

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

ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

РУЗИБОВЕВ ХАЙДАРАЛИ СОБИРЖОНОВИЧ

**РНҚ ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ТЕХНОЛОГИЯСИ АСОСИДА ЯНГИ
БИОТЕХНОЛОГИК ҒЎЗА НАВЛАРИ ЯРАТИШ**

03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2018

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавления автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Рузибоев Хайдарали Собиржонович

РНК интерференция технологияси асосида янги биотехнологик ғўза навлари яратиш..... 3

Рузибоев Хайдарали Собиржонович

Создание новых сортов хлопчатника с использованием технологии РНК интерференции..... 21

Рузибоев Хайдарали Собиржонович

Creation of new cotton varieties using RNA interferention technology..... 39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works..... 41

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

ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

РУЗИБОЕВ ХАЙДАРАЛИ СОБИРЖОНОВИЧ

**РНҚ ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ТЕХНОЛОГИЯСИ АСОСИДА ЯНГИ
БИОТЕХНОЛОГИК ҒЎЗА НАВЛАРИ ЯРАТИШ**

03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2018

Биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2018.2.PhD/B228 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Геномика ва биоинформатика марказида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.genetika.uz) манзилига ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим порталининг www.ziyo.net манзилига жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Буриев Забардаст Тожибоевич
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Ризаева Сафия Мамедовна
биология фанлари доктори , профессор

Мухамедов Рустам Султонович
биология фанлари доктори , профессор

Етакчи ташкилот:

ЎЗР ФА Биорганик кимё институти

Диссертация ҳимояси Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.29.08.2017.B.53.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2018 йил «___» _____ куни соат ___ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 111226, Тошкент вилояти, Қибрай тумани, Юқори-Юз п/б, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти мажлислар зали.Тел.: (+99871) 264-23-90; факс: (+99871) 264-22-30; e-mail: igebr@academy.uz).

Диссертация билан Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (___ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 111226, Тошкент вилояти, Қибрай тумани, Юқори-Юз п/б, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти мажлислар зали. Тел.: (+99871) 264-23-90; факс: (+99871) 264-22-30.

Диссертация автореферати 2018 йил «___» _____ куни тарқатилди.

(2018 йил «___» _____ даги _____ рақамли реестер баённомаси)

А.А. Нариманов

Илмий даражалар берувчи илмий
кенгаш раиси, к.-х.ф.д.

С.М. Набиев

Илмий даражалар берувчи илмий
кенгаш илмий котиби, б.ф.н.,
катта илмий ходим

А.Т. Адълова

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

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертация аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда аҳоли сонининг тобора ошиб бориши тўқимачилик саноатида кенг қўлланиладиган табиий ўсимлик толалари, жумладан, пахта толаси сифатига бўлган талабнинг ҳам ошиб боришига олиб келмоқда. Бироқ, ўрта иқлим минтақасидаги пахта етиштирувчи кўпгина мамлакатларда ҳавонинг ўртача ҳарорати чекланганлиги бундай ҳудудларда толаси сифати юқори бўлган ғўза навларини кенг жойлаштиришга салбий таъсир кўрсатмоқда. Бу ўринда, ғўза селекция жараёнларига замонавий технологияларни жалб қилган ҳолда тола сифати юқори бўлган янги навлар яратиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Жаҳонда ғўза геномидан фойдаланган ҳолда қимматли хўжалик белгиларини, жумладан тола сифатини мақсадли ўзгартиришга катта эътибор қаратилмоқда. Айниқса, жаҳон бозорида тола сифати ўта қадрланувчи ингичка толали ғўза навларини ўрта иқлим минтақасидаги мамлакатларда етиштиришнинг бир мунча самарасизлиги, хусусан ҳосилини пишмай қолиши, ингичка толали ғўза навларининг тола сифатини ўзида сақлайдиган ва ўрта иқлим минтақаларида етиштириш қулай бўлган янги навларни яратиш бўйича замонавий тадқиқотларни йўлга қўйилиши зарурлигини белгилаб бермоқда. Таъкидлаш лозимки, анъанавий усуллар асосида ингичка толали ғўзадаги тола узунлиги, унинг пишқиклик ва майинлик белгилари ўрта толали ғўзага ўтказилганда, ундаги бошқа агрономик белгилар ҳам ўтиб, олинган янги дурагайлар ҳам кечпишар, толаси қисман дағал бўлишига сабаб бўлади. Шунга кўра, бугунги кунда ген муҳандислиги тадқиқотлари маҳаллий навлар геномидаги фитохром *RHYA1* гени фаолиятини интерференциялаш («сусайтириш») орқали ўрта толали ғўза навларининг тола сифати ингичка толали ғўза толасига яқин бўлган янги биотехнологик навларини яратишни талаб этмоқда. Бу ўринда, тола сифатини фитохром *RHYA1* гени фаолиятини сусайтириш натижасида янада такомиллаштириш ва янги истиқболли ғўза навларини яратиш долзарб илмий-амалий аҳамият касб этади.

Республикамызда инновацион селекция ютуқлари асосида қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқаришини, хусусан ғўза етиштиришни интенсивлаштириш ишлари амалга оширилмоқда. Бу борада, жумладан, тола сифат белгиларига генетик бириккан ДНК маркерлари аниқланди ва тезпишар, ҳосилдор, тола чикими юқори бўлган ҳамда касалликларга чидамли кўплаб истиқболли янги навлар яратилди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида¹ «... қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқариш соҳасига интенсив усулларни жорий этиш ҳамда маҳаллий ер-иқлим ва экологик шароитларга мослашган янги селекция навларни яратиш» вазифалари белгилаб берилган. Ушбу вазифалардан келиб чиққан ҳолда, жумладан, РНК интерференция технологияси асосида *RHYA1*

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

RNAi генотипли линияларини олиш, маҳаллий ғўза нави билан дурагайлаш орқали янги тола сифати яхшиланган биотехнологик нав яратиш ва ишлаб чиқаришга жорий этиш муҳим илмий-амалий аҳамиятга эга.

Ўзбекистон Республикасининг Президентининг 2018 йил 27 апрелдаги ПҚ-3683-сон «Ўзбекистон республикасида уруғчилик тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» қарорлари ва 2017 йил 15 сентябрдаги ПҚ-3281-сон «Қишлоқ хўжалиги экинларини оқилона жойлаштириш чора-тадбирлари ва қишлоқ хўжалиги маҳсулотлари етиштиришнинг прогноз ҳажмлари тўғрисида»ги ҳамда 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, ҳамда бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси Дунёда ўрта толали (*G. hirsutum*) ва ингичка толали (*G. barbadense*) ғўза навларида ўтказилган молекуляр генетик тадқиқотлар М.Е. Jhon ва бошқалар томонидан (1996) бошлаб берилган ва *Eb* гени фаоллигининг трансген ўсимликда 60-98% га сусайтирилиши тола ривожланишида ҳеч қандай сезиларли фенотипик ўзгаришларга олиб келмаслиги аниқланган. Бу тадқиқотлар тола ривожланиш жараёнида *Eb* гени унчалик муҳим эмаслигини кўрсатган. Y.L. Ruan, D.J. Llewellyn ва R.T. Furbank (2003) ғўза сахарат синтетаза генини (SUS) 70% сусайтириш учун вектор конструкцияси трансформациясини муваффақият билан амалга оширганлар ва бу туксиз, бужмайган уруғлар фенотипини пайдо бўлишига олиб келиши исботланган. W.Tang ва бошқ. (2004) томонидан яшил флуоресцент оқсиллини (*GFP*) таргетлаш учун дизайн қилинган гени *siRNA* орқали «ўчириш» қобилияти аниқланган. Ғўза трансген хужайраларини *in vitro* шароитида ўстириш орқали *GFP* тузилмали иккита *siRNA* нинг ўчириш натижаларига эришилган. B.Zhang ва бошқ. (2015), G.J.Liu ва бошқ. (2015) томонидан ўрта толали ғўза (AD)₁ нинг Texas Marker-1 (TM-1) нави ва ингичка толали ғўза (AD)₂ нинг Xinhai-21 навлари тўлиқ геномни секвенс қилинган. K.Kutar ва бошқ. (2014) ғўза барглари буралиб кетиши (CLCV) вируси билан зарарланишини олдини олиш бўйича тадқиқотларни амалга оширганлар. Бетта-сателлити ДНК CLCV Мултан (CLC ва MV) га таъсир этишида VIGS-воситачилигида RNAдан фойдаланилган.

Мамлакатимизда ўрта толали ғўза генотипларидаги эртапишарлик, чидамлилиқ ва ҳосилдорликни сақлаб қолган ҳолда тола сифат кўрсаткичларини яхшилашга қаратилган тадқиқотлар олиб борилган. I.Abdurakhmonov ва бошқ. (2012, 2014) томонидан ғўза генларини генетик

хариталаштириш, уларни тавсифлаш, экспрессиясини ўрганиш, секвенслаш каби тадқиқотлар асосида юзлаб генетик конструкциялар яратилган, клонланган ва ғўза геномига трансформация қилиш ишлари амалга оширилган. Таъкидлаш лозимки, РНК интерференция технологияси асосида янги биотехнологик ғўза навлари яратиш масалалари ўрганилмаган. Шунга кўра, ғўзада *PHYA1* гени фаолиятини пасайтириш орқали янги ғўза линиялари ва навлари яратиш муҳим аҳамиятга эга.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассаси илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Геномика ва биоинформатика маркази илмий-тадқиқот ишлари режасининг Ф-4-Т149 «Маркерларга асосланган селекцияни яратиш мақсадида ғўза геноми структураси ва функциясининг тадқиқоти» (2007-2011), ФА-Ф10-Т92 «Ғўза генлари учун тузилган синтетик RNAi дуплекслари асосидаги бинар генетик векторлар ёрдамида юқори сифатли трансген ғўза линиялари олиш» (2009-2011) Ф5-Т030 «Инновацион биотехнологияларни ривожлантириш учун устивор қишлоқ хўжалиги экинларининг геномларини тадқиқ қилиш» мавзуларидаги фундаментал ва амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади RNAi технологияси ёрдамида Кокер-312 линиясининг *PHYA1* RNAi генотипли шаклларини олиш ва маҳаллий ғўза нави билан дурагайлаш орқали янги, тола сифати яхшиланган биотехнологик нав яратишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

РНК интерференция технологияси асосида Кокер-312 ғўза линияси геномига *pHellsgate8_PHYA1* ген конструкциясини киритиш орқали янги трансформантлар олиш;

трансформант (RNAi) ўсимликларни тупроқ муҳитига мослаштириш, дастлабки фенотипик кузатувлар олиб бориш ва уларнинг авлодини ошириш;

геномида *pHellsgate8_PHYA1* ген конструкциясини тутган генотипларни ПЗР ва гель-электрофорез усулларида танлаб олиш;

RNAi ғўза намуналарини маҳаллий АН-Боёвут-2 нави билан чапиштириш асосида янги комбинация дурагайларини олиш;

ушбу RNAi дурагайларининг турли морфо-биологик белгиларини ўрганиш;

RNAi дурагайларининг ҳар бир авлоди геномида *pHellsgate8_PHYA1* ген конструкцияси мавжудлиги текшириб бориш;

RNAi ўсимликлари ичидан тола сифат кўрсаткичлари яхшиланган генотипларни танлаш орқали янги нав яратиш.

Тадқиқотнинг объекти *pHellsgate8_PHYA1* вектор конструкцияси, маҳаллий АН-Боёвут-2 ғўза нави ҳамда Кокер-312 линияси.

Тадқиқотнинг предмети замонавий RNAi технологиясидан фойдаланиб ўрта толали ғўза навлари тола сифат кўрсаткичларини яхшилаш билан бирга улардаги морфобиологик хусусиятларини такомиллаштириш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертацияда замонавий биотехнологик

усуллар-ўсимлик тўқимасидан геном ДНК ажратиш; трансформация қилиш; гель электрофорез; полимераза занжир реакцияси; qRT-PCR; генотиплаш; оддий дурагайлаш; ўз-ўзига чанглатиш; биоинформатик ва статистик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

қизил, узоқ-қизил нур таъсирини фоторецепторлар орқали ўзлаштирилишини назорат қилишга алоқадор *PHYA1* гени учун *pHellsgate-8_PHYA1 RNAi* вектор конструкциялари тузилган;

илк бор *pHellsgate-8_PHYA1 RNAi* вектор конструкциясини трансформация қилиш орқали регенерант эмбрионд ғўза ўсимликлари олинган;

Кокер-312 (*G. hirsutum* L.) линиясининг *PHYA1 RNAi* генотипли шакллари яратилган;

Кокер-312 линиясига *pHellsgate-8_PHYA1 RNAi* вектори киритилган трансформантлар Т₃-1_7 да *PHYA1* транскриптлари 70 % гача, Т₃-31_10 ўсимликларида эса ~ 25 % гача камайганлиги очиб берилган;

ўрта толали маҳаллий ғўза нави асосида *PHYA1 RNAi* генотипли тола сифати яхшиланган, эртапишар ва серҳосил янги ғўза навини яратиш усули ишлаб чиқилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Кокер-312 линияси ўсимлигининг 50 га яқин *PHYA1 RNAi* линиялари яратилган ва Геном технологиялари асосида яратилган янги ўсимлик навлари гермоплазмаси ноёб объекти коллекциясида фойдаланилган;

ўрта толали маҳаллий ғўза нави асосида янги *PHYA1 RNAi* генотипли, тола сифати яхшиланган, эртапишар, ҳосилдор янги «Порлоқ-1» биотехнологик ғўза нави яратилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги диссертацияда замонавий ген технологияси ва ёндашувларидан фойдаланилганлиги, олинган маълумотларни статистик қайта ишлашда вариациялар (ANOVA) таҳлилларининг қўлланилганлиги, илмий тадқиқот натижаларининг ҳалқаро ва республика илмий-амалий анжуманлардаги муҳокама қилинганлиги, кўп йиллик изланишлар асосида яратилган «Порлоқ-1» ғўза нави 2013-2017 йилларда республиканинг жаъми 105 минг гектардан зиёд пахта майдонларига жорий этилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти тола сифат белгилари ва агрономик кўрсаткичларни *PHYA1 RNAi* конструкцияси трансформациясини амалга ошириш орқали соматик эмбриогенез усулида *RNAi* генотипли линияларни олиш асослари ишлаб чиқилгани, регенерантларни фенотипик ва генотипик таҳлилларини статистик баҳолаш асосида *PHYA1 RNAi* хусусиятлари тавсифланганлиги ва белгилар ирсийланишининг молекуляр таҳлили очиб берилгани билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти турли ғўза навларининг *PHYA1 RNAi* линияларини олиш имкониятлари асослангани, *RNAi* технологиясидан тола сифат белгилари яхшиланган ва ҳосилдорлиги юқори

бўлган шакллари ажаптиб олишда фойдаланиш самараси кўрсатилгани ҳамда *PHYA1* RNAi линиясини маҳаллий нав билан дурагайлаш янги нав яратишга хизмат қилиши исботлангани билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. РНК интерференция технологияси асосида янги биотехнологик ғўза навлари яратиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

ўрта толали (*G. hirsutum* L.) маҳаллий ғўза нави асосида *PHYA1* RNAi генотибли тола сифати яхшиланган, эртапишар, ҳосилдор ҳамда агрономик кўрсаткичлари юқори бўлган янги «Порлоқ-1» биотехнологик ғўза нави учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтиро патенти олинган (№NAP 00146, 2017 йил). Натижада вектор конструкциялар трансформацияси орқали янги линиялар олиш ва янги биотехнологик ғўза навлари яратиш имконини берган;

«Порлоқ-1» ғўза нави республиканинг Сурхондарё, Жиззах, Сирдарё ва Наманган вилоятлари фермер хўжалиқларининг 105 минг гектардан ортиқ пахта майдонларига жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ ва сув хўжалиги вазирлигининг 2018 йил 20 апрелдаги 01/20-27-сон маълумотномаси). Натижада «Порлоқ-1» ғўза навидан сифатли тола кўрсаткичларига эга юқори ҳосил олиш имконини берган;

ўрта толали (*G. hirsutum* L.) ғўза навлари селекциясига замонавий RNAi технологияси И5-ФҚ-0-89870 рақамли «Порлоқ ген-нокаут ғўза навларини супер элита уруғларини ишлаб чиқариш ва доимий кўпайтириш» мавзусидаги инновация лойиҳасида ғўза навларининг дастлабки уруғчилигини ташкил этишда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2018 йил 14 мартдаги 4/1255-655-сон маълумотномаси). Натижада RNAi технологиясини қўллаш орқали яратилган линиялар орасидан янги биотехнологик навлар яратиш ва уларнинг сифатли элита авлодли уруғликларини тайёрлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 6 та, жумладан, 1 та халқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 12 та илмий иш чоп этилган. Шундан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссияси томонидан докторлик диссертациясининг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 6 та илмий мақола, жумладан, 5 таси республика ва 1 таси хорижий журналларда чоп этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертация ҳажми 90 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

«**Кириш**» қисмида тадқиқотнинг долзарблиги ва аҳамияти асосланган, тадқиқотнинг мақсад ва вазифалари, объекти ва предмети тавсифланган, тадқиқотнинг Республика фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг амалий натижалари ва илмий янгилиги келтирилган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти ёритилган, тадқиқот натижаларининг амалиётга жорий этилиши, нашр қилинган ишлар ва диссертациянинг тузилиши ҳақидаги маълумотлар берилган.

