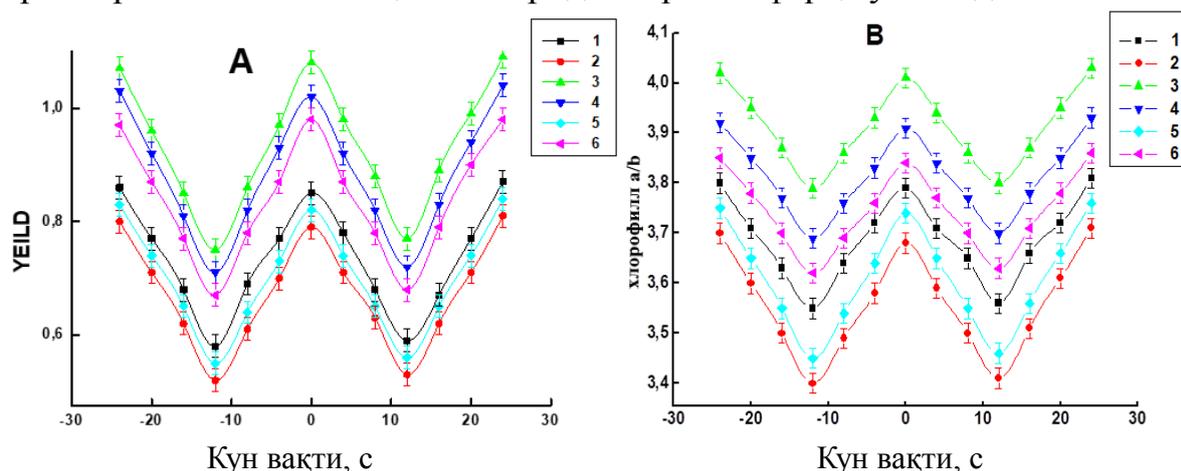
Ушбу маълумотлар шуни кўрсатадики, бу турдаги хлоропластларнинг фотосинтетик фаоллигининг камайиши юқори ҳароратда, биринчи навбатда, сув оксидланиш марказининг ишини бузилиши билан боғлиқ.

Шу билан бирга, ғўзанинг бошланғич она шакллари кундалик ҳароратнинг ошишига нисбатан кўпроқ сезувчанликка эга бўлиб, бу навларда фотосинтезнинг камайиши ҳам сув оксидловчи марказнинг ҳамда ФЭТЦ фаолиятининг бузилиши билан боғлиқ.

Кейин ғўзанинг турли навларида фотосинтез фаоллигининг циркадли ўзгаришлари ўрганилди.

Бунда хлорофилл флуоресценциясининг циркадли ритмлари, Калвин циклининг ген-нокаут ва ген-нокаут бўлмаган ғўза (*Gossypium hirsutum*) навларида асосий пигментлар таркиби ва асосий ферментларининг фаоллиги тавсифланди.

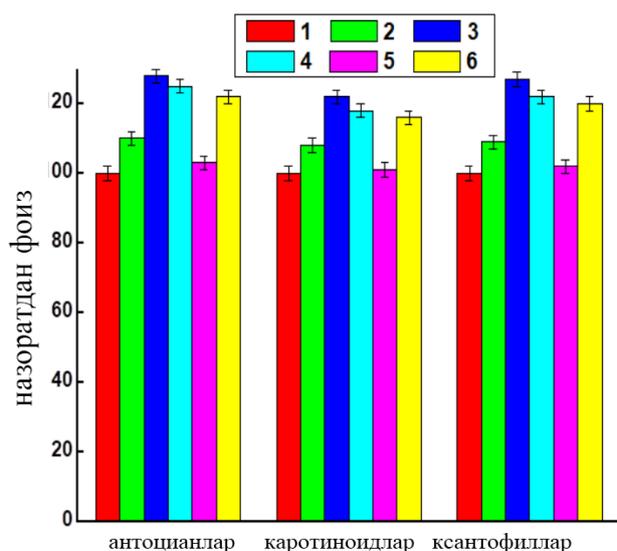
Тажирибалар давомида ФС II нинг квант чиқиши ғўза навларининг барча навлари учун аниқ белгиланган циркадли ритмга эга бўлиб, туннинг ярмида максимал даражада, кун ярмида эса минимал даражага етганлиги аниқланди (8-расм, А). Бунда таъкидлаш жоизки, назорат ва RNAi ўсимликларда циркадли ритмларнинг умумий йўналиши ўхшаш бўлишига қарамай, YIELD параметрининг абсолют қийматларида етарлича фарқ кузатилди.



8-расм. Фотосинтетик аппарат фаоллиги параметрларини суткалик ритмлари. А – квант унумини ўзгариши, В – хлорофилл а/в нисбатини ўзгариши. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1. Абсцисса ўқи бўйлаб – сутка вақтлари. $P \leq 0,05$

Шундай қилиб, RNAi линиялари ва навларида ген-нокаут бўлмаган ўсимликларга нисбатан, квант чиқиши параметрининг статистик жиҳатдан

аҳамиятли бўлган юқори кўрсаткичи кузатилди. Бу эса фотоингибирланишга бардошлиликни ва фотосинтетик аппаратнинг кўрсаткичининг юқорилигини,



бу эса ҳосилдорликнинг ортиши тўғрисидаги маълумотлар билан ижобий корреляцияни кўрсатди.

9-расм. Ғўзанинг турли навларида каротиноидлар ва ксантофилларнинг миқдори. 1 – Кокер-312, 2 – ноль сегрегант, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1. Маълумотлар назоратга нисбатан %ларда келтирилган. $P \leq 0,05$

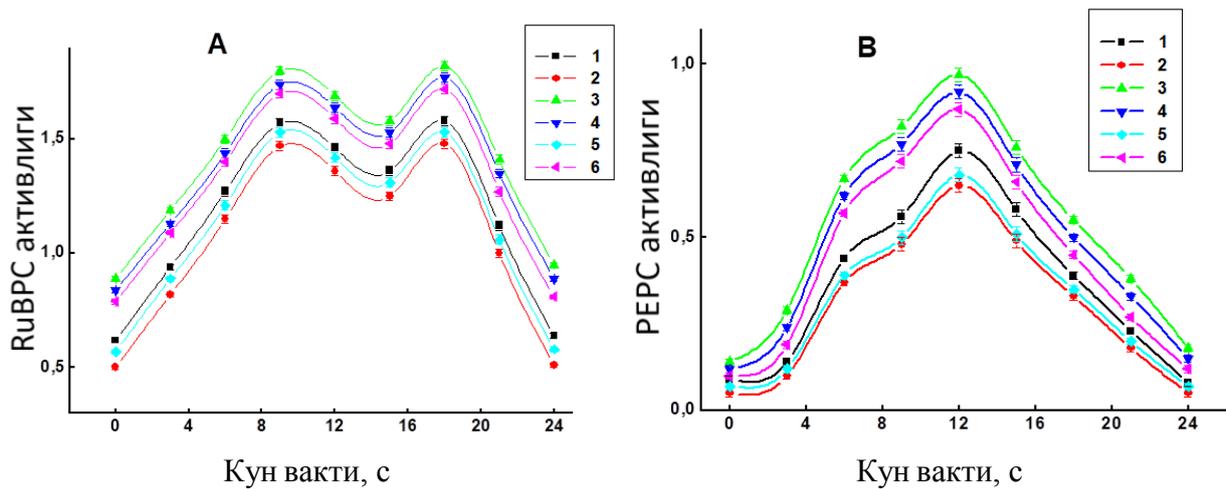
Хлорофиллар нисбати (Chl a/b) бўйича пигментли аппаратларни тадқиқ қилишда a/b

хлорофилларнинг нисбати ҳам ярим кечада максимал даражага етган циркадли циклик хусусиятига эга эканлиги аниқланди (8-расм В). Ундан ташқари, RNAi навларида кузатилган a/b хлорофиллар нисбатининг тебранишларини кичик амплитудаси, назорат ўсимликларига нисбатан юқори бўлди, бундан кўринадики фотосинтетик аппаратларининг барқарорлигини ва натижада фотосинтезнинг юқори самарадорлигини намоён қилиши мумкин.

Ғўза баргларида ген-нокаут ва назорат навларининг антоцианин ва каротиноидлар даражасини ўрганиш бўйича тадқиқот натижалари, ғўзанинг RNAi-навларидаги антоцианинлар ва каротиноидларнинг назорат намуналарига нисбатан юқори эканлигини кўрсатди, бу эса уларни фотоингибирланишга нисбатан чидамлилигини оширади ва бунинг натижасида дастлабки генотиплар билан солиштирганда ғўзада фотосинтетик аппаратнинг нисбатан юқори имкониятини таъминлайди (9-расм).

Шунингдек, Калвин-рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (RuBPC) ва фосфоенолпируват карбоксилаза (PEPC) циклини асосий ферментларининг ғўза ген-нокаут ва бошланғич (трансформация қилинмаган) навларида кундалик фаоллиги текширилди (10-расм).

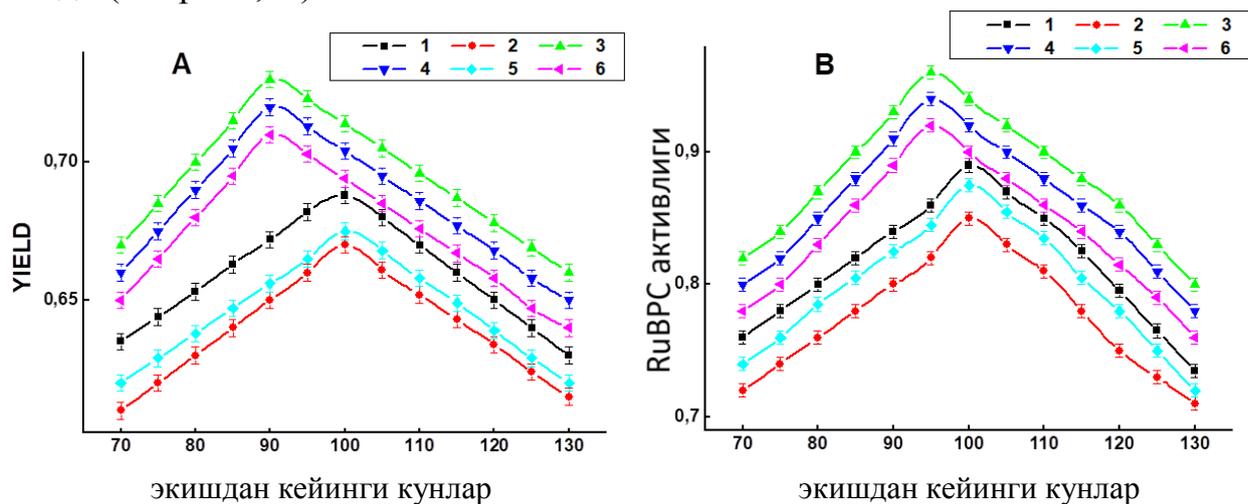
Шу билан бирга, RuBPC фаоллик даражасининг графиги кунлик динамикада, кўсаклашиш фазасида – гуллаш даврининг бошида “эгар”симон характерга эга бўлди ва барча ўрганилган навларда, 8-соатдан бошлаб, RuBPC фаоллигининг даражаси ортиб борди ва 9-10 соатга келиб максимал қийматга етди, 14-15 соатга етганда бироз пасайиш кузатилди, 18-19 соатда яна максимумга даражага кўтарилди, сўнг тунги соатларда минимал қийматгача камайиб борди (10-расм, А). Бунда ген-нокаут ва бошланғич навлар ўртасида $P=0.01$ қиймат даражасида ишонарли фарқ кузатилди, бу мазкур ген-нокаут навларининг юқори ҳосилдорликка эга эканлигидан дарак беради.



10-расм. Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (А) ва фосфоенолпируват карбоксилаза (В) фаоллигининг циркадли ритмлари. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1. Абсцисса ўқи бўйлаб – сутка вақти; ордината ўқи бўйлаб – ферментлар фаоллиги, мкмоль CO_2 /(мг хом вазни \times мин). $P \leq 0,05$

Калвин- РЕРС циклининг бошқа ферменти фаолиятини ўрганишда РЕРС ферментатив фаоллиги куннинг ўрта вақтида максимал даражага етиб, тун ярмида деярли нолга тушди ва натижада аниқ циркадли боғлиқликка эга эканлиги аниқланди (10-расм, В). Бунда ген-нокаут навлардаги мазкур ферментнинг (РЕРС) фаоллиги ген-нокаут бўлмаган навларга нисбатан анча юқори кўрсаткичга эга бўлди, бу мавжуд адабиётларда келтирилган маълумотларга кўра ғўза толасининг элонгациясига таъсир кўрсатиши мумкин.

Фотосистема II да экилган кундан бошлаб 90-100 кунлик ўсимликларга фотокимёвий жараённинг квант рентабеллигининг энг юқори қиймати тўғри келди (11- расм, А).



11-расм. Фотосинтетик аппаратнинг фаоллик параметрларини вегетация фазасига боғлиқлиги. А- квант унуми ўзгариши, В- RuBPC фаоллиги. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1. Абсцисса ўқи бўйлаб – экишдан кейинги кунлар; ордината ўқи бўйлаб – квант чиқиши қиймати (А) ёки ферментлар фаоллиги, мкмоль CO_2 /(мг хом вазн \cdot мин) (В). $P \leq 0,05$

Бунда, RNAi навларида YIELD параметрининг максимал қийматига назорат навларга нисбатан 5-10 кун аввал эришилди, бу эса ғўзанинг Порлок ген-нокаут навларининг эртапишарлигидан (5-10 кун эрта) далолат беради (11-расм А). Ўсимликларнинг вегетация даври охирлаган сайин, ген-нокаут ва назорат навларининг фотосинтез фаолиятининг пасайиши кузатилди, бироқ, RNAi навларида фотосинтез фаолиятининг тушиш тезлиги юқори даражага эга бўлди. Шунга қарамай, онтогенезнинг кейинги босқичларида ҳам ген-нокаут ғўза навларининг фотосинтетик тизими фаолияти назорат ўсимликларига нисбатан юқори кўсаткични намоён этди.

Фотосинтезда муҳим роль ўйнайдиган, CO₂ ассимиляциясини асосий тартибга солувчи ва тезликни чекловчи фермент бўлган RuBPC фаолиятини аниқлаш натижалари фотохимёвий жараённинг квант чиқиши ҳақидаги қуйидаги маълумотлар билан тасдиқланди.

Аниқланишича, RuBPC фаоллиги, уруғ ерга экилгандан кейинги 70-кундан бошлаб тез ортиб борган ва назорат ўсимликларида 100-кунда максимал даражага етган, RNAi ўсимликларида эса 95-кунда энг юқори даражага етганлиги аниқланди, бу юқоридаги маълумотларга мос келади (11-расм В). Шунга қарамай, RuBPC фаоллиги назорат сифатида олинган бошланғич оналик навларида 105-кундан бошлаб ва ген-нокаут ўсимликларда эса 100-кундан бошлаб камайиб борди.

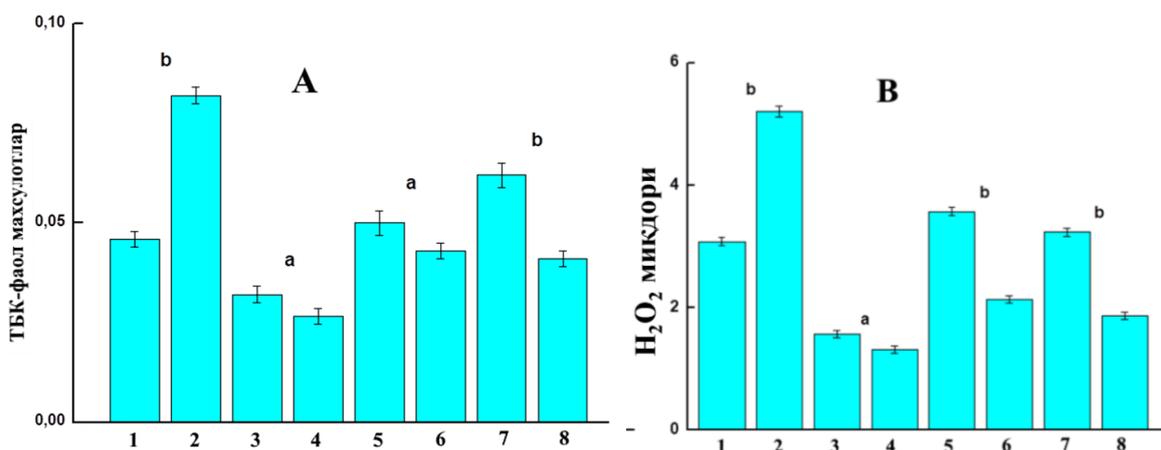
Шу билан бирга, ген-нокаут ўсимликларидаги фермент фаоллигининг умумий камайиш даражаси назорат ўсимликларига нисбатан юқорироқ даражада бўлди.

