

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI**  
**OLIY VA O‘RTA MAXSUS TA‘LIM VAZIRLIGI**  
**MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI**  
**O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI**

Qo‘lyozma huquqi asosida

UDK.633.5:575.1(571.1)

**ERKAYEVA OZODA BAXROMOVNA**

**Gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan g‘o‘za liniyalaridagi qimmatli  
xo‘jalik belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilish**

5A140107 – Genetika

Magistr

Akademik darajasini olish uchun yozilgan

Dissertatsiya

**Ilmiy rahbar:** b.f.d.dots. Kushanov F.N.

**Ilmiy maslahatchi:** akademik Abdurahmonov I.Y

TOSHKENT-2018

## MUNDARIJA

<b>Shartli belgilar va qisqartmalar.</b> . . . . .	3
<b>KIRISH.</b> . . . . .	4
<b>I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI.</b> . . . . .	9
1.1. <i>PHYA1</i> genining o‘simlik o‘sishi va rivojlanishidagi ahamiyati. . . . .	9
1.2. RNK interferensiyasining molekulyar mexanizmi. . . . .	16
1.3. Qishloq xo‘jaligi ekinlarini rivojlantirishda RNK interferensiyasining roli. . . . .	21
<b>II BOB. MATERIALLAR VA USLUBLAR</b> . . . . .	23
2.1. Tadqiqot namunalarini tanlash. . . . .	23
2.2. Uskuna va reaktivlar. . . . .	23
2.3. Foydalanilgan uslublar. . . . .	25
2.3.1. O‘simlik to‘qimasidan genom DNK ajratish. . . . .	25
2.3.2. Gel-elektroforez. . . . .	29
2.3.3. Polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) va genotiplash. . . . .	31
2.4. Paxta tolasiga qo‘yiladigan sanoat talablari va tola sifat ko‘rsatkichlarini HVI tizimida aniqlash. . . . .	42
<b>III BOB. OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING MUHOKAMASI.</b> . . . .	48
3.1. RNK interferensiyasi asosida <i>PHYA1</i> geni nokaut qilingan biotexnologik g‘o‘za genotiplarini olish. . . . .	47
3.2. Gen-nokaut liniyalaridagi tola sifat belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilish. . . . .	52
3.3. Yaratilgan bekkross duragaylarida tola sifat ko‘rsatkichlarining tahlili. . . . .	55
3.3.1. Tolaning pishiqlik (Str) ko‘rsatkichining tahlili. . . . .	56
3.3.2. Tolaning uzunligi (Len) ko‘rsatkichining tahlili. . . . .	58
3.3.3. Tolaning elongatsiyasi (Elo) ko‘rsatkichining tahlili. . . . .	59
3.4. Bekkross duragaylari morfo-biologik xususiyatlarini tahlil qilish. . . . .	60
<b>XULOSALAR.</b> . . . . .	65
<b>FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO‘YXATI</b> . . . . .	68

### **Shartli belgilar va qisqartmalar**

dNTPs – Deoxynucleotide triphosphates (Dezoksinukleozid trifosfatlar)

DNA (DNK) – Deoxyribonucleic acid (Dezoksiribonuklein kislota)

PCR (PZR) – Polymerase chain reaction (Polimeraza zanjir reaksiyasi)

BSA (BZA) – Bovine serum albumin (Buqa zardobi al'bumini)

NCBI (BMMM) – National Center for Biotechnology Information  
(Biotexnologiya ma'lumotlari uchun milliy markaz)

EDTA (EDTA) – ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamintetraatsetet)

SDS (NDS) – Sodium dodecyl sulphate (Natriy dodetsil'sul'fat)

TEMED (TEMED) – Tetramethylethylenediamine (tetrametiletildiamin)

Tris (Tris) – Tris (hydroxymethyl) aminomethane (tris  
(gidroksimetil)aminometan)

TBE (TBE) – Tris-Boric acid-EDTA (Tris-Borat kislotasi-EDTA)

DICER-LIKE1 –RNKaza III oilasi vakili endoribonukleaza DICER yoki  
RNKaza motiviga ega xelikaza nomlari bilan ma'lum

AGO (Argonaute)- RISCni katalizlovchi oqsillar komponentlari bo'lib, bular  
RNK

interferentsiyasida genlarni nofaol qilishga javobgar oqsil

E.coli-Escherichia coli bakteriya

TOPO TA- genlarni klonlashda ishlatiladigan vektor qurilma

SOC-Super optimal broth(SOB)with catabolite repression – hujayra o'limini  
boshqaruvchi gen

MS(Murashige and Skoog)- ozuqa muhit

WT- *ingl.* wild type (yovvoyi tur)

Arabidopsis thaliana–genom ketma-ketliklari ma'lum bo'lgan model o'simlik

Donor-o'simlikning otalik shakli

Retsipient-o'simlikning onalik shakli

Nol gibrid –genomida gen konstruksiyasi mavjud bo'lmagan

HVI- High Volume Instrument

## KIRISH

**Magistrlik dissertasiya mavzuning asoslanishi va uning dolzarbligi:**BMT ma'lumotlariga ko'ra 2050 yilga borib dunyo aholisining soni 9 milliardga yetishi takidlanmoqda. Aholi sonining keskin ortishi insoniyatning oziq-ovqatga va kiyim-kechak mahsulotlariga bo'lgan talabning ortishiga sabab bo'lmoqda. Bu esa, o'z navbatida qishloq xo'jaligida ekin maydonlaridan samarali foydalanish va shu bilan birga ekin turlarining sifatli, erta pishar, hosildor hamda kasallik va zararkunandalarga chidamli navlarini yaratishni taqozo qiladi [5].

Mamlakatimiz mustaqillik yillarida paxtachilik sohasida keng qamrovli islohotlar olib borilishi natijasida qator salmoqli natijalarga erishildi. Keyingi yillarda ushbu sohada yangi, ilg'or texnologiyalarni qo'llash, mo'l hosil olishda inovatsion usullarni jalb qilinayotgani hech kimga sir emas.

O'zbekistonning paxta yetishtiruvchi eng shimoliy mintaqalardan biri ekanligini inobatga oladigan bo'lsak, bu ish orqali paxta hosilini sovuq kunlarga qadar erta yig'ishtirib olish imkoni tug'iladi va tola sifati saqlab qolinadi. Jahon seleksionerlari bir necha o'n yillardan buyon o'rta tolali uzun tolalai g'o'za navlarini yaratish ustida tatqiqotlar olib borayapti. Chunki uzun tolaga ega bo'lgan g'o'za navlari tolasining har bir qo'shimcha millimetri uning qiymatini oshiradi. Biroq tola sifati yaxshilash jarayonida uning ertapisharlik xususiyati va hosildorligiga putur yetishi mumkin. Bir vaqtning o'zida o'rta tolali paxtaning sifati yaxshilash, gullashi va ochilishini tezlashtirish, shuningdek, hosildorligini oshirish oson emas. Yangi navlar yaratilganda, patogen mikroorganizmlar va zararkunanda hasharotlarning tabiiy tanlanish va moslashuvchanlik kabi jarayonlarning mavjudligi tufayli ularning yanada agressiv tur va shakllarining paydo bo'lishi kuzatiladi. Olimlar tomonidan bu kabi muammolarni hal etishda ananaviy seleksiya usullarining imkoniyatlari cheklanganligini etirof etiladi.

Bu kabi jiddiy muammolarni hal etishda zamonaviy gen muhandisligi va markerlarga asoslangan seleksiya texnologiyalaridan foydalanish yuqori samaradorlikka ega. Shu kabi zamonaviy biotexnologiya usullaridan biri bo'lgan gen-nokaut, ilmiy til bilan aytganda, RNK interferensiyasi-organizmdagi muayyan genlar faoliyatini susaytirish yoki butunlay to'xtatib qo'yish imkonini beradi. Masalan, o'simlikning yetilish jarayonini sekinlashtiruvchi genlar faoliyatini susaytirib yoki butunlay to'xtatib, ertapisharlikka erishish imkoniyati mavjud.

Shunga ko'ra gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan g'o'za liniyalaridagi qimmatli xo'jalik belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilish ilmiy-amaliy ahamiyatga ega.

O'zbekiston Respublikasini yanada rivojlantirish bo'yicha Harakatlar strategiyasida "kasallik va zararkunandalarga chidamli, mahalliy tuproq-iqlim va ekologik sharoitlarga moslashgan qishloq xo'jaligi ekinlarining yangi seleksiya navlarini yaratish" vazifalari belgilab berilgan. Paxtachilik sohasida bu boradagi vazifalarni bajarilishida gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan g'o'za liniyalaridagi qimmatli xo'jalik belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilishga yo'naltirilgan tadqiqotlar muhim ilmiy va amaliy ahamiyat kasb etadi.

O'zbekiston Respublikasining 2002 yil 29 avgustdagi 395-II-son «Seleksiya yutuqlari to'g'risida» Qonuni, O'zbekiston Respublikasi Prezidentining 2015 yil 29 dekabrda PQ-2460-son «2016-2020 yillarda qishloq xo'jaligini yanada isloh qilish va rivojlantirish chora tadbirlari» to'g'risidagi qarori va 2017 yil 7 fevraldagi PF-4947-son «O'zbekiston Respublikasini yanada rivojlantirish bo'yicha Harakatlar strategiyasi to'g'risida»gi Farmoni hamda boshqa me'yoriy-huquqiy hujjatlarda belgilangan vazifalarni amalga oshirishga ushbu dissertatsiya tadqiqoti muayyan darajada xizmat qiladi.

**Tadqiqot ob'yekti:** Retsipient genotip sifatida *G.hirsutum* turiga mansub mahalliy g'oz navlari (C-4727, Buxoro-6 va Mehnat) va gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan donorliniyalar (T2\_1\_7, T2\_31\_10 va T2\_47\_3).

**Tadqiqot predmeti:** Donor va retsipient genotiplarini bir-biri bilan o'zaro oddiy duragaylash natijasida tola sifat ko'rsatgichlari va morfobiologik ko'rsatgichlari yaxshilangan, o'zida *pHallsGate-8-PHYA<sub>1</sub>* gen konstruksiyani tutgan BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> avlod duragaylari.

**Tadqiqotning maqsadi:** Gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan g'oz liniyalaridagi qimmatli xo'jalik belgilarini mahalliy navlarga (resipient genotiplar) o'tkazish.

**Tadqiqotning vazifalari:**

- Mahalliy navlar (resipient genotiplar) hamda gen-nokaut liniyalarni morfobiologik hamda qimmatli xo'jalik belgilarini o'rganish;
- O'rganilayotgan gen-nokaut liniyalarni mahalliy navlar bilan changlantirish;
- Olingan duragay avlod o'simliklarini molekulyar tahlil qilish;
- Gel-elektroforez usulida o'zida *pHallsGate-8-PHYA<sub>1</sub>* gen konstruksiyasini tutgan o'simliklarni genotiplash.

**Tadqiqotning ilmiy yangiligi:** Tadqiqot yakunida gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan g'oz liniyalaridagi qimmatli xo'jalik belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilinadi, istiqbolli deb topilgan navlardagi ayrim salbiy xususiyatlardan holi bo'lgan yangi biotexnologik liniyalar olinadi.

**Tadqiqotning asosiy masalalari va farazlari:** Mamlakatimizda g'oz ekin maydonlari qisqarib borayotganligini inobatga olib, tola sifat ko'rsatgichlari jahon bozori talablariga javob beradigan va asosiy samaradorligi yuqori bo'lgan yangi biotexnologik nav va tizimlarni yaratish hamda ularni qishloq xo'jaligiga joriy etish hozirgi kunda muhim masalalardan biri hisoblanadi. Jahon ilmiy nashrlarida chop etilgan adabiyotlarda model o'simlik *Arabidopsis thaliana* genomidagi PHYA genini overekspressiya va nokaut qilish natijasida o'simlik bo'yining, ildiz va barg bandining qisqa va uzun formalari olingan.

Tadqiqotlarimizda g'o'za PHYA1 geni nakaut bo'lgan genotipdagi qimmatli xo'jalik belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilish natijasida tola sifat ko'rsatgichlari yuqori bo'lgan duragay liniyalari olindi.

**Tadqiqot mavzusi bo'yicha adabiyotlar sharhi:** Fitoxromlar regulyator fotoretseptorlar oilasi bo'lib, o'simlik hayot siklida turli molekulyar va hujayraviy jarayonlarni nazorat qiladi va atrof-muhit yorug'ligiga javob beruvchi gen ekspressiyasini boshqaradi. Tetraploid g'o'zada fitoxrom genlari oilasi o'rganilganda, to'rtta fitoxrom A (PHYA), ikkita fitoxrom B (PHYB) va ikkita fitoxrom E (PHYE) genlari borligi ma'lum bo'ldi [1]. Shulardan g'o'za PHYA1 geni nokaut qilinganda, o'simlikda ildiz tizimini taraqqiy etishi va poyaning uzayishi, erta gullash, tolaning uzunligi, hosildorlik va uning boshqa parametrlarini nazorat navlariga nisbatan sezilarli darajada yaxshilanganligi aniqlangan [2]. Shuningdek, *PHYA<sub>1</sub>* geni qizil nurga sezgir fotoretseptor bo'lib, qorong'ulikda ishlamaydi. *PHYA<sub>1</sub>* geni kunduzgi yorug'likda gullash jarayonini ingibirlaydi. Ushbu gen funksiyasini yo'qotgan o'simliklar erta gullaydi. T. Shisamatsu [39] va Chentao Lin (11) larning tadqiqotlarida fitoxrom genlari funksiyasini yo'qotgan oq jo'xori va no'xot o'simliklarining erta gullaganligi va fotoperiodik sezgirligi kamayganligi kuzatilgan. Hozirda o'simlik, hayvon va mikroorganizmlarning gen ekspressiyasini boshqarishda, hamda funksional genomika usullari sifatida RNK interferensiya usulidan keng foydalanilmoqda. RNK interferensiya mexanizmi hujayrada interferensiyalanuvchi RNKni kodlaydigan vektor konsruksiya yordamida amalga oshiriladi. Bizning maqsadimiz yorug'lik nuri spektrlariga o'simlikda muntazam javob qaytaruvchi va shu orqali o'simlikning hayoti davomida muhim vazifalarni bajaruvchi fotoretseptorlar – fitoxromlarni yuqoridagi texnologiya yordamida tadqiq etishdan iborat. Ushbu tadqiqotda *PHYA<sub>1</sub>* geni nokaut qilingan o'simliklar bilan mahalliy navlar (C-4727, Buxoro-6 va Mehnat) nio'zaro chatishtirilishidan olingan biotexnologik liniyalarda tola sifat ko'rsatgichlari va qimmatli xo'jalik belgilari o'rganildi. RNK interferensiya mexanizmi – hujayra interferentsiyasida

vektor konsruksiyasi, kodlanadigan interferentsiyalangan RNK yordamida ishga tushishi mumkin.

**Tadqiqotda qo'llanilgan metodikaning tavsifi.** Tadqiqot ishlarini amalga oshirishda o'simlik to'qimasidan genom DNK ajratish, gel-elektroforez, polimeraza zanjir reaksiyasi va genotiplash, tola sifat ko'rsatkichlarini HVI (High Volume Instrument) tizimida aniqlash usullaridan foydalanildi.

**Tadqiqot natijalarining nazariy va amaliy ahamiyati:** Ushbu ish biotexnologiyaga, gen injeneriyasiga va ananaviy seleksiyaga tegishli bo'lib, u g'o'za fitoxrom A1 geni (PHYA1) ekspressiyalanuvchi (interfering RNA) – interferensiyalanuvchi RNK (iRNK) yordamida o'simlik hujayrasida gen ekspressiyasini pasaytiradi. Ushbu mavzuda dissertatsiya ishini bajarish jarayonida, gen muxandisligiga aloqador usullar va metodikalardan foydalanish imkoni tug'iladi, hamda yuqorida ta'kidlangan genning funksiyasini aniq bilish mumkin bo'ladi. Ananaviy seleksiya usuli bilan g'o'za tolasining sifat ko'rsatkichlarini yaxshilash bo'yicha uzoq yillik ilmiy tadqiqotlar olib borilgan. O'zbekiston paxta etishtiruvchi davlatlarning eng shimolda joylashganligini inobatga olib, ushbu gen-nokaut texnologiyasi yordamida o'rta tolali go'za turlaridan uzun va sifatli tola beruvchi ertapishar hamda hosildor o'rta tolali navlarni yaratish uchun ahamiyatli.

**Ish tuzilmasining tavsifi:** Dissertatsiya kirish, adabiyotlar sharhi, material va metodlar, olingan natijalar va ularning muhokamasi, tajribaviy qism, xulosalar, amaliy tavsiyalar, foydalanilgan adabiyotlar ro'yxatidan va ilovadan iborat. Dissertatsiyaning asosiy matni 73betdan iborat bo'lib, 19 ta rasm va 9 ta jadval keltirilgan.



## I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI

### 1.1. *PHYAI* genining o‘simlik o‘sishi va rivojlanishidagi ahamiyati

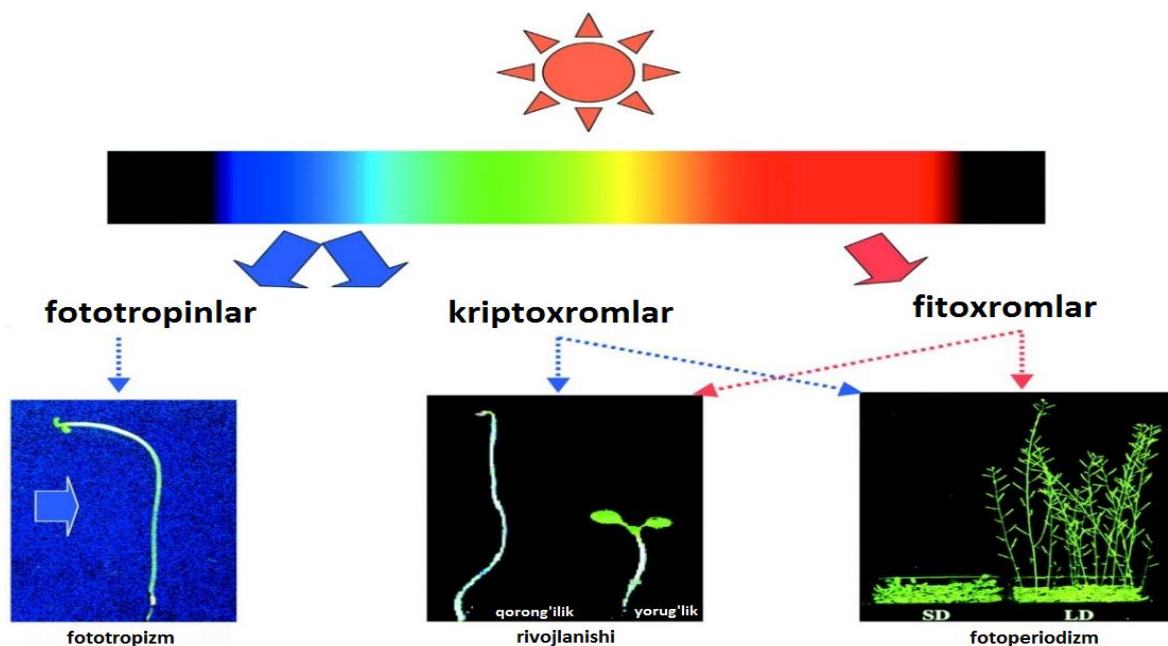
Yorug‘lik nuri o‘simliklarning rivojlanishi va fiziologiyasini nazorat qiluvchi eng muhim omillardan biri hisoblanadi. Uning ta‘sirida o‘simlik urug‘larning unishidan vegetatsiya davrigacha, uglerod almashinuvi, barglarning shakllanishi, ritmik sikllar nazorati, gravitropizm (o‘simlik organlarining yer tortishish kuchiga nisbatan joylashuvi) va fototropizm jarayonlari boshqariladi [6]. Shu sababli tushayotgan yorug‘lik nurining kerakli spektrini o‘simlik tomonidan tanlanishi va uning miqdorini sezishi o‘simlikning baquvvat o‘sishi uchun katta ahamiyatga egadir [7].

O‘simliklarda yorug‘lik nurini sezuvchi ikki xil molekulyar tizim mavjud bo‘lib, ulardan biri havorang nurni sezuvchi - kriptoxromlar va ikkinchisi qizil nurni sezuvchi - fitoxromlardir. Shunga ko‘ra, o‘simliklarda fototropizm, barg o‘tkazuvchanligi va xlorofill sintezi bilan bog‘liq bo‘lgan jarayonlar kriptoxromlar ta‘sirida amalga oshadi.

Mazkur magistrlik dissertasiyasi tadqiqot ob‘ekti retsipient genotip sifatida *G.hirsutum* turiga mansub mahalliy g‘o‘za navlari va gen-nokaut texnologiyasi asosida olingan donor genotiplar bo‘lgani tufayli, adabiyotlar sharhida fitoxrom oqsillariga tegishli ma‘lumotlarga va g‘oza o‘simligi tolasining asosiy sifat ko‘rsatgichlariga kengroq to‘xtalamiz.

Fitoxromlar – yorug‘lik nurini sezuvchi oqsillar oilasi bo‘lib, o‘simlikning rivojlanishi uchun muhim bo‘lgan qizil va uzoq qizil nurlarni yutadi [8] va o‘simlik hayot siklida turli molekulyar va hujayraviy jarayonlarni nazorat qiladi, hamda atrof muhit yorug‘ligiga javob beruvchi gen ekspressiyasini boshqaradi. Demak, fitoxromlar qizil nurlar ta‘sirida hosil bo‘lgan qisqa pulslar asosida qorong‘ulikda yashil pigmentlarning yo‘qolib qolmasligiga va urug‘kurtak rivojining boshlanishiga turtki bo‘ladi [9]. Bunda fotodavriy gullashning jadalligi, xloroplastlar rivoji (xlorofill sintezi bunga kirmaydi), barglarning yetilishi va to‘kilishi ham shular jumlasiga kiradi [10].

Quyidagi 1-rasmda fitoxrom genening xromofor va domenlari keltirilgan.



**1-rasm.** Fitoxrom qismlarining tuzilishi.

Ushbu rasmda fitoxrom (*PHYA1*) genining kriptoxrom geni bilan o'zaro farqlanishi keltirilgan.

Fitoxromlar 1959 yilda kashf etilgandan davrdan boshlab, ularning o'simliklarning ko'pgina turlarda urug'larning unishidan gullashgacha bo'lgan fiziologik jarayonlarni nazorat qilishi ma'lum edi [11,12].

Bugunga kelib, ko'plab o'tkazilgan tadqiqotlarning natijasida fitoxromlarning molekulyar va biokimyoviy mexanizmlari oydinlasha boshladi. Ya'ni, ular tomonidan boshqariladigan javob reaksiyalari gipokotil (poya uzunligi) elongatsiyasi, flavonoid va karotinoid sintezini ham o'z ichiga oladi [13,14].