Диссертациянинг «**Ўсимликларда замонавий RNAi технологиясининг қўлланилиши ва аҳамияти**» деб номланган биринчи бобида дунё ва мамлакатимиз олимлари томонидан олиб борилган тадқиқотларга асосланган маълумотлар таҳлили акс этган.

RNAi технологиясининг афзалликлари, ғўза ўсимлигида биотик ва абиотик омилларга чидамликни ошириш бўйича олиб борилган тадқиқот ишларида ушбу усулнинг қўлланилиши ҳақида маълумотлар берилган.

Шунингдек, ғўза селекциясида молекуляр даражада салбий таъсирларга қарши курашиш чора тадбирларида, генотипдаги сифат кўрсақичларга жавоб берувчи генлар фаолиятини очиб беришда RNAi технологиясининг аҳамияти тўғрисидаги тадқиқот натижалари келтирилган.

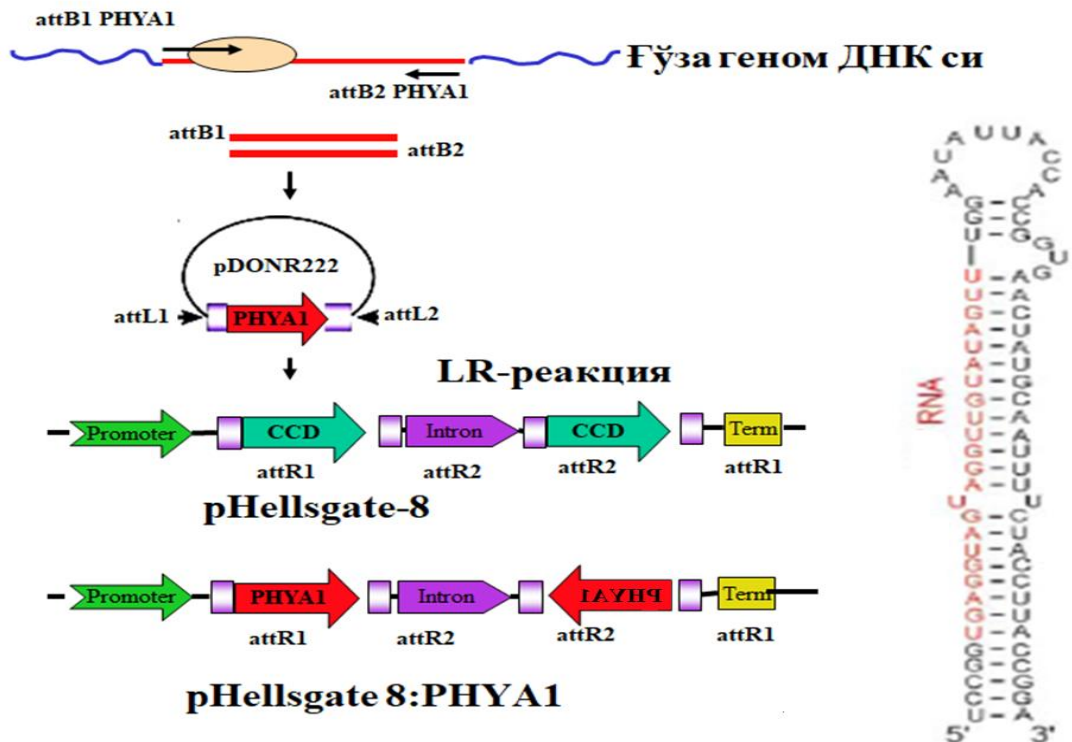
Диссертациянинг «**Тадқиқот ўтказилган жой ва шароити, манбаи ва услублари**» мавзусидаги иккинчи бобида тадқиқот ўтказишнинг усуллари, шароитлари ва материаллари батафсил ёритилган.

Ўсимлик материаллари, замонавий биотехнологик усуллар, ўсимлик тўқимасидан геном ДНК ажратиш; трансформация қилиш; гел электрофорез; полимераза занжир реакцияси; RT-qPCR; генотиплаш; оддий дурагайлаш; ўз-ўзига чанглатиш; биоинформатик ва статистик усулларнинг тавсифи келтирилган.

Тадқиқотнинг объекти сифатида *pHellsgate8_PHYA1* вектор конструкцияси, ғўзанинг маҳаллий ўрта толали АН-Боёвут-2 нави, Кокер-312 линияси ҳамда тадқиқот жараёнида олинган янги *PHYA1*RNAi генотипли шакллар ҳисобланади.

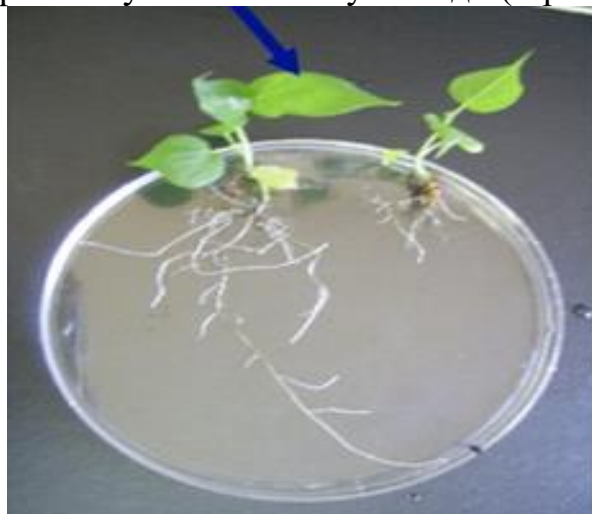
Диссертациянинг «**RNAi технологиясидан фойдаланиб, Кокер-312 линиясидан фитохром A1 (PHYA1) гени фаолиятини сусайтириш орқали янги генотиплар олиш**» деб номланган учинчи бобда қизил ва узоқ-қизил нурларни ўзлаштиришда *PHYA1* генининг роли ва унинг функциясини ўзгартириш имконияти борлигини эътиборга олиб, *PHYA1* RNAi вектор конструкциясини яратиш ҳақида, ушбу вектор конструкциясининг ўсимлик тўқимасига трансформацияси қилиниши келтирилган. Бундан ташқари олинган соматик регенерантларнинг молекуляр ва ташқи фенотипик белгиларини таҳлили баён қилинган.

Дастлаб ғўза *PHYA1* генини сусайтиришга мосланган (RNAi) вектор конструкцияси тузилиб (1-расм) ушбу конструкция *Agrobacterium tumefaciens* штаммига трансформация қилинди.



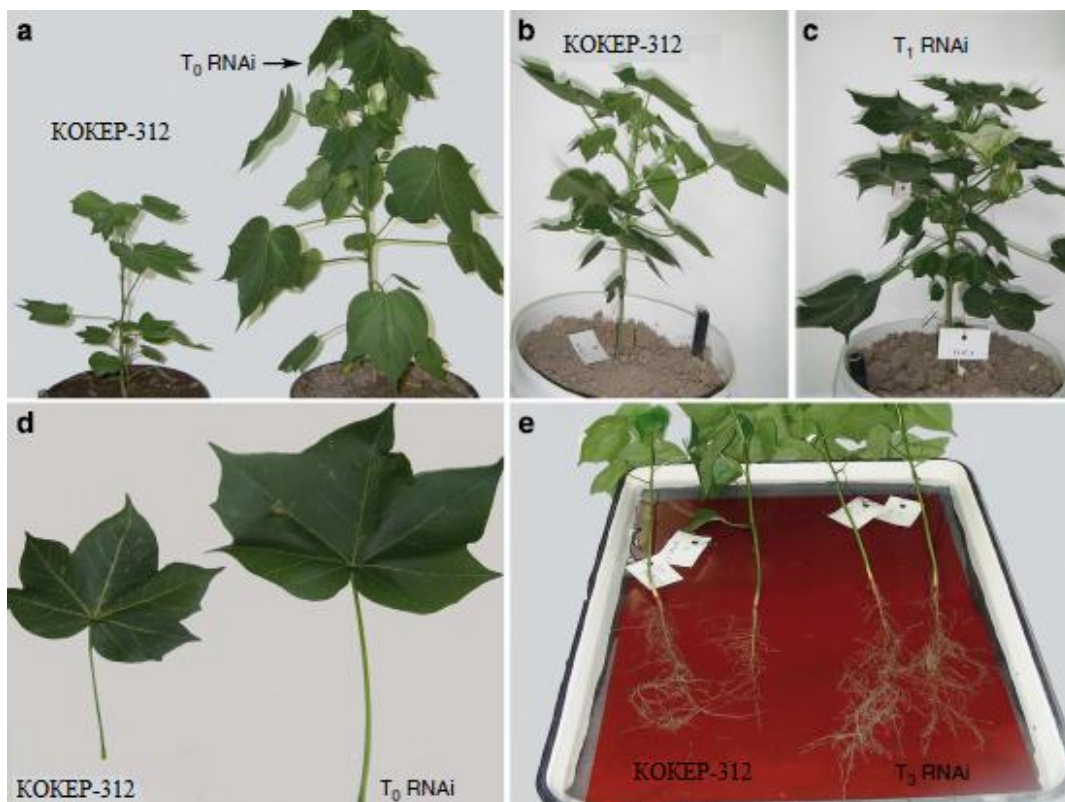
1-расм. *pHellsgate-8_PHYA1* RNAi вектор конструкциясининг таркибий тузилиши

ПЗР текширувида ижобий натижа аниқлангач, агробактерия колониялари ўсимлик тўқимасига киритилди ва трансформация самарали амалга ошишига эришилди. *In vitro* шароитида хужайрадан тўқималар шаклланиши, тўқималардан эса ўсимлик бошланғич вегетатив қисмлари шаклланиши босқичларидан сўнг регенерант ўсимликлар олинди. Соматик эмбриогенез натижасида жами 68 та ўсимлик олиниб, улардан 15 таси трансформация амалга ошмаган ўсимликлар эканлиги молекуляр генотиплаш усули ёрдамида аниқланди. *PHYA1* RNAi вектори киритилган регенерантлар билан трансформация амалга оширилмаган ўсимликлар солиштирилганда, *PHYA1* RNAi эмбрионидларнинг ривожланиши нисбатан тезлиги, илдиз тизими ва барг бандларининг узайганлиги кузатилди (2-расм).



2-расм. Соматик эмбриогенез орқали олинган регенерант ўсимликлар: чап томонда трансформацияланган, ўнг томонда трансформацияланмаган.

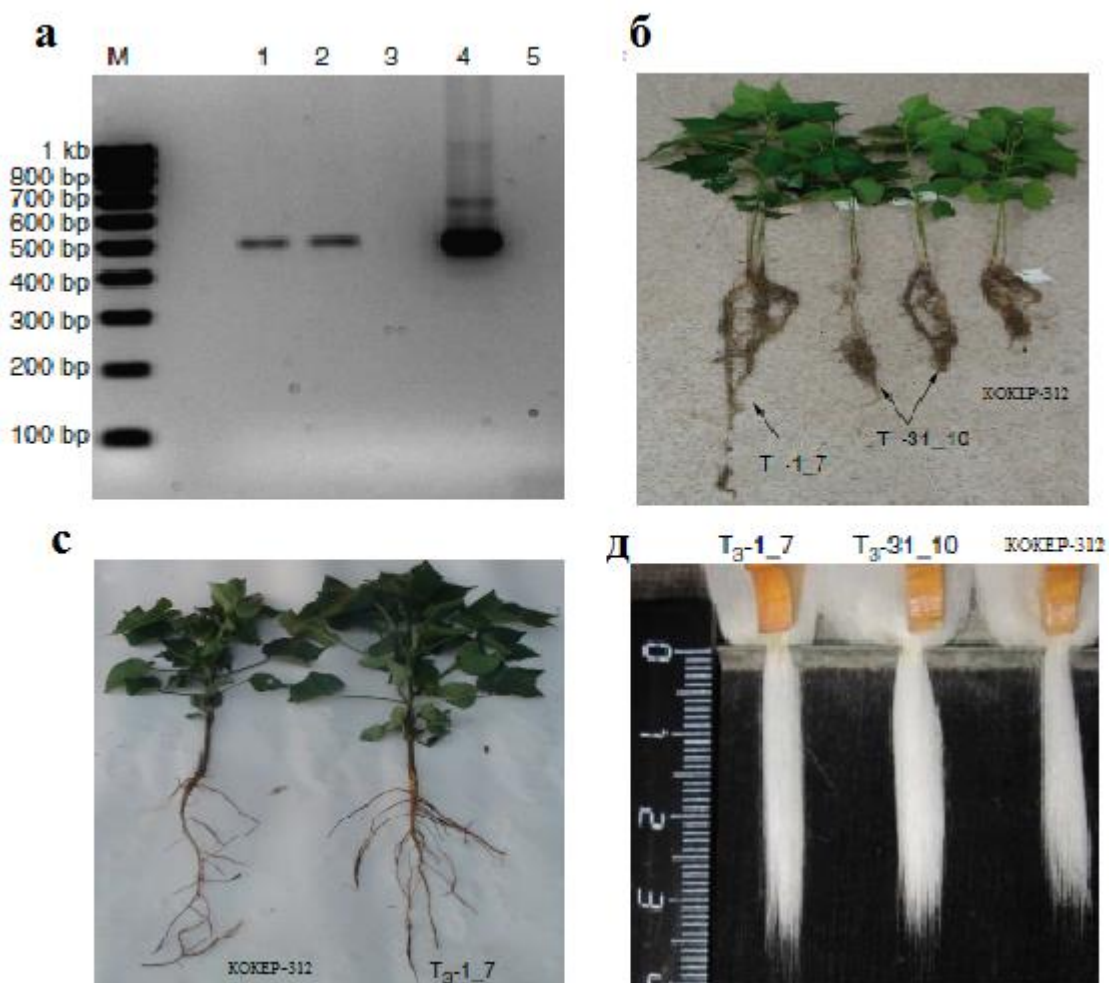
In vitro шароитидан кейинги босқичда регенерант ўсимликларни тупрок мухитига кўчириб ўтказилди. Фитотрон шароитида бир хил озуқа ва мухитда ўстирилган T₀ авлод назорат ва RNAi ўсимликларининг фенотипик белгилари кузатиб борилди. Парваришланаётган ўсимликлар ўсиш ва ривожланиш жараёнларини кузатиш натижаларининг таҳлили назоратга нисбатан RNAi генотибли ғўза трансформантларида ўсимлик бўйи баланд, барг бандлари ва кўсак бандлари узун эканлигини, илдиз тизимининг ривожланганлигини, гуллашнинг ва кўсакларнинг очилиши эрта кечишини ҳамда пахта толаси 5 мм. (17%)га узун эканлигини кўрсатди. (3-расм).



3-расм. *PHVA1* RNAi ўсимликларни назоратга нисбатан фенотипик фарқланиши: (a) ривожланиш тезлиги; (b, c) гуллаши; (d) барг банди узунлиги; (e) илдиз ривожланиши.

