

ЎЗБЕКИСТОН RESPUBLIKASI FANLAR AKADEMIYASI  
АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

**ЎЗБЕКИСТОН  
БИОЛОГИYA  
ЖУРНАЛИ**

**3**

---

**2020**

**УЗБЕКСКИЙ  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**

*Издается с января 1957 г. по 6 номеров в год*

ТАШКЕНТ – 2020

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Р.З. САБИРОВ (главный редактор)  
И.У. АТАБЕКОВ (ответственный секретарь)  
А.А. АБДУКАРИМОВ  
Дж.А. АЗИМОВ  
Т.Ф. АРИПОВ  
М.И. МАВЛОНИЙ  
И.М. МИРАБДУЛЛАЕВ  
В.П. ПЕЧЕНИЦЫН  
Т.С. СААТОВ  
Дж. С. САТТАРОВ  
П.Б. УСМАНОВ

Адрес редакции:  
100047, Ташкент, ул. Я. Гулямова, 70.

Телефон (71) 232-11-81

На обложке:  
*Кесселринг савринжони*  
*Безвременник Кессельринга*  
*Colchicum kesselringii Regel*

Журнал зарегистрирован Агентством по печати и информации Республики Узбекистан 22.12.2006  
Регистрационный номер 0052.

БУРИЕВ З.Т., АБДУРАХМОНОВ И.Ю.

**КЛОНИРОВАНИЕ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СОЗДАНИЕ СЕРИЙНЫХ  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ПРОМОТОРНОГО РЕГИОНА *MIC-3*  
ГЕНА ХЛОПЧАТНИКА**

zabar75@yahoo.com

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Buriev Z.T., Abduraxmonov I.Yu.

**GU'ZANI *MIC-3* GENENI PROMOTOR QISMINI KLONLASH NUKLEOTID KETMA KETLIGINI  
ANIQLASH VA SERIYALI GENETIK TUZILMALARINI YARATISH**

Tadqiqotda go'zani 2,5 kb intergenli speysir regionni klonlangan, nukleotid ketma-ketligini tafsiflangan bo'lib, *MIC-3* promotorini o'z ichiga olgan ildiziga xos bo'lgan signal ketma-ketlikni ko'rsatildi. seriyali genetik tuzilmalarini yaratilib Arabidopsis o'simlikgiga transformaciya qilingan va faqat ildizlarda namoyon bo'lishi kursatilgan.

Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю.

**КЛОНИРОВАНИЕ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СОЗДАНИЕ СЕРИЙНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
КОНСТРУКЦИЙ ПРОМОТОРНОГО РЕГИОНА *MIC-3* ГЕНА ХЛОПЧАТНИКА**

В исследовании описаны клонирован, секвенирован и охарактеризован 2,5 kb межгенный спейсерный регион, содержащий *MIC-3* промотор с сигнальной корень-специфичной последовательностью. Трансформирован в растения арабидопсиса и показано экспрессию только в корнях.

Buriev Z.T., Abdurakhmonov I.Yu.

**CLONING, SEQUENCING AND CREATION OF SERIAL GENETIC STRUCTURES OF THE  
PROMOTOR REGION *MIC-3* OF THE COTTON GENE**

The study described cloned, sequenced and characterized a 2.5 kb intergenic spacer region containing the *MIC-3* promoter with a signal root-specific sequence. Transformed into Arabidopsis plants and shown to be expressed on

Селекция растений играет большую роль в увеличении глобального производства пищевых продуктов, решая вопросы, связанные с ограничением земельных и водных ресурсов и изменением климата. С момента, когда эра молекулярной биологии привела к созданию молекулярной селекции, появление геномных технологий и инструментов предоставляет беспрецедентную возможность для понимания молекулярных основ роста, развития и проявления ключевых признаков, улучшающих продуктивность сельхозкультур в XXI веке (Abdurakhmonov, 2008).

Так, в хлопчатнике (*Gossypium*) был обнаружен ген *MIC-3* (*Meloidogyne Induced Cotton-3*), который в высокой степени экспрессируется только в корневой части растения (Callahan et al. 1997; Zhang et al. 2002). Проведенные молекулярно-эволюционные исследования семейства генов *MIC-3* имеют высокое значение, потому что он расположен в геноме видов *Gossypium* в кластерном виде с редкой мультигенной структурой и играет важную роль в устойчивости хлопчатника к нематодной инфекции (Buriev et al., 2011). Это открывает перспективы для получения генотипов растений, устойчивых к галловой нематоды. Ген *MIC-3* является специфичным защитным механизмом, ассоциированным с корневыми тканями, и он не связан с биосинтезом госсипола, пероксидазой липидов и экспрессией PR10 в хлопчатнике (Wubben et al., 2008).

Исходя из того, что ген *MIC-3* экспрессируется только в корневой части растения, изучение регионов гена, которые используются в качестве промоторов в экспрессии специфических генов является очень важным. На сегодняшний день существуют ряд вирусных промоторов (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), такие как промотор 35S, промотор 34S (M. Sanger et al., 1990), а также Act1 и Ubi. В растениеводстве часто используется рекомбинантная ДНК-технология для переноса определенных

нужных свойств, что должно привести к повышению урожайности, например, за счет повышенной устойчивости к патогенам и насекомым или к улучшению свойств продукта. Часто при этом желательно, чтобы переносимый ген экспрессировался только в тканях, в которых ожидается активность трансгена, так как присутствие продукта, вырабатываемого трансгеном, может отрицательно сказаться на нормальных физиологических процессах. Так, была показана, что суперэкспрессия анионной пероксидазы под контролем действующего повсеместно 35S-промотора приводит к увяданию трансгенных растений табака, так как имеет место слабый рост корня и поэтому образуется небольшая корневая масса (Lagrimini et al 1997). В биотехнологии растений имеется большая потребность в ткане-специфичных промоторах растений.

Промоторы - важный регуляторный элемент, контролирующий экспрессию генов. Промоторные последовательности, которые позволяют экспрессировать чужеродные гены в растениях, являются полезным инструментом для производства генетически модифицированных культурных растений с превосходной урожайностью, более высоким качеством урожая, более коротким вегетационным периодом и более высокой устойчивостью к насекомым. Раковые гены растений подразделяются на конститутивные, индуцируемые, тканеспецифичные и синтетические / гибридные промоторы. Любой из упомянутых промоторов может быть выбран для развития трансгенного растения в зависимости от типа гена и ткани назначения.

Идентификация и характеристика специализированных промоторов и их цис-регулирующих элементов является важным шагом в достижении контролируемой экспрессии генов в биотехнологических применениях. В настоящем исследовании рассматривается промотор, его типы и его цис-регуляторные элементы, участвующие в регуляции экспрессии генов.

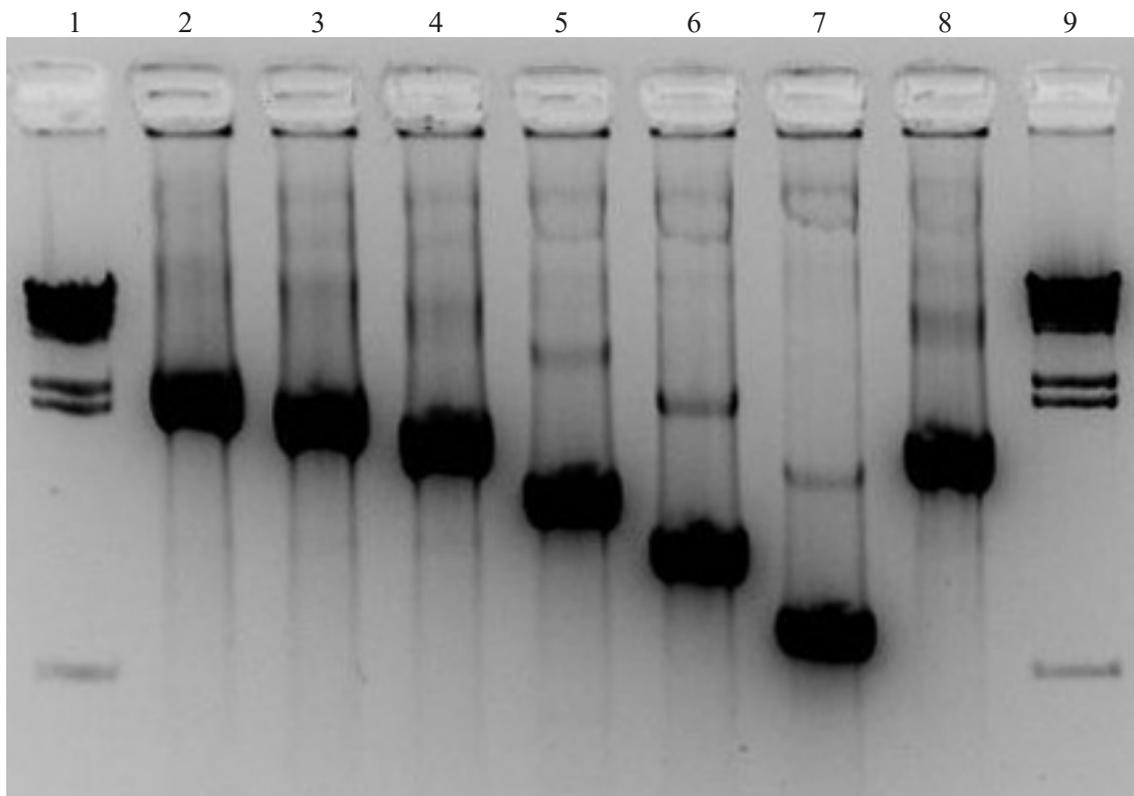
Материалами для исследования служили растения хлопчатника TM-1, M240 (*Gossypium hirsutum* L.) и агробактерии (*Agrobacterium tumefaciens*), содержащие векторы, созданные генетических конструкций промоторного региона *MIC-3* гена хлопчатника.

TCTATATCTTTATAAAAGTCTCAACTACATAAAAAAGTGTTGGGTGCAAT	-2575
ACTAAGGCA:.....TATTGCATATTGCAAGTTTATCTCTATACTTCAC	-2525
TCAAATTTGAAATTGAATCTCTATAGTTTAAATTCTAACATAAGTTGGCAC	-2475
CTGAATTCTTATAATGTCTTTTCGTTAGTCTAAATATGTTATTCTAATTGA	-2425
AACGCTCATGCGAATTTAAAAAGATTATTAACACCATCAAAATTCTCTAT	-2375
TAAATTAATTCTAGTCAATTACAATGTAATTTTCTTTTGCTCCTTGGATA	-2325
CCAAGTATAAGTATATTTTTTAATTTGAAAATGGCATGCCAACAAATTTA	-2275
ACAAAAGAATTATAACAACGCTAACAAATGGACCTAAATTCAAGATGTGG	-2225
AGTTCTCTATTGATGTGACTTCGAGGATCGCTCCTATAACAGGTGTGCTG	-2175
TATAGAATCACTCCAGCAGACATAAAGGAGTTGAAAGTTCAGCTACAAGA	-2125
ACTGTTAGATAATGGGTTTCATCAGATCAAATGTTTCGCCTTGGGGTGCAC	-2075
CAATATTGTTTGTACGAAGAAGGATGAGACCCTCCGATTATGTATTGAT	-2025
TATAGGTAGCAGCAAAAGTGACCATATTAAGTTGCCAGGATTGAGAACT	-1975
TTTTTGATCAGCTAACTGGAGCTAGAGTTTCTCAAAGATTGATCTATGA	-1925
GCTAGGTATTATCAAGTTGAAACTTCCAAATATAAAACAACGTAAGATGT	-1875
TAATAATATCCTCTTAACAATAATAAGATGACTTGTAATATTAAGACGAA	-1825
GACCGGTAATAATATCTTAACAATTTAAACTATTTTATTTGGAAATCTAA	-1775
СТААГААТСАТТССТТГСАТГТСССААСТТГГТГГГТААСААГТСТТТ	-1725
AAAAGAATAGCAGGGGTATGGGGTGATTTAATTGCACTGGGCAAGAACCC	-1675
СААСААГГСААТТГТТТГСАТГТГССАААГТГГТСААГТСАТГА	-1625

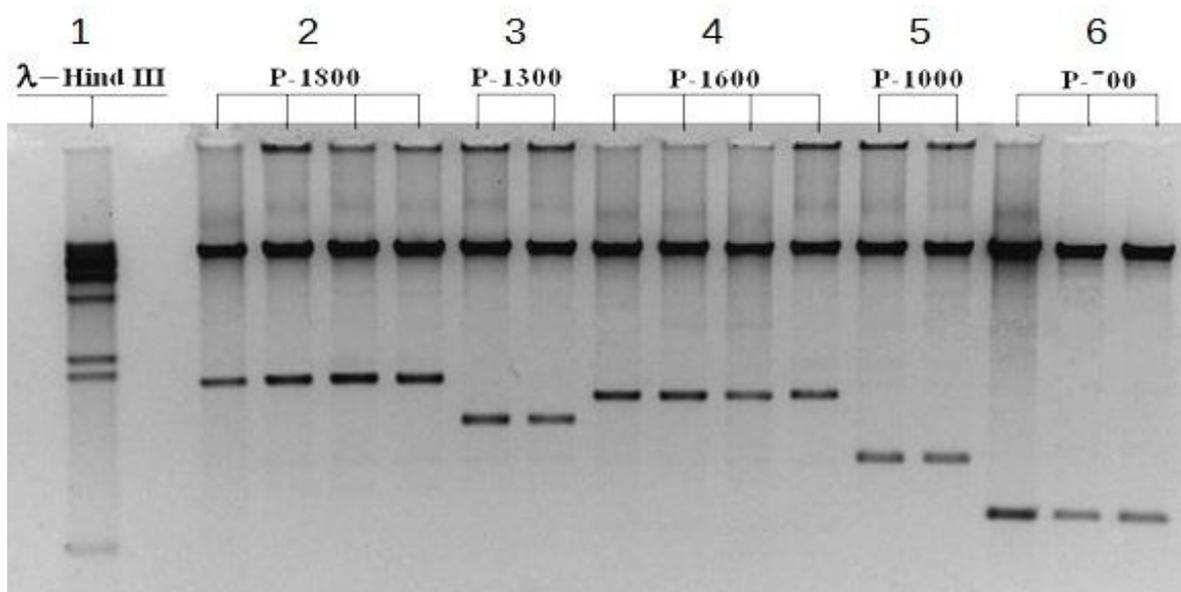
AACCAGAAAAGGTTGACGATCTGATTTTTCTAGAGGTGGGGAGTTCTAGG	-1575
TTTCCCATTAGAATGGTAGAACAGGGGTTGCCTGAAGTCGAATATGCGAG	-1525
CCAGTCCTTGACGGGTAACAATGGCAGCGATGGGAAGAATATTGAGCAGG	-1475
GTAGGGCTGATTCCGTCATGTCAGAATTCGAATCGGTGCTAGGCCTTAGG	-1425
TCGGATTGGTTGAAATATAGTCATAGAATGCGATTCAATTACTGGTTCGG	-1375
ATTGGTTGAAATATTGTCATCTTCAGCCGTGGTCGTTTAGGAATTTGTTC	-1325
GCGAATATTGAAGGAAGTTTAAGGTGAATGGTTGAGGTTTCAGATTGAAGT	-1275
CACAAATCGAGGTAAGAATGGAATGGCGGAAGCCTTGGCTAAAGCAGGTT	-1225
TGTCAAGGAATACCTTGTTTAGAGCATACTGGTAATCCATTTTGGGGTTT	-1175
GCTGCTTTTATGGTTTTTTGTGCTCTATTTTGGCATAGTTTTGCAGCTTT	-1125
TGGTTCCTTGTTTCGAACTGGTATGGGCTGGGTGATCCCAACACCTCTTCC	-1075
TGTAATCAATTGAATGAGGAAAAAAAAAAGATGGTCAACGGTCAAAATAT	-1025
ATAAGAATGTAAGAGCAATAGGTAACCTTACCTATTCATTTAATATCCT	-975
TTTAAACAATGAGCTTTTTGGTCAACTCAATAGATCTCCCTTCTCAACTA	-925
GTTGCTGGAGATGCCGGACAACTTGTCAAAAAGTAAATGAGACATGTC	-875
AACCCATGTGTTAACCGAAGTAGGAGGTAATATTAGCTTATTTAATTA	-825
TCCTTCTTGGTTGCTTTAAAAAATGGATTTAATAAAGGACAATTATCTAT	-775
ATTTTGAATCACCTATTCATATCCTTGCACAATTAACACACAAGTCTA	-725
ATATTTGTTTTAAACAAARAAGGTGAGATGACAATAATATCCTCCTAACT	-675
ACGAGGCTTTTCTTGATATTCATGTCTAAATTTTAAATAAGATGACTAGT	-625
TGAAATAAAAATTGTTGGCCAAATGTACATGATGACAATAATATCCCCCT	-575
AACTATGGAGCTTTTGTCTTCAATGTAATGATAGACCTATTCATTATATT	-525
TTAACTTTTCGTAACAAAGACTTATTCCTTTGAAATATTTTAGTATTCT	-475
TATTTGCTAGAGCTAAAAGTTGAAGTGATTCTTTTTTAAAAAGCATGTTA	-425
ATTAAATCCTTGTTGGCGTAAGGGCCTAAAAGGCAATTTGTCCAGTTTAG	-375
CCAAGGTYCATGCCTACTTACAACAATAGATGACATTAATATCCTGTCCT	-325
AATCATTTAATATCCTCTTAACAAGGAGGCTTTTCGAGTTTTATTTTATT	-275
AAAACATAATAATATGACTTTGACTTTAAAGTATATTAATAAAAATGGTAA	-225
AACTAAGTCTGGGCCATATTTGATATTTACACATATAAAATAAAATGACT	-175
TTGTTATCATATTTAAATTTAAAAGTCTTACTTGTAAGCTAGAAGGTTG	-125
TG <b>TATAAAT</b> ATGTGTATGGAGGTAGATATGAAGCAGATTA <b>TATA</b> GAAGGA	-75
GAGTGAAATAAAAAAGGAGTTAAAAATG	-25

В целях клонирования, секвенирования и создания серийных генетических конструкций промоторных регионов *MIC-3* гена хлопчатника 2.5 Кб межгенные регионы кластерного гена *MIC-3* были амплифицированы, клонированы и секвенированы и с помощью праймерных пар составленных из первого экзона *MIC-3* генов была выявлена нуклеотидная последовательность. Была использована консенсусная позиция 220-240 п.о. (прямого) и 130-154 (обратного) алайнментов (сопоставления) множественного выравнивания последовательностей. ПЦР продукт был секвенирован после клонирования в вектор TOPO XL Invitrogene США. Анализ этой межгенной *MIC-3* последовательности позволил идентифицировать характеристики последовательности промотора с ТАТА-боксом и

множественные различные мотивы последовательности, связанные с корневой специфичностью и патогеном. Было разработано несколько пар праймеров для амплификации различных фрагментов этого 2,5 т.п.о. промоторной последовательности.



**Рис. 1.** Фрагментированные последовательности промотора гена MIC-3. 1, 10 – Marker  $\lambda$ Hind III, 2 Pr-2500, 3 Pr-2200, 4 Pr-1882, 5 Pr-1381, 6 Pr-1057, 7 Pr-708, 8 Pr-1658.



**Рис. 1.** Субклонирование в бинарный вектор pBI101, содержащий маркерный ген *GUS* 1 – Marker  $\lambda$ Hind III, 2 Pr-1882, 3 Pr-1381, 4 Pr-1658, 5 Pr-1057, 7 Pr-708.

Мы сконструировали несколько праймерных пар для амплификации различных фрагментов промоторного региона. Сконструированные праймерные пары имеют на своих концах рестрикционные сайты ферментов, что необходимо для инсерции в вышерасположенный регион бинарных плазмидных векторов, содержащих репортерный ген GUS. Основываясь на данных нуклеотидных последовательностей промотора, мы амплифицировали весь промоторный регион гена MIC-3 длиной в 2.5 тыс. п.о. из линии хлопчатника TM-1 и сконструировали несколько бинарных векторов, нацеленных на весь регион длиной в 2.5 тыс. п.о., а также несколько фрагментов с малыми размерами из последовательностей промотора для изучения роли промотора в развитии устойчивости к галловой корневой нематод. Промотор длиной в 2562 п.о. был ремплифицирован при помощи пары праймеров, несущих адаптеры рестрикционных сайтов HindIII и BamHI. Более короткие фрагменты промоторов, имеющие делецию различной длины 5'-конца, также были амплифицированы с помощью специфических праймеров (рис. 1, 2). Эти промоторные фрагменты были вставлены в общедоступный вектор pBI101, в вышерасположенный регион кодирующего региона гена GUS.

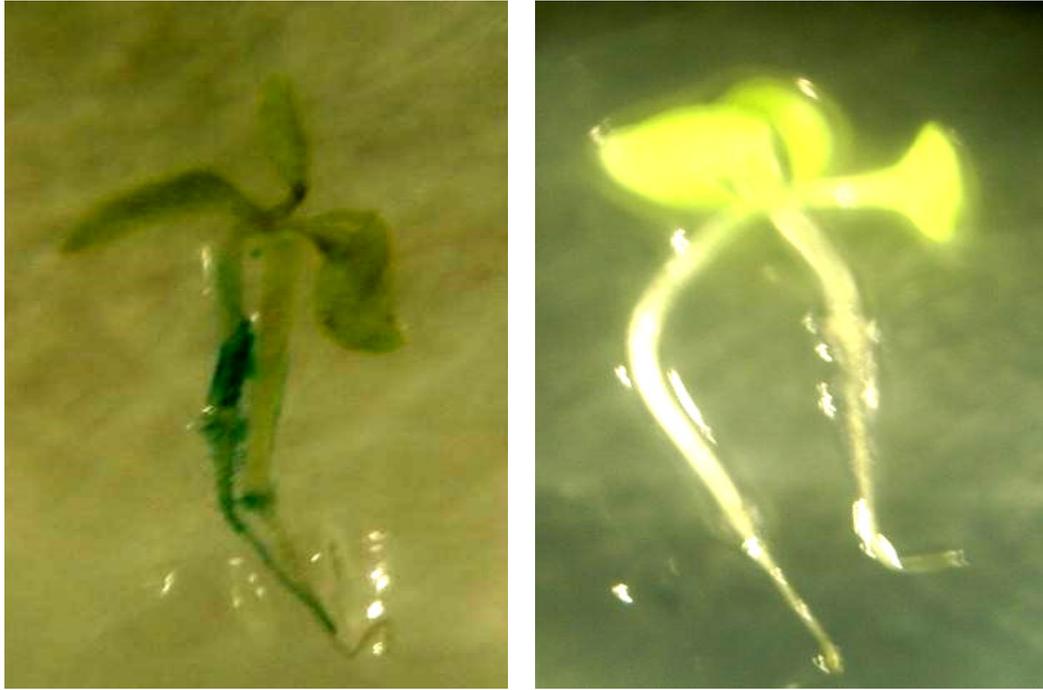
В результате этого были созданы серии бинарных векторов pBI101-MIC3\_Pr::GUS, названные P-2500 (-2500/-1, 2500 bp), P-2200 (-2200/-1, 2200 bp), P-1800 (-1882/-1, 1882 bp), P-1600 (-1658/-1, 1658 bp), P-1300 (-1381/-1, 1381 bp), P-1000 (-1057/-1, 1057 bp), P-700 (-708/-1, 708 bp). Эти векторы были перенесены в штаммы LBA4404 (для трансформации хлопчатника) или GV3101 (для трансформации арабидопсиса) бактерии *Agrobacterium tumefaciens* и использованы для *in planta* трансформации арабидопсиса. Было трансформировано 7 векторных конструкций в арабидопсис и получены трансгенные линии арабидосиса (рис. 3).



**Рис. 3.** Трансгенный арабидопсис содержащий коренспецифический MIC3 промотора хлопчатника.

Трансгенные растения были отобраны путем высевания на питательных средах, содержащих канамицин. Трансгенные растения арабидопсиса, несущие вектор с минимальным промоторным регионом pBI101-700::GUS, показали экспрессию только в корнях (рис. 4). Это позволило предположить, что минимальный промоторный регион гена MIC-3 длиной в 708 п.о. будет достаточным для направления экспрессии любого гена в корни растения.

Таким образом, был клонирован, секвенирован и охарактеризован 2,5 kb межгенный спейсерный регион, содержащий MIC-3 промотор с сигнальной корень-специфичной последовательностью. Эти векторы были перенесены в штаммы GV3101 и получены трансгенные линии арабидосиса.



**Рис. 4.** Гистохимическое окрашивание паттерна экспрессии GUS в трансгенные растения *Arabidopsis*, экспрессирующие P-700 :: GUS. (А) 1 неделя рассады; (Б) контрольные растения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abdurakhmonov I.Y., and Abdukarimov A. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. // International Journal of Plant Genomics. - 2008, doi:10.1155/2008/574927.
2. Callahan FE, Jenkins JN, Creech RG, Lawrence GW Changes in cotton root proteins correlated with resistance to root-knot nematode development // J Cotton Sci -1997 1:38–47.
3. Zhang XD, Callahan FE, Jenkins JN, Ma D-P, Karaca M, Saha S, Creech RG A novel root-specific gene, MIC-3 with increased expression in nematode-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) after root-knot nematode infection // Biochim Biophys Acta – 2002 - 1576: 214–218.
4. Buriev ZT, Saha S, Abdurakhmonov IY\*, Jenkins JN, Abdukarimov A, Scheffler BE, Stelly DM. Clustering, haplotype diversity, and locations of *MIC-3*, a unique root-specific defence - related gene family in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L) // TheorAppl Genet - 2010.- 120(3):587-606.
5. Buriev ZT, Saha S, Shermatov SE, Jenkins JN, Abdukarimov A, Stelly DM, Abdurakhmonov IY (corresponding author). Molecular evolution of the clustered *MIC-3* multigene family of *Gossypium* species // TheorAppl Genet. - 2011.123(8):1359-73. doi: 10.1007/s00122-011-1672-y.
6. Wubben MJ, Callahan FE, Hayes RW, Jenkins JN. Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the *MIC* (Meloidogyne-induced cotton) gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Planta -2008 228:111–123.

**САЛАХУТДИНОВ И.Б., ХУРШУТ Э.Э., РАДЖАПОВ Ф.С., ТОЖИБАЕВА Д.И.,  
ЗУПАРОВА Д.М., АРЗУМАНОВ А.Ш.**

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ВИНОГРАДА ТАДЖИКСКОЙ  
СЕЛЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ**

silkhom@mail.ru

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Salaxutdinov I.B., Xurshut E.E., Radjapov F.S., Bikmetova D.I., Zuparova D.M., Arzumanov A.Sh.