Fitoxromlar o'simliklarda kichik gen oilasiga mansub fotoretseptorlar sifatida turli tadqiqotchilar tomonidan katta qiziqish bilan o'rganildi va tavsiflandi. Masalan, G. Bae va G. Choining ishlarida *Arabidopsis thaliana* L. (*PHYA* dan *PHE* gacha) va *Solanum lycopersicum* dabeteshta (*PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHE* va *PHYF*), *Oryza sativa* da uchta (*PHYA* dan *PHYC* gacha), *Pinus* da to'rtta (*PHYP1*, *PHYP2*, *PHYN* va *PHYO*), hamda *Ginkgo* da uchta (*PHYP*, *PHYN* va *PHYO*) fitoxrom genlari borligi ma'lum ekani aytib o'tilgan [7].

Shuningdek, I.Y. Abduraxmonov va boshqalarning ishlarida diploid g'ozda genomida *PHYA* genining ikkita nusxasi (*PHYA1*, *PHYA2*), *PHYB*, *PHYC*, *PHE* genlarining yagona nusxalari aniqlangan. Tetraploid g'ozda esa to'rtta *PHYA*, ikkita *PHYB*, ikkita *PHYC* va ikkita *PHE* genlari borligi aniqlanib, *PHYD* genining topilmagani aytib o'tilgan [16].

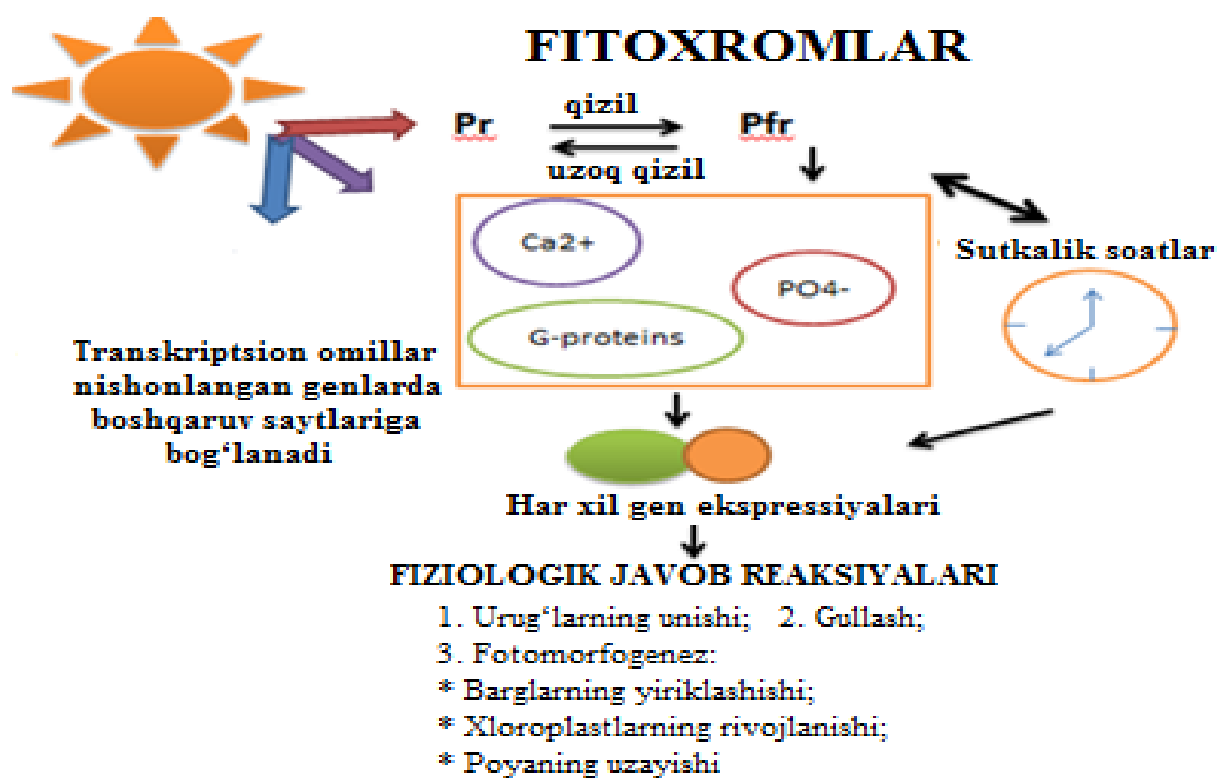
*PHYA<sub>1</sub>* geni quyoshdan tushadigan qizil nurni sezadigan va undan o'simlikni himoya qilishda ishtirok etadigan fotoretseptor hisoblanadi. Uning yorug'lik nuriga bunday javob reaksiyasi ko'plab o'simlik turlari poyasini atrofidagi boshqa o'simliklar bilan soyalanganda juda tez o'sishiga imkon beradi. Xlorofill tutuvchi barglar quyosh nuri spektrining qizil nurlarini yutganda Pfr (fitoxrom uzoq qizil) ning miqdori sezilarli darajada kamayadi. *PHYA<sub>1</sub>* geni kunduzgi yorug'likda gullash jarayonini to'xtatadi. Ushbu gen funksiyasini yo'qotgan mutant o'simliklar erta gullaydi. T. Hisamatsu va boshqalarning ishlarida *Sorghum bicolor L.* va *Pisum sativum L.* o'simliklarining *PHYA1* geni mutatsiyaga uchratilgandan so'ng, hosil bo'lgan mutantlarning nazoratga nisbatan erta gullashi va fotodavriy sezgirligi kamayishi ko'rsatilgan [17].

Fotoretseptorlar ichida faqat fitoxromlargagina xos bo'lgan yagona muhim jihat, bu ularning qizil nurni yutuvchi *Pr* (yutilish maksimumi 660 nm) va uzoq qizil nurlarni yutuvchi *Pfr* (yutilish maksimumi 730 nm) shakllari o'rtasidagi interkonvertlikning mavjudligidir. Ushbu holat quyidagicha ifodalanadi:  $Pr \leftrightarrow Pfr \rightarrow$  biologik faollik.

Qolaversa, barcha fotoretseptorlar ichida faqat fitoxromlargagina yorug'lik nurining miqdoriga bog'liq ravishda unish jarayonini faollashtiruvchi va to'xtatuvchi asosiy omil hisoblanadi.

2-rasmda fitoxromlar dastlab quyoshdan kelayotgan nur tarkibidan faqat qizil va uzoq qizil nurga tegishli spektrlarni yutishi, va har bir oqsilning ishlab chiqarilish vaqti borligini hisobga olgan holda, fitoxromlar  $Ca^{+2}$  va  $PO^{-4}$  kabi ionlar, noorganik birikmalar va G – proteinlar bilan bog'langan holda turli

genlar ekspressiyasini initsirlashi va nihoyat urug‘larning unishi, gullash va fotomorfogenez kabi fiziologik jarayonlar amalga oshishi ko‘rsatilgan.



**2-rasm.** Fitoxrom oqsillarining ta‘sir mexanizmi.

Demak, o‘simlik gullashining fotodavriylikka bog‘liqligi, genlararo aloqa almashinuvi orqali gullashning boshlanishini, siklik soatning boshqaruvi va fotoretseptorlarga signal uzatilishini o‘z ichiga oladi [19].

O‘simlik gullashning shakllanish vaqtini nazorat qiluvchi mexanizm *Arabidopsis* da yovvoyi turga nisbatan erta yoki kech gullovchi, ammo boshqa tomonlama sog‘lom mutantlarni aniqlash orqali izchil o‘rganilgan. Bu mutantlar gullash vaqtiga aloqador mutantlar sifatida, unga aloqador genlar esa gullash vaqtini belgilovchi genlar sifatida ma‘lum bo‘ldi [20].

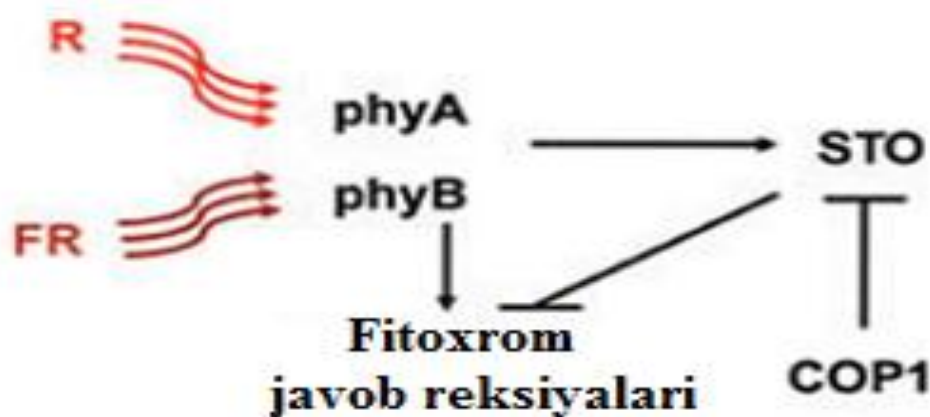
Fitoxromlarda unuvchanlikni boshqarish gibberellin signali va sintezi asosida amalga oshadi. Unuvchanlikni boshqarishda *PHYA* va *PHYB* genlarining roli katta. Bu hol *PHYA* genining past yorug‘likka sezgirligi va *PHYB* ning qizil va uzoq-qizil nurlarni boshqarishi bilan tushunarli bo‘ladi.

Shuningdek, *PHYD* va *PHE* genlarining ham unuvchanlikka aloqadorligi kuzatilgan [21].

*Arabidopsisda* *PHYC* geniboshqa fitoxrom oilasiga mansub fotoretseptorlarga nisbatan juda kam miqdorda uchraydi. Tadqiqot natijalarining ko'rsatishicha, *PHYC* geni urug' kurtak rivojini boshqaruvchi *PHYA* va *PHYB* genlaridan farqli ravishda boshqa qator fiziologik jarayonlarda muhim rol o'ynashi taxmin qilinadi. O'simliklarda fitoxromlarning mavjudligi ularning yuqori darajada, mukammal tizim asosida ishlashini ta'minlaydi.

Fitoxromlarning sho'r stressiga bog'liq javob reaksiyalari xam bor [22,23]. Masalan, *Mesembryanthemum crystallinum* sho'r stressi muhitida S3 formadan KKM (Krasulasian kislota metabolizmi) fotosinteziga o'zgaradi. Ushbu natija o'simliklar qizil nurga boy muhitda o'stirilganda, informatsion RNK darajasidagi PEP karboksilaza (phosphoenolpyruvate carboxylase) miqdori ko'payishini, KKM fermenti kalit vazifasini o'tashini ko'rsatadi. Yorug'likdagi qizil va uzoq qizil nurlar miqdori kam yoki ko'p bo'lgandagi tafovut ko'plab o'simlik turlarini sekinlik bilan stress sharoitidan chiqaruvchi pinitol shaklining o'zgarishiga va uglevodning yutilishiga sabab bo'ladi [24].

Garchi fitoxromlarning sho'r stressiga aloqadorligi yuqoridagi tadqiqotlarda juda oddiy ta'riflangan bo'lsada, ularning biokimyoviy va molekulyar mexanizmlari yaqindagina oydinlashdi. Misol uchun sho'rga chidamli oqsillarning harakati fitoxrom signallariga nisbatan teskari boshqarilishi ta'kidlangan (3-rasmga qaralsin).



**3-rasm.** Fitoxrom genlarining sho'r stressiga bog'liqligi.

Sxemadan ko‘rinishicha, qizil va uzoq qizil nurlar o‘simlikka kelib tushgandan keyin avval fitoxromlar induksiyalanadi, so‘ng fitoxromlar STO (Salt Tolerance) genining faoliyatini va ekspressiyasini stimullaydi. Qizig‘i shundaki, STO geni fitoxromlarning faolligini ingibirlaydi. Keltirilgan ma‘lumotlarning o‘zaro paradoksligi sababi, bu mexanizm kompleks tarzda ishlaydi, ya‘ni jarayonda faqatgina fitoxromlar dominantlik qilmasdan, balki STO va COP1 kabi genlarning ham nazorati ostida kechadi.

M. Indorf va boshqalar tomonidan [19] *Arabidopsis thaliana* L. O‘simligi qizil nurlar bilan ta’sirlantirilganda uning *phyA*, *phyB* va *phyA phyB* qo‘sh mutantlarida sho‘rga chidamli oqsillarning ekspressiyasi nazoratga nisbatan kamaygani kuzatilgan.

Boshqa tarafdin qaraganda, nazorat o‘simliklarida uzoq-qizil nurlar ta’sirida sho‘rga chidamli oqsillarning ekspressiyasi qizil nurlardagi kabi bir xil miqdorda ortgan. Ayni shu muhitda *phyB* mutantlarida sho‘rga chidamli oqsillar miqdorining ortishi boshqa mutantlarga solishtirganda yaqqolroq ko‘zga tashlanadi. *phyA* va *phyA phyB* qo‘sh mutantlari solishtirilganda sho‘rga chidamli oqsillarning transkriptlik darajasi kamaygan. Garchi bu ikki fotoretseptorlar va sho‘rga chidamli oqsillar orasidagi o‘zaro aloqalarning mavjudligi oydinlashgan bo‘lsada, ular kompleks signal mexanizmlarning eng muhim qismi sifatida namoyon bo‘lishini o‘rganish kerak.

Shuningdek bir qator tadqiqotchilar turli vaqtlarda [26,27] sho‘rga chidamli oqsillarning yorug‘lik signallari regulyatorlari bilan aloqadorligini o‘rganishgan va natijada gipokotil elongatsiyasi -5 - (HY5) fotomorfogenezning muhim qismi - (COP1) bilan aloqadorligini aniqlashgan.

Boshqa tadqiqotchilarning ishlaridafitoxromlar barg transpiratsiyasini nazorat qilgani bois qurg‘oqchilik stressi bilan aloqador ekanligi borasidagi savollar ilgari surilgan [28,29] bo‘lsa, Quyidagi tadqiqotlar natijasida fitoxromlar qurg‘oqchilik stressini tinim davridagi urug‘larning unishi vaqtida o‘zgartira olishi ko‘rsatilgan [30,31]. R.J. Staneloni va boshqalarning ishida [32]

fitoxromlar qurg‘oqchilik stressi ta‘siridagi o‘simlik molekulalarining asosiy signali hisoblangan absizin kislota (abscisic acid – ABA) bilan reaksiyaga kirishishi aniqlangan.

Fitoxromlar gibberelin va absizin kislotasining faoliyatini initsirlashi natijasida urug‘ning unishi faollashadi. Yana shuningdek bir vaqtning o‘zida fitoxromlarning V va E shakllari urug‘ning unishida bevosita stimullash vazifasini bajarsa, fitoxromning A shakli aksincha, ingibirlovchi vazifasini o‘taydi.

Savada tomonidan o‘tkazilgan tadqiqotlarda fitoxromlar absizin kislotasining metabolizmiga aloqador genlar faoliyatini susaytirishi aniqlagan [33].

Misol uchun *Nicotiana plumbaginifolia* ning nazoratga nisbatan kam fitoxromli mutantlarida olib borilgan degidratsiya (suvsizlantirish) tadqiqotlarida ABA miqdori sezilarli darajada ortgan va suv miqdori samarali tarzda saqlab qolingan [34].

Shuningdek pomidorning *Solanum lycopersicum* yuqori pigmentli mutantlarining yorug‘likka javob reaksiyalari bo‘rttirilganda, qurg‘oqchilik stressiga moyil ekanligi bir qator maqolalarda o‘z aksini topgan [35,36].

Umuman olganda fitoxromlar yorug‘lik signali transduksiylarida keng turdagi bunday javob reaksiylarini muvofiqlashtira oladi. Unga misol tariqasida fitoxromi mutatsiyaga uchragan pomidor *Solanum lycopersicum* o‘simligining mutanti – aureada qurg‘oqchilik stressi sharoitida transpiratsiya tezligi o‘zgarmaganligini aytish mumkin [37]. Boshqacha aytganda, qurg‘oqchilik stressi paytida fitoxrom signallarining maxsus javob reaksiylarida turlar orasida variatsiyalar mavjud.

Bugungi kunda o‘simliklarni gullash vaqtini belgilovchi fitoxrom genlari faoliyatini o‘rganishning turli biofizikaviy mutatsion usullari ishlab chiqilgan bo‘lsada, ularning odatdagidek o‘ziga xos kamchiliklari va zararli tomonlari mavjud. Shuning uchun ham keyingi vaqtlarda molekulyar biologiya va gen

muhandisligi usullaridan foydalangan holda, o‘simliklar genomini tadqiq etish, mavjud genlarni aniqlash hamda ularni aniq maqsadlar yo‘lida boshqarish imkoniyatlari paydo bo‘la boshladi. Ushbu zamonaviy usullar ichida eng samaralisi gen nokaut va sintetik RNKi duplekslar yordamida genlar faoliyatini susaytirish usullari xisoblanadi. Bunga yaqqol misol tarzda keyingi vaqtlarda O‘zbekiston Fanlar Akademiyasining “Genomika va bioinformatika markazi” da *G. hirsutum*L.g‘o‘za o‘simligida mazkur usullar yordamida istalgan genlarni “o‘chirib qo‘yish” yoki ular faoliyatini susaytirish ustida olib borilgan ilmiy tadqiqotlarni aytish mumkin [38].

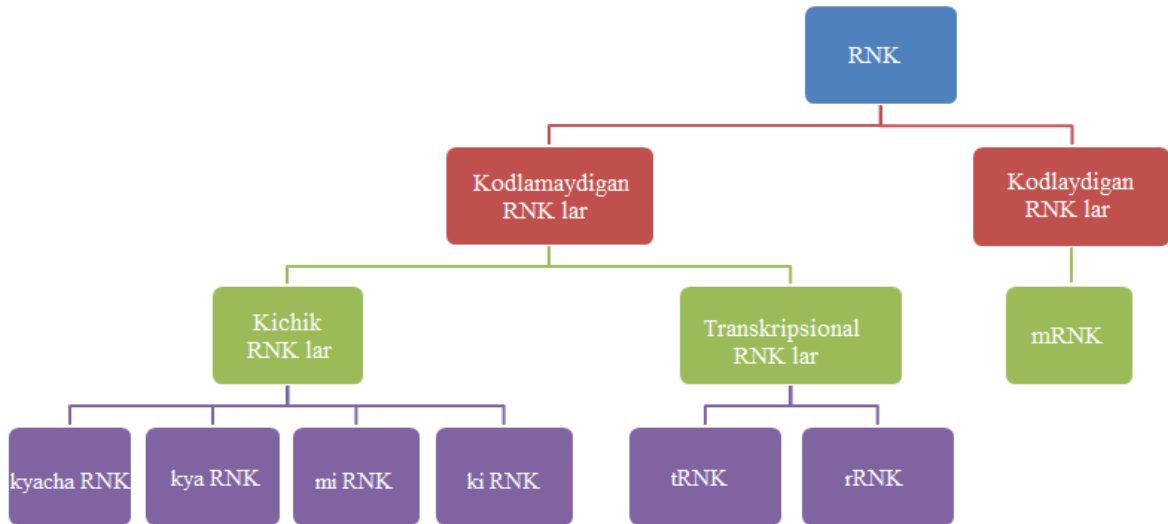
Ushbu markazda yuqoridagi texnologiyalar yordamida tolasi uzun, ildiz tizimi yaxshi rivojlangan, hosildor g‘o‘za liniyalari va navlari olindi. Natijada genlar ekspressiyalanganda hosil bo‘ladigan morfologik va biokimyoviy o‘zgarishlarni tahlil qilish orqali ularning vazifalarini bilish mumkinligi isbotlandi.

## **1.2. RNK interferensiyasining molekulyar mexanizmi**

Avval RNK interferensiya hodisasini “co-suppression”, “post transcriptional gene silencing (PTGS)”, “quyelling” kabi nomlar bilan atalgan edi [39]. Umuman olganda RNK interferensiya bu, hujayra ichida kechuvchi kimyoviy jarayon bo‘lib, unda maxsus RNK molekulalari gen ekspressiyasini ingibirlaydi va odatda bu jarayon mRNK molekulalarini buzish orqali amalga oshadi. 1998-yilda Endryu Fayr va Kreyg Mello tomonidan nashr ettirilgan chuvalchang nematoda *Cayenorhabditis elegans* da RNK interferensiya xodisasini uslub darajasiga ko‘tarishgan. Mazkur ishning natijalariga ko‘ra ular 2006-yilda fiziologiya va tibbiyot yo‘nalishi bo‘yicha Nobel mukofotiga sazovor bo‘lishgan [32].

Umuman olganda barcha RNKlar 4–rasmda ko‘rsatilgan sxema asosida sinflanadi:





**4–rasm** RNKlarning sxematik ko‘rinishi

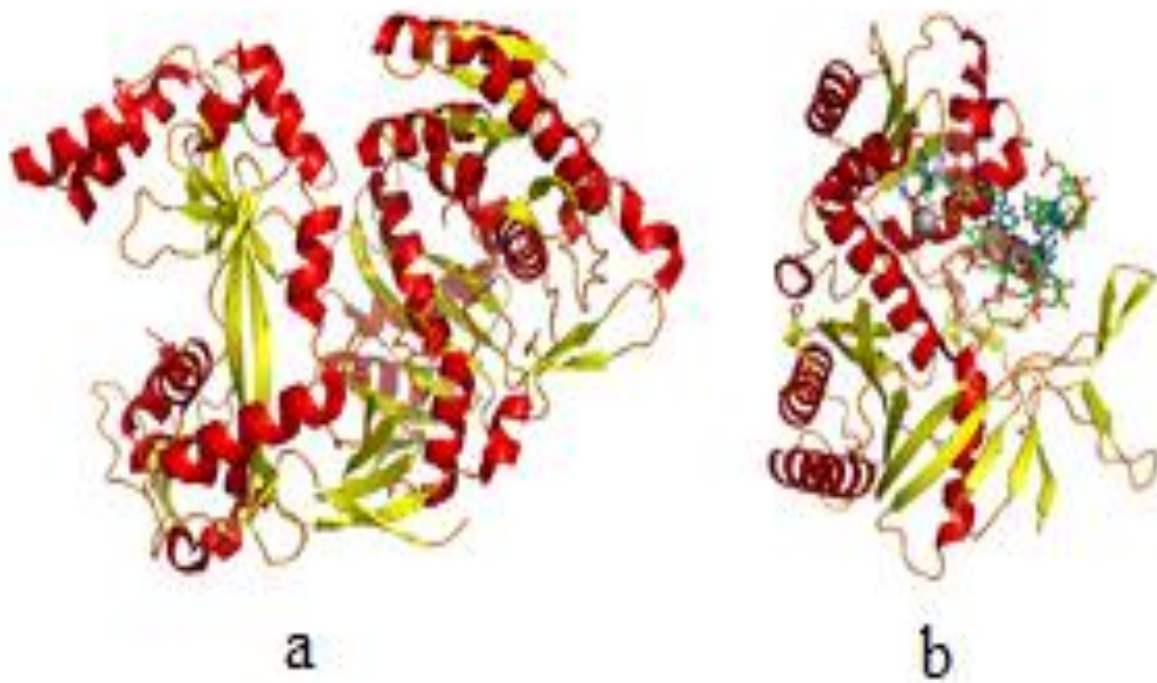
Ya‘ni ular avval vazifasiga ko‘ra kodlovchi va kodlamaydigan RNKlarga bo‘linadi. Agar mRNK kodlaydigan RNKga mansub bo‘lsa, o‘z navbatida kodlamaydigan RNKlar esa: (a) faqatgina transkripsiyalanib, o‘zida oqsil kodini saqlamaydigan rRNK va tRNKlarga; xamda (b) turli uzunlikdagi (20-50 nukleotid qoldiqlari oralig‘ida) kichik RNKlardan iboratdir. Shunga ko‘ra, RNKi mexanizmini amalga oshirishda ikki turdagi kichik RNKlar (siRNA va miRNA) qatnashadi.