RNAi генотибли ўсимликларнинг T₀ ва T₁ авлодларининг генотиби таркибида *PHVA1* генининг RNAi конструкцияси бор ёки йўқлигини аниқлаш учун ўтказилган молекуляр таҳлил натижасида нуклеотидлар кетма-кетлигининг узунлиги, тузилган *pHellsgate-8-PHVA1* вектори плазмидасидаги каби бир хил узунликда эканлиги аниқланди. Назорат Кокер-312 геноми ва ДНК назорати учун қўйилган бўёқли эритма намунаси таркибидан эса мос ҳолдаги нуклеотид таркиб аниқланмади (4-расм).

Генотипга асосан RNAi бўлмаган ўсимликларни RNAi ўсимликлар (назорат Кокер-312, трансформацияланган T₁, ва трансформация жараёни амалга ошмай қолган-ноль сегрегант) билан таққосланганда RNAi генотибли ўсимликлар 5-10 кун эрта гуллаши, вегетация даврининг тезлашганлиги кузатилди.



4-расм. *T*₃ авлод *PHYA1* RNAi-оиласи ўсимликларининг молекуляр (а) ва фенотипик (б,с,д) таҳлили; (а) PDK 35S-F/R жуфт праймерлар ёрдамида ПЗР таҳлили. М-маркер 100 ж.а., 1-*T*_{3-1_7}; 2-*T*_{3-31_10}; 3-Кокер-312; 4-*pHellsgate-8_PHYA1* плазида; 5-ДНК сиз назорат намуна.; (б) *T*₁ авлод ўсимликлар илдизи кўриниши, (с) *T*₃ авлод ўсимликларининг илдиз тизими, (д) Тола узунлиги.

*T*₀ авлод ўсимликлардан олинган чигитлар экилиб, *T*₁ авлод ниҳоллар етиштирилди. Кейинги авлодларда олиб борилган кузатув ишлари натижасида тўпланган маълумотлар ANOVA статистик таҳлил дастури билан қайта ишлаш ниҳолларнинг гипокотиль қисми узайганлиги, илдиз массасининг ортганлиги (1-жадвал), гуллар сони кўплиги ва кўсакларнинг эрта очилганини кўрсатди (2-жадвал). Кузатувларда кўсак, барг ва поядаги антоциан пигментларнинг пайдо бўлиши RNAi линияларда бирмунча жадал эканлиги аниқланди. Толанинг 5-7 мм. гача узайганлиги HVI таҳлилларида ҳам ўз тасдиғини топди (5-расм).

Дала шароитига экилган *T*_{2.5} авлод RNAi ва RNAi бўлмаган ўсимликлар ниҳоллари гипокотелининг узунлиги ва илдиз оғирлиги ўлчаниб борилди. Уларнинг ўртача кўрсаткичлари 1-жадвалда келтирилган бўлиб, ушбу авлод ўсимликларида бу белгилар кўрсаткичлари наслдан-наслга барқарор ҳолатда ирсийланиб келаётганлиги фенотипик, молекуляр таҳлил маълумотлари асосида тасдиқланди. Генотиплар билан турли муҳит омилларида баҳоланган фенотипик маълумотларнинг ўзаро $P < 0.01$ даражадаги таҳлили келтирилган бўлиб, Кокер-312 ва *T*-1 ҳамда *T*-31 RNAi линияларида; *T*-1 ва *T*-31 RNAi

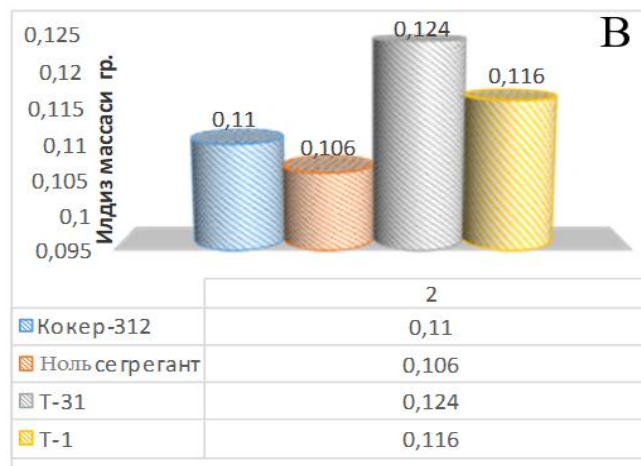
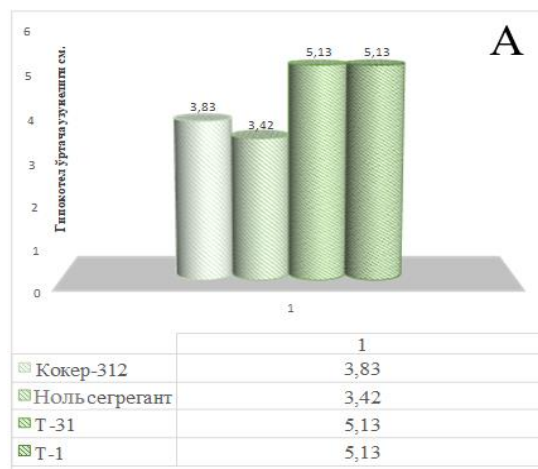
линиялари ва ноль сегрегантда; T-1 ва T-31 линияларида ҳамда Кокер-312 ва ноль сегрегантда гипокотиль узунлиги ва илдиз оғирлиги бўйича статистик таҳлиллар ўтказилиб, ўзаро фарқлар аниқланди.

1-жадвал

RNAi (T_{2:5}) ҳамда назорат ғўза ўсимликларининг гипокотиль узунлиги ва илдиз оғирлиги таҳлили

1	2	3	4	5	6	7	8
гипокотил узунлиги, см.							
Кокер-312	линия	3	80	27	3.83 ^b	1.33	0.26
Ноль сегрегант	T ₃	6	90	81	3.42 ^b	0.98	0.11
T-31	T ₅	3	100	41	5.54 ^{acd}	0.89	0.14
T-1	T ₅	3	100	44	5.13 ^{acd}	1.03	0.15
илдиз оғирлиги, г.							
Кокер-312	линия	3	80	27	0.110 ^b	0.006	0.003
Ноль сегрегант	T ₃	6	100	49	0.106 ^b	0.022	0.009
T-31	T ₅	3	100	41	0.124 ^a	0.010	0.006
T-1	T ₅	3	100	44	0.116 ^a	0.006	0.003

Изоҳ: 1 - генотип; 2 - авлоди; 3 - такрорлар сони; 4-унувчанлик фоизи,%; 5 - ўсимликлар сони, дона; 6 – гипокотилнинг ўртача узунлиги, см. (жадвалнинг юқори қисмида) ёки илдизнинг ўртача оғирлиги, г. (жадвалнинг қуйи қисмида); 7 - стандарт оғиш қиймати; 8 - стандарт хатолик.



5-расм. RNAi (T_{2:5}) ҳамда назорат ғўза ўсимликларининг гипокотиль узунлиги (A) ва илдиз оғирлиги (B) таҳлили.

Ҳосилдорлик ва тола сифат кўрсаткичлари таҳлили. Дала шароитида ўстирилаётган T₂ авлод ўсимликлардан фенотипик баҳолаш асосида ҳосилдорлиги, тола сифат кўрсаткичлари юқори бўлган иккита T₂-1 ва T₂-31 оилалари ажратиб олинди (6-расм). Генотипик жихатдан уш бу оилалар *pHellsgate-8_PHYA1* вектор конструкцияси нусхалар сони бўйича бир биридан фарқ қилади: T₃-1_7 оила геномида 3 нусхада, T₃-31_10 да эса 2 нусхада *PHYA1* RNAi конструкцияси мавжуд эканлиги аниқланган. Бундан ташқари 7- расмда кўрсатилганидек *PHYA1* гени экспрессияси бўйича ҳам улар бир биридан фарқланади.

Бу икки оилалар ўсимликлари ниҳолларида гипокотиль узунлиги, илдиз

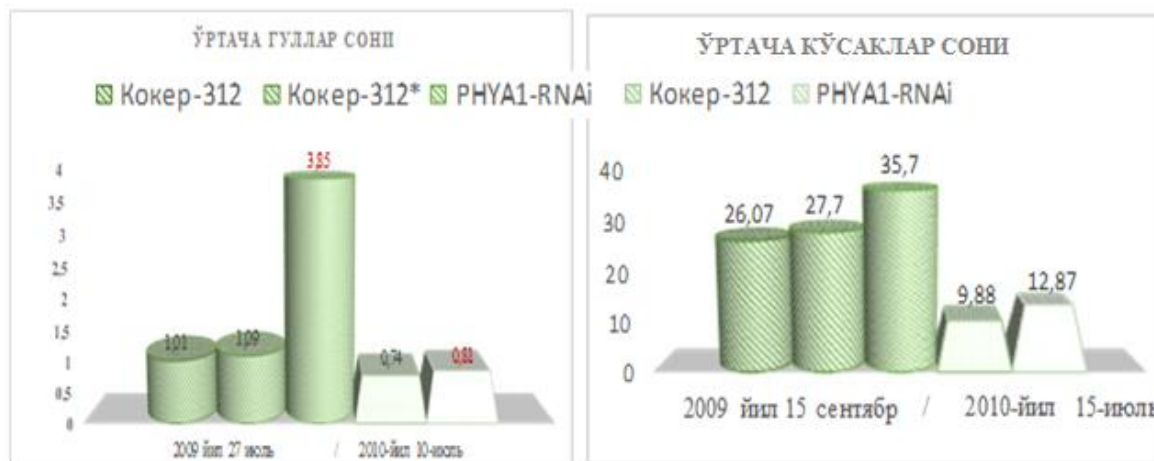
тизимининг ривожланганлиги, ва тола сифат белгиларининг юқорилигини инобатга олиб уларнинг кейинги авлодлари ўрганиб борилди. RNAi генотибли оилалар RNAi конструкцияси бўлмаган назорат ўсимликлар билан солиштирилганда бу оилаларда тола узунлиги сезиларли даражада узайганлиги, микронейр кўрсаткичларининг яхшиланганлиги, тола бир хиллиги даражаси янада такомиллашганлиги аниқланди. Тола пишиқлиги (5%) ва етилганлик даражаси (2-10%), тола ранги оклик даражаси (+B) яхшиланганлиги фарқлари таҳлил натижаларида аниқланди (ANOVA, $p \leq 0.01$). Шу билан биргаликда оддий Кокер-312 (~10848) га нисбатан ноль сегрегант (~10485). *PHYA1* RNAi оиларининг (~10492, ~10289) чигитлари миқдори деярли фарқ қилмади. Бироқ, RNAi ўсимликлардаги чигитнинг чикими статистик жихатдан 3% кўпайди, чунки 1та кўсақдаги пахта оғирлиги ўртача қиймати солиштирилганда назоратда ~ 5.67 г., 0-сегрегантда 5.57 г., ва RNAi генотипларда ~ 6.37-6.41 г. эканлиги маълум бўлди.

2-жадвал

RNAi ҳамда назорат ғўза ўсимликларидаги гул ва кўсақ сони таҳлили

1	2	3	4	5	6	7	8	9
гул сони								
Кокер-312	2009	нав	4	168	27 июль	1.01 ^b	0.423	0.21
Кокер-312*	2009	R ₂	2	80	27 июль	1.09 ^b	0.375	0.27
PHYA1-RNAi	2009	T ₂	6	663	27 июль	3.85 ^{ac}	2.486	1.01
Кокер-312	2010	нав	3	1880	10 июль	0.74	0.041	0.02
PHYA1-RNAi	2010	T ₃	3	1224	10 июль	0.81	0.079	0.05
кўсақ сони								
Кокер-312	2009	нав	4	60	15 сентябрь	26,07 ^b	9,54	1,23
Кокер-312*	2009	R ₂	2	54	15 сентябрь	27,7 ^b	13,30	1,81
PHYA1-RNAi	2009	T ₂	6	198	15 сентябрь	35,7 ^{acd}	16,98	1,21
Кокер-312	2010	нав	3	2012	15 июль	9,88	0,18	0,10
PHYA1-RNAi	2010	T ₃	4	1614	15 июль	12,87	3,32	1,66

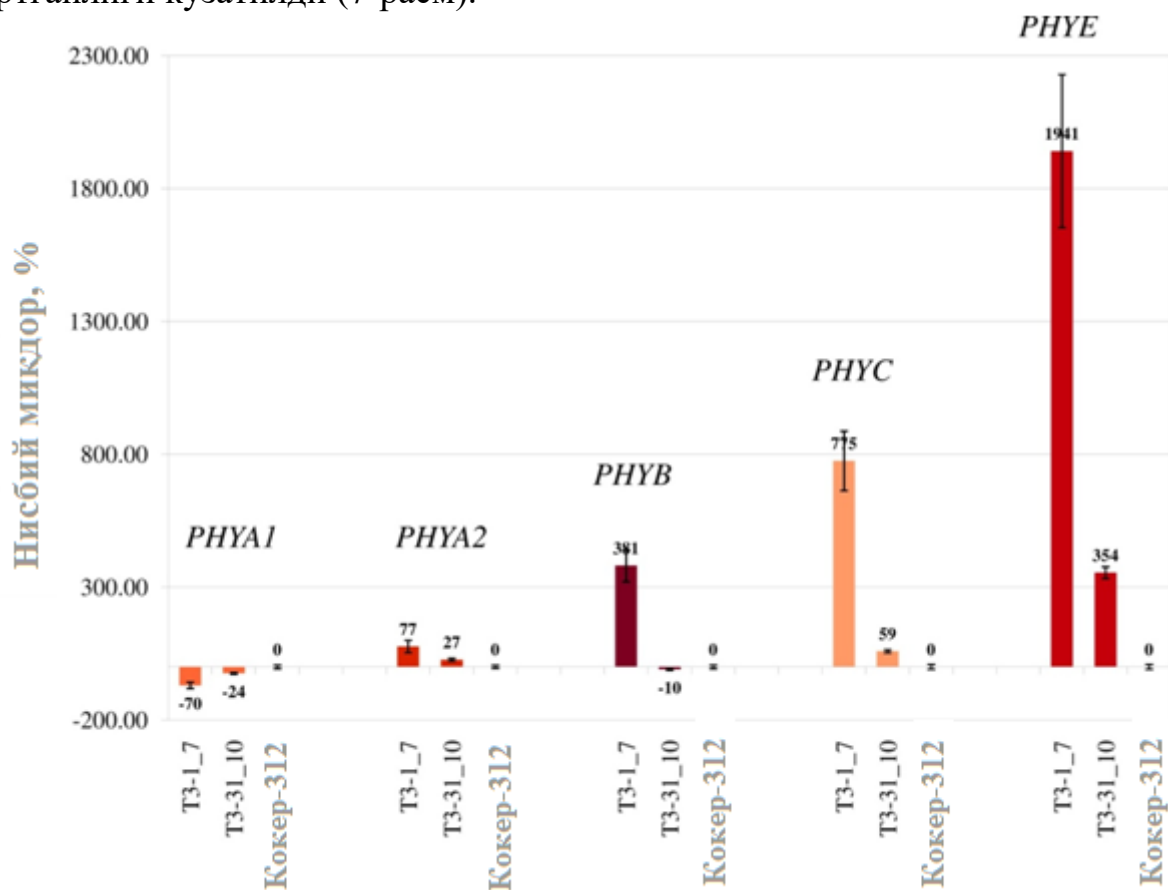
Изоҳ: (2009-2010 йиллар) 1 - генотип; 2 - йиллар; 3 - авлод; 4 – такрорлар сони; 5 - ўсимликлар сони; 6 - қайд этилган вақт; 7 – битта ўсимликдаги гулларнинг ўртача сони (жадвалнинг юқори қисмида) ёки кўсақлар сони (жадвалнинг қуйи қисмида); 8 - стандарт оғиш қиймати; 9 - стандарт хатолик.



6-Расм. RNAi ва RNAi бўлмаган генотиплар ўртасидаги фарқларни^a $P < 0.01$ даражада ANOVA дастури маълумотлари таҳлили.

Кокер-312 линияси, Кокер-312 * – *PHYA1* RNAi вектори киритилмаган ПЗР-салбий регенерант ва *PHYA1* RNAi ўсимликлар бир вақтнинг ўзида бир хил муҳитда ўстирилган.