**MIKROSATELLIT MARKERLARI YORDAMIDA TOJIKISTON UZUM NAVLARI SELEKSIYASI  
XILMA-XILLIGI TAXLILI**

Ushbu maqolada O'zbekiston ampelografik kolleksiyasidagi Tojikiston uzum navlari seleksiyasi genetik xilma-xilligi baholandi. Tadqiq etilgan navlar morfologik belgilar bilan bir qatorda, DNK markerlari bilan ham tekshirildi. Genetik tahlil natijalari asosida Tojikiston navlari genetik xilma-xilligi o'rganildi va DNK profillari olindi. Olingan DNK profillari esa, kelgusida tadqiq etilayotgan navlarga genetik pasport sifatida qo'llanilishi mumkin.

Салахутдинов И.Б., Хуршут Э.Э., Раджапов Ф.С., Бикметова Д.И., Зупарова Д.М., Арзуманов А.Ш.

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ВИНОГРАДА ТАДЖИКСКОЙ СЕЛЕКЦИИ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ**

В данной работе приведена оценка генетического разнообразия сортов таджикской селекции из узбекской ампелографической коллекции винограда. Исследуемые сорта анализировались как по морфологическим признакам, так и с использованием ДНК маркеров. В результате генетического анализа были изучены генетическое разнообразие таджикских сортов и получены ДНК профили, позволяющие в дальнейшем применить их в качестве генетического паспорта для каждого из исследуемых сортов.

Salakhutdinov I.B., Khurshut, Rajapov F.S., Bikmetova D.I., Zuparova D.M., Arzumanov A.Sh.

**THE GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF TAJIK GRAPE VARIETIES USING MICROSATELLITE  
MARKERS**

This paper provides an evaluation of the genetic diversity of Tajik grape varieties from the Uzbek ampelographic collection. The studied varieties were analyzed both by morphological characters and using DNA markers. As a result, the genetic diversity of Tajik varieties was studied as well as so obtained DNA-profiles, which will be used as a DNA passport for each of the varieties under study subsequently.

Виноград - одна из важнейших и распространенных плодово-ягодных культур в мире. Культурный вид *Vitis vinifera* происходит из Европы и Средней Азии, культивируется с античных времен [1]. Средняя Азия - один из центров по выращиванию винограда. За многие столетия здесь (в особенности в Узбекистане и Таджикистане) были созданы в большом разнообразии великолепные местные сорта винограда с замечательными технологическими качествами и отличными вкусовыми характеристиками [2]. Виноград, благодаря большому, генетически обусловленному, морфологическому разнообразию имеет сильную приспособляемость к различным климатическим условиям и почвам, в связи с чем эта культура получила широкое распространение. Более того, по причине спонтанного скрещивания а также тщательно спланированной гибридизации, в совокупности с вегетативным способом размножения сортимент винограда очень разнообразен [1, 3]. Однако, фенотипы растений винограда очень сильно взаимодействуют с окружающей средой - различные условия внешней среды могут вызывать морфологические изменения, касающиеся ампелографических признаков, что также приводит к увеличению морфологического разнообразия, в особенности возделываемых сортов, внося свой вклад в ложную идентификацию сортов [4].

Традиционно, идентификация сортов винограда основывается на ампелографии (от греческого *ampelos* - виноград и *graphos* - описание), основой которой является анализ и сравнение морфологи-

ческих признаков листьев, побегов, гроздей и ягод [5, 6]. Однако идентификация при помощи классических методов ампелографии и ампелометрии часто сопряжены с ошибочной интерпретацией. Исходя из этого, остро встает вопрос идентификации сортов винограда менее трудоемкими и наиболее точными способами. Другими словами, необходима удобная, быстрая и объективная система для идентификации сортов. Данная система может быть использована как для изучения генетического разнообразия сортов винограда, так их регистрации и мониторинга, что является ключевым моментом для селекции, производства и обмена сертифицированного растительного материала.

Развитие ДНК-маркеров позволило изменить такое положение дел и дало возможность легко идентифицировать сорта без сложной ампелографической экспертизы. Получаемые результаты не только объективны, но они также не зависят от условий окружающей среды и болезней, присутствующих в растениях. ДНК-маркеры стали одним из полезных средств, позволяющих решать во многих случаях проблемы, связанные с синонимами и неправильным названием сортов винограда [7–9]. Основными ДНК-маркерами для дифференциации, характеристики и определения сортов винограда стали микросателлитные маркеры [10, 11]. Преимуществом микросателлитных маркеров является высокая степень полиморфности и кодоминантная форма наследования, что делает этот тип маркеров более информативными. Кроме того они позволяют получить результаты, легко поддающиеся количественному определению, и также легко оцифровываются и могут быть сохранены в формате баз данных [12].

С 01.03.1997 – 02.02.2002 был инициирован исследовательский проект Европейского Союза GENRES 081, сосредоточенный на компиляции, стандартизации обмена информацией относительно генетических ресурсов винограда [13]. Партнеры проекта – основные коллекции европейских сортов винограда, поставили перед собой цель по развитию Центральной Европейской Базы Данных, содержащей стандартизированные микросателлитные профили для унификации идентификации гермплазмы винограда. В итоге были выбраны 9 основных информативных маркеров. С использованием этих маркеров был создан профиль аллелей, основанный на известных эталонных сортах, что облегчило сравнение данных между лабораториями, и сделало возможным развитие эффективной идентификации сортов [14].

Объектом исследования в данной статье являются 80 сортов винограда таджикской селекции из коллекции Научно-исследовательского института растениеводства (НИИР МСХ РУз). Целью исследований являлась оценка генетического разнообразия сортов таджикской селекции. В рамках данной работы исследуемые сорта анализировались как по морфологическим признакам, для оценки разнообразия фенотипов и предварительной оценки, их предполагаемой пищевой и товарной ценности или направленности использования, так и с использованием ДНК-маркеров, для оценки генетического разнообразия.

Описание исследуемых сортов проводили по 15 признакам, представляющих собой механический анализ грозди. Статистический анализ признаков и построение результирующих диаграмм проводили в системе R [15].

В качестве материала для выделения ДНК собирали молодые листья исследуемых сортов винограда. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно методике производителя.

Генетический анализ проводился методом ПЦР с использованием 9-ти нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров, рекомендуемых международным проектом GENRES 081: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 и VrZAG79. При анализе сортов были использованы одинаковые условия ПЦР (за исключением температуры отжига праймеров). Идентификацию и определение размеров аллелей микросателлитных локусов проводили с использованием программы GelAnalyzer 19.1 ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)).

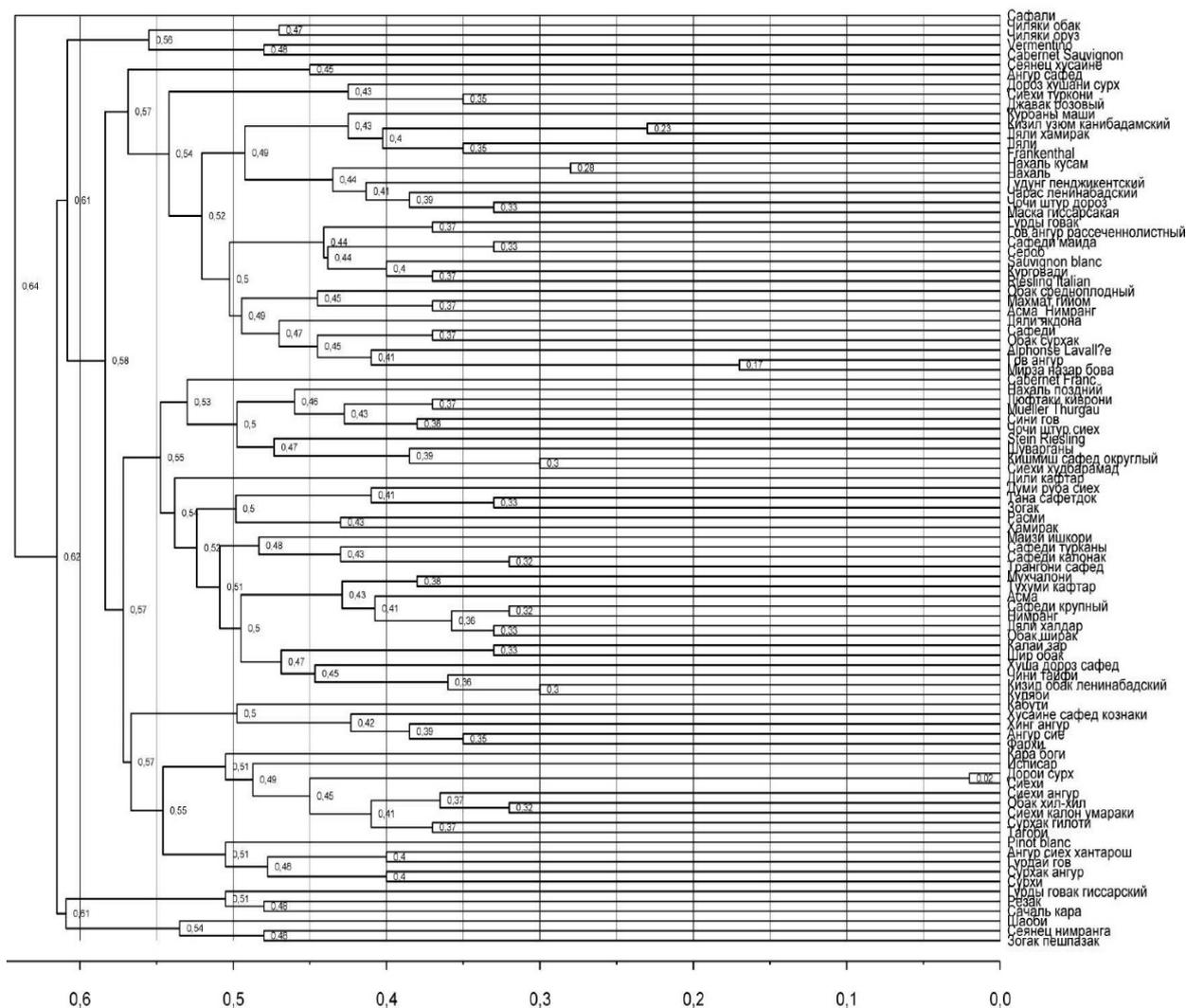
Статистический анализ данных генотипирования и филогенетический анализ проводили в системе R и UGENE 1.20 [15, 16]. Анализ генетической структуры популяций проводили в программе Structure 2.3.4 [17].

В результате проведенного исследования были получены следующие результаты. На основании данных описания исследуемых сортов винограда таджикской селекции по 15 дескрипторам был проведен статистический анализ. В результате этого анализа было установлено, что 61% из исследованных сортов таджикской селекции пригодны в большинстве случаев для употребления в свежем

виде, производства сока, а также сушенной продукции, 18% можно использовать как универсальные сорта и только 17 сортов (21%) из исследованных могут быть классифицированы как чисто винные.

Для выявления степени генетического родства, в особенности при создании панели для баркодинга с применением микросателлитных маркеров, требуется определение точной разницы в размерах амплифицированных полиморфных ДНК локусов, которые определяли с использованием программы GelAnalyzer 19.1 ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)). В результате были идентифицированы четкие полиморфные аллели по всем девяти праймерным парам для 80 исследуемых образцов. В качестве контролей использовались 10 хорошо известных европейских сортов: Mueller Thurgau, Pinot blanc, Vermentino, Cabernet Sauvignon, Stein Riesling, Frankenthal, Sauvignon blanc, Riesling Italian, Alphonse Lavallée и Cabernet Franc. Кроме того, в качестве контролей были также использованы: крымский сорт – Асма, иранский сорт – Фахри и два узбекских сорта – Зогак и Зогак пешпазак.

После определения размеров полиморфных аллелей и их состояния была проведена оценка генетического разнообразия исследуемых сортов. Разница в размерах аллелей отображает генетическое сходство сортов, что объясняется путями эволюции микросателлитных последовательностей генома. Оценку генетического разнообразия проводили с применением функции различия (расстояния) Хэмминга, в результате чего была получена матрица генетических расстояний между исследуемыми образцами, выраженных в процентном соотношении различий между ними. На основании полученной матрицы было построено филогенетическое древо, показывающее распределение образцов по отношению друг к другу (рис. 1).

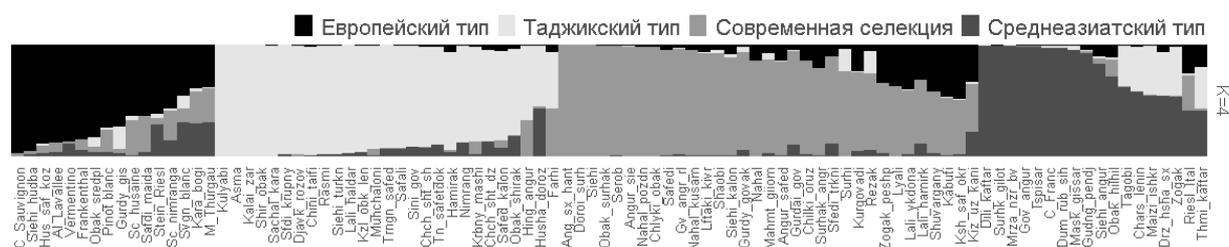


**Рис. 1.** Филогенетическое древо, показывающее генетическое разнообразие (%) среди исследуемых сортообразцов.

Как видно из анализа микросателлитных профилей, сорта отличаются друг от друга на 2%-64%, что делает возможным использование данной панели маркеров для паспортизации исследуемых сортов.

Однако филогенетический анализ не дает полной картины о структуре популяции в целом. Для восполнения этого пробела был проведен дополнительный анализ, в результате которого установлено, что таджикские сорта подразделяются на четыре четких субпопуляции (рис. 2).

Исходя из полученных данных видно, что лишь некоторая часть сортов являются аборигенными или автохтонными, большая же часть являются сортами относительно современной селекции, так как в них прослеживается европейский генофонд, а также имеется большой процент генотипов восточного и среднеазиатского типов. Последний является следствием того, что Таджикистан граничит с Узбекистаном, поэтому прослеживается влияние узбекского сортимента в таджикской селекции, и наоборот.



**Рис. 2.** Кластерный анализ структуры популяций изученных сортов, полученный при помощи программы Structure 2.3.4.

Таким образом, использование микросателлитных маркеров, обладающих высоким уровнем полиморфизма, дало возможность оценить генетическое разнообразие исследуемых сортов винограда, а также получить более полную информацию об исследуемых генотипах.

Кроме того, на основании полученных данных о полиморфных аллелях и их размерах, был определен первичный генетический профиль (паспорт) для 80 сортов таджикской селекции. Генетические профили были закодированы согласно международному стандарту GENRES 081.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alleweldt G., Spiegel-Roy P., Reisch B. Grapes (*Vitis*). *Acta Hortic*// 1991; 291–330. doi:10.17660/ActaHortic.1991.290.7.
2. Рубан Н.Г. Сорта винограда Средней Азии // Ташкент: Издательство “ФАН” Узбекской ССР; 1972.
3. Kiss E., Kozma P., Halasz G. Hungarian *Vitis* Microsatellite Database // In: XXX Congreso Mundial de la Viña y el Vino. 2007.
4. Трошин Л.П., Звягин А.С. Новации виноградарства России. совершенствование клоновой селекции винограда // Научный журнал КубГАУ. 2009; 54:1–22.
5. IPGRI, UPOV, OIV. Descripteurs de la vigne (*Vitis* spp.). Union internationale pour la protection des obtentions végétales // Genève, Suisse/Office international de la Vigne et du Vin, Paris, France/Institut international des ressources phylogénétiques, Rome. 1997.
6. Звягин А.С., Трошин Л.П., Подваленко П.П. Биометрическая оценка морфологических признаков популяции Мерло // Критерии и принципы формирования высокопродуктивного виноградарства. Анапа; 2007. p. 165–72.
7. Bowers J.E., Dangi G.S., Meredith C.P. Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape // *Am J Enol Vitic*. 1999; 50:243–6. <http://www.ajevonline.org/content/50/3/243>.
8. Baneh H.D., Mohammadi S.A., Mahmoudzadeh H., de Mattia F., Labra M. Analysis of SSR and AFLP markers to detect genetic diversity among selected clones of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Keshmeshi // *South African J Enol Vitic*. 2009; 30:38–42. <http://www.cabdirect.org/abstracts/20103003238.html>. Accessed 8 Aug 2013.

9. Işçi B., Yildirim H.K., Altindişli A. A review of the authentication of wine origin by molecular markers // Journal of the Institute of Brewing. 2009; 115:259–264.
10. Aradhya M.K., Dangi G.S., Prins B.H., Boursiquot J-M, Walker M.A., Meredith C.P., et al. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. // Genet Res. 2003;81:179–192. doi:10.1017/S0016672303006177.
11. Emanuelli F., Lorenzi S., Grzeskowiak L., Catalano V., Stefanini M., Troggio M. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape // BMC Plant Biol. 2013; 13:39. doi:10.1186/1471-2229-13-39.
12. Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P., Scott N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification // Theor Appl Genet. 1993; 86:173–180.
13. Dettweiler E., Jung A., Zyprian E., Töpfer R. Grapevine cultivar Muller-Thurgau and its true to type descent // Vitis. 2000; 39:63–65.
14. Maul M.E., Dias J.E.E., Kaserer H., Lacombe T., Ortiz J.M., Schneider A., et al. European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources Report of a Working Group on *Vitis* // 2003. [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Report\\_of\\_a\\_Working\\_Group\\_on\\_Vitis\\_1293.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Report_of_a_Working_Group_on_Vitis_1293.pdf). Accessed 12 Oct 2018.
15. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing // R Core Team. 2016.
16. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012; 28:1166–1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091.
17. Pritchard J.K. Software for Inferring Population Structure // 2010. [http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/html/structure.html](http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html).

**MAMAJONOV B.O., AYUBOV M.S.\*, NOROV T.M., NAZIROV M., KAZBEKOV M.J.,  
KHASANOVA N.A., BURIEV Z.T., SHERMATOV Sh.E., ABDURAKHMONOV I.Y.**

### **CHARACTERIZATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* CRYPTOCHROME-1 GENE (CRY1)**

mirzo.ayubov@gmail.com \*

Center of Genomics and Bioinformatics AS RUz

Mamajonov B.O., Ayubov M.S., Norov T.M., Nazirov M., Kazbekov M.J., Hasanova N.A., Bo'riev Z.T.,  
Shermatov Sh.E., Abduraxmonov I.Yu.

#### *ARABIDOPSIS THALIANA* NING KRIPTOXROM-1 (CRY1) GENINI TAVSIFLASH

Ushbu tadqiqotda *Arabidopsis thaliana* ning CRY1 geni RNK interferentsiya texnologiyasini qo'llagan holda tadqiq qilindi. Buning uchun *Arabidopsis* CRY1 geni asosida genetik vektor konstruktsiya tuzildi, hamda in planta usuli yordamida *Arabidopsis* guliga transformasiya qilindi. Natijalar transformatsiyalangan o'simliklarida unuvchanlik, gullash va pishish davrlari nazorat o'simliklariga nisbatdan ertaroq ekanligini ko'rsatdi. Bu esa ushbu texnologiyani qishloq xo'jaligi ekinlarining ertapishar navlarini yaratishda qo'llash mumkinligini ko'rsatadi.

Мамажонов Б.О., Аюбов М.С., Норов Т.М., Назиров М., Казбеков М.Ж., Хасанова Н.А., Буриев З.Т.,  
Шерматов Ш.Э., Абдурахмонов И.Ю.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА КРИПТОХРОМА-1 (CRY1) У *ARABIDOPSIS THALIANA*

В этом исследовании был характеризован ген *CRY1 Arabidopsis thaliana* с использованием технологии РНК-интерференции. Для этого, на основе гена *CRY1* была разработана генетическая РНКи - конструкция и произведена ее in planta трансформация в арабидопсис. У трансформированных растений наблюдалось более раннее прорастание семян, цветение и созревание, чем у контрольных растений. Это показывает, что технология может быть использована для получения скороспелых сортов сельскохозяйственных культур.

Mamajonov B.O., Ayubov M.S., Norov T.M., Nazirov M., Kazbekov M.J., Hasanova N.A., Bo'riev Z.T., Shermatov Sh.E., Abduraxmonov I.Yu.

#### CHARACTERIZATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* CRYPTOCHROME-1 GENE (CRY1)

In this study, *Arabidopsis thaliana* CRY1 gene was characterized using RNA interference technology. For this purpose, the genetic RNAi vector construction was developed based on CRY1 gene and transferred into plant flowers using in planta technique. The seed germination, flowering, and fruit maturity periods were earlier in transformed plants, compared to WT controls. The results revealed that this technology can be applied to other important crops to develop early flowering varieties.

The transcriptome studies of *Arabidopsis thaliana* L. have been improved in recent years when new generation sequencing technologies appeared in the World market. It became easy way to analyze gene(s) functions and their expression levels in special condition/treatments. Some important genes were found and characterized in many agricultural crops by recent transcriptome studies. This new approach opened a way to use the genes of interest in commercial purpose by the transferring them to the selected crops after characterization of their functions in Arabidopsis genome. For example, drought, salinity, heat, cold and fiber related genes of cotton, rice, maize and many other crops were the first tested in Arabidopsis using modern biotechnological tools, then transferred into original genomes. In this study, Arabidopsis blue light responsible receptor cryptochrome 1 (CRY1) gene were characterized using RNAi technology in order to know their role in plant life. Because of CRY1 gene's regulation in ethylene synthesis and interactions with other genes as a regulator.

Light is an essential for plant development and morphology. All physiological processes, from seed germination until fruit maturity, carbon exchange, leaf differentiation, rhythmic cycles regulation, gravitropism and phototropism are regulated by light signals [1]. Every plant have a special molecular systems and mechanisms to accept light signals, called photoreceptors. Three different photoreceptors, phytochromes (PHYs), cryptochromes (CRYs) and phototropins (PHOTs) are responsible to above-mentioned processes. Phytochromes occur in plants, bacteria, fungi and sensitive to light in the red and far-red region of the visible spectrum. The seed germination, chlorophyll synthesis, the seedlings elongation, the size, shape and number and movement of leaves and the timing of flowering in adult plants are regulated by phytochromes. Phototropins more specifically, flavoproteins, responsible for phototropism in flowering plants. Phototropins, cryptochromes and phytochromes contribute in plant growth under specific the light environment. Unlike phytochromes and cryptochromes, phototropins play a vital role in the opening of stomata [2] and the movement of chloroplasts. These receptors are exist in every green plant lineage. Cryptochromes are the evolutionary belong to DNA photolyases, known as light-activated DNA-repair enzymes. They are classified into three groups - plant cryptochromes, animal cryptochromes, and CRY-DASH proteins. Cryptochromes are important to regulate circadian clock in plants and animals, along with controlling photomorphogenesis under blue or ultraviolet (UV-A) light. The two cryptochrome proteins CRY1 and CRY2 are produced by CRY1 and CRY2 genes [3]. Several studies showed that CRY1 regulates the circadian clock in a light-dependent fashion in insects and plants [4]. CRY1 genes are found in root elongation, meristem tissues activities, anthocyanin accumulation and ethylene synthesis in *A. thaliana* [5]. In fact, Usami and his colleagues revealed that chlorophyll accumulation in root, depend on cryptochrome genes other than phytochromes [6].

In order to study biological function of arabidopsis CRY1 gene, we designed hairpin RNAi genetic construct for arabidopsis CRY1 gene that introduced to cells, should specifically suppress the targeted gene expression. A pHellsGate-8 vector construct bearing CRY1 cassette (driven by 35S promoter) and kanamycin resistance gene marker was developed. RNAi plants were obtained using in planta transformation. Candidate RNAi plants contain the CRY1 RNAi were verified using PCR reaction that amplifies specifically pHG-8::CRY1 insertions from the vector construct. Phenotypic observations of CRY1 RNAi plants throughout multiple generation phytotron evaluations demonstrated early flowering and maturity compared to wild-type controls. Our studies helped to accurately coordinate gene function in complex arabidopsis genomes.

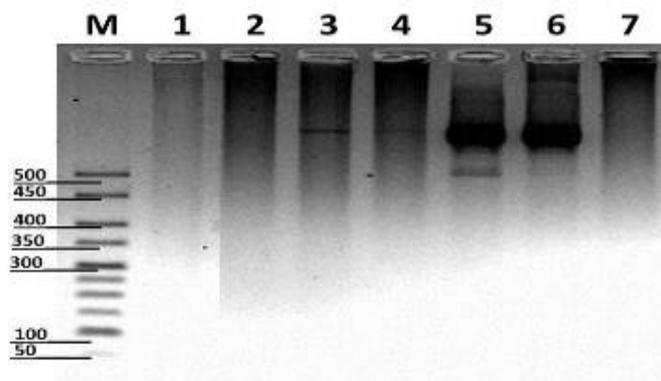
As plant materials CRY1 RNAi and its wild type (WT) lines of *Arabidopsis thaliana* were used in this study. RNAi plants were obtained using in planta transformation technique that was described by Clough

in 1998 [7]. For the morphological observations, we obtained several generations (from T1 to T3) of CRY1 RNAi Arabidopsis plants and evaluated them in comparison to their wild-type. All phytotron experiments were implemented with three biological replications where we collected observation morphological data.

Candidate RNAi plants bearing the CRY1 RNAi were verified using PCR reaction that amplifies specifically CRY1 RNAi insertions from the vector construct and/or transformed plant. For this purpose, genomic DNAs were isolated from young leaf tissues using the CTAB method. Amplification reactions were performed in 25 ul volumes containing 2.5 ul 10xPCR buffer with 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ul BSA, 0.5 ul 25mM of a dATP, dGTP, dTTP and dCTP mix, 2.5 ul/50ngul 1 of each RNAi vector-specific 35S-F/OST-R primers pairs, 1 ul 50 ng/ul 1 template DNA and 0.5U Taq DNA polymerase (Sigma, USA). Amplification was carried out with an initial denaturation at 94 C for 3 min followed by 45 cycles of 94 C for 1 min, 55 C for 1 min and 72 C for 2 min. A final 5 min extension at 72 C was then performed. The PCR product sizes was determined in 1,5% agarose (Sigma) gel electrophoresis along with 0.5x TBE buffer. Gels were stained with gel-red, specific dye which is not danger to human body. PCR products were obtained when the gel visualized in transilluminator (Figure 1).