Agar mRNKlarni genlarning to‘g‘ridan-to‘g‘ri mahsuloti deb xisoblasak, kichik RNKlar maxsus mRNKlarga bog‘lanib, ularning faolligini kamaytiradi, masalan, mRNKdan oqsil hosil bo‘lishini to‘xtatishi mumkin. RNKi ning hujayralarni parazit nukleotid ketma-ketliklarga, ya‘ni viruslar va transpozonlarga qarshi kurashdagi roli juda katta. RNKi hodisasi ko‘plab eukariotlar, xususan hayvonlarda ham topilgan bo‘lib, uzun 2 zanjirli RNK molekulalarini kichik fragmentlarga parchalovchi ferment – Dicer tomonidan initsirlanadi.

Nihoyat hosil bo‘lgan xar bir siRNA 2ga ajraladi. Natijada ularning biri parchalanib ketadi, ikkinchisi esa RISC kompleksiga bog‘lanadi. Oxirigi bosqichda esa, post-trankripsional gen susayishi ro‘y beradi, ya‘ni RISCning aktiv komponentlari bo‘lgan argonaute oqsillari endonukleazalarga mansub bo‘lib, o‘ziga bog‘langan siRNA bilan mo‘ljaldagi mRNKga komplementar

bog‘lanib uni kesib tashlaydi [40]. Dicer parchalab bergan 2 zanjirli fragmentlar nazariy jihatdan 2ga ajralib har biridan funksional siRNA hosil bo‘lishi mumkin. Biroq, faqat bittasi argonaute oqsillariga bog‘lanadi va gen susayishini amalga oshiradi. Ikkinchisi esa, RISCning aktivlanish jarayonida parchalanib ketadi [42]. Garchi, birinchi bo‘lib RNKni ikkiga ajratuvchi ferment vazifasini ATFga bog‘liq xelikaza o‘taydi deb qaralgan bo‘lsada [43], izlanishlar mazkur jarayonni bevosita RISCning oqsil komponentlari tomonidan amalga oshirilishini ko‘rsatdi [44]. Lekin, ATF parchalangan mRNKni RISCdan ajratish jarayonida ishtirok etishi mumkin [46].

Agar RNKni argonaute oqsiliga bog‘lanishi haqida fikr yuritsak, rentgen tuzilish tahlili asosida olib borilgan tekshiruvlar RNKning fosforlangan 5' oxiri argonaute oqsilining PIWI domeniga kirib, magniy kabi ikki valentli kation hamda tirozin qoldig‘i va siRNAdagi 5' nukleotid o‘rtasida bo‘ladigan aromatik taxlanish orqali bog‘lanishini ko‘rsatdi [47] (4-rasmga qaralsin).



**5-rasm.**(a) argonaute oqsili; (b) argonaute oqsilining PIWI domeni bilan 2 zanjirli RNKning kompleksi

RNKi kashf qilinganiga ko'p bo'lmay, u o'simliklarni yaxshilashda katta potensialga ega ekanini ma'lum bo'ldi [39]. Bugungi kunda RNKi ning ahamiyati juda katta, chunki hujayraga kiritilgan sintetik dsRNA bizni qiziqtirayotgan genni aniq va selektiv suppressiyaga uchrata oladi. Bu usul biotexnologiya, tibbiyot va funksional genomikada keng qo'llanilmoqda [41].

RNKi eksperimental biologiyada genlarning funksiyasini model organizmlarda *in vivo* o'rganishda qo'llanilmoqda. 2 zanjirli RNKni bizni qiziqtirayotgan genning nukleotid ketma-ketligiga komplementar sintez qilib, uni hujayraga yoki organizmga kiritsak, u ekzogen genetik material sifatida qabul qilinadi va RNKi ni boshlab beradi. Ushbu mexanizmdan foydalangan holda tadqiqotchilar, mo'ljalidagi genning ekspressiyasini sezilarli ravishda kamaytirishlari mumkin va bu kamayishning oqibatlarini o'rganish genning fiziologik rolini ochib beradi. Genning ekspressiyasini kamaytirish jarayoni "gen nokaut" deyiladi. Lekin RNKi gen ekspressiyasini to'liq to'xtata olmasligini hisobga olib, olimlar ba'zida bu jarayonni "gen nokdaun" deb ham atashadi [49].

Bevosita RNKi mexanizmida ishlatiladigan siRNA konstruksiyani dizayn qilish uchun u bizni qiziqtirayotgan genning mRNKsidagi qaysidir qismiga komplementar bo'lishi lozim. Demak, mRNK sikvensi asosida siRNA konstruksiyani tuzilar ekan quyidagi qoidalarga rioya qilish zarur:

1. Kerak bo'lgan genning mRNKsini start kodoni (ATG) dan taxminan 50-100 nukleotid keyin joylashishi lozim;
2. siRNA [AA(N<sub>19</sub>)TT yoki NA(N<sub>21</sub>) yoki NAR(N<sub>17</sub>)YNN] formulaga mos bo'lishi kerak. N-istalgan nukleotid, R-purin (A,G), Y-pirimidin (C,U);
3. Konstruksiyaning G+C tarkibi 35-60% atrofida bo'lishi lozim;
4. 4 ta yoki undan ortiq kelgan takroriy nukleotidlar bo'lmasligi zarur;
5. mRNKning 5'UTR va 3'UTR saytlariga konstruksiya tuzmaslik kerak;
6. Boshqa genlar bilan komplementar bo'lmasligi lozim.

Demak, NCBI bazasidan bizni qiziqtirayotgan gen mRNKsining nukleotid ketma-ketligi topiladi va yuqoridagi 6 ta qoidaga rioya qilgan holda siRNA ni unga komplementar tarzda tuziladi [51,52].

RNKi biotexnologiyada, xususan ekinlarning yangi navlarini shakllantirishda, nikotinsiz tamaki, kofeinsiz kofe, ozuqaviy qiymati oshirilgan mahsulotlar olishda keng qo'llanilmoqda. Bunday mahsulotlarga gen muxandisligi usulida olingan Arktika olmalarini misol tariqasida aytish mumkin. Polifenoloksidaza fermentini ishlab chiqaruvchi geni nokautga uchratilgan Arktika olmalari AQShda yaqin orada iste'molga chiqariladi va bu olmalar kesilgandan so'ng jigarrang tusga kirmaydi, ya'ni bunday olmalar xlorogen kislotasini xinon mahsulotlariga aylantira olmaydi. RNKi texnologiyasidan erta gullashni stimullashda, pishishni kechiktirishda, senessans (qarish) ni uzaytirishda, tinim davrini buzishda foydalanish mumkin [39].

Bundan tashqari RNKi usulidan o'simlik urug'laridagi tabiiy toksik komponentlarning miqdorini kamaytirishda xam foydalanish mumkin. Masalan, paxta chigiti parhez oqsillarga boy bo'lishi bilan bir qatorda uning tarkibida gossipolning mavjudligi, paxta yog'ining iste'mol qilish darajasini chegaralaydi. Ushbu muammoni yechish jarayonida bir qator tadqiqotchilar RNKi uslubi yordamida gossipol sintezida muhim o'rin tutuvchi delta-kadinen sintaza fermentining miqdorini kamaytirish orqali gossipolning miqdorini pasaytirishga muvaffaq bo'lishgan [50].

O'zbekistonda keng ekiladigan paxta o'simligining texnik parametrlarini yaxshilash davlatning iqtisodiy rivojlanishiga hissa qo'shadi. Shu vaqtgacha mavjud ilmiy adabiyotlarni tahlil qilish asnosida garchi model o'simlik hisoblangan arabidopsisda PHYA ning funksiyasi aniqlangan bo'lsada, paxtada ushbu genning roli hali to'liq o'rganilmagan. Shundan kelib chiqqan holda, malakaviy bitiruv ishining tadqiqot ob'ekti sifatida g'oz'a o'simligi tanlab olindi. Paxtaning erta gullash xususiyatini oshirish maqsadida uning PHYA genini o'rganishga qaratigan ilmiy tadqiqotlar keyingi bobda keltirilgan.

### 1.3. Qishloq xo‘jaligi ekinlarini rivojlantirishda RNK interferensiyasining roli

Dunyo aholisi soninig yildan-yilga ortib borishi aholini oziq-ovqat mahsulotlariga bo‘lgan talabni o‘sib borishiga olib kelmoqda. Asrimizning boshlarida duyo olimlari tomonidan qishloq xo‘jaligi ekinlarining hosildor, turli kasallik va zararkunandalarga chidamli ekin turlarini yaratishda biotexnologiya va gen injenerligi kabi zamonaviy ilm fan yutuqlarini qo‘llab kelishmoqda. Olib borilgan ilmiy izlanishlar natijasida ko‘plab transgen o‘simliklar olingan hamda yuqoridagi salbiy kamchiliklari ijobiy tomonga o‘zgarganligi aniqlangan. RNK Interferentsiya (RNAi) si texnologiyasi asosida 20 dan ortiq o‘simlik turlarining yangi formalari olingan va qishloq xo‘jaligiga tadbiq etilgan, jumladan mamlakatimizdqa dunyoda birinchilardan bo‘lib g‘o‘zadagi *PHYA1* geni RNK Interferentsiya texnologiyasi yordamida nokautga uchratilib yangi biotexnologik, ertapishar, tola sifati yaxshilangan “Porloq” navlari olinib qisqa vaqt davimda respublikamiz g‘oza ekin maydonlariga rayonlashtirildi.

Ushbu texnologiyaning bir necha usullari mavjud bo‘lib, ularning hammasida qaysidir gen faoliyatini to‘xtatish (nokaut) yoki ekspressiyasini oshirish (overekspressiya) ko‘zda tutilgan va microRNAs, hairpin RNK, sintetik RNAi va promoter metillanishi kabi yo‘nalishlari mavjud. Bu yo‘nalishlar orasida bir organism genomidagi bir genni boshqa organizmga introgressiya qilish orqali o‘simliklarning biotik hamda abiotik ta’sirlarga chidamliligini oshirish, yangi mahsuldor hayvon zotlarini yaratish imkonini beradi. Masalan *Bacillus thuringiensis* genomidagi zaharli toksinga javob beruvchi nukleotidlar ketma-ketligi g‘oza genomiga kiritilishi natijasida hasharotlarga chidamli BC g‘oza liniyalari olingan va qishloq xo‘jaligiga joriy qilingan.

#### I-bob bo‘yicha xulosalar.

Texnologiyalar rivojlanayotgan bugungi dunyoda boshqa tarmoq maxsulotlari narx borasida pasayish kuzatilgani holda qishloq xo‘jaligi

maxsulotlari narxlarining resurslar qisqarishi sababidan ko'tarilishi kuzatilmoqda va agrar soxaning davlatlar iqtisodiyotidagi ulushi oshmoqda. O'zbekiston Respublikasi axolisining asosiy qismi qishloq joylarda istiqomat qilishi, axoli sonining shiddat bilash oshishi va er resurslari tobora qisqarayotgan bir paytda oziq ovqat maxsulotlariga bo'lgan talabning oshishi agrar soha oldiga katta vazifa va masalalarni ko'ndalang qo'yimoqda.

Ana shu masalalardan eng birinchisi bu albatta qishloq xo'jaligi ekinlari va xayvonlari hosildorligi va maxsuldorligini resurs tejovchi texnologiyalarni qo'llash asosida oshirishdir. Bu masalani hal qilishda yangi inovatsion, resurstejamkor texnologiyalarni ishlab chiqarishda qo'llash va ilm fanning zamonaviy yutuqlaridan foydalangan holda olingan yuqori hosildor, muhitning biotik va abiotik omillariga chidamli, tezpishar va erta hosilga kiradigan nav va maxsuldor xayvon zotlarini amaliyotga tadbiq etish asosiy rol o'ynaydi.

Yuqorida keltirilgan muammolarni hal etishda "Gen-nokaut texnologiyasidan foydalanish va qishloq xo'jaligi ekinlaridan olinadigan mahsulotlarning sifati jahon bozori talablariga javob beradigan hamda hosildor ekin turlarini yaratish imkoniyati mavjud.

## II BOB. MATERIALLAR VA USLUBLAR

### 2.1. Tadqiqot namunalari tanlash

Tadqiqotlar uchun mamlakatimizning asosiy maydonlarida ekib kelinayotgan C-4727, Buxoro-6 va Mexnat g'ozalari donori sifatida, Genomika va bioinformatika markazida yaratilgan T2\_1-7, T2\_31\_10 va T2\_47\_3 biotexnologik g'ozalari liniyalari retsipient sifatida, shuningdek, ushbu namunalari asosida olingan BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> duragay namunalari tanlab olindi.

### 2.2. Uskunava reaktivlar

1. Laminar
2. Sentrifuga (Eppendorf 5417C, eppendorf, USA)
3. Avtoblot
4. Muzlatgich (Cool-Lab Freezer, LAB-LINE Instruments Inc., USA)
5. Mikser (Thermomixer 5433, eppendorf, USA)
6. Termostat
7. Sterilizator (AccuSterilizer AS12, VWR, USA, s mini printerom  
epson TM-U200D)
8. Alphaimager (Alphaimager<sup>TM</sup> 3400, IS 3400, Alpha Innotech, USA  
nABKzekompyutera Intel Pentium-IV, IBM MT-M 8307-4/U.)
9. Avtomatik termotsikler (Gene AMP PCR System 9700, Applied  
Biosystems, USA.)
10. Elektr tokini ta'minlovchi asbob
11. Mikroto'liqinli pech
12. Analitik torozi (max.320 g, dq0.001 g)
13. Gorizontali (Joule Box<sup>®</sup> Mini-Gel electrophoresis Apparatus,  
Stratagene, USA) va vertikal (DASG-400-50, C.B.S. Scientific Co, USA.) blokli  
gel-elektroforez jihozlari
14. Mo'rili shkaf

15. Vorteks (MiniVortexerVM-3000 945301, ScientificProducts, HenryTroemnerLLCT, USA)
16. Muz olish apparati(ICE Flaker, WSF 1102-A, Cornelius, USA, s konteynerom dlya xraneniya - Ice Bin B-1048 vP, MICROBAN, USA.)
17. Konsentrator (Concentrator 5301, eppendorf, USA)
18. pH-metr (pH meter Sartorius P 009, USA)
19. Suvhammomi (Thermostatic Circulator 2219 Multitemp II, LKB Bromma, Sweden.)
20. DL jinlash uskunasi
21. CAS MWP o'lov tarozi (model 7 MWP, Amerika)

**Reaktivlar.**Quyida (1-jadval) tajribada ishlatilgan kimyoviy moddalar, fermentlar va boshqalar ro'xatda ishlab chiqaruvchi firma va kimyoviy modda nomi berilgan: Amersham Pharmacea Biotech (Freiburg), Biozym (Oldendorf), MBIFermentas (St.-Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), NewEnglandBiolabs (Frankfurt), PE Applied Biosystems (Weiterstadt), Pharmacia LKB (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

1-jadval

## Reaktivlar

Agaroza	FMC BioProducts/Biozym, Oldendorf
Borat kislota (k.t.)	Merck, Darmstadt
Bromfenol ko'ki (k.t.)	Merck, Darmstadt
BZA (Buqazardobialbumini)	Sigma, Deisenhofen
Xloroform (k.t.)	Merck, Darmstadt
EDTA (k.t.)	Merck, Darmstadt
Etanol (k.t.)	Merck, Darmstadt
Etidium bromid (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
Izopropanol (k.t.)	Merck, Darmstadt



NDS (SDS) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (DMSO) (Dimetilsulfooksid) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
SERDOGEL	Serva, Heidelberg
TEMED (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
Tris (k.t.)	Merck, Darmstadt
$\beta$ -merkaptoletanol (k.t.)	Roth, Karlsruhe
Taq polimeraza	Fermentas; Orbigen, (USA)
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Fermentas, USA
MgCl <sub>2</sub> (magniy xlorid) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
NaCl (natriy xlorid) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
NaOH (natriy gidroksidi) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
KOH (kaliy gidroksid) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
CH <sub>3</sub> COOK (kaliy atsetat) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
CH <sub>3</sub> COONa (natriy atsetat) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (sulfat kislota) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen
HCl (xlorid kislota) (k.t.)	Sigma, Deisenhofen

**Materiallar.** Praymer (35s-F-PDK-R), taq DNK Polimeraza, genom DNKsi, plazmida (vektor), donor va retsipient o‘simliklar.

### 2.3. Foydalanilgan uslublar

Tadqiqot ishlarini amalga oshirishda o‘simlik to‘qimasidan genom DNK ajratish, gel-elektroforez, polimeraza zanjir reaksiyasi, tola sifat ko‘rsatkichlarini HVI (High Volume Instrument) tizimida aniqlash usullaridan foydalanildi.

#### 2.3.1. O‘simlik to‘qimasidan genom DNK ajratish

G‘o‘za o‘simligi barg to‘qimasidan DNK ajratish. STAB usuli. O‘simlik DNK sini ajratish uchun juda foydali usul hisoblanadi. Amalda jami o‘simlik tur DNK

larini ajratish mumkin. Yaxshi tomoni ishlatilayotgan reagentlar inson salomatligi uchun xavfsiz va bosha usullarga qaraganda iqtisodiy jixatdan ham ancha qulay. Kamchiligi, vaqt ko'p talab qilinadi. Yig'ib olingan o'simlik namunalari  $-80^{\circ}\text{C}$  da muzlatkichga saqlashga qo'yildi va STAB uslubi bo'yicha DNK ajratildi [44].

**To'qimalarni hujayraga maydalash.** Biz ajratib olmoqchi bo'lgan DNK to'qimasini hujayralarga maydalash uchun uni chinni idishga solinadi va ustiga  $-180^{\circ}\text{C}$  suyuq azot quyilib uni chinni tayoq bilan maydalanadi. Mexanik ajratganda to'qima suyuq azot ta'sirida boshqa boshqa hujayralarga ajraladi. Natijada bir-biriga bog'lanishni mexanik ajratish uchun kamroq kuch talab etiladi va hujayralar kam jarohatlanadi. Yuqoridagi usul uchun jarohatlanmagan hujayralar kerak bo'ladi, yaxshisi yangi muzlatilgan to'qimalar bo'lgani maqul, faqat saqlash davrida muzdan eritilmagan bo'lishi kerak.

**Yirik molekulalar ajralishi.** Azot ta'sirida bir-biridan ajralgan hujayralar membranasi va uning organoidlarini filtrlash orqali ajratib tashlanadi. Filtrlash shu bilan bir qatorda DNK ajralishida yirik to'qima bo'laklarini kimyoviy vositalar yordamida qayta ishlaydi. Hosil bo'lgan hujayralarni birinchi navbatda lizirlovchi buffer orqali qayta ishlanadi. Hujayra membrana qobig'i va uning yadrosini eritish uchun  $65^{\circ}\text{C}$  haroratda 45 daqiqa davomida 2x STAB buferida inkubatsiya qilinadi. Natijada hujayraning barcha organoidlari tashqariga chiqadi va aralashma yopishqoq, cho'ziluvchan, hujayraning oldingi suyuqligiga nisbatan ancha shaffof bo'ladi. Aralashmaning bunday o'zgarishi lizis muvaffaqiyatli o'tganidan darakdir. CHinni xovonchaga 0,1gr o'simlik material solindi va suyuq azot qo'yilib kukun holigacha maydalandi. Eritmaga 4 ml 2xSTAB eritmasi solindi, va aralashtirilib 2 ml li probirkaga 800 mkl gomogenat solinib so'ngra gomogenatni yaxshilab aralashtirildi (Vortex), so'ngra suv hammomiga ( $65^{\circ}\text{C}$ ) 20 minutga inkubatsiyaga qo'yildi va davriy ravishda har 5 minutda aralashtirilib (Vortex) turildi. So'ngra probirkaga teng hajmda xloroform :izoamil spirti (24:1) aralashmasi solindi. 2 min davomida aralashtirilib, 10000 rpm 5 minsentrifugalandi.

**Oqsillardan tozalash.** DNK ni oqsillardan tozalash uchun probirkaga lizatoma bilan xloroform izoamil spirt aralashmasi qo'shiladi. Bizga ma'lumki DNK bilan oqsillar bir biriga juda mustahkam bog'langan. Oqsillarni aralashmadan olib tashlashning bir necha bosqichlari mavjud. Misol uchun undan eng osoni denaturatsiya va cho'kma ustiga tuzli aralashma qo'shish. Bizning sharoitda o'simlik DNK sini oqsillardan holi qilish uchun bir necha daqiqa probirkalarni sentrifuga qilamiz. Bundan so'ng hamma yoki katta-kichik hujayra bo'laklari, parchalangan oqsillar va boshqa moddalar cho'kma bo'lib probirka tubiga tushadi. Tarkibida asosan nuklein kislotalar-DNK va RNK bo'lgan probirkaning ustki qatlamidagi suyuqlik (supernatant) ni boshqa probirkaga olish kerak. Laboratoriya sharoitida aralashmadagi kerakmas qismlar fenol xloroform bilan olib tashlanadi. Organik aralashma oqsilni o'ziga biriktirib oladi keyin, sentrifugadan oldin og'ir suvli aralashma qismi suyuqlikni markazida qoladi. Sentrifugadan keyin xloroform bilan erigan oqsil probirka tubida, DNKli suvli qismi yuqorida joylashgan bo'ladi. Yuqoridagi suyuqlik (supernatant) ni boshqa probirkaga olinadi va ustiga suyuqlikdagi DNK ni ivishi uchun STAB pretsipitation buferidan qo'shamiz va +65<sup>0</sup>C haroratli suv hammomida ma'lum soat saqlanadi.

Suv usti suyuqligini yangi probirkaga o'tkazilib teng hajmda pretsipitatsiyalovchi STAB solinib, sekinlik bilan 5 min aralashtirildi. So'ngra 65<sup>0</sup>C da 30 minutga inkubatsiyaga qo'yildi va 14000 rpm da 3 minsentrifugalandi. Supernatant to'kib tashlanib 500 mkl yuqori tuzli TE eritmasi, mikserda 5 minut aralashtirilib so'ngra 300mkl izoprapanol solinib sekinlik bilan 5 minut davomida aralashtirilib DNK cho'ktirildi. So'ngra 15 minut mobaynida 10 000 rpm dasentrifugalandi. Supernatant to'kilib, 1 ml dan 70% li etanol eritmasi solindi va DNK ni yuvish maqsadida 5 minut sekinlik bilan aralashtirildi va 14 000 rpm da 3 minsentrifugalandi. Spirt to'kib tashlanib oxirgi jarayon yana bir marta takrorlandi.

Choʻkma EPPENDORF Concentrator 5301da quritildi. Soʻngra DNK 200 mkl TE da eritildi.