Олинган натижалар ўсимликларнинг кейинги босқичларида яъни ғўза вегетациясининг сўнгги босқичларида вегетатив органлардаги RuBPC фаоллигини камайиши адабиётларда келтирилган маълумотларга мос келади (11-расм, В).

Шундай қилиб, RNAi векторли структуранинг инсерциясини фитохром A1 генига таъсирини ўрганиш натижалари шуни кўрсатдики, назорат ўсимликларига нисбатан ген-нокаут ўсимликларининг фотосинтетик фаоллигига ижобий таъсир кўрсатди.

“Ќўзанинг ген-нокаут навларини абиотик стрессларга потенциал чидамлилигини баҳолаш” мавзусидаги диссертациянинг еттинчи бобида антиоксидант тизим ферментлари фаоллигини қиёсий ўрганиш натижалари ва RNAi ғўза навларида бир қатор биохимёвий параметрлари (ёғ кислотаси таркиби, пролин миқдори, эрувчан шакар, крахмал) келтирилган.

Тадқиқот натижаларига кўра, липидларнинг пероксидли оксидланишининг оралиқ ва охириги маҳсулотларини тўпланиш даражаси назорат навлари ва оналик шаклларида (бошланғич Кокер-312 ва оналик шакллари АН-Боёвут-2 ва С-6524), геномида *PHYA1* RNAi вектор конструкцияси бўлган навларга (Порлок-1 ва Порлок-2) нисбатан анча юқори бўлган (12-расм).



12-расм. Модифицирланган ва модифицирланмаган ғўза навлари баргларидаги H₂O₂ ва МДА миқдори. А – МДА миқдори; В – H₂O₂ миқдори. Абсцисса ўқи бўйлаб – ўрганилаётган навлар (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31-10, 4 – Т 1-7, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1, 7 – С-6524, 8 – Порлоқ-2); Ординат ўқи бўйлаб – ТБК-фаол махсулотларнинг тўпланиши, мкмолда МДА/мг хом вазн. P ≤ 0,05

Бунда ЛПО махсулотларининг энг кўп тўпланиши Кокер-312 навида кузатилди, Порлоқ-2 навида энг кам миқдорда тўпланганлиги аниқланди. Сўнг ғўзанинг RNAi навларида супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (POD), ва аскорбат-глутатион цикли ферментлари, жумладан аскорбатпероксидаза (APX) ва глутатионредуктаза (GR) ферментларининг киёсий фаоллиги ўрганилди (13-расм).

Барча антиоксидант ферментларнинг фаоллиги (SOD, CAT, POD, APX ва GR) турли генотиплар ўртасида фарқ қилди ва бу генотида вектор конструкциянинг борлиги билан боғлиқ (ген-нокаут навларининг баргларида ферментларнинг фаоллиги Кокер-312 назорат генотидага нисбатан анча юқори).

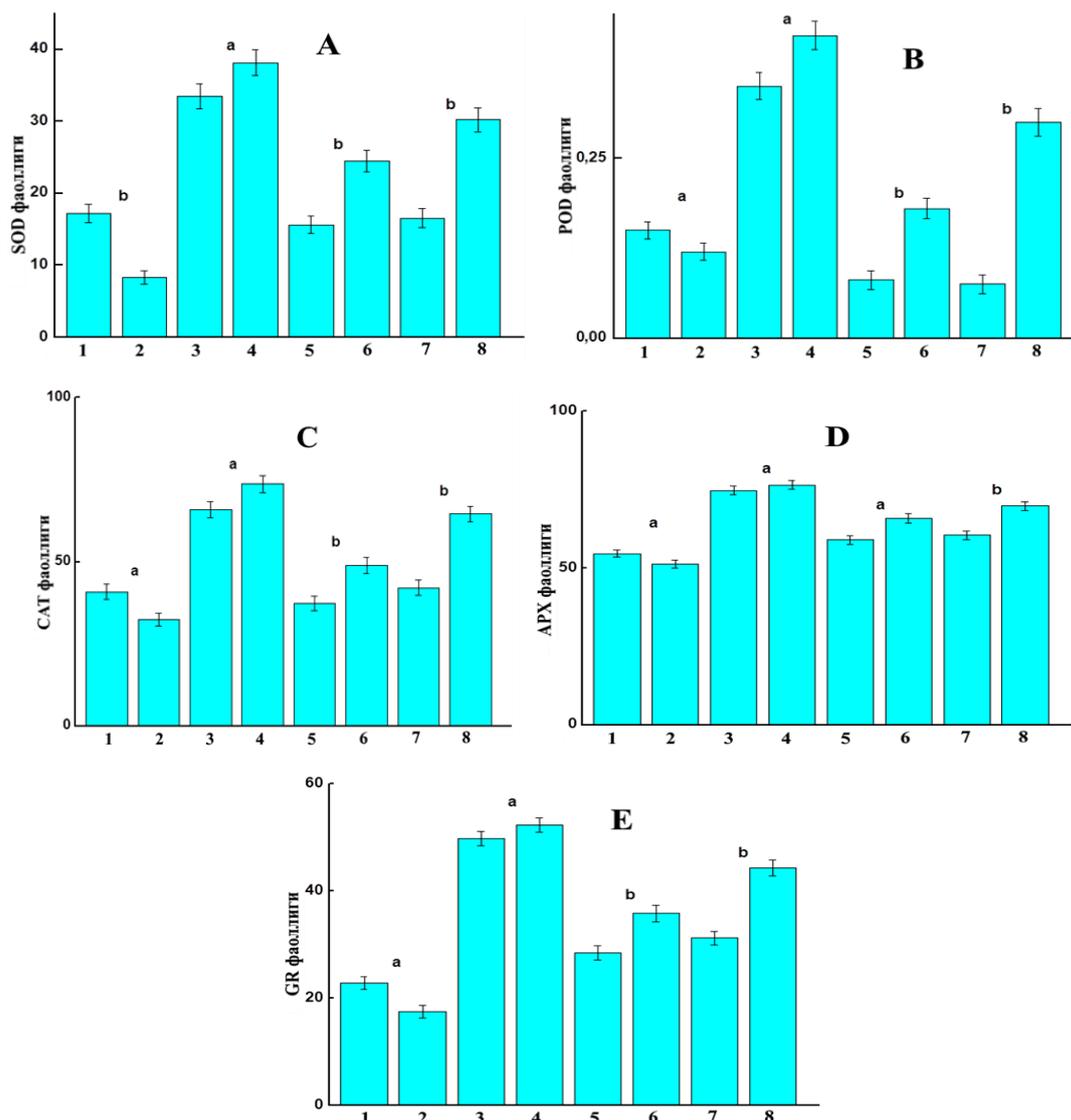
Бу антиоксидант ферментларнинг юқори фаоллигини тутиб туриш қобилияти H₂O₂ махсулдорлигини камайиши, липидларнинг пероксидланиши, мембраналарнинг юқори барқарорлиги, Порлоқ навларининг қурғоқчиликка ва шўрланишга чидамлилигини оширишга олиб келди.

Бундай шўрланиш билан боғлиқ стресс таъсирларга ғўзани антиоксидант химоя қилиш тизими ферментларининг фаоллиги ортиши ҳақидаги маълумотлар бошқа кўплаб адабиётларда ҳам келтирилган.

Шундай қилиб, олинган маълумотларга кўра, ген-нокаут линиялари ва вектор конструкция тутган ғўза навлари антиоксидантларни химоя қилиш тизими A1 фитохромнинг генига дастлабки ва оналик навларига нисбатан катта таъсирга эга бўлиб, модификацияланган навларнинг абиотик стрессларга нисбатан кўпроқ барқарорлигини таъминлаш имконини беради.

Бундан ташқари, ғўзанинг ген-нокаут ва назорат навлари баргларида биокимёвий таркиби бўйича киёсий тадқиқотлар ўтказилди.

Дастлаб, фосфолипидларнинг миқдори ва таркиби ўрганилди, у мембраналарнинг нормал шароитлардаги ва стресс ҳолатдаги барқарорлиги билан боғлиқ. Олинган натижаларга кўра, ғўзанинг турли генотипларининг ёғ-кислотали таркиби бир-биридан фарқ қилади.

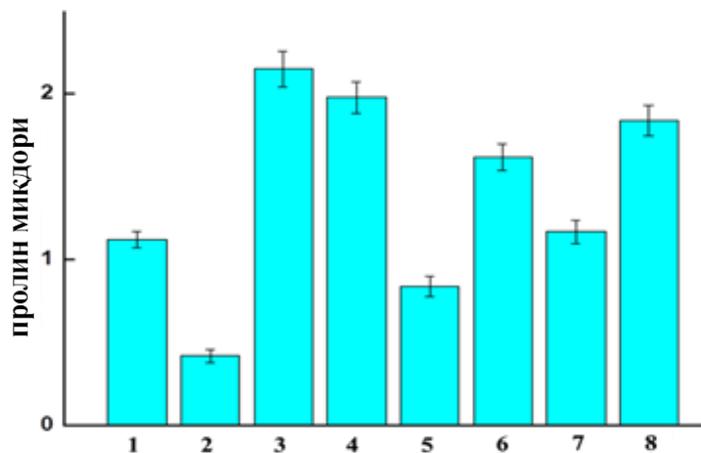


Расм-13. Ғўзанинг ген-нокаут ва модифицирланмаган навлари баргларидаги антиоксидант тизим ферментларининг фаоллиги. А – супероксиддисмутаза фаоллиги, В – пероксидаза фаоллиги, С – каталаза фаоллиги, D – аскорбатпероксидаза фаоллиги, E – глутатионредуктаза фаоллиги. Абсцисса ўқи бўйлаб – ўрганилаётган навлар (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31-10, 4 – Т 1-7, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1, 7 – С6524, 8 – Порлок-2); ордината ўқи бўйлаб – фаоллик бирлиги/ мг оксил, фермент фаоллиги. $P \leq 0,05$

Барча ўрганилган намуналардаги асосий ЁК лар - пальмитин кислотаси, стеарин кислотаси, олеин кислотаси, линол кислотаси ва линолен кислотаси юқори кўрсаткичга эга бўлди. Бу бешта ёғ кислотаси ғўзанинг функционал баргларидаги ЁК ларнинг умумий миқдорини 95% ини ташкил қилади (3-жадвал). Бунда ген-нокаут навларининг ЁК таркибида тўйинган ЁК (SFA) улуши паст ва тўйинмаган ЁК (UFA) улуши, назорат Кокер-312 га нисбатан юқори бўлади.

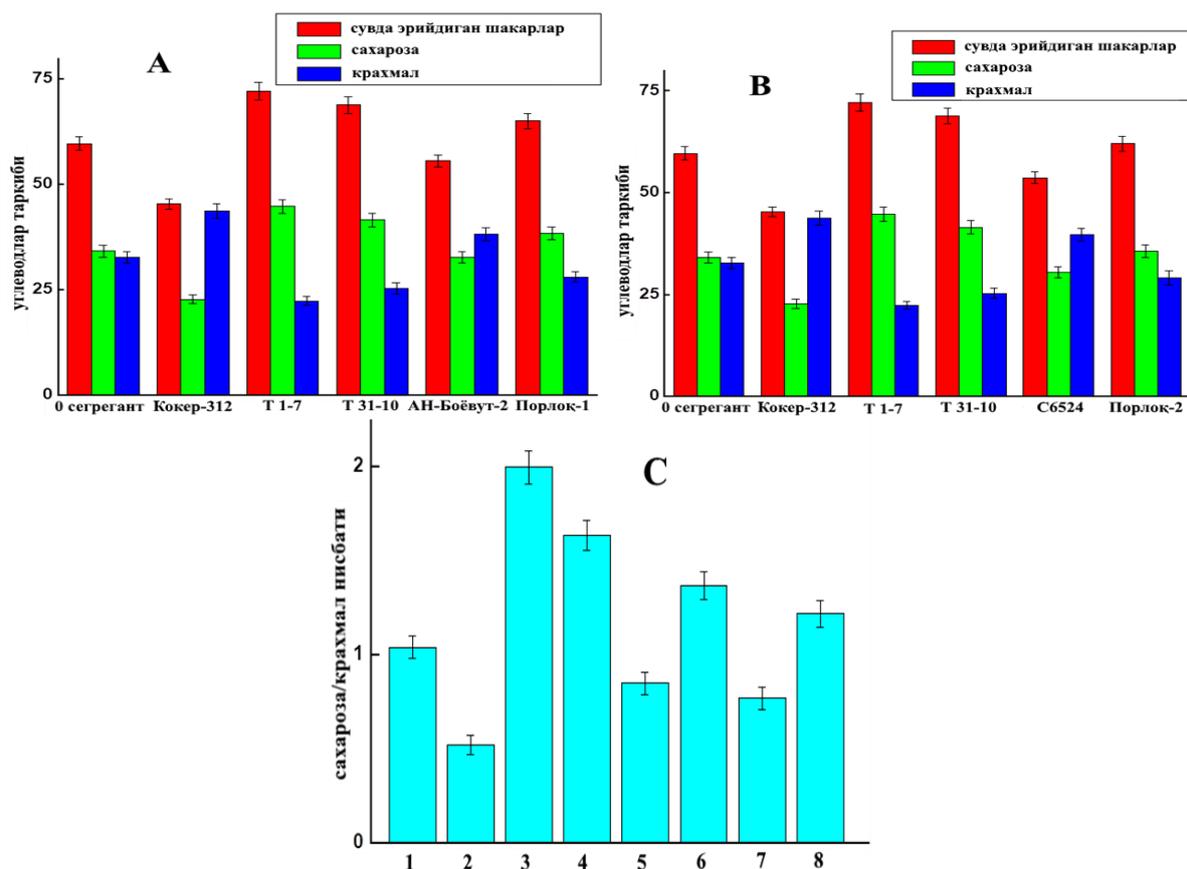
Шунингдек барча олинган намуналарнинг вектор конструкциянинг инсерциясини ғўза баргларидаги эркин пролин таркибига таъсири ўрганилди. 13-расмдан кўришиб турибдики, ғўзанинг турли навларида пролин миқдори сезиларли даражада бир-биридан фарқ қилиб, бу жараён қурғоқчилик ва

шўрланишга чидамлилиги каби белгилар билан ижобий корреляцияга эга. Бунда бошланғич Кокер-312 назорат линиясида пролин миқдори энг кам кўрсаткичга эга бўлди. Порлоқ-2 навида эса энг кўп пролин миқдори аниқланди.



14-расм. Ғўзанинг турли генотиплари баргларида эркин пролин миқдори. Абсцисса ўқи бўйлаб – ўрганиладиган навлар (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1, 7 – С6524, 8 – Порлоқ-2); ордината ўқи бўйлаб – пролин миқдори, мкг/хом вазн г, $P \leq 0,05$

Шу билан бирга, ғўзанинг турли генотипларида углеводлар миқдори ўрганилди. 15-расмдан кўриниб турибдики, киритилган вектор конструкциянинг таъсири натижасида эрувчан қанд, сахароза, крахмал миқдори ва сахароза/крахмал нисбати тадқиқот намуналарида турлича нисбатга эга бўлди.



15-расм. Тадқиқот учун олинган ғўза линиялари ва навлари баргларидаги углеводлар таркиби. Абсцисса ўқи бўйлаб – ўрганилаётган навлар (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлоқ-1, 7 – С6524, 8 – Порлоқ-2); ордината ўқи бўйлаб – углеводлар миқдори, мг/г хом вазн (А,В) ва сахароза/крахмал миқдорининг нисбати (С). $P \leq 0,05$

Шу билан бирга, Порлоқ-1, Порлоқ-2 навлари ва ген-нокаут линияларида

эрувчан қанд ва сахарозанинг Кокер-312 линияси ҳамда назорат навларига нисбатан юқори миқдорда эканлиги аниқланди (15-расм). Бу натижалар шўрланиш стресси шароитларида ғўза ўсимлигидаги қанд миқдорини ўрганиш бўйича адабиётларда мавжуд бўлган маълумотларга мос келади.

Шундай қилиб, юқорида айтилганлардан келиб чиқиб таъкидлаш лозимки, Порлоқ ген-нокаут навларини абиотик стрессларга фенотипик жиҳатдан барқарорлиги молекуляр тадқиқотлар ёрдамида тасдиқланди. Бу навларда антиоксидант ферментларнинг юқори фаоллиги, эркин пролин, эрувчан қанд ва сахароза миқдорининг юқорилиги, тегишли равишда, Кокер-312 линияси ҳамда назорат навларига нисбатан сахароза/крахмал нисбатининг юқори кўрсаткичда эканлиги аниқланди.