Hairpin RNA interference technique was used to silence arabidopsis CRY1 gene expression to investigate its biological functions during vegetative and generative period. Therefore, specific 270 bp regions from Arabidopsis CRY1 gene was chosen and designed RNAi cassettes putting – PDK intronic sequence between sense and anti-sense strands. This hairpin RNAi cassette for cryptochrome 1 gene was inserted into a pHellsGate-8 vector. Our construct carries the CRY1 cassette driven by 35S promoter and contained kanamycin resistance gene marker was transformed into WT plant.

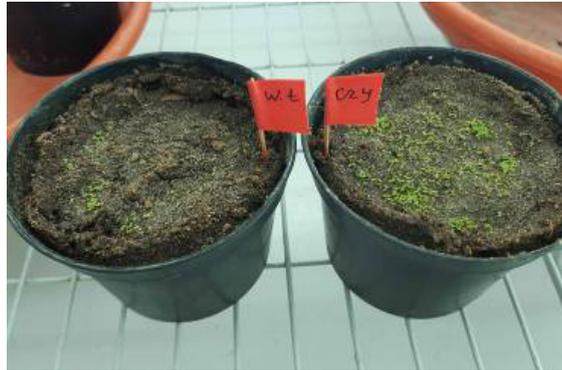
After seven days of transferring genetic construct into plant flowers, the seeds matured accordingly. The seeds then individually harvested and kept in cold room to make special repose period for next generations. Selected seeds then sowed on the soil surface with three biological replicates along with WT controls. Comparative analysis of grown seedlings showed that CRY1 RNAi plants were early growing (Figure-2), early fowering and early maturing than WT controls. Further, after seed increased from first generation, the next generations of CRY1 RNAi were grown again with biological replicates under normal solar light to test their complex characteristics. Multiple phenotypic observations of T1 to T3 generation of CRY1 RNAi plants in phytotron conditions demonstrated 5-7 days early flowering (Figure 3) compared to wild-type. In addition, seed colors became brown (normally yellowish) after RNA interference. The research is underway to conduct a detail molecular characterization of CRY1 RNAi lines including 1) copy number identification for genomic inserts of the RNAi cassettes in RNAi plants, 2) quantification of expression level of CRY1 genes after transformation in comparison wild-type genotypes, and mobilization of CRY1 RNAi effects to the important crops background using somatically embryogenesis. Our preliminary results demonstrated the possible biological function of cotton CRY1 gene and their agronomic importance using RNAi technology.



**Fig. 1.** PCR amplified with 35-forward and PDK-reverse primer pairs for CRY1 RNAi T0 plants. M- 25bp – DNA ladder, 1-4 – *CRY1* RNAi plants, 5-6 - *CRY1* RNA plasmids, 7 – negative control.

As we mentioned earlier transcriptome studies opened a way to detect important genes and use them in specific purposes. Beside that the scientists from the Center of Genomics and bioinformatics are identifying new genes and their contributions in plant physiology and morphology using modern approaches. Up to

date, more than twenty agronomical important genes and their families have been identified and characterized. More than ten cotton, wheat and potato varieties were developed based on those gene. Therefore, our studies on RNA interference of Arabidopsis CRY1 gene may help to detect gene function in complex arabidopsis genomes, and use the result for other crops in the future. This effective gene-knockout technology, readily applicable to any flowering plants and crops, opens novel opportunities to manipulate any gene of interest in high specificity and generate novel biotechnological crops with “cis-genic” (based on plants own genes that differs available “transgenic” technologies utilizing foreign genes) nature, assuring its environmental safety.



**Fig. 2.** Comparative observation of seed germination between *CRY1 RNAi* and WT (control) plants.



**Figure 3.** We counted number of flowers three different stages and generations of *CRY1 RNAi* and WT together in phytotron. The results showed that *CRY1 RNAi* plants flowered earlier compared to controls.

#### REFERENCES

1. Abdurakhmonov IY, Buriev ZT, Saha S, Jenkins JN, Abdulkarimov A, Pepper AE. 2014. Cotton PHYA1 RNAi enhances major fiber quality and agronomic traits of cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Nature Communications* 4:3062; DOI:10. 1038/ncomms4062.
2. Smith, Garland (2010). *Fundamentals of Biomolecular Botany* (2 ed.). Fisher Press. p. 340.
3. van der Spek PJ, Kobayashi K, Bootsma D, Takao M, Eker AP, Yasui A (October 1996). «Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors». *Genomics*. 37 (2): 177–82. doi:10.1006/geno.1996.0539. hdl:1765/55742.
4. Griffin EA, Staknis D, Weitz CJ (October 1999). «Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock». *Science*. 286 (5440): 768–71. doi:10.1126/science.286.5440.768.
5. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q43125>
6. Usami T, et al. Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate Arabidopsis root greening under blue light. *Plant Cell Physiol*. 2004;45:1798–1808.
7. Clough SJ and Bent AF, 1998; [http://plantpath.wisc.edu/~afb/ protocol.html](http://plantpath.wisc.edu/~afb/protocol.html)

ШЕРМАТОВ Ш.Э., УСМАНОВ Д.Э., МИРЗАХМЕДОВ М.Х.,  
АЮБОВ М.С., АБДУРАХМОНОВ И.Ю.

ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК У ХЛОПЧАТНИКА  
С РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЕЙ ГЕНА ФИТОХРОМА A1 (*PHYA1*)

sshernmatov@hotmail.com

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Shermatov Sh.E., Usmonov D.E., Mirzakhmedov M.Kh., Ayubov M.S., Abduraxmonov I.Yu.

FITOXROM A1 (*PHYA1*) GENI RNK-INTERFERENCIYALANGAN GO'ZADA MIKRORNK  
EKSPRESSIYASINI PROFILINI BAHOLASH

Fitoxrom A1 (*PHYA1*) geni RNK-interferenciyalangan go'zada mikroRNK ekspressiya profilini baholandi. MikroRNKni oltmish bitta konservativ oilalari va 35 ta yangi mikroRNAlar aniqlandi. O'ttiz beshta mikroRNK g'o'zada birinchi marotaba aniqlandi va ularni mo'ljal-genlari bashorat etildi. Natijalar shuni ko'rsatadiki genlarni o'ta darajada aniq boshqarishida qatnashadiagan mikroRNKlar fitoxrom A1 (*PHYA1*) geni RNK-interferenciyalangan go'za fenotipini o'zgarishiga olib kelishi mumkin.

Шерматов Ш.Э., Усманов Д.Э., Мирзахмедов М.Х., Аюбов М.С., Абдурахмонов И.Ю.

ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК У ХЛОПЧАТНИКА С РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЕЙ  
ГЕНА ФИТОХРОМА A1 (*PHYA1*)

Проведено исследование профиля микроРНК у RNAi-хлопчатника. Идентифицированы 61 консервативных семейств микроРНК и 35 новых микроРНК. Тридцать пять новых микроРНК были идентифицированы в хлопчатнике впервые и предсказаны их гены-мишени. Результаты показывают, что микроРНК, вовлеченные в тонкую регуляцию генов в могут привести к изменению фенотипа хлопчатника с РНК-интерференцией *PHYA1*.

Shermatov S.E., Usmonov D.E., Mirzakhmedov M.Kh., Ayubov M.S., Abduraxmonov I.Y.

EVALUATION OF MICRORNA EXPRESSION PROFILES IN COTTON PHYTOCHROME A1 (*PHYA1*)  
RNAI LINES

A microRNA profile in cotton RNAi lines was studied. Sixty-one conserved miRNA families and thirty-five novel miRNAs were identified. The 35 novel miRNAs were identified in cotton for the first time, and their target genes were predicted. The results imply that miRNAs involved in fine-tune gene regulation might confer to the phenotype of the RNAi

Хлопчатник является уникальной культурой, производящей натуральное волокно и культивируемой на 32-36 миллионах гектаров на территории более 80 стран по всему миру [1, 2]. Решение проблем урожайности, выхода, качества длины и прочности волокна хлопчатника было традиционно трудной задачей из-за сложности генома, негативной генетической корреляции и низкого генетического разнообразия среди культурных сортов. Поэтому приоритетной задачей глобальных генетических и селекционных хлопковых программ является разработка высокоурожайных, скороспелых сортов средневолокнистого хлопчатника (*G. hirsutum*) с более длинным и прочным волокном.

Путем РНК-интерференции гена фитохрома A1 (*PHYA1*) в Центре геномики и биоинформатики АН РУз были получены новые биотехнологические сорта средневолокнистого хлопчатника [3]. Данные сорта хлопчатника характеризуются одновременным улучшением нескольких признаков: высокая урожайность, скороспелость, увеличение прочности и длины волокна, а также сильное развитие корневой системы. Существует крайняя необходимость исследования профиля микроРНК у данных растений хлопчатника с РНК-интерференцией гена *PHYA1*, что поможет пролить свет на механизмы одновременного улучшения ключевых признаков.

МикроРНК представляют собой небольшие высококонсервативные некодирующие молекулы РНК длиной ~22 нуклеотида, участвующие в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов

[4]. МикроРНК транскрибируются РНК - полимеразой II и III, образуя предшественников, которые подвергаются расщеплению с образованием зрелой микроРНК. Идентификация микроРНК в хлопчатнике отстает от других видов растений, таких как арабидопсис и рис, который может быть вызван с полиплоидностью генома хлопчатника. *Gossypium hirsutum*, также известный как средне-волоконистый хлопчатник, является аллотетраплоидом (AADD,  $2n = 4x = 52$ ) и появился от гибридизации между А-геномным и D-геномным предшественниками (*Gossypium arboreum* и *Gossypium raimondii*). Исследователи провели секвенирование полного генома аллотетраплоидного хлопчатника *Gossypium hirsutum* и это определенно ускорит идентификацию и аннотацию, специфичных для хлопчатника микроРНК [5].

Предполагается, что с большим размером генома хлопчатник может кодировать больше, чем типичное количество микроРНК, в том числе некоторые из них играют уникальную роль в развитии волокон. С целью лучшего понимания молекулярных путей у хлопчатника, полученного путем РНК интерференции гена фиторхома A1 и из-за потенциальной важности микроРНК в сложных процессах развития, таких как качество волокна мы поставили задачу повести сравнительный анализ профиля микроРНК хлопчатника с РНК-интерференцией гена РНУА1 (RNAi-хлопчатник) и их контролей.

Материалами для исследования служили десятое поколение ( $T_{10}$ ) RNAi- растений хлопчатника Кокер-312 семейств « $T_{1-7}$ » и « $T_{31-10}$ », несущих в своем геноме генетическую RNAi-конструкцию, ноли сегреганты Кокер-312 (контроль) и не трансформированный Кокер-312 (контроль). Малые РНК выделяли из различных тканей (волокно, листья, корень, цветки) хлопчатника с использованием коммерческого набора mirPremier™ MicroRNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich) согласно инструкции производителя. Концентрация РНК и чистота была измерена с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000c (Thermo- Fisher Scientific). Из выделенной РНК подготовлена библиотека малых РНК с использованием набора The Next Multiplex Small RNA Library Prep Set (New England Biolabs) согласно инструкции производителя. МикроРНК из волокна хлопчатника была выделена на стадиях развития семян 5, 10 и 15 дней после антезиса (ДПА).

Подготовленные библиотеки малых РНК из « $T_{1-7}$ » и « $T_{31-10}$ » были подвергнуты глубокому секвенированию на секвенаторе HiSeq 2500. Из необработанных данных малых РНК волокна хлопчатника выделены минимум 8052792 и максимум 12947430 коротких ридов (таблица 1). Последовательности адаптеров и низкокачественные риды, составившие 39,54-65,63% от необработанных данных, были удалены и средняя длина коротких ридов после тримминга была, равна 22,5-24,2 нуклеотидов (таблица 1). Внутри ридов подвергнутых триммингу 8.9%, 8.9%, 9.6%, 10.3%, 10.7% и 10.4% были аннотированы для волокна Кокер-312 5 ДПА (BK5), 10 ДПА (BK10) and 15 ДПА (BK15) и РНУА1 RNAi линии 5 ДПА (BRNAi5), 10 ДПА (BRNAi10) и 15 ДПА (BRNAi15) соответственно (таблица 2). Среди всех ридов, уникальные риды 6,566,588, 6,588,884, 5,025,362, 8,286,014, 6,426,397 и 4,741,820 были аннотированы как малые РНК (табл. 2).

Большинство этих ридов были кластрированы внутри рРНК, тРНК, мяРНК, мякРНК и мцРНК и удалены до анализа микроРНК. Среди остальных аннотированных ридов риды 7,004, 7,291, 5,704, 8,698, 6,942 и 5,559 совпали с базой данных miRBase. Распределение размера этих малых РНК варьировало от 15 до 30 нуклеотидов (нт) и наиболее преобладал 24 нт как в не трансформированном Кокер-312 так и в RNAi-хлопчатнике.

Также было проведено глубокое секвенирование малых РНК выделенных из тканей листьев, корней и бутонов контрольных (не трансформированный Кокер-312) и RNAi-растений хлопчатник. Из необработанных данных малых РНК этих тканей хлопчатника, выделены минимум 9640488 и максимум 13860992 коротких ридов (табл. 3).

Использование генома аллотетраплоидного хлопчатника TM-1 в качестве референтной последовательности очень важно для идентификации микроРНК и предсказания мишени. Без полной геномной последовательности *Gossypium hirsutum* очень сложно проводить анализ микроРНК по биоинформатическому предсказыванию. Во-первых, библиотеки малых РНК, генерированные в предыдущих исследованиях, могут содержать много ошибок. Во-вторых, очень трудно оценить возможность локусов генов микроРНК у аллотетраплоидного хлопчатника. В-третьих, выделение и идентификация микроРНК у хлопчатника отстает по сравнению с другими растениями из-за сложности генома.

Таблица 1

## Статистика тримминга из необработанных данных малых РНК волокна хлопчатника

Номер образца	Необработанные риды	Риды, подвергнутые триммингу	Процент тримминга (%)	Средняя длина после тримминга
BK5-1	8,052,792	3,867,782	48,03	22,8
BK 5-2	11,192,002	7,345,455	65,63	22,7
BK5-3	10,445,749	6,503,668	62,26	22,6
BK10-1	10,496,469	6,475,658	61,69	22,9
BK10-2	10,807,969	7,164,085	46,45	22,6
BK10-3	10,343,483	4,804,740	46,45	22,7
BK15-1	9,721,703	4,083,368	42	22,5
BK15-2	11,898,328	5,846,551	49,14	22,7
BK15-3	12,947,430	6,272,361	48,44	23
BRNAi5-1	8,684,895	5,396,278	62,13	23,3
BRNAi5-2	12,917,341	7,671,999	59,39	23,4
BRNAi5-3	12,783,126	8,366,374	65,45	23,3
BRNAi10-1	10,924,895	5,315,759	48,66	23,7
BRNAi10-2	10,578,419	5,777,184	62,69	24,2
BRNAi10-3	10,347,993	6,487,061	62,69	24,2
BRNAi15-1	10,939,628	5,511,637	50,38	23,4
BRNAi15-2	11,395,084	5,859,236	51,42	23,2
BRNAi15-3	10,194,345	4,040,911	39,54	23,7

**BK**- Кокер-312, **BRNAI**- RNAi-растения. Цифры 5, 10, 15 представляют дни после антезиса.

Таблица 2

## Распределение картированных ридов малых РНК волокна хлопчатника

Категория	BK5	BK10	BK15	BRNAi5	BRNAi10	BRNAi15
Всего ридов	17,716,905	18,444,483	16,202,280	21,434,651	17,580,004	15,411,784
Аннотированные	1,583,027	1,645,910	1,554,366	2,214,010	1,883,895	1,607,358
	(8.9%)	(8.9%)	(9.6%)	(10.3%)	(10.7%)	(10.4%)
Всего идентифицированных малых РНК	6,566,588	6,588,884	5,025,362	8,286,014	6,426,397	4,741,820
Аннотированные малые РНК	373,566 (5.7%)	354,203 (5.4%)	308,890 (6.1%)	506,395 (6.1%)	390,173 (6.1%)	298,707 (6.3%)
Малые РНК совпадающие с miRBase	7,004	7,291	5,704	8,698	6,942	5,559
Малые РНК совпадающие с <i>Gossypium hirsutum</i>	366,562	346,912	303,186	497,697	383,224	293,148

**BK**- Кокер-312, **BRNAI**- RNAi-растения. Цифры 5, 10, 15 представляют дни после антезиса.

## Статистика тримминга рядов

Библиотека	Необработанные данные	Отобранные данные	%	Удаленные данные	%
LC-1	9640488	7850614	(81.43%)	1789874	(18.57%)
LC-2	11065911	8678714	(78.43%)	2387197	(21.57%)
LC-3	9320432	6974774	(74.83%)	2345658	(25.17%)
LE-1	12598710	9779651	(77.62%)	2819059	(22.38%)
LE-2	9524748	6568953	(68.97%)	2955795	(31.03%)
LE-3	10381794	7464027	(71.90%)	2917767	(28.10%)
RC-1	13024422	9523002	(73.12%)	3501420	(26.88%)
RC-2	9989019	9018311	(90.28%)	970708	(9.72%)
RC-3	7709099	6791027	(88.09%)	918072	(11.91%)
RE-1	10004524	9406793	(94.03%)	597731	(5.97%)
RE-2	9083109	6730226	(74.10%)	2352883	(25.90%)
RE-3	10647934	8532266	(80.13%)	2115668	(19.87%)
SC-1	7592190	6541576	(86.16%)	1050614	(13.84%)
SC-2	13860992	12706280	(91.67%)	1154712	(8.33%)
SC-3	12609639	11781181	(93.43%)	828458	(6.57%)
SE-1	7361307	6655243	(90.41%)	706064	(9.59%)
SE-2	10516510	9648194	(91.74%)	868316	(8.26%)
SE-3	6392739	5763961	(90.16%)	628778	(9.84%)

**LC**-листья Кокер-312 (контроль), **LE**-листья RNAi-растений, **RC**-корни Кокер-312 (контроль), **RE**-корни RNAi-растений, **SC**- бутоны Кокер-312 (контроль), **SE**- бутоны RNAi-растений.

Основным критерием для предсказания новых микроРНК является структура шпильки образуемой прекурсором микроРНК. В данном исследовании прекурсоры для всех новых микроРНК были предсказаны и идентифицированы путем использования psRNATarget [6], и излишние мишени были сокращены вторичным blastом с TM-1, так как большинство попаданий определенного микроРНК оказались одними и теми же генами.

Известные и консервативные микроРНК были идентифицированы путем картирования с использованием базы данных miRBase. Были обнаружены 77 известных микроРНК относящихся к 61 семействам микроРНК и они все присутствовали у обеих линий хлопчатника. Из них 34 семейств микроРНК были специфичными для хлопчатника и 7 микроРНК экспрессировались дифференциально у RNAi-хлопчатника (более 2 раз, FDR $\leq$ 5). Для большинства семейств микроРНК был идентифицирован один. Тем не менее в некоторых семействах микроРНК были идентифицированы множественные члены - miR7495, 390, 2949, 167, 399, 7486, 394, 7484, 396, 7492, 156, 827 и 7496. Дополнительно к 77 консервативным микроРНК, также из волокон RNAi-хлопчатника и их контролей были идентифицированы новые микроРНК.

Сравнение экспрессии этих консервативных микроРНК показало усиление экспрессии 39 и снижение экспрессии 38 у RNAi-хлопчатника. Семь из консервативных микроРНК, включая miR7503, miR7514, miR399c, miR399d, miR160, miR169b и miR2950 были экспрессированы дифференциально (больше 2 раз) у RNAi-хлопчатника по сравнению с Кокер-312. Это указывает на возможное влияние микроРНК на фенотип RNAi-хлопчатника.

МикроРНК растений обычно полностью или почти полностью комплементарны своим мише-

ням, и разрезание происходит между 10 и 11 нуклеотидами от 5' конца микроРНК. Это было использовано для идентификации мишеней новых микроРНК. Путем использования psRNATarget были предсказаны 97 мишеней для 35 новых микроРНК. Среди них мишени у трех новых микроРНК miR14, 22 и 24 не были идентифицированы. Среди мишеней ген, кодирующий цитохром P450 подобный ТАТА связывающий белок, чаще встречался среди мишеней будучи мишенью различных новых микроРНК - miR1, 2, 16, 19, 26, 27, 28, 31 и 32. Цитохром P450 растений вовлечен в широкий круг биосинтетических реакций, включая конъюгацию жирных кислот, синтез гормонов, образование защитных компонентов. Из этих 9 новых микроРНК только miR27 и miR32 аккумулялировались слегка больше у RNAi-хлопчатника, другие 7 микроРНК - miR1, 2, 16, 19, 26, 28 и 31 были немного меньше у RNAi линий по сравнению с Кокер-312.

Анализы также показали, что из новых микроРНК 16 были в D-субгеноме, а еще 15 микроРНК - в A-субгеноме. Большинство первых идентифицированных микроРНК были локализованы в D-геноме в силу ограниченной информации по сиквенсам генома средневолокнистого хлопчатника. Расширение пула секвенированных геномов хлопчатника повысило точность и охват для биоинформатического предсказания и анализа микроРНК. МикроРНК длиной в 24 нуклеотида превалировали среди 35 новых микроРНК, что согласуется с исследованиями других ученых. В отличие от микроРНК длиной 21 нуклеотида, ассоциированных с AGO1, микроРНК длиной 24 нуклеотида были ассоциированы с AGO4, который предпочтительнее для sРНК с 5-терминальным аденином. Как ожидалось, микроРНК длиной 24 нуклеотида имели 5-терминальный аденин, что согласуется с данными других исследований. Препараторы предсказанных шпилек имели негативную свободную энергию фолдинга от 45.7 до -230.1 kcal mol<sup>-1</sup>, что согласуется с другими исследованиями.

Было показано, что новые микроРНК подавляют белок, связывающий промотор рРНК, и некоторые факторы транскрипции и родственные белки, такие как фактор транскрипции bZIP, изоформа 1 группы глобальных факторов транскрипции и WD40-подобный фактор транскрипции. Гены рибосомных белков также были мишенью для этих новых микроРНК. Кроме того, было предсказано, что многие белки, связанные с трансляцией, такие как фактор инициации трансляции и фактор элонгации 1 $\alpha$ , являются мишенями для новых miR2, 10, 26 и 27. Предсказанные мишени этих новых микроРНК также включают множество ферментов, таких как АТФ-синтаза, серин-треонин-белок. Показано, что мишенью новой микроРНК miR18 является альфа-3 цепь тубулина, белка, транскрипт которого накапливается во время развития волокна хлопка.

Выявлено, что, Gh-miR7514, специфичный для хлопчатника микроРНК, больше встречался у RNAi-хлопчатника. Мишень микроРНК Gh-miR2950 кодирует предполагаемый гиббереллин 3 гидроксилазу, который накапливается много в волокне. Было показано, что гиббереллин 3 гидроксилаза контролирует элонгацию междоузлий у гороха. Результаты этого исследования согласуются с этой гипотезой в том, что подавление Gh-miR2950 способствует удлинению волокна у RNAi-хлопчатника за счет увеличения активности гиббереллин-3-гидроксилазы и, следовательно, повышения уровня биологически активного гиббереллина GA1.

МикроРНК miRNA169, 160 и 399 являются высоко консервативными в растениях. Докладывалось, что miR160 и miR169 были значительно ниже экспрессированы в волокнах, чем в проростках. Показано, что miRNA160 нацелена на три фактора ответа на ауксин ARF10, 16 и 17. Хорошо известно, что ауксин играет важную роль в развитии хлопкового волокна. Результаты этого исследования позволили предположить, что miR160 может способствовать развитию волокна через путь передачи сигналов ауксина за счет повышенной экспрессии ARF10, 16 и 17. Эксперименты по аннотации идентифицированных микроРНК выявили, что некоторые мишени данных микроРНК участвуют в механизмах развития волокна хлопчатника.

Таким образом в средневолокнистом хлопчатнике были идентифицированы 61 консервативных семейств микроРНК и 35 новых микроРНК. Мишени из 6 консервативных микроРНК, которые экспрессируются дифференциально у RNAi-хлопчатника участвуют в первичном синтезе клеточной стенки и сигнальных путях фитогормонов. Тридцать пять новых микроРНК были идентифицированы в хлопчатнике впервые и предсказаны их гены-мишени. Показано, что мишенью девяти новых микроРНК является цитохром P450 TBP. Эти результаты показывают, что микроРНК, вовлеченные в тонкую регуляцию гена могут придавать соответствующий фенотип RNAi-растениям хлопчатника с улучшенным качеством волокна.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abdurakhmonov I.Y. [et al.] Genetic diversity in *Gossypium* genus // Мю Caliskan // Genetic diversity in Plants. – R. : InTech, - P. 331-338.
2. Abdurakhmonov I.Y. RNA Interference / I.Y. Abdurakhmonov // A Hallmark of Cellular Function and Gene Manipulation. – R. : InTech, 2016. – P. 3-18.
3. Abdurakhmonov I.Y. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. / I.Y. Abdurakhmonov [et al.] // Nat Commun. – 2014. – No 5. – P. 3062.
4. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA. 2004; 10(12):1957±1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204> PMID: 15525708
5. Wang K, Wang Z, Li F, Ye W, Wang J, Song G, et al. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. Nature Genetics. 2012; 44(10):1098±1103. <https://doi.org/10.1038/ng.2371> PMID: 22922876
6. Dai X, Zhao PX. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Res. 2011; 39 (Web Server issue):W155±9. Epub 2011/05/31. doi: 10.1093/nar/gkr319. PMID: 21622958

**КАМБУРОВА В.С.<sup>1</sup>, УБАЙДУЛЛАЕВА Х.А.<sup>1</sup>, ЧАРЫШНИКОВА О.С.<sup>2</sup>,  
НАСРИЕВА К.С.<sup>2</sup>, АБДУРАХМОНОВ И.Ю.<sup>1</sup>**

### **АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА**

e-mail: [venera\\_k75@mail.ru](mailto:venera_k75@mail.ru)

<sup>1</sup>Центр геномики и биоинформатики АН РУз

<sup>2</sup>Центр передовых технологий при Министерстве инновационного развития  
Республики Узбекистан

Kamburova V.S., Ubaydullayeva X.A., Charyshnikova O.S., Nasrieva K.S., Aburakhmonov I.Y.