Биз тадқиқотларимизда *PHYA2*, *PHYB* ва фитохром иоласига оид бошқа генларда ҳам қандай ўзгаришлар бўлганлигини аниқлаш яъни *PHYA1* гени экспрессиясининг сусайиши бошқа генлар фаолиятига таъсирини билиш мақсадида таҳлил ўтказдик. Шу учун биз турли мРНК миқдорини солиштиришига ёрдам берадиган RT-qPCR (миқдорий ва реверс ПЦР комбинацияси) усулидан фойдаландик. Натижалар шуни кўрсатадики Кокер-312 линиясига *PHYA1* RNAi вектори киритилган усимликларда *PHYA1* генининг экспрессияси сезиларли даражада камайди: Т3-1_7 линияда 70%гача, Т3-31_10 линияда эса- 25%гача сусайиши кузатилди. Шу билан бир қаторда фитохром оиласига оид бошқа генларнинг экспрессияси ўзгарганлиги аниқланди. Масалан Т3-1_7 линияси ўсимликларида *PHYA2*, *PHYB*, *PHYC* ва *PHYE* генларининг экспрессияси 2 дан 20 баробаргача ортганлиги кузатилди (7-расм).

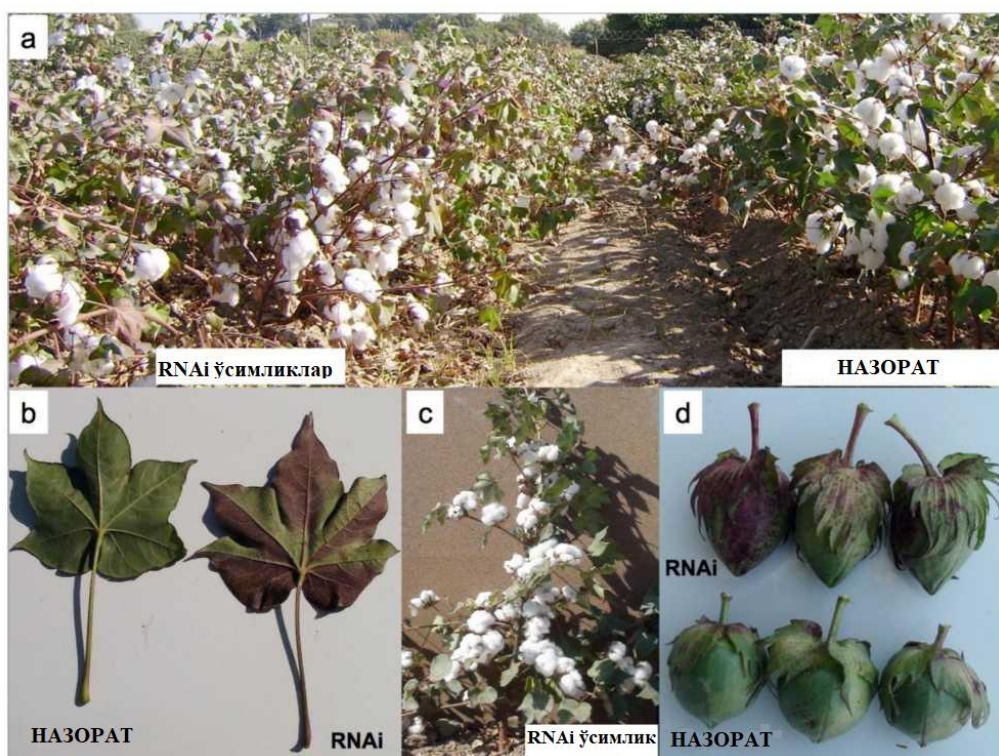


7-расм. Ғўзанинг *PHYA1* RNA линияларида ҳар хил фитохром генларининг (*A1*, *A2*, *B*, *C* ва *E*) экспрессияси Кокер-312га нисбатан ўзгариши.

Диссертациянинг «*PHYA1* RNAi ўсимликларини маҳаллий нав билан дурагайлаш орқали янги биотехнологик линиялар олиш» номли тўртинчи бобида тола сифат белгилари юқори бўлган Т₀ *PHYA1* RNAi регенерант ўсимлик хусусиятларини маҳаллий навга ўтказиш, олинган дурагайларни индивидуал-алоҳида ҳар бир ўсимликни ўзидан чанглатиш натижасида кейинги авлодларини кўпайтириш, RNAi га хос хусусиятлар

ирсийланишини назорат қилиш асосида тўпланган маълумотларни таҳлил қилиш ва олинган натижалар асосида нав яратиш учун бажарилган ишлар келтириб ўтилган.

Жумладан, T_0 авлод Кокер-312 *PHYA1* RNAi генотибли соматик эмбрионид ўсимликни маҳаллий нав билан дурагайлаш орқали бир нечта генотиплар олинди. Биринчи (T_1) ва икинчи (T_2) авлод дурагайларни (АН-Боёвут-2 $\times T_0$ -1) молекуляр ПЗР натижалари ҳамда белги кўрсаткичлари таҳлилига кўра, назоратга нисбатан жадал вегетатив ривожланган, яъни ҳосил элементлари, барг бандлари ва кўсак бандлари узун, гуллар ва кўсак сони кўп, эрта гуллаб кўсаклари 5-10 кун эрта очиладиган, антацион пигментлар миқдори барг, поя, кўсак юзаларида кўп бўлган линия бир неча бор танлаш усули ёрдамида ажратиб олинди.

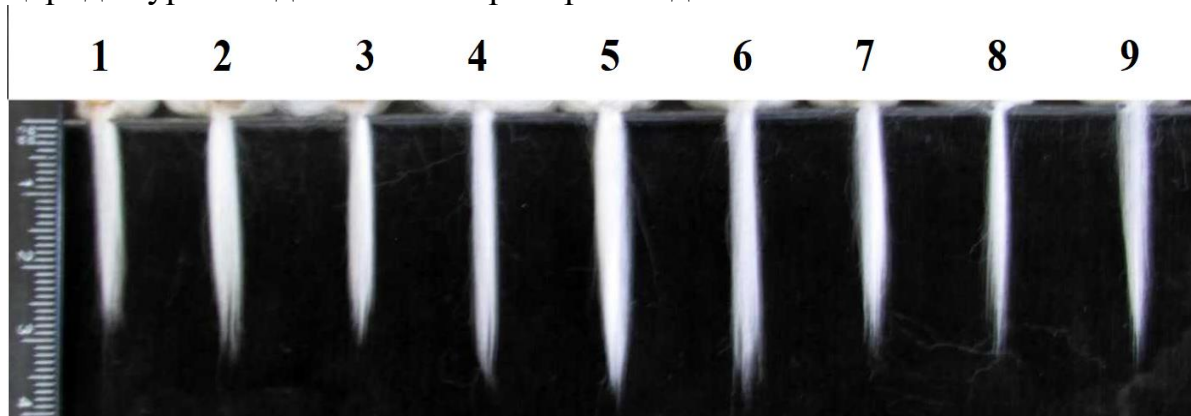


8-расм. АН-Боёвут-2 \times RNAi Кокер-312 (T_0 -1) дурагай линияларида *PHYA1* RNAi хусусиятларининг кўриниши: (а) ўсимликларда антоциан пигментларнинг кўриниши; (б) барг ва (д) кўсак юзасида антацион рангларнинг кўриниши; (с) яратилган RNAi линиясининг кўриниши;

Дурагайларнинг F_2 ва F_3 авлодларида асосий тола сифат белгилари назорат навга ва *PHYA1* гени RNAi конструкцияси тутмаган дурагайларга нисбатан сезиларли даражада яхшиланган. АН-Боёвут-2 \times Кокер-312 T_0 1 дурагайлари толасининг ўртача узунлиги 1.29 дюйм (9 расм), микронейри 4.3, пишиқлиги 31.75 г/текс.гача ўзгарган. Назорат ва *PHYA1* гени RNAi конструкцияси тутмаган дурагайларининг тола кўрсаткичлари ўхшаш бўлиб, тола узунлиги 1.19 дюйм, микронейри 4.6, пишиқлиги 30.61г./текс.ни ташкил қилди. Ушбу қийматлар ANOVA, $p \leq 0.05$ қиймати бўйича фарқланиши аниқланди.

Худди шу усул билан бошқа маҳаллий навларни ҳам дурагайлаш орқали

юқорида кўрилгандек натижаларга эришилди.



9-расм. *PHYA1* RNAi ғўза ва назорат ғўза ўсимликлари тола узунлигидаги фарқлар: 1, 2, 3 – маҳаллий АН-Боёвут-2 нави; 4, 5, 6 – F₆-авлод RNAi линия [RNAi Koker 312 (Т-1 оила) × АН-Боёвут-2]; 7, 8, 9 – F₆-авлод назорат ноль дурагай [АН-Боёвут-2 × Кокер-312 (RNAi сиз)]. Тола наъмуналари 2013 йил F₆ авлод генотиплар экилган синов дала майдонидан олинган.

RNAi гибридларнинг тола чиқими 33,82%ни, бир дона чигитдаги тукланиш миқдори ~ 12661 ни ташкил қилиб, назорат (тола чиқими - 34.04%, чигит тукланиши ~ 12979) ва ноль сегрегантларга (тола чиқими - 35,97%, чигит тукланиши ~ 13351) нисбатан камайиши кузатилди (ANOVA, $p \leq 0.05$). Бироқ битта чанокдаги чигит оғирлиги солиштирилганда RNAi дурагайлардаги оғирлик ~ 6,58 г, ноль-сегреганда эса ~ 6,08 г назорат навда ~ 6,13 г ни ташкил қилди, бу аса хосилдорликнинг 17%гача ортганлигидан далолат беради.

Диссертациянинг «*PHYA1* RNAi линиялари асосида биотехнологик нав яратиш ва ишлаб чиқаришга жорий этиш» номли бешинчи бобида RNAi технологиясида яратилган янги Порлоқ-1 ғўза навининг яратилиши, тола сифати таҳлиллари, ҳамда уларни ишлаб чиқаришга жорий қилиш бўйича олиб борилган тадқиқотлар ёритилган.

Тола типига эътибор берилса, назорат ғўзалардаги 4 типли тола, RNAi ғўзаларнинг аксарият генотипларида 2, 1, 1б, 1а типгача ўзгарганлиги диққатга сазовордир. Бу натижалар, RNAi технологияси ёрдамида толани ҳақиқатдан ҳам узайтириш мумкинлигини тўлиқ тасдиқлайди.

Махсус уруғчилик хўжалиги ноёб илмий объектида олиб борилган бир қатор илмий-тадқиқот ишлари натижасида кўплаб илмий ва амалий натижаларга эришилди. Жумладан, ҳар бир яратилган линиялар алоҳида тоқорлар асосида экилиб, агротехник чора тадбирлар бир хил тарзда амалга оширилиб, фенотипик ва молекуляр мониторинг ишлари олиб борилди. Линиялар ичидан тўпланган маълумотлар таҳлили натижаларига кўра RNAi технологияси асосида ғўзанинг янги тола сифати юқори, серҳосил, эртапишар ва сувсизликка чидамли Порлоқ-1 нави яратилди.

Порлоқ-1 нави супер элита уруғлари дастлаб 2013 йил мавсуми учун республикамиз пахтачилик худудларидаги уруғчилик фермер хўжаликларига тарқатилди ва бугунги кунга қадар ҳар йили уруғлик чигитлар етказиб берилмоқда.

Уруғлик чигитларни таёрлаш ишлари марказ махсус уруғчилик хўжалигида бажарилди. Уруғлик чигитларга «Ўздавуруғназорат» томонидан сертификат берилди. Супер элита уруғлик чигитлар толаси «СИФАТ» маркази томонидан текширилиб тола типлари аниқланди (3-жадвал).

3-жадвал

Порлоқ-1 навининг АН-Боёвут-2 навига нисбатан тола сифат кўрсаткичларидаги фарқлар

Нав номи	Микро-нейр (Mic)	Пишиқ-лиги (Str) г/текс	Узунлик, (УНМ) дюйм	Бир хиллик (Unf) %	Тола типи	Вегетация даври
АН-Боёвут-2 (назорат)	4,7	33,5	1,13	84,2	4	120-125
Порлоқ-1	4,3	40,1	1,27	86,5	2	110-115

2013 йил Республикамизнинг 6 та уруғчилик фермер хўжаликларида Порлоқ-1 ғўза нави жами 180 гектар майдонда экилиб, натижада 932 тонна пахта ҳосили тайёрланди. Шунингдек, нав экилган ҳар бир вилоятда 500 дондан, жами 3 мингта якка танловлар ажратиб олинган бўлиб, улар вилоятлар бўйича ҳар бир туманда 0,6 га майдонда жами 3.6 гектар майдонга экилди. 2017 йилда эса ушбу нав Республика пахтачилик майдонларининг 26 минг 517 гектарига, яъни 2013 йилга нисбатан деярли 150 баравар кўп майдонга экиб етиштирилди. Ушбу нав уруғлиги учун бўлган талабни қондириш мақсадида, 2014 йили Сурхандарё вилоятида бирламчи уруғчилик хўжалиги, 2016 йили Наманган вилояти Уйчи туманида Порлоқ-1 нави элита уруғчилик хўжаликлари ташкил қилинди. Бундан ташқари, доимий равишда ҳар йили марказ «Махсус уруғчилик хўжалиги»да вилоятлардаги уруғчилик фермер хўжаликларида супер элита уруғлик чигитлар тайёрлаб етказиб берилмоқда.

Шундай қилиб *in vitro* шароитида *PHYA1* гени RNAi соматик регенерант ўсимликлар табиий мухитга мослаштирилиб, маҳаллий нав билан дурагайлаш орқали бир нечта янги генотиплар ҳосил қилинди. Улар ичидан кўп марталик танлаш усули ёрдамида Порлоқ-1 ғўза нави яратилди. Бугунги кунда ушбу навга Интеллектуал мулк агентлигининг №NAP 00146 сонли патенти олинган бўлиб, вилоятлардаги ғўза уруғчилиги бирлашмаларида уруғчилик ишлари йўлга қўйилган. 2013 йилдан бугунги кунга қадар республикамизнинг пахта етиштирилаётган майдонларида экиб келинмоқда.

ХУЛОСАЛАР

«РНК интерференция технологияси асосида янги биотехнологик ғўза навлари яратиш» мавзусидаги фалсафа доктори (PhD) диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқот натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Илк бор Кокер-312 ғўза линияси геномига *pHellsgate8_PHYA1* ген конструкциясини киритилиши орқали, РНК интерференция жараёнининг

амалга оширилиши натижасида ўрта толали ғўзанинг тола сифат белгилари яхшиланиши исботланди.

2. RNAi технологияси асосида Кокер-312 ғўза линияси геномига *PHYA1* RNAi векторнинг трансформацияси кўплаб янги *PHYA1* RNAi генотипларини олиш имконини беради.

3. Кокер-312 линиясига *PHYA1* RNAi вектори киритилган усимликларда *PHYA1* генининг экспрессияси ТЗ-1_7 линияда 70%гача, ТЗ-31_10 линияда эса- 25%гача сусайиши ва шу билан бир қаторда фитохром оиласига оид бошқа генларнинг экспрессияси ўзгарганлиги аниқланди.

4. АН-Боёвут-2 нави билан *PHYA1* RNAi регенерант ғўза намуналарини дурагайлаш орқали бир нечта янги линиялар олинганлиги ва ушбу линияларда узига хос белгиларнинг ривожланиши *PHYA1* RNAi конструкциянинг аҳамиятини белгилайди.

5. *PHYA1* гени фаолияти сусайтирилган RNAi дурагай авлодларидан морфобиологик хусусиятлари ва тола сифат кўрсаткичлари яхшиланган бир нечта селекцион намуналарнинг олиниши RNAi технологияси асосида янги ғўза навларини яратиш самарасини кўрсатади.

6. RNAi ғўза оилаларида кенг даражада сегрегацияланишнинг юзага келиши *PHYA1* ген фаолияти турли даражада сусайганлиги билан боғлиқдир.