ХУЛОСАЛАР

Ғўзанинг (*Gossypium* ssp) фитохром А1 гени РНК интерференциясининг генетик-хужайравий асослари ва ген-нокаут «Порлоқ» навларининг физиологик, биокимёвий тадқиқ қилиш мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилган:

1. RNAi интерференция технологияси ёрдамида яратилган Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 ген-нокаут навларида фитохром А1 гени экспрессияси сусайиши натижасида фитохром В генининг оверэкспрессияси амалга ошди.

2. Ғўзанинг Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 ген-нокаут навларида тола сифати ва абиотик стрессларга чидамлилигини белгилаб берадиган генларнинг дифференциал экспрессияси топилди.

3. Олиб борилган тадқиқотлар натижасида Порлоқ ген-нокаут навларида бошланғич ва оналик шаклига нисбатан нитратредуктаза фаоллиги юқори даражада бўлди.

4. Порлоқ ген-нокаут навларида фотосистемалар ўртасидаги оқимларнинг алмашилишининг юқори ўзгарувчанлик ва фотосистема II нинг юқори ҳароратга нисбатан барқарорлиги исботланди.

5. Ғўзанинг RNAi навларида квант чиқиши параметрининг ген-нокаут бўлмаган ўсимликлардагига нисбатан статистик жиҳатдан ишончли бўлган юқори қиймати, фотосинтетик аппарат самарадорлиги юқори кўрсаткичга эга бўлди.

6. Ғўзанинг Порлоқ ген-нокаут навларида Кальвин цикли ферментларининг (RuBPC ва PEPC) бошланғич ва оналик шаклларига нисбатан юқори фаолликка эга эканлиги исботланди.

7. Ғўзанинг ген-нокаут навлари барг тўқималарида бошланғич ва оналик навларига нисбатан кислороднинг фаол турларидан бири - H_2O_2 ва липид пероксидланишининг якуний маҳсулоти – малон диальдегидининг куйи даражалари аниқланди.

8. Барча антиоксидант ферментларнинг (SOD, CAT, POD, APX ва GR) фаоллиги ген-нокаут ва назорат намуналарда турли даражада бўлди, ферментлар фаоллигининг турли даражада бўлиши трансформация бўлган

вектор конструкциянинг мавжуд эканлиги билан боғлиқ.

9. Ген-нокаут навларида, Кокер-312 линия ва назорат намуналарига нисбатан ЁК таркибида тўйинган ЁК улуши кўп ва тўйинмаган ЁК улуши кам эканлиги исботланди.

10. Ёўзанинг ген-нокаут навларининг назорат навларига нисбатан абиотик стрессларга чидамлилиги, ген-нокаут навларида векторли конструкциянинг мавжудлиги ва эркин пролин тўпланиши миқдори юқорилиги билан боғлиқ.

11. Порлоқ-1 ва Порлоқ-2 ген-нокаут навларида эрувчан қандлар ва сахарозанинг юқори миқдори, тегишли равишда сахароза/крахмал нисбати қийматининг Кокер-312 линия ва назорат намуналарига нисбатан юқори эканлиги исботланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК DSc.29.08.2017.В.53.01 при ИНСТИТУТЕ ГЕНЕТИКИ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ,
НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА УЗБЕКИСТАНА**

**ЦЕНТР ГЕНОМИКИ И БИОИНФОРМАТИКИ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

УБАЙДУЛЛАЕВА ХУРШИДА АБДУЛЛАЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕННО-КЛЕТОЧНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РНК
ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ГЕНА ФИТОХРОМА A1 ХЛОПЧАТНИКА
(GOSSYPIUM SSP), А ТАКЖЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ
ПАРАМЕТРОВ ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ПОРЛОК**

**03.00.14 – Геномика, протеомика, биоинформатика
(биологические науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК (DSc)**

Ташкент – 2019

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за B2019.2.DSc/B82

Диссертационная работа выполнена в Центре геномики и биоинформатики академии наук Республики Узбекистан.

Автореферат диссертации на трёх языках (узбекский, русский, английский) размещён на веб-странице Научного совета (www.genetika.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный консультант:	Абдурахмонов Иброхим Юлчиевич доктор биологических наук, академик
Официальные оппоненты:	Ризаева Сафия Мамедовна доктор биологических наук, профессор Кадырова Дильбар Абдуллаевна доктор биологических наук, профессор Мухамедов Рустам Султанович доктор биологических наук, профессор
Ведущая организация:	Институт биоорганической химии

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании Научного совета DSc.29.08.2017.B.53.01 при Институте генетики и экспериментальной биологии растений, Национальном университете Узбекистана (Адрес: 111226, Ташкентская область, Кибрайский район, п/о Юкори-юз. Актовый зал Института генетики и экспериментальной биологии растений. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30. E-mail: igebr@academy.uz, genetics@uzsci.net, gen@inst.gov.uz).

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института генетики и экспериментальной биологии растений (зарегистрирован за №___). Адрес: 111226, Ташкентская область, Кибрайский район, п/о Юкори-юз. Актовый зал Института генетики и экспериментальной биологии растений. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2019 года.

(протокол рассылки №___ от «___» _____ 2019 года).

А.А. Нариманов

Председатель Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук д.с/х.н.,

С.К. Бабоев

Ученый секретарь Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н.

З.Т. Буриев

Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н., старший научный сотрудник

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации доктора наук (DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мировой текстильной промышленности используется больше хлопкового (*Gossypium* spp.) волокна, по сравнению с прежними годами, что способствует повышению экономической важности хлопчатника среди сельскохозяйственных культур. Хлопчатник выращивается по всему миру в более чем 80 странах на 32-34 млн га с общей ежегодной продукцией 25,65 млн метрических тонн. В настоящее время в мире культивируется два основных аллотетраплоидных вида хлопчатника *Gossypium hirsutum* (упланд-хлопок или средневолокнистый хлопчатник) и *Gossypium barbadense* (длинноволокнистый (ELS) хлопок или хлопок сортов Пима /Си-Айленд). Молекулярное исследование физиологических и биохимических свойств выращиваемых на более чем 90% мировых хлопковых посевных площадей сортов упланд хлопчатника, сочетающих раннее созревание и другие агрономические признаки, имеет важное научно-практическое значение.

В мире большое внимание уделяется передаче признаков качества волокна от тонковолокнистого хлопчатника (ELS) к средневолокнистому (упланд) хлопчатнику с сохранением преимуществ урожайности и раннеспелости упланд генотипов. Длинноволокнистый хлопчатник (ELS), несмотря на хорошее качество волокна, имеет отрицательные характеристики, такие как низкая продуктивность, продолжительность вегетационного периода, подверженность различным заболеваниям и высокое потребление воды. Успехи традиционной селекции в преодолении таких негативных признаков ограничен из-за деформированной сегрегацией и нестабильностью признаков, обнаруживаемой у гибридов межвидовых гибридов сортов упланд и Пима. В упланд хлопчатнике (*G. hirsutum*) RNAi используется для получения трансгенных растений с улучшенными положительными признаками качества волокна, раннего цветения, раннего созревания и плодородия, недостижимых с помощью традиционных методов отбора.

В Узбекистане достигнуты значительные успехи по расширению исследовательских усилий по созданию и внедрению новых сортов сельскохозяйственных культур. Используя самую современную концепцию РНК-интерференции (RNAi) для гена фитохрома A1 (PHYA1) в хлопчатнике создаются новые сорта, которые являются высокопродуктивными, устойчивыми к болезням и вредителям и адаптированы к местным почвенно-климатическим и экологическим условиям. В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан³ ставится задача «... внедрять интенсивные методы в сельскохозяйственный сектор и создавать новые селекционные сорта, адаптированные к местным климатическим и природным условиям». При реализации этих задач важно использовать технологию ген-нокаута для создания новых сортов хлопчатника,

³ Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан»

обладающих высокой урожайностью и качеством волокна, а также устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды и патогенам.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г. № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Указом Президента Республики Узбекистан от 21 сентября 2018 г. № УП-5544 «Об утверждении стратегии инновационного развития Республики Узбекистан на 2019–2021 годы», а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий Узбекистана V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и защита окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации⁴. Научные исследования, направленные на выявление молекулярно-генетических механизмов реализации эффектов сайленсинга генов при помощи двухцепочечных РНК (dsРНК), осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, в Mississippi State University (США), Institute for Genomics, Biocomputing and Biotechnology (США), Texas A & M University (США), Biodiversity Institute of Ontario (Канада), Huazhong Agricultural University (Китай), Shanghai Institutes for Biological Sciences (Китай).

В результате исследований в мире по выявлению молекулярных механизмов реализации эффектов нокаута генов хлопчатника был получен ряд данных, в том числе, следующие научные результаты: выявлена роль генов *MIB* и HD-ZIP транскрипционного фактора (*GhHOX3*) в развитии волокна и семян у хлопчатника (CSIRO Plant Industry, Австралия); обоснована регуляторная функция вакуолярной инвертазы (*GhVIN1*) в инициации и дифференциации клеток волокна (University of Newcastle, Австралия; Shanghai Institutes for Biological Sciences, Китай); определена существенная роль гена фасциклин-подобного арабиногалактана (*FLAs*) в развитии волокна хлопчатника (Huazhong Agricultural University, Китай); исследована роль генов сахарат синтазы (*SUS*) в развитии хлопкового волокна (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Plant Industry, Австралия).

В мире проводятся исследования по следующим приоритетным направлениям применения технологии нокаута генов для улучшения урожайности и качественных признаков сельскохозяйственных культур: выявление механизмов RNAi, выявление молекулярных компонентов,

⁴ Комментарий зарубежных научных исследований по теме диссертационной работы основан на данных из www.elsevier.com, www.springerlink.com, www.sciencedirect.com, www.ncbi.nlm.nih.gov, а также других источников.

участвующих в реализации сайленсинга генов, характеристика молекулярно-генетических механизмов RNAi у хлопчатника, его отличия от снижения экспрессии генов, применение RNAi для функциональной геномики хлопчатника, в том числе, для выявления генов, отвечающих за качество волокна и урожайность, а также улучшение качества волокна, семян и масла, устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессам.

Степень изученности проблемы. Большинство исследований по выявлению детальных молекулярных внутриклеточных механизмов, отвечающих за реализацию эффектов РНК интерференции, проводились в ведущих зарубежных научных центрах. Так, например, выявление эффектов RNAi *GhMYB25*-подобного гена позволило выяснить важную функциональную роль генов *MIB* и HD-ZIP транскрипционного фактора (*GhHOX3*) в развитии волокна и семян у хлопчатника (Machado et al.; Walford et al., CSIRO Plant Industry, Австралия).

При этом было установлено, что предположительным механизмом, который обеспечивает элонгацию клеток волокна, является трансдукция сигнала гибберелиновой кислоты гомеодоменным белком (Shan et al., Shanghai Institutes for Biological Sciences, Китай). Аналогично было установлено, что другой фактор удлинения и роста клеток – вакуолярная инвертаза (*GhVIN1*) опосредует гексозное сигнализирование, которое является важным для регуляции ключевых регуляторных генов инициации и дифференциации клеток волокна из тканей семяпочки на ранних стадиях развития волокна. Также сообщалось о существенной роли гена фасцилин-подобного арабиногалактана (FLAs) в развитии волокна хлопчатника с использованием *GhAGP4* RNAi трансгенных растений. Кроме того, детальная характеристика *GbPDF1* RNAi растений позволила предположить участие пероксида водорода и ферментов, связанных с синтезом этилена и пектина или транспортом сахаров при развитии волокна (Deng et al., Huazhong Agricultural University, Китай). Наряду с этим, использование *GhAGP4* RNAi трансгенных растений позволило выявить существенную роль гена фасцилин-подобного арабиногалактана (FLAs) в развитии волокна хлопчатника (Li et al., Huazhong Agricultural University, Китай). Также транскриптомный анализ RNAi *PHYA1* линий хлопчатника позволило выявить 142 дифференциально-экспрессирующихся гена (ДЭГ), картированных по 28 метаболическим путям при помощи KEGG (Miao et al., Mississippi State University, США).

Молекулярные исследования эффекта RNAi в Узбекистане и выявление детальных механизмов влияния сайленсинга гена фитохрома A1 хлопчатника имеют теоретическое значение.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами высшего образовательного учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационная работа выполнена в Центре геномики и биоинформатики в рамках инновационного проекта И-2015-6-15 «Химическая, биохимическая и фармако-токсикологическая оценка показателей продуктов переработки семян ген нокаут сортов хлопчатника – Порлок». Результаты также получены

в рамках фундаментального проекта ФА-Ф-5-025 «Исследование генома приоритетных сельхозкультур для создания инновационной биотехнологии».

Целью исследования является исследование генно-клеточных особенностей РНК интерференции гена фитохрома A1 хлопчатника (*Gossypium* spp), а также физиолого-биохимических параметров, а именно, содержание активных форм кислорода, активности основных антиоксидантных ферментов, состава жирных кислот и углеводов, у геннокаутных сортов Порлок.

Задачи исследования:

определение сравнительной экспрессии генов фитохромов A1 и B у геннокаутных сортов серии «Порлок» и линий (T₁₋₇ ва T₃₁₋₁₀), а также контрольных сортов и линий Кокер-312, АН-Боёвут-2 и С-6524;

сравнительное изучение дифференциально экспрессирующихся генов у геннокаутных линий и сортов хлопчатника серии «Порлок», полученных с использованием технологии RNAi гена *PHYA1*;

определение активности ферментов азотного обмена, в частности, нитратредуктазы у геннокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника в зависимости от времени суток, фазы развития, а также наличия векторной конструкции в геноме;

определение параметров фотосинтетической системы (фотофосфориллирующая активность, квантовый выход, содержание фотосинтетических пигментов – хлорофиллов а и b, антоцианов и каротиноидов, активность ферментов цикла Кальвина – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RuBPC) и фосфоенолпируват карбоксилазы (PEPC)) у геннокаутных линий и сортов «Порлок» и у местных сортов хлопчатника, взятых в качестве родительских;

сравнение параметров антиоксидантной системы (содержание активных форм кислорода, конечных продуктов перекисного окисления липидов, активности основных антиоксидантных ферментов - (SOD), каталазы (CAT), пероксидазы (POD), аскорбатпероксидазы (APX) и глутатионредуктазы (GR)) у трансформированных и нетрансформированных сортов и линий хлопчатника;

определение биохимических особенностей (жирнокислотный состав, содержание пролина, растворимых сахаров и крахмала) у различных генотипов хлопчатника в зависимости от наличия векторной конструкции в геноме.

Объектом исследования служили различные геннокаутные и немодифицированные сорта и линии хлопчатника *G. hirsutum*.

Предметом исследования являлось проведение молекулярно-генетических исследований – полимерно-цепной реакции (ПЦР), экспрессии генов при помощи ПЦР в реальном времени; определение активности ферментов азотного обмена; выявление параметров фотосинтетической активности, изучение активности антиоксидантных ферментов и биохимических параметров у различных генотипов хлопчатника.

Методы исследования. В работе были использованы основные методы

молекулярной биологии, включая выделение ДНК, проведение ПЦР в реальном времени, методы газовой хроматографии, биохимические методы определения активности ферментов, спектрофотометрические и флуорометрические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые было определено подавление экспрессии гена фитохрома A1 при одновременной оверэкспрессии гена фитохрома B у ген-нокаутных сортов Порлок-1 и Порлок-2;

выявлена дифференциальная экспрессия генов, определяющих качество волокна и устойчивость к абиотическим стрессам, у ген-нокаутных сортов хлопчатника Порлок-1 и Порлок-2;

установлен более высокий уровень нитратредуктазной активности у ген-нокаутных сортов серии «Порлок»;

впервые определена большая лабильность переключения потоков между фотосистемами и большая устойчивость фотосистемы II к высоким температурам у ген-нокаутных сортов серии «Порлок»;

у RNAi сортов хлопчатника наблюдалось статистически достоверное более высокое значение параметра квантового выхода, чем у контрольных растений и, соответственно, большая эффективность работы фотосинтетического аппарата;

определена достоверно большая активность ферментов цикла Кальвина (RuBPC и PEPС) у ген-нокаутных сортов хлопчатника серии «Порлок» по отношению к исходным и родительским формам;

определены более низкие уровни одного из активных форм кислорода – H_2O_2 и конечного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида в тканях листьев ген-нокаутных сортов хлопчатника в сравнении с исходными и родительскими сортами;

показано, что активность всех антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, POD, APX и GR) значительно различалась между разными генотипами и коррелировала с наличием векторной конструкции в генотипе;

определено, что жирнокислотный (ЖК) состав у ген-нокаутных сортов содержал более высокую долю ненасыщенных ЖК (UFA) и более низкую долю насыщенных ЖК (SFA) по сравнению с контрольным генотипом Кокер-312;

анализ накопления свободного пролина у ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника показал зависимость данного параметра от наличия векторной конструкции и наличие корреляции с устойчивостью сортов к абиотическим стрессам;

впервые определено более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахароза/крахмал у ген-нокаутных сортов Порлок-1 и Порлок-2 по сравнению с контрольной линией Кокер-312.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

выявлено, что оверэкспрессия гена фитохрома B при сайленсинге гена *PHYA1* может обуславливать повышенную урожайность и улучшенные

показатели качества волокна сортов хлопчатника серии Порлок, реализация эффектов RNAi гена *PHYA1* может осуществляться через систему фитогормональной регуляции, что объясняет повышенную устойчивость RNAi генотипов хлопчатника к водному и солевому стрессу;

полученные результаты работы могут использоваться для оценки безопасности генно-модифицированных сортов растений, созданных с применением передовых методов генной инженерии, выбора наиболее оптимальной и безопасной стратегии создания ГМО, что позволит гарантировать безопасность при осуществлении и использовании результатов и продуктов генно-инженерной деятельности.