#### **GEN-NOKAUT G'O'ZA NAVLARNING ANTIOKSIDANT FERMENTLAR TIZIMNING FAOLLIGI**

Ushbu ishda Porloq gen-nokaut navlarida reaktiv kislorod turlari to'planishi va antioksidant tizimning fermentlar faolligi o'rganildi. Ushbu navlarning abiotik stressga chidamliligi antioksidant tizimning fermentlari faolligi oshishi bilan bog'ligi ko'rsatilgan.

Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Чарышникова О.С., Насриева К.С., Абдурахмонов И.Ю.

#### **АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА**

В данном исследовании проведено сравнительное изучение накопления активных форм кислорода и активности ферментов антиоксидантной системы у ген-нокаутных сортов хлопчатника серии Порлоқ. При этом показано, что устойчивость данных сортов к абиотическим стрессам опосредуется повышением активности ферменты антиоксидантной системы.

Kamburova V.S., Ubaydullayeva X.A., Charyshnikova O.S., Nasrieva K.S., Aburakhmonov I.Y.

#### **ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM ENZYMES IN GENE-KNOCK-OUT BREEDER VARIETIES**

In this study, a comparative study of the accumulation of ROS and the activity of the enzymes of the antioxidant system in gene knockout cotton varieties Porloq was carried out. It was shown that the resistance of these varieties to abiotic stress is mediated by an increase in the activity of enzymes of the antioxidant system.

Одной из наиболее значимых проблем сельскохозяйственного производства является повышение уровня засоленности аридных почв, используемых для выращивания сельхозпродукции в южных регионах. При этом увеличение доли засоленных сельхозугодий связано как с изменением климата, так и применением современных методов ирригации, вызывающих вымывание солей из глубоких слоев почвы [1 – 4].

Солевой стресс оказывает негативное влияние на физиологические процессы, протекающие в растениях, что, в свою очередь снижает урожайность сельхозкультур. Так, высокие концентрации соли в почве вызывают задержку роста и развития растений, ингибирование ферментативной активности и снижение скорости фотосинтеза [5, 6]. Внутри клетки солевой стресс активирует дисбаланс воды и ионов в растительной клетке, что приводит к индукции осмотического и ионного стресса, которые ускоряют окислительный стресс, опосредованный гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидные анионы ( $O_2^-$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксил радикалы ( $OH^\bullet$ ) [7 – 11].

Для минимизирования окислительного повреждения, вызванного продуцированием АФК во время солевого стресса, растения имеют сложную антиоксидантную систему, включающую некоторые неферментативные антиоксиданты и различные антиоксидантные ферменты. Антиоксидантные ферменты включают супероксиддисмутазу (SOD, EC 1.15.1.1), каталазу (CAT, EC 1.11.1.6), глутатионпероксидазу (EC 1.11.1.9) и пероксидазу (POD, EC 1.17.1.7); и ферменты цикла аскорбат-глутатион (аскорбатпероксидаза (APX, EC 1.11.1.11) и глутатионредуктаза (GR, EC 1.6.4.2)) [7 – 11].

Кроме того, как показал анализ литературных данных, в большинстве сельхозкультур, включая хлопчатник, повышенные уровни активности антиоксидантных ферментов могут рассматриваться как один из возможных механизмов устойчивости к абиотическим стрессам [8, 12]. Таким образом, накопленные данные позволяют предположить, что внутренние механизмы устойчивости растений к антиоксидантам могут обеспечить стратегию повышения солеустойчивости и рассматривать в качестве маркера для эффективного отбора генетически трансформированных солеустойчивых сортов [8, 12].

Учитывая вышеизложенное, а также основываясь на данных об устойчивости данных сортов к абиотическим стрессам [13], было проведено сравнительное исследование накопления АФК и активности ферментов антиоксидантной системы.

Для достижения цели исследований эксперименты проводили на растениях, выращенных в модельных условиях фитотрона. Все растения подвергались генетической верификации.

Для экстракции ферментов навеску замороженных листьев (0,3 г) измельчали в мелкий порошок, используя ступку, помещенную в ледяную баню, и пестик, который предварительно охлаждали жидким азотом, и гомогенизировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 1 мМ аскорбата и 2% (в/об) поливинилполипирролидона. Затем гомогенаты центрифугировали при 20 000 g в течение 30 минут при 4° C. Активность супероксиддисмутазы (SOD, EC 1.15.1.1) определяли по методу Foster и Hess (1980) [14]. Реакцию инициировали добавлением ксантиноксидазы и измеряли оптическую плотность при 560 нм. Общая активность каталазы (CAT, EC 1.11.1.6) измерялась в соответствии с методом, описанным Beers и Sizer (1952) [15], с небольшими изменениями.

Для определения активности пероксидазы (POD, EC 1.17.1.7) на основании реакции окисления бензидина при 700 нм. Активность пероксидазы вычисляли по скорости реакции в условных единицах. Активность аскорбат пероксидазы (APX, EC 1.11.1.11) определяли согласно Nakano и Asada (1981) [16] по снижению оптической плотности при 290 нм по мере окисления аскорбата. Активность глутатион редуктазы (GR, EC 1.6.4.2) измеряли, как описано Foyer, Halliwell (1976) [17]. Реакцию инициировали добавлением GSSG, и скорость окисления НАДФН контролировали при 340 нм. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции  $6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  для НАДФН. Удельную активность фермента для всех ферментов выражали в единицах / мг белка.

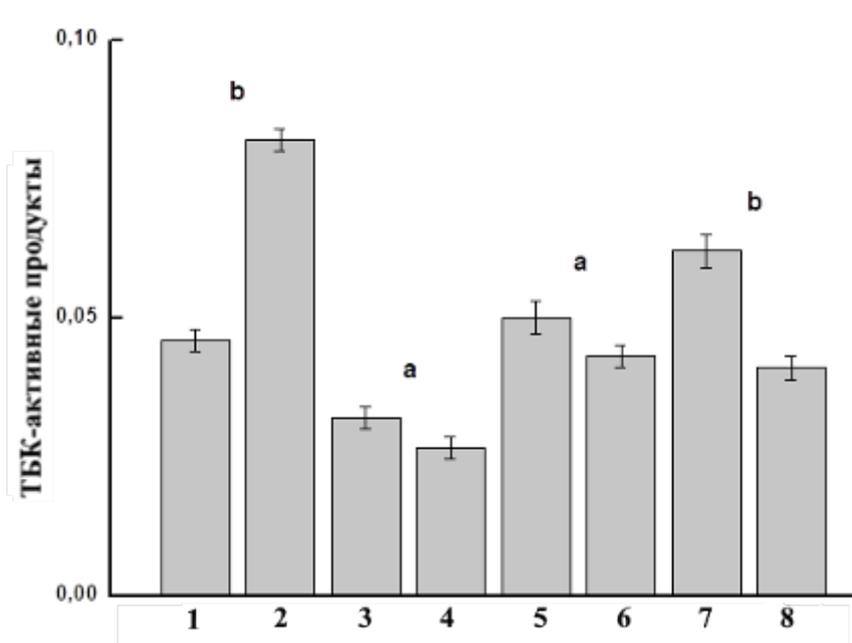
*Определение активных форм кислорода.* Содержание  $H_2O_2$  определяли с использованием модифицированного метода Ferguson et al. (1983) [18].

*Определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).* Навеску замороженных листьев (0,5 г) гомогенизировали в 0,1% (в/об) растворе ТХУК. Гомогенат центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин и 1 мл супернатанта прибавляли к 4 мл 0,5% (в/об) раствора 2-тиобарбитуровой кис-

лоты в 20% (в/об) ТХУК. Смесь инкубировали при 90° С в течение 30 мин, реакцию останавливали помещением пробирок в ледяную баню. Образцы центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин. Оптическую плотность супернатанта поределяли при 532 нм. Значение неспецифической абсорбции при 600 нм вычиталась из полученного значения. Концентрация малонового диальдегида (МДА) рассчитывали, используя коэффициент экстинкции, равный 155 мМ<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>.

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием пакета программ OriginPro 7.0. Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка из 3 биологических и 3 технических повторов. Значимость различий между средними значениями определяли с помощью теста Туки. Различия в P ≤ 0,05 считались значимыми.

Известно, что солевой стресс вызывает активацию ПОЛ, которое часто используется в качестве индикатора окислительного повреждения в мембранах, вызванного солевым стрессом [19]. В связи с этим на первом этапе нами было исследовано содержание МДА в листьях как модифицированных, так и немодифицированных сортов хлопчатника (рис. 1). Результаты показали, что накопление МДА было выше у немодифицированных сортов по сравнению с модифицированными линиями и сортами, имеющими конструкцию с вектором к гену РНУА1 в геноме (рис. 1).

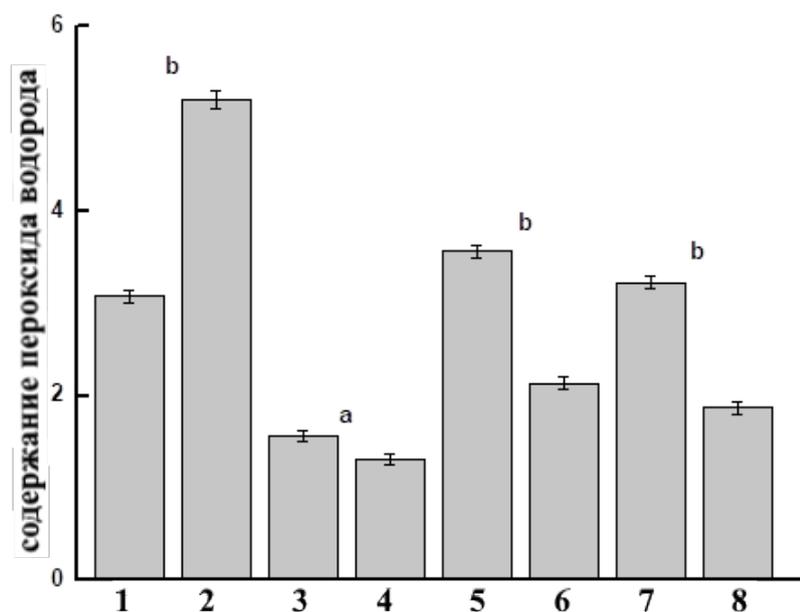


**Рис. 1.** Содержание МДА в листьях модифицированных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – накопление ТБК-активных продуктов, в мкмоль МДА/мг сырого веса. а – p ≤ 0,05, b – p ≤ 0,01

Важно отметить, что стрессовые условия усиливают выработку H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в разных компартментах клеток растений посредством как ферментативных, так и неферментативных процессов [8]. В связи с этим мы исследовали содержание пероксида водорода в тканях листьев как у ген-нокаутных, так и исходных и родительских сортов.

Как видно из рис. 2, разные генотипы имеют разный уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях. При этом наивысший уровень перекиси водорода наблюдался у исходного сорта Кокер-312. Самый низкий уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> был отмечен у модифицированной линии T<sub>1-7</sub>, что было меньше, чем у Кокер-312. Остальные генотипы имеют промежуточные уровни H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 2). Эти результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными [7, 20].

Кроме того, было показано, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> индуцирует цитозольную АРХ [8], и, следовательно, накопление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в условиях засоления может быть сигналом для иницирования адаптивного ответа на стресс [7, 20]. Хотя различия в солеустойчивости между различными сортами не обязательно связаны с различиями в способности к детоксикации АФК, многие сравнительные исследования с использованием солеустойчивых и солечувствительных генотипов показали корреляцию между солеустойчивостью и повышенной активностью антиоксидантных ферментов [7, 20].



**Рис. 2.** Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в мкмоль /мг сырого веса. a – p ≤ 0,05, b – p ≤ 0,01

Полученные результаты позволяют говорить о том, что более низкие уровни МДА и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и, соответственно, ПОЛ могут быть объяснены более высокой активностью ферментов антиоксидантной системы у модифицированных линий и сортов и способствовать наблюдаемой устойчивости сортов серии Порлок к солевому стрессу.

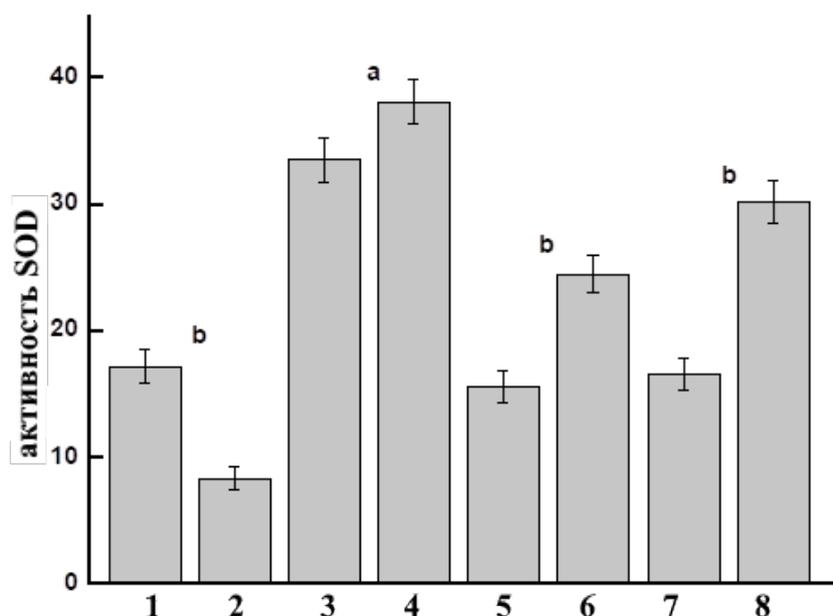
Абиотические стрессы могут увеличивать вызванное кислородом повреждение клеток из-за увеличения выработки АФК [8, 10, 11]. Следовательно, устойчивость к солевому и водному стрессу может зависеть, по меньшей мере частично, от усиления антиоксидантной защитной системы, которая включает антиоксидантные соединения и несколько антиоксидантных ферментов. В связи с этим, далее была исследована сравнительная активность антиоксидантных ферментов SOD, POD, CAT, APX и GR у RNAi сортов хлопчатника.

Вследствие того, что SOD может катализировать превращение супероксида в молекулярный кислород и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, этот фермент считается наиболее эффективным внутриклеточным ферментативным антиоксидантом [8, 10 – 12, 21].

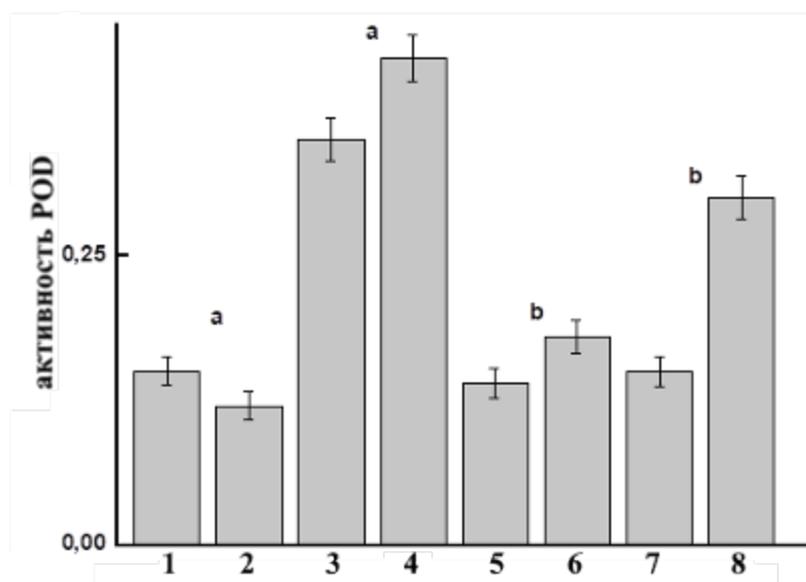
Как видно из рис. 3, при исследовании активности SOD у трансформированных и нетрансформированных сортов хлопчатника была обнаружена повышенная активность фермента в листьях RNAi сортов по сравнению с контрольным генотипом Кокер-312. Эти результаты позволяют предположить, что RNAi генотипы обладают более эффективной способностью детоксифицировать радикалы O<sub>2</sub><sup>-</sup> и более устойчивы к абиотическим стрессам. Полученные результаты хорошо коррелируют с литературными данными [7, 20, 21].

POD является основным ферментом, который обеспечивает превращение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в воду в хлоропластах и цитозоле растительных клеток, используя для этого фенольные соединения в качестве восстановителей [10, 11, 21]. С другой стороны, разложение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до H<sub>2</sub>O и O<sub>2</sub> также может катализироваться CAT, который в основном находится в пероксисомах и глиоксисомах [10, 11, 21]. Эти два фермента составляют основные системы элиминации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках. В связи с тем, что ранее показано, более низкое содержание пероксида водорода в листьях ген-нокаутных сортов серии Порлок, что предполагает более высокую активность этих ферментов, обеспечивающих его разложение, было проведено сравнительное изучение активности POD и CAT у RNAi сортов (рис. 4).

Полученные данные показали, что активность POD коррелировала с наличием инсерции векторной конструкции в геноме хлопчатника (рис. 4): более высокая активность фермента по сравнению с контрольным генотипом наблюдалась у ген-нокаутных сортов, что согласуется с данными об их более высокой устойчивости к абиотическим стрессам [13].



**Рис. 3.** Активность супероксиддисмутазы в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – активность SOD, в единицах активности /мг белка. a –  $p \leq 0,05$ , b –  $p \leq 0,01$

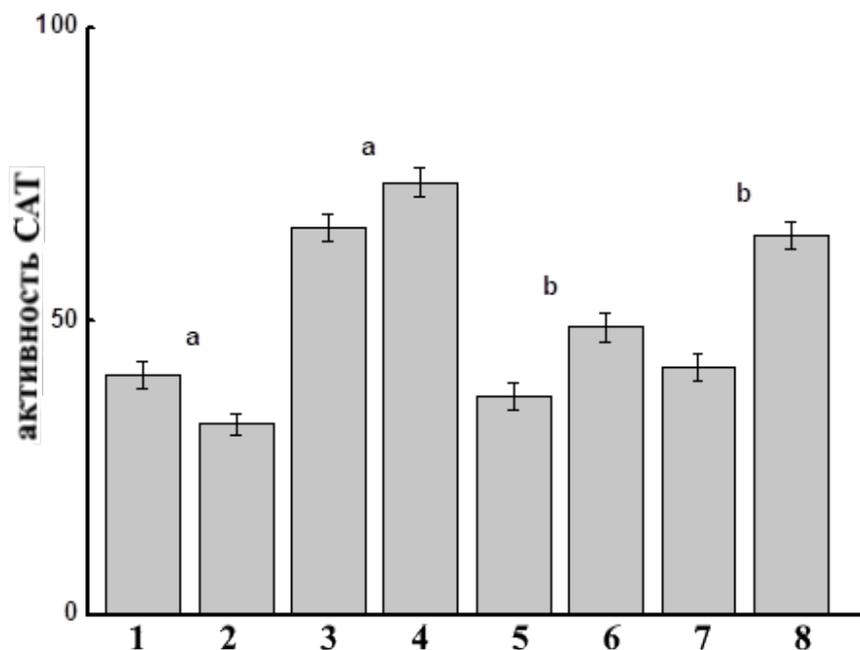


**Рис. 4.** Активность пероксидазы в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – активность POD, в условных единицах /мг белка. a –  $p \leq 0,05$ , b –  $p \leq 0,01$

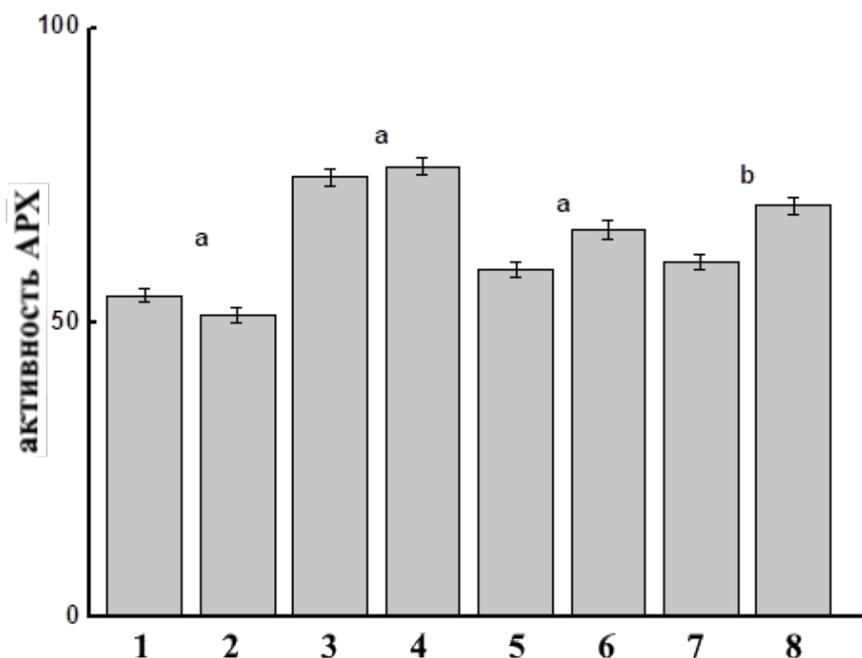
Из литературных данных известно, что повышение активности каталазы (CAT) при солевом стрессе показано у солеустойчивых сортов различных культур [4, 7, 21]. Как видно из рис. 5, активность CAT значительно различалась для разных сортов хлопчатника. Эти результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными об активности каталазы у разных сортов хлопчатника, обладающих различной степенью устойчивости к солевому стрессу, при моделированном засолении [7, 12, 20].

Удаление  $H_2O_2$  также осуществляется через глутатион-аскорбатный цикл, серией последовательных окислительно-восстановительных реакций с участием трех ферментов: APX, GR и монодегидроаскорбатредуктазы [8, 11, 21]. APX играет ключевую роль в защите растения от окислительного стресса путем удаления  $H_2O_2$  в различных клеточных компартментах с участием аскорбиновой кис-

лоты в качестве восстановителя. Данный фермент имеет более высокое сродство к  $H_2O_2$ , чем POD и САТ, и, как таковой, может играть более важную роль в элиминации АФК во время стресса [4, 8, 11, 21]. Как видно из рис. 6, наблюдалось значительное различие активности АРХ между исследуемыми генотипами. При этом более высокая активность аскорбатпероксидазы отмечалась у ген-нокаутных сортов хлопчатника, хорошо коррелируя с литературными данными [7, 12].



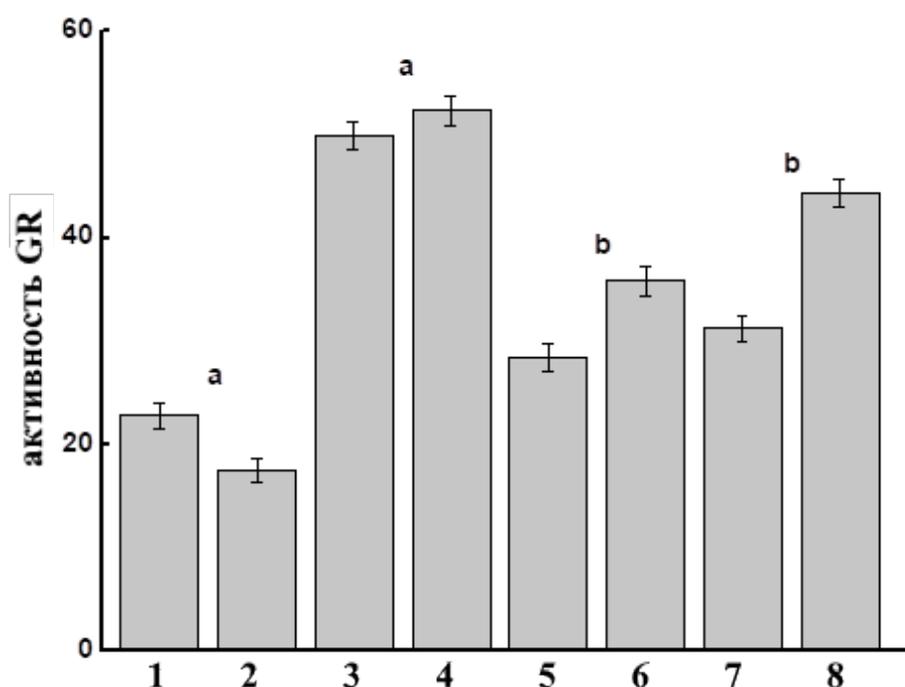
**Рис. 5.** Активность каталазы в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – активность САТ, в единицах активности /мг белка. а –  $p \leq 0,05$ , б –  $p \leq 0,01$



**Рис. 6.** Активность аскорбат пероксидазы в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – активность АРХ, в единицах активности /мг белка. а –  $p \leq 0,05$ , б –  $p \leq 0,01$

Мы также обнаружили, что более высокая активность APX сопровождалась более высокой активностью САТ в ген-нокаутных сортах (рис. 5, 6), подразумевая, что данные сорта имеют более эффективный механизм удаления  $H_2O_2$  по сравнению с немодифицированными генотипами. Эти данные хорошо согласуются с имеющимися в литературе сведениями о прямой корреляции активности APX и САТ у солеустойчивых сортов хлопчатника [7].

Роль восстановленного глутатиона (GSH) и GR в разложении  $H_2O_2$  в растительных клетках была хорошо установлена в ферментативном пути Холливелла-Асада [11]. GR является скоростью-лимитирующим ферментом и катализирует последнюю стадию аскорбат-глутатионного цикла [8, 11, 21]. Учитывая данные о повышенной активности одного из ферментов аскорбат-глутатионного цикла – APX, исследована активность GR модифицированных и немодифицированных сортов и линий хлопка. В нашем исследовании активность GR хорошо коррелировала с наличием ген-нокаутной векторной конструкции в геноме хлопчатника и была увеличена у RNAi генотипов по сравнению с контрольным и родительскими сортами Кокер-312 (рис. 7). При этом полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [7, 12].



**Рис. 7.** Активность глутатион редуктазы в листьях ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта; по оси ординат – активность GR, в единицах активности /мг белка. a –  $p \leq 0,05$ , b –  $p \leq 0,01$

Повышенная активность GR способствует увеличению скорости окисления NADPH до  $NADP^+$ , обеспечивая тем самым доступность  $NADP^+$  для акцепции электронов из фотосинтетической цепи. При таких условиях поток электронов к  $O_2^-$  и, следовательно, образование  $O_2^-$  могут быть сведены к минимуму [7]. Учитывая, что у трансформированных сортов хлопчатника также наблюдается более высокая активность APX (рис. 6), эти результаты показывают, что ген-нокаутные сорта обладают более активным аскорбат-глутатионным циклом, что может обуславливать большей устойчивостью сортов хлопчатника серии Порлок к абиотическим стрессам [13].