7. Илк бор RNAi технологиясини қўллаш орқали тола сифат кўрсаткичлари ҳамда муҳим агрономик белгилари юқори бўлган янги биотехнологик “Порлоқ-1” ғўза нави яратилиб, ишлаб чиқаришга жорий этилди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.29.08.2017.B.53.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ ГЕНЕТИКИ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И
НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

ЦЕНТР ГЕНОМИКИ И БИОИНФОРМАТИКИ

РУЗИБОВ ХАЙДАРАЛИ СОБИРЖОНОВИЧ

**СОЗДАНИЕ НОВЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИИ**

03.00.14 – Геномика, протеомика и биоинформатика

**АВТОРЕФЕРАТ
ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент-2018

Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2018.2.PhD/B228

Диссертация выполнена в центре Геномики и биоинформатики.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета и на Информационно-образовательном портале «Ziyouet».

Научный руководитель:

Буриев Забардаст Тожибоевич
доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Ризаева Сафия Мамедовна
доктор биологических наук, профессор

Мухамедов Рустам Султонович
доктор биологических наук, профессор

Ведущая организация:

институт биоорганической химии

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в ___ часов на заседании Научного совета DSc.29,08,2017.K/B/T.37.01 при Институте генетики и экспериментальной биологии растений и Национальном университете Узбекистана (Адрес: 111226, г. Ташкенская область, Кибрайский район, п/о Юкори-юз. Актовый зал Институте генетики и экспериментальной биологии растений. Тел.: (+99871)264-23-90, факс: (99871)264-22-30, e-mail: igebr@academy.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Институте генетики и экспериментальной биологии растений (регистрационный номер №___). (Адрес: 111226, г. Ташкенская область, Кибрайский район, п/о Юкори-юз. Тел.: (+99871)264-23-90.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2018 года

(реестр протокола рассылки № «___» от _____ 2018года).

А.А. Нариманов

Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.с-х.н.

С.М. Набиев

Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, к.б.н., с.н.с.

А.Т. Адьлова

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., с.н.с.

ВВЕДЕНИЕ (Аннотации диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. Постоянный рост населения в мире приводит к увеличению спроса на натуральные волокна, включая хлопковое волокно, которые широко используются в текстильной промышленности. Однако средняя температура воздуха в большинстве стран, производящих хлопковое волокно в средне климатической зоне отрицательно сказывается на широком распространении сортов хлопчатника на хлопковых полях. В то же время создание новых сортов с высококачественным волокном с использованием современных технологий в процессе селекции хлопка играет важную научно-практическую роль.

Большое внимание в мире уделяется целенаправленному изменению ценных экономических признаков, в том числе качества волокна, на основе использования генома хлопчатника. Неэффективность выращивания в странах с умеренным климатом тонковолокнистых сортов хлопчатника, в частности, недозревание урожая, обуславливает необходимость проведения современных исследований по созданию новых сортов с высоким качеством волокна и адаптированных к условиям средних климатических поясов. Следует отметить, что при передаче средневолокнистым сортам признаков тонковолокнистых сортов, таких как прочность и мягкость волокна в соответствии с традиционными методами, сортам также передаются другие агрономические признаки: у полученных новых гибридов наблюдается позднее созревание урожая и грубость волокна. Соответственно, сегодня исследования по геной инженерии требуют создания новых биотехнологических средневолокнистых сортов, приближенных по качеству волокна к тонковолокнистым сортам с помощью интерференции гена фитохрома *A1 (PHYA1)* в геноме местных сортов. В связи с этим, создание новых перспективных сортов хлопчатника и усовершенствование качества волокна в результате интерференции деятельности гена *PHYA1* фитохрома имеет актуальное научно-практическое значение. В настоящее время в республике проводятся мероприятия по интенсификации сельскохозяйственного производства, в частности хлопковой продукции, на основе инновационных селекционных достижений. Были идентифицированы маркеры ДНК, в том числе маркеры качества волокна, и созданы новые перспективные устойчивые к болезням сорта с высоким выходом волокна.

Стратегия дальнейшего развития Республики Узбекистан¹ определила задачу «...внедрения интенсивных методов сельскохозяйственного производства и создание новых селекционных сортов, адаптированных к местным климатическим и экологическим условиям». Исходя из этих задач, создание биотехнологических сортов с улучшенным качеством волокна путем получения линий с генотипом *PHYA1 RNAi* на основе технологии РНК

¹ Указ Президента Республики Узбекистан «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» за № УП-4947 от февраля 2017 г.

интерференции, гибридизацией с местными сортами хлопчатника и внедрение их в производство имеет важное научно-практическое значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указах Президента Республики Узбекистан № ПП-3683 от 27 апреля 2018 года «О мерах по усовершенствованию системы семеноводства в Республике Узбекистан», № ПП-3281 от 15 сентября 2017 года «О мерах по рационализации сельскохозяйственных культур и прогнозируемых объемах сельскохозяйственного производства», от 7 февраля 2017 года № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики –V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология охрана окружающей среды».

Степень изученности проблемы. Исследования, проведенные в мире над средневолокнистыми (*G. hirsutum*) и тонковолокнистыми (*G. barbadense*) сортами хлопчатника Jhon и др. в 1996 году, определили, что «антисмысловое» подавление активности гена Е6 на 60-98% не вызывает каких-либо значительных фенотипических изменений в развитии волокна у трансгенных растений. Эти исследования показали, что ген Е6 не имеет важного значения в процессе развития волокна. Ruan, Llewellyn и Furbank (2003) успешно сконструировали антисмысловой вектор для 70% подавления гена сахарат синтазы (*SUS*) хлопчатника, что привело к появлению фенотипа с неопушенными и сморщенными семенами. Tang и др. (2004) экспериментально оценили способность siRNA «элиминировать» генную активность путем таргетирования гена зеленого флуоресцентного белка (*GFP*). При выращивании трансгенных клеток хлопчатника в условиях *in vitro* показано, что достигнуто нокаутирование генов *GFP* при помощи двух конструкций siRNA. В. Zhang и др. (2015), G.J.Liu и др. (2015) секвенирован полный геном сортов Xinhai-21 тонковолокнистого хлопчатника (AD)₂ и сорта Texas Marker-1 (TM-1) средневолокнистого хлопчатника (AD)₁, что явилось важным источником для дальнейших исследований. Kumar и др. (2014) провели исследования по профилактике заражения вирусом скручивания листьев (CLCV). При этом была использована VIGS-опосредованная RNAi для воздействия на бетасателлитную ДНК CLCV Мультана. В нашей стране также были проведены исследования по улучшению качества волокна, с сохранением признаков скороспелости, устойчивости к болезням и урожайности в генотипах хлопчатника. I.Abdurakhmonov и др. (2012, 2014) на основе исследований по генетическому картированию генов хлопчатника, их классификации, изучению экспрессии, секвенирования создали и клонировали сотни генетических конструкций, провели работы по их трансформации в геном хлопчатника. Вышеприведенные сведения не полностью отражают

исследования по созданию новых биотехнологических сортов хлопчатника на основе технологии интерференции РНК. Поэтому важное значение имеет создание новых линий и сортов хлопчатника путем снижения активности гена *PHYA1*.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментального проекта ФАФ-4-Т149 (2007-2011) «Исследование структуры и функции гена в целях создания маркер-ассоциированной селекции» и прикладного молодежного проекта ФА-Ф10-Т92 (2009-2011) «Получение высококачественных трансгенных линий хлопка с использованием бинарных генетических векторов на основе синтетических RNAi-дуплексов для генов хлопчатника».

Целью исследования являлось создание нового биотехнологического сорта с улучшенным качеством волокна с помощью технологии RNAi для получения генной линии RNAi *PHYA1* Кокер-312 и гибридизации с местным сортом хлопчатника.

Задачи исследования:

Получение новых трансформантов через введение генной конструкции *pHellsgate8_PHYA1* в геном линии хлопчатника Кокер-312 на основе технологии РНК интерференции;

Адаптирование растений трансформантов RNAi к почвенным условиям, проведение первичных фенотипических наблюдений и повышение количества поколений;

Отбор генотипов с генной конструкцией *pHellsgate8_PHYA1* в геноме методом ПЦР и гель-электрофореза;

Получение новых комбинаций гибридов на основе гибридизации образцов хлопчатника RNAi с местным сортом АН-Боёвут-2;

Изучение различных морфо-биологических признаков данных гибридов;

Исследование наличия генной конструкции *pHellsgate8_PHYA1* в геноме каждого поколения гибридов RNAi;

Создание нового сорта путем отбора генотипов среди RNAi растений с улучшенным качеством волокна.

Объектом исследования являлись векторная конструкция *pHellsgate8_PHYA1*, местный сорт хлопчатника АН-Боёвут-2 (*G. hirsutum* L.) и линия Кокер-312.

Предметом исследования является использование современной технологии RNAi для улучшения качества волокна и усовершенствование морфо-биологических свойств этих сортов (*G. hirsutum* L.).

Методы исследования. При выполнении диссертационной работы были использованы современные биотехнологические методы исследования: выделение ДНК из растительной ткани; агробактериальная трансформация; гель-электрофорез; полимеразная цепная реакция (ПЦР); ПЦР в реальном времени (qRT-ПЦР); генотипирование; гибридизация; самоопыление; биоинформатические и статистические методы.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

составлены RNAi векторные конструкции *pHellsgate-8_PHYA1*, связанные с контролем влияния красного и дальнего красного света на фоторецепторы;

впервые путем трансформации RNAi векторной конструкции *pHellsgate-8_PHYA1* получены регенерантные эмбрионидные растения хлопчатника;

впервые созданы RNAi *PHYA1* линии растения Кокер-312 (*G. Hirsutum* L.);

впервые обнаружено, что у трансформантов T_{3-1_7} линии Кокер-312 с RNAi вектором *pHellsgate-8_PHYA1* транскрипты *PHYA1* уменьшались до 70%, у растений T_{3-31_10} до ~ 25%;

впервые разработан метод создания скороспелого, высокоурожайного, с улучшенным качеством волокна нового сорта хлопчатника с генотипом *PHYA1* RNAi на основе средневолокнистого местного сорта хлопчатника.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

создано около 50 RNAi *PHYA1* линий на основе растений линии Кокер-312 и новые сорта растений, созданные при помощи геномных технологий, были помещены в коллекцию гермоплазмы хлопчатника;

разработан новый биотехнологический сорт хлопчатника «Порлок-1» с генотипом RNAi *PHYA1*, обладающий улучшенным качеством волокна, скороспелостью, высокой урожайностью, на основе средневолокнистого местного сорта хлопчатника.

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием современных генных технологий и подходов, использовании методов вариационного анализа ANOVA при статистической обработке полученных данных, обсуждением результатов исследований на международных и республиканских научных конференциях и полевыми испытаниями созданного на основе многолетних исследований сорта «Порлок-1» в течение 2013-2017 годов на более чем 105 гектарах хлопковых полей

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость полученных результатов исследования заключается в том, что разработаны основы получения RNAi генотипных линий хлопчатника методом соматического эмбриогенеза, на основе статистической оценки фенотипических и генотипических анализов регенерантов охарактеризованы свойства RNAi гена *PHYA1* и проведен молекулярный анализ наследования признаков.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что обоснованы возможности получения линий *PHYA1* RNAi различных сортов хлопчатника, показана эффективность использования RNAi технологии при отборе форм с высокой урожайностью и улучшенным качеством волокна, доказана возможность использования линии с RNAi

PHYA1 в качестве основы для гибридизации с местным сортом для создания нового сорта.

Внедрение результатов исследования. На основе научных результатов по созданию новых биотехнологических сортов хлопка с использованием технологии интерференции РНК:

получен патент Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (№.NAP 00146 от 22.02.2017 г.) на новый биотехнологический сорт хлопчатника «Порлок-1» с RNAi *PHYA1* генотипом, улучшенным качеством волокна, скороспелостью, высокой урожайностью и улучшенными агрономическими параметрами, созданный на основе местного сорта средневолокнистого хлопчатника (*G. hirsutum* L.). В результате получена возможность создания новых линий и биотехнологических сортов хлопчатника за счет трансформации векторными конструкциями;

Сорт хлопчатника «Порлок-1» был высеян в Сурхандарьинской, Джиззакской, Сырдарьинской и Наманганской областях республики на более чем 105 тыс. гектарах хлопковых полей в стране (Справка Министерства сельского хозяйства и водных ресурсов Республики Узбекистан от 20 апреля 2018 года, № 01 / 20-27). В результате получена возможность производить высококачественное волокно из сорта хлопчатника «Порлок-1»;

Современная RNAi технология селекции сортов средневолокнистого хлопчатника (*G.hirsutum* L.) использована в инновационном проекте И5-ФҚ-0-89870 «Производство и постоянное размножение суперэлитных семян геннокаутных сортов хлопчатника Порлок» для организации первичного семеноводства сортов хлопчатника (Справка Академии наук Республики Узбекистан № 4/1255-655 от 14 марта 2018 года). В результате с использованием технологии RNAi из созданных линий удалось получить новые биотехнологические сорта и подготовить высококачественные элитные семена.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования прошли апробацию на 1 международной и 9 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 6 научных работ, в том числе 5 – в республиканских и 1 – в зарубежном журнале, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 90 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность и востребованность темы диссертации, сформированы цели и задачи, а также объект и предмет исследования, приведено соответствие исследований приоритетным направлениям развития науки и технологий республики Узбекистан, изложены научная новизна и практические результаты исследований, раскрыты теоретическая и практическая значимость полученных результатов, даны сведения по внедрению результатов исследований в практику, по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Применение и эффективность технологии RNAi в современной биотехнологии»** дан обзор исследований зарубежных и отечественных ученых по данной проблеме.

Представлены достоинства технологии RNAi, сведения о применении данного метода для повышения устойчивости хлопчатника к абиотическим и биотическим факторам. Также представлены исследования, касающиеся значимости RNAi технологии в борьбе на молекулярном уровне с негативными воздействиями в селекции хлопчатника, а также в раскрытии деятельности генов, отвечающих за качественные показатели у генотипа.

Вторая глава диссертации **«Условие и место проведения работ, источники и методы исследований»** описываются методы, условия и материалы исследования. Описаны методы, используемые для растительных материалов, реагенты, оборудование, современные биотехнологические методы исследования: выделение ДНК из растительной ткани; проведение агробактериальной трансформации; гель-электрофорез; полимеразная цепная реакция; ПЦР в реальном времени (RT-qПЦР); генотипирование; гибридизация; самоопыление; биоинформатические и статистические методы анализа.

Объектом исследования были векторная конструкция *pHellsgate8_PHYA1*, местный сорт хлопчатника АН-Боёвут-2 (*G. Hirsutum* L.), Кокер-312, а также полученные в процессе работы новые *PHYA1* RNAi генотипы.

В третьей главе диссертации **«Получение новых генотипов линии Кокер-312 с супрессией гена фитохрома A1 (PHYA1) с помощью технологии RNAi»** поэтапно описано создание RNAi *PHYA1* векторной конструкции, её структура, а также, с учетом функции фитохрома A1 растений в рецепции красного и дальнего красного света и возможности ее модификации, освещены исследования по трансформации растительной ткани данной конструкцией, кроме этого дан анализ молекулярных и внешних фенотипических признаков полученных соматических регенерантов.

Первоначально была разработана векторная конструкция для подавления активности гена *PHYA1* (RNAi) (рисунок 1), которая далее была

трансформирована в бактерию *Agrobacterium tumifaciens*.