2-jadval

DNK ajratish uchun ishlatilgan bufer va eritmalarining tarkibi hamda tayyorlash usullari keltirilgan.

<b><u>2 x STAB</u></b>	300ml
100mM Tris pH-8.0	1M Tris pH-8.0 30ml
20mM EDTA pH-8.0	0.5M EDTA pH-8.0 2ml
1.4M NaCl	NaCl 24.5448g
2% STAB	STAB 6g
Avtoklavlash	
Yuqori tuz konsentratsiyali <b>TE</b>	200ml
10mM Tris pH-8.0	1M Tris pH-8.0 2ml
0.1mM EDTA pH-8.0	0.5 M EDTA pH-8.0 40mkl
1M NaCl	NaCl 11.68g
Avtoklavlash	
<b>10 x STAB (STAB/NaCl)</b>	100ml
0.7M NaCl	NaCl 4.1g
10% STAB	STAB 10g
Avtoklavlash	
<b>Pretsipitatsiya uchun STAB ertimasini</b>	100ml
50mM Tris pH-8.0	1M Tris pH-8.0 5ml
10mM EDTA pH-8.0	0.5M EDTA pH-8.0 2ml
1% STAB 1 g	Avtoklavlash

**RNKaza**

10mg RNKaza 1ml dH<sub>2</sub>O ga qo‘shiladi 3

va 10 minut davomida (100<sup>0</sup>C) da qaynatiladi. -20 °C ga qoldiriladi.

<b>TE (Tris EDTA)</b>	50 ml
10mM Tris1M	TrispH 8.0 0.5 ml
1mM EDTA	0.5M EDTA pH 8.0, 0.1 ml

**0.5 M EDTA pH 8 (avtoklavlangan)**

dH <sub>2</sub> O	700 ml
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	186.1 g
10 M Na OH	pH8.0 gacha
dH <sub>2</sub> O	1 litragacha

**3M NaOAc (CH<sub>3</sub>COONa)pH 5.2 (avtoklavlangan)**

dH <sub>2</sub> O	300 ml
NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> *3H <sub>2</sub> O(NaOAc)	408 g
kons. Sirka kislota	pH5.2 gacha
dH <sub>2</sub> O	1 litrgacha

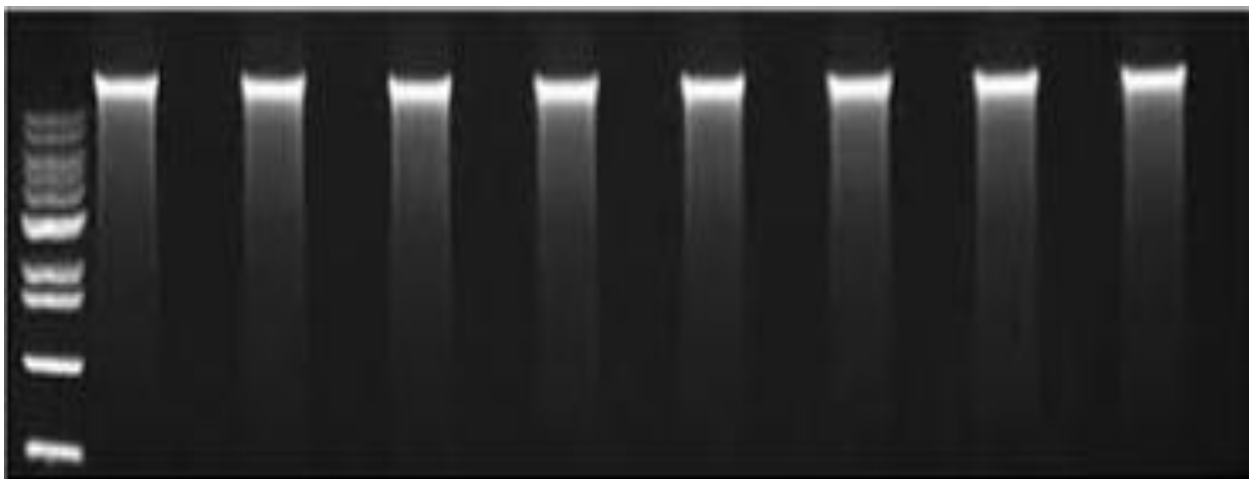
**2.3.2. Gel-elektroforez**

DNK ajratish jarayoni tugallangandan so‘ng, PZR reaksiyasi o‘tkazishdan avval so‘nggi mahsulotda haqiqatdan ham genom DNK ning bor-yo‘qligini 0,9% li agarozaga gelida ko‘rildi va uning konsentratsiyasi marker konsentratsiyasi bilan solishtirildi va ayrim namunalar marker konsentratsiyasiga tenglashtirish maqsadida suyultirildi. Buning uchun avvalo 250 ml li kolbaga 0.48 g agarozaga kukunidan tortib, 80 ml 0.5xTBE buffer solindi. So‘ngra ozgina chayqatib mikrotolqinli pechda pastroq haroratda tiniq gomogen holatga kelguniga qadar qizdirildi. Qizdirish davomida har 30 sekundda kolba maxsus (issiq o‘tkazmaydigan) qo‘lqop yordamida olinib, chayqatilib turilishi lozim. Qaynab gomogen holatga o‘tgandan so‘ng xona haroratiga sovutishga qo‘yiladi. 70°C ga

tushganida 2-3 $\mu$ l etBr (Etidium bromid) qo'shiladi. Agar 70°C dan yuqori bo'lganda qo'shilsa etidium bromid parchalanib ketishi mumkin. Bu moddani solishdan maqsad, nuklein kislotani ultrabinafsha nuri ta'sirida ko'rinishidir. Etidium bromid qo'shganimizdan so'ng, avvaldan sathini shayton yordamida to'g'irlab qo'ygan maxsus idishga quyamiz, va gelda kichik xonachalar hosil qilish uchun kerakli o'lchamdagi tishlarni joylashtiramiz. 20-30 daqiqada gelimiz qotib, ishlatish uchun tayyorholatga keladi. Qotgan gelni elektroforez idishiga joylashtiramiz. So'ngra gelni yuzasini qoplagunicha oldindan tayyorlab qo'ygan 0.5xTVE buffer dan quyamiz. Bo'yoq qo'shilgan PZR yoki DNK maxsulotlarimizni geldagi kichik xonachalarga 05-10  $\mu$ l atrofida solib chiqamiz va gel-elektroforez idishi qopqog'ini yopamiz. So'ngra maxsulotimizga qarab 90-120 Volt elektr kuchlanish bilan xaydashimiz mumkin.



**6-rasm.** Ajratilgan DNK namunalarini agarozali geldagi xonachalarga joylashtirish.



**7-rasm.** DNK fragmentlarining 0,9 % agarozaga gelidagi ko‘rinishi.

Ajratilgan DNK namunalari 0,9 % li agarozaga gelida 1 kb marker bilan tekshirib olindi.

Ajratilgan DNK namunalaridan 8 mkl olib oldindan tayyorlab qo‘yilgan agarozaning 1.2 % li gelga tushurib elektor tokening 80 V kuchlanishi bilan ta’sir ettirganimizda molekulalar harakatlanadi (taxminan 1 soat). Agarozaga geliga harakatlangan DNK namunalari Alpha Imager uskunasiida UV nurlar ta’sir ettirilganda 6-rasmdagi ko‘rinish paydo bo‘ladi.

<b>0.9% Agarozaga -</b>	80ml
0.48g	Agarose
80ml	0.5X TBE
2-3µl	etBr.

### **Eritmalar**

<b>10 X TBE–</b>	<b>1 Liter</b>
800 ml	dH <sub>2</sub> O
121 g	Tris (Trizma) Base
55 g	Boric Acid
7.44 g	EDTA
<b>TE</b>	<b>50 ml</b>
10mM Tris	0.5 ml 1M Tris pH 8.0
1 mM EDTA	0.1 ml 0.5M EDTA pH 8.0

**Super TEA                    50ml**  
 50 mM Tris            2.5ml 1M Tris  
 10 mM EDTA    1ml 0.5M EDTA  
 300 mM NaOAc    15ml 1M NaOAc  
 50 ml ga dH<sub>2</sub>O bilan yetkaziladi.

3-jadval

Gel tayyorlash uchun ishlatiladigan agaroz miqdori

Agaroz miqdori	DNK bo'linishini % dagi samaradorligi (kb)
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.5	4-0.2
2	3-0.1

### 2.3.3. Polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) va genotiplash

Ajratib olingan DNK maxsulotlarimizga Polimeraza zanjir reaksiyasi qo'yamiz.

4-jadval

PZR uchun ishlatiladigan praymerlar

10 x PSR bufer (magniy xlorid)	5 mkl
BSA	1 mkl
dNTPs aralashmasi 25 mM (dATP, dGTP, dTTP, i dCTP)	0.5 mkl
To'g'ri praymer	1.25 mkl
Teskari tartibdagi praymer	1.25 mkl
Taq polimeraza-5 ed./mkl	0.5 mkl
Genom DNKsi	1 mkl
Distillangan steril suv	39.5 mkl



## PZR sikllari

Birlamchi denaturatsiya	94 °C	3 min
Denaturatsiya	94 °C	30 sekund
Praymer o‘tirishi	54 °C	30 sekund
Elongatsiya	72°C	45 sekund
Yakunlovchi elongatsiya	72°C	7 min

**10xPCR Buffer – 100ml**  
 60ml dH<sub>2</sub>O  
 10mM Tris 1.21 g Tris  
 2mM – 1.5mM MgCl<sub>2</sub> 0.305 g MgCl<sub>2</sub>  
 50mM 3.728 g KCl

100 ml gacha dH<sub>2</sub>O bilan yetkaziladi  
 Avtoklavlash.

**100mM Glucose (Dextrose)**

18.16 g/L of dH<sub>2</sub>O 9.01 g Glucose  
 Add 50 ml dH<sub>2</sub>O.

**10xGel Loading Buffer “Type III”**

0.42% Bromophenol Bule 20mg Bromophenol Bule  
 49.9% Glycerol in dH<sub>2</sub>O 5ml Glycerol  
 5ml dH<sub>2</sub>O

**PZR va praymerlar haqida tushuncha.** 1970 – yillarning boshida Nobel mukofotiga sazovor bo‘lgan Hara Gobindi Xoran laboratoriyasining olimi Xellyu Kleppening miyasiga bir fikr keladi. Ushbu fikrga ko‘ra sintetik praymerlar yordamida DNK ni amplifikatsiyalash mumkin edi. Lekin bu ishlar o‘sha vaqtda amalga oshirilmadi. 1983 – yil amerikalik olim Keri Mallis tomonidan bu yangilik amalga oshirildi. Bu ilmiy ishdan maqsad yangi usul

yaratish ya'ni DNK-polimeraza fermenti yordamida boshlang'ich DNK molekulasining ma'lum bir bo'lagini ko'p marotaba orttirish hisobiga uni amplifikatsiyalash edi. PZR ga taalluqli dastlabki ilmiy maqola 1985 yil "Science" jurnalida e'lon qilingan bo'lsa, oradan 8 yil o'tgach PZR usulining yaratilishi evaziga K.Mallis Nobel mukofotiga sazovor bo'ldi. Dastlab usul qo'llanilayotganda har safar qizdirishdan so'ng-sovutib reaksiyalanuvchi aralashmaga DNK-polimeraza qo'shib borilardi, chunki u yuqori temperaturada ferment o'z faolligini yo'qotishi, natijada DNK zanjiri alqasining ajralishiga to'sqinlik qilardi. Reaksiyalarni amalga oshirish birmuncha samarasiz bo'lib, ko'p vaqt va ferment talab qilardi. 1986-yil polimeraza zanjiriy reaksiyalar usuli ancha yaxshilandi. Fermentlarning ancha termomuqobil xillari olindi. Dastlabki termomuqobil DNK-polimeraza *Thermus aquaticus* bakteriyasidan olingan bo'lib, u Taq-polimeraza deb nomlanadi. Bu polimerazaning o'ziga yarasha avzalligi bo'lishi bilan birga kamchiligi ham mavjud edi. Uning kamchiligi shundan iborat ediki, unda xatoliklarni tog'iray oladigan mexanizm ( $3'$  -  $5'$  ekzonukleaza) yo'q edi. SHuning uchun unda yanglish nukleotidlarni kiritish ehtimolligi yuqori hisoblanadi.

Yong'oqdan ajratib olingan Pfu va Pwo polimeraza aniqlik darajasi Taq – polimerazaga nisbatan yuqori polimerazalar hisoblanadi. Pfu va Pwo polimerazalar DNK dagi nukleotidlarni aniqlashda aniqlik darajasi yuqori, lekin ishlash tezligi Taq- polimerazaga nisbatan sustroq. Hozirda Taq – polimeraza va Pfu – polimeraza aralashmalarini birgalikda qo'llanilishi polimerazatsiyalashni yuqori tezlikda va aniq nusxalashtirish imkoniyatini bermoqda.

Keri Mallis PZR usulini ixtiro qilgan vaqtida sintetik – kimyogar sifatida Situs kompaniyasida ishlar va aynan shu kompaniya Polimeraza zanjiriy reaksiyalarini patentlashtirgan edi. 1992 - yil Situs kompaniyasi PZR usulini Taq - polimerazani qo'llash patentini Xofman – La Rosh kompaniyasiga 300 million dollarga sotdi. Biroq 1980 – yil sobiq ittifoq olimlari A.Kaledin, A.Slyusarenko va S.Gorodetskiy Taq-polimeraza tavsiflashgan, unda 4 yil ilgari

esa amerikalik biokimyogarlar Alice CHien, David edgar va John Trelalar tomonidan bu fermentlar haqida xabar qilgan edilar. SHunga ko‘ra Promega kompaniyasi sudlashuv asosida Roshni ferment xuquqlaridan voz kechishga majburlab, bu usulning patenti 2005 –yil to‘liq tugatildi.



**8-rasm.**PZR amplifikatorning umumiy ko‘rinishi.

**PZR ning o‘tkazilishi.** Bu usul – DNK ning muayyan qismini invitro muhitda ko‘p marotaba nusxalashtirishga asoslangan. Unda faqat lozim bo‘lgan DNK bo‘lagining nusxalashuvi mavjud sharoitda, qoniqtiruvchi informatsiya tekshirilayotgan namunada bo‘lsagina ro‘y beradi. Tirik organizmlardagi DNK amplifikatsiyasi (replikatsiyasi) singari emas, balki PZR yordamida DNK dagi qisqa qismning amplifikatsiyasi ro‘y beradi. Turli xil polimerazalarning aralashmasi yordamida muayyan muhit sharoitida PZR – fragmentining uzunligi 20-40 ming nukleotid juftligini qamrab olishi mumkin. Lekin u eukariot hujayralarning xromosomalaridagi DNK ning juda ham oz qisminigina qamrab oladi. Masalan odam genomi 3 milliard juft nukleotiddan tashkil topgan. Hayvon organizmidagi DNK ni replikatsiya qilishdagiga nisbatan DNK ni kamroq bo‘lagi amplifikatsiya qilinadi (odatda 3000 juft nukleotidlarni. Lekin Long Range PCR nomli yangi metoda 20 mingdan ortiq nukleotidlar bilan ishlashga imkoniyatiga ega). Ilgari har bir siklda isitish vaqtida polimerzani qo‘shib turishga to‘ri kelardi. Keyinchlik esa issiqlika chidamli polimerzalar

taklif qilindi. Ular issiqlika shunchlik chidamliki polimer zanjirli reaksiyani o'tkazishni judayam osonlashtirishga yordam berdi.

**Reaksiya komponentlari.** PZR ni o'tkazishda quyidagi komponentlar talab qilinadi:

Matrista-DNK, ya'ni amplifikatsiya qilinishini talab qiladigan DNK qismini tutadigan molekula;

Ikkita paymer. Talab qilinayotgan DNK fragmenti turli zanjirlarini qarama-qarshi uchlariga komplementar bo'lgan praymerlar;

Termostabil DNK-polimeraza - DNK-polimerizatsiyasi reaktsiyasini katalizlaydigan ferment. PZR uchun ishlatiladigan polimeraza uzoq vaqt davomida yuqori haroratda aktivligini saqlashi kerak. Buning uchun termofillar - *Thermus aquaticus* (Taq-polimeraza), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-polimeraza), *Pyrococcus woesei* (Pwo-polimeraza) va boshqalardan ajratilgan fermentlardan foydalaniladi;

dezoksinukleozidtrifosfatlar (dATF, dGTF, dCTF, dTTF);

polimeraza ishida ishtirok etadigan ionlar shu jumladan  $Mg^{+2}$  ionlari;

Bufer eritma; u reaktsiyani zarur shartlari - pH, eritmani ion kuchini ta'minlaydi. Tarkibida tuzlar, buqa zardobi albumini mavjud.

PZR da ishlatiladigan bufer, Tris-HCl, KCl va Triton X-100 dan iborat bo'ladi.

Tris-HCl. Harorat ko'tarilganda Tris-buferning pH i tushadi va 72°C da - 7,5 ni tashkil qiladi. SHuning uchun bufer pH ini yuqori ko'rsatkichi (8,6-9) tanlanadi.

KCl ni o'rtacha konstantralari Taq-polimeraza aktivligini 40-60% ga stimullaydi (lekin 0,2 M miqdorda polimeraza aktivligini ingibirlaydi).

Triton X-100. Probirka yuzasida oqsil atsoabsiyasini oldini oladi.

Reaksiyon aralashmani parlanishini oldini olish uchun probirkaga yuqori qaynash haroratiga ega bo'lgan yog', masalan, vazelin qo'shiladi. Agar isituvchi qopqog'li amplifikatordan foydalanilsa - bu yog' talab qilinmaydi.

Pirofosfatazani qo‘shilishi - PZR reakstiyasi chiqishini oshirishi mumkin. Bu ferment pirofosfat gidrolizini katalizlaydi. Pirofosfat PZR reakstiyasini ingibirlashi mumkin.

Praymerlar. PZR o‘ziga xosligi matritsa bilan praymerlararo komplementar majmui hosil qilishga asoslanadi. Unda qisqa sintetik oligonukleotidlarning uzunligi 18-30 asosdan iborat. Har bir praymer matritsaning ikki zanjiridan biriga komplementar va aynan amplifikatsiyalanuvchi qismning boshi va oxirini chegaralab turadi.

Praymer matritsa bilan duragaylangandan so‘ng, DNK polimeraza uchun, matritsa esa komplementar zanjirining sintezi uchun xizmat qiladi.

Praymerlarning muhim tavsifi, ularning praymer matritsa majmuasidagi erish haroratidir ( $T_m$ ).

$T_m$  harorat bo‘lib, unda DNK – matritsaning yarmi oligonukleotid praymerli majmuani hosil qiladi. erish haroratini quyidagi formula asosida taxminan aniqlash mumkin:

$$T_m = 2x(\eta_A + \eta_T) + 4x(\eta_G + \eta_C)$$

bunda  $\eta_x$  - X praymerdagi nukleotidlar soni, A – adenin, G – guanin, C – sitozin, T – timin



**9-rasm.** PZRo‘tkazilishi

Praymerdagi nukleotidlar tarkibi va uzunligini tanlash noto'g'ri bo'lsa yoki optimal harorati komplementar majmual DNK – matritsaning boshqa qismlarining qisman hosil qilishi, natijada nomaxsus mahsulotlarni paydo bo'lishiga sabab bo'lishi mumkin. Erish haroratining yuqori chegarasi polimeraza ta'sirining optimum harorati bilan chegaralanib, uning faolligi harorat 80° C dan oshgandan so'ng susayadi.

Polimerazalarni tanlashda quyidagi mezonlarga amal qilish lozim.

- GC 40-60% bo'lishi lozim.
- Nomaxsus ikkilamchi sutrukturalarning yo'qligi (shpilkasimon va dimer)
- $T_m$  praymerlar (5° C dan ko'p bo'lmagan farqdagi)
- 5<sup>1</sup> yakunida guanin yoki sitoziinning bo'lishi lozim, chunki ular 3 ta vodorod bog' hosil qilib bog'lanadi. Bu bog'lar matritsa molekulalari duragaylaylanishni stabillashtiradi.

Amplifikator. PZR amplifikator probirkalarda o'tkazilib, ular muntazam sovutilishi va qizdirilishi mumkin (0,1 S aniqlikda). Zamonaviy amplifikatorlar murakkab dasturlarnishi va “qaynoq start” imkoniyatiga ega bo'lishi, Touchdown PZR va amplifikatsiyalangan molekulaning 4° C da kechishi mumkin bo'ladi (3-rasm). Avtomatik qopqog'ga ega pribor (uskuna)lar mavjud bo'lib, ular yordamida avtomatlashgan tizimiga mahsulotni joylash mumkin.

**Denaturatsiya.** Unda DNK zanjirlarining ajralishi uchun ikki zanjirlari DNK matritsa 94-96° C 0,5 – 2 min qizdiriladi (yoki 98° C gacha, agar termoturg'un polimeraza ishlatilsa). Ba'zan birinchi bosqichidan avval (polimeraza tugagunga qadar) matritsa va praymerning to'liq denaturatsiyalanishi uchun 2-5 min mobaynida reaksiyaga kiruvchi aralashma dastlab qizdiriladi. Bu usul “qaynoq start” deb nomlanib u reaksiya natijasidagi nomaxsus mahsulotning miqdorini kamaytiradi. Demak, denaturatsiya bosqichida adinen va timin orasidagi 2 ta, guanin va sitoziin orasidagi 3 ta vadarod bog' uziladi. Natijada qo'sh zanjir ikkita yagona zanjirga aylanadi.