Достоверность результатов исследования. Достоверность исследования подтверждена полученными результатами с использованием современных молекулярно-генетических, биохимических, спектрофотометрических методов исследования. Данные были проанализированы и подтверждены с использованием вариационного анализа (ANOVA), молекулярного вариационного анализа (AMOVA), критерия Пирсона для корреляционного анализа и других статистических методов. Соответствие результатов теоретическим данным подтверждается тем, что результаты публикуются в ведущих научных публикациях, а результаты применяются на практике.

Научная и практическая значимость полученных результатов. Научная значимость результатов исследования объясняется реализацией эффектов RNAi гена *PHYA1* может осуществляться через систему фитогормональной регуляции, которая способствует не только развитию волокна хлопчатника, но и повышению устойчивости исследуемых генотипов хлопчатника к водному и солевому стрессу; показана прямая связь между наличием генетической векторной конструкции в геноме хлопчатника, повышенной урожайностью ген-нокаутных сортов и активностью фотосинтетической системы листьев и ферментов азотного обмена; раскрыты фундаментальные механизмы устойчивости RNAi сортов хлопчатника к абиотическим стрессам, которая обусловлена дифференциальной экспрессией генов, регулирующих метаболизм фитогормонов, а также с повышенной активностью антиоксидантных ферментов.

Практическая значимость результатов исследований объясняется использованием результатов для выявления механизмов повышения урожайности и устойчивости хлопчатника к биотическим и абиотическим стрессам и отбора кандидатных генов для создания новых высокоурожайных сортов хлопчатника с улучшенным качеством волокна, обоснованием, что реализация эффектов RNAi гена *PHYA1* может осуществляться через систему фитогормональной регуляции, которая способствует не только развитию волокна хлопчатника, но и повышению устойчивости исследуемых генотипов хлопчатника к водному и солевому стрессу.

Внедрение результатов исследований. На основе научных результатов генно-клеточных особенностей РНК интерференции гена фитохрома A1 хлопчатника (*Gossypium ssp*), а также физиолого-биохимических параметров

ген-нокаутных сортов «Порлок»:

получен патент на селекционное достижение (№ NAP 00146) Интеллектуального агентства Республики Узбекистан на сорт средневолокнистого хлопчатника Порлок-1. В результате получена возможность производства высококачественного хлопкового волокна из сорта хлопчатника Порлок-1;

получен патент на селекционное достижение (№ NAP 00147) Интеллектуального агентства Республики Узбекистан на сорт средневолокнистого хлопчатника Порлок-2. В результате получена возможность производства урожая хлопка высокого качества благодаря высокой урожайности сортов хлопка и устойчивости к болезням сорта хлопчатника Порлок-2;

сорта хлопчатника Порлок-1 и Порлок-2 внедрены в фермерские хозяйства в разных регионах республики, в том числе, за период 2013-2019 гг. сорт хлопчатника Порлок-1 высевался на общей площади 133 491,3 гектар, а сорт Порлок-2 – на общей площади 54 477,8 гектар (справка Министерства сельского хозяйства от 31 октября 2019 года № Т-9/02-1087). В результате средняя урожайность новых сортов достигала 40 центнеров с гектара, что позволило получить высококачественное волокно с микронейром 4,2, прочностью -37,9 (Str) и длиной волокна 1,27 (UHM);

результаты полученные с помощью РНК интерференции для функциональной геномики хлопчатника, были использованы в 4 зарубежных журналах с высокими импакт факторами для изучения взаимодействий между генами фитохрома-генами, контролирующими признаки длины волокна хлопчатника (PLOS ONE oct 2017/ <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186240> RG., IF-2,76, Genet.mol.Res. 2016, Dec. RG. IF -0,75, AJPS Jan 2017, IF -5,46, BMC Genetics, oct 2016, IF 3,73). В результате удалось усовершенствовать методы применения новых технологий нокаута генов и создать новые сорта хлопчатника с длинным волокном.

Апробация результатов исследования. Результаты этих исследований обсуждались на 13, в том числе, 3 международных конференциях и 10 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 29 научных работ. Из них 16 научных статей, в том числе 10 в республиканских и 6 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций и получено 2 республиканских авторских свидетельства на сорта хлопчатника Порлок-1 и Порлок-2.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, семи глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 197 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во Введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются

объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации под названием **«РНК-интерференция: компоненты, механизмы и функция»** приведены молекулярно-генетические исследования, посвященные установлению механизмов RNAi, молекулярных компонентов, участвующих в реализации сайленсинга генов, а также особенностям и функциям данного процесса у различных организмов, его эволюции, возможному применению и краткий обзор оценки безопасности.

Во второй главе диссертации под названием **«Применение РНК-интерференции для улучшения агрономических признаков хлопчатника»** рассматриваются особенности молекулярно-генетических механизмов RNAi у хлопчатника, ее отличия от антисмыслового подавления экспрессии генов, применение RNAi для функциональной геномики хлопчатника, включая RNAi генов, отвечающих за качество волокна и фертильность, а также улучшения качества волокна, семян и масла, повышению устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессам. Кроме того, в данной главе приведены данные по полевым испытаниям и коммерциализации сортов, полученных с применением технологии RNAi.

Третья глава диссертации под названием **«Материалы, условия и методы исследования»** посвящается методам, использованным в ходе выполнения диссертационной работы.

Здесь приведено детальное описание растительного материала и использованных реагентов, методов молекулярной биологии, включая выделение ДНК, проведение ПЦР и ПЦР в реальном времени, методов газовой хроматографии, биохимических методов определения активности ферментов, спектрофотометрических и флуорометрических методов определения активности фотосинтетического аппарата.

В четвертой главе диссертации под названием **«Определение экспрессии генов ген-нокаутных сортов хлопчатника»** приведены результаты сравнительного изучения экспрессии генов фитохромов A1 и B, а также дифференциально экспрессирующихся генов у ген-нокаутных линий и коммерческих сортов хлопчатника серии Порлок, полученных с использованием технологии RNAi гена *PHYA1*.

При этом показано, что при проведении молекулярно-генетического анализа экспрессии генов фитохромов у ген-нокаутных линий (Т 1-7 и Т 31-10) и сортов хлопчатника Порлок-1 и Порлок-2 в сравнении с исходным линиями Кокер-312 и родительскими формами, взятыми для скрещивания с целью мобилизации векторной конструкции, уровень экспрессии гена *PHYA1* у родительских сортов АН-Боёвут-2 (для сорта Порлок-1) и С-6524 (для сорта

Порлок-2) в сравнении с референс-линиями Кокер-312 был увеличен в 2,8 и 1,3 раза, соответственно (рис. 1). В то время как уровень экспрессии гена *PHYB* у сорта С-6524 был снижен по сравнению с Кокер-312 на 65%, а у сорта АН-Боёвут-2 был снижен незначительно (около 5%).

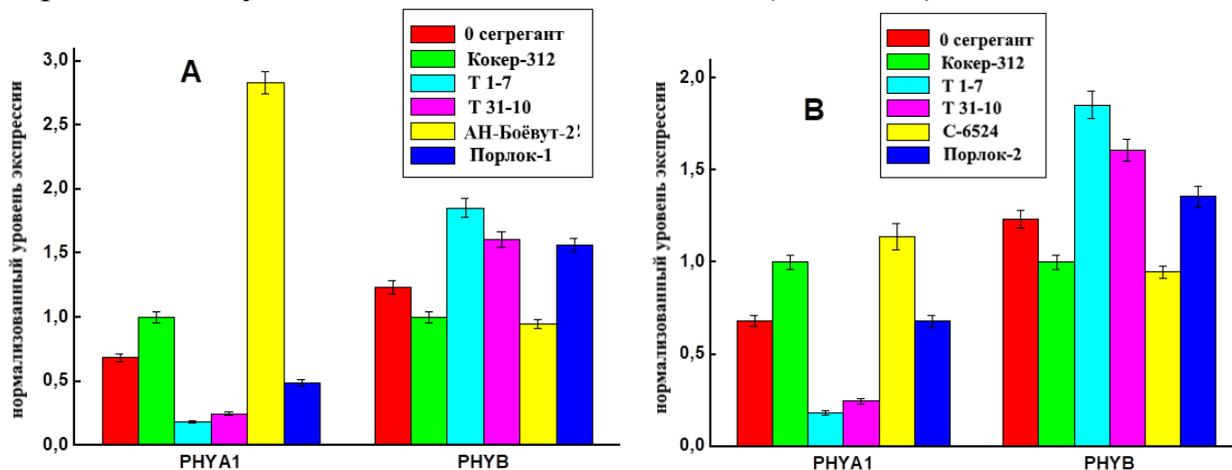


Рис. 1. Сравнительная экспрессия генов фитохромов у немодифицированных и ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника. Уровни экспрессии генов были нормализованы с использованием гена убиквитина GhUBQ7 в качестве эталона. Значение $P \leq 0,05$.

При этом анализ уровня экспрессии гена *PHYA1* у ген-нокаутных сортов серии Порлок показал, что у сорта Порлок-1 транскрипты *PHYA1* были подавлены на 50% по сравнению с исходной линией Кокер-312, взятой для трансформации, и на 80% по сравнению с родительской формой АН-Боёвут-2, использованной для мобилизации векторной конструкции. В то же время уровень экспрессии *PHYA1* у сорта Порлок-2 был снижен на ~ на 33% по сравнению с линией Кокер-312 и на 40% по сравнению с родительской формой С-6524.

Кроме того, при изучении сравнительной экспрессии гена *PHYB* в немодифицированных и ген-нокаутных сортах хлопчатника было обнаружено, что у ген-нокаутного сорта хлопчатника Порлок-1 наблюдалось увеличение экспрессии гена *PHYB* в 1,5 и 1,6 раза по сравнению с исходным линией Кокер-312 и родительским сортом АН-Боёвут-2, соответственно (рис. 1, А). В то же время, у RNAi сорта Порлок-2 уровень транскриптов *PHYB* был повышен в 1,3 и 1,4 раза по сравнению с исходной линией Кокер-312 и родительским сортом С-6524, соответственно (рис. 1, В).

Наряду с этим, в данной главе изложены данные, посвященные сравнительному исследованию изменения экспрессии дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) у ген-нокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника.

Результаты исследований показали, что уровни транскрипции многих генов у ген-нокаутных линий и сортов были значительно изменены. Так, экспрессия гена, кодирующего АВА 8'-гидроксилазу (*Gh_D08G1639*), тип цитохрома Р450 монооксигеназы, которая катализирует первый этап окислительной деградации АВА, была увеличена (рис. 2 А, В; 3 А, В).

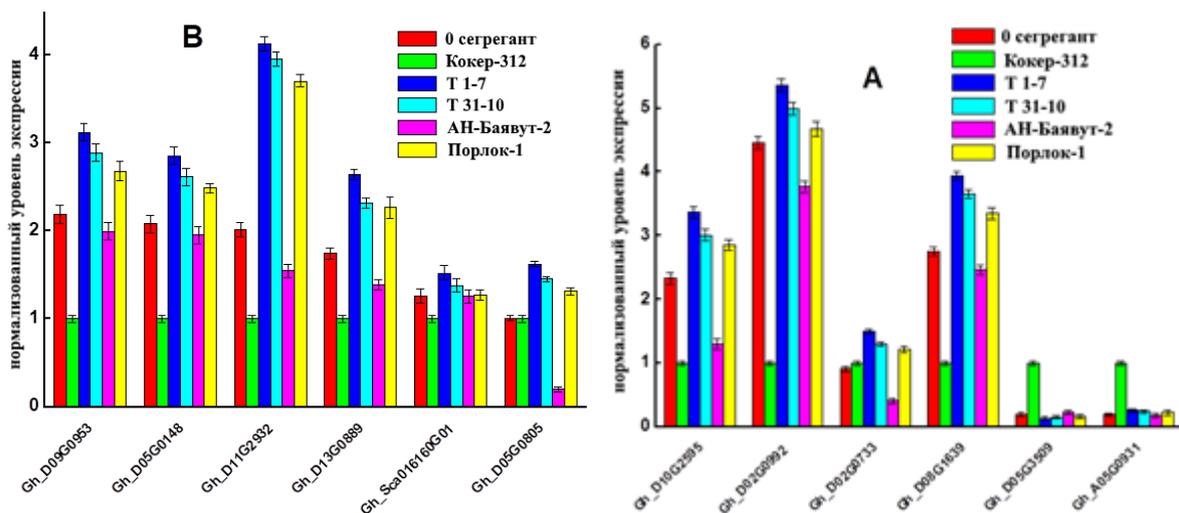


Рис. 2. Сравнительная экспрессия ДЭГ у ген-нокаутных линий и сорта хлопчатника Порлок-1. Уровни экспрессии генов были нормализованы с использованием гена убиквитина GhUBQ7 в качестве эталона. Значение $P \leq 0,05$.

Кроме того, было выявлено влияние сайленсинга гена *PHYA1* на некоторые белки и ферменты, вовлеченные в процесс биогенеза и организации клеточной стенки. Например, экспрессия гена, кодирующего семейство белков ксилоглюкан эндотрансглюкозилазы гидролазы (*Gh_D02G0992*), была увеличена у сортов серии Порлок как по сравнению с исходной линией Кокер-312, так и с родительскими сортами АН-Боёвут-2 и С-6524 (рис. 2 А, В; 3 А, В).

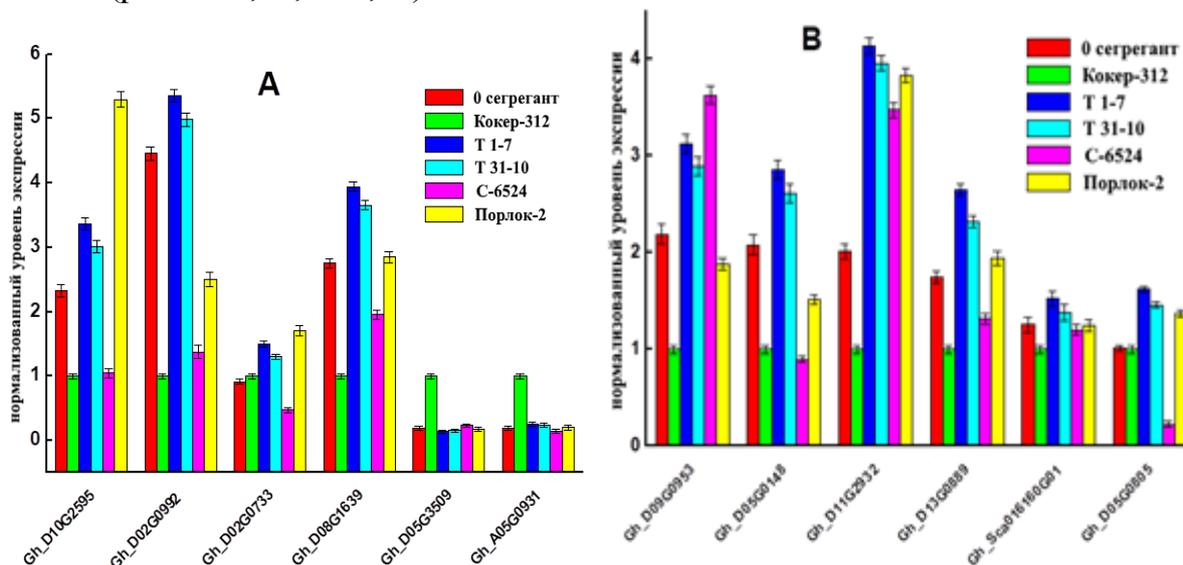


Рис. 3. Сравнительная экспрессия ДЭГ у ген-нокаутных линий и сорта хлопчатника Порлок-2. Уровни экспрессии генов были нормализованы с использованием гена убиквитина GhUBQ7 в качестве эталона. Значение $P \leq 0,05$.