Кроме того, активность всех антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, POD, APX и GR) значительно различалась между разными генотипами и коррелировала с наличием векторной конструкции в генотипе. При этом способность поддерживать более высокую активность этих антиоксидантных ферментов приводило к более низкой продукции  $H_2O_2$ , перекисному окислению липидов, более высокой стабильности мембран и, следовательно, более высокой засухо- и солеустойчивости сортов серии Порлок [13]. Эти результаты хорошо коррелируют с литературными данными об активности ферментов системы антиоксидантной защиты хлопчатника при солевом стрессе [7, 12, 22].

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Arzani A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44: 373–383
2. Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–681
3. Shrivastava P., Kumar R. 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22: 123–131
4. Kumar S., Sachdeva S., Bhat K.V., Vats Sh. 2018. Plant Responses to Drought Stress: Physiological, Biochemical and Molecular Basis. In *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 1–26
5. Gaber M.A. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behaviour* 5: 369–374
6. Sytar O., Mbarki S., Zivcak M., Brestic M. The Involvement of Different Secondary Metabolites in Salinity Tolerance of Crops. In *Salinity Responses and Tolerance in Plants: Exploring RNAi, Genome Editing and Systems Biology*, eds. Kumar V. et al.: Springer Nature (Switzerland). 21–48
7. Zhang L., et al. 2014. Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity. *PLoS ONE* 9(11): e112807
8. Caverzan A., Casassola A., Brammer S.P. 2016. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives*, eds. Shanker A., Shanker C.: InTechOpen (Croatia). 463–480
9. Hamed K.B., Dabbous A., El Shaer H., Abdely Ch. 2018. Salinity Responses and Adaptive Mechanisms in Halophytes and Their Exploitation for Producing Salinity Tolerant Crops. In *Salinity Responses and Tolerance in Plants: Exploring RNAi, Genome Editing and Systems Biology*, eds. Kumar V. et al.: Springer Nature (Switzerland). 1–20
10. Nouman W., et al. 2018. Variation in Plant Bioactive Compounds and Antioxidant Activities Under Salt Stress. In *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 77–102
11. Saini P., et al. 2018. Reactive Oxygen Species (ROS): A Way to Stress Survival in Plants. In *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective*, eds. Zargar S.M., Zargar M.Y.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 127–154
12. Hasan M.M., et al. 2018. Molecular and Physio-Biochemical Characterization of Cotton Species for Assessing Drought Stress Tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2636
13. Abdurakhmonov I.Y., et al. 2014. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. *Nat Comm.* 5: 3062
14. Foster J.G., Hess J.L. 1980. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiol* 66: 482–487
15. Beers R.F., Sizer I.W. 1952. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133–140
16. Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *PCPhy* 22(5): 867–880
17. Foyer C.H., Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25
18. Ferguson I.B., Watkins C.B., Harman J.E.C. 1983. Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol* 71:182-186
19. Hernandez J.A., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F. 2002. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ.* 23: 853–862
20. Zhang L., et al. 2013. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. *J Plant Res.* 126: 293–304
21. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. 2017. Функционирование антиоксидантной систе-

мы растений при солевом стрессе. Вісник Харківського Національного Аграрного Університету Серія Біологія, вип. 3. 42: 23-45.

22. Chen Z. et al. 2018. Biomass Accumulation, Photosynthetic Traits and Root Development of Cotton as Affected by Irrigation and Nitrogen-Fertilization. *Frontiers in Plant Science* *Frontiers in Plant Science*. 9: 173.

**ИМАМХОДЖАЕВА А.С., КАДЫРОВА Ш.Б., СОБИРОВ Б.М., МУХАММЕДОВ Й.А.,  
МАМАНАЗАРОВ Ш.И., МАМАДЖАНОВ А.**

**ХАРАКТЕР ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕНА *NPT II*  
У ГЕН-НОКАУТНЫХ РАСТЕНИЙ ХЛОПЧАТНИКА**

iazadaxan@gmail.com

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Sobirov B.M., Muhammadov J.A., Mamanazarov S.I., Mamadjanov A.

***NPT II* GENINING GEN-NOKAUT G'O'ZANING AVLODLARIDA NAMOYON ETILISHI**

Maqolada biotexnologik o'simliklar yaratishda tadqiqotchilar duch kelishi mumkin bo'ladigan ko'chirib-otqazilgan genlar expressiyasi tufayli biotexnologik g'o'zaning Porloq-1 navi populyatsiyasida kanamitsinga bardoshlikni ta'minlovchi selektiv belgisi *npt II* genini namoyon etilishini tavsiflab beriladi

Имамходжаева А.С., Кадырова Ш.Б., Собиров Б.М., Мухаммедов Й.А., Маманазаров Ш.И., Мамаджанов А.

**ХАРАКТЕР ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕНА *NPT II* У ГЕН-НОКАУТНЫХ РАСТЕНИЙ ХЛОПЧАТНИКА**

В статье обсуждается поведение селективного маркерного гена *npt II*, обеспечивающего устойчивость к канамицину, в популяции биотехнологического хлопчатника сорта Порок -1 в связи с экспрессией перенесенных генов, с которыми сталкивается экспериментатор при создании биотехнологических растений.

Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Sobirov B.M., Muhammadov J.A., Mamanazarov S.I., Mamadjanov A.

**THE BEHAVIOR OF DISPLAY OF GENE *NPT II* AT GENE-KNOCKOUT OF COTTON-PLANTS**

The article discusses the behavior of the selective marker gene *npt II*, providing resistance to kanamycin in the biotechnology population cotton variety Porloq-1 in connection with the experimenter is faced with when creating biotechnological plants.

Известно, что ген *npt II* кодирует фермент неомицинофосфотрансферазу II (амино-гликозид-3'-фосфотрансферазу II, АРН(3')II), активность которого придает ей признак устойчивости к родственному антибиотикам: канамицину, неомицину и гинетицину. Этот ген выделен и. из транспозона Tn5 *E.coli* (то есть бактериального происхождения). Устойчивость клеток, имеющих этот ген, обеспечивается тем, что фермент *NPTII* модифицирует структуру молекулы канамицина (фосфорилирует одну из его гидроксильных групп), вследствие чего канамицин утрачивает свои антибиотические свойства, а клетка приобретает признак устойчивости [1]. Клетки, в геном которых включают этот ген, приобретая устойчивость способны выживать при инкубации в канамициновой среде. Это свойство гена до сегодняшнего дня применяется в биотехнологии, когда создают молекулярно-генетические конструкции на основе стандартных плазмид, с целью переноса, например в растительный геном некоего геномного фрагмента. В своем составе такие внехромосомные экспрессирующиеся (или челночные) векторы имеют сайты инициации репликации и обязательно селективный ген [2].

Непредсказуемые изменения в экспрессии перенесенных генов - одна из проблем, с которыми сталкивается экспериментатор при создании и исследовании трансгенных растений. Как выяснили

исследователи, работавшие с трансформацией, в условиях стабильной экспрессии перенесенных генов их проявление среди потомков соответствовало доминантной мутации при полном доминировании и наследование подчинялось классическим законам Менделя. В случае нарушений экспрессии ими наблюдается как отклонения от ожидаемых расщеплений, так и полная потеря экспрессии перенесенных генов [3,4]. Описаны случаи нестабильной экспрессии чужеродных генов, где их проявление выражается в виде мозаицизма, как чередование участков растительных тканей с активным и неактивным трансгеном. Такой паттерн экспрессии описан для генов *npt II* [5]. Авторами изучалась стабильность экспрессии и наследования чужеродной ДНК в геноме трансгенных растений [6].

Проблема поведения селективного маркерного гена заинтересовала нас в связи с целью получить популяцию биобезопасных биотехнологических сортов – одной из актуальных сегодня тем, связанных с коммерческими культурами, особенно выходящими на мировой рынок.

В Центре геномики и биоинформатики АН РУз работают с генно-инженерными сортами хлопчатника серии Порлок, полученными применением технологии РНК-интерференции [7]. В процессе создания этих сортов была использована специальная векторная конструкция, в составе которой имеется целевая вставка, а также селективный ген, который является обязательным элементом «кассеты экспрессии» [8, 9]. «Кассеты экспрессии», включаемые в векторные плазмиды, состоят из константных последовательностей гетерологической ДНК: промотор 35S, терминатор NOS и селективный, маркерный ген *npt II*. Применение конститутивно экспрессируемых селективных генов устойчивости к антибиотикам (в данном случае к канамицину *npt II*), обеспечивает скрининг клеток-трансформантов традиционно. Однако после отбора трансформированных растений присутствие в их геноме селективных маркерных генов становится бесполезным, а их эффект непредсказуемым. И перед учеными ставится задача по разработке методов получения трансгенных растений нового поколения без “генетического мусора”, к которому относятся селективные и скрининговые гены-репортеры [10].

Наша задача была среди биотехнологических сортов хлопчатника выявить генотипы, не несущих ген канамицинустойчивости и рассмотреть характер проявления селективного маркерного гена в поколениях.

Объектом исследования послужил хлопчатник серии Порлок-1, полученный техникой РНК-интерференции (*PHYA1 RNAi*).

Для молекулярно-генетического скрининга были использованы следующие методы:

- экстракция геномной ДНК из листьев хлопчатника методом СТАБ;
- ПЦР (полимеразная цепная реакция);
- гель-электрофорез (в 0,9% и 1,5 % агарозном геле).

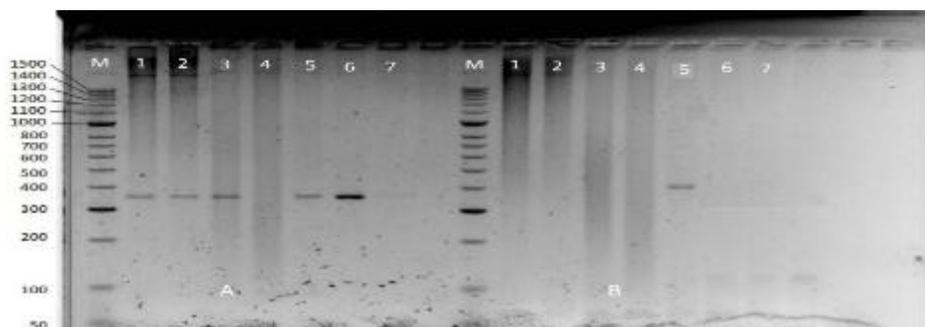
Очищенную растительную ДНК использовали в качестве матрицы при постановке ПЦР при инкубировании с сайт-специфическими праймерами. Были использованы праймеры для 35S, PDK и *kan* участков ДНК. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Для сорта Порлок-1 в результате ПЦР-скрининга на наличие в геноме векторной конструкции, выполненного парой праймеров 35S-F и PDK-R были получены позитивные результаты. То есть в ходе ПЦР были синтезированы продукты амплификации, что принято нами за подтверждение присутствия в геноме растительных образцов векторной конструкции *pHellsgate-8::PHYA1*, или ее фрагмента. Затем, эти же образцы ДНК использовали в ПЦР с праймерной парой, специфичной для гена *npt II*. И на данном этапе мониторинга мы обращали внимание на образцы, в которых реакция амплификации не состоялась. Эти результаты представлены и на рис. 1.

У исследуемых растений были наблюдения такими характеристиками, как длина волокна, процент выхода и масса 1000 семян у растений определенных как не имеющие в своем геноме гена устойчивости к канамицину (табл. 1)

Как представлено в таблице 1, длина волокна растения № 21 варьировала в пределах 38-39 мм, и среднее значение равнялось 38,6 мм. Выход волокна составил 32,2%, а вес 1000 семян был равен 134 г. У растения № 23 длина волокна «летучек» была немного ниже и состояла в пределах 37-38 мм (среднее значение равнялось 37,6 мм). Ниже оказался и процент выхода волокна - 29,1%. Но вес 1000 семян немного превысил этот показатель по отношению к № 21 и составил 136 г. Длина волокна хлопчатника под № 35 такая же, как и у № 23, была равна 37,6 мм, но выход волокна не превысил 30 %, и вес семян также оказался ниже - 126,4 г. У хлопчатника № 96 длина волокна самая низкая среди

этих четверых растений и равна 36,6 г. , а выход волокна составил так же, как и у № 23 – 30,0% и очень снизился до 119,3 г. Тем не менее, эти показатели варьируют в пределах значений исходного сорта Порлок-1, из которого были отобраны эти проанализированные генотипы.



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации, образовавшихся при ПЦР с праймерами PDK-F / OST-R (A ) и KanF / Kan-R (B).

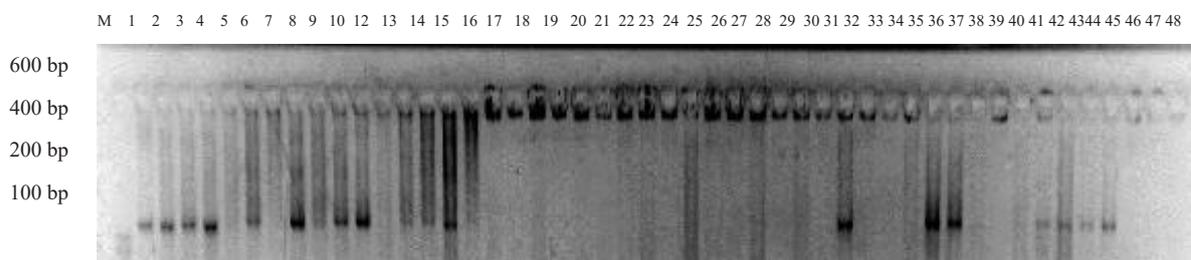
1- ампликоны ДНК растения под №21; 2- ампликоны ДНК растения под №23; 3- ампликоны ДНК растения под №35; 4- ампликоны ДНК нетрансформированного растения; 5 и 6- ампликоны плазмиды с R<sup>HY</sup> A; 7 - ампликоны мастер-mix.

Таблица 1

**Показатели длины волокна хлопчатника сорта Порлок-1, верифицированных как безканамициновые генотипы**

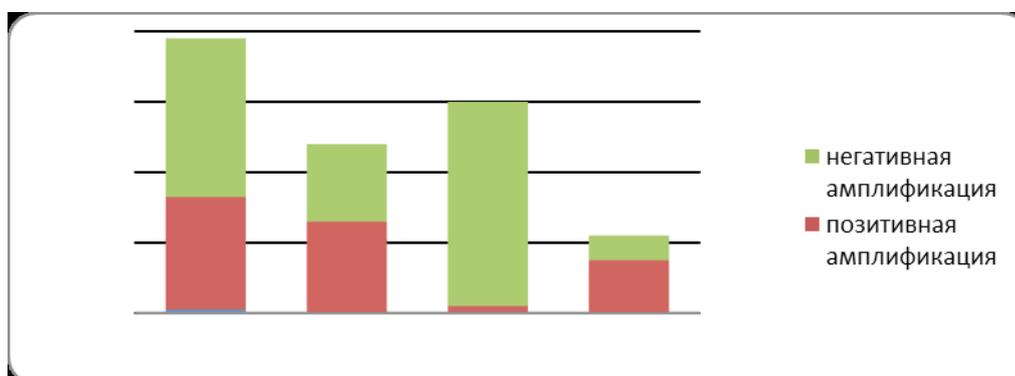
№	№ растения	Длина волокна, мм					Средняя длина	Выход волокна	Вес (г) 1000 семян
		1	2	3	4	5			
1	21	39	38	38	38	39	38,6	32,2	134
2	23	38	37	38	37	38	37,6	29,1	136
3	35	38	38	37	37	38	37,6	30,0	126,4
4	96	36	37	37	36	37	36,6	30,0	119,3

Имевшие негативные результаты амплификации с праймером на ген устойчивости к канамицину были высеяны в грунт и растительный материал был использован для мониторинга на наследование *npt II*. Результаты амплификации представлены на рис. 2



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации в ходе ПЦР с праймером Kan-F / Kan-R. (Фрагмент 1,5 % ного агарозного геля с результатами ПЦР с результатами амплификации образцов для семьи 21 и 23). Дорожки №1-77 - продукты амплификации на ДНК растений из семейства № 21; Дорожки № 78-93 - продукты амплификации на ДНК растений из семейства № 23 (16 из 48-ми); А - плазида, В - m mix, С – С-312

Объединяя результаты ПЦР по всем семьям, получили следующую картину распределения. Наибольшее число образцов с негативным ответом оказалось среди растений семьи – 35, тогда как наименьшее число образцов с негативным ответом было семейство растений от 96 растения (5 негативных ответа).



**Гистограмма 1.** Процентное соотношение образцов с негативной реакцией в ПЦР с праймером KanF / Kan-R. 1 столбец – семья-21; 2 столбец - семья-23; 3 столбец семья – 35; 4 столбец - семья – 96.

Таким образом, при скрининге геномов следующего года генерации из 214 растений хлопчатника семей № 21, № 23, № 35 и № 96, нами выявлено в общем счёте 134 образца, которые имели негативный ответ при постановке ПЦР с сайт-специфичными праймерами (kan) для гена, обеспечивающего устойчивость к канамицину (*npt II*).

Как обсуждается в мировой литературе наследование привнесённых чужеродных генов, несмотря на то, что интегрированные в геном растения- реципиента фрагменты экзогенной ДНК (в нашем случае ген устойчивости к канамицину) становились его облигатным компонентом, сохранялись в последующих поколениях как неотъемлемая часть генома [11, 12]. Однако к настоящему времени накоплено достаточно много примеров отклонений от менделевского наследования, обусловленных инактивированием гетерологичных генов [13].

На сегодняшний день, по данным литературы, известны два механизма, связанные с инактивированием трансгенов, которые реализуются на транскрипционном и пост-транскрипционном уровнях. Первый из них связан с выключением регуляторной части (промотора) гена и реализуется через метилирование ДНК. Второй механизм включается на посттранскрипционном уровне и связан с разрушением мРНК чужеродного гена в цитоплазме клетки. Все еще остается не ясным, включаются ли эти механизмы только в частных случаях, связанных с переносом в геном растений фрагментов экзогенной ДНК, или они отражают более общие механизмы защиты растений на внедрение чужеродной ДНК, например, защиты растений на внедрение вирусной инфекции. В любом случае для более глубокого понимания данного явления представляется крайне важным накопление большего числа феноменологических данных, связанных с инактивированием перенесённых генов.

В литературе встречаются научные исследования по изучению особенностей проявления гетерологичных генов у трансгенных растений, в которых отражены результаты исследований по анализу экспрессии гена *nptII* и влияние его на фенотип растения табака. Исследователями было установлено, что из 75 проанализированных растений большая часть (80,0 %) проявляла нестабильный уровень экспрессии гена *nptII*. Нестабильность экспрессии исследуемого гена выражалась в отклонениях от менделевского типа наследования и расщепления, а в некоторых случаях в полной потере Km-устойчивого фенотипа [14, 15].

Однако следует отметить, что данные исследования были проведены на гибридах первого и второго года. Тогда как в нашем случае мы имеем дело с биотехнологическими сортами уже седьмого и восьмого года генерации. Тем не менее полученные результаты интерес с точки зрения исследований биотехнологических генотипов на однородность по присутствию ген-конструкции, дающей эффект РНК-интерференции, в геноме обозначенных нами как «безканамициновые» генотипов. Таким образом, при молекулярно-генетической верификации случайно отобранных генотипов из сорта Порлок-1 праймерами на генетическую векторную вставку, в 52,8 % проанализированного

на второй год материала получен негативный результат амплификации с праймеров kan. Возникает предположение о гетерогенности полученного в прошлом году. И в связи с этим среди популяции «безканамициновые» растения под №21, 23, 35 и 96 следующего года выращивания появляются генотипы, у которых происходит процесс амплификации фрагментов канамицинового гена в ходе ПЦР с парой праймеров KanF / Kan-R.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. NarendraTuteja, Shiv Verma, SebastinRaveendar, RanjanSahoo, BheemaLingeswara Reddy. Recent advances in development of marker-free transgenic plants:Regulation and biosafety concern// Journal of Biosciences. March 2012. P. 167–197. <https://www.researchgate.net/publication/220000891>.
2. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. <http://chem21.info/info/200493/>.
3. Budar F., Thia-Toong, Montagu van M. Agrobacterium-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single Mendelian factor//Genetics. 1986. V. 114. P. 303-313.
4. Deroles S.C., Gardner R.C. Expression and inheritance of kanamycin resistancxe in a large number of transgenic petunias generated by Agrobacterium mediated transformation // Plant.Mol.Biol. 1988. 11: 355-364
5. Дейнеко Е.В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений (на примере *Nicotiana tabacum* L.). / Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.
6. Potrykus Ingo, Jerzy Paszkowski, Michael W. Saul, JirinaPetruska , Raymond D. Shillito . Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer// Molecular and General Genetics MGG. (1985)Vol. 199, P.169–177.
7. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., Abdukarimov A., Pepper A.E. Cotton PHYA1 RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Nature Communications. 2013. 5: 3062. DOI: 10.1038/ncomms4062|[www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications)
8. Рузибоев Х.С., Имамходжаева А.С, Никитина Е.В, Буриев З.Т. РНК интерференция: механизмы и применение // Вестник НУУз, 2018. - №3/1. - С.45-52.
9. Имамходжаева А.С., Курбонов А., Маманазаров Ш., Мухаммадов Й., Кадырова Ш. Выявление свободных от селективного маркерного гена генотипов среди популяций биотехнологического сорта хлопчатника. // Вестник российской сельскохозяйственной науки. Москва. 2020г. №3 (май-июнь) 2020 г., стр. 70-72/
10. Рукавцова Е. Б., Лебедева А. А., Захарченко Н. С., Бурьянов Я. И. Пути создания биобезопасных трансгенных безмаркерных растений.// Физиология растений.Т.60,№ 1,2013. С.17-30
11. Heberle-Bors E., Charvat B., Thompson D., Scherthaner J.P., Barta A., Matzke A.J.M., Matzke A.M. Genetic analysis of T-DNA insertion into tobacco genome // Plant Cell Rep. 1988. V. 7. P. 571-574.
12. Christou P., Swain W.F., Yang N.S., McCabe D.E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 7500-7504.
13. Хадеева Н В., Яковлева Е. Ю. Анализ наследования маркерного и целевого генов в семенном и вегетативном потомстве трансгенных растений табака с геном ингибитора сериновых протеиназ гречи-хи. // Генетика, 2010, том 46, № 1, с. 58-65
14. Маренкова (Новоселя)Т. В., Дейнеко Е. В., Шумный В. К. Мозаичный характер проявления гена *nptII* у трансгенных растений табака NU 21 // Генетика, 2007, том 43, № 7, с. 943-954.
15. Deineko E., Zagorskaya A., Filipenko E. et al. Instability of nptII gene expression in the progeny of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. and *N.plumbaginifolia* L.) // Biotechnology and biotechnological equipment. 1996. N. 4. P. 89-92.

**КАМБУРОВА В.С., УБАЙДУЛЛАЕВА Х.А., АБДУРАХМОНОВ И.Ю.**

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ  
ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА**

e-mail: venera\_k75@mail.ru

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Kamburova V.S., Ubaydullayeva X.A., Abdurakhmonov I.Y.

**GEN-NOKAUT G'O'ZA NAVLARNING BIOKIMYOVIY PARAMETRLARNI TADBIIQ QILISH**

Fitoxrom A1 genning RNK interferentsiya yordamida olingan g'o'za gen-nokaut navlari barglarida prolin, yog kislotalari va uglevodlar miqdori qiyosiy o'rganilgan. Olingan natijalar shuni ko'rsatdiki, gen-nokaut navlari va liniyalarda yog kislotalari va uglevodlar tarkibi, hamda prolin miqdori nazorat navlariga nisbatan sezilarli darajada farq qiladi.

Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Абдурахмонов И.Ю.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ГЕН-НОКАУТНЫХ  
СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА**

Было проведено сравнительное исследование содержания пролина, жирных кислот (ЖК) и углеводов в листьях ген-нокаутных сортов хлопчатника, полученных с помощью РНК-интерференции гена фитохрома А1. Полученные результаты показали, что состав ЖК и углеводов, а также содержание пролина значительно различались у ген-нокаутных сортов и линий по сравнению с исходными сортами.

Kamburova V.S., Ubaydullayeva Kh.A., Abdurakhmonov I.Y.

**COMPARATIVE STUDY OF BIOCHEMICAL PARAMETERS IN GENE-KNOCKOUT COTTON  
VARIETIES**

A comparative study of the content of proline, fatty acids (FA) and carbohydrates in the leaves of gene knockout cotton varieties obtained using RNA interference of the phytochrome A1 gene was carried out. The results showed that the composition of FAs and carbohydrates, as well as the content of proline, were significantly different in gene-knockout varieties and lines compared to the original varieties.

В настоящее время засуха и засоленность почв являются основными факторами, снижающими урожайность [1]. Это явление усиливается как климатическими изменениями, так и интенсификацией агрономических технологий. Однако у растений существуют разные защитные механизмы на различных уровнях: клетка, органы и организм в целом [1 - 4]. Из литературных данных известно, что при абиотических стрессах изменяется ряд биохимических параметров листьев хлопчатника, таких как жирнокислотный (ЖК) состав [5], содержание пролина [6], водорастворимых сахаров и крахмала [7], и данные параметры также могут быть использованы для отбора стрессоустойчивых сортов при селекции хлопчатника.

Принимая во внимание все вышесказанное, а также на основании данных об устойчивости ген-нокаутных сортов хлопка серии Порлок к абиотическим стрессам [8], нами было проведено сравнительное исследование биохимического состава листьев ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника.

Для достижения цели исследований эксперименты проводили на растениях, выращенных в модельных условиях фитотрона. Все растения подвергались генетической верификации.

*Определение содержания углеводов.* Навеску листьев (1,0 г) помещали в центрифужную пробирку на 10 мл и смешивали с 5 мл 80% этанола. Смесь инкубировали на водяной бане со встряхиванием при 80° С в течение 30 минут и центрифугировали при 4000 g в течение 5 минут и собирали супернатант. Гранулы подвергали еще двум экстракциям с использованием 80% этанола. Все супернатанты объединяли и разбавляли до 25 мл 80% этанолом, смешивали и хранили при -20° С для

измерения растворимого сахара и сахарозы.