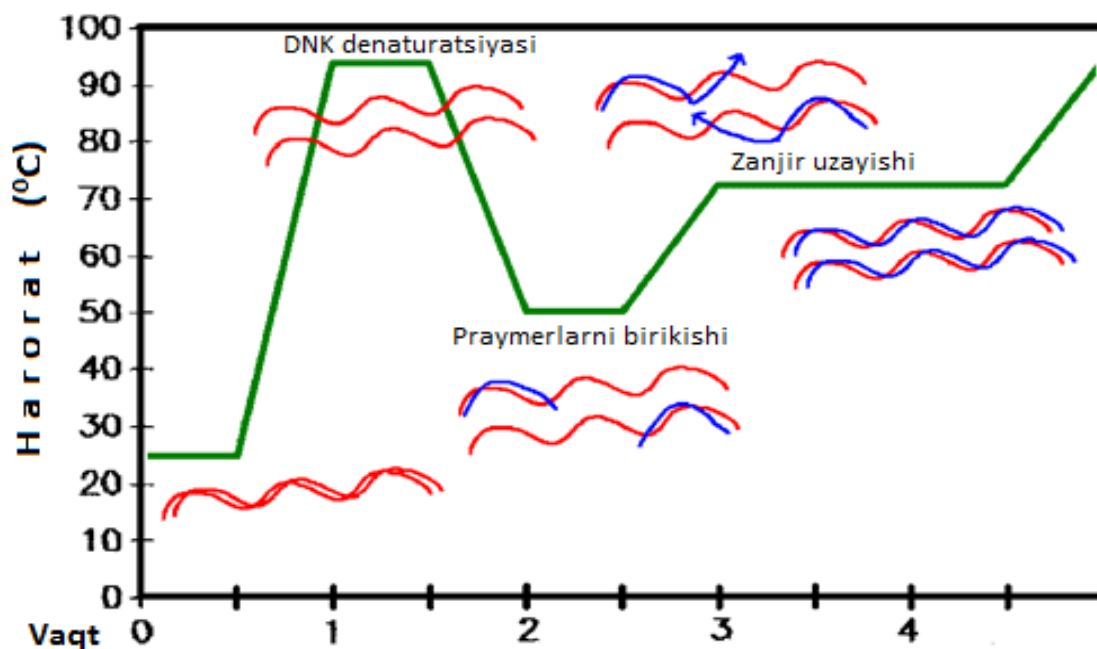
**Renaturastiya. Bu bosqichda yogana zanjirga praymerni bog‘lanishi kerak.** Zanjirlar ajralganida, praymerlar bir zanjirli matrasta bilan bog‘lanishi uchun harorat pasaytiriladi. Bu bosqich renaturastiya deyiladi. Renaturastiya harorati praymerlar tarkibiga bog‘liq va odatda erish haroratidan  $4-5^{\circ}\text{C}$  ga pastroq bo‘ladi. Bosqichni davom etish vaqti 0,5-2 min. Renaturastiya haroratini noto‘g‘ri tanlanishi - yoki praymerlarni matrasta bilan yomon bog‘lanishiga (yuqori haroratda), yoki noto‘g‘ri joyda bog‘lanishiga hamda nospestifik mahsulotlarni hosil bo‘lishiga (past haroratda) olib keladi. Shuning uchun renaturatsiya bosqichi asosiy omil haroratning to‘g‘ri tanlanishi hisoblanadi.

**Elongastiya.** DNK-polimeraza tomizg‘i sifatida praymerlarni ishlatib matrasta zanjirini replikastiyalaydi. Bu - elongastiya bosqichidir. Polimeraza, matrasta bilan bog‘langan praymerni Z’-uchidan ikkinchi zanjirni sintez qila boshlaydi va matrasta bo‘ylab harakatlanadi. Elongastiya harorati - polimerazaga bog‘liq. Ko‘pincha ishlatiladigan Tag va Pfu-polimerazalar  $72^{\circ}\text{C}$  da aktivroq bo‘ladi. elongastiya vaqti DNK-polimeraza tipiga, hamda amplifikastiyalangan fragment uzunligiga bog‘liq.

Odatda, elongastiya vaqtini har 1000 asoslar jufti 1 min.ga teng deb qabul qilinadi. Barcha sikllar tugagandan keyin ko‘pincha final elongastiyani qo‘shimcha bosqichi o‘tkaziladi. Bu - barcha bir zanjirli fragmentlarni oxirigacha qurishga xizmat qiladi. Bu bosqich 7-10 min. davom etadi.

Reaksiya natijasida maxsus mahsulotning miqdori (praymerlar bilan chegaralangan) teng ravishda proporsional nazariy jihatdan o‘sadi ya’ni  $2^n$  bilan ifodalanadi. Bu yerda  $n$  - reaksiya bosqichlari soni.

Odatda, har bir bosqichning samaradorligi 100% dan kamroq bo‘lishi mumkin, shuning uchun, haqiqatda  $P \sim (1+E)^n$ , bu erda  $P$  — mahsulot miqdori,  $e$  — bosqichning o‘rtacha samaradorligi.



**10-rasm.**PZR ning umumiy sxemasi

Reaksiya to‘g‘ri amalga oshish uchun : DNK – matritsa , praymer, DNK – polimeraza, erkin nukleozitlar( yangi sintezlanadigan DNK dagi bo‘lajak “xarflar “) va polimerazani ishini yaxshilash uchun moddalar (ularni reaksiyadagi maxsus buferlarga joylashtiriladi)

Har bir DNK zanjiri nukleotidlarni ketma-ketlik bo‘yicha tuzilgan, yonidagi zanjirga komplementar birikan bo‘ladi(ular bir xil informatsiyani o‘zida saqlaydi) DNK bo‘linganda ular ajraladi va har bir zanjir matritsaga xizmat qiladi va ularni har biriga komplementar ravishda yangi zanjirlar birikadi. Natijada 2ta duplikat DNK paydo bo‘ladi va ularning har biri birinchi DNK ni nusxasi bo‘ladi (sintez xatolarsiz )

DNK ni sintezlash uchun komplementar matritsa bilan praymerlar vodorod bog‘ini xosil qilishi kerak lekin matritsa uni o‘zining zanjiri bilan xosil qilib bo‘lgan! Demak, DNK ni eritishimiz kerak – yani vodorod bog‘larni uzishimiz kerak. Buni isitish yo‘li bilan qilinadi ( $\approx 95^\circ\text{C}$ ) – buni denaturatsiya deb ham atashimiz mumkun. Endi esa xaroratning yuqoriligidan praymer matritsa bilan vodorod bog‘ini xosil qila olmaydi. SHuning uchun temperturani  $50\text{--}65^\circ\text{C}$  tushiramiz praymerlar matritsaga yopishgandan keyin temperturani  $72^\circ\text{C}$  ga ko‘taramiz. Shundan so‘ng DNK zanjirdagi komplementar matritsani



polimeraza sintezlay boshlaydi. SHunday sikldan keyin bizga kerakli bo'lgan DNK bo'laklari 2 barobar ko'payadi. Bu siklni yana ko'p marotaba takrorlasak xam bo'ladi (10-rasm).

**PZR ning xilma – xilligi.** Nested PCR (nested inglizcha so'z bo'lib, uya qurish ma'nosini anglatadi) – reaksiyaning mahsulotini surunkali miqdorini kamaytirish maqsadida foydalaniladi. Ikkita ketma – ket reaksiyalarni amalga oshirish uchun ikki juft praymer qo'llaniladi. Ikkinchi juft praymer birinchi reaksiya mahsulotining ichida DNK qismini amplifikatsiyalaydi.

Inverse PCR (inverse inglizcha so'z bo'lib qarama – qarshi degan ma'noni bildiradi) – Bu usul genomga DNK joylangandan keyingi holatdagi birikmalarning ketma – ketligini aniqlashda foydalidir. Inverse PCR da DNK ning biror bir ahamyatga ega bo'lgan kichkina bo'lagini ko'paytirishda keng qo'llaniladi. Inverse PCR ni amalga oshirishda DNK restriktazalar yordamida bir necha marotaba kesilib, so'ng fragmentlarga biriktiriladi. Natijada ma'lum fragmentlar har ikkala uchlarda hosil bo'lib, PCR o'tkazishning imkoniyati yuzaga keladi.

Teskari transkripsiyali PCR – RNK bibliotekasidan ma'lum ketma-ketlikni identifikatsiyalash yoki aniqlash, amplifikatsiya maqsadida qo'llaniladi. PCR da matritsa rolini o'tovchi bir zanjirli DNK revertazalar yordamida m-RNK matritsasidan sintezlab olinib oddiy PCR o'tkaziladi. Bu usul yordamida qachon va qayerda muayyan gen ekspressiyalanishi mumkinligini aniqlash mumkin.

Assimmetrik PCR – boshlang'ich DNK ning bir zanjirini amplifikatsiyalashda qo'llash mumkin. Duragaylash tahlilida va ayrim sekvenirlash usullarida ham qo'llaniladi.

Miqdoriy PCR – namuna k-DNK yoki RNK dagi muayyan miqdorini aniqlash maqsadida qo'llaniladi.

Aniq vaqtdagi miqdoriy PCR – reaksiya mahsulotining to'planishiga ko'ra fluorescent nishonlangan reagentlarda aniq miqdorni o'lchash maqsadida qo'llaniladi.

Molekulyar koloniyalar usuli – akrilamid gelni yuza qismda PCR ning butun komponentlari bilan polimerlab, so‘ng PCR o‘tkaziladi.

Uzun fragmentlar PCR – DNK ning olis qismlarini amplifikatsiyalashdagi PCR modifikatsiyasida (10 ming asos va undan ortiq) qo‘llaniladi. Unda ikki polimeraza – yuqori faoliyatli (ya’ni bir yurishda DNK ning uzun zanjirini sintezlay olishi mumkin bo‘lgan) Taq polimeraza, 3<sup>1</sup> – 5<sup>1</sup> ekzonukleaza faolligiga ega DNK polimerazalarga ta’luqlidir. Ikkinchi polimeraza birinchisidan yuzaga kelgan xatoliklarni to‘g‘irlashi uchun kerak.

#### **2.4.Paxta tolasiga qo‘yiladigan sanoat talablari va Tola sifat ko‘rsatkichlarini HVI tizimida aniqlash**

Tolaning texnologik xususiyatlarini tasniflash uchun uch xil usulda amalga oshiriladi. Klassiyorlik usuli- paxta tolasiga navi va sinfi bo‘yicha organoleptik baho berishdir. Bunda tola tashqi ko‘rinishi bo‘yicha belgilangan tartibda tasdiqlangan namunalar bilan solishtiriladi. Uning shtapel uzunligi o‘lchanadi. Asbob yordamida faqat mikroneyr ko‘rsatkichi aniqlanadi.

HVI usuli-paxta tolasini uzunlik, uzunlik bo‘yicha bir xillik, pishiqlik, uzilishdagi uzayish, mikroneyr, rang va ifloslanish ko‘rsatkichlari bo‘yicha yuqori samarador (High Volume Instruments) o‘lchash tizimi.

Maxsus qo‘llaniladigan usullar-bu paxta tolasini kichik namuna asosida asbob yordamida sinashning an’anaviy usullari majmuidir. Bunda paxta tolasining turli toylaridan yoki tekshirilayotgan andozaning turli joylaridan tanlab olingan namunalar birlashtirilib umumlashgan namunalar hosil qilinadi. Umumlashgan namunalardan sinov namunalari olinadi. Maxsus usullar ko‘p mehnat va talab qilishi, sinalayotgan namunaning miqdori kamligi tufayli paxta tolasini sertifikatlash maqsadlari uchun yaroqsizdir. Bu usullar paxta xom ashyosini baholashda, selekstiya ishida, paxta zavodlari va to‘qimachilik korxonalaridagi texnologik jarayonlarni nazorat qilishda qo‘llaniladi.

Hozirda dunyo bo'yicha HVI usuli eng ko'p qo'llaniladi. Ushbu usuldan toyma-toy sinovlarda ham foydalaniladi. Shuni hisobga olib, HVI usulida qo'llaniladigan, paxta tolasining sifatlari va xususiyatlarini tavsiflovchi atamalarni keltiramiz.

Mikroneyr ko'rsatgichi (Mic)-paxta tolasini namunasining havo o'tkazuvchanligiga qarab, tolaning ingichkaligi va pishib etilganligini bildiradi.

Yuqori o'rtacha uzunlik (**UHM**)- tekshirilayotgan namuna massasining yarmini tashkil qiluvchi eng uzun tolalarining o'rtacha uzunligi bo'lib, dyumda yoki millimetrda ifodalanadi.

1/32 dyumdan iborat shtapel uzunlik (Staple) – tolaning uzunligi bo'lib, u klassifikator tomonidan qo'lda tahlangan parallel tolalar shtapelini vizual, ya'ni ko'z bilan ko'rish orqali aniqlanadi. 0,99-1,01 dyum uzunlikdagi tolalar kasr ko'rinishda 1/32 dyum yoki 32 kod deb ataladi. Tola uzunligi oshgan sari ushbu miqdor ham oshib boradi. Mazkur standartda uning eng katta miqdori 43 ga teng.

O'rtacha uzunlik (ML)– namunadagi barcha tolalarning o'rtacha uzunligi.

Uzunlik bo'yicha bir xillik indeksi(Unf) –tolalar o'rtacha uzunligining yuqori o'rtacha uzunlikka nisbati bilan belgilanuvchi kattalik bo'lib, foizlarda o'lchanadi.

*Kalta tolali indeksi (SFI)*-namunadagi uzunligi 0,5 dyumdan (12,7 mm) kalta bo'lgan tolalar uzilishi bo'lib, foizlarda o'lchanadi.

Nur qaytarish koeffitsienti (Rd) – sinalayotgan paxta tolasini namunasi yuzasidan qaytgan yorug'lik miqdori, foiz hisobida.

Sarg'ishlik darajasi(+b) – sinalayotgan namuna tarkibidagi sarg'ishlik darajasini ifodalaydi.

Tresh kodi (T) – notolaviy aralashmalar bilan ifloslanganlik ko'rsatkichi bo'lib, iflos aralashmalar maydoning ulushini 10 ga ko'paytirish orqali aniqlanadi. Masalan, agar iflos aralashmalar maydonining ulushi 0,4 foizni tashkil etsa, tresh kodi 4 ga teng bo'ladi.

Iflos aralashmalar soni (Area)-HVI tizimida o‘lchov asboblari yordamida aniqlanadigan iflos zarrachalarning umumiy maydoni. Bu maydon kattaligi skanerlash yo‘li bilan aniqlanadi hamda tekshirilayotgan namuna sathiga nisbatan foiz hisobida aniqlanadi.

Iflos aralashmalar maydoni (Cnt)– namunadagi diametri 0,01 dyum (0,25 mm) va undan katta bo‘lgan iflos zarrachalar soni.

Solishtirma uzilish kuchi (Str)-paxta tolasining pishiqligi bo‘lib, kolibrilanuvchi paxtaning HVI darajasida (HVI Calibration Cotton), gk/teks (grammkuch/teks) yoki sN/teks (santinyuton/teks) bilan ifodalanadi.

Uzilishdagi uzayish (Elg) – dinomometr yordamida tortilganda tolaning uzilishdagi uzayishi, foizlarda ifodalanadi.

- tolaning biologik jihatdan pishib etilganligini bildiradi.

Paxta tolasining uzunlik ko‘rsatkichi to‘qizta (1a, 1b, 1,2,3,4,5,6,7) tipga bo‘linadi. (6-jadval). Har xil ko‘rsatkichlar bo‘yicha tola tipini aniqlashda farqlar kelib chiqqan hollarda yuqori o‘rtacha uzunlik (UHM) ustuvor mavqeda bo‘ladi. 1a, 1b, 1, 2 va 3 tipdagi tolalarga ega bo‘lgan paxta – uzun tolali g‘o‘za navlariga, 4, 5, 6 va 7-tipdagi tolalarga ega bo‘lgan paxta esa o‘rta tolali g‘o‘za navlariga kiradi.

Xar bir tip paxta rangi, tashqi ko‘rinishi, pishib etilganlik koeffitsienti bo‘yicha va belgilangan tartibda tasdiqlangan namunalarga muvofiq beshta sanoat navi bo‘linadi. (7-jadvalga qaralsin). Tasniflashda har bir sanoat navi ma’lum solishtirma uzilish kuchi talablarga mos bo‘lishi zarur.

Har bir sanoat va biologik navga xos pishib etilganlik koeffitsienti eng kichik qiymat paxta tolasining tiplari bo‘yicha rangi va tashqi ko‘rinishiga doir talablar O‘zDSt 615:2007 standartining 7-jadvalda keltirilgan.

Paxta xom ashyosining sanoat navi xom ashyodagi iflos aralashmalar va namlikning massaviy ulishi miqdoriga ko‘ra uch sinfga bo‘linadi.: -1-sinf- “qo‘lda terilgan”; -2-sinf- “mashinada terilgan”; -3- “yerdan terib olingan”.

## Tolaning uzunligi va solishtirma uzilish kuchi bo'yicha tasniflanishi

Paxta tipi	Yuqori o'rtacha uzunlik (UHM)		Shtapel uzunlik (Staple)		I va II navlar uchun HVI tizimi bo'yicha solishtirma uzilish kuchi, (Str), sN/teks,(gk/teks)
	mm	dyum	dyum	Kod	
1a	33,7-34,3	1,33-1,35	1,11/32	43	29,4-34,3 (30,0-35,0)
1b	32,9-33,6	1,30-1,32	1,5/16	42	
1	32,2-32,8	1,27-1,29	1,9/32	41	
2	31,4-32,1	1,24-1,26	1,1/4	40	
3	30,7-31,3	1,21-1,23	1,7/32	39	
	29,9-30,6	1,18-1,20	1,3/16	38	
4	28,9-29,8	1,14-1,17	1,5/32	37	23,0-27,8 (23,5-28,4)
	28,1-28,8	1,11-1,13	1,1/8	36	
5	27,4-28,0	1,08-1,10	1,3/32	35	
	26,6-27,3	1,05-1,07	1,1/16	34	
6	25,8-26,5	1,02-1,04	1,1/32	33	
7	25,1-25,7	0,99-1,01	1	32	

7-jadval

## Paxta tolasining nav bo'yicha ko'rsatkichlari

Tipi	Navlar bo'yicha pishib yetilganlik koeffitsienti, kamida				
	Birinchi (I)	Ikkinchi (II)	Uchinchi (III)	To'rtinchi (IV)	Beshinchi (V)
<b>1a, 1b, 1, 2,3</b>	2,0	1,7	1,4	1,2	1,2 dan kam
<b>4,5,6,7</b>	1,8	1,6	1,4	1,2	1,2 dan kam

Paxta xom ashiyosining iflos aralashmalar va namlik bo'yicha standart talablari 3-jadvalda keltirilgan.

Paxta xom ashiyosi va tolasining navi va sinfini aniqlash uchun maxsus tashqi korinish namunalari (etalonlari) mavjud. Paxta tolasining kondistion massasini aniqlash uchun iflos aralashmalar hisob me'yorining massaviy ulishi – 2,0% va namlikning massaviy nisbati – 9,0% deb olinadi.

Qabul qilingan paxta xom ashiyosi uchun hisob-kitoblar uning tipi, sanoat navi va sifat ko'rsatkichlariga qarab, Preyskurant narxlar bo'yicha joriy yilda uning 90 foizi miqdorida va qolgan 10 foizi uni qayta ishlash yakunlangandan keyin olingan tola miqdori va sifatidan kelib chiqib amalga oshiriladi.

## **II Bob bo'yicha xulosalar**

Xulosa qilib, zamonaviy molekulyar biologiyaning usullaridan foydalanib qishloq xo'jalik ekinlarini yangi biotexnologik nav va nav tizmalarini yaratish imkoni mavjud. Bu biotexnologik o'simliklar o'zining ishonchliligi ya'ni o'tkazilgan gen konstruksiyani keying avlodlarda mavjud yoki yo'qligini yuqoridagi usullar bilan kuzatish va nazorat qilish mumkin hamda seleksion davrining qisqaligi bilan oddiy an'anviy usullardan ajralib turadi.

Magistrlik dissertatsiyasini tayyorlashda PHYA genini aniqlash uchun turli molekulyar biologik, molekulyar genetik, shuningdek bioinformatik metodlardan foydalanildi. Tadqiqotning asosiy metodlari sifatida genlarni klonlash, polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR), genetik konstruksiya yaratish, STAB usulida DNK ajratish, gel-elekrtoforez, HVI metodlari asosida aniqlandi.

## III BOB. OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING MUHOKAMASI

### 3.1. RNK interferensiyasi asosida PHYA1 geni nokaut qilingan biotexnologik g'ozga genotiplarini olish.

**RNKi vektor kassetani tuzish.** PHYA1 genini nokautga uchratish aynan pHALLSGATE-8 vektor kassetasi orqali amalga oshiriladi. Eng avval shunday kasseta tuzish va uni kallas to'qimaga kirgizish zarur. Vektor kassetani tuzish Reynolds [52] usuliga binoan shakllantirildi. Natijada o'simlik hujayrasidagi gen ekspressiyasini to'xtatuvchi RNA (vektor konstruktsiya) terminlovchi nukleotid ketma-ketliklaridan, xamda (g) intron va (d) restriksiya saytlaridan iboratdir.

Quyida PHYA1 geniga tuzilgan 21 juft nukleotid ketma-ketlikdan iborat bo'lgan sens uchastkasi keltirilgan:

CACTTGGGAATTCCCGTTTGTG

Antisens ham mos ravishda 21ta nukleotid qoldig'idan iborat bo'lib sensga nisbatan teskari tartibda komplementardir:

CAATTACTGCATCCCCAAGTG

Intron qism esa 9 ta nukleotid ketma-ketligiga ega:

AAGTGGCCT

Terminlovchi ketma-ketlik quyidagicha:

TTTTTT

PHYA geniga tuzilgan dupleksning restriksiya saytlari esa XhoI va XbaI ketma-ketligiga mos:

XhoI – CTCGAG      XbaI – TSTAGA

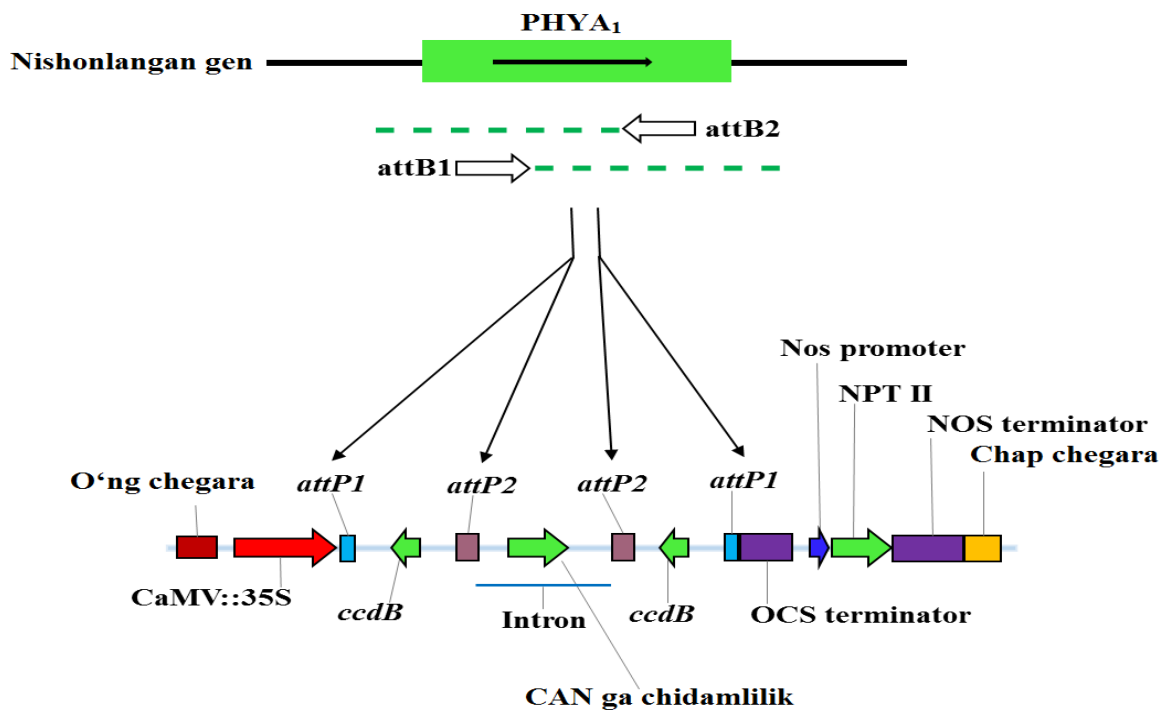
Yuqoridagi ketma-ketliklarning barchasini quyidagi tartibda joylashtirildi:

XhoI → sens → intron → antisens → terminator → XbaI

Yuqorida keltirilgan tartibda nukleotid qismlarni kimyoviy sintez qilib vektor kasseta olish uchun AQShning "Invitrogen" firmasiga buyurtma berildi. Buning sababi, "Invitrogen" firmasi xalqaro sertifikatga ega bo'lgan tashkilot

sifatida sintez qilingan mahsulotlarini to‘g‘riligini to‘liq kafolatlagani uchun, biz mazkur bosqichda sintez qilingan vektor konstruktsiya tasdig‘ini muhokama qilmaymiz.