В тоже время при сравнительном исследовании уровня транскриптов ДЭГ у ген-нокаутных сортов было показано, что экспрессия генов, кодирующих семейство белков ole e1 аллергена пыльцы и экстенсина (*Gh_D05G0805*), белок, подобный цитозольной сульфотрансферазе 12

(*Gh_D13G0889*), вероятный гомолог 11 *csr4*-ассоциированного фактора (*Gh_D09G0953*), *ein3*-связывающий f-бокс подобный белок 1 (*Gh_D05G0148*), алкоголь дегидрогеназу (*Gh_D02G0733*), липоксигеназу-3 (*Gh_D10G2595*), белок, подобный ингибитору пектинэстеразы (*Gh_D11G2932*), и гипотетический белок M569_00222 (*Gh_Sca016160G01*), была увеличена у обоих ген-нокаутных сортов серии Порлок по сравнению с контрольным линиями Кокер-312. Экспрессия других генов, включая *Gh_D05G3509* (*scarecrow*-подобный белок 21) и *Gh_A05G0931* (вероятный белок фосфатазы 2с 25), была снижена у RNAi сортов относительно Кокер-312 (рис. 2 А, В; 3 А, В).

Таким образом, суммируя данные по сравнительной экспрессии генов фитохромов А и В, а также ДЭГ в листьях ген-нокаутных сортов можно предположить, что реализация эффектов RNAi гена *PHYA1* реализуется через систему фитогормональной регуляции, которая способствует не только развитию волокна хлопчатника, но и повышению устойчивости исследуемых генотипов хлопчатника к водному и солевому стрессу.

В пятой главе диссертации под названием «**Изменение активности ферментов азотного обмена у ген-нокаутных сортов хлопчатника**» представлены данные об изменении активности ферментов азотного обмена, в частности, нитратредуктазы у ген-нокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника.

В ходе исследований скорости редукции нитратов в различных вегетативных органах хлопчатника было установлено, что наибольшей скоростью восстановления нитратов у всех исследованных сортов хлопчатника обладали листья (рис. 4, А). При изучении содержания нитратов в различных вегетативных органах хлопчатника показано, что по количеству нитратов в органах исследуемых растений не было закономерности, соответствующей активности нитратредуктазы (рис. 4, В).

Содержание нитратов в корнях всех растений было либо на уровне листьев, либо ниже. Это позволяет говорить, что поглощенные нитраты не накапливались в корнях, а были восстановлены в корне или транспортировались в надземные органы в неизменном виде.

Вместе с тем, на данном этапе работы был исследован вклад вегетативных органов хлопчатника в процесс восстановления нитратов по фазам развития растений. Скорость восстановления нитратов в листьях хлопчатника высока и снижалась только в последние фазы вегетации. Активность нитратредуктазы в стебле растений возрастала до фазы бутонизации, а затем снижалась по мере старения тканей органа.

Органы надземной части хлопчатника активно, как известно, усваивают нитраты почвенного поглощающего комплекса в течение всего периода наблюдений, тем не менее, содержание белка по мере развития растений от цветения до плодообразования снижается вдвое. Вероятно, это объясняется тем, что активность нитратредуктазы в расчете на грамм сырой массы надземной части за этот период резко снижалась.

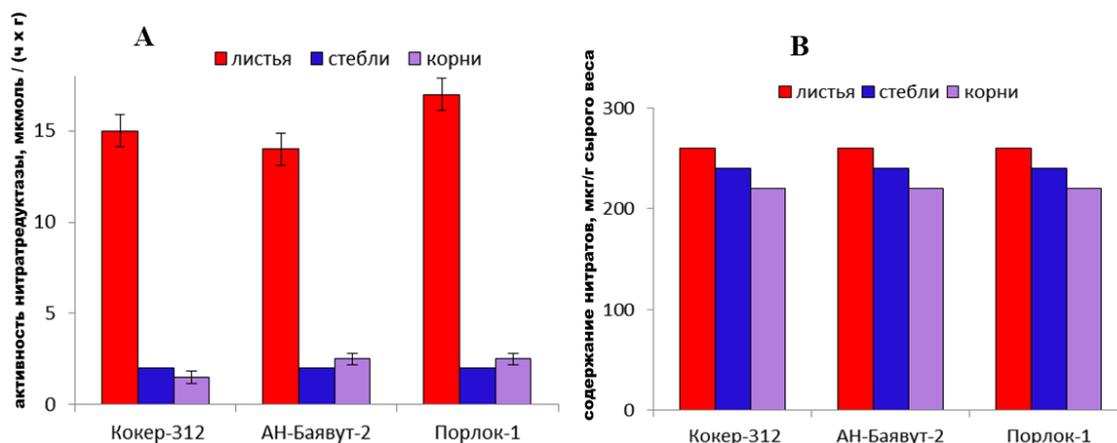


Рис. 4. Потенциальная активность нитратредуктазы и содержание нитратов в органах различных сортов хлопчатника. А – активность NR, В – содержание NO_3 . Примечания: по оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – активность нитратредуктазы, в мкмоль/ч×г сырого веса (А) или содержание нитратов, мкг/г сырого веса (В). $P \leq 0,05$

Удельная активность нитратредуктазы – количество нитратов восстановленных за единицу времени в расчете на единицу белка, не в полной мере показывает интенсивность работы аппарата восстановления нитратов. В этой связи более правильно рассчитывать активность фермента, учитывая массу всего органа.

Вклад листьев в процесс восстановления нитратов за период наблюдений был доминирующим. Однако, в процентном соотношении доля листьев в общей редукции нитратов растениями на протяжении периода вегетации незначительно снижалась с 94% до 87%, при этом роль стеблей и корней в этом процессе практически не изменялась.

В процессе восстановления нитратов у хлопчатника принимают участие все органы растения: листья, стебли, плоды и корни. Значительной редукции нитратов в корнях показано не было. Органы надземной части не равноценны в усвоении нитратов. В листьях растений, обладающих наивысшей активностью нитратредуктазы в течение всего периода наблюдений, в зависимости от возраста может редуцироваться 87 – 94% поступивших нитратов.

В соответствии с изменением соотношения массы органов надземной части в процессе вегетации изменяется и их роль во включении азота нитратов в метаболизм растений. Активность этого процесса высока и не приводит к накоплению нитратов в органах растений.

Учитывая факт, что активность нитратредуктазы в высших растениях подчиняется циркадному ритму, была исследована зависимость активности нитратредуктазы от времени суток. При этом исследование активности нитратредуктазы у хлопчатника линия Кокер-312 показало, что активность фермента в листьях достигала максимального значения спустя 5-6 часов после восхода солнца, т.е. начала освещения растений (рис. 5). Количество нитратов в надземной части растений изменяется в течение суток, но

наименьшее их количество отмечено в период наивысшей скорости их восстановления, то есть имеет отражение по отношению к активности нитратредуктазы.

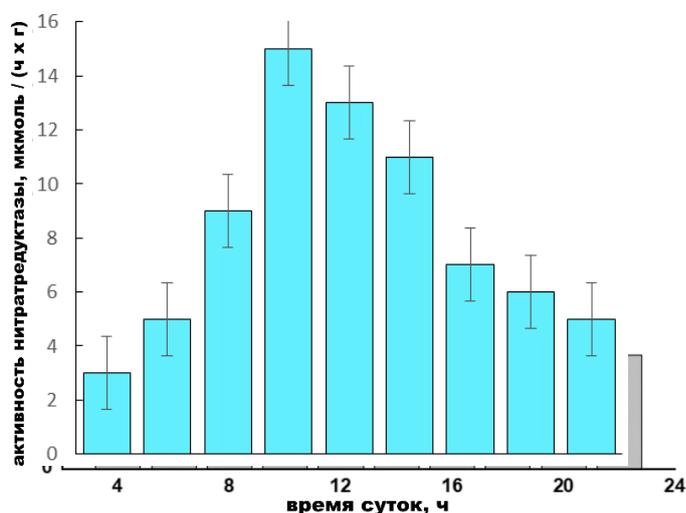


Рис. 5. Активность нитратредуктазы в листьях хлопчатника линия Кокер-312 в зависимости от времени суток. Примечания: по оси абсцисс – время суток, в часах; по оси ординат – активность нитратредуктазы, в мкмоль/ч×г сырого веса. $P \leq 0,05$

Таким образом, активность нитратредуктазы у хлопчатника существенно меняется в течение суток. Наибольшая активность фермента отмечена

спустя 5-6 часов после восхода солнца, т.е. после начала освещения. Суточные изменения нитратредуктазной активности хлопчатника не приводят к изменению вклада органов в процесс восстановления нитратов. Независимо от времени суток и дозы азота в среде лист оставался доминирующим органом в процессе восстановления нитратов (рис. 5).

Наряду с этим, было проведено сравнительное исследование активности фермента у контрольных и ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника. Как видно из данных, представленных в табл. 1, у сорта «АН-Боёвут-2» нитратредуктазная активность в период тестирования варьировала от 11,71 мкмоль (минимальное значение) до 17,82 мкмоль (максимум), составляя в среднем 14,30 мкмоль. Среднее арифметическое значение «М» нитратредуктазной активности у ген-нокаутного хлопчатника Порлок-1 составляет 17,52 мкмоль, что на 22,94% выше, чем у исходного родителя «АН-Боёвут-2». Аналогичные параметры у сортообразца «С-6524» представлены цифрами 14,45 и 20,39, соответственно, со среднеарифметическим значением «М» - 17,58 мкмоль, в то время как у её ген-нокаутной формы - Порлок-2 этот показатель соответствует 19,61 мкмоль, что на 11,55% выше, по сравнению с исходным генотипом «С-6524». Средняя арифметическая «М» у Порлок-2 была самая высокая среди всех протестированных генотипов (табл. 1).

Таким образом, однозначно более высокий уровень нитратредуктазной активности у всех ген-нокаутных форм хлопчатника серии Порлок по сравнению с исходными сортами (АН-Боёвут-2 и С-6524), дает основание предполагать, что инсерция в геном хлопчатника *PHYA1* RNAi вектора индуцирует системы, участвующие в транспортировке и утилизации неорганических азотных удобрений, повышая таким образом общую урожайность ген-нокаутных сортов.

Таблица 1.

Нитратредуктазная активность) листьев ген-нокаутных сортов хлопчатника в сравнении с их исходными сортообразцами

Генотипы	Даты определения нитратредуктазной активности, [мкмоль NO ₂ ⁻ (г сырого веса, час)] ^{-1*}				Среднее арифметическое M±m
	I	II	III	IV	
0 сегрегант	13,42±0,20	14,56±0,22	18,75±0,25	14,47±0,23	15,30±0,22
Кокер-312	12,35±0,19	13,64±0,21	18,26±0,25	15,14±0,23	14,85±0,22
T 1-7	15,21±0,22	16,48±0,23	19,86±0,24	20,87±0,25	18,11±0,23
T 31-10	14,31±0,21	15,37±0,22	18,79±0,23	19,65±0,24	17,03±0,22
АН-Боёвут-2	11,71±0,18	12,91±0,20	17,82±0,24	14,74±0,22	14,30±0,21
Порлок-1	18,05±0,22	12,11±0,20	17,82±0,23	22,11±0,25	17,52±0,22
C-6524	14,45±0,20	19,14±0,23	20,39±0,26	16,34±0,22	17,58±0,23
Порлок-2	15,31±0,21	19,71±0,23	21,37±0,25	22,05±0,27	19,61±0,24

* I – 10 июля, II – 15 июля, III – 21 июля, IV – 25 июля. P ≤ 0.05

В шестой главе диссертации под названием «**Фотосинтетическая активность у ген-нокаутных сортов хлопчатника**» приводятся результаты сравнительного исследования фотосинтетической активности различных сортов хлопчатника, включая ген-нокаутные линии и сорта серии Порлок.

При этом на первом этапе были изучены циркадные изменения фотофосфорилирующей активности хлоропластов как немодифицированных, так и ген-нокаутных сортов хлопчатника в зависимости от колебаний суточной температуры. На рис. 6 представлена фотофосфорилирующая активность хлоропластов различных сортов хлопчатника при воздействии изменяющихся суточных температур с диапазоном от +23⁰ С до +45⁰ С (приведены данные по сорту Порлок-1). Согласно полученным результатам у немодифицированных и ген-нокаутных сортов хлопчатника наблюдался определенный циркадный ритм активности циклического фосфорилирования (рис. 6, А). При этом с ростом суточной температуры изменения скоростей циклического фосфорилирования (ЦФ) и нециклического фосфорилирования (НЦФ) носили следующий характер (рис. 6, В): в диапазоне ночных температур уровень НЦФ был выше, чем ЦФ, в то время как повышение суточной температуры до дневной нормы вызывало переключение потоков электронов с нециклического пути на циклический.

Максимум активности ЦФ наблюдался при температурах, близких к 35⁰ С. При этом процесс НЦФ в хлоропластах немодифицированных сортов хлопчатника оказался более термочувствительным: значительное снижение его скорости наблюдалось уже при температурах около +30⁰ С - примерно на 60%, а при +50⁰ С его активность была почти нулевой (рис. 6 А, В). У ген-нокаутных сортов серии Порлок повышение суточной температуры вызывало рост активности ЦФ (рис. 6, А). При этом повышение температуры до +30⁰ С приводило к незначительному увеличению активности ЦФ на 15%, а увеличение суточной температуры до +40⁰ С повышало скорость ЦФ почти в 2 раза по сравнению с базовыми показателями в ночное время.

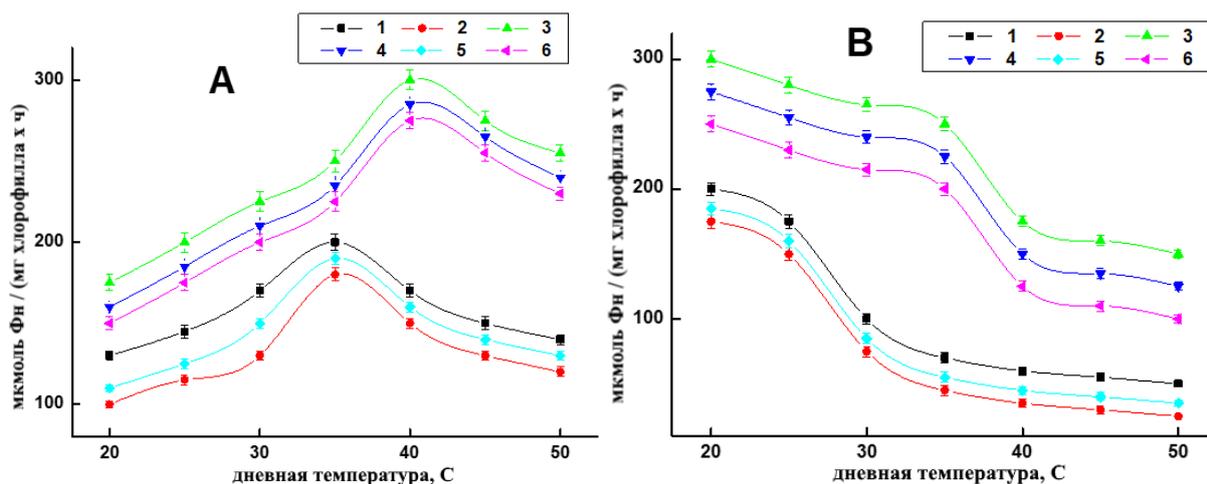


Рис. 6. Зависимость активности циклического (А) и нециклического фосфорилирования (В) хлопчатника от суточной температуры. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1. $P \leq 0.05$

Дальнейшее увеличение суточной температуры до $+50^{\circ}\text{C}$ вызывало незначительное снижение интенсивности ЦФ, однако его значение превышало контрольный уровень примерно на 55 – 70%. Что касается НЦФ, то при повышении суточной температуры до $+30^{\circ}\text{C}$ наблюдалось незначительное снижение его активности на 10%. Однако, увеличение суточной температуры до 40°C приводило к значительному снижению скорости – почти в 2 раза ниже контроля. При дальнейшем повышении температуры до дневного максимума активность НЦФ продолжала уменьшаться и составляла лишь 35% от контрольного уровня (рис. 6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что у ген-нокаутных линий и сортов серии Порлок наблюдалось меньшее снижение активности НЦФ по сравнению с исходными немодифицированными сортами, что позволяет предположить о большей устойчивости ФС II у трансформированных сортов хлопчатника к температурному стрессу.

Также были проведены исследования зависимости скорости реакции Хилла от колебаний суточной температуры. Как видно из рис. 7 при росте суточной температуры у немодифицированных сортов хлопчатника (приведены данные для Кокер-312 и АН-Боёвут-2) наблюдалось достоверное понижение скорости реакции Хилла уже повышении температуры до $+30^{\circ}\text{C}$ – в среднем на 25%. При дальнейшем росте суточной температуры ее активность продолжала снижаться, достигая минимальных значений (40% от контрольного уровня) при максимальной суточной температуре. В то же время при аналогичных суточных температурах растения модифицированных линий и сортов серии Порлок характеризовались довольно значительной термоустойчивостью: достоверное понижение скорости реакции Хилла было отмечено только при субмаксимальных и максимальных значениях суточных температур (примерно на 15%).