Нерастворимый в этаноле остаток подвергали экстракции крахмала. После выпаривания этанола крахмал в остатке растворяли в 2 мл дистиллированной воды при кипячении в течение 15 минут и охлаждали до комнатной температуры. Затем листовой крахмал гидролизовали 9,2 М раствором  $\text{HClO}_4$  (2 мл) в течение 15 минут, разбавляли 4 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 4000 г в течение 10 минут. Осадок экстрагировали еще раз, используя 4,6 М раствор  $\text{HClO}_4$  (2 мл). Супернатанты оставляли, объединяли и разбавляли дистиллированной водой до 25 мл.

Содержание растворимых сахаров и крахмала в собранных экстрактах определяли антроновым методом [9]. Содержание сахарозы анализировали в ресуспендированном супернатанте в соответствии с ранее описанными протоколами [10].

*Определение жирных кислот.* Липиды были метил-этерифицированы 0,4 М раствором  $\text{KOH}$ , содержащем метанол и смесь равных объемов бензена и петролейного эфира (1:1, об/об), согласно методу [11]. Метилвые эфиры жирных кислот (ЖК) разделялись методом газовой хроматографии на газовом хроматографе (Shimadzu GC-17A или аналогичный), оснащенном водородным пламенным детектором и капиллярной колонкой SP-2330 (15 м × 0.32 мм). Температура колонки изотермическая 165° С, температура детектора – 250° С. Для измерения степени ненасыщенности ЖК использовали индекс двойных связей (DBI).

*Определение свободного пролина.* Содержание пролина в тканях корня и листьев измеряли по реакции с нингидрином [12]. Для колориметрических определений раствор пролина, нингидриновой кислоты и ледяной уксусной кислоты (1: 1: 1) инкубировали при 90 ° С в течение 1 часа. Затем реакционную смесь охлаждали на бане со льдом. Хромофор экстрагировали, используя 2 мл толуола, и его оптическую плотность определяли на подходящем спектрофотометре при 520 нм.

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием пакета программ OriginPro 7.0. Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка из 3 биологических и 3 технических повторов. Значимость различий между средними значениями определяли с помощью теста Туки. Различия в  $P \leq 0,05$  считались значимыми.

*Содержание липидов и свободного пролина.* На первом этапе нами было исследовано содержание и состав фосфолипидов, с которым тесно связана стабильность мембран как в нормальных условиях, так и при стрессе [13 – 15]. Как видно из табл. 1, ЖК состав разных генотипов хлопчатника различается. Основными ЖК во всех исследованных образцах были пальмитиновая кислота (16: 0), стеариновая (18: 0), олеиновая (18: 1), линолевая (18: 2) и линоленовая (18: 3). На эти пять ЖК приходится более 95% общего содержания ЖК (таблица 1) в функциональных листьях хлопчатника. При этом ЖК состав у ген-нокаутных сортов содержал более высокую долю ненасыщенных ЖК (UFA) и более низкую долю насыщенных ЖК (SFA) по сравнению с таковой у контрольного немодифицированного генотипа Кокер-312.

На ранних стадиях стресса выработка АФК в качестве сигнальных молекул инициирует защитные реакции растений [16]. АФК вырабатываются при нарушении переноса электронов в фотосистемах I и II [16, 17]. Эти оксирадикалы инициируют перекисное окисление липидов, при котором образуются ЖК радикалы ( $L\cdot$ ,  $LO\cdot$  и  $LOO\cdot$ ). ЖК радикалы не являются стабильными, поэтому они легко реагируют с молекулярным кислородом, превращаясь, таким образом, в различные пероксиды липидов и, в конечном итоге, превращаются в МДА и другие альдегиды и короткоцепочечные кетоны, карбоксильные кислоты и углеводороды [17]. Эти серии реакций вызывают снижение содержания ЖК и увеличение содержания МДА.

Многие растения накапливают пролин как нетоксичный и защитный осмолит как в физиологических условиях, так и в условиях осмотического стресса при недостатке влаги и/или засолении [18]. В связи с этим, было изучено влияние инсерции векторной конструкции на содержание свободного пролина в листьях различных сортов хлопчатника. Как видно из рис. 1, содержание пролина в разных сортах хлопчатника достоверно различалось и коррелировало с их устойчивостью к водному дефициту и засолению. При этом наименьшее количество пролина наблюдалось у немодифицированного исходного сорта Кокер-312, а наибольшее у RNAi сорта Порлок-2.

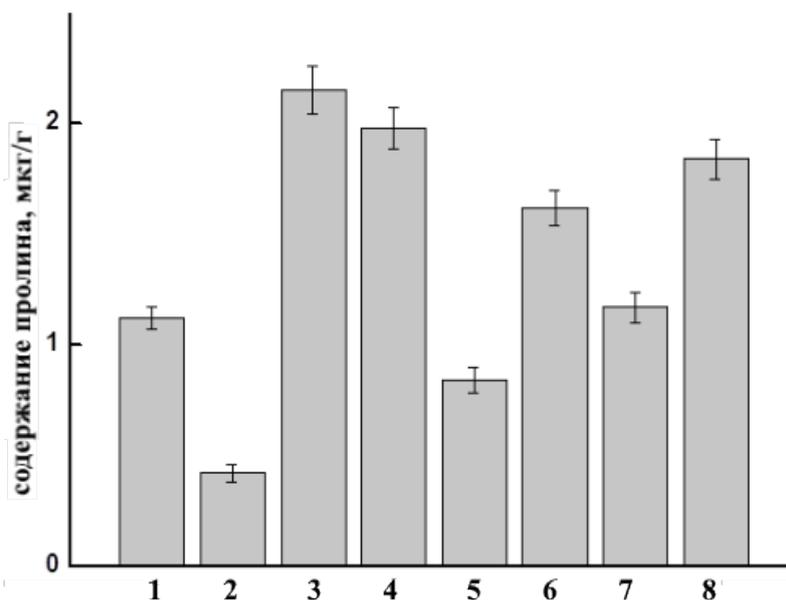
Такое накопление осмолитов, особенно пролина, является обычным явлением у растений. Помимо своей роли в качестве осмолита, пролин способствует удалению АФК, стабилизации субклеточных структур, модуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток, снабжению

**Жирнокислотный состав мембран у различных генотипов хлорчатника**

Генотипы	ЖК состав (%)						SFA	UFA	UFA/SFA
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:3			
Ноль сегрегант	21.94±0,8	2.80±0,2	6.08±0,15	8.27±0,37	60.91±0,9	60.91±0,9	23.86±0,64	76.14±1,34	3.19±0,13
Кокер-312	25.52±1,2	6.05±0,18	6.78±0,25	7.43±0,42	54.22±1,9	54.22±1,9	31.57±0,95	68.43±0,82	2.16±0,11
T <sub>1-7</sub>	20.47±0,9	2.39±0,1	4.88±0,2	11.24±0,5	61.02±1,2	61.02±1,2	22.86±0,8	77.14±1,6	3.37±0,2
T <sub>31-10</sub>	20.67±0,84	1.52±0,07	4.26±0,12	9.70±0,45	63.49±1,3	63.49±1,3	22.19±0,81	77.81±1,7	3.51±0,9
АН-Баявут-2	22.90±1,12	3.59±0,21	7.01±0,37	8.41±0,35	58.09±1,18	58.09±1,18	26.49±0,86	73.51±1,32	2.78±0,15
Порлок-1	21.55±1,0	3.11±0,15	3.36±0,23	8.99±0,41	62.99±1,24	62.99±1,24	24.66±0,83	75.34±1,56	3.05±0,14
С-6524	22.77±0,82	2.36±0,09	5.02±0,23	9.58±0,44	60.27±0,84	60.27±0,84	25.13±0,93	74.87±1,58	2.97±0,18
Порлок-2	21.93±1,04	1.22±0,21	4.41±0,15	9.33±0,51	63.11±1,23	63.11±1,23	23.15±0,84	76.85±1,64	3.30±0,21

SFA – насыщенные ЖК (C16:0 + C18:0), UFA – ненасыщенные ЖК (C18:1 + C18:2 + C18:3), отношение UFA/SFA = (C18:1 + C18:2 + C18:3)/(C16:0 + C18:0)  
P < 0.05

энергией и функционированию в качестве сигнала [19]. Хотя накопление пролина является обычной реакцией на солевой стресс у растений, степень его накопления варьирует между толерантными и чувствительными генотипами. Действительно, наши результаты показали, что накопление пролина достоверно повышено в листьях устойчивых генотипов по сравнению с чувствительными генотипами.



**Рис. 1.** Содержание свободного пролина в листьях различных генотипов хлопчатника.

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

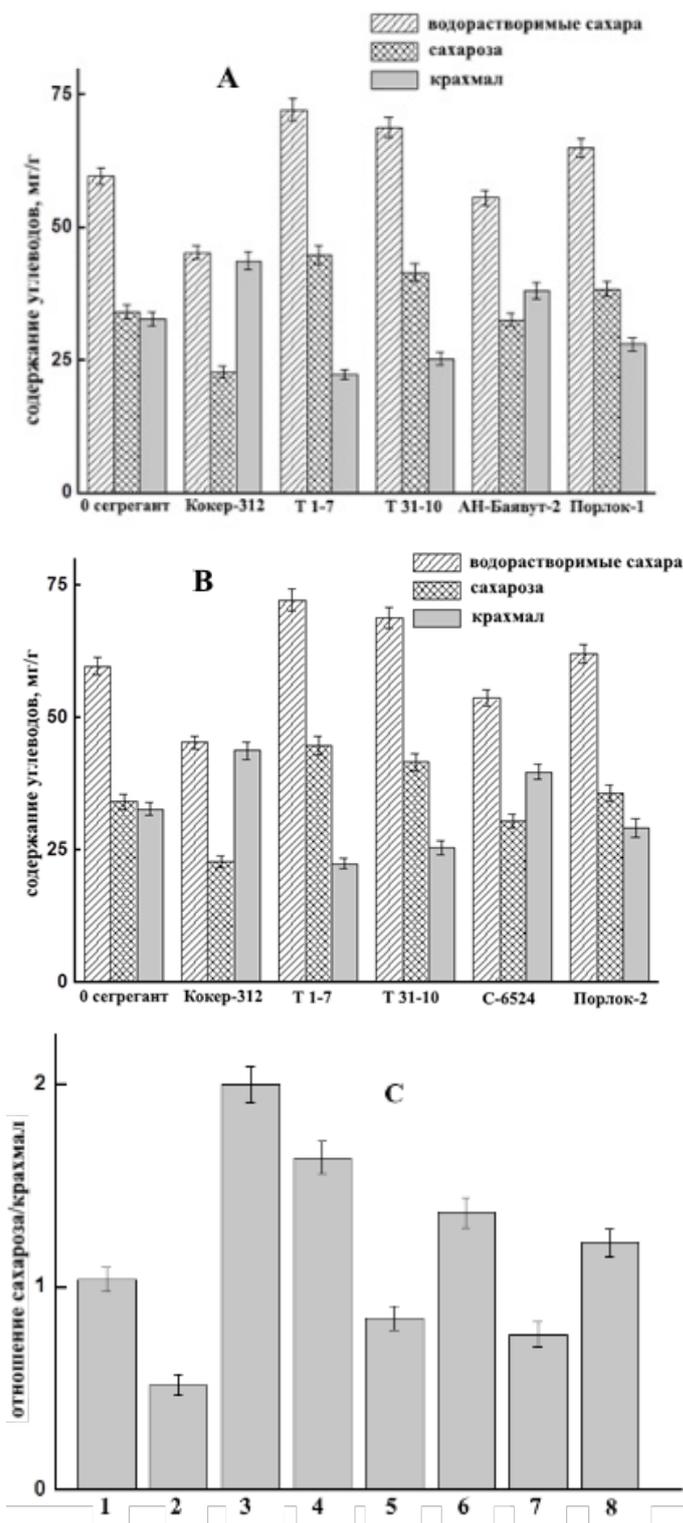
*Содержание углеводов.* Известно, что солевой стресс тормозит рост растений, в основном за счет подавления роста листьев и снижения скорости фотосинтеза ( $Pn$ ) [7]. Снижение  $Pn$  в основном связано с работой устьичного аппарата или повышенным содержанием сахарозы в листьях [7]. Так, например, показано, что различия между чувствительными и устойчивыми к засолению сортами нута снижение общего фотосинтеза через нестоматальные ограничения и повреждение фотосистемы II [20]. При этом у устойчивых растений содержание первичных метаболитов метаболизма аминокислот и углеводов увеличивается, и эти растворенные вещества играют роль в осмотической регуляции, защите мембран и белков или в поглощении АФК [7].

Сахароза и крахмал являются основными конечными продуктами фотосинтеза у большинства растений, включая хлопчатник. Более того, известно, что содержание сахарозы чувствительно к абиотическим стрессам [7]. Сахарозофосфатсинтаза (SPS), которая катализирует последнюю стадию синтеза цитоплазматической сахарозы, является ключевым регуляторным ферментом в распределении углерода между сахарозой и крахмалом в листьях и часто тесно связана со скоростью экспорта сахарозы в исходных тканях [7]. Сахарозосинтаза (SuSy) играет решающую роль в расщеплении сахарозы и обеспечении клетки энергией [7]. Активность обоих ферментов зависит от степени засоления почвы, но их реакции на засоление почвы у разных растений и органов различны. При стрессе засоления почвы активность SPS может увеличиваться или уменьшаться, а у некоторых видов активность SuSy увеличивается [7].

Учитывая вышеизложенное, а также факт, что сорта серии Порлок являются более устойчивыми к абиотическим стрессам [8], нами было исследовано содержание углеводов у различных генотипов хлопчатника. Как видно из рис. 2, содержание растворимых сахаров, сахарозы, крахмала и отношение сахара/крахмал в стеблевых листьях различается в зависимости от исследуемого генотипа и зависит от наличия векторной конструкции.

При этом у ген-нокаутных сортов Порлок-1 и Порлок-2 отмечается более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахара/крахмал по сравнению с немодифицированным контрольным сортом Кокер-312 (рис. 2). Эти резуль-

таты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными о содержании сахаров у различных генотипов хлопчатника в условиях солевого стресса [7].



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

Сахара (а именно, крахмал и сахароза) являются основными продуктами фотосинтеза у высших растений [21]. При этом растворимые сахара очень чувствительны к абиотическим стрессам. Вместе с тем, необходимо отметить, что сахара не только обеспечивают энергией и растворимыми

веществами для осмотической адаптации, но также модулирует экспрессию множества генов в качестве регуляторных мессенджеров [7].

В связи с этим, полученные результаты позволяют предположить, что у ген-нокаутных сортов распределение фотосинтетических продуктов благоприятствовало синтезу сахарозы в стеблевых листьях, что может быть обусловлено изменением активности ферментов, обеспечивающих метаболизм сахарозы.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar S., et al. 2018. Plant Responses to Drought Stress: Physiological, Biochemical and Molecular Basis. In Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 1–26
2. Hamed K.B., et al. 2018. Salinity Responses and Adaptive Mechanisms in Halophytes and Their Exploitation for Producing Salinity Tolerant Crops. In Salinity Responses and Tolerance in Plants: Exploring RNAi, Genome Editing and Systems Biology, eds. Kumar V. et al.: Springer Nature (Switzerland). 1–20
3. Nouman W., et al. 2018. Variation in Plant Bioactive Compounds and Antioxidant Activities Under Salt Stress. In Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 77–102
4. Saini P., et al. 2018. Reactive Oxygen Species (ROS): A Way to Stress Survival in Plants. In Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective, eds. Zargar S.M., Zargar M.Y.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 127–154
5. Zhang L., et al. 2013. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. J Plant Res. 126: 293–304
6. Zhang L., et al. 2014. Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity. PLoS ONE 9(11): e112807
7. Peng J., et al. 2016. Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Leaves. PLoS ONE 11(5): e0156241
8. Abdurakhmonov I.Y., et al. 2014. Phytochrome RNAi Enhances Major Fibre Quality and Agronomic Traits of the Cotton *Gossypium hirsutum* L. Nature Communications. 5: 3062
9. Seifter S., et al. 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. Arch. Biochem 25(1): 191–200
10. Hendrix D.L. 1993. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. Crop Sci 33(6): 1306–1311
11. Yu H.G., Su W.A. 1996. Studies on relationship between fatty acids desaturation of PSII membrane and low temperature photoinhibition of cucumber. Acta Biochimica Biophysica Sinica 12: 227–233
12. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205–207.
13. Hou Q., et al. 2016. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. Plant, Cell and Environment. 39: 1029–1048
14. Niu Y., Xiang Y. 2018. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. Front. Plant Sci. 9: 915.
15. Sui N., et al. 2018. Transcriptomic and Physiological Evidence for the Relationship between Unsaturated Fatty Acid and Salt Stress in Peanut. Front. Plant Sci. 9: 7
16. Noctor G., et al. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. Plant Physiol. 164: 1636–1648
17. Caverzan A., et al. 2016. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives, eds.

- Shanker A., Shanker C.: InTechOpen (Croatia). 463–480
18. Hayat Sh., et al. 2012. Role of proline under changing environment: A review. *Plant Signaling & Behavior* 7 (11): 1–11
  19. Gharsallah C., et al. 2016. Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. *AoB Plants*. 8: 1-21
  20. Khan H.A., et al. 2015. Salt sensitivity in chickpea: Growth, photosynthesis, seed yield components and tissue ion regulation in contrasting genotypes. *J Plant Physiol* 182: 1–12
  21. Huber S.C., Huber J.L. 1996. Role and regulation sucrose phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 47 (1): 431–444.

**ТУРАЕВ О.С., ХУСЕНОВ Н.Н., ДАРМАНОВ М.М., МАКАМОВ А.Х., КУШАНОВ Ф.Н.,  
БУРИЕВ З.Т., АБДУКАРИМОВ А.**

**АНАЛИЗ АГРОНОМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И КАЧЕСТВА ВОЛОКНА  
СОРТА ХЛОПЧАТНИКА «САХОВАТ» СОЗДАНЫХ  
НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ДНК-МАРКЕРОВ**

ozodturaev@gmail.com

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Turayev O.S., Xusenov N.N., Darmanov M.M., Makamov A.X., Kushanov F.N., Buriyev Z.T., Abdugarimov A.  
DNK-MARKERLAR TEXNOLOGIYASI ASOSIDA YARATILGAN SAXOVAT G'O'ZA NAVI TOLA  
SIFATI VA AGRONOMIK KO'RSATKICHLARINING TAHLILI

Maqolada DNK-markerlar texnologiyasi asosida yaratilgan Saxovat g'o'za navi tola sifati va turli agronomik belgilarining tahlili natijalari yoritilgan. Yaratilgan yangi nav, tola sifati va boshqa bir necha xususiyatlariga ko'ra ota-ona namunalari va nazorat naviga nisbatan ustunlikni namoyon etdi. Tadqiqotimiz, molekulyar seleksiya usullari va texnologiyalarining samaradorligini yana bir bor tasdiqladi.

Тураев О.С., Хусенов Н.Н., Дарманов М.М., Макамов А.Х., Кушанов Ф.Н., Буриев З.Т., Абдукаримов А.  
АНАЛИЗ КАЧЕСТВА ВОЛОКНА И АГРОНОМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ СОРТА ХЛОПЧАТНИКА  
САХОВАТ, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИЙ ДНК-МАРКЕРОВ

В данной статье изложены результаты анализа качества волокна и различных агрономических признаков сорта хлопчатника Саховат, разработанного на основе технологии ДНК-маркеров. Новый сорт показал относительно высокое качество волокна, а также превзошёл по некоторым критериям контрольные растения и родительские генотипы. Это еще раз доказывает эффективность методов и технологий молекулярной селекции.

Turaev O.S., Xusenov N.N., Darmanov M.M., Makamov A.Kh., Kushanov F.N., Buriyev Z.T., Abdugarimov A.  
ANALYSIS OF FIBER QUALITY AND AGRONOMIC TRAITS OF SAKHOVAT COTTON CULTIVAR  
DERIVED THROUGH DNA-MARKERS TECHNOLOGIES

This paper highlights the results of the analysis of fiber quality and various agronomic traits of Sakhovat cotton cultivar derived through DNA markers technology. New cotton variety has demonstrated advantages with its fiber quality and several other characteristics compared with control and parental genotypes. Our study once again confirmed the efficiency of molecular breeding methods and technologies.

Существенные изменения происходят в развитии аграрного сектора в рамках «Стратегии действий» по пяти приоритетным направлениям развития Республики Узбекистан на 2017-2021 годы. Одним из доказательств этих изменений является создание крупных хлопково-зерновых агрокластеров и отмена государственных планов по этим культурам с 2020 года. Одной из важных задач уче-

ных республики является проведение научного анализа селекции хлопководства и создание новых, с высокими показателями качества волокна и урожайности, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам, вредителям и различным фитопатогенам, сортов хлопчатника для существующих и организуемых агрокластеров.

Одним из недостатков современной селекции хлопчатника является то, что он недостаточно использует секулярное разнообразие генофонда хлопчатника [1]. Использование новых молекулярно-генетических технологий (CRISPR, РНК-интерференция, маркер ассоциированная селекция) при оценке образцов генофонда хлопчатника и их применение в селекционной работе значительно сокращает время создания генотипов с желаемыми признаками. Для этого сначала необходимо идентифицировать гены или локусы QTL (локусы количественных признаков), которые контролируют ценные признаки, и идентифицировать прикрепленные к ним ДНК-маркеры [2, 3].

В последние годы ученые Центра геномики и биоинформатики АН РУз при помощи современных технологий молекулярной генетики определили ряд генов и QTL локусов, контролирующих качество волокна, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам, вредителям и фитопатогенам, вызывающим увядание растений [4].

Нужно отметить, что ученые данного центра первыми в мире выявили локус на 16-й хромосоме хлопчатника, генетически связанный с длиной и прочностью волокна, и применили его для отбора хлопчатника [5, 6]. Используя коллекцию гермоплазмы хлопчатника, ученые центра определили аллели QTL, отвечающие за такие показатели качества волокна, как удельная разрывная нагрузка (или прочность волокна - Str) и верхняя средняя длина волокна (UHML) в донорских линиях L-141 и L-N1. Используя метод маркер-ассоциированной беккроссной селекции (МАБС), их перенесли в геном более 10 местных сортов, выращиваемых на хлопковых полях республики [7]. Качество волокна, урожайность и другие хозяйственно - ценные показатели новых сортов, созданных на основе технологии маркер ассоциированной селекции, были значительно выше, чем у исходных генотипов, использованных в качестве реципиентов.

Объектом наших исследований служили средневолокнистые сорта хлопчатника - сорт Саховат, созданный на основе технологии МАС, а также местные сорта Мехнат и С-417, использованные в качестве родительских генотипов и стандартный сорт - Наманган-77.

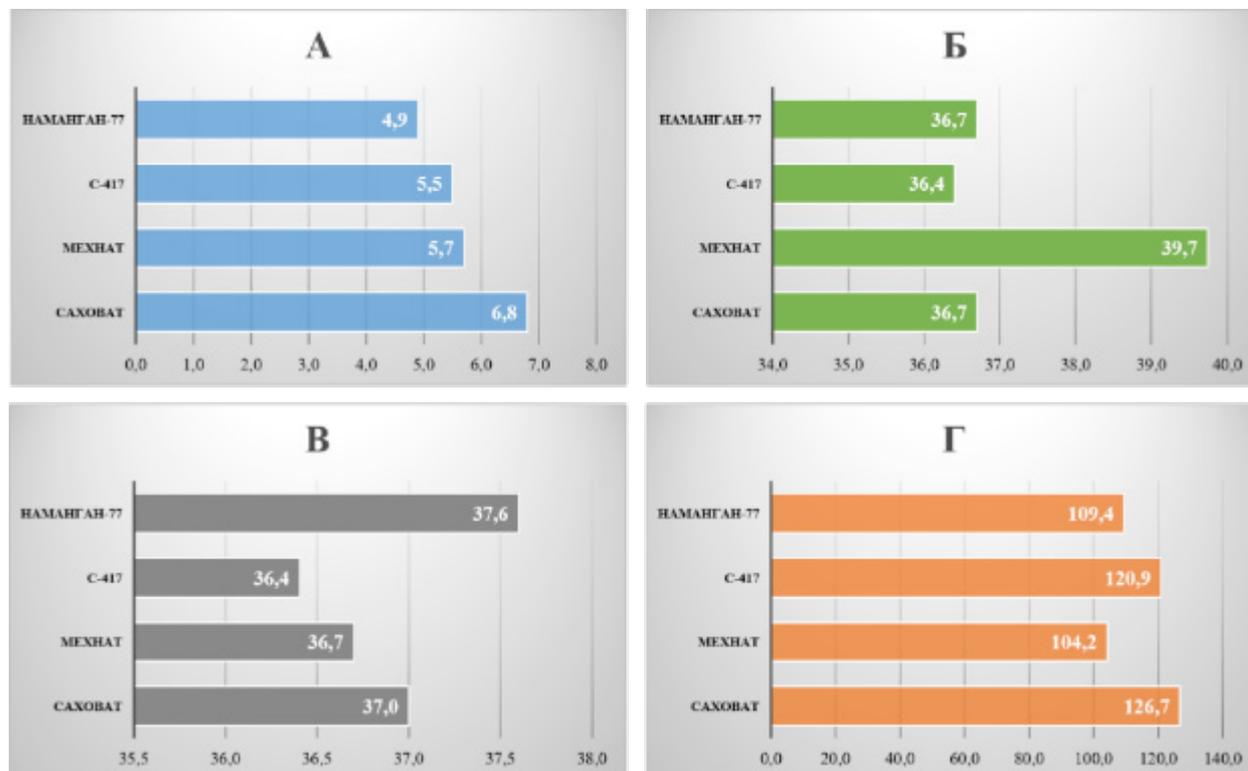
В лабораторных условиях из пробных коробочек, собранных с учетных растений каждого сорта были определены такие хозяйственно – ценные показатели, как масса хлопка-сырца одной коробочки, штапельная длина волокна, урожай волокна и масса 1000 семян. Оценка показателей качества волокна исследуемых сортов проводилась с использованием оборудования USTER HVI 1000 (High Volume Instrument) «Сервисного центра в агропромышленном комплексе» при Министерстве промышленности и новых технологий Республики Узбекистан. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием метода ANOVA (дисперсионного анализа) и тестов множественного сравнения Z-тест Крускала-Уоллиса статистического пакета NCSS 2003.