Olingan vektor konstruktsiyaning yakuniy tuzilishi 11-rasmda ko‘rsatilgandek nukleotid ketma-ketligiga ega.



**11-rasm.**PHYA<sub>1</sub> geniga tuzilgan vektor konstruktsiya.

Agar 10-rasmda keltirilgan barcha qismlarning vazifalariga qisqacha to‘xtalsak: XhoI va XbaI saytlar kassetani plazmidaga tikkandan so‘ng XhoI va XbaI restriktaza fermentlari bilan kesib tekshirish uchun kerak bo‘ladi. Intron qism nokaut jarayoni boshlanganda Dicer fermenti tomonidan kesib tashlanadi. Sens qismni post-transkripsion jarayonda RISC kompleksi parchalab tashlaydi. Antisens qism esa RISC kompleksini PHYA<sub>1</sub> genining mRNKsiga komplementar bog‘lanish uchun xizmat qiladi. Terminator sayt transkripsiya bosqichida RNK polimeraza fermentini to‘xtatish uchun zarur bo‘ladi.

Reynolds [52] usulida ko‘rsatilgan talablarga muvofiq solishtiradigan bo‘lsak, vektor konstruktsiyada 4 tadan ortiq ketma-ket kelgan bir xil nukleotidlar yo‘qligi ko‘rinadi. Shuningdek, kasseta PHYA<sub>1</sub> genining 5'UTR va 3'UTR saytlariga komplementar qilib tuzilmagan va uning G+C tarkibi 44%



tashkil etdi. Demak, kassetaning yuqoridagi talablarga to'liq javob berishini xisobga olsak, uni molekulyar jihatdan sitoplazmada barqaror bo'lishi, qolaversa issiqlik bilan bog'liq bo'lgan PZR reaksiyasini u bilan bimalol o'tkazish mumkinligi ma'lum bo'ldi.

Mazkur vazifani bajarish jarayonida yaratilgan vektor kasseta g'o'zaning DNKsiga plazmada orqali birikadi. Demak u tadqiqotlarning keyingi bosqichida siRNA kassetani tutuvchi rekombinant plazmidani sintez qilishda qo'llaniladi.

**Kassetani plazmidaga tikish.** Tuzilgan kassetaning ekspressiyasini tekshirib ko'rish uchun u binar plazmada pHALLSGATE-8 ga tikilishi kerak. Bu plazmidaning SaMV 35S promotori va PDK-terminatori oralig'ida XbaI va XhoI restriksiya saytlari, hamda kanamitsin va spektinomitsinga chidamlilik beruvchi genlar mavjud. Sintetik dupleksni plazmidaga tikish uchun binar plazmada pHALLSGATE-8 XbaI va XhoI fermentlari (Firma «Fermentas», Litva) bilan restriksiyalandi.

Bunda umumiy reaksiyon aralashma 10 mkl bo'lib u: 4 mkl suv, 4 mkl plazmada (250ng/mkl) va 1mkl 10% restriksion buferdan (0,1 mkldan XbaI va XhoI restriktazalari) iborat. Reaksiyon aralashma 370S da 16 soat mobaynida inkubatsiya qilindi. Reaksiya vaqti tugagandan so'ng, restriksiyalangan plazmada elektroforez usulida agaroz gelida fraksiyalandi. Plazmada fragmenti agaroz gelidan fenol/xloroform usulida tozalab olindi.

Kesilgan plazmada pHALLSGATE-8 ni kasseta bilan birikish reaksiyasini amalga oshirish uchun 1mkl (200ng/mkl) tozalangan pHALLSGATE-8 plazmada, 50mkl kasseta, 10mM ATF, tikuvchi bufer (T4 DNK ligaza (Firma «Invitrogen»)) aralastirildi va 220S da 16 soat davomida inkubatsiya qilindi. Natijada hosil bo'lgan rekombinant plazmada tadqiqotlarning keyingi bosqichida bakteriyaga transformatsiya qilish uchun ishlatildi.

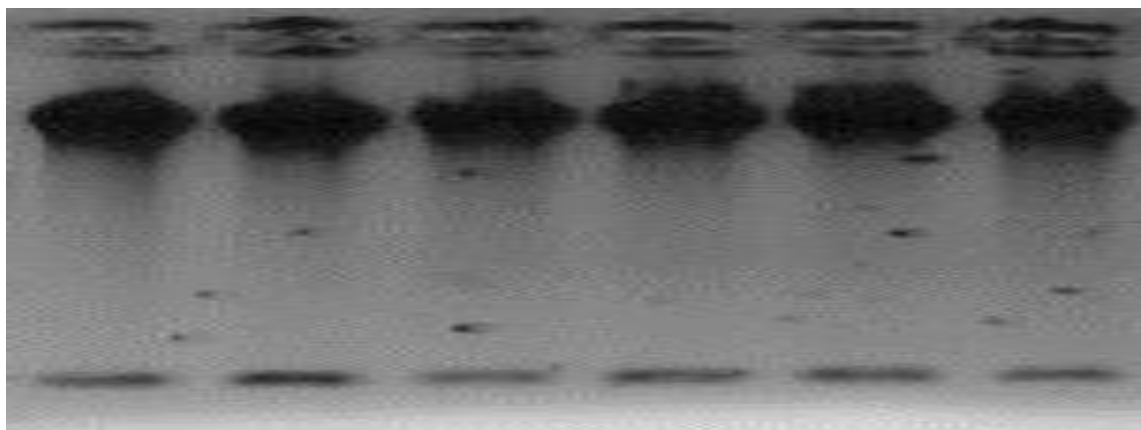
**Rekombinant plazmidani bakteriyaga transformatsiya qilish.** Ushbu vazifani amalga oshirishdan maqsad, hosil bo'lgan rekombinant plazmidani

*Agrobacterium tumefaciens* (GV3101 shtamm) hujayrasiga transformatsiya qilish edi. Mazkur ish “heat-shock” [54] usuliga muvofiq amalga oshirildi.

Natijada transformatsiya qilingan bakteriyalarni ko‘paytirish uchun ularni agarozali YEP ozuqa muhitiga (Bakto-pepton – 10 g/l, natriy xlorid – 5 g/l, achitqi (drojja) ekstrakti – 10 g/l, bakto-agar – 15 g/l, kanamitsin – 50 mg/l, gentomitsin – 40 mg/l, spektinomitsin – 50 mg/l, rN 7,2) ekib, 260S haroratda, 200 aylana/minut tezlikda, 12 soat mobaynida aylantirishga qo‘ydik.

Keyinchalik tabiiy tanlangan, ya’ni haqiqatda tarkibida rekombinant plazmida tutgan agrobakteriyalar suyuq YEP muhitiga (Go’sht ekstrakti - 5 g/l, achitqi ekstrakti - 1 g/l, pepton - 5 g/l, saxaroza - 5 g/l, MgSO<sub>4</sub> – 493 mg/l, kanamitsin – 50 mg/l, gentomitsin – 40 mg/l, spektinomitsin – 50 mg/l, rN 7,2) plazmida ajratish uchun o‘tkazildi.

O‘tkazilgan tadqiqotlarning davomida plazmidani ishqoriy-lizis usuliga [53] binoan ajratildi. Natijada ajratilgan plazmidaning tarkibida tuzilgan kassetaning borligini tasdiqlash uchun plazmida XbaI va XhoI restriktazalari bilan kesilib, elektroforez usulida tekshirildi (12-rasmga qaralsin).



**12-rasm.** Kesilgan plazmidaning elektroforegrammasi

Ushbu elektroforegrammada kesilgan plazmidaning gel tasviri keltirilgan bo‘lib, undagi har bir vertikal qatorida 2 tadan dog‘ni yaqqol ko‘rish mumkin. Xususan, har bir qatorning yuqori qismidagi quyuq qora dog‘lar plazmidaga tegishli bo‘lsa, pastdagi xira dog‘lar – kassetaga tegishli dog‘ ekanini anglatadi. Demak, olingan natijalarni tahlil qilish asnosida avvalgi bosqichda tuzilgan “vektor kasseta plazmidaga joylashgan” degan xulosaga kelish mumkin.

Shundan kelib chiqqan holda tadqiqotlarning keyingi bosqichida o'zida rekombinant plazmida tutgan agrobakteriyalarni g'o'zaning kallus to'qimasiga transformatsiyalash ishlari amalga oshirildi.

**Transformant bakteriyalarni g'o'za kallus to'qimasiga kiritish.**

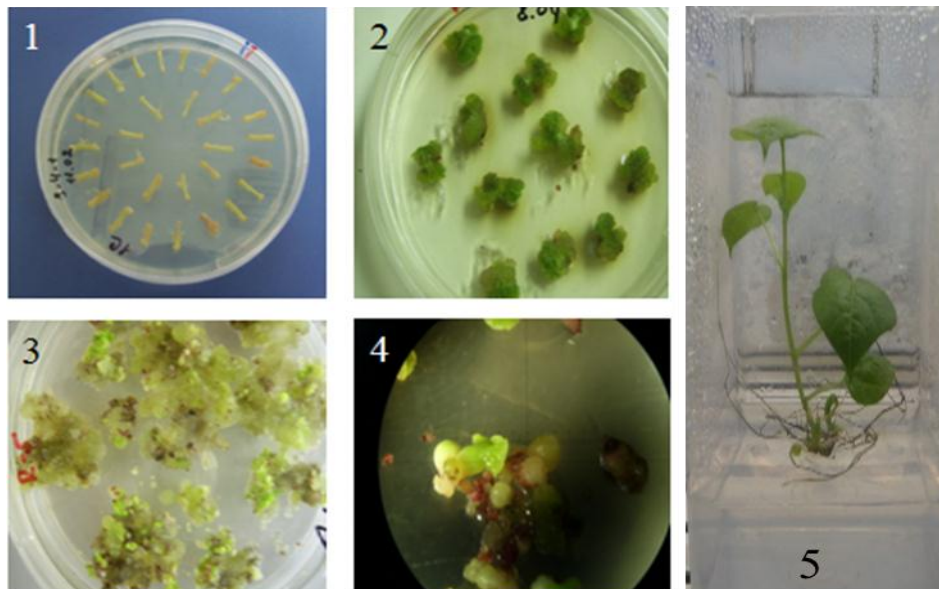
Ushbu vazifani bajarishdan maqsad o'zida rekombinant plazmida saqlagan transformant bakteriyalarni g'o'za o'simligining kallus to'qimasiga kiritishdan iborat bo'lib, uning natijasida bakteriyadagi rekombinant plazmida g'o'zaning DNKsi bilan integratsiyalashadi va o'zidan kichik interferensiyalovchi RNK (siRNA) larni ekspressiya qilishni boshlaydi. Natijada, g'o'zada fitoxrom oqsili translyatsiya bosqichida sintez bo'lmasligiga, ya'ni *PHYA1* genining mRNKsi plazmidadagi kassetadan transkripsiya bo'lib chiqayotgan siRNA tomonidan supressiyaga uchratilishiga olib keladi.

Demak, transformant bakteriyalarni g'o'za o'simligining kallus to'qimasiga kiritish uchun "Coker-312" liniyasi g'o'za chigiti 6% agarli ozuqaga ekildi va 28<sup>0</sup>C haroratda, 3 kecha-kunduz mobaynida qorong'u xonada saqlandi. Belgilangan muddat o'tgandan so'ng ozuqaga ekilgan chigitlar yorug' xonaga olib o'tildi. Natijada 7-8 kunlik o'simalardan gipokotellar kesib olindi (9-1 rasmga qaralsin).

So'ng gipokotellarni R1 ozuqaga o'tkazildi va ularning xar ikki uchiga 5 mkl bakteriyaning suspenziyasidan tomizilib, 22<sup>0</sup>C xaroratda, 3 kecha-kunduz mobaynida qorong'u xonada saqlandi. Belgilangan muddat o'tgandan so'ng bakteriya bilan zararlantirilgan gipokotellarni seleksiya qiluvchi antibiotikli kanamitsin (50mg/l) va sefabol (500 mg/l) R1 ozuqasiga o'tkazildi va yorug'lik kuchi oshirildi. Natijada 3 hafta o'tgandan so'ng, uzunligi 3 mm bo'lgan kalluslarni o'zida R1 ozuqasi tutgan boshqa idishga ko'chirildi.

Undan so'ng R1 ozuqasida 20-25 kun davomida saqlangan kalluslar embriogenezni rivojlantirish uchun modifikatsiya qilingan R5 ozuqasiga o'tkazildi (9-2 rasmga qaralsin). Ushbu ozuqada embrionlar 12-16 hafta mobaynida rivojlanib ko'paygandan so'ng 9-3 rasmda ko'rsatilgan holatga o'tdi.

Soʻngra, 16-haftada embrioidlar ER ozuqasiga koʻchirilishi natijasida unda ohista barg va ildiz hosil boʻlish jarayoni kuzatildi (9-4 rasmga qaralsin). Nihoyat, ildizi va bargi yaxshi shakllangan oʻsimtalar konteyner idishga quyilgan SH-3 ozuqasiga oʻtkazildi (13- rasmga qaralsin).



**13-rasm.** pHALLSGATE-8 vektorini bilan transformatsiya qilingan transgen gʻoʻza oʻsimligi. 1-transformatsiya qilingan gipokotel; 2-kallus toʻqimalari; 3-transgen embrioidlar; 4-shakllanayotgan oʻsimliklar; 5-transgen regenerat.

Demak, ushbu vazifani bajarish jarayonida gʻoʻzaning gipokotel holidan to transgen yetuk oʻsimlikni yetishtirishgacha boʻlgan barcha jarayonlar amalga oshirildi.

### **3.2. Gen-nokaut liniyalaridagi tola sifat belgilarini mahalliy navlarga introgressiya qilish.**

Tadqiqotlar davomida olingan “T2\_1-7”, “T2\_31\_10” va “T2\_47\_3” biotexnologik gʻoʻza genotiplaridagi tola sifat belgilarini mahalliy navlarga oʻtkazish maqsadida C-4727, Buxoro-6 va Mexnat gʻoʻza navlari bilan oʻzaro duragaylandi.

*PHYA<sub>1</sub>* geni nokaut qilingan oʻsimliklar bilan mahalliy navlarning oʻzaro duragaylanishidan olingan oʻsimliklar genomida gen konstruksiyasi mavjud yoki yoʻq ekanligini PZR tahlili asosida aniqlandi.

Buning uchun duragaylarning barg to'qimalaridan CTAB usuli yordamida genom DNK ajratib olindi va elektroforez usulida DNK ning sifat va miqdori aniqlandi (14-rasmga qaralsin).



**14-rasm.** DNKni samarali ajratilganini tasdiqlash uchun o'tkazilgan elektroforez.

Gel tasviri olingandan so'ng ko'ringan dog'lar DNK borligini bildiradi.

Undan so'ng ajratilgan DNKlarga quyidagi praymerlar asosida Polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) tahlili amalga oshirildi:

35S-F → 5'-GTTTCATTTTCATTTGGAGAGG-3'

PDK-R → 5'-CGCATATCTCATTAAAGCAG-3'

PZR reaksiyasi quyidagi moddalar ishtirokida amalga oshirildi:

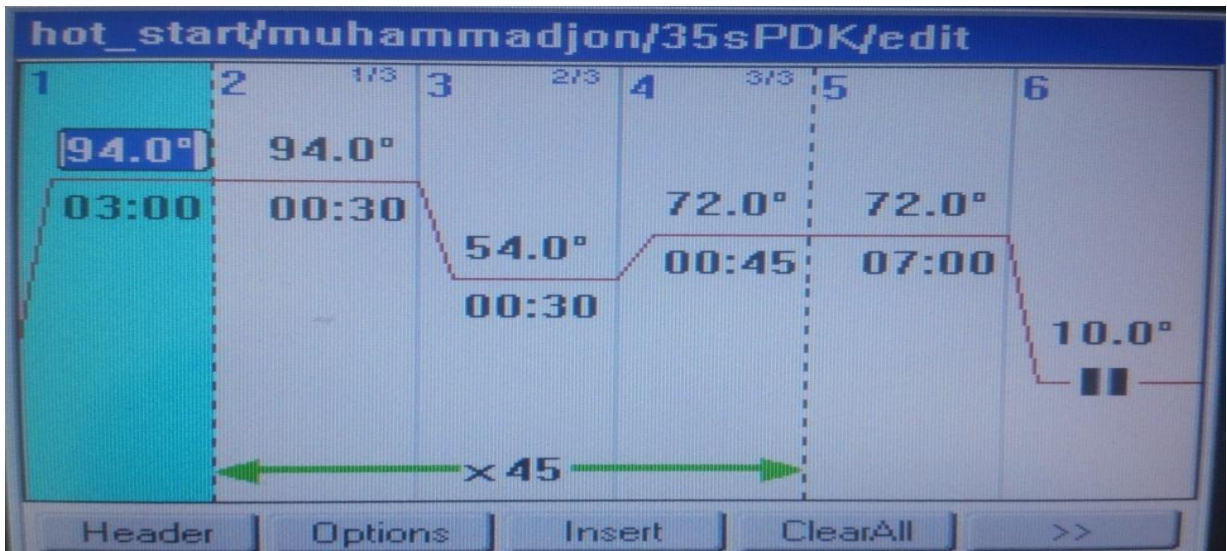
DNK, 2,5 mkl 1.5mM MgCl<sub>2</sub> li 10xPZR bufer, 1 mkl BZA (buqa zardobi albumini), 0,2 mkl dNTF (dezoksinukleintrifosfatlar) (tarkibida 25 mMdan har bir dNTF (dGTF, dTTF, dSTF, dATF) mavjud), 5 pikomol/mkl praymer (RNAi vektor-spetsifik 35S-F/PDK-R juft praymerlar), 0,2 mkl Taq polimeraza, 25 mklgacha suv bilan to'ldirilgan.

Reaksiya sharoiti esa quyidagicha belgilandi:

1-sikl - 94<sup>0</sup>S, 3 min

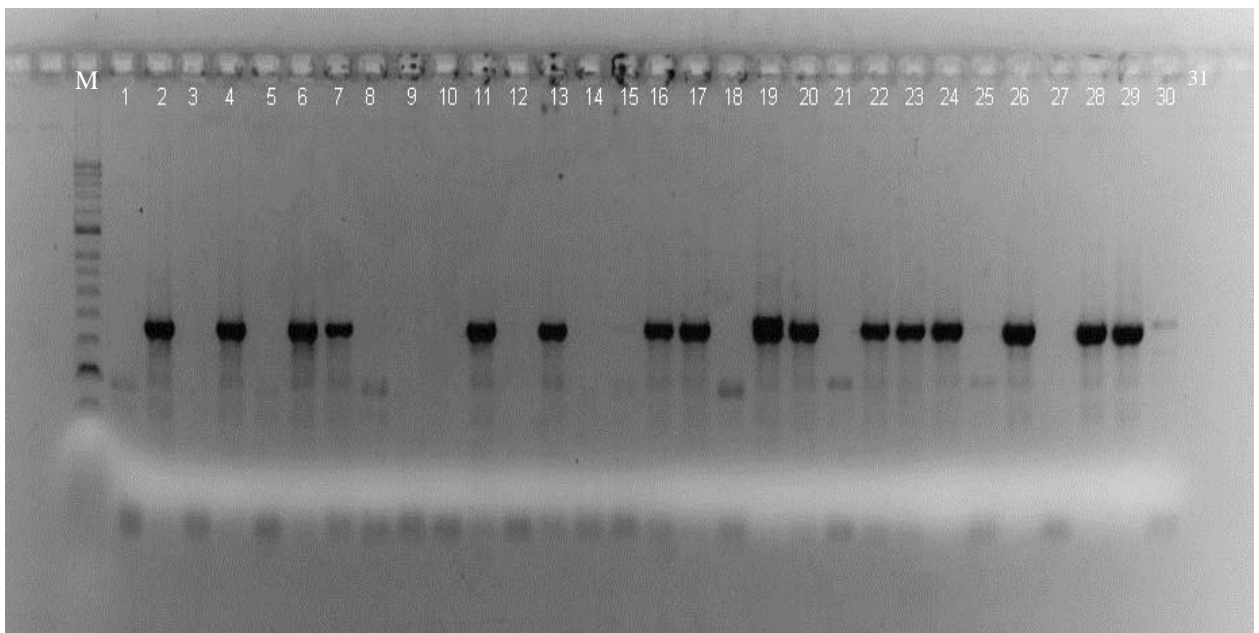
Keyingi 45ta sikl – 94<sup>0</sup>C, 30 sekund; 54<sup>0</sup>C, 30 sekund; 72<sup>0</sup>C, 45 sekund

Oxirgi sikl - 72<sup>0</sup>S, 7 min.



**15-rasm.** PZR borishida zarur harorat va vaqtning korsatilishi.

PZR reaksiyasi DNKdagi kassetani ko‘paytirib beradi. Olingan mahsulotni esa 2%li agarozaga geli (2% li agarozaga geli, 0,5% li TBE bufer - 45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.0) da elektroforez o‘tkazib tasdiqlab oldik. Agarozaga geli etidium bromid bilan bo‘yaldi.



**16-rasm.** *PHYA1* geni nokaut bo‘lgan liniyalar va mahalliy navlarimizni o‘zaro duragaylashdan olingan yangi biotexnologik liniyalar gel-elektroforegrammasi.

Bu rasmda *PHYA1* geni nokaut bo‘lgan liniyalar bilan mahalliy navlarimizni o‘zaro chatishtirilishidan olingan yangi biotexnologik liniyalarda PZR o‘tkazilib o‘zida *pHallsGate-8\_PHYA1* gen konstruksiyasini tutgan o‘simliklarni genotiplash jarayoni keltirilgan. 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 17, 19, 20,

22, 23, 24, 26, 28 raqamlar ostidagi namunalar o'zida *pHallsGate-8\_PHYA1* gen konstruksiyasini tutganligi sababli bu o'simliklar keyingi tadqiqotlarimiz uchun tanlab olinadi. 1, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 18, 21, 25, 27 namunalarda esa yuqoridagi gen konstruksiya segeregatsiyaga uchragan va bu o'simliklar tadqiqotlarimiz uchun o'z ahamiyatini yo'qotadi.

Nokaut o'simliklarning ajratilgan DNKsi uchun 35S-F vaPDK-R praymerlari bilan o'tkazilgan PZR natijalarini elektroforezda ko'rinishi.