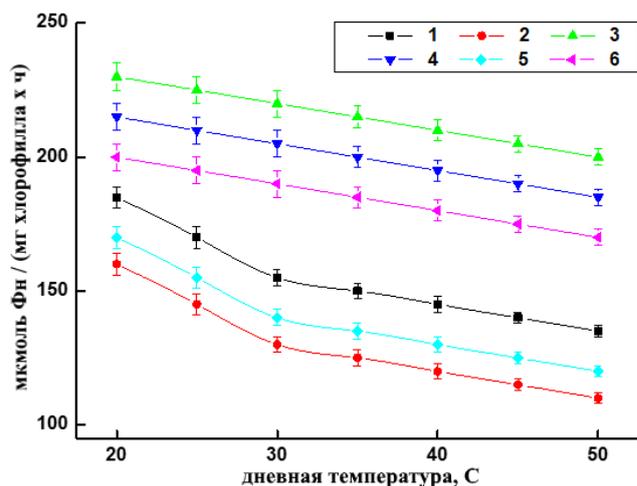


Рис.7. Зависимость скорости реакции Хилла у различных сортов хлопчатника от суточной температуры. Примечания: по оси абсцисс – изменение температуры в течение суток; по оси ординат – скорость реакции Хилла, мкмоль Рн (мг хлорофилла × ч). 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1. $P \leq 0,05$

Взятые вместе результаты исследований свидетельствуют о том, у ген-нокаутных сортов серии Порлок при тепловом шоке

(суточном росте температуры) происходило одновременное ингибирование НЦФ и реакции Хилла. Эти данные позволяют предположить, что снижение фотосинтетической активности хлоропластов этих сортов при высоких температурах в первую очередь связано с нарушениями функционирования водоокисляющего центра. В то же время немодифицированные исходные сорта хлопчатника обладали большей чувствительностью к повышению суточной температуры, и снижение фотосинтеза у данных сортов было связано с нарушениями функционирования как водоокисляющего центра, так и ФЭТЦ.

Далее были изучены циркадные изменения активности фотосинтеза у различных линий и сортов хлопчатника. При этом были охарактеризованы циркадные ритмы флуоресценции хлорофилла, содержания ключевых пигментов и активности ключевых ферментов цикла Кальвина у модифицированных и немодифицированных сортов хлопчатника (*Gossypium hirsutum*). В ходе экспериментов было установлено, что квантовый выход ФС II имел четко выраженный циркадный ритм у всех изученных сортов хлопчатника, достигая максимума в полночь, а минимума – в полдень (рис. 8, А).

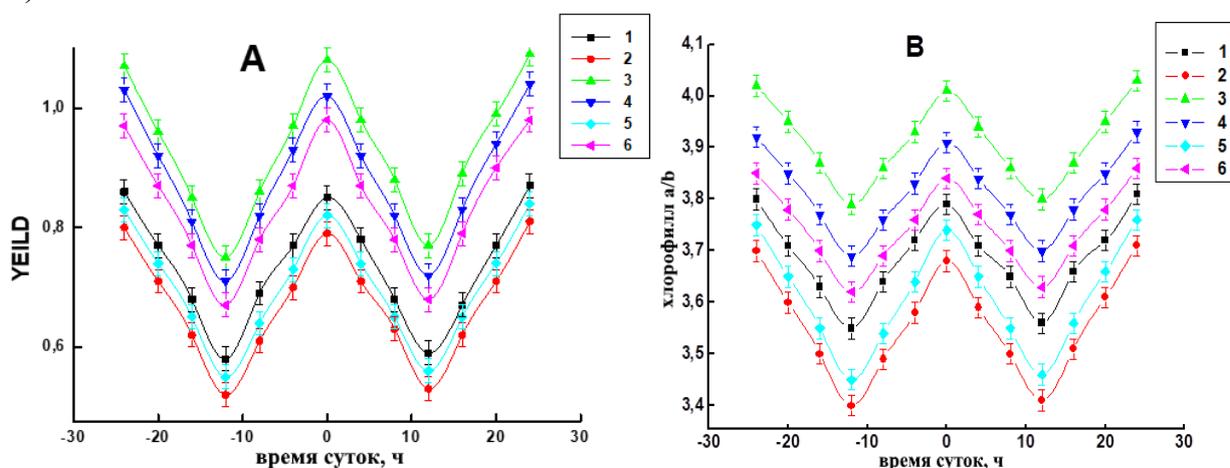


Рис.8. Суточные ритмы параметров активности фотосинтетического аппарата. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1. А – изменение квантового выхода, В – изменение отношения хлорофилла а/б. По оси абсцисс – время суток. $P \leq 0,05$

При этом необходимо отметить, что, несмотря на сходство общей направленности циркадных ритмов у контрольных и RNAi растений, наблюдалось значительное различие в абсолютных значениях параметра YEILD.

Так, у растений RNAi линий и сортов наблюдалось статистически достоверное более высокое значение параметра квантового выхода, чем у нетрансформированных растений, что позволяет предположить большую устойчивость к фотоингибированию и, вследствие этого, большая эффективность работы фотосинтетического аппарата, что хорошо коррелирует с данными о повышенной урожайности данных сортов (рис. 8, А).

При исследованиях пигментного аппарата по соотношению хлорофиллов (Chl a/b) было установлено, что отношение хлорофиллов a/b также имеет циркадную цикличность, достигая максимума в полночь (рис. 8, В). Кроме того, наблюдаемая у RNAi линий и сортов меньшая амплитуда колебаний отношения хлорофиллов a/b может свидетельствовать о большей, по сравнению с контрольными растениями, устойчивости фотосинтетического аппарата и, как следствие, большей эффективности фотосинтеза.

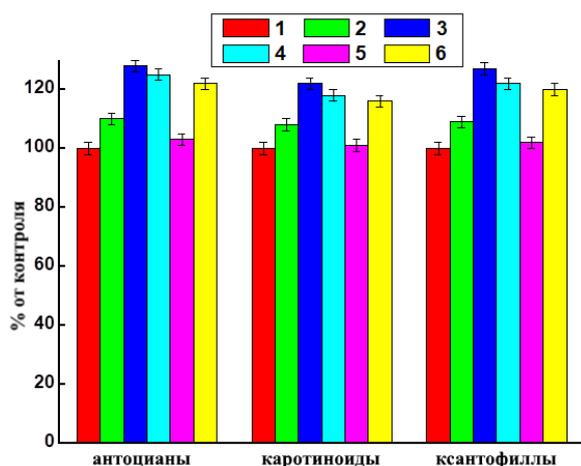


Рис. 9. Содержание каротиноидов и ксантофиллов в различных сортах хлопчатника. 1 – Кокер-312, 2 – ноль сегрегант, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1. Данные приведены в % от контроля. $P \leq 0,05$

При исследовании уровня антоцианов и каротиноидов в листьях хлопчатника трансформированных и нетрансформированных линий и сортов было показано более высокое содержание антоцианов и каротиноидов в листьях RNAi-сортов хлопчатника по сравнению с контрольными, что делает их более устойчивыми к фотоингибированию, и, как следствие, обеспечивает относительно высокий потенциал фотосинтетического аппарата у хлопчатника, по сравнению с исходными генотипами (рис. 9).

Также была исследована суточная активность основных ферментов цикла Кальвина – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RuBPC) и фосфоенолпируват карбоксилазы (PEPC) у различных ген-нокаутных и исходных (нетрасформированных) линий и сортов хлопчатника (рис. 10).

При этом график уровня активности RuBPC в суточной динамике в фазу бутонизации – начала цветения имел «седловидный» характер и у всех исследованных нами сортов, начиная с 8 ч, уровень активности RuBPC повышался и достигал максимальной величины к 9-10 ч, незначительно

снижаясь к 14-15 ч, вновь практически достигая максимума к 18-19 ч, а затем плавно снижался до минимума в ночное время (рис. 10, А). При этом между модифицированными и исходными сортами были выявлены достоверные различия при уровне значимости $P \leq 0.01$, что хорошо коррелирует с данными о более высокой урожайности данных сортов.

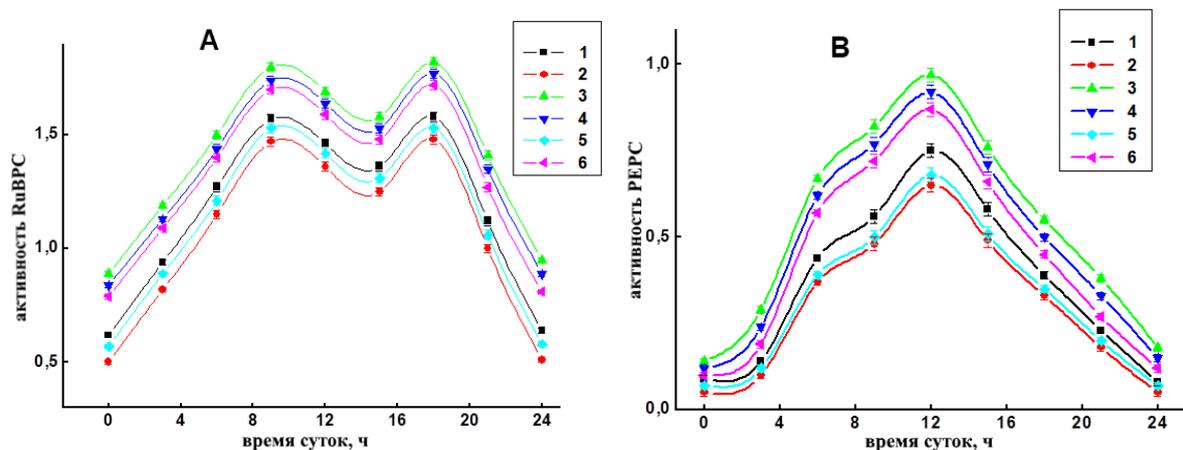


Рис. 10. Циркадные ритмы активности рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (А) и фосфоенолпируват карбоксилазы (В). 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1. По оси абсцисс – время суток; по оси ординат – активность ферментов, в $\mu\text{моль CO}_2/(\text{мг сырого веса} \times \text{мин})$. $P \leq 0,05$

При исследовании активности другого фермента цикла Кальвина – PEPCase было обнаружено, что ферментативная активность PEPCase имела четко выраженную циркадную зависимость, достигая максимума в полдень и снижаясь практически до нуля в полночь (рис. 10, В). При этом активность данного фермента (PEPCase) у ген-нокаутных сортов была достоверно выше, чем у немодифицированных сортов, что согласно имеющимся литературным данным может оказывать влияние на элонгацию волокна хлопчатника.

Кроме того, были проведены исследования сезонных изменений квантового выхода ФС II и активности основных ферментов цикла Кальвина у модифицированных и исходных генотипов хлопчатника. В результате было обнаружено, что наивысшее значение квантового выхода фотохимического процесса в фотосистеме II приходится приблизительно на 90-100 дневные растения со дня посева (рис. 11, А).

При этом у RNAi сортов максимальное значение параметра YIELD достигается на 5-10 дней раньше, чем для контрольных нетрансформированных сортов, что хорошо коррелирует с данными о раннеспелости (на 5-10 дней) ген-нокаутных сортов хлопчатника серии Порлок (рис. 11, А).

С увеличением возраста растений отмечался ожидаемый спад фотосинтетической активности как трансформированных, так и нетрансформированных сортов. Однако у RNAi сортов скорость падения была выше. Тем не менее, даже на более поздних этапах онтогенеза активность фотосинтетической системы ген-нокаутных сортов хлопчатника оставалась достоверно выше, чем у контрольных растений.

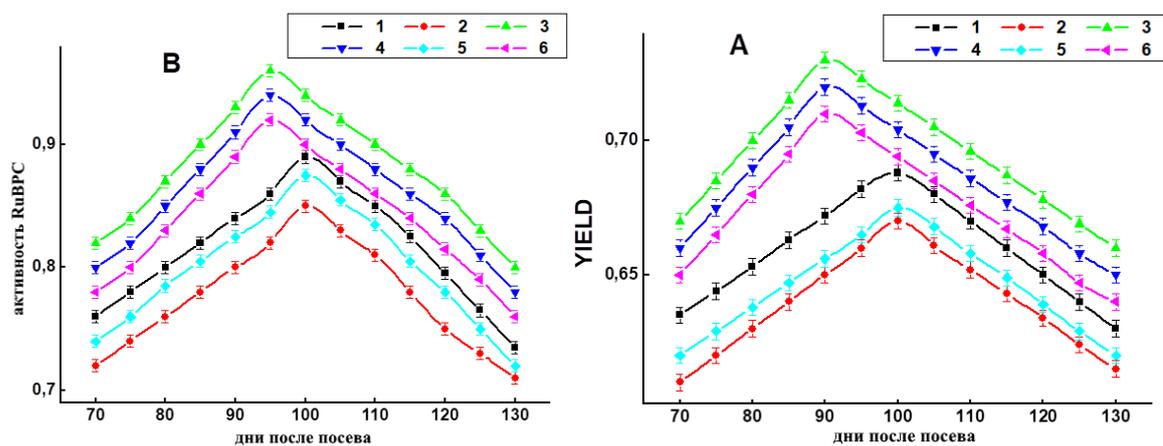


Рис. 11. Зависимость параметров активности фотосинтетического аппарата от фазы вегетации. А – изменение квантового выхода, В – активности RuBPC. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1. По оси абсцисс – дни после посева; по оси ординат – значение квантового выхода (А) или активность ферментов, в мкмоль CO_2 (мг сырого веса \times мин) (В). $P \leq 0,05$

Эти данные по квантовому выходу фотохимического процесса в фотосистеме II были подтверждены результатами по определению активности RuBPC, который играет важную роль в фотосинтезе, являясь ключевым регуляторным и скоростью-лимитирующим ферментом при ассимиляции CO_2 . При этом было обнаружено, что активность RuBPC быстро возрастала, начиная с 70 дня после посева, и достигала максимума к 100 дню после посева у контрольных растений и 95 дню – RNAi растений, что хорошо согласуется с вышеприведенными данными (рис. 11, В). Однако следует отметить, что активность RuBPC листьев снижалась, начиная с 105 дня вегетации у нетрансформированных растений и 100 дня у ген-нокаутных растений. При этом общая степень снижения активности фермента у ген-нокаутных растений была больше, чем у контрольных растений. Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными о снижении активности RuBPC вегетативных органов хлопчатника на поздних стадиях вегетации (рис. 11, В).

Таким образом, результаты исследования влияния инсерции RNAi векторной конструкции к гену фитохрома A1 показали, что данная вставка оказывает положительное влияние на фотосинтетическую активность ген-нокаутных растений по сравнению с контрольными растениями.

В седьмой главе диссертации под названием «**Оценка потенциальной устойчивости к абиотическим стрессам ген-нокаутных сортов хлопчатника**» приводятся результаты сравнительного исследования активности ферментов антиоксидантной системы и ряд биохимических параметров (жирнокислотный состав, содержание пролина, растворимых сахаров и крахмала) у RNAi линий и сортов хлопчатника.

Результаты экспериментов показали, что накопление промежуточных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (H_2O_2 и МДА) было выше у немодифицированных сортов (исходного Кокер-312 и родительских форм: АН-Боёвут-2 и С-6524) по сравнению с модифицированными сортами,

имеющими в геноме конструкцию с вектором к гену *PHYA1* (Порлок-1 и Порлок-2) (рис. 12). При этом наибольшее накопление продуктов ПОЛ наблюдалось у линий Кокер-312, а наименьшее у сорта Порлок-2.

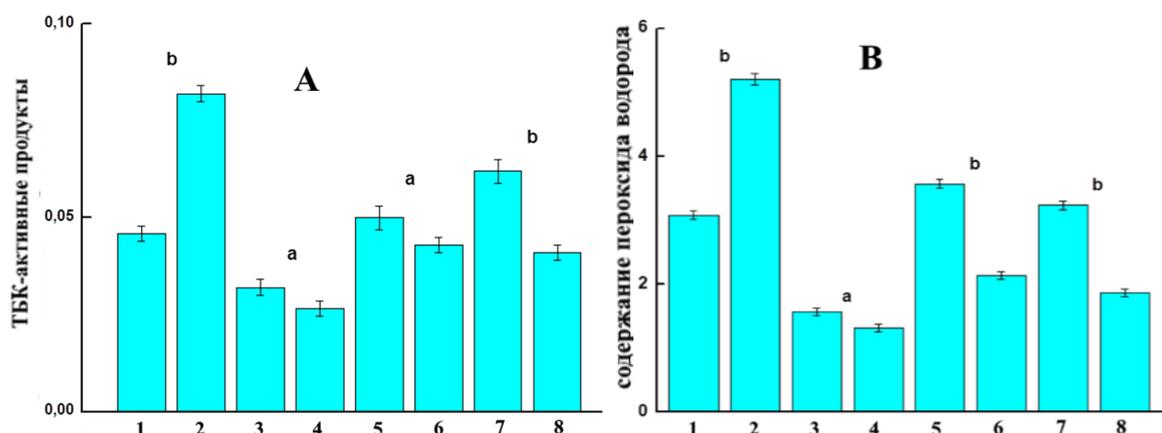


Рис. 12. Содержание H_2O_2 и МДА в листьях как модифицированных, так и немодифицированных сортов хлопчатника. А – содержание МДА, В – содержание H_2O_2 . По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31-10, 4 – Т 1-7, 5 – АН- Боёвут -2, 6 – Порлок-1, 7 – С6524, 8 – Порлок-2); по оси ординат – накопление ТБК-активных продуктов, в мкмоль МДА/мг сырого веса (А) или содержание H_2O_2 , мкмоль/мг сырого веса (В). а – $p \leq 0,05$, б – $p \leq 0,01$

Далее была исследована сравнительная активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (POD), и ферменты так называемого аскорбат-глутатионного цикла, включая аскорбатпероксидазу (APX) и глутатионредуктазу (GR), у RNAi сортов хлопчатника (рис. 13). При этом активность всех антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, POD, APX и GR) значительно различалась между разными генотипами и коррелировала с наличием векторной конструкции в генотипе (активность ферментов в листьях геннокаутных сортов была достоверно выше по сравнению с контрольным генотипом Кокер-312).