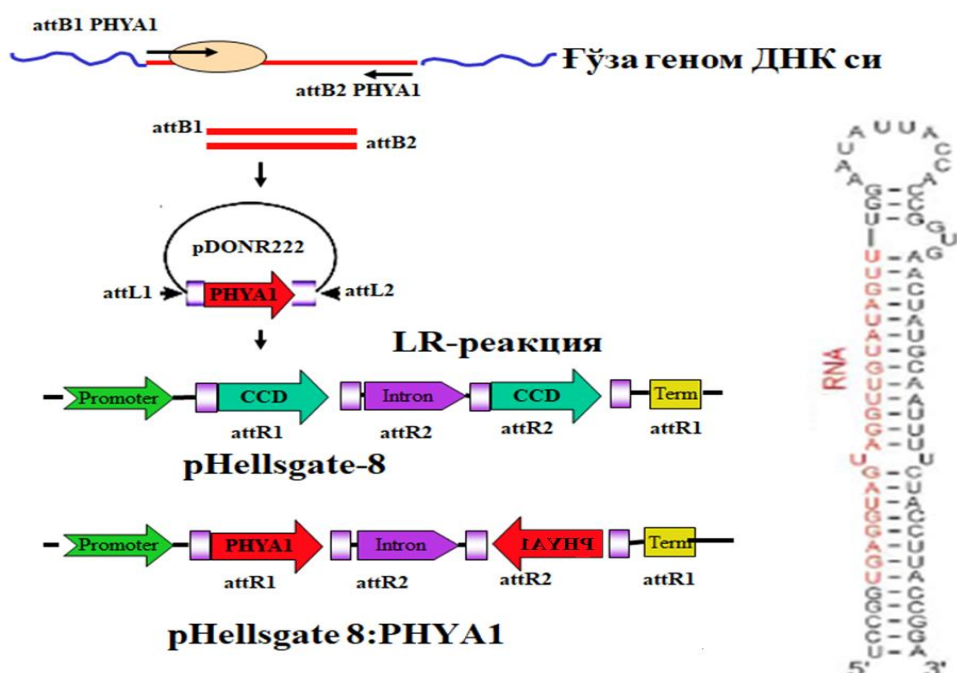


Рисунок 1. Структура векторной конструкции *pHellsgate-8_PHYA1*

После получения положительных результатов с помощью ПЦР о наличии введенной конструкции в бактериальном штамме, проводили следующую процедуру агробактериальной трансформации растительной ткани. В условиях *in vitro* после образования из соматических клеток тканей, а затем из тканей первичных органов были получены регенерантные растения. В результате соматического эмбриогенеза было получено 68 растений, 15 из которых, как было установлено методом молекулярного анализа, не содержали вставку. Как показал анализ *PHYA1* RNAi эмбриоидов, у них наблюдалось увеличение темпов развития, удлинение корневой системы и черешков листьев по сравнению с регенерантами, не содержащими вставку (рисунок 2).

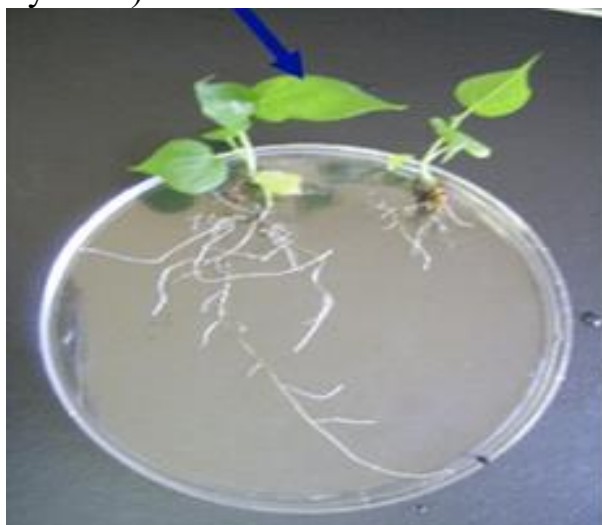


Рисунок 2. Регенерантные растения, полученные соматическим эмбриогенезом: слева - трансформированные, справа без трансформации.

На следующем этапе после выращивания в условиях *in vitro* трансформированные растения были перенесены в почву. В фитотроне, в одинаковых условиях, проводилось обследование фенотипических признаков растений T_0 поколения, контрольных форм, а также RNAi генотипов. Анализ результатов наблюдений за процессами роста и развития контрольных и RNAi растений T_0 поколения показал, что трансформанты с RNAi конструкцией в геноме имеют большую высоту стебля, увеличенные размеры листа и коробочки, более развитую корневую систему, более раннее цветение и раскрытие коробочек, а также более удлиненные (на 5 мм или на 17%) волокно, по сравнению с контрольными растениями (рисунок 3).

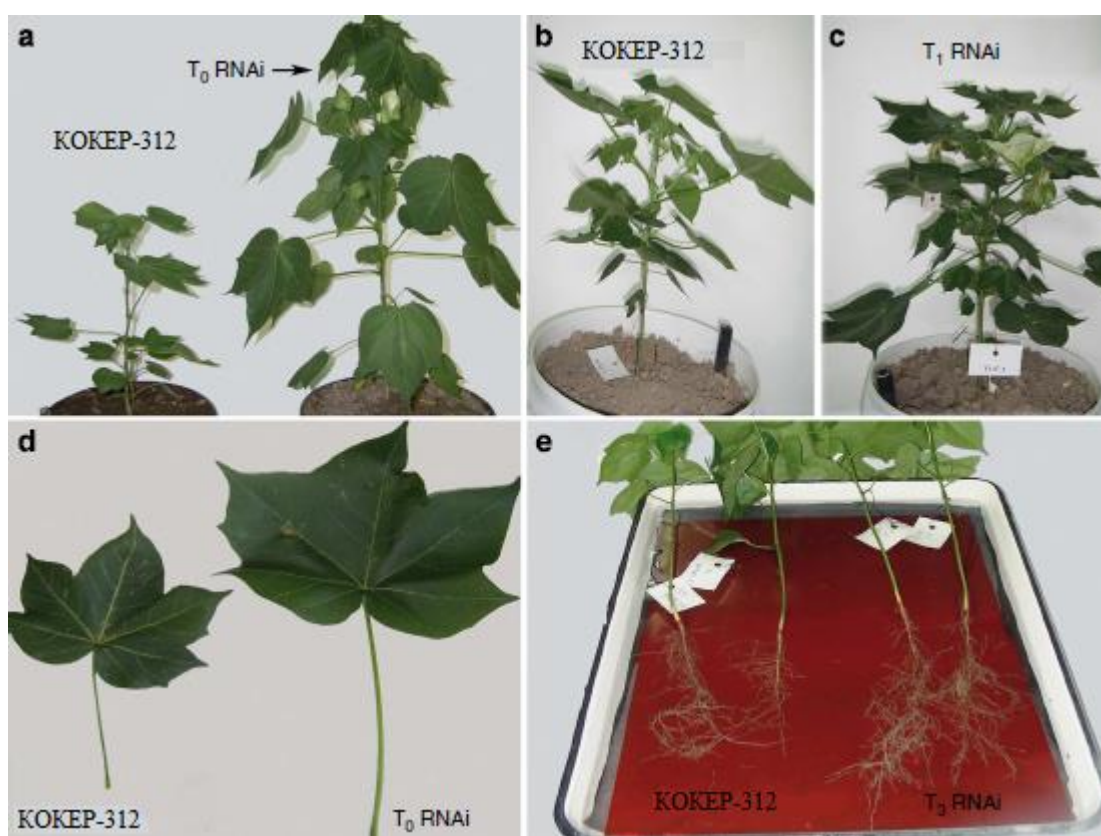


Рисунок 3. Сравнение контрольных и *PHYA1* RNAi растений по различным фенотипическим признакам: (а) темпы роста; (b, c) сроки цветения; (d) длина листового черешка; (e) развитие корневой системы.

Молекулярный скрининг T_0 и T_1 растений, проведенный с целью выявления введенной конструкции в геноме трансформированных растений показал присутствие у них вставки, аналогичной по размеру и по последовательности нуклеотидов той, что содержалась в сконструированном плазмидном векторе *pHellsgate-8_PHYA1*. В то же время ДНК контрольного растения Кокер-312, не несущего подобную конструкцию, не дает ПЦР – продукт (рисунок 4, 3).

При сравнении трансформированных и нетрансформированных растений (Кокер-312, трансформированные T_1 растения и ноль-сегреганты) было обнаружено, что генотипы, содержащие RNAi конструкцию, зацветают на 5-10 дней раньше и имеют ускоренные темпы вегетации.

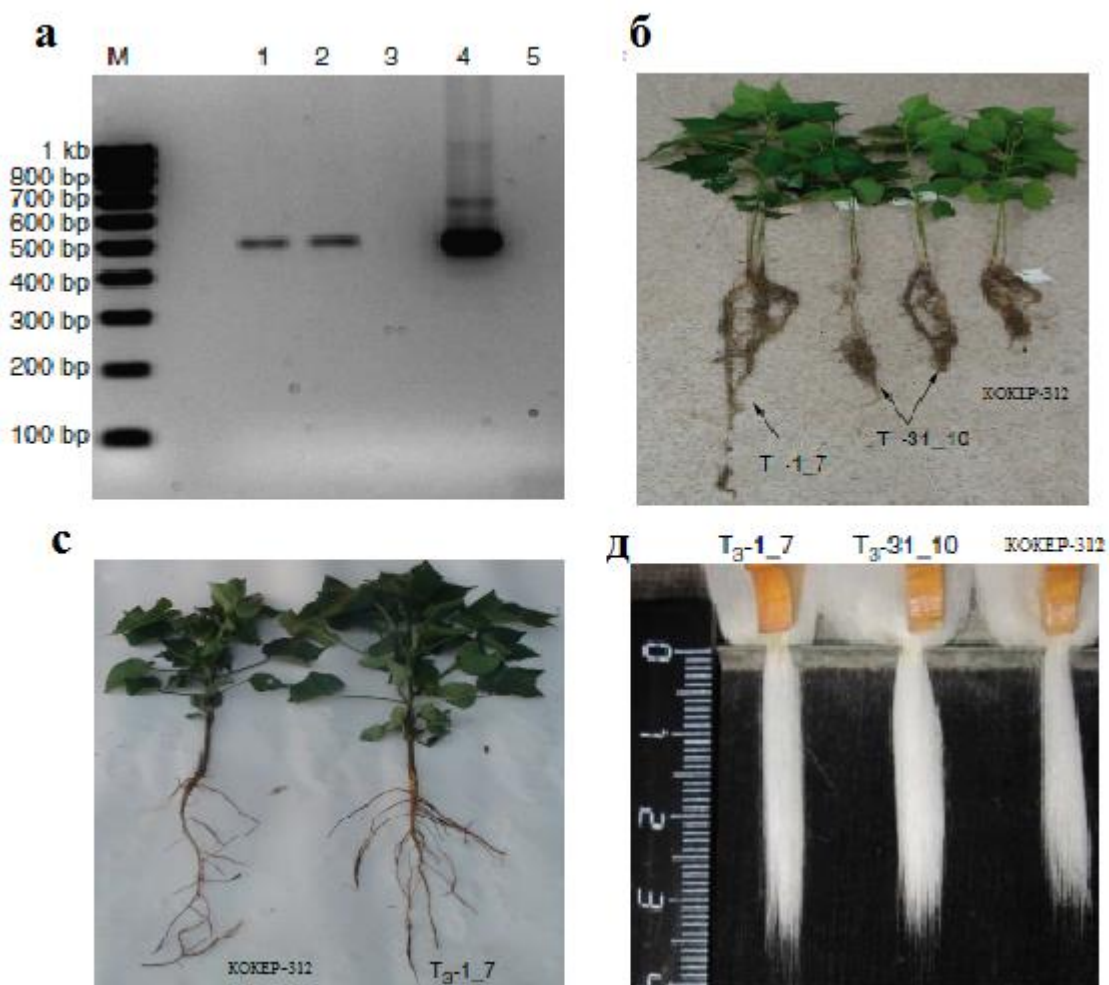


Рисунок 4. Молекулярный (а) и фенотипический анализ (b,c,d) семейства *PHYA1* RNAi растений T₃ поколения: (а) ПЦР анализ с использованием пары праймеров PDK 35S-F/R. М-маркер 100 п.о., 1 - T_{3-1_7}, 2 - T_{3-31_10}, 3 - Кокер-312, 4 - плазмида *phellsgate-8_PHYA1* (позитивный контроль), 5 –ПЦР без ДНК (негативный контроль); (б) корневая система растений T₁-поколения; (с) корневая система растений T₃-поколения; (д) длина волокна.

Семена, полученные от растений T₀ поколения, высаживали и получали растения T₁ поколения. Анализ данных, полученных в результате наблюдений за последующими поколениями трансгенных растений с использованием специальной статистической программы ANOVA, показал заметное удлинение у них гипокотыля, увеличение корневой системы (таблица 1), большее, по сравнению с контролем, количество цветков и раннее раскрытие коробочек (таблица 2). Также наблюдалось более интенсивное антоциановое окрашивание коробочек, листьев и стеблей у RNAi линий. Визуальное увеличение длины волокна на 5-7 мм (рисунок 5) также подтвердилось данными HVI анализов.

В таблице 1 приведены средние показатели по длине гипокотыля и массе корней у трансформированных и нетрансформированных растений T₂₋₅ поколений, высеваемых в полевых условиях. При этом как молекулярный, так и фенотипический анализ этих генотипов показал, что тестируемые признаки стабильно наследуются. Анализ взаимоотношений между разными генотипами и неоднородностью условий при оценке фенотипа показал

существование достоверных различий ($p < 0,01$) по длине гипокотыля между Кокер-312 и Т-1, а также Т-31 RNAi линиями; между ноль-сегрегантами и Т-1, а также Т-31 RNAi линиями; между Кокер-312 и ноль-сегрегантами, с одной стороны, и Т-1 и Т-31 линиями, с другой.

Таблица 1
Сравнительный анализ RNAi (T₂₋₅) и контрольных растений по длине гипокотыля и массе корней.

1	2	3	4	5	6	7	8
длина гипокотыля, см.							
Кокер-312	линия	3	80	27	3.83 ^b	1.33	0.26
Ноль сегрегант	T ₃	6	90	81	3.42 ^b	0.98	0.11
Т-31	T ₅	3	100	41	5.54 ^{acd}	0.89	0.14
Т-1	T ₅	3	100	44	5.13 ^{acd}	1.03	0.15
масса корней, г.							
Кокер-312	линия	3	80	27	0.110 ^b	0.006	0.003
Ноль сегрегант	T ₃	6	100	49	0.106 ^b	0.022	0.009
Т-31	T ₅	3	100	41	0.124 ^a	0.010	0.006
Т-1	T ₅	3	100	44	0.116 ^a	0.006	0.003

Примечание: 1 - генотипы; 2 - поколение; 3 – число повторов; 4 - процент неопределенности, %; 5 – число растений, шт; 6 – средняя длина гипокотыля, см (верхний фрагмент таблицы) или средняя масса корней, г (нижний фрагмент таблицы); 7 - стандартное отклонение; 8 – стандартная ошибка.

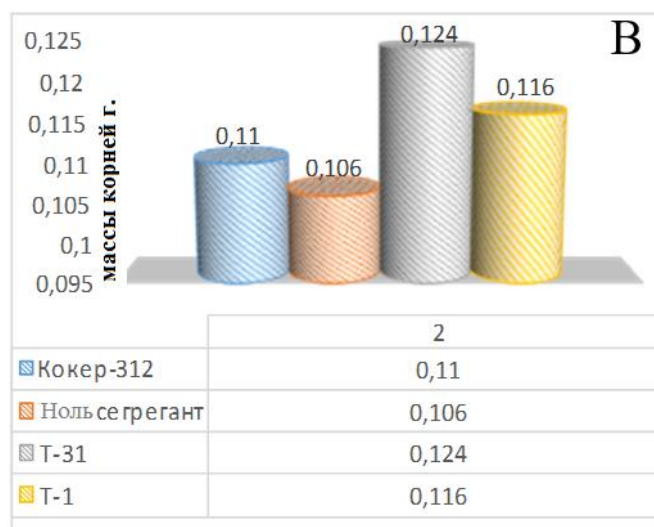
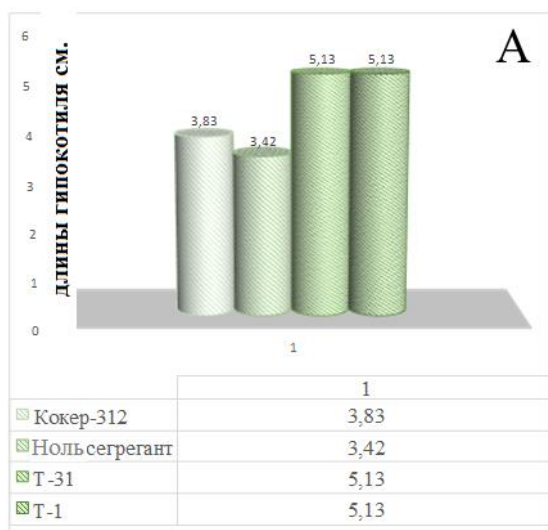


Рисунок 5. Сравнение длины гипокотыля (А) и массы корней (В) у RNAi (T₂₋₅) линий и контрольных растений хлопчатника

Анализ показателей волокна и урожайности. На основе фенотипической оценки растений второго (T₂) поколения, выращенных в полевых условиях, были отобраны две семьи T₂-1 и T₂-31 с высоким качеством волокна и урожайностью (рисунок 6). Генотипически эти две семьи различались между собой по количеству копий pHellsgate-8::*PHYA1* RNAi конструкции: геном растений семейства T₃-1_7 нес три копии, а T₃-31_10 – две копии этой вставки. Кроме этого, как показано на рис.7, растения также различаются по уровню экспрессии фитохрома *A1*.