Полевые исследования проводились на опытном участке Специального семеноводческого хозяйства Центра геномики и биоинформатики АН РУз. В гибридных комбинациях обратного скрещивания  $BC_3F_6$ , созданных с использованием метода МАБС, был проведен ПЦР-скрининг с использованием ДНК-маркеров, генетически связанных с прочностью и длиной волокна хлопчатника. Гомозиготные генотипы, имеющие высокое качество волокна, были выбраны в качестве популяции нового сорта Саховат. Семена сорта хлопчатника Саховат, родительских генотипов, а также стандартного сорта Наманган-77 были посеяны по схеме 90x15x1 с рендомизированным (случайным) расположением вариантов в трех повторностях. Длина делянок составила по 10 метров. В конце вегетации с каждого сорта были собраны по 50 пробных коробочек, 30 индивидуальных отборов и в лабораторных условиях были определены продуктивность растений, масса хлопка-сырца одной коробочки, штапельная длина волокна, выход волокна и масса 1000 семян.

В соответствии с изученными агрономическими характеристиками различия между сортом Саховат, его родительскими генотипами и стандартным сортом Наманган-77 были показаны в виде диаграммы. Результаты анализа показали, что масса хлопка-сырца одной коробочки у сорта Саховат, созданного по технологии МАС, составил 6,8 г, штапельная длина волокна - 36,7 мм, а масса 1000 семян - 126,7 г (рис. 1). Таким образом, у данного сорта показатели многих хозяйственно-ценных признаков были сравнительно высокими, чем у остальных изученных генотипов (рис.1). Выход во-

локна у сорта Саховат составил 37%, что указывает на уменьшение выхода волокна по сравнению с реципиентным сортом Мехнат на 3%, увеличение на 0,5% по сравнению с С-417 и на одинаковые значения признака со стандартным сортом Наманган-77.

Кроме того, после анализа всех агрономических показателей образцов были измерены параметры качества волокна всех образцов индивидуальных отборов с использованием оборудования USTER HVI 1000.

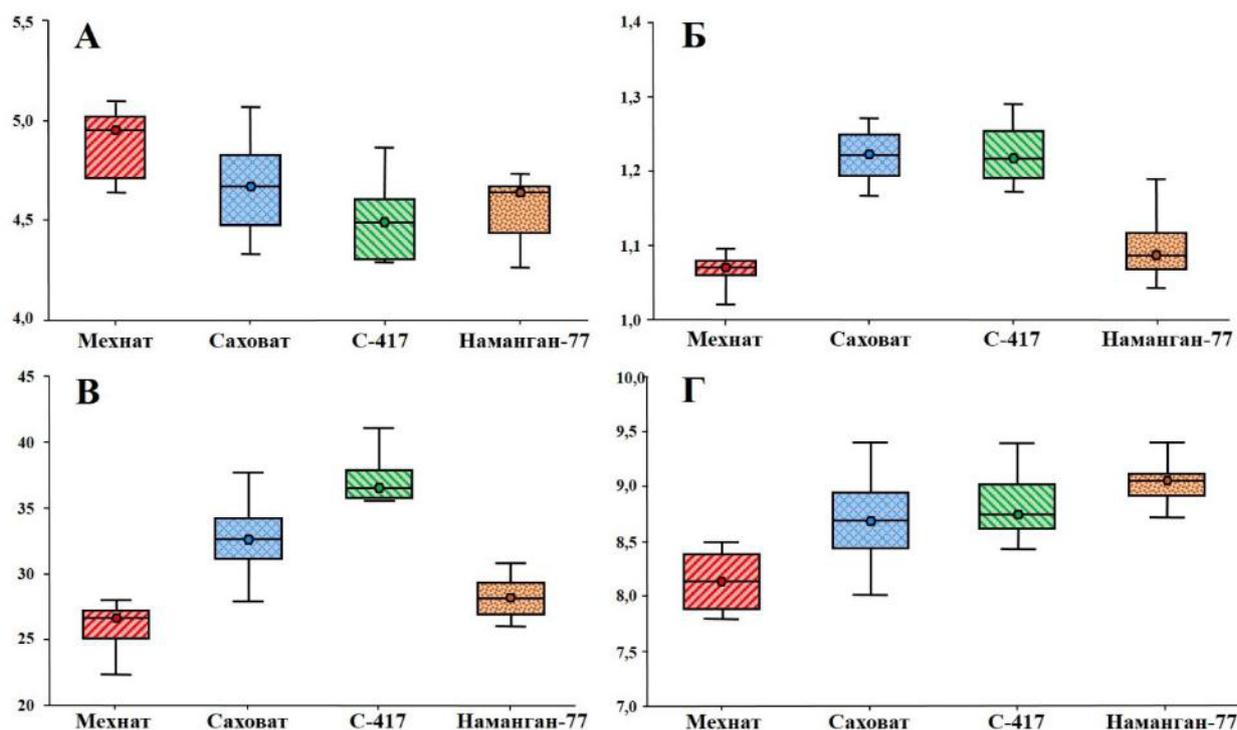


**Рис. 1.** Сравнительный анализ агрономических показателей исследуемых образцов.

А – масса хлопка-сырца одной коробочки, Б - выход волокна, В – штапельная длина волокна, Г - масса 1000 семян.

Прежде всего, все образцы сравнивали друг с другом с помощью дисперсионного анализа по ANOVA (Analysis of variance) в соответствии с изученными признаками. Однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA) был выполнен после того, как было обнаружено, что образцы отличаются друг от друга. Согласно результатам анализа, среднее значение микропейра волокна у сорта Саховат составляло 4,7, прочности волокна составляло 32,7 гс/текс, длины волокна составляло 1,23 дюйма, а элонгации составляло 8,7%. У сорта реципиента Мехнат среднее значение микропейра волокна составляет - 4,9, прочности волокна - 25,8 гс/текс, длины волокна - 1,07 дюйма и элонгации - 8,2%. У используемой в качестве донорной линии С-417 среднее значение микропейра волокна составляло - 4,5, прочности волокна - 36,2 гс/текс, длины волокна - 1,24 дюйма и элонгации - 8,8%. У стандартного сорта Наманган-77 среднее значение микропейра волокна составляет 4,6, прочности волокна - 28,2 гс/текс, длины волокна - 1,10 дюйма и элонгации - 9,0% (рис. 2).

Проведённый анализ показал, что у сорта хлопчатника Саховат, содержащего генетически ассоциированного с признаками длины, элонгации и микропейра волокна ДНК-маркер NAU2277, не изменился микропейр волокна, однако длина волокна увеличилась на 0,16 дюйма (16%). Кроме того, хотя элонгация волокна у сорта Саховат существенно не изменилась по сравнению с реципиентным сортом, но прочность волокна увеличилась на 7 гс/текс (27%). Положительные изменения в таких показателях технологических качеств волокна имеют большое значение в текстильной промышленности и при экспорте хлопкового волокна.



**Рис. 2.** Результаты дисперсионного анализа технологических качеств волокна сортов хлопчатника сорта (F-Test, альфа = 0,05). А - микронейр волокна, Б - длина волокна (в дюймах), В - прочность волокна (гс/текс), Г - элонгация волокна (%).

Для сравнения эффективности аллелей QTL, у сорта Саховат был проведен анализ критерий множественных сравнений Z-значений Краскла-Уоллиса с использованием маркера ДНК NAU2277 (табл.)

**Многомерный сравнительный тест Крускала-Уоллиса  
по качеству волокна у сортов хлопчатника**

<b>Прочность волокна</b>	Мехнат	Наманган-77	Саховат	С-417
Мехнат	0	0,997	4,68172*	5,66062*
Наманган-77	0,997	0	3,30867*	4,5272*
Саховат	4,68172*	3,30867*	0	2,25109*
С-417	5,66062*	4,5272*	2,25109*	0

<b>Длина волокна</b>	Мехнат	Наманган-77	Саховат	С-417
Мехнат	0	0,77263	5,27637*	4,08258
Наманган-77	0,77263	0	4,15379*	3,21157*
Саховат	5,27637*	4,15379*	0	0,27625
С-417	4,08258	3,21157*	0,27625	0

\***Типичный тест:** Если значение  $Z > 1,9600$ , медианы будут значительно отличаться.

\* **Тест Бонферона:** Если значение  $Z > 2,6383$ , медианы значительно отличаются.

Результаты этого анализа также показали, что волокно сорта хлопчатника Саховат имеет стабильное улучшение по сравнению с параметрами качества волокна стандартного сорта Наманган-77 и реципиентного сорта Мехнат.

Следует отметить, что с точки зрения агрономических показателей и технологических качеств волокна сорт хлопчатника Саховат показал более высокие показатели, чем исходные генотипы и стандартный сорт Наманган-77. Полученные данные свидетельствуют о том, что используемый, для технологии маркер ассоциированной селекции, ДНК маркер NAU2277 сыграл важную роль в улучшении длины волокна, элонгации и микронейра волокна сорта Саховат, а также положительно влиял на прочность волокна. В настоящее время этот новый сорт проходит испытания во всех сортоучастках Центра по испытанию сортов сельскохозяйственных культур МСХ Республики Узбекистан, расположенных во всех регионах страны. В ближайшее время ожидается, что сорт Саховат будет рекомендован для хлопковых «Агрокластеров» как высокоурожайный, скороспелый сорт с III промышленным типом волокна.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abdurakhmonov IY, Kohel RJ, Yu JZ, Pepper AE, Abdullaev AA, Kushanov FN, Salakhutdinov IB, Buriev ZT, Saha S, Scheffler BE, Jenkins JN, Abdukarimov A (2008) Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm// *Genomics* 92:478–487.
2. Abdurakhmonov I.Y., Z.T. Buriev, S.E.Shermatov, A. Abdukarimov, S. Saha, J.N. Jenkins, R.J. Kohel, J.Z. Yu, A.E. Pepper (2010) Molecular diversity and population structure analysis in a global set of *G. hirsutum* exotic and variety germplasm resources and association mapping of the main fiber quality traits // S10. Proceedings of International Cotton Genome Initiative conference, Canberra, Australia, 2010. –P. 22.
3. Darmonov M.M., Makamov A.Kh., Kushanov F.N., Ph.D., Buriev Z.T., Ph.D., Abdurakhmonov I.Y. (2015) Marker-assisted selection for cotton// The proceeding of Tashkent International Innovation Forum. Tashkent. 19-21 May. –P. 260-267
4. Н.Н. Хусенов, М.У. Маткаримов, Ж.К. Норбеков, Э.Э. Хуршут, М.С. Аюбов, Ф.Н. Кушанов (2018) Подбор родительских генотипов хлопчатника *G. hirsutum* для идентификации и QTL-картирования локусов устойчивости к вилту// *Узбекский биологический журнал*, № 6, 2018.-С. 51-55.
5. Abdurakhmonov IY, Saha S, Jenkins JN, Buriev ZT, Shermatov SE, Scheffler BE, Pepper AE, Yu JZ, Kohel RJ, Abdukarimov A (2009) Linkage disequilibrium based association mapping of fiber quality traits in *G. hirsutum* L. variety germplasm// *Genetica* 136:401–417.
6. Kushanov F.N., Makamov A.Kh., Darmanov M.M., Turaev O.S., Tulanov A.A., Shermatov Sh. E., Buriev Z.T., Abdukarimov A., Abdurakhmonov I.Y. (2014) New cotton varieties obtained through MAS technology// ICGI cotton conference, Wuhan Hubai, China.
7. Дарманов М.М., Макамов А.Х., Тураев О.С., Туланов А.А., Камбурова В.С., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. // Улучшение признаков качества волокна средневолокнистого хлопчатника (*G. hirsutum*) с использованием MAS технологии// *Международный рецензируемый журнал "Eurasian science journal" ISSN (print) - 2411-6467, ISSN (online) -2413-9335 Global Impact Factor (GIF) - 0.5. Россия, 2019. С. 7-11.*

КАМБУРОВА В.С., УБАЙДУЛЛАЕВА Х.А., ДАРМАНОВ М.М., УСМАНОВ Д.Э.,  
ШЕРМАТОВ Ш.Э., АБДУРАХМОНОВ И.Ю.

## АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ У ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА

e-mail: venera\_k75@mail.ru

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Kamburova V.S., Ubaydullaeva X.A., Darmanov M.M., Usmanov D.E., Shermatov Sh.E., Abdurakhmonov I.Y.  
GEN-NOKAUT G'O'ZA NAVLARNING DIFFERENTIAL EKSPRESSIYALANUVCHI GENLARINI  
TADBIQ QILISH

Fitoxrom A1 genning RNK interferentsiya yordamida olingan g'o'za gen-nokaut navlarida differentsial ekspressiyalanuvchi genlarining ekspressiyasi qiyosiy o'rganilgan. Olingan natijalar shuni ko'rsatdiki, modifikatsiyalangan navlarida gen ekspressiya darajasi boshlang'ich va onalik navlariga nisbatan sezilarli farq qiladi.

Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Дарманов М.М., Усманов Д.Э., Шерматов Ш.Э., Абдурахмонов И.Ю.  
АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ У ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ  
ХЛОПЧАТНИКА

Был изучен сравнительный уровень экспрессии различных генов у ген-нокаутных сортов хлопчатника, полученных с помощью РНК-интерференции гена фитохрома А1. Полученные результаты показали, что уровень экспрессии генов у модифицированных сортов значительно отличался от исходных и родительских сортов.

Kamburova V.S., Ubaydullaeva Kh.A., Darmanov M.M., Usmanov D.E., Shermatov S.E., Abdurakhmonov I.Y.  
ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN GENE KNOCK-OUT COTTON VARIETIES

The comparative expression level of various genes in gene-knockout cotton varieties obtained using RNA interference of the phytochrome A1 gene was studied. The results showed that the level of gene expression in the modified varieties was significantly different from the original and parent varieties. Из литературы известно, что сайленсинг гена *PHYA1* с помощью RNAi позволило создать RNAi линии хлопчатника с улучшенным качеством волокна (более длинное, более прочное и более тонкое волокно) и некоторым другим фенотипическими изменениями, включая раннее цветение, энергичный рост корней и вегетативный рост, без побочных эффектов на урожайность и развитие волокон, а также более высокую устойчивость к абиотическим стрессам по сравнению с нетрансформированным Кокер 312 [1].

Кроме того, известно, что фитохромы опосредуют передачу сигналов растительных гормонов через прямое взаимодействие между их негативными регуляторами, взаимодействующими с фитохромами (PIF), и некоторыми компонентами передачи сигналов фитогормонов, такими как белки DELLA [2]. Фитогормоны играют важную роль в развитии хлопкового волокна. AUX и GA3 на ранних стадиях способствуют инициации волокна и оказывают положительное влияние на удлинение волокна [3] Абсцизовая кислота (АВА) ингибирует инициацию волокна, противодействуя продвижению ауксинов и гиббереллинов [4, 5]. Этилен (ЕТ) играет важную роль в стимулировании удлинения клеточных волокон. Кроме того, гены, связанные с ЕТ и брассиностероидами (BR), активируются при удлинении волокна [4, 5].

Вместе с тем, за последние десятилетия было установлено, что помимо генов фитогормонов многие гены вовлечены в развитие хлопкового волокна. Гены, кодирующие транскрипционные факторы MYB, играют роль в инициации и развитии волокон хлопчатника [6]. Волокна на стадии удлинения динамически изменяются как по компонентам, так и по структуре. Многие гены, участвующие в метаболизме и транспорте углеводов, активируются во время развития клетчатки [7].

Развитие клеточных волокон также зависит от более высокого тургорного давления, а ферменты и белки для поддержания высокого тургорного давления обогащаются растущими клеточными волокнами [7, 8]. Кроме того, разрыхляющие стенку белки также играют роль в удлинении волокна [7]. Недавно в рамках геномного анализа экспрессии генов с помощью сравнительного профилирования транскриптома было выявлено много генов, которые дифференциально экспрессируются в клетках волокна на четырех стадиях развития [9].

В связи с вышеизложенным, основной целью исследования было исследование сравнительной экспрессии генов фитохромов А1 (*PHYA1*) и В (*PHYB*), а также дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) у ген-нокаутных и немодифицированных сортов хлопчатника.

Для достижения цели исследований эксперименты проводили на растениях, выращенных в модельных условиях фитотрона. Все растения подвергались генетической верификации.

Тотальная РНК выделена с помощью метода Wu et al. (2002) [10]. Чистота РНК была проверена присутствием и интенсивностью рибосомальной РНК в 1% агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегида в присутствии бромистого этидия. Образцы РНК были обработаны ферментом ДНКазы I (Ambion, USA), не содержащим РНКазы согласно инструкции производителя и были очищены дополнительным этапом очистки с помощью фенол-хлороформа (5:1; Ambion) и преципитации этанолом. Концентрация общей РНК была измерена на спектрофотометре (GENESYS 10UV, Thermo Scientific, USA).

Для определения экспрессии гена использован метод количественной ПЦР с обратной транскрипцией с использованием определения ампликонов на основе SYBR Green и набора LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) со следующим циклическим профилем: 95° С в течение 5 мин, затем 45 циклов: 10 с при 95° С, 15 с при 60° С и 15 с при 72° С. Каждая реакционная смесь qRT-PCR содержала 10 мкл SYBR Green I Master (Roche, Базель, Швейцария), 1 мкл прямого праймера (10 мкМ), 1 мкл обратного праймера (10 мкМ), 2 мкл кДНК (4-кратное разбавление) и 6 мкл ddH<sub>2</sub>O. Транскрипт гена убиквитина 7 хлопчатника (*GhUBQ7*) использовали для нормализации уровней экспрессии продуктов ОТ-ПЦР [11]. Все реакции были выполнены с тремя повторностями. Метод 2-ΔΔC<sub>t</sub> был использован для расчета относительной экспрессии дифференциально экспрессированных генов [12]. Все праймеры были разработаны с использованием онлайн-инструмента IDT.

В работе были использованы праймеры для RT-PCR, представленные в табл.

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием пакета программ OriginPro 7.0. Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка из 3 биологических и 3 технических повторов. Значимость различий между средними значениями определяли с помощью теста Туки. Различия в  $P \leq 0,05$  считались значимыми.

Как видно из рис. 1, уровень экспрессии гена *PHYA1* у родительских сортов АН-Баявут-2 (для сорта Порлок-1) и С-6524 (для сорта Порлок-2) в сравнении с референс-сортом Кокер-312 был увеличен. В то время как уровень экспрессии гена *PHYB* у сорта С-6524 был снижен по сравнению с Кокер-312. При этом анализ уровня экспрессии гена *PHYA1* у ген-нокаутных сортов серии Порлок показал, что у данных сортов транскрипты *PHYA1* были подавлены по сравнению как с исходным сортом Кокер-312, так и с родительскими сортами.

Вместе с тем, учитывая факт, что ранее было показано увеличение экспрессии гена *PHYB* в RNAi-линиях хлопчатника с нокаутом гена *PHYA1* [1], а также что эффекты данных фитохромов в клетке являются антагонистическими [13], была изучена сравнительная экспрессия гена *PHYB* в немодифицированных и ген-нокаутных сортах хлопчатника. При этом результаты показали, что у ген-нокаутных сортов хлопчатника серии Порлок наблюдалось увеличение экспрессии гена *PHYB* по сравнению с исходным сортом Кокер-312 и родительскими сортами (рис. 1).

Интересно отметить, что в норме *phys* регулируют элонгацию гипокотилия у *Arabidopsis thaliana* за счет регуляции экспрессии генов фитогормонов, включая брассиностероиды (БР), ауксин (ИУК), гиббереллины (ГК), цитокинины (ЦК), этилен и абсцизовую кислоту (АБК) [14 – 16]. При этом на молекулярном уровне *phyA* регулирует транскрипцию, формируя комплекс с семейством фитохром-взаимодействующих факторов [16, 17]. Фитохром А взаимодействует с PIF, вызывая их деградацию, что приводит к ингибированию удлинения гипокотилия. В то же время, в ответ на сигнал фитогормонов белки DELLA убиквитинируются и разлагаются, высвобождая PIF для связывания с промоторами-мишенями и модуляции экспрессии генов, связанных с удлинением гипокотилия [2].

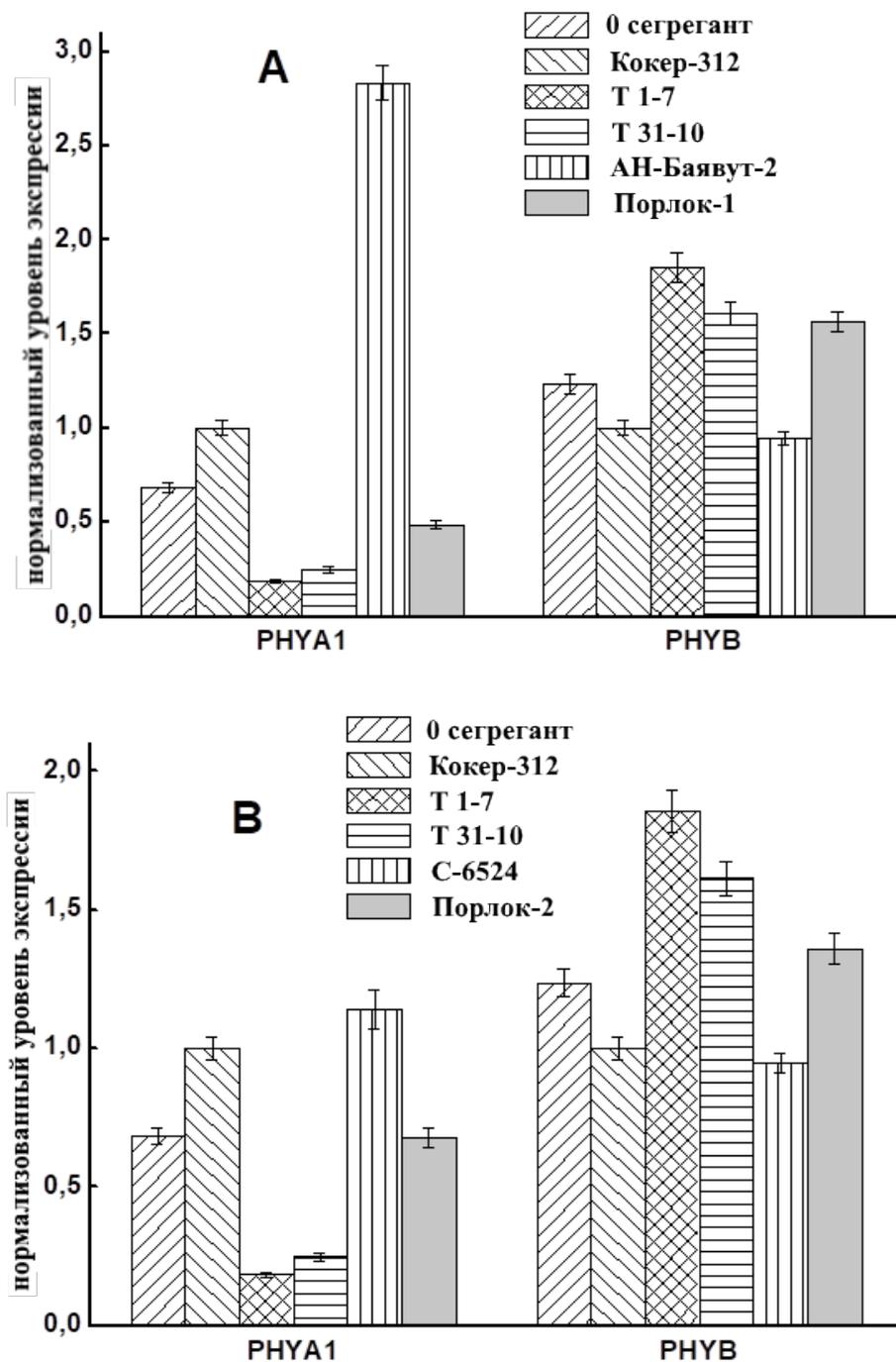
**Праймеры, использованные для количественного RT-PCR**

№	Название праймера	Праймерная последовательность (5'→3')	Кодируемый белок
1.	Gh_D10G2595F	CCATAACCGCGACCTTAACT	Липоксигеназа-3
2.	Gh_D10G2595R	CGGCAACTTCTTCACTGTTTC	
3.	Gh_D02G0992F	TCGAGTTCCTCGGGAATTTAAG	Семейство белков ксилоглюкан эндотрансглюкозилазы гидролазы
4.	Gh_D02G0992R	CAGTTGGGTCAAACCAGAGATA	
5.	Gh_D02G0733F	GCAGAAGGATGAAGTCCGTATTA	Алкоголь дегидрогеназа
6.	Gh_D02G0733R	GACCTAGTATGCGAGGAAACAG	
7.	Gh_D08G1639F	GGTGTCCCTGTGTGATGATT	АВА 8'-гидроксилаза
8.	Gh_D08G1639R	TGCCCAACATCCTCTCTTTAC	
9.	Gh_D05G3509F	GAGGTCCTTAT GTGCGGATTAC	scarecrow-подобный белок 21
10.	Gh_D05G3509R	CTGCTCGGATAGTTCATCAAA	
11.	Gh_A05G0931F	TCCGTCCGGGTCTCTATTATC	Вероятный белок фосфатазы 2с 25
12.	Gh_A05G0931R	TTGGCCTCTTCTCTTCAATATC	
13.	Gh_D09G0953F	GAGGAGGCAAGGGATTGATTT	Вероятный гомолог 11 csg4-ассоциированного фактора
14.	Gh_D09G0953R	CCCAACTCACCGACTCATTAC	
15.	Gh_D05G0148F	CTCCTGTGCTTGTGTCTCTAAG	ein3-связывающий f-бокс подобный белок 1
16.	Gh_D05G0148R	CGTTCTCCTTGACCACCTTT	
17.	Gh_D11G2932F	CTTTGGCACTTCACGAACAAG	Белок, подобный ингибитору пектинэстеразы
18.	Gh_D11G2932R	AACTCACGCCTCTGGTAAAC	
19.	Gh_D13G0889F	CTTTGGCACTTCACGAACAAG	Белок, подобный цитозольной сульфотрансферазе 12
20.	Gh_D13G0889R	AACTCACGCCTCTGGTAAAC	
21.	Gh_Sca016160G01F	AGTGCTTTACAACCCGAAGG	Гипотетический белок M569_00222
22.	Gh_Sca016160G01R	ACACGGTCCAGACTCCTAC	
23.	Gh_D05G0805F	GTGGACCAAACCAGCTATACA	Семейство белков ole e1 аллергена пыльцы и экстенсина
24.	Gh_D05G0805R	AGGGCATGAAGTGGAGAAAG	
25.	Gh_UBQ7F	GAAGGCATCCACCTGACCAAC	Убиквитин
26.	Gh_UBQ7R	CTTGACCTTCTTCTTGTGCTTG	

Таким образом, эффекты *phyA* и фитогормонов в трансдукции сигналов являются антагонистичными и, следовательно, ингибирование экспрессии *PHYA* должно закономерно приводить к ускорению роста клеток. Кроме того, известно, что большинство фитогормонов регулируют развитие волокон хлопчатника [2, 4]. При этом ИУК, ГК, этилен и БР стимулируют элонгацию волокон хлопчатника, что также подтверждается накоплением транскриптов генов, регулирующих синтез этих гормонов, на разных стадиях развития волокна [2, 4].