M - marker

1-28 - nokaut o'simliklar DNKsi

29 - "*PHYA<sub>1</sub>*" plazmidasi

30 - nazorat

31 - DNKsiz PZR aralashmasi

Har bir qatorning quyi qismida ko'ringan quyuq dog'lar kiritilgan konstruksiyaga tegishli bo'lsa, yuqori qismidagi xira ko'rinayotgan dog'lar aynan DNKning o'zi. Demak, har bir qatorda 2 tadan dog' hosil bo'lishi PZR reaksiyasini amalga oshishgani ko'rsatsa, o'z navbatida bu natija *PHYA<sub>1</sub>* geni nokaut qilingan o'simliklar bilan mahalliy navlarimizning o'zaro chatishtirilishidan olingan liniyalarda haqiqatan biz kiritgan konstruksiya borligini isbotidir. Shundan so'ng mahalliy navning genomini tiklash maqsadida qayta chatishtirish (Becross) amalga oshirildi va becross qilish BC2 ga qadar 3 marta davom ettirildi.

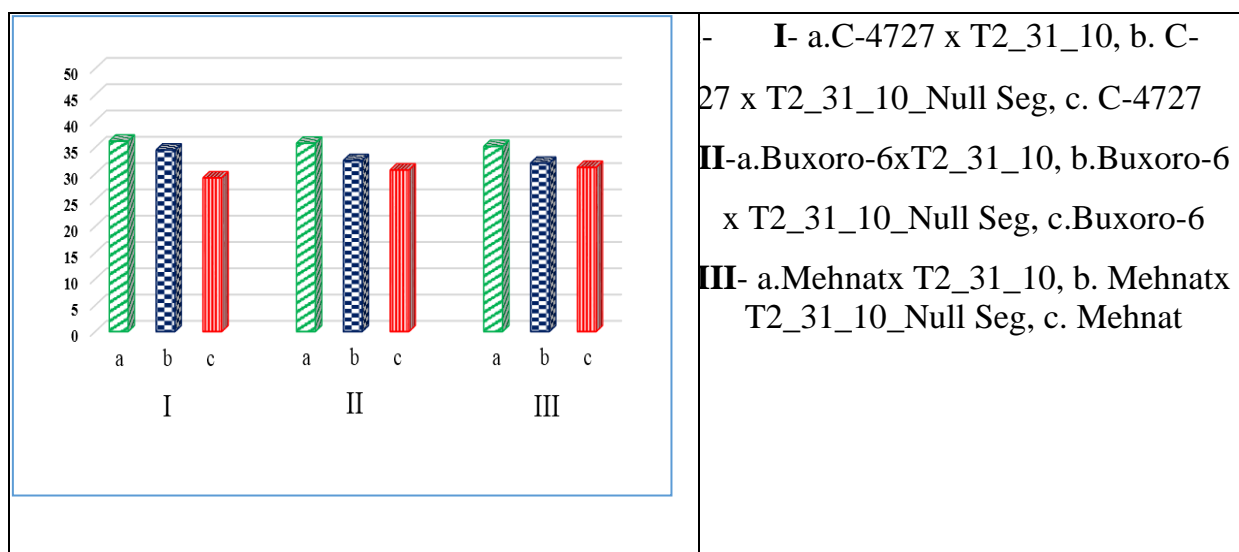
### **3.3. Yaratilgan bekkross duragaylarida tola sifat ko'rsatkichlarining tahlili**

Donor va retsipient namunalarnio'zaro duragaylashdan olingan BC2F1 avlod o'simlik namunalari va nazorat namunalari sifatida esa donor va resipient o'simliklari markaz maxsus urug'chilik xo'jaligiga tasodifiy (Randomizatsiya) takror usulida 3 ta biologik va 3 ta texnik takrorlarda ekildi. Donor va resipient hamda olingan gibridlarning asosiy tola sifat ko'rsatkichlari Respublika "SIFAT" markazida aniqlandi. Buning uchun 3 ta biologik takrorlarda ekilgan

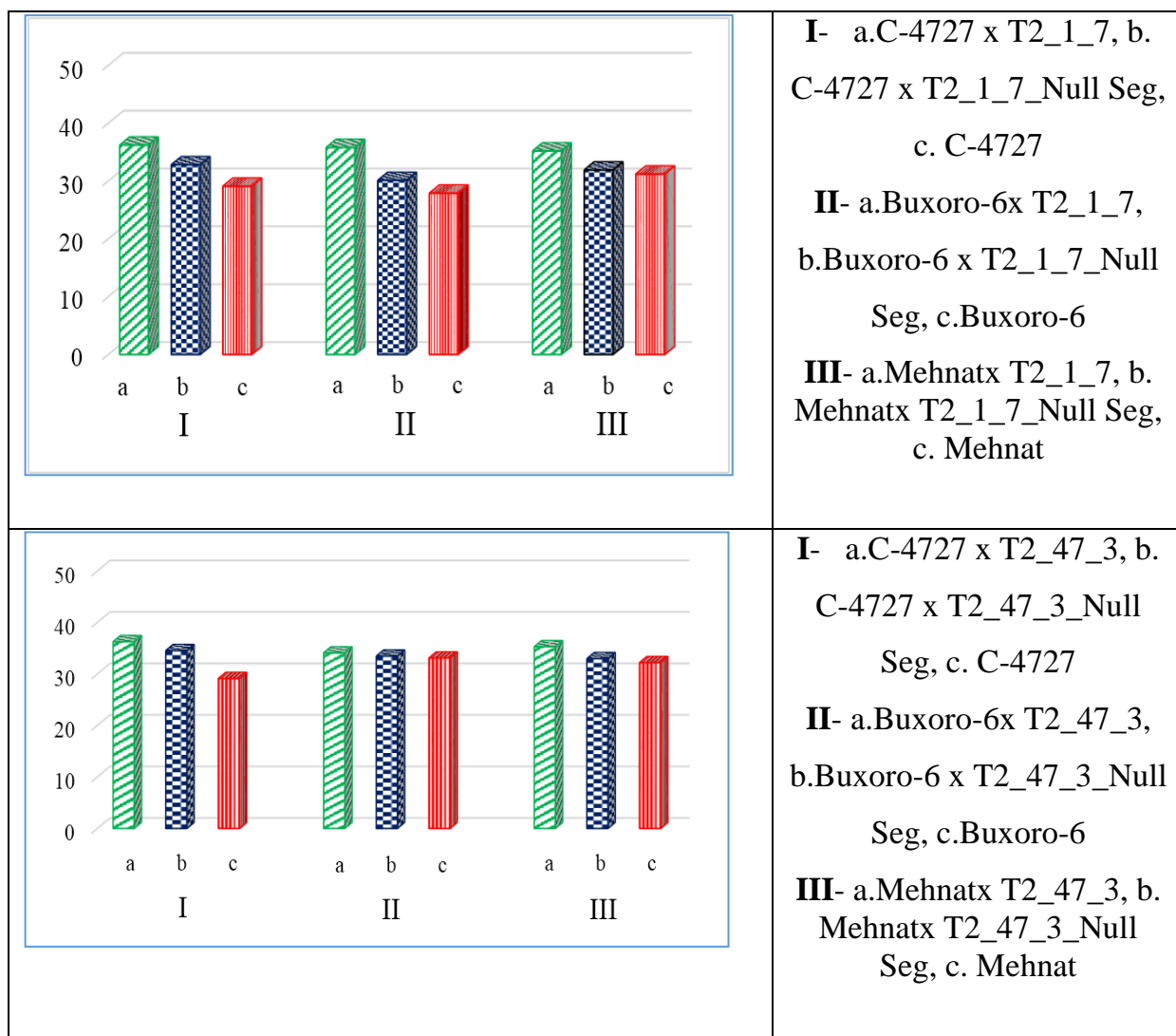
BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>o‘simliklaridan yig‘ib olingan hosilni laboratoriyada og‘irliklari o‘chandi va “DL-20” rusumli jinlash uskunasida yordamida jinlandi (tolasi chigitidan ajratib olindi). Shundan so‘ng, namunalar Respublika “SIFAT” markazi laboratoriyasiga jo‘natildi. “SIFAT” markazida asosan tolaning pishiqligi (Str),uzunligi (Len),mikroneyri (Mic),birxilliligi (Unf),elongatsiyasi (Elg),sariqlik darajasi (+b)hamda yaltiroqlik darajasi koeffisienti (Rd)kabi belgilari o‘rganildi.Biz tadqiqotlarimizda tolaning asosiy ko‘rsatgichlari hisoblangan pishiqlik(Str),uzunlik(Len) va tola elongatsiyasi (Elg) kabi ko‘rsatgichlari ustida statistik va matematik tahlillar olib borildi.

### 3.3.1 Tolaning pishiqlik (Str) ko‘rsatgichining tahlili

Yaratilgan BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> genotiplarida tola sifat ko‘rsatkichlari bo‘yicha xilma-xillikni baholash, shuningdek, ularni stabillik darajasini aniqlash bir omilli dispersion statistic tahlil GLM (- General Linear Model – umumiy chiziqli model) va ANOVA (One-Way Analysis of Variance) komandalaridan foydalanib amalga oshirildi. Buning uchun donor va resipient o‘simliklar markaz tajriba maydonida 3 ta biologik va 3 ta texnik takrorlarda ekilgan o‘simliklarning hosili yig‘ib olindi hamda respublika “SIFAT” markaziga jo‘natildi.Tahlillar har bir duragay kombinatsiyalarda tolaning ayrim sifat belgisi bo‘yicha o‘tkazildi.





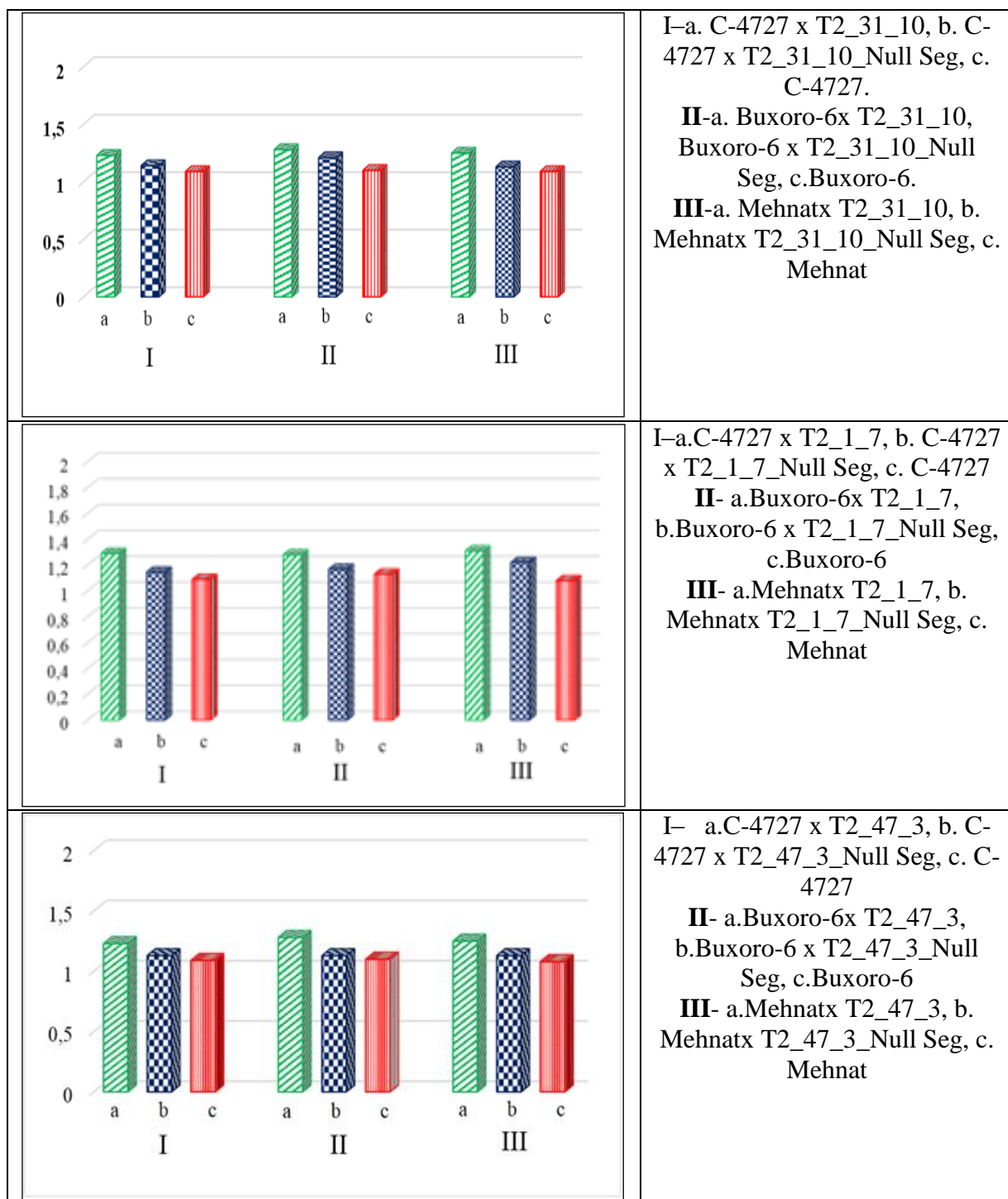


**17-rasm.** Tolaning pishiqlik ko'rsatkichlari

Tahlil natijalariga ko'ra yaratilgan BC2F1gen-nokaut o'simliklar tolasining pishiqligi resipient sifatida tanlangan mahalliy navlari (C-4727, Buxoro-6, Mehnat) ning tola pishiqligiga nisbatan yuqori ekanligi yani C-4727, Buxoro-6, Mehnat navlaritolasining pishiqligi mos ravishda 34.5, 32.5, 32 hamda ularning gen-nokaut o'simliklari bilan hosil qilingan gibrud o'simliklarda esa ushbu ko'rsatgich mos ravishda 36.2, 35.8 va 35.2 ekanligi aniqlandi. Tahlillarda nazorat namuna sifatida gen-nokaut va mahalliy navlarning o'zaro chatishtirilishidan olingan va keyingi avlodda aynan shu belgi bo'yicha segeregatsiyalangan yani o'zida o'zida *pHallsGate-8\_PHYA1*gen konstruksiyasini tutmagan (Null Gibrud) o'simliklarining tola sifat belgilari ham o'rganildi. Yaratilgan gibrud namunalardagi tolaning pishiqligi somatik

embriogenezning yoki somatik embriogenezda kallus olish uchun foydalanilgan C-312 navidan irsiylanmayotganligi aniqlandi yani ushbu null gibridlarda tolaning pishiqligi mos ravishda 29,2; 29,2 va 31,2 ga pasayganligi kuzatildi. (17-rasmga qaralsin)

### 3.3.2 Tolaning uzunligi (Len) ko'rsatgichining tahlili

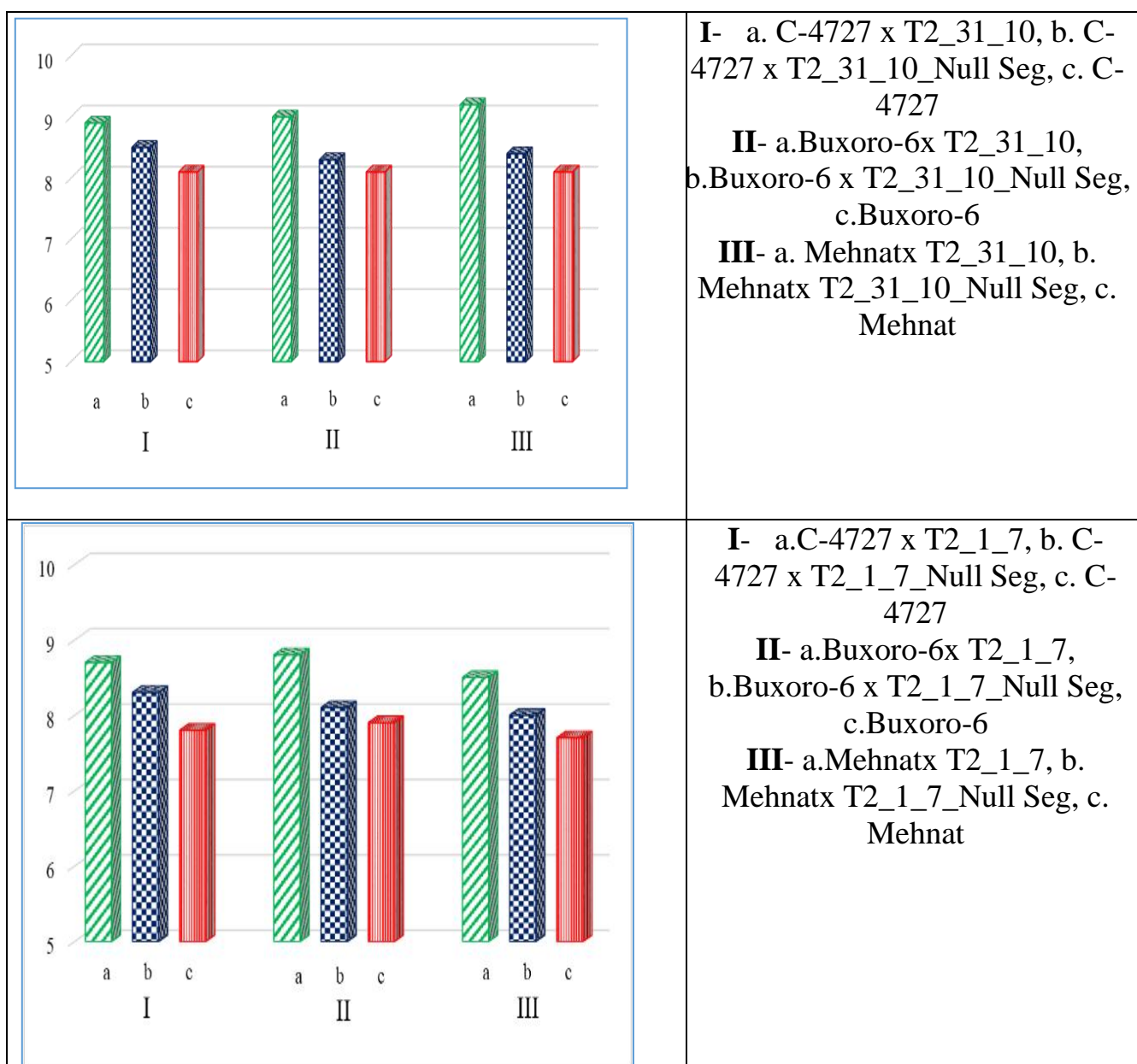


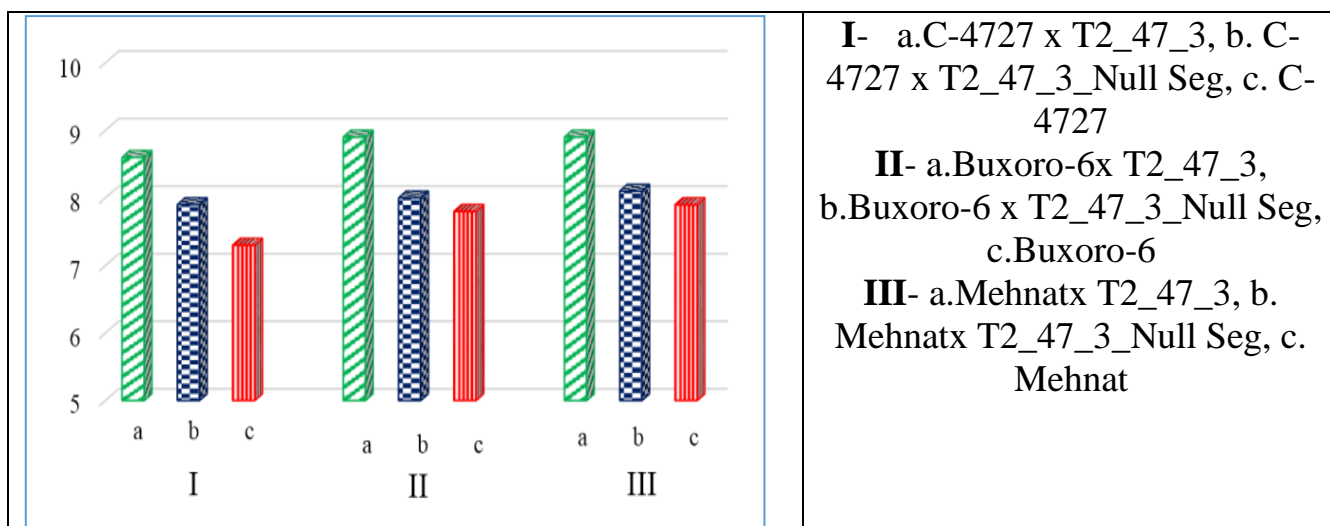
18-rasm. Tolaning uzunlik ko'rsatkichlari

Statistik tahlillar tolaning uzunligi belgisi bo'ycha ham o'rganildi va o'zaro karrelyatsiyalari aniqlandi.

Tola uzunligi tola pishiqligi bilan o'zaro ijobiy karelyatsiyasi borligi aniqlandi. Yaratilgan BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> genotiplarida tolaning uzunliklari o'rtacha 1.14, 1.28 va 1.25 dyum nazorat namunalarda esa o'rtacha 1.09 dyum ekanligi kuzatildi.

### 3.3.3 Tolaning elongatsiyasi (Elg) ko'rsatgichining tahlili





**19-rasm.** Tolaning elongatsiyasi ko'rsatkichlari

Yaratilgan biotexnologik liniyalarning tola elongatsiyasi C-4727 x T2\_31\_10 liniyasida resipient (T2\_31\_10, T2\_1\_7 va T2\_47\_3) hamda donor (C-4727, Buxoro-6 va Mehanat) namunalariga qaraganda yuqori ekanligini ko'rishimiz mumkin. Polimeraza zanjir reaksiyasida o'zida *pHallsGate-8\_PHYA1* gen konstruksiasini tutmagan genotiplarning tola uzunliklari tahlil qilinganda o'rtacha 8.1 ekanligi aniqlandi.

### 3.4. Bekkross duragaylarining morfo-biologik xususiyatlarini tahlil qilish

Tadqiqotlarimizda yaratilgan bekkross liniyalarning morfo-biologik xususiyatlari ham o'rganildi. Buning uchun tajriba maydonida ekilgan liniyalar vegetatsiya davrining nihollik, shonalash, gullash, ko'saklash va pishib etilgan bosqichlarida fenologik kuzatuvlar olib borildi va ayrim xo'jalik va biologik belgilari o'rganildi.

“hs” bu ko'rsatgich go'zaning ertapishar yoki kech pishar ekanligini belgilovchi ko'rsatgich bo'lib, bunda go'za nihollarining ildiz bo'g'zidan to birinchi hosil shohigacha bo'lgan kurtaklar sanaladi va ushbu kurtaklar soninig ko'p bo'lishi ushbu g'o'za liniyalarining kechpishar ekanligini va aksincha kam bo'lishi esa ertapishar ekanligini bildiradi. Tanlangan donor va resipient liniyalardagi “hs” ko'rsatgichi qayd etib borildi hamda olingan bekkross

liniyalarga nisbatan 1-2 ta kurtakga ko'p ekanligi aniqlandi. Bu esa ushbu liniyalarning 3-8 kunga ertapishar ekanligini bildiradi.