При этом способность поддерживать более высокую активность этих антиоксидантных ферментов приводило к более низкой продукции H_2O_2 , перекисному окислению липидов, более высокой стабильности мембран и, следовательно, более высокой засухо- и солеустойчивости сортов серии Порлок.

Эти результаты хорошо коррелируют с литературными данными об активности ферментов системы антиоксидантной защиты хлопчатника при солевом стрессе.

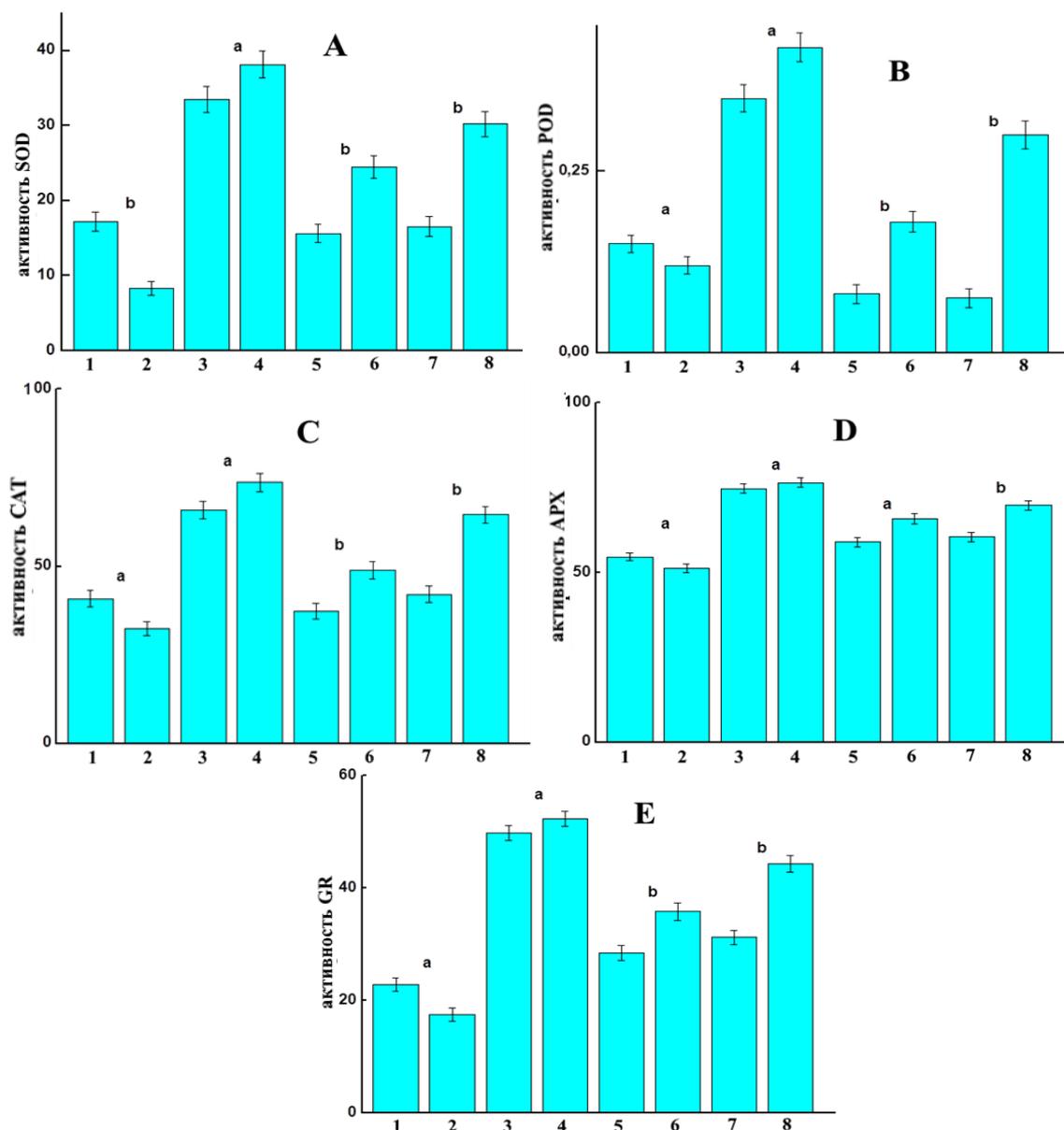


Рис. 13. Активность ферментов антиоксидантной системы в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. А – активность супероксиддисмутазы, В - активность пероксидазы, С – активность каталазы, D – активность аскорбатпероксидазы, Е – активность глутатионредуктазы. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31-10, 4 – Т 1-7, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1, 7 – С6524, 8 – Порлок-2); по оси ординат – активность ферментов, в единицах активности /мг белка. $P \leq 0,05$

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что система антиоксидантной защиты ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника с векторной конструкцией к гену фитохрома A1 имеет большую активность по сравнению с исходными и родительскими сортами и позволяют заключить о большей устойчивости модифицированных сортов к абиотическим стрессам.

Кроме того, было проведено сравнительное исследование биохимического состава листьев ген-нокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника.

Первоначально было исследовано содержание и состав фосфолипидов, с

которым тесно связана стабильность мембран как в нормальных условиях, так и при стрессе. Согласно полученным результатам, жирнокислотный (ЖК) состав разных генотипов хлопчатника различается.

Основными ЖК во всех исследованных образцах были пальмитиновая кислота (16: 0), стеариновая (18: 0), олеиновая (18: 1), линолевая (18: 2) и линоленовая (18: 3). На эти пять ЖК приходится более 95% общего содержания ЖК (таблица 3) в функциональных листьях хлопчатника. При этом ЖК состав у ген-нокаутных сортов содержал более низкую долю ненасыщенных ЖК и более высокую долю насыщенных ЖК по сравнению с таковой у контрольного немодифицированного генотипа Кокер-312.

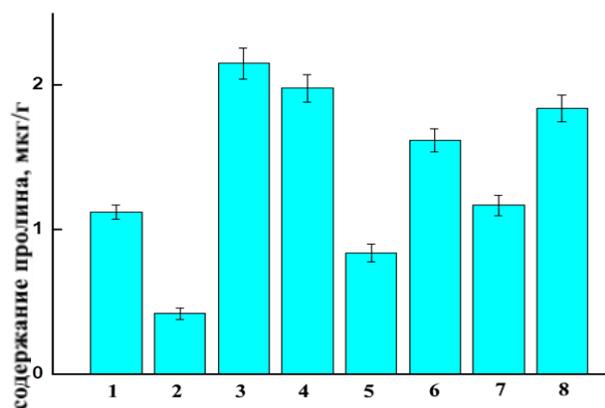


Рис. 14. Содержание свободного пролина в листьях различных генотипов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1, 7 – С6524, 8 – Порлок-2); по оси ординат – содержание пролина, в мкг /г сухого веса. $P \leq 0,05$

Далее было изучено влияние инсерции векторной конструкции на содержание свободного пролина в листьях различных сортов хлопчатника. Как видно из рис. 14, содержание пролина в разных сортах хлопчатника достоверно различалось и коррелировало с их устойчивостью к водному дефициту и засолению. При этом наименьшее количество пролина наблюдалось у немодифицированного исходного линия Кокер-312, а наибольшее у RNAi сорта Порлок-2.

Наряду с этим, было исследовано содержание углеводов у различных генотипов хлопчатника. Как видно из рис. 15, содержание растворимых сахаров, сахарозы, крахмала и отношение сахароза/крахмал в стеблевых листьях различается в зависимости от исследуемого генотипа и зависит от наличия векторной конструкции.

При этом у ген-нокаутных сортов Порлок-1 и Порлок-2 отмечается более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахароза/крахмал по сравнению с немодифицированным контрольным линиям Кокер-312 (рис. 15). Эти результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными о содержании сахаров у различных генотипов хлопчатника в условиях солевого стресса.

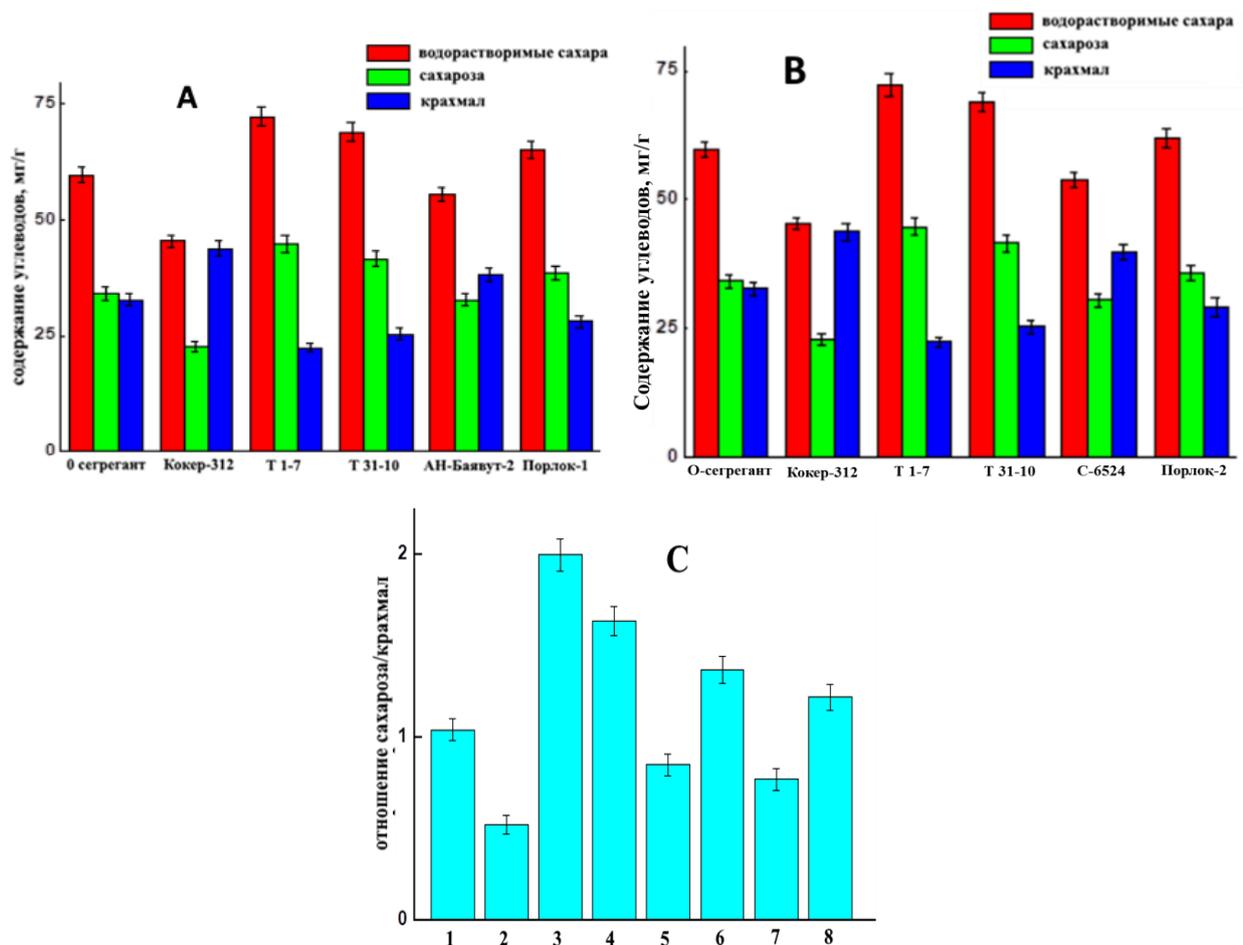


Рис. 15. Содержание углеводов в стеблевых листьях различных генотипов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Боёвут-2, 6 – Порлок-1, 7 – С6524, 8 – Порлок-2); по оси ординат – содержание углеводов, в мг /г сухого веса (А, В) и отношение содержания сахаразы/крахмала (С). $P \leq 0,05$

Таким образом, суммируя вышеизложенное необходимо отметить, что фенотипическая устойчивость ген-нокаутных сортов серии Порлок к абиотическим стрессам подтверждено молекулярными исследованиями. У данных сортов наблюдалась более высокая активность антиоксидантных ферментов, более высокое содержание свободного пролина, более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахаразы/крахмал по сравнению с немодифицированным контрольным линиям Кокер-312.

ВЫВОДЫ

Следующие выводы сделаны в докторской диссертации на тему: «Исследование генно-клеточных особенностей РНК интерференции гена фитохрома A1 хлопчатника (*Gossypium ssp*), а также физиолого-биохимических параметров ген-нокаутных сортов Порлок»:

1. Определено подавление экспрессии гена фитохрома A1 при одновременной оверэкспрессии гена фитохрома В у ген-нокаутных сортов Порлок-1 и Порлок-2.

2. Обнаружена дифференциальная экспрессия генов, определяющих качество волокна и устойчивость к абиотическим стрессам, у ген-нокаутных сортов хлопчатника Порлок-1 и Порлок-2.

3. В результате исследований определен более высокий уровень нитратредуктазной активности у ген-нокаутных сортов серии Порлок по сравнению с исходными и родительскими формами.

4. Показана большая лабильность переключения потоков между фотосистемами и большая устойчивость фотосистемы II к высоким температурам у ген-нокаутных сортов серии Порлок.

5. Показано, что у RNAi сортов хлопчатника наблюдалось статистически достоверное более высокое значение параметра квантового выхода по сравнению с нетрансформированными растениями, большая эффективность работы фотосинтетического аппарата.

6. Определена достоверно большая активность ферментов цикла Кальвина (RuBPC и PEPС) у ген-нокаутных сортов хлопчатника серии Порлок по сравнению с исходными и родительскими формами.

7. Определены более низкие уровни одного из активных форм кислорода – H_2O_2 и конечного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида в тканях листьев ген-нокаутных сортов хлопчатника в сравнении с исходными и родительскими сортами.

8. Показано, что активность всех антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, POD, APX и GR) значительно различалась между разными генотипами и коррелировала с наличием векторной конструкции в генотипе.

9. Определено, что ЖК состав у ген-нокаутных сортов содержал более низкую долю ненасыщенных ЖК (UFA) и более высокую долю насыщенных ЖК (SFA) по сравнению с линией Кокер-312 и контрольными образцами.

10. Показана зависимость накопления свободного пролина и наличие корреляции с устойчивостью ген-нокаутных сортов к абиотическим стрессам по сравнению с контрольными от наличия векторной конструкции.

11. Доказано, что у ген-нокаутных сортов Порлок-1 и Порлок-2 отмечается более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахароза/крахмал по сравнению с немодифицированным контрольным линией Кокер-312.

**SCIENTIFIC COUNCIL DSc.29.08.2017.B.53.01 ON AWARD OF
SCIENTIFIC DEGREES AT THE INSTITUTE OF GENETICS AND PLANT
EXPERIMENTAL BIOLOGY AND NATIONAL UNIVERSITY OF
UZBEKISTAN**

CENTER OF GENOMICS AND BIOINFORMATICS

UBAYDULLAEVA KHURSHIDA ABDULLAEVNA

**INVESTIGATION OF GENETIC AND CELLULAR PECULIARITIES OF
RNA INTERFERENCE OF PHYTOCHROME A1 GENE OF COTTON
(GOSSYPIUM SSP) AS WELL AS PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL
PARAMETERES OF RNAI VARIETIES “PORLOQ”**

03.00.14 – Genomics, Proteomics and Bioinformatics

**DISSERTATION ABSTRACT FOR THE DOCTOR OF SCIENCES (DSc.) OF
BIOLOGICAL SCIENCES**

TASHKENT – 2019

The title of doctor of sciences dissertation (DSc.) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers B2019.2.DSc/B82 №B2017.2.DSc/B46

The dissertation has been carried out at the Center of Genomics and Bioinformatics.