Учитывая увеличение длины гипокотыля, развитие корневой системы, а

также улучшение качества волокна этих двух отобранных семей были изучены и их последующие поколения. При сравнении контрольных растений, не имеющих *PHYA1* интерферирующую систему, с RNAi генотипами, у последних было отмечено значительное удлинение волокна (на 5%), улучшение показателей микронейра (на 4-8%) и однородности волокна (на 5%) (ANOVA, $p \leq 0,01$). Также было отмечено улучшение у них прочности волокна (на 5%), зрелости (на 2-10%) и белизны волокна (+ B) (ANOVA, $p \leq 0,01$). Вместе с тем, по количеству волокна на одно семя достоверных различий между Кокер-312 (~10848), ноль-сегрегантами (~10485) и *PHYA1* RNAi линиями (10492, ~10289) не было выявлено. Однако, с учетом того, что вес хлопка-сырца одной коробочки в контроле составил ~ 5.67 г, у 0-сегреганта ~5.57 г, а у генотипов RNAi ~ 6.37-6.41 г, это равноценно увеличению выхода семян у растений RNAi линий на 3%.

Таблица 2

Анализ количества цветков и коробочек контрольных и RNAi растений хлопчатника

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кол-во цветков								
Кокер-312	2009	сорт	4	168	27 июль	1.01 ^b	0.423	0.21
Кокер-312*	2009	R ₂	2	80	27 июль	1.09 ^b	0.375	0.27
PHYA1-RNAi	2009	T ₂	6	663	27 июль	3.85 ^{ac}	2.486	1.01
Кокер-312	2010	сорт	3	1880	10 июль	0.74	0.041	0.02
PHYA1-RNAi	2010	T ₃	3	1224	10 июль	0.81	0.079	0.05
Кол-во коробочек								
Кокер-312	2009	сорт	4	60	15 сентябрь	26,07 ^b	9,54	1,23
Кокер-312*	2009	R ₂	2	54	15 сентябрь	27,7 ^b	13,30	1,81
PHYA1-RNAi	2009	T ₂	6	198	15 сентябрь	35,7 ^{acd}	16,98	1,21
Кокер-312	2010	сорт	3	2012	15 июль	9,88	0,18	0,10
PHYA1-RNAi	2010	T ₃	4	1614	15 июль	12,87	3,32	1,66

Примечание: (2009-2010 гг.) 1 - генотип; 2- годы; 3- поколение; 4- кол-во повторов; 5 – кол-во растений; 6- дата; 7 – среднее значение количества цветков (верхний фрагмент таблицы) или количества коробочек (нижний фрагмент таблицы) ; 8 – стандартное отклонение; 9 – стандартная ошибка .

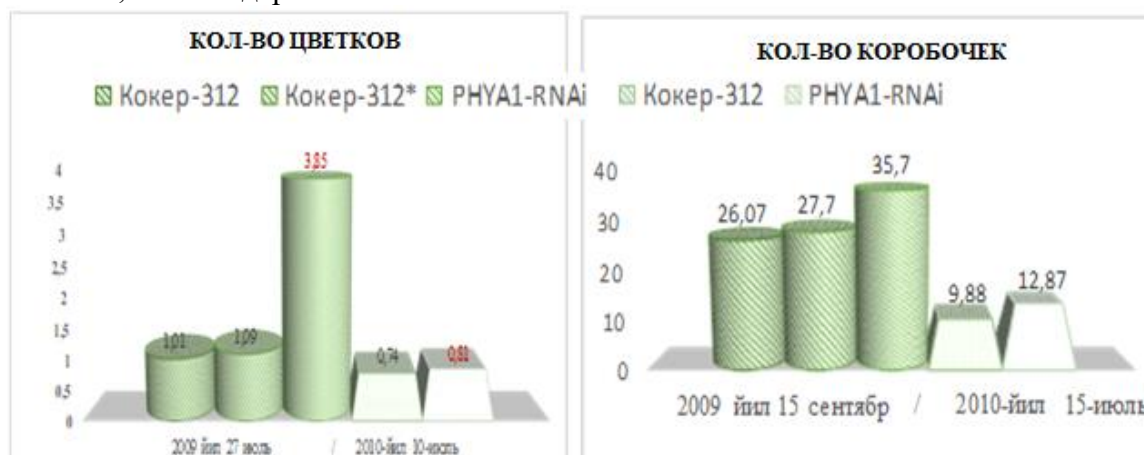


Рисунок 6. Анализ различий между генотипами, содержащими и не содержащими *PHYA1* RNAi конструкцию с использованием программы ANOVA при $p < 0,01$: линия Кокер-312, Кокер-312* - ПЦР-отрицательные, т.е. не содержащие *PHYA1* RNAi

вставку регенеранты и *PHYA1* RNA линии культивированы в одинаковых условиях.

В наших исследованиях мы не затрагивали гены *PHYA2*, *PHYB* или другие члены семейства фитохромов. Тем не менее, нам было интересно посмотреть, как супрессия фитохрома A1 отражается на уровне экспрессии других фитохромных генов. Для этого нами был использован метод RT-qPCR (количественный ПЦР в комбинации с реакцией обратной транскрипции), позволяющий сравнивать уровни мРНК у разных генотипах. Как видно из рисунка 7, введение в геном Кокер-312 *PHYA1* RNAi вектора привело к заметному уменьшению количества у RNAi линий фитохрома A1: содержание транскриптов *PHYA1* у растений линии T3-31_10 падало до 25%, а у линии T3-1_7 – до 70 % по отношению к их уровню в контрольном образце. Одновременно с этим было обнаружено компенсаторное увеличение экспрессии большинства других генов семейства фитохромов. В частности, у растений линии T3-1_7 экспрессия генов *PHYA2*, *PHYB*, *PHYC* и *PHYE* увеличивалась от 2 до 20 раз (рисунок 7).

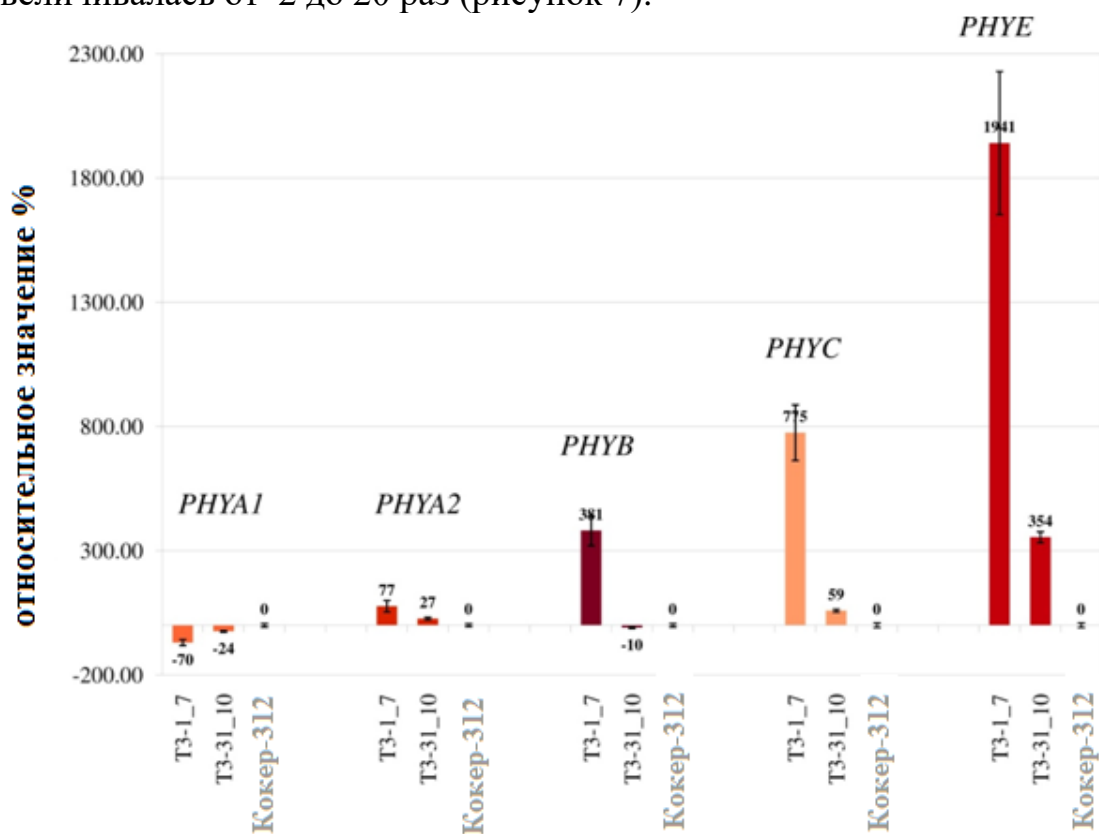


Рисунок 7. Количественное содержание у *PHYA1* RNA линий хлопчатника транскриптов различных фитохромных генов (A1, A2, B, C и E) по отношению к Кокер-312.

В четвертой главе диссертации «Получение новых биотехнологических линий путем гибридизации растений *PHYA1* RNAi с местным сортом хлопчатника» приведены данные по анализу результатов, полученных при исследовании передачи свойств *PHYA1* RNAi регенерантного растения T₀ с высокими показателями качества волокна местному сорту, получению последующих поколений гибридов путем самоопыления каждого

растения индивидуально, мониторингу и анализу наследования RNAi свойств, а также выполненные работы по созданию нового сорта хлопчатника на основе полученных результатов.

В частности, были получены несколько генотипов путем скрещивания T₀ поколения линии Кокер-312 с генотипом *PHYA1* RNAi с местным сортом. На основе результатов ПЦР и анализа фенотипических признаков из гибридов (АН-Боёвут × T₀-1) первого (T₁) и второго (T₂) поколений растений путем многократного отбора была выделена линия с интенсивным вегетативным развитием, большим количеством цветков и коробочек, более ранним (на 5-10 дней) цветением, с насыщенной антоциановой пигментацией на поверхности листьев, стебля и коробочек (Рисунок 8).

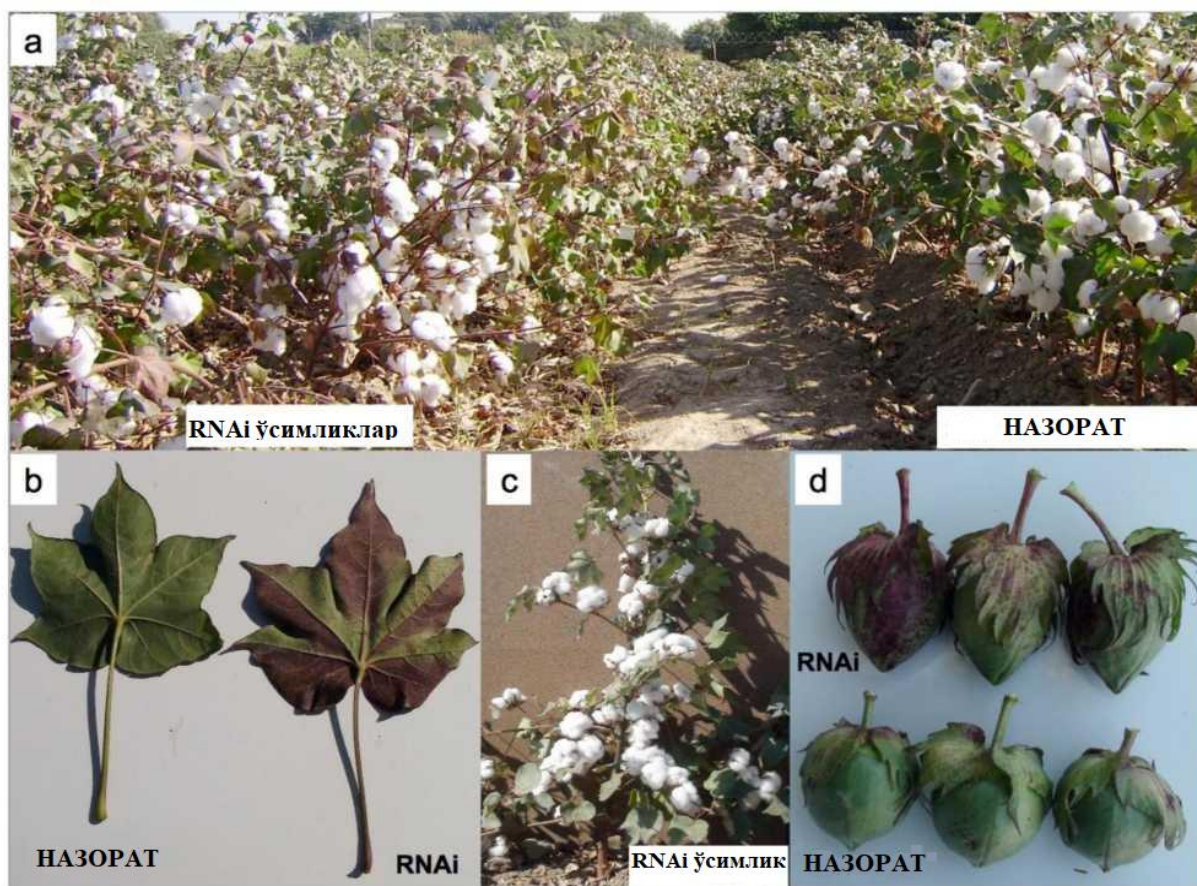


Рисунок 8. Визуализация признаков *PHYA1* RNAi линий у гибридных растений АН-Боёвут-2 × RNAi Кокер-312 (T₀-1): (а) антоциановый «загар»; (b) антоциановые пятна на поверхности листьев; (d) антоциановая пигментация коробочек; (с) общий вид созданной RNAi линии.

У гибридов в поколениях F₂ и F₃ основные качественные признаки волокна значительно улучшились по сравнению с контрольным сортом и ноль-сегрегантами (гибридами без RNAi конструкции). Средняя длина волокна гибридов АН-Боёвут-2 × Кокер-312 T₀1 составляла до 1.29 дюйма (рисунок 9), значение микронейра - до 4.36 и прочности - до 31.75 г/текс. Показатели качества волокна контрольных и ноль-сегрегантов были близки друг к другу и составляли 1,19 дюйм, 4,64 и 30,61 г/текс, соответственно.

Эти значения были определены при помощи теста ANOVA, $p \leq 0,05$.

Подобные результаты были достигнуты у гибридов, полученных путем скрещивания RNAi Кокер-312 с другими местными сортами хлопчатника.