O'suv shoxi– (monopadial); O'suv shoxi bosh poyaning quyi qismidan, bargning qo'ltiq kurtagidan bosh poyaga nisbatan o'tkir burchak yasab, o'sish kurtagining rivojlanish hisobiga uzluksiz o'saboradi. O'sish xarakteriga ko'raegri-bugri bo'lmay to'g'ri o'sadi, bosh poyani eslatadi, undan hosil shoxlari ham paydo bo'lib, hosil beradi. Donor genotip sifatida tanlangan C-4727, Buxoro-6 va Mehnat navlaridagi o'suv shoxlari tahlil qilinganda Buxoro-6 va Mehnat navlarida C-4727 naviga nisbatan o'rtacha 2 ta ga ko'p ekanligini ko'rsatdi. C-312 navida esa 2-3 ta o'suv shoxlari mavjudligi aniqlandi.

BC2F1 avlodli genotiplardagi o'suv shoxlari donor genotip sifatida tanlangan navlarga yaqin ekanligini ko'rsatdi.

Hosil shoxi bosh poyadan o'suv shoxiga qaraganda kengroq burchak hosil qilib chiqadi. Hosil shox ham bosh poyaning barg qo'ltig'ida joylashgan kurtakdan chiqib, uchida gul-kurtak hosil etish bilan o'sishdan to'xtaydi, mana shu gul-kurtak yonida barg ham paydo bo'ladi. Shu barg qo'ltig'idagi kurtaklardan biri o'sib, ikkinchi bo'g'im oralig'ini (pog'onani) vujudga keltiradi, bu ham gul-kurtak va barg bilan tugallanadi va hakoza. Shunday qilib, hosil shoxi ketma-ket paydo bo'lgan birnecha kurtakdan vujudga keladi va ko'p pog'onali bo'ladi. Gen-nokaut liniyalarining hosil shoxlari 13-17 ta gacha bo'ladi. Hosil shoxlarining qisqa-uzunligi irsiy belgi bo'lib, g'o'za tupining g'uj yoki tarvaqaylab o'sishini belgilaydi. Shoxlar tarvaqaylab o'sganda qator oralarini ishlashni va hosilni terishni qiyinlashtiradi, shoxlar g'uj o'sgan taqdirdagina bu jarayon osonlashadi.

O'simliklar shonalash davrida jami uch marta 1, 6 va 12 kunlari shonalarning soni qayd etib borildi va tahlillar o'tkazilganda olingan gen-nokaut liniyalarda shonalar soni va shonalashning erta ekanligi o'rganildi. Ko'saklar pishib yetilganda har bir liniyadan 25 ta dan ko'saklar yig'ib olinda va

laboratoriyada xo'jalik va sifat belgilarini aniqlash maqsadida tahlillar olib borildi.

Dastavval terib olingan chanoqlar tarozida tortildi va nazorat namunalari bilan solishtirildi. C-4727, Buxoro-6, Mehnat va C-312 navlari mos ravishda 142,5 (har bir chanoqdagi paxta og'irligi o'tracha 5,7); 170,2 (6,8); 152,5 (6,1); 130 (5,2) ni olingan beccross liniyalarda esa ushbu ko'rsatkich donor genotiplarga yaqinroq ekanligi yani T2\_1\_7, T2\_31\_10 va T2\_47\_3 liniyalari hamda C-4727 navini o'zaro chatishtirilishidan olingan liniyalarda mos ravishda 135 g.; 135g.; va 137,5 g. nitashkil etdi. Xuddi shunday Buxoro-6 va Mehnat navlari bilan chatishtirib olingan gen-nokaut liniyalarda C-312 naviga yaqinlashganligi aniqlandi.

Shundan so'ng tolaning shtapel uzunliklarini aniqlash maqsadida har bir namunadan 5 tadan tolali chigitlar tanlab olinib seleksion doskalarda taraldi va o'lchandi. Tola va chigit chiqimlarini aniqlash maqsadida "DL-20" jinlash uskunasida namunalar jinlandi va mahsulot chiqimlari tarozida o'lchanib ularning ulushlari aniqlandi. Tahlil natijalari 9-jadvalda keltirilgan.

Olingan natijalar shundan dalolat beradiki, aksariyat duragay kombinatsiyalarining 1000 ta chigit og'irligining o'rtacha ko'rsatkichlari Mehnat bilan Coker-312 navlarining ko'rsatkichlariga yaqin bo'lgan.

Tola chiqimining ko'rsatkichlari esa duragay va nav o'simliklarda faqat 1-2 % ga gina farq qiluvchi ko'rsatkichlarga ega.

Nav va duragay o'simliklarning chigit chiqimining o'rtacha qiymatlari o'rtasidagi farq 2-3 % nitashkilettdi.

Tolaning shpatel uzunligi o'rtacha ko'rsatkichlari asosan T2-1-7 x C-47-27 duragay kombinatsiyada  $36,1 \pm 0,23$  sm ni tashkil etgan holda qolgan duragay o'simliklarda bu ko'rsatkich 1-2 sm ga yuqori bo'ldi. Boshlang'ich nav o'simliklarning tola uzunliklari esa Coker-312 dan tashqari past bo'lib 34-35 sm dan oshmadi. Demak, bu belgi bo'yicha duragay o'simliklarda geterozis hodisasi kuzatildi.

Nav va duragay o'simliklarning ayrim xo'jalik belgilariga ko'ra tavsifi

Tanlangan donor va resipient genotiplar nomi	1000 ta chigit vazni (g)	Tola chiqimi $x \pm m$ $x(\%)$	Chigit chiqimi (%)	Tolaning shtapel uzunligi (sm)
T2_31_10 x C-4727	124,4 $\pm$ 2,76	33,2 $\pm$ 0,39	63,2 $\pm$ 2,14	37,2 $\pm$ 0,51
T2_31_10 x Buxoro-6	118,5 $\pm$ 3,55	35,3 $\pm$ 0,61	61,8 $\pm$ 1,97	39,3 $\pm$ 0,34
T2_31_10 x Mehnat	130,3 $\pm$ 2,81	35,1 $\pm$ 0,52	62,3 $\pm$ 2,88	38,2 $\pm$ 0,50
T2_1_7 x C-4727	119,4 $\pm$ 3,11	33,3 $\pm$ 0,54	62,7 $\pm$ 1,96	36,1 $\pm$ 0,23
T2_1_7 x Buxoro-6	113,2 $\pm$ 2,92	34,4 $\pm$ 0,37	63,3 $\pm$ 2,34	38,4 $\pm$ 0,45
T2_1_7 x Mehnat	136,1 $\pm$ 3,22	34,2 $\pm$ 0,41	60,5 $\pm$ 2,16	38,4 $\pm$ 0,55
T2_47_3 x C-4727	124,5 $\pm$ 3,35	33,1 $\pm$ 0,90	63,1 $\pm$ 2,23	37,2 $\pm$ 0,45
T2_47_3 x Buxoro-6	119,5 $\pm$ 2,78	35,3 $\pm$ 0,99	60,4 $\pm$ 2,45	38,2 $\pm$ 0,24
T2_47_3 x Mehnat	131,4 $\pm$ 2,88	34,4 $\pm$ 0,86	62,7 $\pm$ 2,43	38,2 $\pm$ 0,33
C-4727	120,2 $\pm$ 2,97	34,3 $\pm$ 0,40	64,5 $\pm$ 2,22	34,5 $\pm$ 0,49
Buxoro-6	113,5 $\pm$ 3,11	36,4 $\pm$ 0,38	61,3 $\pm$ 2,67	34,5 $\pm$ 0,39
Mehnat	131,2 $\pm$ 2,85	35,4 $\pm$ 0,51	61,4 $\pm$ 2,81	35,5 $\pm$ 0,58
Coker-312	137,3 $\pm$ 2,93	34,5 $\pm$ 0,39	62,9 $\pm$ 2,85	37,2 $\pm$ 0,45

Olingan ma'lumotlar ANOVA statistik dasturlari yordamida to'g'ri chiziqli va dispersion tahlillar qilindi. Yaratilgan BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> o'simliklarining tola uzunliklari nazorat namunalarning tola uzunliklardan uzun ekanligi yuqoridagi tahliliy kompyuter dasturlari orqali aniqlandi.

### **III Bob bo'yicha xulosalar**

Tadqiqotlarimizda gen-nokaut texnologiyasi usuli yordamida olingan g'ozalar liniyalaridagi qimmatli xo'jalik belgilarini mahalliy navlarga o'tkazish orqali yuqori iqtisodiy samaradorlikka erishish va o'tqazilayotgan belgining ishonchliligini zamonaviy biotexnologik usullar bilan aniqlashdan iborat. Tadqiqotlarimiz natijasida mamlakatimiz g'ozalar ekin maydonlarining katta qismiga ekib kelinayotgan C-4727, Buxoro-6 va Mehnat navlarining tola sifat ko'rsatkichlari hamda agronomik belgilari yaxshilangan liniyalarining olinishiga erishildi, xususan g'ozalarda agronomik muhim belgilarga bog'langan gen vazifasini yuqori aniqlikda tartibga solishda yordam berdi. Bunday samarali gen-nokaut texnologiyasini har qanday gulli o'simliklar va ekinlarga qo'llash oson. Qiziqtirgan har qanday genni "sis gen" (o'simliklarning o'z genlari asosida o'chirish) bilan manipulyasiya qilish genlar faoliyatini yuqori aniqlikda boshqarishda va yangi biotexnologik ekinlar olishda, shuningdek, tabiat va uning ekologik xavfsizligini saqlashda katta ahamiyatga ega.

Tadqiqot materiallarida dastavval urug'larning unuvchanligi, "HS" yani ildiz bo'g'zidan birinchi hosil shohigacha bo'lgan masofa, birinchi shona, shonalar soni, gullar soni, ko'saklar soni kabi biologik belgilari o'rganildi va o'zaro solishtirildi. Undan tashqari monopodial shox, simpodial shox, shoxlanish tipi, burglar shakli va rangi, poya shakli, rangi va tuklanishi kabi morfologik belgilari o'rganildi. Dissertatsiya ishidan maqsad mahalliy navlar genomini tiklagan holda ularning tola sifat belgilarini yaxshilash ko'zda tutilgan bo'lib, bu liniyalarni o'zaro chatishtirishdan oldin ulardagi tola ko'rsatkichlari ham o'rganildi.



## XULOSALAR

1. Dala tajriba maydonida o'zaro chatishtirish uchun ekilgan C-4727, Buxoro-6 va Mehnat hamda gen-nokaut T2-1-7, T2-31-10 va T2-47-3 liniyalarining morfobiologik xususiyatlari vegetatsiya davrida qayd etib borildi va o'rganildi. Olingan natijalar haqiqatdan ham *PHYA1* geni nokaut bo'lgan biotexnologik liniyalarda hosil elementlari soni, hosil shoxlari soni mahalliy navlar ko'rsatgichlaridan yuqori ekanligi aniqlandi.

2. Tadqiqot liniyalar gullash fazasida bir-biri bilan o'zaro chatishtirildi va  $F_0$  duragay namunalari markaz fitatronida rivojlantirildi. Nihollardan genom DNK ajratilib o'zida *pHallsGate-8\_PHYA1* gen konstruksiyasini tutgan o'simliklar genotiplandi va gullash davrida mahalliy navlar bilan qayta chatishtirildi. Genotiplash natijalari belgilarni 1/1 (50/50 %) ajralishi kuzatildi. BC1 duragay namunalari dala tajriba maydoniga ekildi va donor genotipning genomini tiklash uchun qayta chatishtirildi.

3. Statistik va tahliliy tadqiqotlar o'simliklarning BC2F1 duragay namunalari olib borildi. PZR natijalariga ko'ra BC2F1 o'simliklarida mahalliy navlar genomi 75% ga tiklanganligi aniqlandi va bu morfobiologik ko'rsatgichlarni solishtirish davomida ham aniqlandi.

4. Yaratilgan BC2F1 liniyalarida *pHallsGate-8\_PHYA1* genining ekspressiyasi va gen-konstruksiyasining miqdori kabi ko'rsatgichlar aniqlandi. Zamonaviy biotexnologiyaning molekulyar usullardan va LightCycler-480 II, 7500 RealTime PCR System va 3130xl Genetic Analyzer kabi uskunalari yordamida kiritilgan gen kassetasini mavjudligini va miqdorlarini aniqlashga muvofiq bo'lindi.

5. Biotexnologik liniyalardan nihollik davrida ulardan CTAB usulida genom DNK lar ajratib olindi. Ajratilgan DNK namunalari sifatini va miqdorlari NanoDrop-2000 usulasida o'lchanib, ularga PZR o'tkazildi. Amplifikatsiyalangan *PHYA1* geni agaroz gelida elektroforez usulida elektr toki ta'sirida harakatlantirildi. Agaroz gelida harakatlangan *PHYA1* geni Alga

Imager uskunasida rasmga olinib va molekulyar og'irliklariga qarab genotiplandi.

6. O'simlik hayoti uchun muhim hisoblangan fitoxrom genlari faoliyatini yangi zamonaviy gen-nokaut, sintetik RNAi dupleks texnologiyalari orqali o'rganish, ular faoliyatini boshqara olish imkonini beradi va bu orqali o'simlikdagi ijobiy belgilarni yuzaga chiqarish mumkin.

## FOYDALANILGAN ADABIYOTLARRO‘YXATI

1. Abdurakimov A.A, Abdurakhmonov I.Y, Buriev Z.T, Bozorov T. 2011. Small interfering RNA (siRNA) for knocking down gene expression in plant cells. Uzbekistan patent IAP 04300, IAP 04360, IAP 04361, IAP 04383. Official bulletins of State Patents #2 and 6, 2011.

2. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., A. Abdurakimov A., Pepper A.E., Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. Nature communications, 2014.

3. Abdurakhmonov I.Y, Buriev Z.T, Abdurakimov A.A, and Pepper A.E., Molecular Cloning and characterization of phytochrome gene family in cotton (*Gossypium* spp.). Plant and Animal Genome Conference XIV, January 14-19, San Diego, California. W159, 2006.

4. Abdurakhmonov I.Y, Buriev Z.T, Saha S, Jenkins J.N, Abdurakimov A, Pepper A.E. 2014. Cotton PHYA1 RNAi enhances major fiber quality and agronomic traits of cotton (*Gossypium hirsutum* L). Nature Communications 4:3062; DOI:10.1038/ncomms4062.

5. Abdurakhmonov I.Y, Buriev Z.T, Logan-YOung CJ, Abdurakimov A, Pepper A.E. 2010. Duplication, divergence and persistence in the Phytochrome photoreceptor gene family of cottons (*Gossypium* spp.). BMC Plant Biol. 10:119.

6. Andres F., Galbraith D., Talon M, Domingo C., (2009) Analysis of photoperiod sensitivity sheds light on the role of phytochromes in photoperiodic flowering in rice. Plant Physiol. 151, 681–690.

7. Bae G, Choi G (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. Annu. Rev. Plant Biol. 59, 281–311.

8. Biehle K, Haupt S, Beckmann J, Fock H, Becker T (1997) Simultaneous CO<sub>2</sub>- and 16O<sub>2</sub>/18O<sub>2</sub>-gas exchange and

fluorescence measurements indicate differences in light energy dissipation between the wild type and the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato during water stress. *J. Exp. Bot.* 48, 1439–1449

9. Brock M.T, Maloof J.N, Weinig C., (2010) Genes underlying quantitative variation in ecologically important traits: PIF4 (phytochrome interacting factor 4) is associated with variation in internode length, flowering time, and fruit set in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Ecol.* 19, 1187–1199.

10. Carvalho R., F, Takaki M., Azevedo R., A (2011a) Plant pigments: The many faces of light perception. *Acta Physiol. Plant.* 33, 241–248.

11. Chentao Lin, Photoreceptors and regulation of Flowering Time. *Plant Physiology*, 2000.

12. Datta S, Johansson H, Hettiarachchi C, Irigoyen M, Desai M, Rubio V, Holm M. (2008) *lzf1/salt tolerance homolog3*, an *Arabidopsis* B-box protein involved in light-dependent development and gene expression, undergoes COP1-mediated ubiquitination. *Plant Cell* 20, 2324–2338.

13. Franklin K. A. and Quail P. H., *J. Exp. Bot.* 61, 11–24, 2010.

14. Galpaz N, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J (2008) Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J.* 53, 717–730.

15. Guo C.X., Oosterhuis D.M (1997) Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. *Environ. Exp. Bot.* 37, 147–152.

16. T. Hisamatsu, King R.W., Helliwell and M. Koshioka M, The Involvement of Gibberellin 20-Oxidase Genes in Phytochrome-Regulated Petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005.

17. Hideaki N, Kimi A, Osamu N, Yusuke K, Jo I, Tatsuyuki C, Takatsune S, Ken-ichi Y, Yutaka S, Hideyuki S and Shinji K. 2010. The

Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Activator Cdh1 Modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for Degradation. *Mol Cell Biol.* 30(16): 3994–4005.

18. Holm M, Hardtke C, Gaudet R, Deng X (2001) Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J.* 20, 118–127.

19. Indorf M, Cordero J, Neuhaus G, Rodriguez-Franco M. (2007) Salt tolerance (STO), a stress-related protein, has a major role in light signalling. *Plant J.* 51, 563–574.

20. Jang I.C, Henriques R, Seo H.S, Nagatani A, Chua N.H (2010) *Arabidopsis* phytochrome interacting factor proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell* 22, 2370–2383.

21. Kami C, Lorrain S, Hornitschek P. and Fankhauser C, *Light-Regulated Plant Growth and Development*, Book chapter, 2010.

22. Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari Z, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 2046–2057.

23. Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Soppe W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 345–370, 1998

24. Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, Kerhoas L, Einhorn J, Caboche M, Miginiac E. (1994) Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana glauca*. *Plant J.* 6, 665–672.

25. Krol V.R, Mur L.A, Beld M, Mol J.N, Stuitje A.R. 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. – Maryland, – No 2. – P. 291-299.

26. Levin I, Frankel P, Gilboa N, Tanny S, Lalazar A (2003) The tomato dark green mutation is a novel allele of the tomato homolog of the *deetiolated1* gene. *Theor. Appl. Genet.* 106, 454–460.

27. Lieberman M., O. Segev, N. Gilboa, A. Lalazar, I. Levin (2004) The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1574–1581.

28. Lipson ED, Horwitz BA. 1991. Photosensory reception and transduction. In *Sensory Receptors and Signal Transduction*, ed. JL Spudich, BH Satir. New York: Wiley-Liss. 64 pp.

29. Ma L, Gao Y, Qu L, Chen Z, Li J, Zhao H, Deng X. (2002) Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2383–2398.

30. Ma LG, Li JM, Qu LJ, Hager J, Chen ZL, et al. 2001. Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13:2589–607

31. Martinez C, G.M. He, Z.Z. Zhou, X. Huang, J.H. Lee, H.Y. Zhang, J.G. Li, G. Li, S.M. Gao, Y.P. Shen, H.Y. Wang, X.W. Deng (2010) *Arabidopsis* transcription factor elongated hypocotyl5 plays a role in the feedback regulation of phytochrome A signaling. *Plant Cell* 22, 3634–3649.

32. Mas P, Devlin PF, Panda S, Kay SA. Endryu Fayr va Kreyg Mello 2000. Functional interaction of phytochrome A and cryptochrome 2. *Nature* 408:207–11

33. Mockler TC, Guo HW, Yang HY, Duong H, Lin CT. 1999. Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome

34. Mollard F., Insausti P. (2009) Soil moisture conditions affect the sensitivity of *Bromus catharticus* dormant seeds to light and the emergence pattern of seedlings. *Seed. Sci. Res.* 19, 81–89.
35. McElwain E.F., Bohnert H.J., Thomas J.C., (1992) Light moderates the induction of phosphoenolpyruvate carboxylase by NaCl and abscisic acid in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 99, 1261–1264.
36. Rao A, Irfan M, Saleem Z, Nasir I.A, Riazuddin S, Husnain T. Overexpression of the phytochrome B gene from *Arabidopsis thaliana* increases plant growth and yield of cotton (*Gossypium hirsutum*), *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2011
37. Reed J.W, Nagatani A., Elich T.D, Fagan M. and Chory J, Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development, *Plant Physiology*, 1994.
38. Sawada Y, Aoki M., Nakaminami K., Mitsuhashi W, Tatematsu K, Kushiro T, Koshiha T, Kamiya Y, Inoue Y, Nambara Y, Toyomasu T (2008) Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* 146, 1386–1396.
39. Shisamatsu S.H., Sokolskaya S.V., Sveshnikova N.V., Kochetova, A.E. Solovchenko A.E, Gostimski S.A, Bashtanova O.B. (2003) Involvement of phytochrome in regulation of transpiration: Red-/far red-induced responses in the chlorophyll-deficient mutant of pea. *Funct. Plant Biol.* 30, 1249–1259.
40. Sanchez R.A., L. de Miguel, Lima C, Lederkremer R.M. de (2002) Effect of low water potential on phytochrome-induced germination, endosperm softening and cell-wall mannan degradation in *Datura ferox* seeds. *Seed. Sci. Res.* 12, 155–163.
41. Slocombe S.P., Whitlam S.P., Cockburn S.P. (1993) Investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxylase) in *Mesembryanthemum crystallinum* L. in C3 and CAM photosynthetic states. *Plant Cell Environ.* 16, 403–411.

42. Staneloni R.J, Rodriguez-Batiller M.J., Casal J.J., (2008) Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation. *Mol. Plant* 1, 75–83.
43. Lamond AI, Earnshaw WC. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280:547–53
44. Tamada T, Kitadokoro K, Higuchi Y, Inaka K, Yasui A, et al. 1997. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat. Struct. Biol.* 4:887–91
45. Thomas B, Vince-Prue D, Photoperiodism in Plants. Academic Press, New York, 1997.
46. Usami T, Matsushita T, Oka Y, Mochizuki N, Nagatani A, 2007. Roles for the N- and C-terminal domains of phytochrome B in interactions between phytochrome B and cryptochrome signalling cascades. *Plant Cell Physiol.*
47. Yanovsky MJ, Mazzella MA, Whitelam GC, Casal JJ. 2001. Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Rhythms* 16:523–30
49. Yeh KC, Lagarias JC. 1998. Eukaryotic Annu. Rev. Plant Biol. 2003.54:469-496. Downloaded from arjournals.annualreviews.org by CNRS-multi-site on 01/01/08. For personal use only. 3 Apr 2003 12:38 AR AR184-PP54-19.tex AR184-PP54-19.sgm LaTeX2e(2002/01/18) P1: IKH 496 LIN ¥ SHALITIN phytochromes: light-regulated serine/ threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13976–81
50. Young JC, Liscum E, Hangarter RP. 1992. Spectral-dependence of light inhibited hypocotyl elongation in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis*: Evidence for a UV-A photosensor. *Planta* 188:106–14
51. Yu J, Hu SN, Wang J, Wong GKS, Li SG, et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296:79–92



52. Zhong HH, Resnick AS, Straume M, McClung CR. 1997. Effects of synergistic signaling by phytochrome A and cryptochrome 1 on circadian clock-regulated catalase expression. *Plant Cell* 9:947–55

53. Zhu H, Green CB. 2001. A putative flavin electron transport pathway is differentially utilized in *Xenopus* CRY1 and CRY2. *Curr. Biol.* 11:1945–49