Суммируя эти данные и результаты экспрессии генов *PHYA1* и *PHYB*, можно предположить, что эффекты сайленсинга гена *PHYA1* могут быть опосредованы за счет активации PIFs фитогормонами, связанными с удлинением волокна либо за счет оверэкспрессии гена *PHYB*.

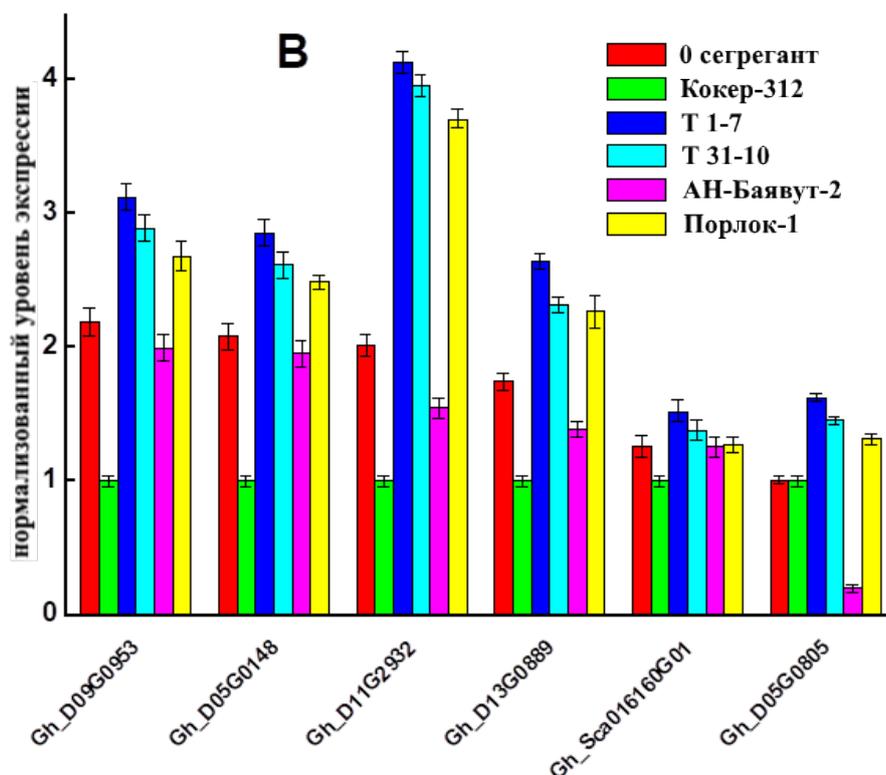
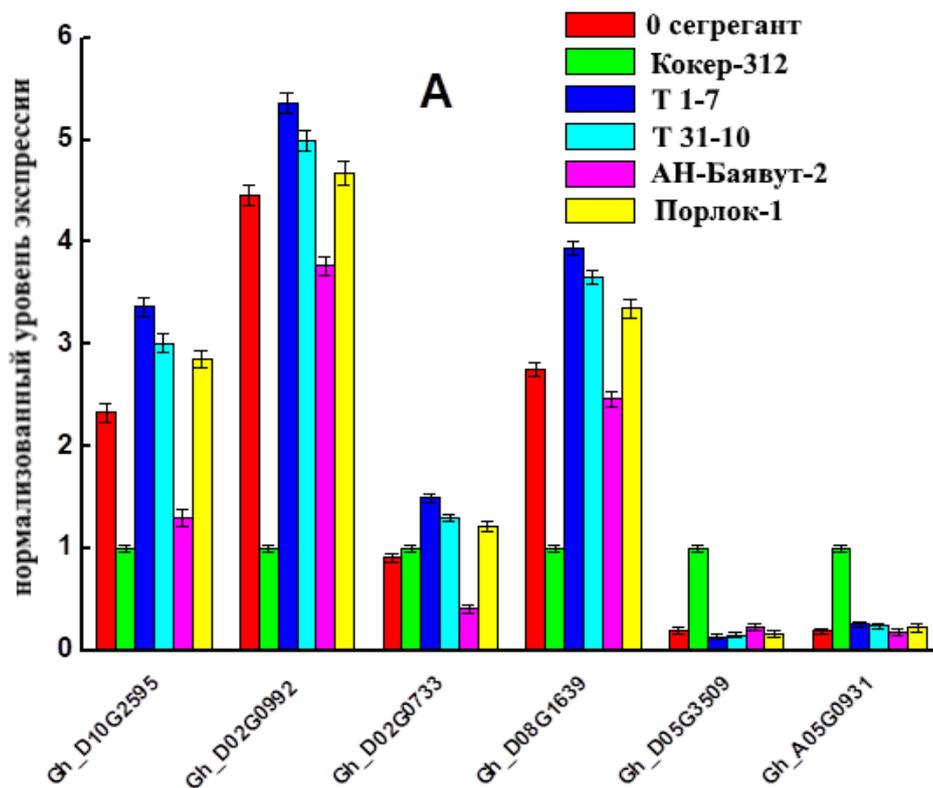
На основании этого предположения было проведено сравнительное исследование изменения экспрессии дифференциально экспрессируемых генов (DEG) в нокаутных генах и немодифицированных сортах хлопка.



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

Результаты исследований показали, что уровни транскрипции многих генов у ген-нокаутных сортов были значительно изменены. Так, например, экспрессия гена, кодирующего АВА 8'-гидроксилазу (Gh\_D08G1639), тип цитохрома P450 монооксигеназы, которая катализирует первый этап окислительной деградации АВА, была увеличена (рис. 2, 3).

Кроме того, было выявлено влияние сайленсинга гена *PHYA1* на некоторые белки и ферменты, вовлеченные в процесс биогенеза и организации клеточной стенки. Например, экспрессия гена, кодирующего семейство белков ксиланглюкан эндотрансглюкозилазы гидролазы (Gh\_D02G0992), была увеличена у сортов серии Порлок как по сравнению с исходным сортом Кокер-312, так и с родительскими сортами АН-Баявут-2 и С-6524 (рис. 2, 3).



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

В тоже время при сравнительном исследовании уровня транскриптов ДЭГ у ген-нокаутных сортов было показано, что экспрессия генов, кодирующих семейство белков ole e1 аллергена пыльцы и экстенсина (Gh\_D05G0805), белок, подобный цитозольной сульфотрансферазе 12 (Gh\_D13G0889),

вероятный гомолог 11 ccr4-ассоциированного фактора (Gh\_D09G0953), ein3-связывающий f-бокс подобный белок 1 (Gh\_D05G0148), алкоголь дегидрогеназу (Gh\_D02G0733), липоксигеназу-3 (Gh\_D10G2595), белок, подобный ингибитору пектинэстеразы (Gh\_D11G2932), и гипотетический белок M569\_00222 (Gh\_Sca016160G01), была увеличена у обоих ген-нокаутных сортов серии Порлок по сравнению с контрольным сортом Кокер-312. Экспрессия других генов, включая Gh\_D05G3509 (scarecrow-подобный белок 21) и Gh\_A05G0931 (вероятный белок фосфатазы 2с 25), была снижена у RNAi сортов относительно Кокер-312 (рис. 2, 3).

Ранее было показано, что хлопчатник с RNAi гена *PHYA1* обладает более длинным волокном по сравнению с нетрансформированным Кокер-312 [1]. Длина волокна определяется синтезом первичной клеточной стенки. Хотя компоненты клеточной стенки волокна динамически изменяются в течение всего развития, первичные стенки хлопковых волокон, подобно другим растущим клеткам растений, в основном содержат целлюлозу, пектин, ксилоглюкан, лигнин и богатый гидроксипролином гликопротеин [18]. Экстенсин, один из гликопротеинов, участвует в создании каркасной сети клеточной стенки [19]. В результате исследований было показано, что экспрессия гена, кодирующего семейство белков ole e1 аллергена пыльцы и экстенсина (Gh\_D05G0805), была увеличена у RNAi сортов хлопчатника.

ole e1 содержащие белки были впервые идентифицированы как основные аллергены и обычно присутствуют у многих растений, включая хлопчатник. Он экспрессируется не только в пыльце, но и в других растительных тканях [18]. Было показано, что ole e1-содержащий белок, кодируемый *AtAGP30* у *Arabidopsis*, необходим для регенерации корней и прорастания семян [18]. Разумно предположить, что экстенсин играет важную роль в архитектуре первичной клеточной стенки хлопкового волокна, как и в других растительных клетках, и его повышенная экспрессия у ген-нокаутных сортов обуславливает более длинное волокно у данных сортов.

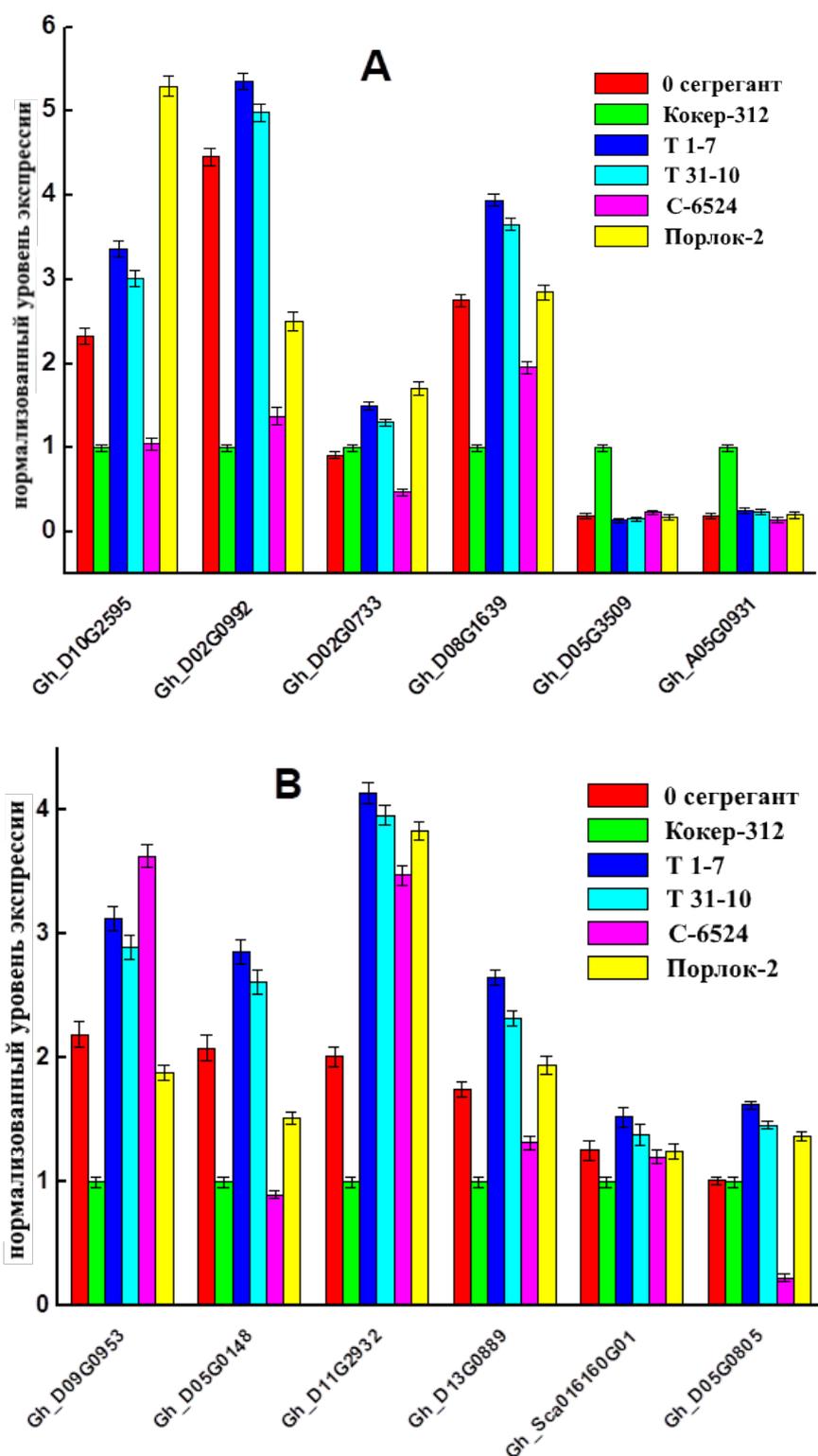
У хлопчатника brassinosterоиды (BR) положительно влияют на развитие волокон [4, 18]. В этом исследовании было обнаружено, что экспрессия гена Gh\_D13G0889, кодирующего белок, подобный цитозольной сульфотрансферазе 12, была увеличена у RNAi сортов хлопчатника относительно немодифицированного сорта Кокер-312. Эти данные позволяют предположить, что развитие волокон может регулироваться метаболизмом brassinosterоидов у RNAi сортов хлопчатника.

Известно, что помимо brassinosterоидов фитогормон абсцизовая кислота (АВА) ингибирует инициацию волокна [4, 18]. В тоже время известно, что АВА играет важную роль в ответах на абиотический стресс и адаптацию. При этом она действует как эндогенный мессенджер, регулирующий водный статус растений [20]. Кроме того, известно, что ген Gh\_D08G1639 кодирует белок, подобный 8'-гидроксилазе 1 абсцизовой кислоты. АВА 8'-гидроксилаза катализирует первую стадию инактивации АБК. Следовательно, увеличение уровня экспрессии гена Gh\_D08G1639 в листьях RNAi сортов хлопчатника относительно немодифицированного сорта Кокер-312 способствует повышению уровня АВА и, следовательно, может быть связано с повышенной устойчивостью сортов серии Порлок к абиотическим стрессам.

Хорошо известно, что этилен играет одну из основных ролей в элонгации хлопкового волокна и развитии устойчивости к водному дефициту [4, 18, 20, 21]. Результаты данного исследования показали, что ген Gh\_D05G0148, кодирующий ein3-связывающий f-бокс подобный белок 1 (EBF1), повышено экспрессируется у RNAi сортов хлопчатника по сравнению с немодифицированным сортом Кокер-312, что позволяет предположить возможную роль этилена в развитии установленной ранее устойчивости сортов линии Порлок к водному дефициту [1].

Солевой стресс часто вызывает окислительный стресс, который повреждает мембранные липиды. Липоксигеназы (LOX, EC 1.13.11.12) представляют собой диоксид-синтазы жирных кислот (ЖК) C18: 2 и C18: 3 в качестве субстратов, которые катализируют разрушение мембранных липидов и влияют на структуру и функцию мембран, и могут быть активированы абиотическими стрессами [22]. Производные окисленного жирных кислот (оксипирины) необходимы для регуляции процесса развития растений и защиты организма. Эти производные ЖК быстро разлагаются до метаболитов, которые приводят к образованию одного из фитогормонов – жасмонатов, играющих важную роль как в инициации хлопкового волокна, так и в развитии устойчивости хлопчатника к водному и солевому стрессу [23]. Следовательно, обнаруженное у ген-нокаутных сортов хлопчатника увеличение уровня экспрессии гена липоксигеназы-3 (Gh\_D10G2595) может способствовать как

более активной инициации волокон у ген-нокаутных сортов хлопчатника, так и повышенной стрессоустойчивости к абиотическим стрессам за счет повышенного образования жасмоновой кислоты.



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

Таким образом, суммируя данные по сравнительной экспрессии генов фитохромов А и В, а также ДЭГ в листьях ген-нокаутных сортов можно предположить, что реализация эффектов RNAi гена

*PHYA1* реализуется через систему фитогормональной регуляции, которая способствует не только развитию волокна хлопчатника, но и повышению устойчивости исследуемых генотипов хлопчатника к водному и солевому стрессу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abdurakhmonov I.Y., et al. 2014. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. *Nat Comm.* 5: 3062.
2. Ahmed M., et al. 2018. An overview of genetic and hormonal control of cotton fiber development. *Pak. J. Bot.* 50(1): 433-443.
3. Kosmidou-Dimitropoulou K. 1986. Hormonal Influences on Fiber Development. In *Cotton Physiology. The Cotton Foundation: Memphis, TN.* 361-373.
4. Liao W., et al. 2010. The role of phytohormones in cotton fiber development. *Russian Journal of Plant Physiology.* 57 (4): 462–468.
5. Shanguan X.X., et al. 2010. Recent Advances in Molecular Biology Research on Cotton Fiber Development. In *Cotton: Biotechnological Advances.* Eds. by Zehr U.B. Springer Science+Business Media B.V. USA. P. 161-175.
6. Samad A.F.A., et al. 2017. MicroRNA and Transcription Factor: Key Players in Plant Regulatory Network. *Frontiers in Plant Science.* 8: 565.
7. Guan X., Song Q., Chen Z.J. 2014. Polyploidy and Small RNA Regulation of Cotton Fiber Development. *Trends in Plant Science.* 19: 516-528.
8. Butterworth K.M., et al. 2009. Initiation and early development of fiber in wild and cultivated cotton. *Int. J. Plant Sci.* 170: 561-574.
9. Wang Z., et al. 2013. A Whole-Genome DNA Marker Map for Cotton Based on the D-Genome Sequence of *Gossypium raimondii* L. *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 3: 1759-1767.
10. Wu Y., Llewellyn D.J., Dennis E.S. 2002. A quick and easy method for isolating good-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 213–218.
11. Fu W., 2015. Acyl-CoA N-Acyltransferase Influences Fertility by Regulating Lipid Metabolism and Jasmonic Acid Biogenesis in Cotton. *Scientific Reports.* 5: 11790.
12. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 25: 402-408.
13. Hennig L., et al. 2001. Negative Interference of Endogenous Phytochrome B with Phytochrome A Function in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 125: 1036-1044.
14. Casal J.J., Candia A.N., Sellaro R. 2014. Light perception and signalling by phytochrome A. *Journal of Experimental Botany.* 65 (11): 2835–2845.
15. Sheerin D.J., Hiltbrunner A. 2017. Molecular mechanisms and ecological function of far-red light signalling. *Plant Cell Environ.* 40(11): 2509-2529.
16. Lymeropoulos P., Msanne J., Rabara R. 2018. Phytochrome and Phytohormones: Working in Tandem for Plant Growth and Development. *Frontiers in Plant Science.* 9: Article 1037.
17. Kong S.G., Okajima K. 2016. Diverse photoreceptors and light responses in plants. *J. Plant Res.* 129: 111–114.
18. Miao Q., et al. 2017. Transcriptome Analysis of Ten-DPA Fiber in an Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*) Line with Improved Fiber Traits from Phytochrome A1 RNAi Plants. *American Journal of Plant Sciences.* 8: 2530-2553.
19. Lampion D.T., Kieliszewski M.J., Chen Y. Cannon M.C. 2011. Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture. *Plant Physiology.* 156: 11-19.
20. Ullah A., et al. 2018. Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environ Sci Pollut Res Int.* 25 (33): 33103-33118.
21. Liu C., Zhang T. 2017. Expansion and stress responses of the AP2/EREBP superfamily in cotton. *BMC Genomics.* 18: 118.
22. Zhang L., et al. 2013. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. *J Plant Res.* 126: 293–304
23. Zhang W., et al. 2017. Plastic transcriptomes stabilize immunity to pathogen diversity: the jasmonic acid and salicylic acid networks within the Arabidopsis/Botrytis pathosystem. *Plant Cell.* 29: 2727–2752.

## МУНДАРИЖА

Buriev Z.T., Abduraxmonov I.Yu. Gu'zani <i>MIC-3</i> geneni promotor qismini klonlash nukleotid ketma ketligini aniqlash va seriyali genetik tuzilmalarini yaratish.....	3
Salakhutdinov I.B., Khurshut, Rajapov F.S., Bikmetova D.I., Zuparova D.M., Arzumanov A.Sh. Mikrosatellit markerlari yordamida Tojikiston uzum navlari seleksiyasi xilma-xilligi taxlili .....	9
Mamajonov B.O., Ayubov M.S., Norov T.M., Nazirov M., Kazbekov M.J., Khasanova N.A., Buriev Z.T., Shermatov Sh.E., Abdurakhmonov I.Y. <i>Arabidopsis thaliana</i> ning kriptoxrom-1 ( <i>CRY1</i> ) genini tavsiflash .....	13
Shermatov Sh.E., Usmonov D.E., Mirzakhmedov M.Kh., Ayubov M.S., Abduraxmonov I.Yu. Fitoxrom A1 ( <i>PHYA1</i> ) geni RNK-interferenciylangan go'zada mikroRNK ekspressiyasini profilini baholash .....	17
Kamburova V.S., Ubaydullayeva X.A., Charyshnikova O.S., Nasrieva K.S., Aburakhmonov I.Y. Gen-nokaut g'o'za navlarning antioksidant fermentlar tizimning faolligi.....	22
Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Sobirov B.M., Muhammadov J.A., Mamanazarov S.I., Mamadjanov A. <i>npt II</i> genining gen-nokaut g'o'zaning avlodlarida namoyon etilishi .....	30
Kamburova V.S., Ubaydullayeva X.A., Abdurakhmonov I.Y. Gen-nokaut g'o'za navlarning biokimyoviy parametrlarni tadbiq qilish .....	35
Turayev O.S., Xusenov N.N., Darmanov M.M., Makamov A.X., Kushanov F.N., Buriyev Z.T., Abdukarimov A. DNK-markerlar texnologiyasi asosida yaratilgan Saxovat g'o'za navi tola sifati va agronomik ko'rsatkichlarining tahlili .....	41
Kamburova V.S., Ubaydullaeva X.A., Darmanov M.M., Usmanov D.E., Shermatov Sh.E., Abdurakhmonov I.Y. Gen-nokaut g'o'za navlarning differentsial ekspressiyalanuvchi genlarini tadbiq qilish.....	46

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Клонирование, секвенирование и создание серийных генетических конструкций промоторного региона <i>MIC-3</i> гена хлопчатника .....	3
Салахутдинов И.Б., Хуршут Э.Э., Раджапов Ф.С., Тожибаева Д.И., Зупарова Д.М., Арзуманов А.Ш. Анализ генетического разнообразия сортов винограда таджикской селекции с использованием микросателлитных маркеров.....	9
Мамажонов Б.О., Аюбов М.С., Норов Т.М., Назиров М., Казбеков М.Ж., Хасанова Н.А., Буриев З.Т., Шерматов Ш.Э., Абдурахмонов И.Ю. Характеристика гена криптохрома-1 ( <i>CRY1</i> ) у <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
Шерматов Ш.Э., Усманов Д.Э., Мирзахмедов М.Х., Аюбов М.С., Абдурахмонов И.Ю. Оценка профиля экспрессии микроРНК у хлопчатника с РНК-интерференцией гена фитохрома A1 ( <i>PHYA1</i> ) .....	17
Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Чарышникова О.С., Насриева К.С., Абдурахмонов И.Ю. Активность ферментов антиоксидантной системы у ген-нокаутных сортов хлопчатника .....	22
Имамходжаева А.С., Кадырова Ш.Б., Собиров Б.М., Мухаммедов Й.А., Маманазаров Ш.И., Мамаджанов А. Характер проявления гена <i>npt II</i> у ген-нокаутных растений хлопчатника.....	30
Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Абдурахмонов И.Ю. Сравнительное исследование биохимических параметров ген-нокаутных сортов хлопчатника .....	35
Тураев О.С., Хусенов Н.Н., Дарманов М.М., Макамов А.Х., Кушанов Ф.Н., Буриев З.Т., Абдукаримов А. Анализ агрономических показателей и качества волокна сорта хлопчатника «Саховат» созданных на основе технологии ДНК-маркеров .....	41
Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Дарманов М.М., Усманов Д.Э., Шерматов Ш.Э., Абдурахмонов И.Ю. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов у ген-нокаутных сортов хлопчатника .....	46

## CONTENTS

Buriev Z.T., Abduraxmonov I.Yu. Cloning, sequencing and creation of serial genetic structures of the promotor region <i>MIC-3</i> of the cotton gene .....	3
Salakhutdinov I.B., Khurshut, Rajapov F.S., Bikmetova D.I., Zuparova D.M., Arzumanov A.Sh. The genetic diversity analysis of Tajik grape varieties using microsatellite markers .....	9
Mamajonov B.O., Ayubov M.S., Norov T.M., Nazirov M., Kazbekov M.J., Khasanova N.A., Buriev Z.T., Shermatov Sh.E., Abdurakhmonov I.Y. Characterization of <i>Arabidopsis thaliana</i> cryptochrome-1 gene ( <i>CRY1</i> ) .....	13
Shermatov S.E., Usmonov D.E., Mirzakhmedov M.Kh., Ayubov M.S., Abduraxmonov I.Y. Evaluation of microRNA expression profiles in cotton phytochrome A1 ( <i>PHYA1</i> ) RNAi lines.....	17
Kamburova V.S., Ubaydullayeva Kh.A., Charyshnikova O.S., Nasrieva K.S., Aburakhmonov I.Y. Activity of antioxidant system enzymes in gene-knock-out breeder varieties .....	22
Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Sobirov B.M., Muhammadov J.A., Mamanazarov S.I., Mamadjanov A. The behavior of display of gene <i>npt II</i> at gene-knockout of cotton-plants.....	30
Kamburova V.S., Ubaydullayeva Kh.A., Abdurakhmonov I.Y. Comparative study of biochemical parameters in gene-knockout cotton varieties .....	35
Turaev O.S., Xusenov N.N., Darmanov M.M., Makamov A.Kh., Kushanov F.N., Buriev Z.T., Abdukarimov A. Analysis of fiber quality and agronomic traits of Sakhovat cotton cultivar derived through DNA-markers technologies .....	41
Kamburova V.S., Ubaydullaeva Kh.A., Darmanov M.M., Usmanov D.E., Shermatov S.E., Abdurakhmonov I.Y. Analysis of differentially expressed genes in gene knock-out cotton varieties .....	46