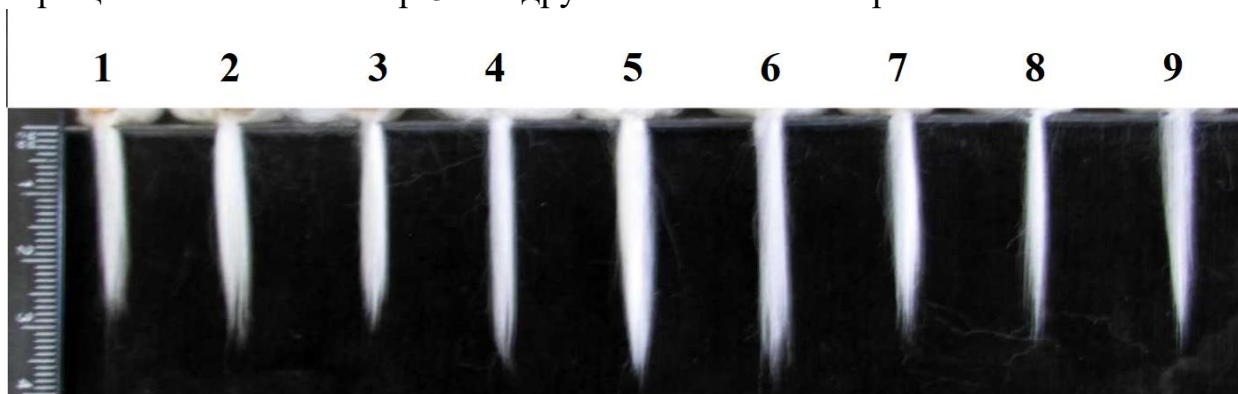


Рисунок 9. Сравнение длины волокна у различных генотипов: 1, 2, 3 - местный сорт АН-Боёвут-2; 4, 5, 6 – шестое (F_6) поколение гибридов [(АН-Боёвут -2 x RNAi Кокер 312 (семейство Т-1)]; 7, 8, 9 - F_6 поколение гибридного ноль-сегреганта [(АН-Боёвут -2 × Кокер 312 (без RNAi)]. Представлены образцы волокна генотипов F_6 поколения, полученные на опытном участке в 2013 году.

У RNAi гибридов выход волокна составлял 33,82%, а среднее значение опушенности семян соответствовала ~ 12661 , что было слегка понижено по сравнению с ноль-сегрегантами (выход волокна - 34.04%, опушенность семян ~ 12979) и контролем (выход волокна - 35,97%, опушенность семян ~ 13351) (ANOVA, $p \leq 0.05$). Однако если сравнение проводить по массе семян в одной коробочке, то у гибридов RNAi этот показатель составлял $\sim 6,58$ г, у ноль-сегрегантов $\sim 6,08$ г и у контроля $\sim 6,13$ г, что адекватно повышению урожайности гибридов до 17%.

В пятой главе диссертации «Создание и внедрение в производство биотехнологических сортов, созданных на основе линии *PHYA1 RNAi*» приведены анализы качества волокна нового сорта Порлок-1, созданного при помощи RNAi технологии, и освещены исследования, проведенные по внедрению данного сорта в производство.

Обращает на себя внимание тот факт, что RNAi генотипы имеют волокно преимущественно 2, 1, 1b и 1a типов против 4 типа, присущего контрольным растениям. Эти результаты полностью подтверждают, что используя технологию RNA интерференции, можно вызвать удлинение волокна.

Благодаря исследованиям, проведенным в Специальном семеноводческом хозяйстве, являющемся уникальным научным объектом, достигнуто множество научных и практических результатов. В частности, путем обобщения данных, полученных с использованием технологии RNAi, был создан новый, качественный, высокоурожайный, длиноволокнистый, засухоустойчивый сорт хлопчатника Порлок-1. В течение посевного сезона 2013 года суперэлитные семена сорта Порлок 1 были распространены среди семеноводческих фермерских хозяйств хлопкосеющих регионов республики.

Работы по подготовке семян были выполнены в Специальном семеноводческом хозяйстве Центра геномики и биоинформатики. Семена

были сертифицированы в «Уздавургуназорат». Качество волокна суперэлитных семян было тестировано в Центре «СИФАТ» (Таблица 3).

Таблица 3

Сравнительный анализ показателей качества волокна сортов Порлок-1 и АН-Боёвут-2

Наименование сорта	Микро-нейр (Mic)	Прочность (Str) г/текс	Длина, (УНМ) дюйм	Однородность (Unf) %	Тип волокна	Период вегетации	Урожайность, ц/га
АН-Баявут-2 (контроль)	4,7	33,5	1,13	84,2	4	120	32
Порлок-1	4,3	40,1	1,27	86,5	2	110	53,8

В 2013 году сорт Порлок-1 был посеян в шести семеноводческих хозяйствах нашей республики на площади в 180 гектаров земли и получено 932 тонны урожая хлопка сырца. Кроме этого, в каждой области было отобрано по 500, в общей сложности, 3000 индивидуальных выборок, которые были высажены на площади по 0,6 га в каждом районе или общей площади в 3,6 га. В 2017 году этот сорт был культивирован на территории в 26517 га, что почти в 150 раз больше, чем в 2013 году. С целью удовлетворения спроса на семенную продукцию в Сурхандарьинской области организовано первичное семенное хозяйство, в Уйчинском районе Наманганской области было создано элитное семеноводческое хозяйство, занимающееся размножением семян сорта «Порлок-1». Кроме того, каждый год «Специальное семеноводческое хозяйство» Центра геномики и биоинформатики на постоянной основе производит и доставляет семена суперэлитных сортов на семеноводческие фермерские хозяйства.

Таким образом, соматические регенерантные растения, полученные в условиях *in vitro*, адаптированы к почвенным условиям; путем гибридизации их с местными сортами хлопчатника получены нескольких новых генотипов. Из них путем многократного отбора создан сорт хлопчатника Порлок-1. В настоящее время на данный сорт получен патент Агентства интеллектуальной собственности №NAP 00146 и налажена работа в областных семеноводческих хозяйствах. Данный сорт, начиная с 2013 года, широко высевается на хлопковых площадях республики.

ВЫВОДЫ

По результатам исследований по диссертационной работе доктора философии (PhD) «Создание новых сортов хлопчатника с использованием технологии РНК интерференции» были представлены следующие выводы:

1. Впервые доказано, что введение конструкции гена *pHellsgate8_PHYA1* в линии хлопчатника Кокер-312 приводит к улучшению качества волокна средневолокнистого хлопчатника за счет РНК интерференции.

2. RNAi технология путем трансформации *PHYA1* RNAi вектора в геном линии хлопчатника Кокер-312 позволяет получить множество новых

генотипов.

3. Установлено, что введение в геном Кокер-312 *PHYA1* RNAi вектора индуцирует падение у RNAi растений экспрессии гена *PHYA1*, на 70% -у линии T₃-1_7 и на 25% – у линии T₃-31_10, одновременно с этим выявлены изменения в экспрессии других генов семейства фитохромов.

4. Получение нескольких новых линий хлопчатника путем гибридизации сорта АН-Боёвут-2 с RNAi *PHYA1* Кокер-312 регенерантными формами, а также особенности развития у них признаков, указывают на значение *PHYA1* RNAi конструкции.

5. Возможность получения нескольких селекционных образцов с улучшенными морфо-биологическими свойствами и показателями качества волокна от гибридов RNAi с ингибированным геном *PHYA1* демонстрирует эффективность создания новых сортов хлопчатника на основе технологии РНК интерференции.

6. Наличие широкой сегрегации среди генотипов RNAi линий связано с различной степенью супрессии гена *PHYA1*.

7. С использованием технологии RNAi создан новый биотехнологический сорт Порлок-1 с высокими показателями качества волокна и важными агрономическими признаками.

**DSc.29.08.2017.B.53.01 AT THE INSTITUTE OF GENETICS AND PLANT
EXPERIMENTAL BIOLOGY AND NATIONAL UNIVERSITY
OF UZBEKISTAN**

CENTER OF GENOMICS AND BIOINFORMATICS

RUZIBOEV HAYDARALI SOBIRJONOVICH

**CREATION OF NEW COTTON VARIETIES USING RNA
INTERFERENTION TECHNOLOGY**

03.00.03 – Genomics, proteomics and bioinformatics

**DISSERTATION ABSTRACT FOR THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD)
OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2018

This dissertation of PhD has been registered with the number B2018.2.PhD/B228 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan

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

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council and on the website of “ZiyoNet” information and educational portal.

Scientific supervisor: **Buriev Zabardast Todjiboevich**
doctor of biological sciences

Official opponents: **Rizaeva Safiya Mamedovna**
doctor of biological sciences, professor

Mukhamedov Rustam Sultanovich
doctor of biological sciences. professor

Leading organisation: Institute of Bioorganic chemistry

The defence of the dissertation will take place on “___” _____ 2018 year _____ at the meeting of the Scientific council DSc.29.08.2017.B.53.01 on award of scientific degrees at the Institute of Genetics and Experimental Biology of Plants and National University of Uzbekistan at the following (Address: 111226, Tashkent region, Kibray district, vil. Yukori-Yuz, meeting room of the Institute of Genetics and Experimental Biology of Plants Phone: (+99871) 264-23-90; fax: (+99871) 264-22-30; e-mail: igebr@academy.uz).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of Genetics and Experimental Biology of Plants (registration number _____) (Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: (+99871) 264-23-90; fax: (+99871) 264-22-30).

Abstract of dissertation is distributed on “___” _____ 2018 year
(Protocol at the register _____ on “___” _____ 2018 year.)

A.A. Narimanov
Chairman of scientific council on award of
scientific degrees, D.Agr.Sc.

C.M. Nabiyeu
Scientific secretary of scientific council on award of
scientific degrees, Ph.D in biology

A.T. Adylova
Chairman of seminar under scientific council
on award of scientific degrees, D.B.Sc.

INTRODUCTION (PhD thesis abstract)

The aim of the research work was creation of new biotechnological varieties with improved fiber quality using RNAi technology for obtain the gene line of RNAi *PHYA1* Coker-312 and hybridization with the local cotton varieties.

The object of the research work: The object of the study was the vector construction *pHellsgate8_PHYA1*, local cotton variety AN-Boevut-2 (*G. hirsutum* L.) and the line Coker-312.

The scientific novelty of the dissertation research is as follows:

RNAi vector construction *pHellsgate-8_PHYA1*, associated with the control of the effects of red, far-red light on photoreceptors was created;

for the first time, regenerative embryos of cotton plants were obtained by transforming the designed vector *pHellsgate-8_PHYA1* RNAi;

the *PHYA1* RNAi line of the Coker-312 (*G. hirsutum* L.) was created;

for the first time, using molecular analysis it was found that in the Coker-312 line with RNAi vector *pHellsgate-8::PHYA1 PHYA1* transcripts level were reduced to 70% in and T_{3-31_10} and to 25% in T_{3-1_7};

for the first time, method was developed for the creation based on the local upland cotton variety (*G. hirsutum* L.) of early maturing, high-yield, with improved fiber quality new cotton variety with the genotype *PHYA1* RNAi.

Implementation of the research results: Based on the results of research on the development of new biotechnological varieties using RNA interference technologies:

Patent of the Agency for Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (No.NAP 00146 dated February 22, 2017) for a new biotechnological cotton variety "Porloq-1" with RNAi *PHYA1* genotype, improved fiber quality, early maturity, high yield and improved agronomic parameters, based on local variety of upland cotton (*G. hirsutum* L.). As a result, it was possible to create new lines and biotechnological varieties of cotton using transformation by vector structures;

the cotton variety Porloq-1 was sown in Surkhandarya, Jizzakh, Syrdarya and Namangan regions of the republic on more than 105,000 hectares of cotton fields in the country (Reference of the Ministry of Agriculture and Water Resources of the Republic of Uzbekistan dated April 20, 2018, No. 01/20 -27). As a result, it was possible to produce high-quality fiber from the cotton grade "Porlock-1";

Modern RNAi technology for selection of upland cotton varieties (*G. hirsutum* L.) is used in the innovative project I5-FK-0-89870 "Production and continuous multiplication of superelite seeds of gene-knockout varieties of cotton Porloq" for the organization of primary seed production of cotton varieties (Reference to the Academy of Sciences of the Republic Uzbekistan No. 4 / 1255-655 of 14 March 2018). As a result, using RNAi technology from the created lines, it was possible to obtain new biotechnological varieties and prepare high-quality elite seeds.

The structure and volume of the thesis. The PhD thesis includes introduction, five chapters, conclusion. The volume of the thesis is 90 pages.

ЭЪЛОН КИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю., Шерматов Ш.Э., Рузибоев Х.С., Абдукаримов А. Хромосомная локализация генов М1С-3 хлопчатника // Узбекский биологический журнал, 2016. Спец.выпуск. – С.33-36. (03.00.00, №5).
2. Шерматов Ш.Э., Буриев З.Т., Шопулатов У.М., Убайдуллаева Х.А., Рузибоев Х.С., Абдурахмонов И.Ю. Характеристика гена засухо- и солеустойчивости ESK1M01 в хлопчатнике // Узбекский биологический журнал, 2016. Спец.выпуск. – С.40-43. (03.00.00, №5).
3. Abdurakhmonov Ibrohim Y., Ayubov Mirzakamol S., Ubaydullaeva Khurshida A., Buriev Zabardast T., Shermatov Shukhrat E., Ruziboev Haydarali S., Shopulatov Umid M., Sukumar Saha, Mauricio Ulloa, John Z. Yu, Richard G.Percy, Eric J. Devor, Govind C. Sharma, Venkateswara R. Sripathi, Siva P. Kumpatla, Alexander van der Krol, Hake D. Kater, Khakimdjan Khamidov, Saalikhov Shavkat I., Johnnie N. Jenkins, Abdugarimov Abdusattor and Alan E. Pepper. RNA Interference for Functional Genomics and Improvement of Cotton (*Gossypium sp.*) // *Frontiers in Plant Science*, 2016. – №7. (№ResearchGate, IF 5,0).
4. Рузибоев Х., Камбурова В.С., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. РНК-интерференция для улучшения качества волокна хлопчатника // ЎЗР ФА маърузалари, 2017. – №6. – С.104-110. (03.00.00, №6).
5. Рузибоев Х.С., Норбобоева Р., Имамходжаева О., Буриев З.Т. РНК интерференция технологияси асосида олинган ғўза линияларида фенотипик белгиларни қиёсий тахлили // Ўзбекистон аграр фани хабарномаси, 2018. – №1(71). – Б.61-64.
6. Рузибоев Х.С., Имамходжаева А., Никитина Е., Буриев З.Т. РНК интерференция: механизмы и применение // Вестник НУУз, 2018. – №3/1. – С.45-52.

II бўлим (II часть; Part II)

7. Рузибоев Х.С., Буриев З.Т., Убайдуллаева Х.А., Рахмонов Б.К., Абдурахмонов И.Ю. Ғўза ўсимлигида *IN PLANTA* трансформация усулини оптималлаштириш // Генетика, геномика ва биотехнологиянинг муҳим муаммолари: республика илмий-амалий анжумани материаллари. – Тошкент, 2016. – Б. 179-180.
8. Рузибоев Х.С., Исломов А. Б., Пратов Ф.Ф., Нуриддинов А.Ш., Убайдуллаева Х.А., Мамаджанов А., Имамходжаева А.С. *In Planta* Трансформация местных сортов хлопчатника // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: материалы республиканской научной конференции. – Ташкент, 2017. – С. 181.
9. Рахмонов Б.К., Рузибоев Х.С., Мирзахмедов М.Х., Абдуллаев А.Н.,

Буриев З.Т., Убайдуллаева Х.А., Шерматов Ш.Э., Абдурахмонов И.Ю. Фитотрон ноёб объектининг қимматли ўсимликларни мухитга адаптацияси ва кўпайтирилишида аҳамияти // Генетика, геномика ва биотехнологиянинг муҳим муаммолари: республика илмий- анжумани материаллари. – Тошкент, 2017. – Б. 164-165.

10. Рузибоев Х.С., Имамходжаева А.С., Буриев З.Т. Улучшение качества хлопкового волокна с помощью геномной технологии // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: материалы республиканской научной конференции. – Ташкент, 2018. – С. 149-150.
11. Буриев З.Т., Рузибоев.Х.С., Убайдуллаева Х.А. Трансформация промоторной конструкции со вставкой на основе *MIC-3* промоторов в хлопчатник // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: материалы республиканской научной конференции. – Ташкент, 2018. – С. 45-47.
12. Рузибоев Х.С., Имамходжаева А.С., Буриев З.Т // Современная научная деятельность: теория и практика: материалы международной научно-практической конференции. – Воронеж, 2018. – С. 128-131.
13. Рузибоев Х.С., Имамходжаева А.С., Буриев З.Т Применение РНК-интерференции на сельскохозяйственных культурах, в частности на хлопчатнике // Актуальные проблемы развития научного потенциала общества: материалы международной научно-практической конференции. – Саратов, 2018. – С. 7-9.