The abstract of the dissertation is posted in three languages (Uzbek, Russian, English (resume)) on the webpage of the Scientific Council (www.genetika.uz) and on the website of "Ziyonet" Information and education portal (www.ziyonet.uz)/

Scientific consultant:

Abdurakhmonov Ibrokhim Yulchievich
Doctor of Biological Sciences, Academician

Official opponents:

Rizaeva Safiya Mamedovna
Doctor of Biological Sciences, Professor

Kadirova Dilbar Abdullaevna
Doctor of Biological Sciences, Professor

Mukhamedov Rustam Sultanovich
Doctor of Biological Sciences, Professor

Leading Organization:

Institute of Bioorganic Chemistry

The defens of the dissertation will take place on « ____ » _____ 2019 at _____ at the meeting of Scientific Council DSc.29.08.2017.B.53.01 at the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology, and National University of Uzbekistan (Address: 111226, Tashkent region, Kibray district, Yuqori-yuz, Conference hall of the place of the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology / Tel: (99871) 264-23-90, fax: (99871) 264-22-30. E-mail: igebr@academy.uz, [genetics @ uzsci. net](mailto:genetics@uzsci.net), gen@inst.gov.uz.

Doctoral dissertation is registered at the Information-resource center of Institute Genetics and Plant Experimental Biology (with registration number № ____): where can be familiarized in the Information-resource center (111226, Tashkent region, Kibray district, Yuqori-yuz, Tel. (99871) 264-23-90, fax: (99871) 264-22-30. E-mail: igebr@academy.uz

Abstract of dissertation sent out on « ____ » _____ 2019 year.
(mailing report № ____ dated « ____ » _____ 2019 year).

A.A. Narimanov
Chairman of Scientific Council for
awarding of the Scientific degrees, Doctor
of Agricultural Sciences

S.K. Baboev
Scientific Secretary of Scientific Council
for awarding of the Scientific degrees,
Doctor of Biological Sciences

Z.T. Buriev
Chairman of the Scientific Seminar under
Scientific Council for the awarding of the
Scientific degrees, Doctor of Biological
Sciences,

INTRODUCTION (abstract of doctoral dissertation)

The aim of the research work is to study the gene-cell characteristics of cotton (*Gossypium* ssp) phytochrome A1 gene RNA interference, as well as the physiological and biochemical parameters, namely, the content of reactive oxygen species, the activity of basic antioxidant enzymes, the composition of fatty acids and carbohydrates, of Porloq gene knockout varieties.

The object of the research are various gene-knockout and unmodified varieties and lines of cotton *G. hirsutum*.

Scientific novelty of the research is as follows:

for the first time, the suppression of phytochrome A1 gene expression was determined with simultaneous over-expression of the phytochrome B gene in gene knockout varieties Porloq-1 and Porloq-2;

differential expression of genes determining fiber quality and resistance to abiotic stresses was revealed in gene knockout varieties of cotton Porloq-1 and Porloq-2;

a higher level of nitrate reductase activity was found in gene knockout varieties of the Porloq series;

for the first time, a large lability of flow switching between photosystems and a high resistance of photosystem II to high temperatures in gene knockout varieties of the Porloq series were established;

it was shown that a statistically significant higher value of the quantum yield parameter and, accordingly, a greater efficiency of the photosynthetic apparatus was observed in RNAi varieties of cotton than in control plants;

reliably greater activity of Calvin cycle enzymes (RuBPC and PEPC) was detected in gene-knockout cotton varieties of the Porloq series with respect to the parent and parental forms;

lower levels of one of the active forms of oxygen - H_2O_2 and the final product of lipid peroxidation - malondialdehyde were established in leaf tissues of gene-knockout cotton cultivars in comparison with the original and parent varieties;

it was shown that the activity of all antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD, APX, and GR) was significantly different between different genotypes and correlated with the presence of a vector construct in the genotype;

it was revealed that the fatty acid (FA) composition in gene knockout varieties contained a lower proportion of unsaturated FAs (UFA) and a higher proportion of saturated FAs (SFA) compared to the control Coker-312 genotype;

analysis of the accumulation of free proline in gene-knockout and unmodified cotton varieties has been showed the dependence of this parameter on the presence of a vector structure and the existence of a correlation with the resistance of varieties to abiotic stresses;

for the first time, it was found that gene-knockout varieties Porloq-1 and Porloq-2 show a higher content of soluble sugars and sucrose and, accordingly, a higher value of the sucrose / starch ratio compared to the control line Cocker-312.

Implementation of the research results. Based on the scientific results of the the gene-cell characteristics of cotton (*Gossypium* ssp) phytochrome A1 gene

RNA interference, as well as the physiological and biochemical parameters of Porlock gene-knockout varieties:

a patent for the selection achievement (No. NAP 00146) of the Intellectual Agency of the Republic of Uzbekistan for the upland cotton variety Porloq-1 was received. As a result, the opportunity was obtained to produce high-quality cotton fiber from the Porloq-1 cotton variety;

a patent for the selection achievement (No. NAP 00147) of the Intellectual Agency of the Republic of Uzbekistan for a upland cotton variety Porloq-2 was received. As a result, it was possible to produce high-quality cotton crops due to the high yield of cotton varieties and the disease resistance of cotton varieties Porloq-2;

cotton varieties Porlok-1 and Porlok-2 were introduced to farms in different regions of the republic (certificate of the Ministry of Agriculture dated October 31, 2019 No. T-9 / 02-1087). So, for example, for the period 2013-2019 Porlock-1 cotton cultivar was sown on a total area of 133,491.3 ha, and Porlock-2 cultivar was sown on a total area of 54,477.8 ha. As a result, the average yield of new varieties reached 40 centners per hectare, which made it possible to obtain high-quality fiber with micronaire 4.2, strength -37.9 (Str) and fiber length 1.27 (UHM);

the results obtained using RNA interference for the functional genomics of cotton were used in 4 foreign journals with high impact factors to study the interactions between phytochrome genes - genes that control the signs of cotton fiber length (PLOS ONE oct 2017/ <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186240> Research Gate IF-2,76, Genet.mol.Res. 2016, Dec. Research Gate IF -0,75, AJPS Jan 2017, IF-5,46, BMC Genetics, oct 2016, IF 3,73). As a result, it was possible to improve the methods of applying new gene knockout technologies and create new varieties of cotton with a long fiber.

Publication of the research results. A total of 29 scientific papers were published on the topic of the dissertation. Of these, 16 scientific articles, including 10 in republican and 6 in foreign journals recommended by the Higher Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publishing the main scientific results of doctoral dissertations, and 2 republican copyright certificates for cotton varieties Porlok-1 and Porlok-2.

The structure and volume of the thesis. The structure of the dissertation consists of introduction, seven chapters, conclusion and list of references. The thesis is 197 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Абдурахмонов И.Ю. Буриев З.Т. Абдукаримов А.А. Макамов. А.Х. Дарманов. М.М. Рузибаев Х.С. Шапулатов.У.М. // Ғўза- Порлоқ-1 Ўсимлик навига патент, № NAP 20130014, Тошкент 15.11.2013
2. Абдурахмонов И.Ю. Буриев З.Т. Абдукаримов А.А. Макамов. А.Х. Дарманов. М.М. Рузибаев Х.С. Шапулатов.У.М. // Ғўза- Порлоқ-2 Ўсимлик навига патент, № NAP 20130015, Тошкент 15.11.2013
3. Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю., Убайдуллаева Х.А., Абдукаримов А.А. Получение трансгенного растения хлопчатника путем соматического эмбриогенеза. // Узбекский биологический журнал. - Ташкент, 2008. - Спецвыпуск. - С. 23-26.(03.00.00.№5)
4. Убайдуллаева Х.А., Адылова А.Т., Имамходжаева, Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Фотосинтетическая активность генотипов хлопчатника, полученных с помощью технологии РНУА1-RNA интерференции. // Фанлар академияси маърузалари. Tashkent, 2016.- №1.- С.74-77. (03.00.00 №6)
5. Убайдуллаева Х.А., З.Т. Буриев, Ш.Э. Шерматов, М.С. Аюбов, Т.М. Норов, А. Абдукаримов, И.Ю. Абдурахмонов. Получение новых линий хлопчатника с помощью RNAi векторов. // Узбекского биологического журнала. Тошкент, 2016 - Спецвыпуск. - С. 8-10. (03.00.00.№5)
6. Х.А. Убайдуллаева, А.Т.Адылова, З.Т.Буриев, И.Ю. Абдурахмонов Нитратредуктазная активность ряда ген-нокаутных форм хлопчатника с измененной экспрессией фитохромных генов. // Узбекского биологического журнала. Тошкент, 2016 - Спецвыпуск. - С. 67-70. (03.00.00.№5)
7. Адылова А.Т., Убайдуллаева Х.А., Рузибаев Х.С., Аюбов М.С., Ишимов У.Ж., Абдурахмонов И.Ю., акад. АН РУз А.Абдукаримов. Свободный аминокислотный состав листьев ген-нокаутного производного хлопчатника Кокер-312, полученное с помощью технологии РНК-интерференции. // Доклады академии наук, 2017. № 3, С.79-80. (03.00.00.№6)
8. Abdurakhmonov I.Y., Shapulatov U.M., Shermatov S.E., Kushanov F.N., Kamburova V.S., Ubaydullaeva H.A., et al. Successes and repispectives of genomics in Uzbekistan. // Uzbek biological journal. Tashkent, 2017.- №3. P. 3-13.(03.00.00; №5)
9. А.Т.Адылова, Х.А. Убайдуллаева, Е.В.Никитина. Передача светового сигнала у высших растений с участием фитохрома. // Узбекского биологического журнала. Тошкент, 2017 -№3 - С. 19-22.(03.00.00.№5)
10. Х.А. Убайдуллаева. Успехи генной инженерия хлопчатника. // Узбекский биологический журнал. Ташкент, 2018.- №6 - С.7-10. (03.00.00.№5)
11. Ibrokhim Y. Abdurakhmonov, Mirzakamol S. Ayubov, Khurshida A

- Ubaydullaeva et al. RNA interference for functional genomics and improvement of cotton (*Gossypium* spp.)// Front. Plant Sci doi: 10.3389/fpls.2016.00202. IF-4,298
12. Khurshida Ubaydullaeva, Sherzod Nematov, Azadkhan Adylova, Ibrokhim Abdurakhmonov. Comparative study of photosynthesis and nitrate reductase activity of “Coker-312” and the line “T6-1~7” obtained by “PHYA1- RNAi” technology. // Proceedings of the III Tashkent International innovation forum. Tashkent, 2017. - P. 182-187.
13. Ubaydullaeva Kh.A., Kamburova V.S., Adylova A.T., Buriev Z.T. Nitrate reductase activity of RNAi-based cotton varieties. // European science review. 2018. №5-6. P. 24-27. (03.00.00.№6).
14. Ubaydullaeva Kh.A., Kamburova V.S., Nematov Sh., Adylova A.T., Buriev Z.T. Study of carbon and nitrate exchange in cotton genotypes obtained by “PHYA1-RNAi” technology. // European science review 2018.- №5.- P. 28-31.
15. Khurshida Ubaydullaeva, Venera Kamburova, Zabardast Buriev.. Analysis of genes expression level in different cotton varieties // American journal of research. USA, Michigan, 2019. -№ 7-8.- С. 215-221. №23. SJIF. IF-3,264
16. Venera Kamburova, Khurshida Ubaydullaeva, Zabardast Buriev. Comparative study of biochemical parameters in gene-knockout cotton varieties. // American journal of research. USA, Michigan, 2019. -№ 7-8.- С.174-181. №23. SJIF. IF-3,264

II бўлим (II часть; Part II)

17. Abdurakhmonov I.Y, Shapulatov U.M., Shermatov S.E., Buriev Z.T., Abdullaev A.A., Kushanov F.N., Egamberdiev I.B., Udaydullaeva Kh.A., et al. Achievements and perspectives of cotton “omics” in Uzbekistan.//32nd International Cotton conference, March 19-21 2014. Bremen.Germany.
18. Ayubov M., BurievZ., Udaydullaeva Kh.A., et al. Deciphering of biological function of cotton PHYB using synthetic short oligonucleotide duplex.// International Cotton genome initiative (ICGI) research conference, Huazhong agricultural university Wuhan, Yubei, China-2014/ Web page: www.researchgate.net/publication/275019683.
19. Убайдуллаева Х.А., В.С. Камбурова, З.Т. Буриев. Влияние нокаута гена фитохрома A1 на фотосинтетическую активность листьев хлопчатника. // “Актуальная биотехнология” журнал. Воронеж, 2018.- №3 - С. 348-352
20. Убайдуллаева Хуршида Абдуллаевна, Камбурова Венера Сейтумеровна, Насриева Камила Станиславовна, Буриев Забардаст Таджибаевич. Функционирование антиоксидантной системы ген-нокаутных сортов хлопчатника. // Межд. Научно-практ конференция. Казахстан Астана 2018. С. 295-299.
21. Убайдуллаева Х.А., Нематов Ш.К., Адылова А.Т., Абдурахмонов И.Ю. Сравнительное изучение фотосинтетической и нитратредуктазной активностей хлопчатника «Кокер-312» и его ген-нокаутной формы «Т6-1-7». // “Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари” Республика илмий анжумани. Тошкент, 2016. С.65-67.

22. Убайдуллаева Х.А., Бўриев З.Т., Аюбов М.С., Абдурахмонов И.Ю. Ген-нокаут технологияси ёрдамида РНУА1 гени эспрессияси сусайтирилган гўза линияларида фенотипик белгиларнинг ўзгариши. “Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари” Республика илмий анжумани. Тошкент, 2016. С.77-78.
23. Убайдуллаева Х.А., Адылова А.Т., Нематов Ш.К., Кувондиқов В.О., Аюбов М., Омаров С., Рузибаев Х., Ходжаева У., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Гўза РНУА1 гени эспрессиясини RNA интерференция технологияси ёрдамида сусайтириш орқали олинган генотипларнинг фотосинтетик фаоллиги // М.Улуғбек номидаги Ўзбекистон миллий университети Проф. Норбоев Зариф Норбоевичнинг 80-йиллигига бағишланган “Биология, экология ва тупроқшуносликнинг долзарб муаммолари” мавзусидаги илмий-амалий семинар материаллари. Тошкент, 2016. С. 201-203.
24. Убайдуллаева Х.А., Адылова А.Т., Имамходжаева А.С., Рузибаев Х., Омаров С., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Сравнительный анализ уровня нитратредуктазной активности ряда ген-нокаутных сортов хлопчатника с измененной экспрессией фитохромных генов // М.Улуғбек номидаги Ўзбекистон миллий университети Проф. Норбоев Зариф Норбоевичнинг 80-йиллигига бағишланган “Биология, экология ва тупроқшуносликнинг долзарб муаммолари” мавзусидаги илмий-амалий семинар материаллари. Тошкент, 2016. С. 203-204.
25. Убайдуллаева Х.А., Ишимов У.Ж., Рузибаев Х.С., Адылова А.Т., Абдурахмонов И.Ю. Сравнительное исследование состава свободных аминокислот в листьях хлопчатника «Т7-1_7», полученного с помощью технологии РНК-интерференции. // “Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари” Республика илмий анжумани, Тошкент, 2017. С.75.
26. Убайдуллаева Х.А., Камбурова В.С., Назарова Е.Ф., Абдурахмонов И.Ю. Транскрипционное регулирование инициации волокна хлопчатника. // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии. Республиканская научная конференция. Ташкент, 2018. С.166-167.
27. Убайдуллаева Х.А., Камбурова В.С., Назарова Е.Ф., Абдурахмонов И.Ю. Использование геномных технологий для улучшения качества хлопкового масла. // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии. Республиканская научная конференция. Ташкент, 2018. С.168-169.
28. Убайдуллаева Х.А., Камбурова В.С., Насриева К.С., Муллахунов Б.Т., Раджабов Ф.С., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Исследование активности ферментов антиоксидантной системы у сортов хлопчатника с РНК-интерференцией гена фитохрома А1. // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии. Ташкент, 2019. С.164-166.
29. Убайдуллаева Х.А., Камбурова В.С., Насриева К.С., и др. Исследование жирнокислотного состава и содержания пролина у ген-нокаутных сортов хлопчатника. // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии. Ташкент, 2019. С.166-167

Автореферат “ Ўзбекистон биология журналы ” журналы тахририятида
тахрирдан ўтказилган

Босишга рухсат этилди: 18.12.2019 йил
Бичими 60x84 ¹/16, «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табағи 4,25. Адади 80. Буюртма №18-12

“IMPRESS MEDIA” масъулияти чекланган жамияти.
Тошкент шаҳри, Қушбеги кўчаси, 6